

# 葡萄芪合酶基因 cDNA 片段酵母表达载体的构建 及其在酿酒酵母中的表达

刘林丽<sup>a</sup>, 王跃进<sup>b</sup>

(西北农林科技大学 a. 生命科学学院; b. 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

**[摘 要]** 应用基因重组技术, 将从华东葡萄白河-35-1 中分离出的长 1 179 bp 芪合酶(stilbene synthase, STS) 基因的 cDNA 片段克隆入大肠杆菌-酵母菌穿梭型诱导表达载体 pYES6/CT 上, 构建重组酵母真核表达质粒 pYES6/CT-STS, 转化酿酒酵母菌株 INVSc1, 用 Blasticidin(bsd) 筛选出阳性克隆转化子, 经半乳糖诱导表达后进行 5 个时间段菌体全蛋白 SDS-PAGE 电泳和 Western-blot 分析。结果发现, 诱导 4 h 后开始有目标带(48 ku) 出现, 诱导 16 h 开始大量且稳定表达。证明目的基因片段可以在酿酒酵母中表达, 为后续基因功能的验证奠定了基础。

**[关键词]** 芪合酶; 酵母表达载体; 载体构建; 诱导表达

**[中图分类号]** Q78

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2007)12-0205-05

## Construction of yeast expression vector and inducible expression of cDNA fragment of stilbene synthase in yeast

LIU Lin-li<sup>a</sup>, WANG Yue-jin<sup>b</sup>

(a. College of Life Sciences, b. College of Horticulture,  
Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** With the technology of gene recombination, we cloned gene of STS full-length cDNA from vitis pseudoreticulata Baihe35-1 into pYES6/CT, a shuttle type plasmid vector of yeast, and transformed INVSc1. The recombinant strains were selected with Blasticidin. The recombinant protein was induced with galactose, and the products of 5 culturing periods were identified by SDS-PAGE and Western-blot analysis. The target band was found after induced 4 h, and rich stable expressions of the target protein appeared after 16 h. The result showed that the fragment of target gene from grape could be expressed in yeast, which may lay a foundation for identifying the function of target gene.

**Key words:** stilbene synthase; yeast expression vector; vector construction; expression

芪合酶是合成芪类次生代谢物的关键酶<sup>[1]</sup>。芪合酶基因主要存在于葡萄、花生、松树等植物中, 当植株受到真菌等外部侵染时, 植株体内会大量合成一系列芪类次生代谢物来抵御这些侵染。芪类次生代谢物是一类多酚类化合物, 在植株体内起植保素

作用, 与植株本身的抗病性密切相关<sup>[2]</sup>。伴随着基因工程操作技术的建立和发展, 将芪合酶基因转入植物来培育抗性植株的研究已倍受科学家的关注<sup>[3]</sup>, 并在小麦、大麦<sup>[4-5]</sup>、番茄<sup>[6-7]</sup>、水稻<sup>[8]</sup>、玉米<sup>[9]</sup>、烟草<sup>[10-11]</sup>等多种植物的转化中取得了重要进展。大

\* [收稿日期] 2006-11-22

[基金项目] 国家科技部转基因专项(JY03-A-19-02); 西北农林科技大学科研专项(JY-A-19-02)

[作者简介] 刘林丽(1967—), 女, 陕西澄城人, 高级实验师, 博士, 主要从事生化与分子生物学研究。E-mail: hilaryliu@163.com

[通讯作者] 王跃进(1958—), 男, 陕西三原人, 教授, 博士生导师, 主要从事中国葡萄属野生种抗病基因分子标记、基因克隆与育种利用研究及无核葡萄育种研究。E-mail: wangyuejin@263.net

量研究表明,芪合酶基因的表达活性及合成次生代谢物的能力取决于其结构<sup>[12-13]</sup>,所以,不同来源的芪合酶基因,其结构存在一定差异,表达活性和合成芪类次生代谢物的能力也不同。对于分离到的目的基因,通过植株转化验证其表达活性和功能,不仅操作复杂、周期长、成本高、转化率低,而且常常出现基因沉默等现象,所以,对从一些具有优良特性的生物中分离到的大量基因,选择一种准确、快速的功能验证途径显得尤为重要。本研究应用基因重组技术构建芪合酶基因酵母表达载体,并转入酿酒酵母菌,拟通过分析芪合酶基因在酵母中的表达能力及其酶活性,摸索一条未知基因表达活性及其功能验证的有效途径,构建功能基因库,加速基因工程遗传育种的进程。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

限制性内切酶 *Xho* I、*Bam*H I、*T*<sub>4</sub> DNA Ligase 为 Ferment 公司产品,酵母培养基、电泳试剂、蛋白分子量标记、DNA Marker IV、半乳糖、棉籽糖、蛋白酶抑制剂(PSMF)等均购自沃尔森公司,酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)菌株 INVSc1、酿酒酵母穿梭质粒 pYES6/CT、Blasticidin(Bsd,杀稻瘟素)均购自 Invitrogen 公司,DNA Extraction kit 为优品公司产品,一抗(Anti-His Antibody)和二抗(anti-mouse IgG)购自 SIGMA。

### 1.2 培养基<sup>[14]</sup>

LB 平板培养基:10 g/L 胰蛋白胨,5 g/L 酵母提取物,10 g/L NaCl,用 NaOH 调 pH 至 7.0(固体培养基加 10 g/L 的琼脂粉)。

YPD 培养基:20 g/L 胰蛋白胨,10 g/L 酵母提取物,20 g/L 葡萄糖(固体培养基加 20 g/L 的琼脂粉)。

SC 选择培养基:含 25  $\mu$ g/mL 杀稻瘟素的 YPD。

诱导培养基:配制 1 L。将 20 g 胰蛋白胨和 10 g 酵母提取物溶解在 800 mL 水中,高压灭菌,冷却至 50  $^{\circ}$ C,再向其中加入 1 mL 的 10 mg/mL Bsd、100 mL 过滤除菌的 200 g/L 半乳糖及 100 mL 过滤除菌的 100 g/L 棉籽糖。

### 1.3 引物

对已获得的芪合酶基因 cDNA 序列,设计合成一对特异引物,并引入限制性酶切位点 *Bam*H I /

*Xho* I 及保护碱基。

5' 端序列:TAGGATCCATGGCTTCAGTT-GAGGAAAT;

3'端序列:CCTATGGTTACAAATTAAGTCGAG-GC。

以上引物由上海生工生物工程有限公司合成。

### 1.4 pYES6/CT-STS 酵母表达载体的构建及大肠杆菌阳性转化子的筛选<sup>[15]</sup>

设计特异引物,对芪合酶基因 cDNA 片段进行 PCR 扩增,引入 *Bam*H I / *Xho* I 酶切位点,琼脂糖凝胶电泳分离,试剂盒回收目标带,并进行 *Bam*H I / *Xho* I 双酶切,电泳再回收酶切片段;同时对酵母表达质粒 pYES6/CT 也进行 *Bam*H I / *Xho* I 双酶切,电泳回收酶切大片段。对回收的目的基因双酶切片段和 pYES6/CT 大片段进行定向连接,并转化大肠杆菌,用含 Amp(氨苄青霉素)的 LB 平板培养基筛选,并进行菌落 PCR 鉴定,PCR 反应体系(25  $\mu$ L)为少许菌落+2.5  $\mu$ L 10 $\times$ PCR Buffer+1  $\mu$ L dNTPs+1  $\mu$ L 5'端引物+1  $\mu$ L 3'端引物+1  $\mu$ L *Taq* DNA 聚合酶+18.5  $\mu$ L 双蒸水。反应程序为:94  $^{\circ}$ C 预变性;94  $^{\circ}$ C 30 s,65  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 1 min,共循环 35 次;72  $^{\circ}$ C 延伸,4  $^{\circ}$ C 保存。挑取阳性单克隆进行扩大培养,碱裂解法提取重组质粒 pYES6/CT-STS,分别对 pYES6/CT-STS 进行 *Bam*H I / *Xho* I 单、双酶切和琼脂糖凝胶电泳鉴定,表达载体的构建过程见图 1。

### 1.5 重组质粒 pYES6/CT-STS 转化酵母

按照 Invitrogen 载体手册并参考文献[15]制备酿酒酵母感受态细胞,用构建好的表达载体重组质粒 pYES6/CT-STS 转化酿酒酵母感受态细胞,用含 Bsd 的 YPD 培养基进行抗性筛选。

### 1.6 重组质粒 pYES6/CT-STS 在酿酒酵母 INVSc1 中的诱导表达

依照 Invitrogen 载体手册和文献[16]进行 pYES6/CT-STS 在酿酒酵母 INVSc1 中的诱导表达。挑取抗性重组酵母菌单克隆,接种于 15 mL 含 100  $\mu$ g/mL Bsd、20 g/L 葡萄糖的 SC 选择培养基中,30  $^{\circ}$ C、200 r/min 过夜培养至  $OD_{600}$  值为 3.0,将培养物于 4  $^{\circ}$ C、1 500 g 离心 5 min,弃上清液,重悬菌体于 90 mL 诱导培养基中,30  $^{\circ}$ C、200 r/min 摇菌继续培养。分别于菌体加入诱导培养基后的 4,8,12,16,20 和 24 h 取菌液,每次 10 mL。

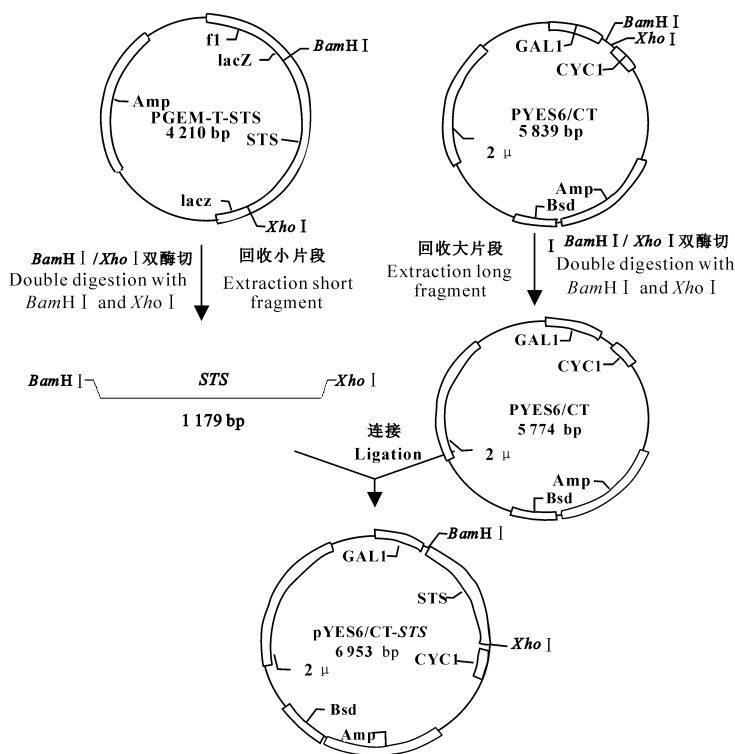


图1 质粒 pYES6/CT-STS 的构建示意图

Fig. 1 Sketch map of plasmid pYES6/CT-STS

## 1.7 表达产物的 SDS-PAGE 电泳和 Western-blot 分析

依照 Invitrogen 载体手册和文献[14-15]测定所有提取菌液的  $OD_{600}$  值后,于 4℃、1 500 g 离心 5 min,收集各时间段菌体,并重悬于 500  $\mu$ L 灭菌水中。转移悬浮细胞于另一离心管中,13 000 r/min 离心 30 s,弃上清液,收集细胞。用破菌缓冲液(50 mmol/L pH 7.4 磷酸缓冲液,1 mmol/L EDTA1, 50 mL/L 甘油,0.01  $\mu$ L/mL PMSF)进行破菌处理,13 000 r/min 离心 20 min,收集上清液,并进行 SDS-PAGE 电泳分析。根据电泳结果选择目标物表达量最大的菌体破碎液(诱导 16 h)进行 Western-blot 分析(以空酵母菌为对照)。

## 2 结果与分析

### 2.1 pYES6/CT-STS 酵母表达载体的构建

pYES6/CT-STS 酵母表达载体经过 *Xho* I、*Bam*HI 单、双酶切后的电泳结果如图 2 所示。重组质粒 pYES6/CT-STS 经 *Xho* I、*Bam*HI 单酶切后,会由闭合环状变成链状的线性分子,因此在琼脂糖凝胶中的迁移速率就会降低,故图 2 中 2、3 泳道的条带较 1 泳道的稍滞后一点。

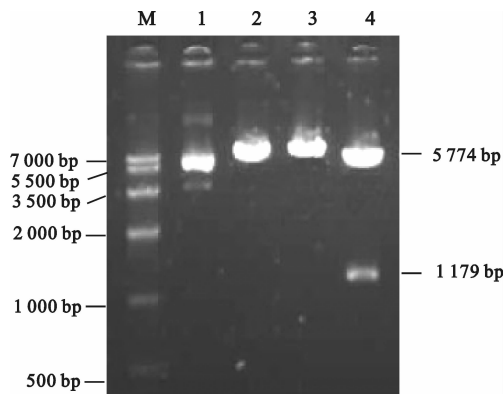


图2 重组质粒 pYES6/CT-STS 的酶切电泳结果

M. DNA 分子量标记 IV; 1. 重组质粒 pYES6/CT-STS;  
2. 重组质粒 pYES6/CT-STS 的 *Bam*HI 单酶切产物;  
3. 重组质粒 pYES6/CT-STS 的 *Xho* I 单酶切产物;  
4. 重组质粒 pYES6/CT-STS 的 *Bam*HI 和 *Xho* I 双酶切产物

Fig. 2 Enzyme-digestion identification of recombinant vector pYES6/CT-STS  
M. DNA Marker IV; 1. Recombinant plasmid pYES6/CT-STS;  
2. Restriction digestion plasmid pYES6/CT-STS with *Bam*HI;  
3. Restriction digestion plasmid pYES6/CT-STS with *Xho* I;  
4. Restriction digestion plasmid pYES6/CT-STS with *Bam*HI and *Xho* I

重组质粒 pYES6/CT-STs 经 *Xho* I、*Bam*H I 双酶切后应该得到 pYES6/CT(5 774 bp)和 STs(1 179 bp)两种片段,结果所得片段大小与预期结果相同。由此可知,STs 基因 cDNA 片段不仅成功克隆入酿酒酵母诱导表达载体 pYES6/CT 中,而且是正向插入,这是基因能在表达载体上正确表达的前提。

2.2 酵母 pYES6/CT-STs 重组质粒转化及阳性转化子的筛选

重组质粒转化感受态酿酒酵母后,经 YPD/Bsd 抗性培养基筛选出阳性转化子菌落,其 PCR 鉴定结果如图 3 所示。图 3 中的 1、2 泳道都有清晰的目标带,证实了经 YPD/Bsd 培养基抗性筛选出的阳性转化子确实携带目的基因片段。由此可以证明, pYES6/CT-STs 重组质粒已成功整合入酵母菌中。

2.3 pYES6/CT-STs 在酿酒酵母 INVSc1 中的诱导表达及表达产物的 SDS-PAGE 电泳和 Western-blot 分析

携带重组质粒 pYES6/CT-STs 的宿主菌 INVSc1 经半乳糖诱导后,其菌体裂解物的 SDS-PAGE 电泳结果如图 4 所示。图 4 中的 1~6 泳道中均出现了预期的条带(48 ku),由此可知,经过半乳糖诱导后,重组工程菌可以表达出分子质量为 48

ku(STs 为 43 ku,6×His-Tagged 为 5 ku)的重组蛋白。利用 Gel-pro 软件对 SDS-PAGE 胶中各泳道进行分析,结果表明,目的条带占总蛋白的比例随诱导时间延长而增加,在诱导 16 h 达到表达高峰,此后持续稳定表达。用 6×His-Tagged 一抗和碱性磷酸酶标记的二抗对表达产物作 Western blot 分析,结果见图 5。

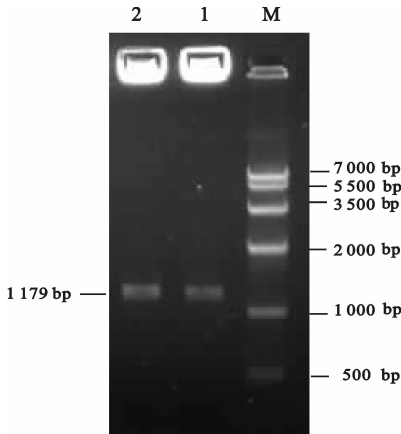


图 3 转化 DH5α 菌落的 PCR 电泳结果  
M. DNA 分子量标记 IV;1,2. 菌落直接 PCR 产物  
Fig. 3 Identification of transformed DH5 with PCR  
M. DNA Marker IV;1,2. Recombinant colony directly by PCR

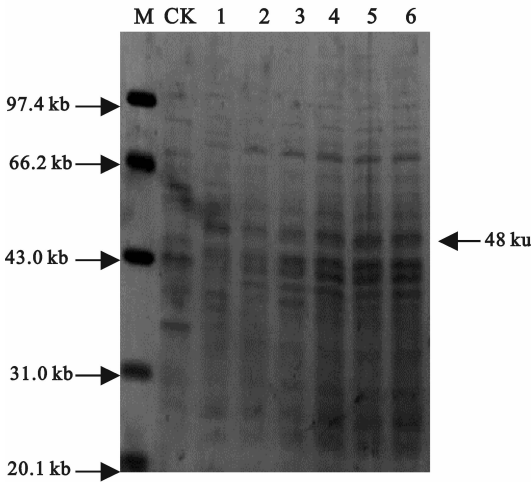


图 4 表达产物的 SDS-PAGE 电泳结果  
M. 标准分子量蛋白;CK. 阴性对照(未转化的酵母);  
1~6. 分别为诱导 4,8,12,16,20 和 24 h 的酵母菌表达产物  
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of expressing production  
M. Protein Marker;CK. Negative control;  
1-6. Expressing production of induced 4,8,12,16,20 and 24 in yeast

由图 5 可知,泳道中出现能与一抗反应、大小为 48 ku 的重组蛋白,与预期结果相同,进一步表明重组工程菌经过诱导,可以表达出分子质量为 48 ku 的目标产物。

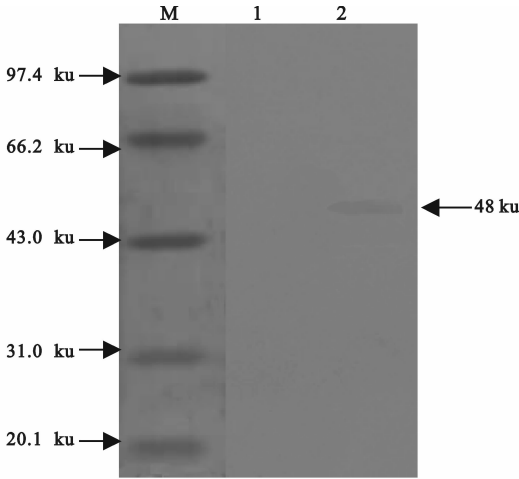


图 5 表达产物的 Western-blot 分析结果  
M. 标准分子量蛋白;1. 未转化酵母的 Western blot;  
2. 表达产物的 Western blot  
Fig. 5 Western blot analysis of expressing production  
M. Protein Marker;1. Western blot of untransformed yeast;  
2. Western blot analysis of expressing production

3 讨论

通过对工程菌的诱导表达,得到了预期分子质量为 48 ku 的目标产物,证明目的基因片段已被正

确插入载体,且有完整的开放阅读框,在真核生物中有表达功能。

试验选择酵母作为目的基因表达的工程菌株,与模式植物相比,不仅试验操作和试验条件简单、成本低,不受季节限制,而且试验周期短、结果易于检测。更重要的是,选用酵母表达系统,不会出现植物转化中常出现的转化率低和基因沉默现象,可以保证在预计时间内有试验结果。

pYES6/CT 载体具有用于通过抗-V5 抗体进行检测的 C-末端 V5 表位和 His-tagged 的重组蛋白,便于表达产物的 Western blot 分析和分离纯化、检测。在本试验的 Western blot 检测中,使用的是检测 6×His 标记的蛋白抗体,只能初步证明插入的基因片段在真核生物中可以表达,而表达产物是否为芪合酶,还要经过芪合酶抗体的 Western blot<sup>[17-18]</sup>检测来确定;同样,表达产物是否有预期的酶活性,也需要经过相应的酶活性分析<sup>[19]</sup>后才能证明。

## [参考文献]

[1] Borie B, Jeandet P, Parize A, et al. Resveratrol and stilbene synthase mRNA production in grapevine leaves treated with biotic and abiotic phytoalexin elicitors[J]. Am J Enol Vitic, 2004, 55:154-161.

[2] 胡小平, 孙 卉, 蔡文启, 等. 植物芪类植保素研究进展[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2003, 31(1):157-160.

[3] Hiroyuki O, Tsutomu T, Tohru O, et al. Strucyure of grapevine stilbene synthase gene inducing different amounts of resveratrol under elicitor treatment[J]. Am J Enol Vitic, 2001, 52(3):284-291.

[4] Fettig S, Hess D. Expression of a chimeric stilbene synthase gene in transgenic wheat lines[J]. Transgenic Research, 1999, 8:179-189.

[5] 梁 辉, 郑 金, 段霞雨, 等. 用基因枪法获得抗白粉病转芪合酶基因小麦[J]. 科学通报, 1999, 44(24):2644-2648.

[6] Thomzik J K, Stenzel K, Stocker R, et al. Synthesis of a grapevine phyto-alexin in transgenic tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill) condition resistance against Phytophthora infestans[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1997,

51:265-278.

[7] 谭 琳, 康有法, 马冰刚, 等. 芪合成酶基因转化番茄产生白藜芦醇的研究[J]. 生命科学研究, 2003, 7(3):262-266.

[8] Stark-Lorenzen P, Nelke B, Hänßler G, et al. Transfer of a grapevine stilbene synthase gene to rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Cell Reports, 1997, 16:668-673.

[9] 郭志鸿, 王汉宁, 陶 玲, 等. ubi 启动子驱动的花生芪合酶基因表达载体的构建及玉米遗传转化初报[J]. 甘肃农业大学学报, 2004, 39(2):117-123.

[10] Hain R, Bieseler B, Kindl H, et al. Expression of a stilbene synthase gene in Nicotiana tabacum results in synthesis of the phytoalexin resveratrol [J]. Plant Mol-Biol, 1990, 15: 325-335.

[11] Fischer R, Budde I, Hain R. Stilbene synthase gene expression causes changes in flower colour and malesterility in tobacco [J]. The Plant J, 1997, 11:489-498.

[12] Hain G, Reif H J, Krause Elvira, et al. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant[J]. Nature, 1993. 361:153-159.

[13] Schroder G, Brown J W, Schroder J. Molecular analysis of resveratrol synthase: cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase [J]. Eur J Biochem, 1988, 172(1): 161-169.

[14] 刘进元, 常智杰, 赵广荣. 分子生物学实验指导[M]. 北京:清华大学出版社, 2002:3-4, 24-25.

[15] Adams A, Gottschling D E, Kaiser C A, et al. Methods in yeast genetics: a cold spring harbor laboratory course manual [M]. 刘子铎, 译. 北京:科学出版社, 2000:81-82, 105.

[16] 吴丽娟, 蒋建新, 朱佩芳, 等. 酵母表达系统及其应用研究[J]. 生命的化学, 2003, 23(1):46-49.

[17] Kobayashi S, Ding C, Nakamura Y, et al. Kiwifruits actinidia deliciosa transformed with a Vitis stilbene synthase gene produce piceid resveratrol-glucoside [J]. Plant Cell Rep, 2000 (19):904-910.

[18] Stark-Lorenzen P, Nelke B, Hänßler G, et al. Transfer of a grapevine stilbene synthase gene to rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Cell Reports, 1997, 16:668-673.

[19] Hain R, Bieseler B, Kindl H, et al. Expression of a stilbene synthase gene in Nicotiana tabacum results in synthesis of the phytoalexin resveratrol [J]. Plant Mol-Biol, 1990, 15: 325-335.