

# 毕赤酵母 FLD1 启动子元件的克隆与测序

Sirajo UMAR<sup>1,2</sup> 段慧明<sup>1</sup> 陈劲春<sup>1\*</sup>

(1. 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029; 2. Usmanu Dan Fodio University Sokoto, Nigeria)

**摘要:** 为了应用毕赤酵母表达某些食用蛋白或同时表达多个异源蛋白, 本文以毕赤酵母 GS115 基因组 DNA 为模板, 采用 prime5.9 程序设计了一对不等长引物, 经多轮直接多聚酶链式反应, 扩增获得了大小为 597bp 目标 DNA 片段; 再经限制性内切酶和双脱氧末端终止法分析, 其 DNA 片段排列顺序与 EMBL 发表的 FLD1 启动子的序列完全一致。

**关键词:** 毕赤酵母; FLD1 启动子; 克隆; 测序

**中图分类号:** Q812

## 引言

毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 是外源基因表达系统中被广泛使用的单细胞真核生物<sup>[1-3]</sup>。毕赤酵母中被研究的启动子有 AOX1、GAP、FLD1、PEX8、YPT1 等, 较为广泛应用的是诱导型甲醇氧化酶 1 启动子 PAOX1, 但此基因表达系统不适用于食品生产<sup>[4]</sup>。1998 年 Shen 等报道了毕赤酵母中一个新的启动子谷胱甘肽依赖型甲醛脱氢酶基因启动子 FLD1, 能单独被甲醇为单一碳源(硫酸铵为氮源)或甲胺为单一氮源(葡萄糖为碳源)强烈诱导, 其受甲醇或甲胺的诱导具有与 AOX1 启动子表达水平相当的功能, FLD1 启动子被甲醇诱导的水平取决于使用的氮源, 用甲醇和甲胺一起诱导比用甲醇和硫酸铵诱导表达水平更高<sup>[5]</sup>。显然启动子 FLD1 不仅使用方便、功能强大, 而且扩大了毕赤酵母的应用范围<sup>[6-7]</sup>。遗憾的是, 目前国内外尚没有应用 FLD1 启动子作为调控元件的表达载体的商品供应, 为了应对某些基因工程的需要, 本文以毕赤酵母核基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 技术克隆了 FLD1 启动子。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒 毕赤酵母 GS115 购自 Invit-

rogen 公司、大肠杆菌 DH5 由本实验室保存、克隆质粒 pGEM-T 购自 Promega 公司。

**1.1.2 酶、试剂与培养基** 限制性内切酶 *Hind*、*Xho*、*Sal*、*Taq* 酶、*pfu* 酶购自 Takara 公司, DNA 100bp Ladder 购自华美公司, 其余试剂为分析纯。PCR 引物由 Invitrogen 公司合成。LB、LB 固体平板培养基按 Invitrogen 公司的方法配制。

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA 的提取** 按照文献[8]的方法从毕赤酵母中提取基因组 DNA。

**1.2.2 FLD1 启动子的扩增** 引物的设计与合成根据 EMBL 发表的 FLD1 启动子的序列, 用 Prime 5.0 软件设计引物, 在上游引物的 5'端设计了保护性碱基和 *Xho* 酶切位点, 在下游引物 5'端设计了保护性碱基和 *Hind* 酶切位点。

#### 上游引物

5'-GCG CTCGA GCA TGCA GGAA TCTC TGG 3'

*Xho*

#### 下游引物

5'-GCG AAGCTT TGTGAATATCAAGAA TTGT

*Hind*

ATGAACAA GC-3'

引物由 Invitrogen 公司合成

**1.2.3 PCR 反应** PCR 反应在 Perkin Elmer 公司 2400 型扩增仪上进行。扩增反应体系 100μL, 其中 10 × *Taq* DNA 聚合酶 buffer 10μL, 模板 2μL, 引物各 2μL (50 pmol), 0.8μL *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/μL), dNTP 1μL, 无菌水 82.2μL。

PCR 反应程序为 94 变性 7 min, 加入 0.8μL

收稿日期: 2007-03-22

第一作者: 男, 1980 年生, 硕士生

\*通讯联系人

E-mail: jingchunchen@hotmail.com

Taq DNA 聚合酶, 94 变性 60 s, 54 退火 120 s, 72 延伸 60 s, 30 个循环, 最后循环结束 72 延伸 10 min。

**1.2.4 PCR 产物的回收** PCR 反应后走 1 % 琼脂糖凝胶电泳, 检测扩增片段的大小和特异性, 将目的片段切下, 用玻璃奶法回收纯化目的片段。

**1.2.5 目的片段的克隆及重组子筛选** 将回收的目的片段克隆到 Promega 公司的 p GEM-T 载体上, 转化到大肠杆菌 DH5, 转化子在加有 ampicillin 的平板上筛选, 用碱变性法进行质粒 DNA 的小量提取, 质粒 DNA 的纯化、酶切按文献[8]的方法进行。

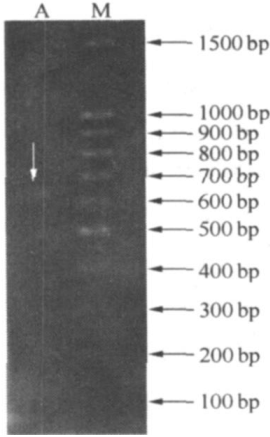
**1.2.6 DNA 序列测定** 将鉴定正确的菌液送 Invitrogen 公司对扩增的启动子片段测序确定碱基序列。

2 结果与讨论

2.1 PCR 扩增及其产物的电泳鉴定

从毕赤酵母中通过 PCR 扩增 FLD1 启动子, 按普通的 PCR 复性时间很难扩出, 经过反复实验, 发现通过延长复性时间到 2 min 就可成功扩出, 这可能因为毕赤酵母基因组比较大, 而 FLD1 启动子的序列占基因组比例小, 所以退火时间太短会影响到引物和模板的复性。

FLD1 启动子序列为 597 bp, 两端加上保护性碱基和酶切位点后大小为 615 bp。由图 1 可见, PCR 扩增后预期的 615 bp 大小 FLD1 启动子扩增产物条带清晰, 无非特异性扩增现象。



A—PCR 扩增产物; M—标准分子量 DNA

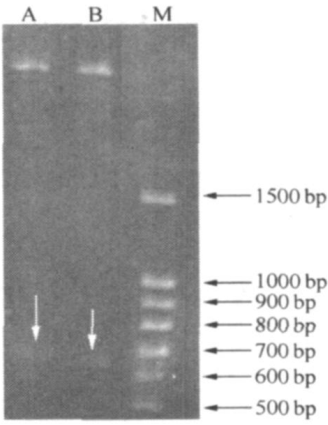
图 1 PCR 扩增的凝胶电泳照片 (1 % 琼脂糖凝胶)

Fig. 1 Electrophoresis of the amplified FLD1 fragment on 1 % agarose gel

2.2 FLD1 启动子测序载体的酶切鉴定

测序载体 p GEM-T 经双酶切后的 DNA 片段位

于分子量 600 ~ 700 bp, 采用 *Xho* 和 *Hind* 双酶切后的片段就是 PCR 扩增后的片段, 大小为 615 bp, 采用 *Xho* 和 *Sal* (为载体上酶切位点, 距 p GEM-T 载体克隆位点为 20 bp) 双酶切后的片段大小为 635 bp, 结果见图 2。



A—*Xho* 和 *Sal* 双酶切的片段; B—*Xho* 和 *Hind* 双酶切的片段; M—标准分子量 DNA

图 2 阳性克隆重组子双酶切结果电泳照片 (1 % 琼脂糖凝胶)

Fig. 2 Electrophoresis of the positive clone on 1 % agarose gel

2.3 PCR 扩增目的片段测序

采用 Sanger 双脱氧末端终止法分析测定 PCR 扩增目的片段, 其序列为

GCGCTCGA GGCA TGCA GGAA TCTCTGGCA  
CGGTGCTAA TGGTA GTTA TCCAACGGA GCTGA  
GGTA GTCGA TA TA TCTGGA TA TGCCGCCTA TA  
GGA TAAAAACA GGA GA GGGTGAACCTTGCTTA  
TGGCTACTA GA TTGTCTTTGTACTCTGAATTC  
TCA TTA TGGGAACTAACTAA TCTCA TCTGT  
GTGTTGCA GTACTA TTGAA TCGTTGTA GTA TC  
TACCTGGA GGGCA TTCCATGAA TTA GTGA GA T  
AACA GA GTTGGGTA ACTA GA GA GAA TAA TA G  
ACGTA TGCA TGA TTACTACACAACGGA TGTCG  
CACTCTTTCCTTA GTTAAACTA TCA TCCAAT  
CACAA GA TGCGGGCTGGAAA GACTTGCTCCCG  
AAGGATAA TCTTCTGCTTCTA TCTCCCTTCCT  
CATA TGGTTTCGCA GGGCTCA TGCCCCCTCTT  
CCTTCGA ACTGCCCGATGA GGAA GTCCTTA GC  
CTA TCAAA GAA TTCGGGACCA TCA TCGA TTTT  
TA GA GCCTTACCTGA TCGCAA TCA GGA TTTCA  
CTACTCA TA TAAA TACA TCGCTCAAA GCTCCA  
ACTTTGCTTGTTCA TACAA TTCTTGA TA TTCA

CAAA GCTTCGC

结果表明,克隆的 FLD1 启动子序列 597 bp (以上序列在 5 端加有保护性碱基和 *Xho* 酶切位点,在 3 端加有保护性碱基和 *Hind* 酶切位点)与 EMBL 发表的 FLD1 启动子的序列一致。可以用 FLD1 启动子元件来进行毕赤酵母表达载体的构建及其他表达调控研究。

#### 参考文献:

- [1] HARTNER F S, GLIEDER A. Regulation of methanol utilization pathway genes in yeasts [J]. *Microbial Cell Factory*, 2006, 5:39.
- [2] ROMANOS M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1995, 6:527 - 533.
- [3] CEREGHINO J L, CREGG J M. Heterologous protein expression in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24:45 - 66.
- [4] DALY R, HEARN M T W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production [J]. *Journal of Molecular Recognition*, 2005, 18:119 - 138.
- [5] RESINA D, SERRANO A, VALERO F, et al. Expression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* [J]. *J Biotechnol*, 2004, 109(1 - 2): 103 - 113.
- [6] SHEN Shigang, SULTER G, JEFFRIES T W, et al. A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign gene in the yeast *Pichia pastoris* [J]. *Gene*, 1998, 216: 93 - 102.
- [7] MACAULEY-PATRICK S, FAZENDA M L, MCNEIL B, et al. Heterologous protein production using *Pichia pastoris* expression system [J]. *Yeast*, 2005, 22:249 - 270.
- [8] SAMBROOK J, FRITTSCH E F, MANIATIS T. *Molecular cloning: A laboratory manual* [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

## Cloning of FLD1 promoter from genomic DNA of yeast *Pichia pastoris* GS115

Sirajo UMAR<sup>1,2</sup> DUAN HuiMing<sup>1</sup> CHEN JinChun<sup>1</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China;

2. Usmanu Dan Fodio University Sokoto, Nigeria)

**Abstract:** The AOX1 promoter is most frequently used for expression of foreign genes in *Pichia pastoris*, but is unsuitable for production of food products or when more than one foreign gene needs to be cloned on a single vector. P<sub>FLD1</sub> is an attractive alternative to the AOX1 promoter as it can be independently induced by either methanol or methylamine. Two primers have been designed using the Primer 5.9 program and according to the P<sub>FLD1</sub> sequences deposited in EMBL under accession No. AR533312. Genomic DNA extracted from *P. pastoris* GS115 strain was used as a template and after several PCR cycles the 597 base pairs FLD1 promoter was cloned on a T-vector and then amplified in *E. coli* DH5. Through enzyme restriction and fragment sequencing analyses, the cloned PFLD1 was confirmed to have 100 % homology with the EMBL sequence.

**Key words:** *Pichia pastoris*; FLD1 promoter; cloning; sequencing