

# 基于 Egfp 启动子高通量筛选方法的研究

徐佳, 皮莉, 张玉, 崔丹瑶, 张翠英, 肖冬光

(天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 本研究以载体 pUC-19 为基础质粒, 引入编码增强型绿色荧光蛋白的 Egfp 为报告基因, 选用 PGK 为启动子, 构建重组质粒 pUC-PEBBK。通过 PCR 扩增出重组盒 *BATs-PGKp-Egfp-PGKt-KanMX-BATx*, 将其与酿酒酵母 AY15 单倍体  $\alpha 5$  同源重组, 获得重组菌株  $\alpha 5$ -PEBBK。使用荧光显微镜和酶标仪检测 EGFP 在酿酒酵母中的表达, 检测到重组菌荧光强度 (RFU) 为 523, 亲本菌株为 53, 是原菌的 10 倍, 证明 Egfp 在 PGK 启动子调控下在酿酒酵母  $\alpha 5$  中能够正确表达。通过培养基优化, 排除了培养基成分酵母浸粉和蛋白胨对绿色荧光蛋白检测的干扰, 确定了利于 Egfp 表达和快速检测的筛选培养基 BSM1。考察了接种量和培养时间对 Egfp 荧光表达和菌体生长的影响, 确定了最佳 48 孔板培养条件为接种量 40  $\mu$ L, 培养时间为 36 h。高效、灵敏的高通量筛选方法的建立为后续系列表达强度启动子的筛选奠定了良好的基础。

**关键词:** 酿酒酵母; Egfp; PGK 启动子; 高通量筛选

文章编号: 1673-9078(2018)01-134-140

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.1.021

## High Throughput Screening of Mutant PGK Promoter Based on Egfp

XU Jia, PI Li, ZHANG Yu, CUI Dan-yao, ZHANG Cui-ying, XIAO Dong-guang

(Tianjin, Tianjin Industrial Microbiology Key Laboratory, College of Biotechnology of Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** The recombinant vector pUC-PEBBK was constructed based on the pUC-19 as the base plasmid, which selected PGK as the promoter and Egfp of the encoding enhanced green fluorescent protein as the reporter gene in this study. The recombinant cassette *BATs-PGKp-Egfp-PGKt-KanMX-BATx* was amplified by PCR, which was homologous recombination with *Saccharomyces cerevisiae* haploid AY15- $\alpha 5$  in order to construct the haploid recombinant  $\alpha 5$ -PEBBK. The expression of Egfp in *Saccharomyces cerevisiae* was detected using fluorescence microplate and fluorescence microplate. It was showed that the recombinant RFU of Egfp in the haploid recombinant  $\alpha 5$ -PEBBK was 523, which was 10.0 fold higher than the parental strain with RFU 53. It was concluded that the Egfp could be correctly expressed in *Saccharomyces cerevisiae* AY15- $\alpha 5$  under the control of PGK promoter. BSM1 was selected as the optimal medium for reducing the interference on fluorescence signal by the optimization of medium. The effects of inoculation quantity and time on Egfp fluorescence expression and microorganism growth were investigated. The optimal culture conditions were 40  $\mu$ L of inoculation and 36 h of incubation time. The establishment of high efficient and sensitive high-throughput screening method provides a good foundation for the selection of subsequent series of expression intensity promoters.

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae*; Egfp; PGK promoter; fluorescence detection

绿色荧光蛋白 (Gfp) 是一类存在于水母、水螅和珊瑚等腔肠动物体内的生物发光蛋白<sup>[1]</sup>。当用 395 nm 的紫外线或 475 nm 的蓝光激发, Gfp 就可在 508 nm 处发射绿色荧光。由于其基因可以在异源组织中表达并产生荧光<sup>[2]</sup>, 检测时不需抗体、辅因子、酶底物等其它成分, 不影响宿主细胞<sup>[3]</sup>, 因而可以鉴定、跟踪、分选表达 Gfp 的活细胞, Gfp 近年来成为细胞

生物学和分子生物学中广泛应用的报告蛋白<sup>[4]</sup>。Gfp 已广泛应用于报告蛋白、融合标记、生物传感器、pH 检测传感器、蛋白间相互作用、胞内各器官蛋白的传递等领域。而与其它常用的报告基因相比, Gfp 具有性质稳定、无细胞毒性、灵敏性、检测便捷等优点<sup>[5]</sup>, 在荧光显微镜下, 可直接观察到活细胞中的 Gfp 绿色荧光, 因此可作为研究与之融合的其他蛋白表达的报告基因。

GFPS65T 突变体 (S65 突变为 T) 荧光强度比野生型 Gfp 强 5 倍, 进一步进行 F64L 突变得得到 37  $^{\circ}$ C 下高效成熟的增强型绿色荧光蛋白 (Egfp), 大大增强了该报告分子的灵敏度<sup>[6]</sup>, 是目前应用最广泛的荧光蛋

收稿日期: 2017-06-07  
基金项目: 国家自然科学基金项目 (31471724); 天津市科委自然科学基金项目 (14JZDJC32900)

作者简介: 徐佳 (1990-), 女, 在读硕士, 研究方向: 现代酿造技术

通讯作者: 张翠英 (1979-), 女, 教授, 研究方向: 现代酿造技术

白之一。但 Egfp 一般都需强启动子以驱动 Gfp 基因在细胞内足量的表达<sup>[7]</sup>, 多数生物具有微弱的自发荧光现象, 并有类似的激发和发射波长, 影响了某些 Gfp 的检测<sup>[8]</sup>。

近年来, 由一系列具有不同调控强度的突变启动子构成的启动子文库, 被用于对目的基因的表达进行精确调控。启动子文库是不同启动子强度的集合体, 在构建时, 可对天然启动子序列进行突变, 再从中筛选出合适强度的多个突变启动子。

构建过程中, 启动子序列的突变方式多种多样, 如易错 PCR<sup>[9]</sup>, DNA shuffling<sup>[10]</sup>, 定点突变和化学合成<sup>[11]</sup>等, 已基本成为常规操作, 只要对反应条件稍作优化, 即可获得包含足够丰富的突变序列。

Alper<sup>[12]</sup>等人通过易错 PCR, 引入 Gfp 基因, 获得了噬菌体启动子活性 196 倍范围内的突变启动子文库, 证明可通过易错 PCR 获得启动子活性差别较大的突变体, 实现了对基因的精细调控。秦秀林<sup>[14]</sup>等人建立了适用于毕赤酵母组成型表达文库筛选的高通量方法, 利用高通量方法筛选了 300 株整合了 ( $P_{GAP}$  突变序列-yEGFP) 表达单元的重组菌, 从中挑选出 6 株 yEGFP 表达水平在 G/GHg 0.6~218%范围内的重组细胞 (G01、G02、G03、G0、G6)。因此启动子文库构建的难点不在于如何实现启动子突变序列的多样性, 而在于建立一个高效、灵敏和可靠的高通量筛选方法<sup>[13]</sup>, 能有效地筛选到强度改变的启动子突变体。故本研究以筛选 PGK 突变子为目标, 通过优化培养条件, 建立可靠的高通量筛选系统, 为构建 PGK 启动子文库奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 菌株

工业酿酒酵母  $\alpha 5$  (酿酒酵母工业菌株 AY15 的  $\alpha$  型单倍体)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 、PyEGFP3 质粒、PAXSK 质粒、pUC-PIAK 质粒, 以上均由天津科技大学天津市工业微生物重点实验室保藏。

#### 1.1.2 培养基和溶液

YEPD 培养基: 葡萄糖 2%, 蛋白胨 2%, 酵母浸粉 1%, pH 自然, 115 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。固体培养基需再添加 2% 琼脂粉。

LB 培养基: 胰蛋白胨 1%, 酵母浸粉 0.5%, NaCl

1%, pH 自然, 115 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。固体培养基需再添加 2% 琼脂粉。

MD 培养基: YNB 13.4 g/L, 生物素 0.4 mg/L, 葡萄糖 20 g/L, pH 6.0, 115 °C, 0.1 MPa 灭菌 30 min。

SD 培养基: YNB 0.67%, 葡萄糖 2%, pH 6.0, 115 °C, 0.1 MPa 灭菌 30 min。

BMD 培养基: 1M  $K_2HPO_4$  (pH 6.0) 100 mL/L, YNB 13.4 g/L, 生物素 0.4 mg/L, 葡萄糖 20 g/L, pH 6.0, 115 °C、0.1 MPa 灭菌 30 min。

BMDY 培养基: 1M  $K_2HPO_4$  (pH 6.0) 100 mL/L, YNB 13.4 g/L, 生物素 0.4 mg/L, 葡萄糖 20 g/L, 酵母浸粉 10 g/L。pH 6.0, 115 °C、0.1 MPa 灭菌 30 min。

BSM1 培养基:  $(NH_4)_2SO_4$  7 g/L,  $CaSO_4$  0.46 g/L,  $K_2SO_4$  9.1 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  7.5 g/L, PTM1 12 mL/L, 葡萄糖 20 g/L。pH 6.0, 115 °C、0.1 MPa 灭菌 30 min。

微量元素 PTM1:  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  6 g/L, KI 0.08 g/L, 生物素 0.2 g/L,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  3 g/L,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  65 g/L,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  20 g/L,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  0.5 g/L,  $H_3BO_3$  0.02 g/L。

PBS 缓冲溶液:  $KH_2PO_4$  0.27 g/L,  $Na_2HPO_4$  1.42 g/L, NaCl 8 g/L, KCl 0.2 g/L。用去离子水定容至 1 L, 用 HCl/NaOH 调 pH 7.4, 4 °C 冰箱保存。

1 mol/L 醋酸锂溶液: 准确称取 6.6 g 醋酸锂溶于 80 mL 蒸馏水中, 并定容至 100 mL, 过膜除菌或 121 °C 高压蒸汽灭菌 15 min, 4 °C 冰箱保存。

### 1.1.3 酶与化学试剂

酵母基因组提取试剂盒和质粒提取试剂盒购自 Solarbio 公司; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Pfu DNA 聚合酶和 DNTP 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; PCR 产物回收试剂盒 (Cycle Pure Kit) 购自 Omega 公司。

## 1.2 仪器与设备

M200PRO 型光栅型多功能酶标仪: 瑞士帝肯有限公司; BX53F 型荧光显微镜: 日本 OLYMPUS 会社; 岛津紫外分光光度计 UVmini-1240: 岛津仪器 (苏州) 有限公司; F0199 型 48 孔细胞培养板: 美国 Coring 公司; F0199 型 96 孔酶标板: 美国 Coring 公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 引物设计与合成

本实验所用引物由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成, 酶切位点以下划线标注。

表1 本实验所用引物

Table 1 Primers used in the current study

引物名称	序列(5'→3')	酶切位点
EGFP-U1	TGCAGGCGCGCAATCCCCGCGGATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTG	<i>Bss</i> III
EGFP-U2	GGCGCGCAATCCC <u>CGCGG</u> ATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTG	<i>Sac</i> II
EGFP-D1	TGCAG TTATTTGTAGAGCTCATCCATGCCATGT	
EGFP-D2	GTTATTTGTAGAGCTCATCCATGCCATGT	
PA-U1	TGCAGCTCGAGGGATCTGCGATAGATC	
PA-U2	GCTCGAGGGATCTGCGATAGATC	
PA-D1	TGCAGAAAACCTCGTGGAGATGCTTTCC	
PA-D2	GAAAACCTCGTGGAGATGCTTTCC	
<i>PGKp</i> -U	TTG <u>CGCGCT</u> TCTAACTGATCTATCCAAAAC	<i>Bss</i> III
<i>PGKp</i> -D	TCCC <u>CGCGG</u> TTTTATATTTGTTGTA AAAAG	<i>Sac</i> II
<i>PGKt</i> -U	AAATATGCGGCCGCTCGAGGGATCTGCGATAGA	<i>Not</i> I
<i>PGKt</i> -D	CTAGTCTAGATAACGAACGCAGAATTTTCGAGT	
<i>BATs</i> -U	AACATCTTCGAACGTGAAAACC	
<i>BATx</i> -D	CCCTCTAAAGATTCATCGGCTA	
B1-U	TACCAAACCGCTAACTTCCTTC	
B1-D	AGTTTTTCATCATCTTTGGGGTC	

### 1.3.2 pUC-PEBBK 质粒的构建

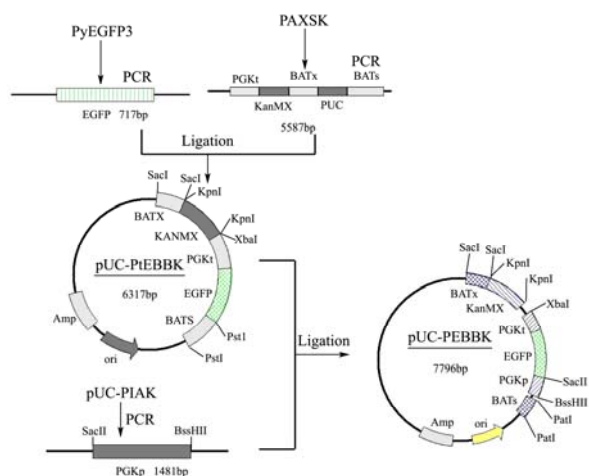


图1 重组质粒 pUC-PEBBK 构建流程图

Fig.1 Construction flowchart of recombinant plasmid pUC-PEBBK

质粒构建流程图如图1所示。以 PyEgfp3 质粒为模板，分别以 EGFP-U2/EGFP-D1 和 EGFP-U1/EGFP-D2 为引物进行 PCR 扩增，得到 EGFP 基因片段，反应条件：95 °C 5 min；94 °C 1 min；56 °C 1 min；72 °C 2 min；循环 30 次，72 °C 10 min。PCR 产物按照 PCR 产物回收试剂盒说明书的要求进行纯化回收。以实验室保存的 PAXSK 质粒为模板，分别以 PA-U1/PA-D2 和 PA-U1/PA-D2 为引物进行 PCR 扩增，得到 PGKt-KanMX-BATx-pUC-BATs 基因片段，纯化回收连接，得到 pUC-PtEBBK 质粒。以实验室保存的

pUC-PIAK 质粒为模板，以 PGKp-U 和 PGKp-D 为引物进行 PCR 扩增，得到 PGKp 基因片段，将 PtEBBK 质粒用 *Sac*II 和 *Bss*III 酶切线性并去磷酸化，与同样经过 *Sac*II 和 *Bss*III 酶切的 PGKp 基因片段连接，得到 pUC-PEBBK 质粒。

### 1.3.3 突变菌株 α5-PEBBK 的构建

酵母以质粒 pUC-PEBBK 为模板，BATs-U 和 BATx-D 为引物 PCR 扩增基因片段。将纯化后的重组片段 BATs-PGKp-Egfp-PGKt-KanMX-BATx，经醋酸锂化学转化法<sup>[15]</sup>将其导入到酿酒酵母单倍体 α5 中，并使重组菌株产生 G418 抗性，使用含 G418 YEPD 平板进行筛选。

### 1.3.4 荧光显微镜检测

将重组菌株 α5-PEBBK 用 YEPD 培养基培养 12 h，将菌液离心，收集菌体，用 PBS (pH 7.0) 稀释至 OD<sub>600</sub>=1，取一滴制成玻片，使用荧光显微镜检测细胞 Egfp 荧光强度，通过荧光显微镜观察。

### 1.3.5 酶标仪检测

重组菌株 α5-PEBBK 和亲本菌株 α5 经 YPD 培养后，菌体收集用 PBS 洗一次，用 PBS (pH 7.0) 稀释至 OD<sub>600</sub>=1，经 PBS 重悬后将稀释后样品取 250 μL 至 96 孔板，使用荧光酶标仪检测 Egfp 荧光强度（激发波长 488 nm，发射波长 510 nm），并检测 OD<sub>600</sub>，检测 Egfp 荧光强度时，以不表达 Egfp 的基因工程菌 α5 作为对照去除背景干扰，比荧光强度 (RFU/OD<sub>600</sub>) 为荧光强度值比上对应细胞密度。

### 1.3.6 培养基对重组菌生长的影响

分别用 SD、MD、BMD、BSM1 培养基培养重组菌  $\alpha 5$ -PEBBK 和亲本菌株  $\alpha 5$ ，各作三个平行，经 30 °C，200 r/min，试管培养 36 h，测定细胞密度 OD<sub>600</sub>。

### 1.3.7 培养基对 Egfp 表达的影响

分别用 SD、MD、BMD、BSM1 培养基培养重组菌  $\alpha 5$ -PEBBK 和亲本菌株  $\alpha 5$ ，经 30 °C，200 r/min，试管培养 36 h，经荧光酶标仪检测荧光强度 RFU，根据 1.3.6 测得的细胞密度 OD<sub>600</sub>，计算比荧光强度 RFU/OD<sub>600</sub>。

### 1.3.8 48 孔板接种量的优化

在确定了合适的培养基后，利用 48 孔深孔板，对不同阶段的接种量和培养时间进行优化，每孔装 900  $\mu$ L BSM1，分别取 10  $\mu$ L、20  $\mu$ L、30  $\mu$ L、40  $\mu$ L 经过 24 h 培养的种子液，30 °C，200 r/min 培养 60 h，每间隔 12 h 取样测细胞密度 OD<sub>600</sub>。

### 1.3.9 最佳检测荧光强度时间的确定

用 BSM1 培养基培养重组菌  $\alpha 5$ -PEBBK 和亲本菌株  $\alpha 5$ ，各接种 40  $\mu$ L 种子液，30 °C，200 r/min 培养 60 h，每间隔 12 h 取样测 OD<sub>600</sub> 和 RFU，计算比荧光强度 RFU/OD<sub>600</sub>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 增强型绿色荧光蛋白 Egfp 在酿酒酵母中的表达

的表达

#### 2.1.1 pUC-PEBBK 质粒的验证

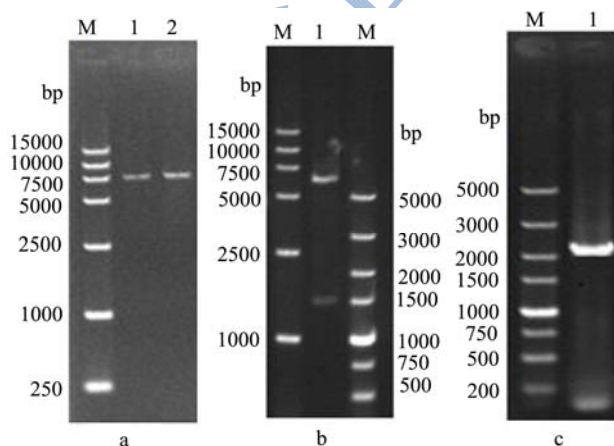


图2 重组质粒 pUC-PEBBK 验证

Fig.2 The confirmation of the recombinant plasmid pUC-PEBBK

注：(a) M: DL5000 DNA marker; 1: pUC-PEBBK 质粒 *SacII* 酶切后; 2: pUC-PEBBK 质粒 *BssHIII* 酶切后。(b) M: DL5000 DNA marker; DL5000 DNA marker 1: pUC-PEBBK 质粒 *SacII*

和 *BssHIII* 双酶切后。(c) M: DL5000 DNA Marker; 1: *BAT3*-U 和 EGFP-D 为引物 PCR 验证。

按照 1.3.2 方法获得重组质粒，提取质粒 pUC-PEBBK，将重组质粒 pUC-PEBBK 分别用 *SacII* 和 *BssHIII* 单酶切，酶切后得到 7785 bp 的单一一条带，如图 2a。分步用 *SacII* 和 *BssHIII* 双酶切后得到 6300 bp 和 1481 bp 的条带 (图 2b)，证明连接正确。并用引物 *PGKp*-U 和 EGFP-D PCR 验证，得到 2300 bp 大小正确条带，结果如图 2c。

#### 2.1.2 重组菌株 $\alpha 5$ -PEBBK 的验证

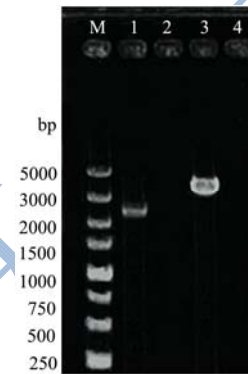


图3  $\alpha 5$ -PEBBK 上下游定点验证

Fig.3 The PCR verification of the mutant strain  $\alpha 5$ -PEBBK

注：M: DL5000 DNA Marker; 1 和 2 泳道分别为重组菌株和对照菌株的上游定点验证; 3 和 4 泳道分别为重组菌株和对照菌株的下游定点验证。

将转化子提取基因组 DNA，然后 PCR 定点验证，结果如图 3 所示。以重组菌株基因组 DNA 为模板，亲本菌株  $\alpha 5$  基因组 DNA 为阴性对照，分别以 B1-U 和 *PGKp*-D, *PGKp*-U 和 B2-D 两对引物进行上下游定点验证，阴性对照  $\alpha 5$  亲本菌株由于不含有 *Egfp* 基因及其与 *PGK* 启动子相连序列，无法扩增出目的条带，重组菌株则可以扩增出 2456 bp 和 4028 bp 大小条带。由图可知，PCR 目的条带单一，大小正确，证明 *BAT2* 基因已经敲除，基因整合成功，得到正确的重组菌株  $\alpha 5$ -PEBBK。

#### 2.1.3 荧光显微镜检测 Egfp 荧光

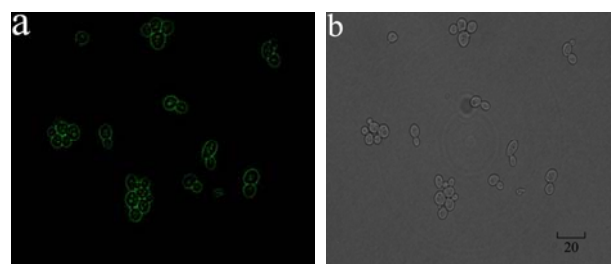


图4 荧光显微镜检测重组菌株  $\alpha 5$ -PEBBK Egfp 荧光强度  
Fig.4 Fluorescence of Egfp measured by the fluorescence microscope in  $\alpha 5$ -PEBBK strain

注：(a) 荧光检测；(b) 光场检测。

使用荧光显微镜检测重组细胞 Egfp 荧光强度, 在重组菌细胞内观察到 Egfp 表达所产生的荧光(图4), 结果证明启动子 *PGK* 可调控绿色荧光蛋白 Egfp 在酵母中的表达。

### 2.1.4 多功能酶标仪检测 Egfp 荧光强度

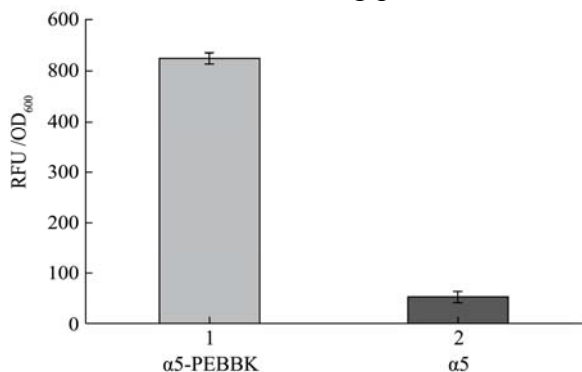


图5 酶标仪检测重组菌株  $\alpha 5$ -PEBBK 与亲本菌株  $\alpha 5$ Egfp 荧光强度

Fig.5 Fluorescence of Egfp measured by the fluorescence microplate in  $\alpha 5$ -PEBBK and  $\alpha 5$  strains

利用多功能酶标仪检测重组细胞 Egfp 荧光强度, 如图5所示,  $\alpha 5$ -PEBBK 和  $\alpha 5$  的比荧光强度值分别为 523 和 53,  $\alpha 5$ -PEBBK 的比荧光强度是亲本菌株  $\alpha 5$  的 10 倍。

## 2.2 *PGK* 启动子文库高通量筛选方法的建立

### 2.2.1 培养基优化

#### 2.2.1.1 培养基对 Egfp 荧光检测的干扰

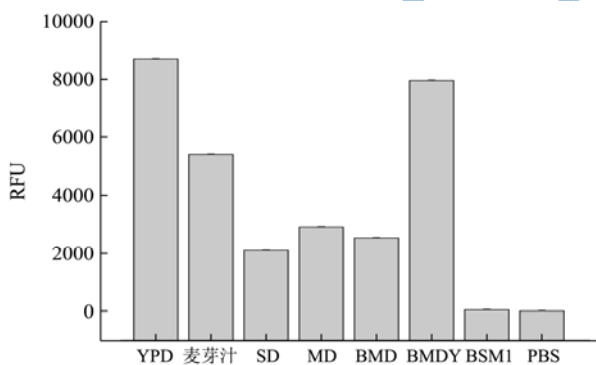


图6 荧光酶标仪测定无菌培养基荧光强度

Fig.6 The fluorescence of the aseptic medium measured by fluorescence microplate

为了排除培养基成分对荧光检测的干扰, 以 PBS 为阴性对照, 考察不同培养基对 Egfp 荧光检测的影响, 结果如图6。

BSM1 培养基的本底荧光强度值最小 (51 RFU), 与 PBS (54 RFU) 接近, 其次是 SD (2100 RFU), MD (2910 RFU), BMD (2531 RFU), 无菌培养基

BMDY 和 YPD 经荧光酶标仪检测荧光强度最强, 分别为: 7971 RFU 和 8717 RFU, 与 PBS 相比, 高出近 150 倍。

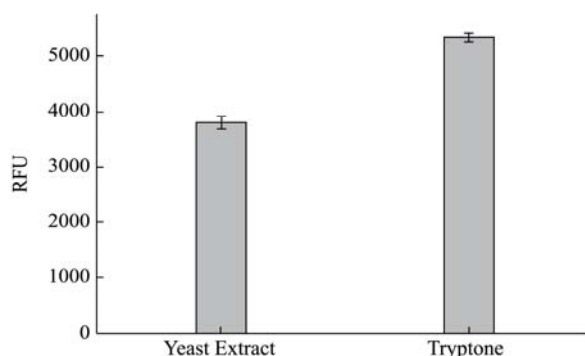


图7 荧光酶标仪测定酵母浸粉 (Yeast Extract) 和蛋白胨 (Tryptone) 荧光强度

Fig.7 The fluorescence of yeast extract and tryptone measured by fluorescence microplate

在本实验中, 发现培养基成分对 Egfp 的检测也有干扰, 通过比较分析这几个培养基成份, 干扰 Egfp 的荧光检测可能的物质: 培养基 BMDY 和 YPD 中含有酵母浸粉 (Yeast Extract) 和蛋白胨 (Tryptone), 通过荧光酶标仪检测, 2% Yeast Extract 和 1% Tryptone 溶液的荧光强度分别为 3800 RFU 和 5400 RFU(图7), 证明含有酵母浸粉和蛋白胨的培养基均不适合检测荧光菌株的培养。

#### 2.2.1.2 培养基对重组菌生长的影响

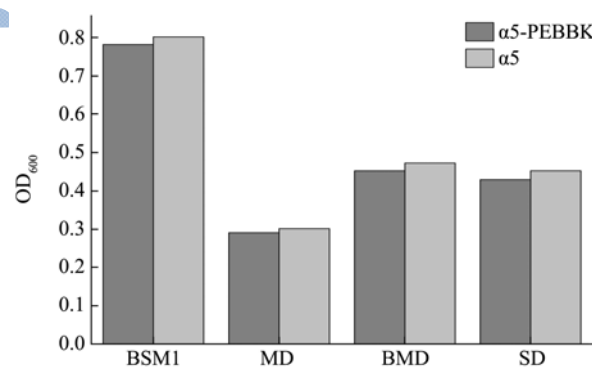


图8 不同培养基对重组菌生长的影响

Fig.8 The effects of medium on the recombinant strain growth

鉴于 BSM1、SD、MD 和 BMD 培养基对 Egfp 荧光强度测定干扰较小, 可作为筛选用的培养基, 又进一步考查了它们对重组菌生长影响(图8)。

结果表明, 重组菌  $\alpha 5$ -PEBBK 和亲本菌株  $\alpha 5$  在同一种培养基上的生长速度没有明显差异, 相比 BMD、SD、MD 三种培养基, BSM1 更有利于两株菌生长, 两种菌的细胞密度 OD<sub>600</sub> 均超过它们在 BMD、SD、MD 中的细胞密度。

#### 2.2.1.3 培养基对重组菌 Egfp 表达影响

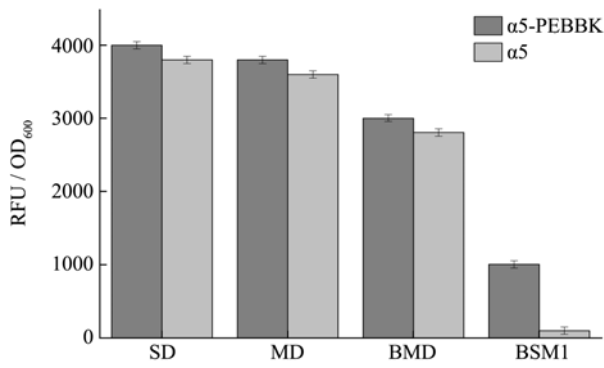


图9 不同培养基对重组菌Egfp表达影响

Fig.9 The effects of medium on the Egfp expression

结果表明,重组菌  $\alpha 5$ -PEBBK 经 SD、MD、BMD 培养基培养后, Egfp 比荧光强度与亲本菌株相差不大,而在 BSM1 中培养,重组菌株比荧光强度为 937,是亲本菌株比荧光强度的 10 倍(图 9)。综上所述,在重组细胞  $\alpha 5$ -PEBBK 中,基因 *Egfp* 在启动子 *PGK* 的调控下获得了正确的表达,但由于仅有 1 个拷贝基因整合在重组菌的染色体中,通过利用荧光酶标仪检测不同培养基对 Egfp 荧光表达的影响,发现在 YPD、BMDY、麦芽汁培养基中 Egfp 表达产生的荧光强度受到较强干扰,在 SD、MD、BMD 培养基中生长缓慢,在 BSM1 培养基中受到干扰较弱,便于检测,比荧光强度重组菌和亲本菌株相差较大,且较利于其生长,因此选定 BSM1 培养基为筛选培养基。

## 2.2.2 筛选条件的优化

### 2.2.2.1 接种量的确定

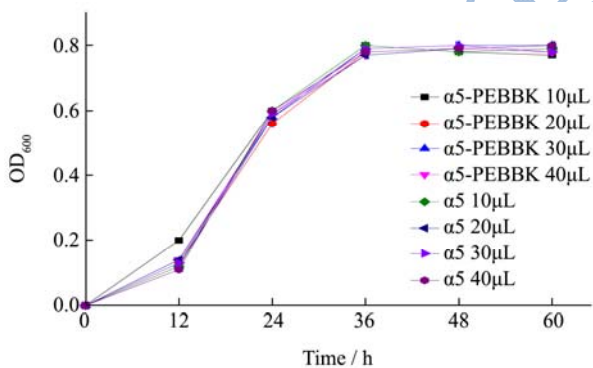


图10 培养板中不同接种量对重组菌和对照菌生长影响

Fig.10 The effects of inoculum volume on the strains growth of  $\alpha 5$ -2 and  $\alpha 5$  in the plate

由图 10 可以看出,即使初始接种量不同,但重组菌  $\alpha 5$ -PEBBK 和原菌  $\alpha 5$  生长曲线趋势保持一致,培养板接种量对最终细胞密度无明显影响,接种量为 10  $\mu$ L、20  $\mu$ L、30  $\mu$ L、40  $\mu$ L 时,重组菌在培养 36 h 后,都对对数生长期过渡至稳定期,培养板培养时间 36 h 细胞密度最大,达到平稳期。但考虑到较大的接种量可降低操作实验误差,因此,确定预培养板的接种量

为 40  $\mu$ L。

### 2.2.2.2 最佳检测荧光强度时间的确定

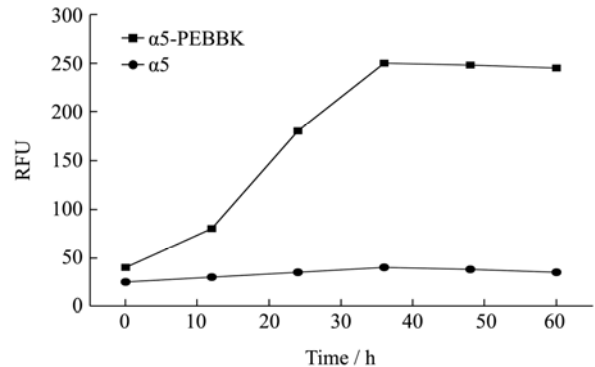


图11 重组菌荧光强度与时间的关系

Fig.11 The correlation between fluorescence and time of recombinant bacteria

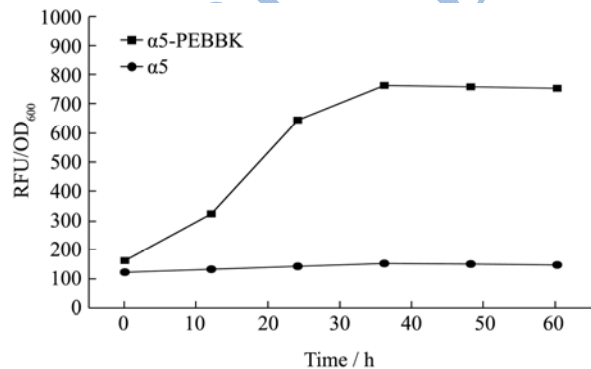


图12 重组菌不同培养时间的比荧光强度

Fig. 12 Specific fluorescence of recombinant strains at different time points

培养 36 h 重组菌与亲本菌株荧光强度差异最大,如图 11,对重组菌  $\alpha 5$ -PEBBK 而言,随着时间的增加,荧光强度也线性增加,当培养 36 h 以后,荧光强度的增长变缓;而随着时间的增加,亲本菌株  $\alpha 5$  的荧光强度始终恒定在一较低水平,实验结果说明在 36 h,  $\alpha 5$ -PEBBK 与亲本菌株  $\alpha 5$  荧光强度差异最大。通过考察不同时间点重组菌的比荧光强度,如图 12,可以发现,36~60 h 重组菌比荧光强度维持在一恒定水平,因此,确定培养板培养 36 h 后测定重组菌 Egfp 荧光强度。

## 3 结论

3.1 在本研究中,我们以 pUC19 为载体,磷酸甘油酸激酶基因 *PGK* 启动子为上游调控元件, *KanMX* 抗性基因为筛选标记,构建酵母表达质粒 pUC-PEBBK,将绿色荧光蛋白 *Egfp* 整合到酿酒酵母基因组上,在启动子调控下表达,同时敲除 *BAT2* 基因,获得重组菌株  $\alpha 5$ -PEBBK,为筛选突变启动子作为亲本菌株,通过荧光显微镜可以清晰的看到 *Egfp* 基因在酵母细胞

内的表达。荧光分光光度计测得其激发波长 488 nm, 吸收波长 510 nm, 荧光酶标仪检测重组菌  $\alpha 5$ -PEBBK 荧光强度是亲本菌株  $\alpha 5$  的 10 倍。Egfp 能够在启动子 PGK 调控下在酿酒酵母中表达。

3.2 利用 48 深孔板结合荧光酶标仪检测, 建立了启动子文库的高通量筛选方法, 通过培养基优化, 排除了 YPD、BMDY、麦芽汁培养基中蛋白胨和酵母浸粉对绿色荧光蛋白检测的干扰, 实验结果显示在 SD、MD、BMD 中酿酒酵母生长缓慢, 最终确定了利于 Egfp 表达和快速检测的筛选培养基 BSM1, 最佳 48 孔板培养条件为接种量 40  $\mu$ L, 培养时间为 36 h。研究结果为实现 48 孔板高效、灵敏、可靠地筛选到强度微量改变的启动子突变体奠定基础。

### 参考文献

- [1] Shimomura O, Johnson F H, Saiga Y. Extraction, purification, and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, Aequorea [J]. J Cell Comp. Physiol., 1962, 59(3): 223-239
- [2] 刘歆. 绿色荧光蛋白基因 (gfp) 转化柑橘及植株再生[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005  
LIU Xin. Transformation of green fluorescent protein gene (gfp) into citrus species and transgenic plants regeneration [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2005
- [3] 吕晓杰, 周广东, 马俐君, 等. 增强型绿色荧光蛋白转染活细胞效率的研究[J]. 组织工程与重建外科, 2011, 7(5): 248-253  
LV Xiao-jie, ZHOU Guang-dong, MA Li-jun, et al. The effectiveness of labeling technique of enhanced green fluorescent protein by transfection into living cell [J]. Journal of Engineering and Reconstructive Surgery, October, 2011, 7(5): 248-253
- [4] 刘伟, 林志伟, 陈美霞, 等. 桔草芽孢杆菌绿色荧光蛋白高效表达载体的构建[J]. 热带作物学报, 2012, 33(3): 467-471  
LIU Wei, LIN Zhi-wei, CHEN Mei-xia, et al. Construction of high-level expression of green fluorescent protein vector in *Bacillus subtilis* [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2012, 33(3): 467-471
- [5] 侯清华, 宋淑亮, 梁浩, 等. 增强型绿色荧光蛋白的色谱分离和纯化[J]. 色谱, 2013, 31(2): 151-154  
HOU Qing-hua, SONG Shu-liang, LIANG Hao, et al. Isolation and purification of enhanced green fluorescent protein using chromatography [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2013, 31(2): 151-154
- [6] Heim R, Cubitt A B, Tsien R Y. Improved green fluorescence [J]. Nature, 1995, 6516: 663-664
- [7] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker as a maker for gene expression [J]. Science, 1994, 263: 802-805
- [8] 杨明瑜, 刘翔. 利用绿色荧光蛋白 GFP 作为报告基因检测转基因植物[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 31(1): 96-102  
YANG Ming-yu, LIU Xiang. Using green fluorescent protein as a reporter gene to detect transgenic plant [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2008, 31(1): 96-102
- [9] Ellis T, Wang X, Collins J J. Diversity-based, model-guided construction of synthetic gene networks with predicted functions [J]. Nat. Biotechnol., 2009, 27(5): 465-471
- [10] Lu C, Jeffries T. Shuffling of promoters for multiple genes to optimize xylose fermentation in an engineered *Saccharomyces Cerevisiae* strain [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2007, 73: 6072-6077
- [11] Bakke I, Berg L, Aune T. E, et al. Random mutagenesis of the PM promoter as a powerful strategy for improvement of recombinant-gene expression [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2009, 75: 2002-2011
- [12] Alper H, Fischer C, Nevoigt E, et al. Tuning genetic control through promoter engineering [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2005, 102(36): 12678-12683
- [13] Tyo K E, Alper H S, Stephanopoulos G N. Expanding the metabolic engineering toolbox: more options to engineer cells [J]. Trends Biotechnol., 2007, 25(3): 132-137
- [14] 秦秀林. 构建 GAP 启动子文库提高重组毕赤酵母 S-腺苷甲硫氨酸合成[D]. 上海: 华东理工大学, 2011  
QIN Xiu-lin. Construction of functional GAP promoter library pave the way for metabolic engineering of *S-Adenosylmethionine* production in *pichia pastoris* [D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2011
- [15] Gietz R D, Woods R A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method [J]. Methods in Enzymology, 2002, 350: 87-96