

葡萄白藜芦醇合成酶基因的克隆及其 在毕赤酵母中的表达

摘 要

白藜芦醇 (resveratrol, 简称 Res), 是一种次生代谢产物, 植物内毒素, 具有抗氧化、抗肿瘤、抗血小板凝聚、防止人体低密度脂蛋白 (LDP) 氧化、提高肌体免疫力等功效; Res 广泛存在于种子植物中, 但是 Res 在植物体内的含量是非常低的, 所以仅仅用传统的提取方法得到高丰度的 Res 非常困难, 并且耗资过大。有关研究表明影响 Res 含量的主要因素是白藜芦醇合成酶 (resveratrol synthase, 简称 RS) 的量, 本研究试图通过基因工程的方法建立一种新的 Res 生产体系——毕赤酵母表达体系。

为了构建白藜芦醇合成酶 (RS) 基因的克隆载体, 用 PCR 技术从葡萄叶片总 DNA 中扩增出 RS 基因全长, 然后将其重组到克隆载体中。通过酶切对重组质粒进行了鉴定和测序, 结果表明, RS 基因已经正确克隆至 pUC19 中, 将重组质粒转入大肠杆菌里, 使 RS 基因能够在大肠杆菌里保存并且大量扩增, 为 RS 基因构建表达载体表达白藜芦醇合成酶奠定了基础。

将重组后得到的克隆载体用加 Kozak 序列的引物扩增, 凝胶电泳后回收目的条带, 然后将回收条带和酵母表达载体 pPIC3.5K 用同样的限制性内切酶切割, 用 T4 DNA 连接酶将两者连接。经酶切鉴定 RS 基因已经正确地连接到 pPIC3.5K 上。

用电激法将重组以后的酵母表达载体导入甲醇型酵母 (*Pichia.pasteoris*) 菌株 GS115 中, 获得转化子。将转化子进行 PCR 筛选, 得到酵母重组菌株。在以甲醇为唯一碳源的培养基上培养, 进行了重组酵母菌株的诱导表达。

关键词: 白藜芦醇; 白藜芦醇合成酶; 基因克隆; 酵母

The cloning and the expression in *Pichia.pasteoris* of resveratrol synthase gene from grape

Abstract

Resveratrol, a kind of time living to metabolize the outcome and a kind of plant endotoxin, has the anti- oxidize, anti- tumor, anti- blood platelets coagulates, keeps low density in human body LDP from oxidizing and increases muscle immunity dint and so on. Res is extensive in seed plant and it is low in plant, so it is difficulty to only use traditionally withdraw method to get plentiful Res. Research shows that resveratrol synthase is the main element to influence the content of Res. In this paper, we use the method of gene ungenerous to establish *Pichia.pasteoris* expression system.

In order to establish the cloning vector of RS, I amplify the RS gene from grapvive leaf total DNA by PCR. Then it was inserted into pUC19 .The recombinant vector was verified with restriction analysis. The results showed that the RS gene was cloned correctly into pUC19. It's concluded that the vector was constructed successfully. Then the recombinant plasmid was turn into the *E.coli* to make the RS gene large amplified.

The cloning vector was amplified by primer with kozak sequence, then RS gene was gotten after electrophoresis. The expression vector pPIC3.5K and RS gene were cutted with the same restrict enzymes. The RS gene and pPIC3.5K wre ligated together. The restriction analysis results showed that the RS gene was ligated correctly into pPIC3.5K .

With the electricity dash the recombinant plasmid was switch to the *Pichia.pasteoris* strain GS115. The strain with recombinant plasmid was chosen by PCR. Then the strain express the RS in the culture medium using methyl alcoholas the carbolic resource.

Key words: Resveratrol; The resveratrol synthase; Gene clonning; Yeast

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师尉亚辉教授指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得西北大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名： 金朕丽 签字日期： 2004年 6月 6日

第一部分 文献综述

1.白藜芦醇的研究进展

1.1 白藜芦醇的发现

白藜芦醇 (resveratrol, 简称 Res) , 此物质早在 1924 年就被发现^[1], 1974 年在葡萄属植物中也找到了该物质, 并首先定性为一种植物自身能产生的抗逆物质。目前已知 Res 还存在于桑树、花生、买麻藤、朝鲜槐等 12 科、31 属的 72 种植物中, 然而就其含量而言还是葡萄属植物中相对较高。

1.2 白藜芦醇的理化性质

白藜芦醇 (resveratrol, 简称 Res), 化学名为芪三酚 (3, 5, 4'-trihydroxystilbene), 分子式是 $C_{14}H_{12}O_3$ ^[2], 相对分子量为 228.25, 具有顺、反两种结构^[3]。Res 是植物体内产生的天然二苯乙烯类多酚物质, 为无色针状结晶, 熔点是 256°C-257°C, 在 261°C 时可升华, 易溶于乙醚、氯仿、甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯等有机溶剂, 在 366nm 的紫外光照射下能产生荧光, 能和三氯化铁-铁氰化钾起显色反应。

1.3 白藜芦醇的药理作用及作用机理

Res 是植物受到病原性进攻和环境恶化时产生的植物抗毒素, 具有较高的抗菌性, 对植物而言 Res 的含量与其抗菌能力呈正相关^[4-5]。研究证明^[6]它对灰色葡萄孢、金黄色葡萄球菌、肺炎双球菌等均有明显抑制作用, 但对酵母菌、半光假丝酵母的作用不明显。Pont 等^[7]就 Res 对灰霉病分析观察测定, 发现这些行为与 Res 的电子特性、亲脂性及亲脂物质的分子体积有关。对人体而言 Res 对心血管系统的作用主要表现为对脂类代谢和血小板凝聚^[8]的影响, 从而对心血管系统起到特殊的保护作用, 防止心血管疾病的发生^[9]。Jang 等^[10]较系统地报道了 Res 的抗肿瘤作用, Res 通过抗氧化和抗突变作用发挥其抗起始活性; 它可以诱导人早幼粒白血病细胞的分化, 表现了对癌的抗发展作用^[11]。近年来发现 Res 的抗癌机理可能与诱导细胞凋亡有关, 而 caspase(半胱天冬酶)家族在细胞凋亡中起重要作用^[12-16]。田雪梅等^[17]研究证明 Res 能够通过诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡抑制 HepG2 细胞的增殖。朱振勤等^[18]另辟新径, 研究了 Res 抑制 HeLa 细胞肿瘤活性的自由基机理, 为 Res 抗癌机制提供了自由基生物学方面的依据。Res 具有防癌作用, 主要是因为 Res 能抑制环氧合酶 (COX) 及过氧化氢酶的活性^[19]。在防

止心血管疾病方面, Res 通过与人体内雌性激素受体的结合调节血液中胆固醇的水平, 减少人患心血管疾病的风险。Res 还对血小板相互之间发生聚集形成血块病粘附在心血管壁上的现象有抑制作用, 从而抑制和减轻了心血管病的发生和反应^[20]。Res 是一种多酚类物质, 有显著的抗氧化、抗自由基作用^[21-24]。Res 也可以有效抑制脊髓损伤后早期受损局部脂质过氧化反应和活性氧水平, 对脊髓损伤有潜在的保护和治疗作用^[25]。Res 能抑制铜介导的低密度脂蛋白 (LPL) 的氧化, 还能通过螯合作用和消除自由基来保护 LPL 的过氧化, 从而达到预防动脉硬化和冠心病的作用^[26]。

1.4 白藜芦醇在葡萄植物体内的代谢及影响代谢的因素

1.4.1 生物合成

Liswidowai 等^[27]研究认为: 在真菌诱导前, 植物体内基本上没有 Res 的产生, 即使有, 量也很少, 且不稳定, 只有在葡萄受到真菌感染或者紫外线照射后才能产生。真菌细胞壁碎片被用来在刺激葡萄发生灰霉感染的某些过程, 例如通过酸的水解作用, 葡萄属植物细胞从真菌细胞壁中可得到葡聚糖激发子、可溶性碎片。可溶性碎片可阻断常规蛋白的合成, 而启动一小部分与诱导抗性有关的蛋白的合成, 可溶性碎片共同作用下, 产生 Res 及其衍生物^[27], 末尾阶段是 Res 合成酶 (简称 RS) 将一份子的对香豆酰 A (malony-CoA), 经苯丙氨酸聚丙二酸盐途径, 转化为 Res^[28]。其合成途径见图 1:

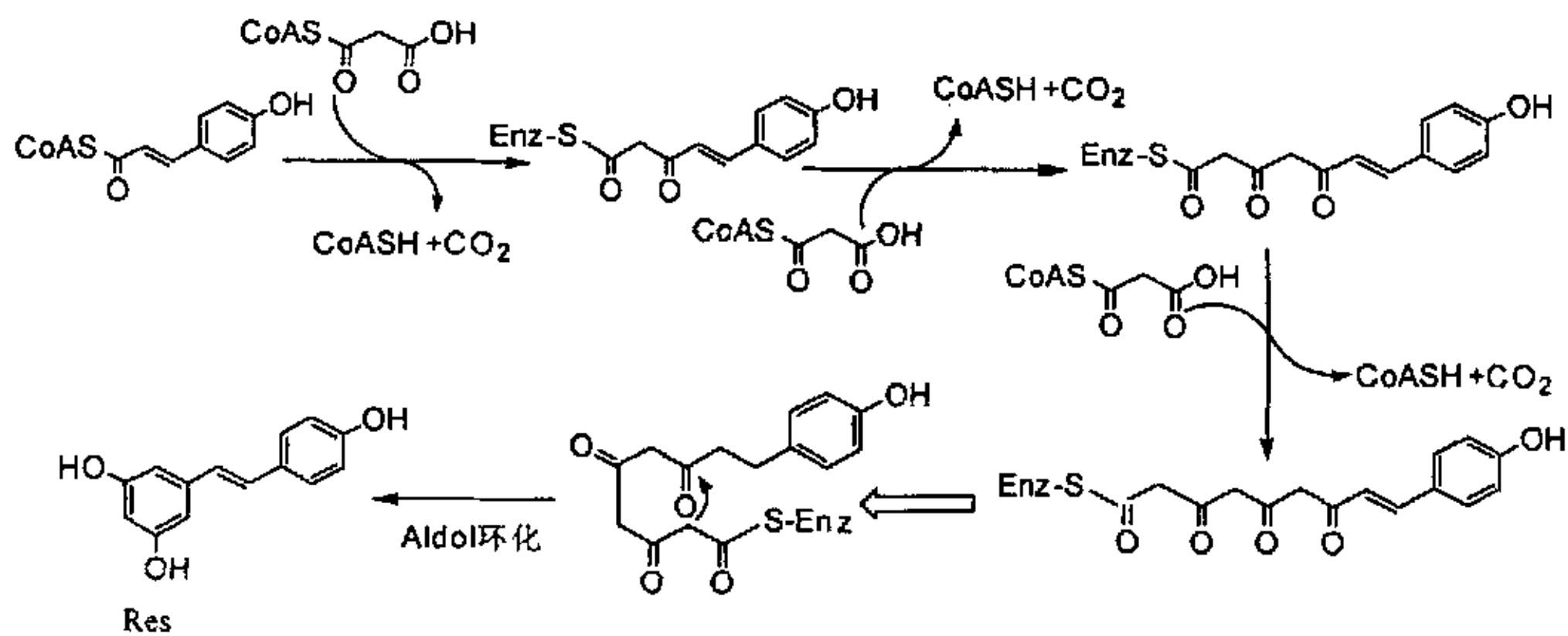


图 1 RS 催化的反应步骤

Fig. 1 Reaction steps catalyzed by RS

PAL, phenylalanine ammonia-lyase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; 4CL, 4-coumarate: CoA ligase

1.4.2 有关合成白藜芦醇的酶

RS (EC 2.3.1.95) 又被称为 3,4',5-三羟基二苯乙烯合酶, 是二苯乙烯合酶 (stilbene synthase, 简称 STS) 中的一类。植物中存在的 STS 被划分为两类, 一

类是花生或葡萄中存在的以 4-香豆酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 为底物,合成 Res; 另一类是以肉桂酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 为底物合成赤松素 (pinosylvin) [29]。Sparvoli 等^[30] (1994) 已从葡萄中分离出 Res 生物合成途径中的相关酶基因, Res 的生物合成途径如图 2 所示。我们实验室也对 RS 进行了分离, 并对其酶学性质做了初步研究, 我们认为 Res 的生物合成需要一系列相关酶的协同作用。当加入诱导因子后, 首先相关酶的 mRNA 含量有所上升, 随后蛋白质水平也上调, 因此证明的确新合成了部分酶; 另外也有可能植物体内原有的相关酶活性较低或处于钝化状态, 诱导物则作为酶的激活剂发挥作用, 也许正是这双重作用使得诱导可明显提高 Res 的含量。

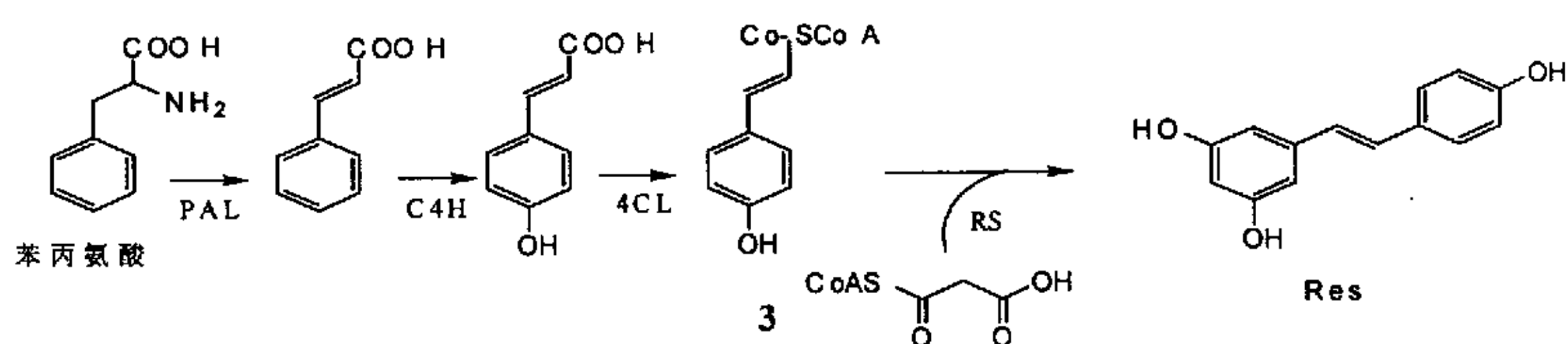


图 2 Res 的生物合成途径

Fig. 2 Pathway of resveratrol biosynthesis

PAL, phenylalanine ammonia-lyase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; 4CL, 4-coumarate: CoA ligase

1.4.2.1 白藜芦醇合成酶 (Resveratrol Synthase, 简称 RS)

在 Res 合成的全过程中, RS 是最后一个起作用的酶, 它与苯基乙烯酮合成酶关系密切^[31]。RS 是一个二聚体, 分子质量约为 90 000, 一个亚基的分子质量 45 000, 等电点 $PI=4.8$ ^[32]对 RS 的氨基酸序列进行分析, 发现 169 位半胱氨酸是必不可少的, 替换掉第 135 和 195 位上的半胱氨酸则降低酶的活性^[33]。RS 对底物的作用具有高度的专一性。Schoppner 等^[34] (1984) 研究证明在催化反应中丙二酰辅酶 A 不可以被其它乙酰基辅酶 A 代替, 4-香豆酰辅酶 A 则是 RS 的最适底物, 若将其换为其它结构类似物则酶活力大大下降且无 Res 生成。Morita 等^[35] (2001) 改变 RS 的底物研究了 RS 合成其它新型聚酮化合物的能力, 结果显示很微小的化学修饰就可引导 RS 催化反应形成一系列不同的新产物。Schroder 等^[36] (1992) 利用定点突变技术研究了 His-Gln 的存在及位置对 RS 的底物特异性的影响, 将 RS 中 His-Gln 转变为 Gln-His, 结果酶对受试三种底物的活性均丧失, 而 Gln-Gln 形式选择性地降低了 RS 对 4-香豆酰辅酶 A 的活性, 动力学分析证明

其与对照相比 K_m 有微小的上升, V_{max} 下降了 3 倍, 从而使得该酶从 Res 形成型转化为二氢赤松素形成型。RS 在某些植物中属结构酶, 而在一些植物中属诱导酶, 但无论是哪一种类型, 诱导处理都会大大提高 RS 的合成率和活性。RS 的常用诱导途径是灰色葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 感染和紫外光处理。Liswidowati 等^[27] (1991) 在一种降低复杂程度的优化体系基础上研究了灰色葡萄孢与葡萄间的相互作用, 结果显示感染后葡萄细胞内普通蛋白质合成被明显阻断, 一系列涉及诱导抗性的蛋白质合成得到选择性提高, 其中 RS 合成率最高。Schoppner 等^[37] (1979) 采用 254nm 的紫外光处理松树的不同器官, 发现处理 10min 新鲜的针状叶中就形成了 STS, 处理 30h 可以大大增强 STS 活性。实验证明诱导因子的参与引起了受体植物蛋白质合成模式的显著改变。诱导前期 RS 基因转录的快速、瞬时提高, 使得 RS 基因的 mRNA 含量迅速上升, 高水平的 RS mRNA 是控制整个后期合成的主要因素^[38]。对 RS mRNA 合成的动力学研究证明, 诱导因子可迅速刺激 RS mRNA 的合成, 并在诱导后一定时期内达到高峰期, 随后 mRNA 的积累将终止^[39]。基于葡萄细胞悬浮培养的研究显示 RS mRNA 的瞬时表达总是存在两个高峰期, 即诱导后 6h 和 24h^[40]。高水平的 RS mRNA 是后期合成 RS 的基础, 但诱导因子的作用不仅仅如此, 它使 RS 的活性也得到提高, 同时 Res 代谢途径中的其它相关酶活性也同样提高^[27]。Res 生物合成的前体物质普遍存在于植物中, 因此诱导 RS 将提供一个提高抗菌性的新思路。

1.4.2.2 二苯乙烯合酶 (Stibene Synthase, 简称 STS)

STS 是人们研究最透彻的一种酶, STS 的合成在整个 Res 合成过程中速度最快, 从空间角度来说, STS 呈现微观的不均一性, 是带一个亚基的二聚体, 分子量为 43 000, 等电点 $PI=5.4$ ^[27]。对 STS 的进一步研究发现, 整段 STS 的 cDNA 是从葡萄属植物的 mRNA 序列开始的, 含有 39 种氨基酸的片断。通过对臭氧在欧亚种葡萄品种上诱导 STS 转录表达的研究, 此研究是通过溶合 STS 启动子与 β -葡萄糖苷酸酶 (GUS) 报告基因, 转化到烟草上。发现 0.1mg/L 臭氧处理 10h 可以使 GUS 基因表达提高 11 倍, GUS 基因活性组织化学定位发现其活性表达呈斑点状分布于整个叶片。叶片的横切面组织化学定位表明 STS 的启动子 (Vst 1) 在栅栏组织、海绵薄壁组织中被诱导, 表皮组织细胞中表达较少。5' -端缺失表明部分启动序列在 -430 和 -280 处构建臭氧反应作用区, 有效病原菌灰霉

病诱导应从-280 到-140^[41]。

1.4.2.3 过氧化物同工酶 (Peroxidase Isoenzyme)

过氧化物同工酶能将 4-羟基进一步氧化成 Res。Calderon 等^[42]使用葡萄栽培品种 Ariren 和 Monastrell 研究了在愈伤组织的组培中,通过对过氧化同工酶的表达和定位研究,认为在浆果的中果皮中形成愈伤组织,其细胞壁中有几种过氧化物同工酶的不同表达,其中过氧化物同工酶 A₁ 的氧化能力是无限的。

1.4.3 RS 与 CHS 的比较研究

RS 和 CHS (EC2.3.1.74) 均是植物特异性的聚酮化合物合酶,是 CHS 家族的代表性成员。二者在结构和功能上均存在密切的联系。它们都是同二聚物且亚单位的分子量都在 43000-45000Dalton 范围内^[35, 43];具有相同的底物,但产物却不同,整个酶反应过程中只是四酮化合物折叠环化的机制不同,即 RS 属醛醇缩合 (aldol) 型环化,而 CHS 属克莱森 (claisen) 型^[35]。正是不同的环化机制使它们形成了不同的产物。

RS 和 CHS 在起源上也存在一定关系。RS 是 Res 生物合成中的关键酶,CHS 是黄酮类化合物和花色素合成途径中的关键酶^[44],Tropf 等认为 RS 可能是从 CHS 经过多元进化形成的,二者的氨基酸同源性高于 65%,系统进化分析也显示了它们具有较高的同源性^[45]。而 CHS 可能与高等植物中脂肪酸合成的相关酶 β -酮脂酰-ACP 合酶有共同的进化起源^[46]。

最近报道的苜蓿中的 CHS 三维晶体结构显示该酶含有两个功能独立的活性位点,即由四个氨基酸 (Cys¹⁶⁴,Phe²¹⁵,His³⁰³,Asn³³⁶) 界定的香豆酰结合部位和环化位点。这四个氨基酸残基在 RS 中也是保守的,尽管 RS 和 CHS 的三维晶体结构还没有确定,但认为 RS 和 CHS 具有相似的活性位点结构^[47]。Lanz 等认为 Cys 是 RS 活性表达所必需的,他们用定点突变将 RS 中高度保守的 6 个 Cys 变换为 Ala,并使其在大肠杆菌异种系统中得到表达,突变体的检测结果显示只有 Cys¹⁶⁹ 是必需的;抑制因素的研究认为 Cys¹⁶⁹ 是浅蓝菌素 (cerulenin) 的主要靶目标,这种抗生素直接与缩合活性中心的 Cys 作用,当然其它位点的突变也使 RS 活性下降。同时他们认为 Cys¹³⁵ 与 Cys¹⁹⁵ 可能是引起二者特异性产物的原因^[36]。

RS 和 CHS 具有如此之多的相似性,人们就设想能否构建一个 RS 和 CHS 的异源二聚物且该二聚物可同时发挥两种酶的功能,但是所做的实验却未能如愿

^[38]。大量的其它突变发生实验也没有检测到同时具有两种酶活性的蛋白质^[39]，因此 RS 和 CHS 的活性排斥也证明了这一点。

1.5 有关白藜芦醇的诱导

RS 在某些植物中属结构酶，而在一些植物中属诱导酶，但无论是哪一种类型，诱导处理都会大大提高 RS 的合成率和活性。实验证明诱导因子的参与引起了受体植物蛋白质合成模式的显著改变。诱导前期 RS 基因转录的快速、瞬时提高，使得 RS 基因的 mRNA 含量迅速上升，高水平的 RS mRNA 是控制整个后期合成的主要因素^[42]。对 RS mRNA 合成的动力学研究证明，诱导因子可迅速刺激 RS mRNA 的合成，并在诱导后一定时期内达到高峰期，随后 mRNA 的积累将终止^[39]。基于葡萄细胞悬浮培养的研究显示 RS mRNA 的瞬时表达总是存在两个高峰期，即诱导后 6h 和 24h^[40]。高水平的 RS mRNA 是后期合成 RS 的基础，但诱导因子的作用不仅仅如此，它使 RS 的活性也得到提高，同时 Res 代谢途径中的其它相关酶活性也同样提高^[27]。另外，对 RS 诱导的直接结果是 Res 的大量积累，实际上诱导也间接调动了植物体的防御机制，如木质素状物质沉积、富含羟脯氨酸的糖蛋白的积累及某些特定水解酶活性的提高^[48]。研究证明二苯乙烯类植物抗毒素对于花生、葡萄和松树这三种植物而言是非常重要的^[49]，而这三例中诱导后 RS 基因的表达及 Res 的形成都是一个快速过程。总之诱导或逆境胁迫触发了协调植物抗性的如 HR、PR 蛋白和 Res 产量等一系列信号网^[50-52]，使植物抵抗逆境。

Res 是低分子量的广泛存在于植物中的次生代谢产物，对微生物的生长有直接的抑制作用，同时病原菌侵染或其它诱导因子可以诱导 RS，进而合成 Res^[53-54]。早期对 RS 诱导研究主要在于用紫外光处理幼嫩的植物或种子，随后人们逐渐建立了植物细胞培养的研究体系，目前植物细胞培养已成为次生代谢产物生化研究的有效模式体系^[55]。细胞悬浮培养的应用更为广泛，尽管它不能考虑到整个诱导过程的方方面面，但它却大大方便了在酶学和 mRNA 水平上的研究工作^[27]。

RS 常用诱导途径是灰色葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 感染^[27]和紫外光处理^[37]。灰色葡萄孢可以引起葡萄植株灰霉病，使葡萄的产量、质量均受到严重损失。葡萄对灰色葡萄孢产生抗性的部分原因是诱导抗性机制快速形成了 Res^[39]。Gehlert 等^[56] (1990) 用灰色葡萄孢感染松树秧苗使 STS (赤松素形成型) 活力 24h 提高

了 38 倍。当然实际研究中也存在其它的有效诱导途径, 例如: RS 可被存在于真菌或细菌细胞壁和培养液中的多糖、糖蛋白及脂类物质所诱导; 有时一些结构不相关的人工诱导物也可起一定作用^[38]; 臭氧处理^[31]、干燥处理^[29]也同样具有诱导作用。在我们的研究中, 以葡萄皮的组织培养为基础, 选用灰色葡萄孢、金黄色葡萄球菌和绿色木霉作为综合诱导子使愈伤组织中 Res 的含量提高了约 5 倍, 三者的诱导效率依次降低, 同时我们也发现这些诱导子对细胞的生长有一定的抑制作用。Adrian 等^[31]分别选用灰色葡萄孢的分生孢子、紫外光和 $AlCl_3$ 作为诱导剂来研究各诱导因子的效率, 结果证明三种诱导剂存在不同的诱导效率。Chung 等^[57] (2001) 通过实验也证明生物与非生物因子均可诱导 RS 基因, 他们用酵母提取物和 UV 诱导了叶、根中 RS 基因的表达, 同时乙烯、茉莉酮酸和水杨酸均可诱导 RS mRNA 在叶中积累。曾有人将 RS 基因这类抗病基因分为两类, 一类是快速反应型, 另一类是迟缓型, 似乎不同类型的基因存在着不同的诱导因子^[40]。

2. 白藜芦醇合成酶基因研究进展

2.1 白藜芦醇合成酶基因的结构

通过对基因组 DNA 与 cDNA 序列的比较分析显示 RS 基因 5' 上游 -33 位点存在 TATA 盒子, 基因的编码区起始于第一个 ATG, 另外 5' 端包含有 RS 基因唯一的内含子 (179-547 位点), 该区域内富含框内终止密码子, 内含子将 RS 基因的编码区分成两部分^[58,59]。从葡萄中分离出的两个 RS 基因 (vst1 和 vst2), 将其转入烟草, 含有这两个基因的转基因烟草对灰色葡萄孢的抗性大大提高^[58]。vst1 启动子缺失分析证明转录位点上游 -280--140 之间的序列是真菌诱导所必需的, 而对臭氧诱导的 RS 的 5' 端缺失分析证明 -430--280 间的启动子序列是臭氧诱导所必需的区域^[59], 即臭氧诱导所必需的区域不同于传统的病原菌诱导型的。

2.2 白藜芦醇合成酶基因的转基因技术的研究进展

伴随着基因工程操作技术的建立与发展, RS 的转基因研究已倍受科学家的关注。不同来源的 RS 基因结构存在一定的差异, 当然其合成 Res 的能力也不同, 因此关于 RS 基因的研究十分活跃^[60]。将 RS 基因转入烟草和西红柿中, 随着抗菌化合物 Res 的形成, 转基因植物对葡萄孢属 (*Botrytis*) 和疫霉属

(*Phytophthora*) 病菌的抗性大大提高^[40]。Hain 等^[39] (1990) 从花生中分离出 RS 基因, 并将其与卡那霉素抗性基因一同转入烟草, 选用紫外光进行诱导, 结果显示 RS 基因迅速在烟草细胞中得到表达, 10min 后检测到了特异 mRNA, 花生和转基因烟草悬浮培养物的 RS mRNA 合成的比较研究也显示了相同的基因表达动力学参数。Hipskind 等^[61] (2000) 以 CaMV35S 为启动子, 将花生中的 RS 基因转入苜蓿, 通过 HPLC、UV 和 NMR 分析证明转基因苜蓿中积累了一种新化合物 RGluc (trans-resveratrol-3-O- β -D-glucopyranoside), 并且 RGluc 含量和 RS 的转录水平在植物的不同组织中存在一定的差异, 叶、茎的均高于根, 另外生物检测的结果证明 RGluc 和 Res 均大大抑制了茎点霉属 (*Phoma*) 的真菌的生长。Chung 等^[57] (2001) 研究了 RS 基因在花生植物体内组织特异性表达, 体外无菌培养的花生根中存在低水平的 RS mRNA, 但是大田生长的成熟植株中根和壳都出现了相当高水平的 RS mRNA, 叶子中的低于检测限度, 其次幼嫩新鲜的壳高于成熟壳。Tropf 等^[62] (1995) 将 RS 和查尔酮合酶 (chalcone synthase, 简称 CHS) 的编码区共同转入大肠杆菌的 PQE-6 质粒载体, 结果二者共同表达, 同时他们应用突变分析证明 Cys¹⁶⁹ 是 RS 活性表达的必需氨基酸。Yamaguchi 等^[43] (1999) 也将 RS 与 CHS 基因共同转入大肠杆菌, 二者也得到了表达, 相应的产物也已检测到, 但重要的是, 他们发现这两个基因在大肠杆菌中得到了交叉表达, 即 RS 可催化形成柚皮素 (naringenin) (占 Res 的 1.4%-2.3%), 而 CHS 可催化产生 Res (占柚皮素的 2.7%-4.2%), 这可能是由于它们活性位点构象的柔性所导致的。Fettig 等^[63] (1999) 将嵌合的 RS 基因转入两种德国春小麦 (Combi 和 Hanno), 通过 RT-PCR 证明了 RS 基因的表达, 用 HPLC 法和质谱分析法检测到 Res, 但没有检测到对病原菌的抗性, 进一步的研究证明 RS 基因不仅在亲本中得到表达, 按孟德尔法分离的两个品种的子一代也表达了 RS 基因, 同时研究显示 RS 基因的失活伴随着该基因的甲基化。研究人员将葡萄中的 RS 基因分别转入大麦 (*H. vulgare*)、大米 (*O. sativa*) 和西红柿 (*L. esculentum*) 中, 在转基因植物中均检测到 RS, 对相应病原菌的抗性也有所提高, 其中转基因西红柿对蔓延疫霉 (*Phytophthora infestans*) 有效, 而对灰色葡萄孢和马铃薯早疫病链格孢 (*Alternaria solani*) 无作用^[64]。

2.3 白藜芦醇合成酶基因在基因转导过程中的异常表达

伴随着 RS 基因的转入，有的植物体也发生了异常的反应。Kobayashi 等^[65] (2000) 从三种葡萄 (*V. vinifera*, *V. labrusca*, *V. riparia*) 中分离到 RS 基因，在 CaMV35S 启动子控制下，由农杆菌介导将它们转入猕猴桃 (*Actinidia deliciosa*)，结果表明：该基因的确在植物体内得到表达，但转化体的叶子中产生的是云杉新苷 (piceid) 而不是 Res，这可能是由于 Res 被该植物内部存在糖基转移酶作用形成了云杉新苷。Fischer 等^[66] (1997) 从葡萄中分离到 RS 基因并转入烟草中，RS 基因得到高效表达，也产生了高水平的 Res，但转基因烟草的花粉失去生活能力，而且烟草粉红花色也消失了。

3. *Pichia.pasteoris* 基因表达系统的研究进展

利用基因工程技术获得有重要生物学活性的蛋白质是现在生物技术的重要目标，在体外表达蛋白质，重要的是最大限度地保持产物的空间结构和生物学活性与天然蛋白一致，同时努力提高表达量。为此人们建立了大肠杆菌、杆状病毒、哺乳动物细胞和酵母四大外源基因表达体系以适应各种来源的蛋白质在体外高效表达。

大肠杆菌系统具有产量高、成本低、生产周期短的特点，但胞内高水平表达的外源蛋白多数以不溶解、无活性的包涵体形式存在，而由包涵体中提取高水平、高比活的目标蛋白的最大问题是回收率低，大部分目标蛋白在复性过程中析出丢失。杆状病毒系统采用先顺时感染，然后裂解感染的昆虫细胞的方式产生重组蛋白，此系统表达的蛋白折叠正确且被糖基化修饰，但是有时糖基化序列与天然的不同，且蛋白产量不稳定。哺乳动物表达系统生产的蛋白具有天然构象，稳定性好，糖基化模式没有发生改变，但哺乳动物细胞培养成本高，条件要求严格，蛋白表达水平低。而酵母是低等真核生物，具有细胞生长快，易于培养，遗传操作简单等原核生物的特点，又具有真核生物对表达的蛋白质进行正确加工、修饰、合理的空间折叠等功能，非常有利于真核基因的表达，能有效克服大肠杆菌系统缺乏蛋白翻译后加工、修饰的不足。因此酵母表达系统受到了越来越多的重视和利用^[67]。

人们对酿酒酵母 (*Saccharomyces Cerevisiae*) 分子遗传学方面的认识最早，酿酒酵母最先作为外源基因表达的酵母宿主，1981^[68] 年利用酿酒酵母表达了第一个外源基因—干扰素基因，随后又有一系列外源基因在该系统得到表达^[69~71]。

但是，酿酒酵母很大部分表达由实验室扩展到工业规模时，培养基中维持高拷贝数的选择压力消失，质粒变得不稳定，拷贝数下降，而多数外源基因的高效表达需要高拷贝的维持，因此产量下降^[72-74]。同时，实验室用培养基复杂而昂贵，采用工业规模能够接收的培养基时，往往导致产量下降^[75]。为克服酿酒酵母的局限，人们发展了以甲基营养型酵母（methylophilic yeast）为代表的第二代酵母表达系统。

甲基营养型酵母包括：*Pichia*, *Hansenula*, *Torulopsis*, *Candida* 等。目前，以 *Pichia.pasteoris*（毕赤巴斯酵母）为宿主的外源基因表达系统近年来发展非常迅速，应用也很广泛，已利用此系统表达了一系列有重要生物学活性的蛋白质，并逐步走向工业化。1983 年，美国 Phillips Petroleum 公司 Wegner^[76]等最先开发 *Pichia.pasteoris*，利用其发酵培养能达到很高密度的特性，生产干酵母蛋白作为食物或动物饲料的来源。由于 *Pichia.pasteoris* 能进行高密度发酵，若能作为外源基因表达系统，就可以方便地形成工业规模，大量生产外源蛋白。在这种设想下，SIBIA 公司和 Phillips Petroleum 公司开展了合作，Ellis^[87]于 1985 年筛选到强效可调控 AOX1 启动子，同年 Cregg^[78]等建立了 *Pichia.pasteoris* 酵母转化方法，1987 年 Cregg 等和 Tschopp^[79]等率先利用 *Pichia.pasteoris* 外源基因表达系统表达了 HbsAg 和 Laz。此后，*Pichia.pasteoris* 外源基因表达系统逐步得到完善，形成了继酿酒酵母基因表达系统以后的第二代酵母表达系统，下面就 *Pichia.pasteoris* 外源基因表达系统做一个简单的介绍。

3.1 表达载体的构成

Pichia.pasteoris 酵母菌体内没有天然质粒，所以表达载体需与宿主染色体发生同源重组，将外源基因表达框架整合于染色体中以实现外源基因的表达^[80]。包括启动子、外源基因克隆位点、终止序列、筛选标记等。表达载体都是穿梭质粒，先在大肠杆菌复制扩增，然后被转到宿主酵母细胞中，因此，表达载体还含有大肠杆菌质粒的复制单元（ColE₁）以及筛选大肠杆菌转化子的标记。如使产物分泌到细胞外，载体还需要带有信号肽序列。

醇氧化酶（alcohol oxidase, AOX）使甲基营养型酵母甲醇利用途径的第一个酶，催化甲醇氧化为甲醛。当 *Pichia.pasteoris* 在含葡萄糖、甘油或者乙醇为碳源的培养基上生长时，检测不到 AOX，而在以甲醇为碳源的培养基上成长时，

AOX 就能大量生产，以适应 *Pichia.pasteoris* 生长的代谢需要，其含量可占菌体蛋白的 30%^[81]。由此推测 AOX₁ 基因启动子可能作为表达外源基因的有效启动子。AOX₁ 基因表达受转录水平的严格调控，在甲醇培养基中生长的酵母细胞内，AOX₁mRNA 含量可占中 polyA⁺RNA 量的 5%，但在其他碳源培养基中生长的酵母细胞内检测不到 AOX₁mRNA^[82]。*Pichia.pasteoris* 可以利用两类筛选标记，一类是营养缺陷选择标记，包括 His4、Arg4 等，其中 His4 是最常用的筛选标记。*Pichia.pasteoris* 宿主菌 GS115 为 His4 基因缺失突变体，不能编码产生组氨酸脱氢酶，只能在全营养培养基如 YPD 上生长，不能在缺乏组氨酸的选择培养基上如 MM、MGY 中生长。带有完整 His 4 基因的载体 DNA 与宿主染色体整合，使转化后的 GS115 能在选择培养基上生长，从而筛选得到转化菌株。另一类是显性选择培养标记，如 Tn903、kan^r、SUC2 等，即使利用全培养基也能表达得到筛选的目的。G418 为氨基糖苷类抗生素，正常情况下，宿主菌 GS115 在含 0.25mg/ml G418 的 YPD 培养基中生长就收到明显抑制，表达载体若含有大肠杆菌转座子 Tn903 kan^r 序列，转化 GS115 后，可使转化株对 G418 产生抗性，且抗性强弱与载体整合的拷贝数有正比关系，利用 Tn903 kan^r 是筛选多拷贝转化株的重要方法^[83]。另外，在表达载体的还有其他的序列，例如在启动子下游有供外源基因插入的多克隆位点，多克隆位点下游为 AOX₁3' 端终止序列。终止序列对最大限度的提高表达量具有重要作用，若删除终止序列，将转录产生较长的 mRNA，此类 mRNA 很不稳定，易急剧降解，从而影响产物的表达量。

3.2 表达载体与宿主染色体的整合

将外源基因插入表达载体后，用适当的限制性内切酶切割，使之线性化，再将线性化重组载体通过适当方法，如原生质体法、锂盐法、电转法等，转化酵母宿主菌。载体线性化以后形成游离的 AOX₁5' 末端和 AOX₁3' 末端，两末端与酵母染色体的同源区域发生双交换，取代宿主染色体中 AOX₁ 编码区，使外源基因位于 AOX₁ 启动子下游，宿主染色体 AOX₁ 结构基因被删除，失去编码 AOX₁ 的能力。最常用的 *Pichia.pasteoris* 宿主菌为 GS115，该菌株为组氨酸营养缺陷型菌株，缺乏合成组氨酸合成酶的能力。发生整合的宿主菌同时也携带了来自载体的完整 His4 基因，因而可在不含组氨酸的营养缺陷型培养基上生长从而方便地筛选出转化子。

值得注意的是，并非发生整合的所有转化子全能将外源基因整合在正确位置，只有整合在 AOX₁ 结构基因两侧并将之取代的双交换才是有效整合。事实上这种正确整合的转化子仅占有所有 His⁺转化子的 30% 左右，所以还需要对转化子进一步的筛选^[84]。整合在正确位置的 His⁺转化子失去了 AOX₁ 结构基因，仅靠 AOX₂ 基因编码非常少量的醇氧化酶支持转化子在含甲醇的培养基上缓慢生长，其表现型为 His⁺Mut^s；而整合在非正确位置的 His⁺转化子仍有 AOX₁ 的能力，在含甲醇的培养基上能正常生长，表现型为 His⁺Mut⁺，所以可以在含甲醇培养基中筛选得到整合位置正确的转化子。此转化子非常稳定，在大规模发酵培养时也不致表达框架的丢失。

除上述双交换整合外，用某些限制性内切酶切割载体时不产生游离的 AOX₁ 启动子 5' 末端和 AOX₁3' 末端，从而使线状载体与宿主染色体同源区发生单交换整合^[85]。单交换整合分为两种：一种是 AOX₁ 启动子 5' 端内部切开，单交换整合入 AOX₁ 位点；另一种是在 His4 基因序列内部切开，单交换整合入 His4 基因位点，此两种整合方式都不能删除宿主染色体中 AOX₁ 结构基因，表现型为 His⁺Mut⁺。Mut⁺转化子能利用甲醇快速生长，对外源基因表达有一定的影响。一般认为单交换整合转化子在高密度发酵时不稳定，酵母生长迅速而外源基因表达较低，所以都采用双交换整合以获得高效表达。但是单交换整合有利于多拷贝整合。

3.3 影响外源基因表达量的因素

基因表达最常见的是转录水平的调节，稳定状态的 mRNA 水平是决定外源蛋白产量的基本因素。mRNA 的量很大程度上取决于启动子的转录起始效率，所以启动子的强弱几乎直接决定了外源基因的表达水平。另外外源基因的拷贝数、表达产物的稳定性和培养条件也是影响基因表达的重要因素。

Sreekrishna^[86]等在 *Pichia.pasteoris* 酵母中表达 TNF 时发现，基因拷贝数增加，表达量随之增加，从占菌体总蛋白的 10% 可增加到 30%。外源基因的多拷贝整合可通过两种方法：一是通过直接构建含多个外源基因拷贝的表达载体，利用 pAO815 可以插入多拷贝外源基因^[85,87]；二是从大量转化子中筛选发生多拷贝整合的表达株。利用 SDS-PAGE^[86]、免疫印迹^[88,89]、菌落杂交^[90]等方法可方便地筛选高拷贝表达株。

表达产物的降解严重影响蛋白的产量^[80]，产物的稳定性主要受到两方面的影响。一是产物自身的特点决定其易受外界因素的作用，可通过改造目的基因来解决，如删除或突变蛋白水解酶敏感的氨基酸编码区，这些方法选择余地非常有限。二是宿主蛋白水解酶的作用，应设法减少宿主蛋白酶的产生并限制其活性。Invitrogen 公司出售商品化的 SMD1163 酵母菌株，该菌株基因组中 Pep4 基因发生了突变，造成蛋白水解酶 A 活性地丧失，保护表达产物免受降解，促进了表达量的提高。

培养条件也是影响表达量的一个重要因素，甲基营养型的酵母一般培养温度为 30℃ 左右，诱导表达时要求不超过 30℃，且需要高通气量。转化株在普通三角瓶中诱导表达量远不及在发酵罐中的表达量，其原因可能就是三角瓶缺乏 PH 值控制，通气量不够，或者是碳源的补充不易控制在适宜水平^[91]。但实验室规模都以三角瓶为主来研究目的基因地表达情况，可以加入合适的缓冲液来调节培养基 PH 值，保持最高的通气量来尽可能满足酵母培养、诱导表达的需要。

转化酵母株一般先在仅以甘油为碳源的培养基中生长，使酵母迅速繁殖，蓄含菌体数量，然后去除甘油培养基，加入甲醇诱导培养基，诱导表达。酵母在含甲醇的诱导培养基中仅能缓慢生长，因此，以典型培养方式诱导，表达量要经过 150~200 小时才能达到最高水平。近来在蓄含培养和诱导培养之间引入一过渡期，此期培养基由甘油和甲醇混合组成，既利于基因表达，又能维持酵母保持较高的生长速度和代谢活性，可使表达水平在诱导 50 小时或更短时间内就达到较高水平，节省了培养时间，提高了表达效率。

缓慢速度地生长可能有利于产物翻译后的加工，如二硫键的形成，空间折叠等。Cregg 在删除了 AOX₁ 基因的 GS115 酵母表达的 HBsAg 大部分呈直径为 22nm 的颗粒，而未删除 AOX₁ 基因的野生型 GS115 酵母表达的 HBsAg 仅 10% 包装成直径为 22nm 的颗粒，由此推测删除了 AOX₁ 基因的酵母株在含甲醇的培养基上生长缓慢，使表达的 HBsAg 来得及加工成颗粒，而含 AOX₁ 基因基因的酵母生长较快，使大量的 HBsAg 未及加工就包装成颗粒。所以酵母菌缓慢生长有利于产物正确折叠，维持产物的空间结构，一般认为比 30℃ 稍低的诱导温度有利于酵母的缓慢生长，可望提高表达效果。

4.实验的意义和研究内容

Res 是一种重要的植物抗毒素，是一种广谱的抗菌素，在植物保护方面具有很重要的作用，同时对动物机体也有一定的作用。1997 年，Jang 等较系统地报道了 Res 的抗肿瘤作用以后，Res 的有关抗癌研究引起了人们的广泛关注。同样，Res 对心血管系统也有一定的保健作用，主要表现为对脂类代谢和血小板凝聚的影响。Res 是多酚类物质，具有显著的抗氧化、抗自由基作用。Res 也可以有效抑制脊髓损伤后早期受损局部脂质过氧化反应和活性氧水平，对脊髓损伤有潜在的保护和治疗作用。

Res 对机体的种种功效，让 Res 的研究成为了热点，伴随着基因工程操作技术的建立与发展，RS 的转基因研究已倍受科学家的关注。不同来源的 RS 基因结构存在一定的差异，其合成 Res 的能力也不同，因此关于 RS 基因的研究十分活跃。目前已经从葡萄、花生、洋槐中得到了 RS 基因，并且已经在西红柿、烟草、大麦、小麦等植物中建立了表达体系，但是还没有人建立过 RS 基因的酵母表达系统，酵母属单细胞低等真核生物，便于基因工程的操作，又具有糖链加工系统等功能。

本试验试图建立毕赤酵母表达系统，用发酵的方法来大量生产 Res。在白藜芦醇合成过程中，白藜芦醇合成酶是合成途径中的关键酶，其量的大小直接影响了白藜芦醇的含量。因此该实验的目的是获得 RS 基因、构建适合的载体进行转导、以便得到该基因的表达，最终建立酵母表达体系。

该实验工作以葡萄叶子总 DNA 为模板进行扩增，将扩增产物和 pPC19 相连以后，转入大肠杆菌中进行基因的大量扩增。对连有目的基因的载体 pUC19-J 测序，测序结果显示扩增出的基因和 GenBank 中所报道的葡萄来源的 RS 基因的同源性在 98% 以上，充分证明此次扩增的条带为 RS 全长基因。将所得到的 RS 基因和表达载体 pPIC3.5K 连接以后，鉴定其连接的正确性，用电转的方法将连有 RS 基因的表达载体 pPIC3.5KJ 转入到甲醇型酵母 GS115 中，经组氨酸缺陷筛选和 PCR 初筛以后得到整合到酵母染色体中的 GS115 酵母株，对其进行甲醇诱导表达，得到了 RS 基因的表达产物，建立了 RS 基因的甲醇型酵母表达体系。

第二部分 材料和方法

1. 主要试剂与仪器

1.1 基本试剂及生产厂家

考马斯亮蓝 G-250、蓝色葡聚糖-2000、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、四甲基乙二胺 (TEMED)、蛋白质分子量标准等购自华美生物工程公司；甲醇、无水乙醇、硫酸铵、乙酸、氯仿、异丙醇等购自西安化学试剂厂；十六烷基三甲酸溴化铵购自西安化玻站化学厂；氨苄青霉素、酵母氮源 (YNB)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 由 Bebcos 分装；5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D 半乳糖苷 (x-gal)、山梨醇、葡萄糖购自生工生物工程有限公司；CaCl₂ 购自天津市天达净化材料精细化工厂；生物素购自北京鼎国生物技术发展中心；琼脂粉由 India 分装。

1.2 酶和其他试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、高保真 Taq 酶均购自大连宝生物技术工程有限公司，Taq 酶购自 MBI，DNA 纯化试剂盒、质粒提取试剂盒购自碧云天生物技术有限公司，DNA 凝胶回收试剂盒购自杭州维特洁生化技术有限公司，引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3 本试验所用的菌株及质粒：

- (1) 大肠杆菌 JM109 由本实验室保存
- (2) 酵母菌株 (*Pichia pastoris*) GS115 购自 Invitrogene 公司
- (3) pUC19 购自华美生物工程公司
- (4) 质粒 pPIC3.5K 购自 Invitrogene 公司

1.4 主要仪器和厂家

Himac CR 22G 型高速冷冻离心机	日本
5415D 台式离心机	Eppendorf 公司
TG328 电光分析天平	上海天平仪器厂
紫外可见分光光度计 751-GW	上海分析仪器厂
DYY-III-211 型垂直平板电泳槽	北京六一仪器厂
DYY-III-5 型电泳仪	北京六一仪器厂
电转仪	Invitrogen 公司
PCR 仪	德国

1.5 试剂和培养基

1.5.1 试剂

- (1) 10×YNB: 每升含 34g 酵母基础氮源培养基（无硫酸铵）和 100g 硫酸铵，过滤除菌，4℃保存。
- (2) 500×B: 将 20mg 的生物素溶于 100ml 水中，过滤除菌，4℃保存。
- (3) 100×H: 400mg 的 L-组氨酸溶于 100ml 水中，过滤除菌，4℃保存。
- (4) 10×D: 200g 葡萄糖溶于 1000ml 水中，灭菌 15 分钟或者过滤除菌。
- (5) 10×M: 将 5ml 甲醇与 95ml 水混匀，过滤除菌。
- (6) 10×GY: 将 100ml 甘油和 900ml 水混匀后，高压灭菌或者过滤除菌。
- (7) 1M 磷酸钾溶液: 将 1mol/L 的 K_2HPO_4 溶液 132ml 与 1mol/L 的 KH_2PO_4 溶液 868ml 混匀，其 PH 为 6.0，如需调节 PH，则用磷酸和氢氧化钾调节 PH。

1.5.2 培养基

(1) LB 培养基:

每升含胰蛋白胨 10g，酵母提取物 5g，NaCl 10g。用 NaOH 调 PH 值至 7.0，灭菌后待用。加 1.5% 琼脂配成固体培养基。

(2) YPD 培养基:

1% 酵母提取物

2% 蛋白胨

2% 葡萄糖

(3) MD 培养基:

100ml 10×YNB

2ml 500×B

100ml 10×D

定容至 1000ml 即可，4℃保存。

(4) MDH 培养基:

如果要配制 MDH，可在上述的 MD 中加入 10ml 的 100×H 即可，4℃保存。

(5) BMGY 培养基:

1.34% YNB

0.00004%生物素
1%酵母提取物
2%蛋白胨
1%甘油
0.1M 磷酸缓冲液, PH7.0

(6) BMMY 培养基:

以 0.5% 甲醇替代甘油, 其余成分和 BMGY 相同。

1.5.3 抗生素

100m mol/mlAmp: 将 1000mgAmp 溶于 8ml 水中, 定容至 10ml, 0.22 μ m 滤器超滤除菌, 分装, 贮于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

2. 试验材料

葡萄(*Vitis vinifera* Linn.) 叶片取自西北大学果园。

3. 实验方法

3.1 用 CTAB 法提取葡萄叶片总 DNA

A 试剂:

(1) 2 \times CTAB 提取缓冲液: 2g/100mlCTAB, 1.4mol/L NaCl, 20mmol/L EDTA, 100m mol/LTris.cl (PH8.0)

(2) PVP(聚乙烯吡咯烷酮)

B 实验步骤:

- (1) 50ml 离心管中加入 10ml 提取缓冲液, 65 $^{\circ}$ C 预热。
- (2) 取 1~2 克新鲜幼嫩叶片, 去除叶脉, 于液氮中 (加入 0.1gPVP 及少许石英砂) 迅速碾磨成粉。
- (3) 将冻粉迅速转入提取缓冲液中, 尽快用细玻璃棒混匀, 于 65 $^{\circ}$ C 保温 30min, 其间轻柔搅动 2~3 次。
- (4) 取出离心管, 冷至室温, 加入等体积的氯仿/异戊醇 (24: 1), 静置 10min。
- (5) 10 000r/min 离心 10min。
- (6) 转移上清液于另一离心管中, 加入 2/3 倍体积的异丙醇, 轻缓颠倒混匀, 室温放置 15min。
- (7) 10 000r/min 离心 10min, 去上清液。

- (8) 用 2ml 70% 的乙醇洗涤沉淀 2 次, 室温下微干, 溶于 500~700 μ l TE 缓冲液。
- (9) 加入终浓度 50 μ g/ml 的 RNase, 37 $^{\circ}$ C 保温 1h。
- (10) 用等体积的氯仿/异戊醇抽提 1~3 次。
- (11) 上清液中加入终浓度 0.2~0.4mol/L 的 NaCl, 2 倍体积的无水乙醇, 放置 1h 左右, 12 000r/min 离心 10min, 去除上清液。
- (12) 70% 乙醇洗涤沉淀 2~3 次, 自然干燥后溶于 50~100 μ l TE 缓冲液中备用。

3.2 引物的设计与合成

- (1) 根据 GenBank 中 RS 基因的序列:

上游引物: 5' -CGGGATCCCGATGGCTTCAGTCGAGGAATT-3'

下游引物: 5' -CGGAATTCGCTTAATTTGTAACCATAGGA-3'

并在引物的两端设计了 BamHI 和 EcoRI 两个内切酶位点和保护碱基。

- (2) 根据所获得 RS 基因序列和酵母胞内表达的原理设计引物:

上游引物: 5' -CGGGATCCCGACCATGGCTTCAGTCGAGGAATT-3'

下游引物: 5' -CGGAATTCGCTTAATTTGTAACCATAGGA-3'

- (3) 根据酵母表达载体 pPIC3.5K 设计 PCR 初筛的引物:

上游引物: 5' -GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'

下游引物: 5' -GGATGTCAGAATGCCATTTGCC-3'

全部引物用 Primer Premier 5 分析设计。

3.3 目的 DNA 片段的 PCR 扩增

3.3.1 在 0.2ml 薄壁 PCR 反应管中加入:

H ₂ O	16.1 μ l
10 \times Pyrobest buffer	2.5 μ l
dNTP(各 2.5mM)	2.0 μ l
上游引物 (10 μ M)	2.0 μ l
下游引物 (10 μ M)	2.0 μ l
总 DNA	0.25 μ l
Taq 酶	0.15 μ l
总体积	25 μ l

3.3.2 PCR 反应条件:

95℃	预变性	5m	
94℃	变性	40s	
56.8℃	复性	40s	35 个循环
72℃	延伸	2m	
72℃	最后延伸	10m	

3.4 PCR 产物的纯化

PCR 产物的纯化使用碧云天生物技术公司的碧云天 DNA 纯化试剂盒。

A 碧云天 DNA 纯化试剂盒的组成:

溶液 I	DNA 纯化结合液
溶液 II	洗涤液
溶液 III	洗脱液
DNA 纯化柱	
废液收集管	

B DNA 纯化步骤:

- (1) 在样品中加入 5 倍体积的溶液 I, 混匀, 然后加入到 DNA 纯化柱内。
- (2) 最高速 (12 000~14 000rpm) 离心 15 秒, 倒弃收集管内的液体。
- (3) 在 DNA 纯化柱内加入 750 μ l 溶液 II, 最高速离心 15 秒, 洗去杂质。
- (4) 最高速再离心 1 分钟, 除去残留液体。
- (5) 将 DNA 纯化柱置于 1.5ml 离心管上, 加入 50 μ l 溶液 III 至管内柱面上, 放置 1 分钟。
如需要得到较高浓度的 DNA, 可以只加 30 μ l 或者 20 μ l 溶液 III, 但产量会稍有下降, 如需增加产量, 可以放置 3~5 分钟。
- (6) 最高速离心 1 分钟, 所得液体即为高纯度的 DNA。

3.5 菌体的培养与保存

3.5.1 菌体的培养

挑取大肠杆菌单菌落, 接种于 LB 培养基上, 在 37℃ 160rpm 振荡培养。

3.5.2 菌种保存

- (1) 平板保存: 挑取大肠杆菌单菌落或单菌落经液体培养后的菌液在含有适当

抗生素的相应平板培养基上划线，在 37℃ 过夜培养后，放入 4℃ 冰箱中保存。

- (2) 甘油冷冻保存：将在液体培养基中生长至对数期的菌液与经高压蒸汽灭菌后的 60% 的甘油等体积加入保存管，混合均匀，室温下放置 1h，液氮速冻后放于 -80℃ 冰箱中长期保存。

3.6 质粒的提取

3.6.1 质粒的小量抽提采用碧云天质粒小量抽提试剂盒

A 抽提系统组成

溶液 I	悬浮液
溶液 II	裂解液
溶液 III	结合液
溶液 IV	洗涤液
溶液 V	洗脱液
纯化柱	
废液收集管	

B 抽提步骤

- (1) 取过夜菌，离心沉淀，弃上清。
- (2) 加入 150 μ l 溶液 I，vortex 或者弹起沉淀，使完全散开，无絮块。
- (3) 加入 200 μ l 溶液 II，颠倒离心管 6~8 次，使细菌完全裂解，溶液透明。
- (4) 加入 500 μ l 溶液 III，颠倒离心管 6~8 次，可见白色絮状物产生。
- (5) 最高速 (12 000~14 000rpm) 离心 3 分钟，离心时准备好质粒纯化柱，及最后的质粒收集管。
- (6) 直接将上清液倒入质粒纯化柱，最高速离心 15 秒，使质粒结合于纯化柱上。
- (7) 倒弃收集管内液体，在质粒纯化柱内加入 750 μ l 溶液 IV，最高速离心 15 秒，洗去杂质。
- (8) 倒弃收集管内液体，最高速离心 1 分钟，除去残留液体。
- (9) 将质粒纯化柱置于质粒收集管上，加入 50 μ l 溶液 V 至管内柱面上，放置 1 分钟。
- (10) 最高速离心 1 分钟。所得液体就是高纯度的质粒。

3.6.2 质粒 DNA 的大量制备

A 试剂:

- (1) STE: 0.1M NaCl, 10mM Tris.HCl (PH8.0), 1mM EDTA (PH8.0)
- (2) Solution I:
50mM 葡萄糖
25mM Tris.Cl (PH8.0)
10mM EDTA (PH8.0)
- (3) Solution II:
0.2M NaOH
1% SDS
- (4) Solution III: 每 100ml 含
5M Kac 60ml
冰乙酸 11.5ml
蒸馏水 28.5ml
- (5) 无 DNA 酶的 RNA 酶: 将 100mg RNA 酶粉剂溶于 10mM Tris.Cl (PH7.5)、15mM NaCl 中, 缓慢冷却至室温, 分装成小份保存于 -20℃。
- (6) TE Buffer: 10mM Tris.Cl (PH8.0)、1mM EDTA (PH8.0)

B 实验步骤:

- (1) 接单菌落于 2ml 含有抗生素的液体 LB 培养基中, 37℃, 250rpm 振荡培养过夜。
- (2) 将培养物转入 500ml 液体 LB 培养基中, 继续培养 8~12 小时。
- (3) 用两个 500ml 离心管在 5000rpm 离心 5 分钟, 收集菌体。
- (4) 用 STE 100ml 悬浮洗涤菌体, 合并两管重新离心去上清。
- (5) 加入 10ml Solution I, 将菌体悬浮后加入 20ml 新配置的 Solution II, 轻轻混匀数次, 冰上放置 10 分钟, 再加入 15ml 冰预冷的 Solution III, 轻轻混匀, 冰上放置 10 分钟。
- (6) 于 4℃ 以 10 000rpm 离心 15 分钟, 用数层纱布过滤, 将上清液转移到一干净的 250ml 离心管中, 加入 0.6 倍体积的异丙醇, 室温放置 10 分钟。
- (7) 于室温以 10 000rpm 离心 15 分钟, 70% 乙醇洗涤一次, 倒置于纸巾上, 使残余的乙醇挥发完, 用 2ml TE 溶解沉淀, 加 RNA 酶 8 μ l (10mg/ml), 37℃ 处理 1 小时。
- (8) 将粗提的 DNA 分装于若干个微量离心管中, 分别用酚 (Tris 平衡)、酚:

氯仿(1:1)、氯仿(加4%异戊醇)各抽提一次,每次抽提后均于10 000rpm离心5分钟小心收集上层水层。

(9) 向上清液中加入1/10体积的3M NaAc (PH5.2)和2倍体积无水乙醇,混匀后冰上放置15~30分钟。

(10) 于4℃以12 000rpm离心10分钟,弃上清,用70%乙醇洗1~3次,沉淀于空气中干燥10分钟,用适量TE buffer溶解质粒DNA,贮存于-20℃。

3.7 DNA 限制性内切酶酶切反应

在一个灭菌的微型离心管里面加入以下成分:

超纯水	x μ l
10×限制性酶缓冲液	2 μ l
DNA	<1 μ g
限制性酶切酶	1 μ l
<hr/>	
总体积	20 μ l

轻弹外壁以混匀反应物,置于适当的温度下并按所需的时间进行温浴。

3.8 质粒 pPU19 和目的 DNA 片段的连接

在一个灭菌的微型离心管里,加入以下成分:

超纯水	x μ l
0.1 μ g 载体	
3~10 倍摩尔量的外源 DNA	
10×ligation buffer	2 μ l
T4 DNA 连接酶	0.5 μ l
<hr/>	
总体积	20 μ l

轻弹管壁,混匀,于16℃下连接过夜。

3.9 琼脂糖凝胶电泳

试验参照《分子克隆试验指南》(萨姆布鲁克,1996)。核酸的琼脂糖凝胶电泳采用TAE电泳缓冲液、0.8~1.2%的凝胶进行。

3.9.1 溶液配制

(1)TAE 电泳缓冲液:

50×贮存液: Tris 242g/L

冰乙酸	57.1ml/L
0.5mol/LEDTA(PH8.0)	100ml

使用液：1×TAE

(2)加样缓冲液：

6×加样缓冲液：0.25%溴酚兰
0.25%二甲苯青 FF
30%甘油水溶液

(3)溴化乙锭 (EB)：用水 10mg/ml 的贮存液，放于棕色瓶中，室温下保存，使用浓度是 0.5 μ g/ml。

3.9.2 琼脂糖凝胶配制

称取适量的琼脂糖粉倒入 1×TAE 电泳缓冲液的三角瓶中，微波炉中加热，使琼脂糖彻底溶化，当琼脂糖冷却至 60℃ 以下后，加入 EB 至浓度是 0.5 μ g/ml，充分混匀后倒入插入梳子的胶模中，室温下放置 30~45 分钟，待胶完全凝固以后，小心移去梳子和两边的挡板，将凝胶放入电泳槽中。

3.9.3 电泳、检测及摄影

在电泳槽中加入适量的 1×TAE 电泳缓冲液，使其没过胶面 1mm。取核酸样品与 6×加样缓冲液按 5:1 的比例混合后，缓慢加入样品槽中。调好电极方向使通电以后核酸物质能向正极移动，在 75V 电压下电泳，当溴酚蓝移至距胶边缘 1~1.5cm 时停止电泳，在 300nm 的紫外灯下检测，并用带有红色滤光片的相机进行拍摄记录。

3.10 目的片断的电泳回收

3.10.1 冻融法

用于大量回收。用刀切下带有目的基因的胶块，置于一个 1.5ml 的微量离心管里面，加入 200 μ l 的 Tris 饱和酚(如果胶块比较小，可加 10~100 μ l 的 TE buffer)，用液氮反复冻融 3~5 次，每次 3 分钟，然后于 12 000rpm 离心 10 分钟，取上层水相继续用氯仿抽提后，乙醇沉淀备用。

3.10.2 DNA 凝胶回收试剂盒 (杭州维特洁生化技术有限公司)

(1) 在紫外灯下切下含有目的基因的琼脂糖凝胶，用纸巾吸尽凝胶表面液体并切碎。计算凝胶重量 (提前记录 1.5ml 离心管重量)，该重量作为一个凝胶

体积。

- (2) 加 3 个凝胶体积的 DE-A 溶液，混合均匀后于 75℃加热，间断混合，直至凝胶块完全熔化。
- (3) 加 0.5 个 DE-A 体积的 DE-B 溶液，混合均匀，当分离的 DNA 片断小于 400bp 时，加入异丙醇至终浓度为 20%。
- (4) 吸取 3 中混合液，转移到 DNA 制备管（置于 2ml 离心管），3 600rpm 离心 1 分钟。如制备管中有液体残留，适当提高离心速度，再离心 1 分钟，弃滤液。
- (5) 将制备管置回离心管，加 0.5ml W1 溶液，3 600rpm 离心 30 秒，弃滤液。
- (6) 将制备管置回离心管，加 0.7ml W2 溶液，3 600rpm 离心 30 秒，弃滤液。以同样的方法再用 0.7ml W2 溶液洗涤一次。
- (7) 将制备管置于离心管，最高速离心 1 分钟。
- (8) 将制备管置于洁净 1.5ml 离心管中，在 DNA 制备管膜正中央加 25μl 水或者洗脱液，室温放置 1 分钟，最高速离心 1 分钟洗脱 DNA。

3.11 大肠杆菌 (E coli) JM109 感受态的制备

- (1) 取大肠杆菌 JM109 接种于 5ml 的 LB 培养基中（不含抗生素），于 37℃振荡培养过夜。
- (2) 取 1ml 过夜培养物按 1: 100 的稀释浓度倒入 100ml LB 培养基中，于 37℃培养 2~4 小时，至 OD₆₀₀ 为 0.5~0.6。
- (3) 将培养物转入到两只预冷的离心管中，置冰浴 10 分钟，使菌体冷却至 10℃，于 4℃5 000rpm 离心 10 分钟，弃上清。
- (4) 每只离心管中加入 10ml 冰冷的 0.1M CaCl₂ 重悬沉淀，冰浴放置 30 分钟，于 4℃5 000rpm 离心 10 分钟，弃上清。
- (5) 每只离心管中各加入 2ml 的冰冷的 0.1M CaCl₂ 重悬沉淀，混匀保存。

3.12 质粒 DNA 转化大肠杆菌

- (1) 用无菌吸头取 100μl 感受态细胞到预冷的 1.5ml 离心管中，加入待转化的 DNA 10~100ng，轻轻混匀，冰上放置 30 分钟。
- (2) 将离心管放到 42℃热激 90 秒。
- (3) 快速将离心管放入到冰上，使其冷却。

- (4) 每管加入 800 μ l 的 LB 培养基，于 37 $^{\circ}$ C 预培养 45 分钟。
- (5) 取 200 μ l 菌液与 4 μ l IPTG 及 40 μ l X-gal (20mg/ml) 混匀。
- (6) 用无菌吸头将混合液移至 LB (附加相应抗生素) 平板上，再用无菌三角头玻璃棒将菌液均匀涂满整个平板表面。平板于 37 $^{\circ}$ C 正向放置至液体被吸收，然后倒置平板。
- (7) 于 37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 小时，挑选白色菌落 (含重组质粒)。

3.13 含重组质粒菌落的筛选

3.13.1 菌落裂解检测质粒 DNA 分子大小

A 试剂:

- (1) 10mmol/EDTA
- (2) 裂解液: 0.2mol/L NaOH, 0.5% SDS, 20% 蔗糖溶液 (新鲜配制)
- (3) 4mol/L KCl
- (4) 0.4% 溴酚蓝

B 步骤:

- (1) 筛选平板上菌落生长至 1~3mm 大小时，用无菌牙签取少许转接到另一个新的筛选平板上 (与原板位置对应，做好位置标记)，37 $^{\circ}$ C 培养过夜，转于 4 $^{\circ}$ C 保存。
- (2) 将各菌落剩余部分分别用牙签挑出，转移到装有 50 μ l 10mmol/L EDTA 的 Eppendorf 管中，编号。
- (3) 挑取对照单菌落按 (2) 同样操作。
- (4) 各管分别加入 50 μ l 裂解液，振荡 30 秒。
- (5) 于 70 $^{\circ}$ C 保温 5 分钟，然后冷却至室温。
- (6) 加入 1.5 μ l 4mol/L KCl，0.5 μ l 0.4% 溴酚蓝，振荡混匀，冰上放置 5 分钟。
- (7) 于 4 $^{\circ}$ C、12 000r/min 离心 3 分钟，取上清液电泳。

3.13.2 质粒 DNA 限制性酶切检测

- (1) 从筛选平板上挑取单菌落接种于 5ml LB 液体培养基中，培养过夜，提取质粒 DNA。
- (2) 用重组时使用的限制性内切酶进行消化，1% 的琼脂糖凝胶电泳分离，观察插入片断的有无及大小。

3.14 酵母的转导

3.14.1 酵母质粒 DNA 的准备

- (1) 同时酶切有 RS 基因的质粒 DNA 和空质粒，其中空质粒可以作为一种表达的阴性对照。
- (2) 用琼脂糖凝胶电泳分析酶切片断，看是否已经完全酶切。
- (3) 用苯酚：氯仿：异丙醇=25：24：1 的比例抽提酶解产物，然后用乙醇沉淀 DNA，用 10~20 μ l TE 重悬沉淀。
- (4) 保存在-20 $^{\circ}$ C 以备用。

3.14.2 菌体的准备

- (1) 挑取酵母单菌落，接种至含有 5ml YPD 培养基的 50ml 三角瓶中，30 $^{\circ}$ C，250~300r/min 培养过夜。
- (2) 取 100~500 μ l 的培养物接种至含有 500ml 新鲜培养基的 2L 三角瓶中，28~30 $^{\circ}$ C、250~300r/min 培养过夜，至 OD₆₀₀ 到达 1.3~1.5。
- (3) 将细胞培养物于 4 $^{\circ}$ C，1500g 离心 5 分钟，用 500ml 的冰预冷的无菌水将菌体沉淀重悬。
- (4) 按步骤 3 离心，用 250ml 的冰预冷的无菌水将菌体重悬。
- (5) 按步骤 3 离心，用 20ml 的冰预冷的山梨醇溶液将菌体沉淀重悬。
- (6) 按步骤 3 离心，用 1ml 冰预冷的山梨醇溶液将菌体沉淀重悬，其终体积约为 1.5ml。
- (7) 将其分装成 80 μ l 一份的包装冷冻起来，但会影响其转化效率（2 周之内）。

3.14.3 电激转化

- (1) 将 5~20 μ g 线性化 DNA 溶解在 5~10 μ l TE 溶液中，与 80 μ l 的处理所得的菌体混匀，转至 0.2cm 冰预冷的电转化杯中。
- (2) 将电转化杯冰浴 5 分钟。
- (3) 1.5kv，5ms，电击。
- (4) 电击完毕后，加入 1ml 冰预冷的山梨醇溶液将菌体混匀，转至 1.5ml 的 EP 管中。
- (5) 将菌体悬液涂布于 MD 平板上，每 200~600 μ l 涂布一个平板。
- (6) 将平板置于 30 $^{\circ}$ C 培养，直至单个菌落出现。

3.15 毕赤酵母表达直接 PCR 鉴定重组子

3.15.1 模板的处理

- (1) 平板上的菌落长到肉眼可见时 (约 12 小时)。
- (2) 将除了模板以外的其他 PCR 反应液组分准备好, 并分装。
- (3) 用一根灭菌牙签挑取菌落, 在 PCR 管中涮一下, 放入一个灭菌的 1.5ml 离心管, 对 PCR 管和 1.5ml 离心管编号。
- (4) PCR 扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳。
- (5) 对 PCR 扩增显现特异性条带的克隆, 置于 1.5ml 离心管中的半截牙签扔到 5ml YPD 培养基中, 30°C 培养, 8~12 小时后提质粒, 酶切鉴定确认。

3.15.2 PCR 反应体系

以 TaKaRa Taq 酶反应为例:

组分	50 μ l 体系	20 μ l 体系
10 \times Reaction Buffer	5.0 μ l	2.0 μ l
25mM MgCl ₂	3.0 μ l	1.2 μ l
2.5mM dNTPs	5.0 μ l	2.0 μ l
Primer 1 (10 μ M)	2.5 μ l	1.0 μ l
Primer 2 (10 μ M)	2.5 μ l	1.0 μ l
ddH ₂ O	31.5 μ l	12.6 μ l
Taq DNA 聚合酶	0.5 μ l	0.2 μ l
TOTAL	50.0 μ l	20.0 μ l

3.15.3 PCR 反应条件

初始变性	94°C	4min	
变性	94°C	30s	
退火	50~54°C	30s	30 个循环
延伸	72°C	30s	
结束延伸	72°C	10min	
保存	4°C		

3.16 重组酵母的诱导表达试验

- (1) 挑选一个单菌落，置于装有 25ml MGY、BMG 培养基的 250ml 摇瓶中，于 28~30℃、250~300rpm 培养至 $OD_{600}=2\sim6$ (16~18 小时)。
- (2) 室温下 1 500~3 000g 离心 5 分钟，收集菌体，用 1/5~1/10 原培养基的 MM、BMM、或者 BMMY 重悬菌体，使 $OD_{600}=1$ 左右。
- (3) 将步骤 2 所得的菌液置于 1000ml 的摇瓶中，用双层纱布或者粗棉布封口，放置于 28~30℃、250~300rpm 的摇床上继续生长。
- (4) 每 24 小时向培养基中添加 100% 甲醇至终浓度为 0.5~1.0%
- (5) 按时间点分别取菌液样品，取样量为 1ml，置于 1.5ml 离心管中，最大转速离心 2~3 分钟，分别收集上清和菌体，分析目的蛋白的表达量和菌液最佳收获时间。时间点一般取：0、24、36、48、72 和 96h。
- (6) 分离样品的菌体沉淀，取菌液 200ul，3000~4000rpm 离心后，用蒸馏水洗 2 次，用缓冲液重悬。
- (7) 加 100 μ l 0.2~0.4 μ m 的玻璃珠，在涡旋振荡器上涡旋，每次 30 秒，冰浴 30 秒，10 次。
- (8) 10000rpm 离心 5 分钟，取 20 μ l 加等量 2 倍上样液煮 5 分钟，离心后跑 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

3.17 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (SDS-PAGE) 定性分析蛋白质

按照文献方法进行 SDS-不连续系统电泳，对各分离纯化步骤中的蛋白质进行定性分析，其中凝胶的催化聚合选用可催化氧化-还原体系的过硫酸铵-四甲基乙二胺 (TEMED) 来完成，分离胶、浓缩胶的浓度分别为 10%、3%，染色方法为银染色法。染色步骤如下：

- (1) 电泳后，50%甲醇，5%乙酸，水溶液，浸泡 20 分钟；
- (2) 50%甲醇水溶液，洗 10 分钟；
- (3) 水洗 10 分钟，去掉剩余的酸；
- (4) 0.02%硫代硫酸钠，敏化 1 分钟；
- (5) 水洗两次，每次 1 分钟；
- (6) 冷(4℃) 0.1%硝酸银溶液中浸泡 20 分钟；
- (7) 水洗两次，每次 1 分钟；

- (8) 0.04%甲醛，2%碳酸钠水溶液里快速振荡显影，显影液变黄，倒掉，换新鲜显影液，直到显影液透明澄清；
- (9) 对比度达到要求时，5%乙酸水溶液，浸泡终止显影。

第三部分 结果与分析

1.RS 基因克隆载体的构建

1.1 基因扩增

提取葡萄叶片总 DNA，然后以此为模板，根据 GenBank 中已经公布的序列设计引物：上游引物：5' -CGGGATCCCGATGGCTTCAGTCGAGGAATT-3'

下游引物：5' -CGGAATTCGCTTAATTTGTAACCATAGGA-3'

并在引物的两端设计了 BamHI 和 EcoRI 两个内切酶位点和保护碱基。全部引物用 Primer Premier 5 分析设计，然后进行扩增，得到 1536bp 的片断，电泳结果见图 3。

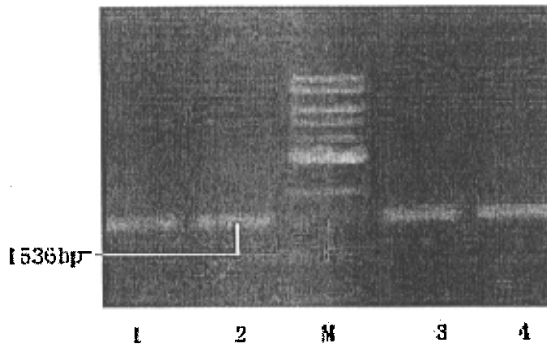


图 3 白藜芦醇合成酶基因的 PCR 扩增产物电泳图

Fig.3 PCR amplification of RS gene

1、2、3、4: RS gene; M: 1kb ladder marker

1.2 重组质粒的构建及鉴定

用 DNA 纯化 PCR 扩增产物，将 PCR 扩增产物和 pUC19 分别用 BamH I 和 EcoR I 酶切，然后用 T4 DNA 连接酶连接，转化 JM109 细菌，进行蓝白斑筛选重组子，将带有目的基因的载体命名为：pUC19-J。将重组质粒用 BamH I 和 EcoR I 进行酶切鉴定，0.8%琼脂糖电泳。BamH I 酶切重组质粒产生了一条 4368bp 的条带，是 RS 基因和 pUC19 质粒的总长度，说明 RS 基因和质粒已经相连了。BamH I 和 EcoR I 双酶切产生了两条条带，一条为 1536bp，正好是 RS 基因的全长，另一条为 2868bp，刚好和经 EcoR I 和 BamH I 双酶切 pUC19（空载体）大

小一样。充分证明了 RS 基因的克隆载体已经构建成功了，结果如图 4。

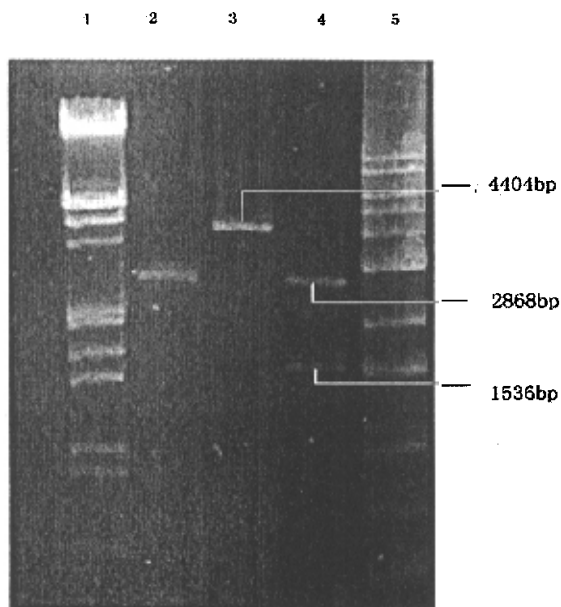


图 4 重组质粒 pUC19-J 经 EcoRI 和 BamHI 酶切图谱

Fig.4 Pattern of recombination plasmid pUC19-J

- 1: λ DNA/EcoRI+HindIII Marker ; 2: pUC19/ EcoRI+BamHI ;
 3: pUC19-J/BamHI ; 4 pUC19-J/EcoRI+BamHI ; 5: 1kb ladder marker

1.3 测序结果

对扩增片断进行序列测定，结果显示此片断全长为 1536bp，测序结果见图 5。

```

ATGGCTTCAGTCGAGGAAATTAGAAACGCTCAACGTGCCAAGGGTCCGGCCACCATCCTAGCCATTGC
ACAGCTACCCCCGACCACTGTGTCTACCAGTCTGATTATGCTGATTTCATTTACGGGTCCTAAGAGC
GAGCACATGACTGCGTTGAAGAAGAAGTTCAATCGCATATGTAAGTATATTCATGCATTAATTTCTTACA
TGCATAACAGTTCGTATATATGTGACTGACACTAGGTGAGGCTCACCTCCAAGTGAATGAATGTTGCA
ATCTTTCTAGAGTATAGCTTTTAGATAAAATACTACAGAAAACCTTGAAAATTATTTTACTTCAGTAGCTA
ATATTCATTTTCATCTGACTGAAATGGCTTGAAGAGCTGTTCTTTGAATCATGTCCGATTGCCAGCTATAA
TTAAGAATAACCTTCTATACTTGCTTCAATGTAAATGCATGTCGATCATCTTCAACGATATTCATATCA
CTTGTTGATTGGTAAAACATAATGTGTTTCATGTTATTTCAITTTACAGGTGACAAAATCCATGATCAAGAAGC
GTTACATTCATTTGACCGAAGAAATGCTTGAGGAGCACCCAAACATTTGGTGTCTTATATGGCTCCATCTC
TTAACATACGCCAAGAGATTATCACTGCCGAGGTACCCAAGCTCGGTAAGGAAGCAGCATTGAAGGCT
CTTAAAGAGTGGGGTCAGCCTAAATCGAAGATCACCCACCTTGATTTTGTACCACCTCAGGTGTAGA
AATGCCTGGTGCAGATTATAAACTCGCTAATCTCTTAGGCCTCGAACCATCTGTCAGAAGAGTGATGTT
GTACCATCAAGGGTGTATGCAGGTGGAAGTCTCTTCCAAGTCTAAGGATCTTGCAGAGAATAATG
    
```


CAGGAGCACGAGTTCCTTGTGGTGTGCTCTGAGATCACAGTTGTTACATTTTCGCGGCCCTCCGAAGAT
GCTTTGGACTCTTTAGTTGGCCAAGCCCTTTTTGGTGATGGGTCTGCAGCTGTAATCGTAGGATCAGAT
CCGGATATCTCAATTGAACGACCACTCTCCAGCTTGTCTCAGCAGCCCAAACATTTATTCTAATTCTG
CAGGTGCCATTGCAGGAACTTACGTGAGGTGGGACTCACCTTTCATTTGTGGCCCAATGTGCCCACT
TTAATTTCTGAGAACATAGAGAAATGTTTGACTCAGGCTTTTGACCCACTTGGTATTAGCGATTGGAAC
TCGTTATTTTGGATTGCTCACCCAGGTGGCCCTGCAATTCTTGATGCAGTTGAAGCAAACTCAATTA
GATAAAAAGAACTCGAAGCAACGAGGCATGTGCTAAGTGAGTATGGAAACATGTCAAGTGCATGTG
TGTTGTTTATTTTGGATGAGATGAGAAAGAAATCCCTTAAGGGGGAGAGGGCCACCACGGGTGAAGG
ATTGGATTGGGGAGTATTATTCGGTTTTGGACCAGGCTTGACTATTGAAACTGTTGTGTTGCATAGCATT
CCTATGGTTACAAATTAAG

图 5 RS 基因的序列
Fig. 5 Sequence of RS gene

1.4 RS 基因的生物信息学分析

1.4.1 序列的同源比对

将该序列和 GenBank 中的葡萄 DNA 来源的序列（登陆号：AF128861）进行同源比对，同源性在 98% 以上，证明所得的基因序列为 RS 基因序列，比对结果见图 6。

```

atggcttcagtcgaggaaattagaaacgctcaacgtgcccaagggtccggccaccatecta
|||||
atggcttcagtcgaggaaattagaaacgctcaacgtgcccaagggtccggccaccatecta

gccattg-cacagctacccccgaccactgtgtctaccagctctgattatgctgatttctat
|||||
gccattggcacagctacccccgaccactgtgtctaccagctctgattatgctgattactat

ttcagggtcactaagagcgagcacatgactgcggtgaagaagaagttcaatcgcatatgt
|||||
ttcaaggtcactaagagcgagcacatgactgcggtgaagaagaagttcaatcgcatatgt

aagtatattcatgcattaatttcttacatgcataacagttctgtatatatgtgactgaca
|||||
aagtatattcatgcattaatttcttacatgcataacagttctgtatatatgtgactgaca

ctaggtgaggetcacctccaagtgaatgaatggttgcaatctttctagagtatagctttta
|||||
ctaggtgaagttcacctccaagtgaatgaatggttgcaatctttctagagtatagctttta

gataaaatactacagaaaacttgaaaattatcttacttcagtagctaataattcatttcat
|||||

```

gataaaatactacagaaaacttgaacattatcttacttcagtaactaatattcatttcat
ctgactgaaatggcttgaagagctgttctttgaatcatgtcgcattgccagctataatta
||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
ctgactgtaatggcttgaagagctgttctttgaatcatgtcgcattgccagctgtaatta
agaataaccttctataacttgcttcaatgttaaagcatgtcgcattccttcaacgatatt
||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
agaataaccttttataacttgcttcaatgttaaagcatgtcgcattccttcaacgatatt
ctatatcacttggtgattggtaaaaactaatgtgttcatgttatttcatttacaggtgaca
||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
ctatatcacttggtgattggtaaaaactaatgtgttcatgttatttcatttacaggtgaca
aatccatgatcaagaagcgttacattcatttgaccgaagaaatgcttgaggagcacccaa
||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
aatccatgatcaagaagcgttacattcatttgaccgaagaaatgcttgaggagcacccaa
acattggtgcttatatggctccatctcttaacatacgccaagagattatcactgccgagg
||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
acattggtgcttatatggctccatctcttaacatacgccaagagattatcactgctgagg
taccaagctcggtaaggaagcagcattgaaggctcttaagagtggggtcagcctaataat
||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
taccaagctcggtaaggaagcagcattgaaggctcttaagagtggggtcagcctaataat
cgaagatcacccaccttgatcttaccacctcaggtgtagaaatgcctggtgcagatt
||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
cgaagatcacccaccttgatcttaccacctcaggtgtagaaatgcctggtgcagatt
ataaactcgctaatactcttaggcctcgaacctctgtcagaagagtgatgtgtaccatc
||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
ataaactcgctaatactttaggcctcgaacctctgtcagaagagtgatgtgtaccatc
aagggtgctatgcaggtggaactgtccttcgaactgctaaggatcttgcagagaataatg
||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
aagggtgctatgcaggtggaactgtccttcgaaccgctaaggatcttgcagagaataatg
caggagcacgagttcttgtggtgtgctctgagatcacagttgttacatttcgcggccctt
||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
caggagcacgagttcttgtggtgtgctctgagatcacagttgttacatttcgcggccctt
ccgaagatgcttggactctttagtggccaagcccttttgggtgatgggtctgcagctg
||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||


```

1 atggcttcagtcgaggaattagaaagctgcaaggt
  M A S V E E I R N A Q R A K G
46 cggccaccatctagccattggcacagctacccccgaccatgt
  P A T I L A I G T A T P D H C
91 gtctaccagtctgattatgctgatttctatttcagggtcactag
  V Y Q S D Y A D F Y F R V T K
136 agcagaccatcactgctggttgaagaaaggttcaatcgcatatgt
  S E H M T A L K K K F N R I C
181 agtatattcatgacttaattttottacatgcatagaggtttotgta
  K Y I H A L I S Y X H N S S V
226 tatatgtga 234
  Y M *

546 atgataagaaaggttacattcatttgaaccgaaagaaactcttgag
  M I K K R Y I H L P E E M L E
591 gggcccccaccattggtgcttatatggctccatctctttaacata
  E H P N I G A Y M A P S L N I
636 cggcaagagattatcactgcccaggtaccaccagctoggttaaggaa
  R Q E I I T A E V P K L G K E
681 gcagcattgaggctctttaagagtgaggctcagcctaaatcgag
  A A L K A L K E W G Q P K S K
726 atcaccaccctgtatftttgtaccacctcaggtgtagaactgct
  I T H L V F C T T S G V E M P
771 ggtgcagattataaacctcctaatctctttaggctcogaaccatct
  G A D Y K L A N L L G L E P S
816 gtcagagagtgatattgtaccatcagggtctctatgcaggtgga
  V R R V M L Y H Q G C Y A G G

861 aotgtccttcgaaagctaaaggtcttgcaagaaatgatgagga
  T V L E T A E D L A E N M A C
906 gcaagagttattgtgtgtcttgaactcagattgttacttt
  A F V L V V C S E I T V V T F
951 cgggaccttcgaaagctgattgaaactcttacttggcaagcc
  R C P S E D A L D S L V G Q A
1006 ctttttctgactggtctctgagtgtaactctagactcagatcag
  L F G D G S A A V I V G S D P
1051 gactctccactgaaagccaccttccagcttctctgagcagcc
  D I S I E R P L F Q L V T A A
1096 caaacattatctcacttctgaggtgocattgcaggaaatta
  D T F T P N K A C A T A G N I
1131 cgtgaggtgggactcactcttcttctgagccactgtgocact
  R E V G L T F H L W P N V P T
1176 ttacttctgaaacatagagaatggttctcaggttttggc
  L I S E N I E K C I T Q A F D
1221 ccacttctgattagcattggactcttcttctgattgctcac
  P I G I S D W N S L F V I A H
1266 caaggtgacctgaaactctctgagctgcaagcaaaactcaat
  P C G P A I L D A V E A K L N
1311 ttactataaacgacactcagaaacagcactctgctactcag
  I T K K I E A T R K V I S R
1356 tatgaaacagctcagctcatttgtgttcttcttctgagcag
  Y C N M S S L C V L P I L D E
1401 atggaagaaatcctttaggggagagggccaccacgggtgaa
  K K K K S L E G E R A Y T G E
1446 ggattgattgggactattatcggttttgaccaggttact
  G I D W G V I F G F G P G L T
1491 atgcaactgllgllgaaatcacttctcttcaaatcag 1536
  I E T V V L E S I P E V T N *

```

图 7 RS 基因序列及推测的氨基酸序列

Fig. 7 Sequence of RS gene and the conjectural sequence of RS

1.4.3 对推测的氨基酸序列和 GenBank 中的 RS 序列进行同源性比较

对推测的氨基酸序列和 GenBank 中的 RS 序列(登陆号: CAA54221)进行同源性比较, 发现所推测的氨基酸在和内含子相连的序列部分多了 16 个氨基酸, 剩下部分氨基酸序列完全一致。具体情况见图 8。

```

Query: 1 MASVEEIRNAQRAKGPATILAI GTATPDHCVYQSDYADFFYFRVTKSEHMTALKKKFNRIC 60
MASVEEIRNAQRAKGPATILAI GTATPDHCVYQSDYADFFYFRVTKSEHMTALKKKFNRIC
Sbjct: 1 MASVEEIRNAQRAKGPATILAI GTATPDHCVYQSDYADFFYFRVTKSEHMTALKKKFNRIC 60

Query: 61 KYIHALISYMHQSSVYM*MIKKRYIHLTEEMLEEHPNIGAYMAPSLNIRQEIITA E VPKL 120
+ S MIKKRYIHLTEEMLEEHPNIGAYMAPSLNIRQEIITA E VPKL
Sbjct: 61 -----DKS-----MIKKRYIHLTEEMLEEHPNIGAYMAPSLNIRQEIITA E VPKL 105

Query: 121 GKEAALKALKEWGQPKSKITHLVFCTTSGVEMPGADYKLANLLGLEPSVRRVMLYHQGCY 180
GKEAALKALKEWGQPKSKITHLVFCTTSGVEMPGADYKLANLLGLEPSVRRVMLYHQGCY
Sbjct: 106 GKEAALKALKEWGQPKSKITHLVFCTTSGVEMPGADYKLANLLGLEPSVRRVMLYHQGCY 165

Query: 181 AGGTVLRITAKDLAENNAGARVLVVCSEITVVTFRGPPSEDALDSL VGQALFGDGSAAVIVG 240
AGGTVLRITAKDLAENNAGARVLVVCSEITVVTFRGPPSEDALDSL VGQALFGDGSAAVIVG
Sbjct: 166 AGGTVLRITAKDLAENNAGARVLVVCSEITVVTFRGPPSEDALDSL VGQALFGDGSAAVIVG 225

Query: 241 SDPDISIERPLFQLVSAAQTFIPNSAGAIAGNLRVGLTFHLPWPNVPTLISENIEKCLTQ 300
SDPDISIERPLFQLVSAAQTFIPNSAGAIAGNLRVGLTFHLPWPNVPTLISENIEKCLTQ
Sbjct: 226 SDPDISIERPLFQLVSAAQTFIPNSAGAIAGNLRVGLTFHLPWPNVPTLISENIEKCLTQ 285

Query: 301 AFDPLGISDWNLSLFWIAHPGGPAILDAVEAKLNLDKKKLEATRHLVSEYGNMSSACVLF I 360
AFDPLGISDWNLSLFWIAHPGGPAILDAVEAKLNLDKKKLEATRHLVSEYGNMSSACVLF I
Sbjct: 286 AFDPLGISDWNLSLFWIAHPGGPAILDAVEAKLNLDKKKLEATRHLVSEYGNMSSACVLF I 345

Query: 361 LDEMRRKSKLGERATTGGLDNGVLF GFGPGLTIETVVLHSIPMVTN 407
LDEMRRKSKLGERATTGGLDNGVLF GFGPGLTIETVVLHSIPMVTN
Sbjct: 346 LDEMRRKSKLGERATTGGLDNGVLF GFGPGLTIETVVLHSIPMVTN 392

```

图 8 RS 的氨基酸序列比对

Fig. 8 Contrastion of RS sequence

2.RS 基因酵母表达载体的构建

2.1 RS 基因的获得

对质粒 pUC19-J 用以下引物进行扩增:

上游引物: 5' -CGGGATCCCGACCATGGCTTCAGTCGAGGAATT-3'

下游引物: 5' -CGGAATCCGCTTAATTTGTAACCATAGGA-3'

将扩增产物进行胶回收和纯化。

2.2 表达载体的构建

将表达载体 pPIC3.5K 和扩增产物用 BamH I 和 EcoR I 双酶切, 纯化以后用

T4 DAN 连接酶进行连接，转到大肠杆菌里面，进行抗生素筛选。将连有 RS 基因的重组质粒命名为 pPIC3.5KJ，构建表达载体的过程见图 9。

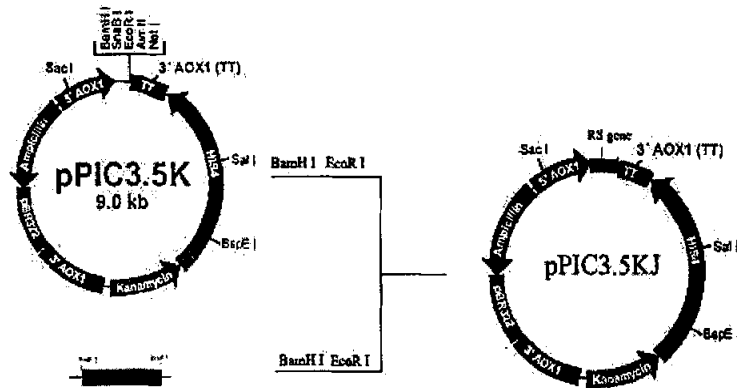


图 9 表达载体构建过程

Fig. 9 The construction of expression vector

2.2.1 裂解检测质粒 DNA 分子大小

挑取阳性克隆，过夜培养，裂解后，取上清液用 0.8% 凝胶跑电泳，从图中可以看到连有目的基因的载体 pPIC3.5KJ 明显比空载体 pPIC3.5K 跑的慢，结果见图 10。

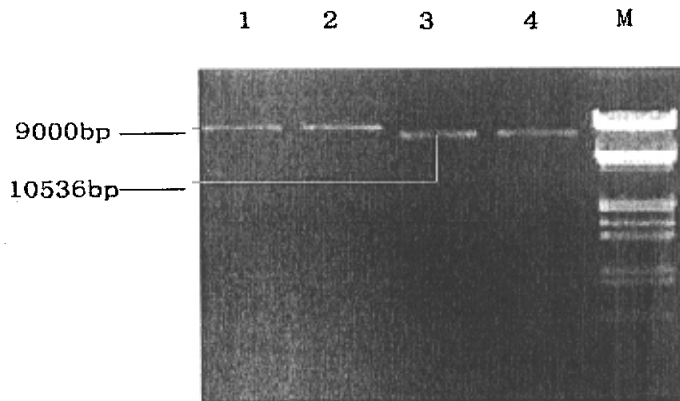


图 10 菌落裂解检测质粒 DNA 分子大小

Fig. 10 Pattern of plasmids DNA

1、2: pPIC3.5K; 3、4: pPIC3.5KJ

M: λ DNA/EcoRI+Hind III Marker

2.2.2 对构建好的载体进行酶切鉴定

对构建好的载体用 BamH I 和 EcoR I 双酶切, 将重组质粒用 BamH I 和 EcoR I 进行酶切鉴定, 0.8% 琼脂糖电泳。BamH I 酶切重组质粒产生了一条条带, 是 RS 基因和 pPIC3.5K 质粒的总长度, 说明 RS 基因和质粒已经相连了。BamH I 和 EcoR I 双酶切产生了两条条带, 一条是 RS 基因的全长, 另一条是空载体 pPIC3.5K 的长度, 充分证明了 RS 基因的表达载体已经构建成功了, 酶切结果见图 11。

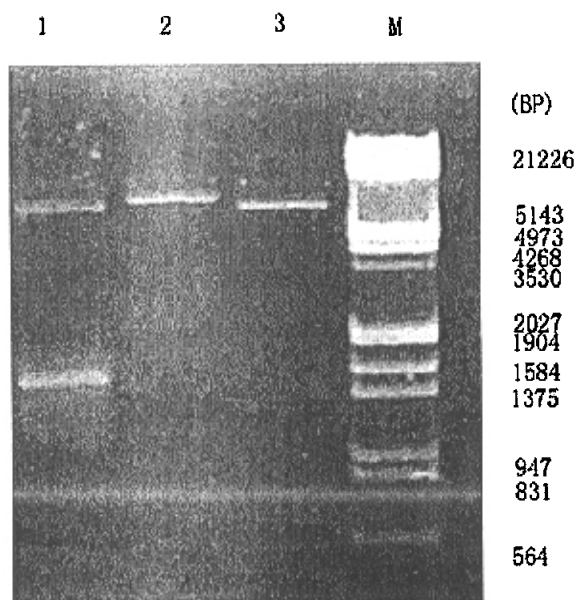


图 11 重组质粒 pPIC3.5KJ 经 EcoR I 和 BamH I 酶切图谱
Fig.11 Pattern of recombination plasmid pPIC3.5KJ
digested by EcoR I and BamH I

1: pPIC3.5KJ /EcoR I+BamH I; 2: pPIC3.5KJ/BamH I;
3: pPIC3.5K/EcoR I+BamH I; M: λ DNA/EcoR I+HindIII Marker

3. 酵母的转化及筛选

3.1 重组型质粒转化酵母细胞

质粒 pPIC3.5KJ 经电激转化酵母细胞后, 通过同源重组, 目的基因可以整合到酵母基因组中 (Streekrishna et al., 1988), 在外源诱导物甲醇存在的条件下, AOXI (乙醇氧化酶) 启动子可以启动其下游基因的表达 (Ellis et al., 1985)。

首先用 Sac I 消化 pPIC3.5KJ，使之线性化，酚/氯仿抽提纯化后，电激转化酵母受体 GS115。由于载体中没有酵母复制起始子，所以 HIS4 基因必须整合到酵母基因组中才能表达，即只有整合了表达载体的酵母细胞才能在不加组氨酸 (His) 的培养基 (MD) 上生长，因此可以用基本培养基 MD 进行转化子的筛选。

3.2 重组酵母株的 PCR 鉴定

为了快速筛选含有 RS 基因的重组酵母菌株，取 5 μ l 重组酵母细胞加入 95 μ l 的双蒸水，煮沸 10 分钟，高速离心 15 分钟，取出 5 μ l 作为 PCR 模板，上游引物：5' - GACTGGTTCCAATTGACAAGC - 3'，下游引物：5' - GGATGTCAGAATGCCATTGCC - 3' 进行 PCR 扩增，其中泳道 1 没有扩增出相应的条带，说明该酵母菌株为假阳性的菌株，2 和 3 都扩增出相应的条带，说明 pPIC3.5KJ 已经整合到了酵母株染色体中了，结果见图 12。

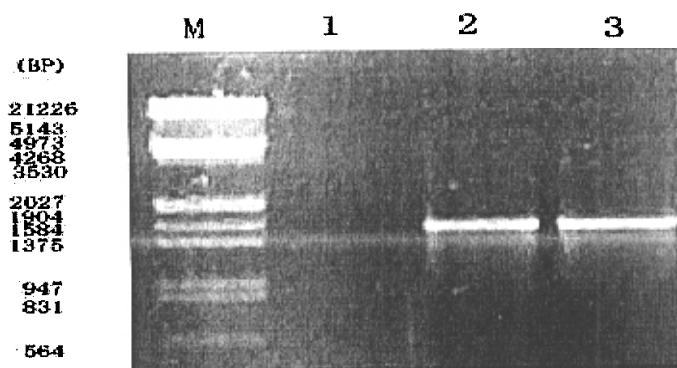


图 12 重组酵母株的 PCR 鉴定图

Fig. 12 Identification for recombinants by PCR

M: λ DNA/EcoR I+Hind III Marker

2、3: Fragments amplified by PCR to recombinants

4.RS 基因在毕赤酵母的表达

将重组酵母细胞株 pPIC3.5KJ/GS115 在 BMGY 培养基中 30 $^{\circ}$ C 培养 18~24 小时，然后在 BMMY 中培养，用 1% 的甲醇进行诱导，每 24 小时取样一次，进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，目前已经检测到 RS 基因的表达产物，在第二天表达量最大。RS 分子量在 90KD 左右，因此仅从电泳图谱也可以得到基本一致的结果。见图 13。

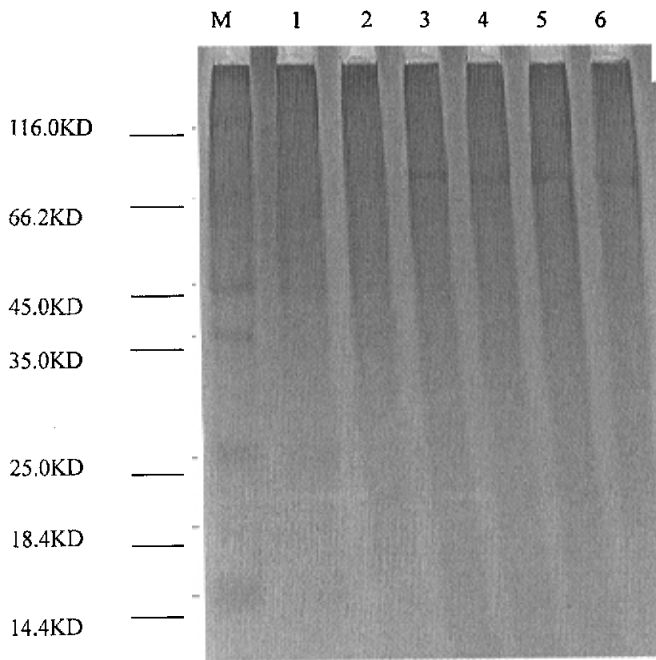


图 13 RS 基因在 GS115 中的表达的 SDS-PAGE 图

Fig.13 Expression of RS gene in the *Pichia.pasteoris* GS115

1:GS115 ; 2、3、4、5、6: RS gene (GS115)

第四部分 讨论

Res 存在于葡萄、桑树、花生、买麻藤、朝鲜槐等 12 科、31 属的 72 种植物中，然而就其含量而言还是葡萄属植物中较高。目前已经在 GenBank 中有四种葡萄属植物来源的序列报道，其登陆号分别是：AB046373、AB04637、AB046375 和 AF128861，并且葡萄叶片能作为很方便的实验材料，所以本次实验选择了葡萄叶子作为实验材料。

本次实验曾设计了 RS 基因的 cDNA 和 DNA 序列作为平行的两个目的基因来建立酵母表达体系，但是在实验过程中，一直没有得到 RS 的 cDNA 片断。主要原因是由于 RS 是一种诱导酶，在正常的情况下，植物体很难产生 RS 基因的表达，只有植物体在受到真菌侵袭、紫外照射、机械损伤等情况下，才能大量合成。我们采集不同生长期的葡萄叶子，并且对野生的葡萄植株进行了真菌、一定梯度的 NaCl 等方法处理，但是一直没有能够得到 RS 基因的 cDNA 序列，这部分工作将会由本实验室继续下去。

Res 作为一种多酚类物质，具有显著的抗氧化、抗自由基作用。另外 Res 通过对脂类代谢和血小板凝聚的影响来保护心血管系统。它可以减轻低密度脂蛋白（LDL）的氧化，从而防止动脉粥样硬化的产生。目前 RS 基因的研究主要是将其转入植物体内，研究 Res 在植物体中的抗逆、抗菌作用。本试验的工作就是要建立 RS 基因的酵母表达体系，通过发酵的方法来得到高丰度的 Res。酵母单细胞是低等真核生物，便于基因工程的操作，又具有糖链加工系统，而且容易进行大规模的发酵生产，目前本实验所建立的表达载体具有以下特点：一、具有 RS 基因的调控序列。按照 Kozak 的理论：设计 Kozak 序列，为 RS 基因在真核里面表达奠定了基础；二、获得了完整的 RS 基因。测序结果显示所得 RS 基因序列和 GenBank 中葡萄来源的基因序列同源性在 98% 以上。Hain G 在《Nature》上发表文章，对基因组 DNA 与 cDNA 序列的比较分析，显示 RS 基因的编码区起始于第一个 ATG，另外 5' 端包含有 RS 基因唯一的内含子，内含子将 RS 基因的编码区分成两部分，在本研究设计引物的时候，就从第一个 ATG 开始，在 ATG 上游设计了限制性内切酶位点和保护碱基，这就保证 RS 基因的完整性；三、RS 基因正确性。不同来源的 RS 基因结构存在一定的差异，其合成 Res 的能力也不同，但大部分的差异位于密码子的第三个碱基处，然而该位点并不引起氨基酸的变化。

例如：葡萄与花生间的 DNA 序列同源性的为 76%，而蛋白质序列间的同源性却达到 97%。本研究扩增所得到的 RS 基因和葡萄不同种属的 RS 进行序列比对，同源性都在 91% 以上。此外，Konrad T. Howitz 等在《Nature》上发表文章：Res 能降低酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）里的 SIRT1 蛋白的米氏常数，提高 DNA 的稳定性，并且延长酵母细胞寿命的 70%。以上几点都使 RS 基因在酵母里的表达有了理论和实验依据。

虽然本次实验已经得到 RS 基因的表达，但是表达量相对比较少，以后的实验试图筛选高拷贝高表达量的 RS 基因的甲醇型酵母 GS115 菌株，通过发酵来得到大量的白藜芦醇。

第五部分 结论

1. 根据 GenBank 中 RS 基因序列和相关的资料显示 RS 的开放读码框是从第一个 ATG 开始的，本次实验就从第一个 ATG 开始设计引物，并且在两端分别加上 BamH I 和 EcoR I 内切酶位点及保护碱基，以葡萄叶片总 DNA 作为模板，扩增出相应条带。
2. 将扩增出来的条带纯化酶切后和用相同的酶酶切 pUC19 相连，成功地得到了其克隆载体，并且对其进行了测序，序列显示其与 GenBank 中发表的葡萄来源的 RS 基因同源性在 98% 以上，进一步证明了所得到的片断为 RS 基因，将连有正确 RS 基因的克隆载体 pUC19-J 转入大肠杆菌 JM109 中，得到 RS 基因的扩增。
3. 将扩增以后的 RS 基因加上 Kozak 序列以后连到 pPIC3.5K 中，成功地构建了 RS 基因表达载体 pPIC3.5KJ，并且用电转的方法转入甲醇酵母（*Pichia pastoris*）/GS115，用组氨酸和 PCR 进行筛选，得到 pPIC3.5KJ 整合到酵母染色体中的菌株 GS115，对其进行甲醇诱导，初步得到 RS 基因的表达。

第六部分 参考文献

- [1]陈镇泉, 林娇健, 陈君琛等.科学新发现与葡萄新品种[J].葡萄栽培与酿酒, 1997, (3): 54~56
- [2]Jeandet P,Shashi M,Bessis R,et al.The use of phytoalexin induction and in vitro methods as a tool for botrytis research.Proceeding of the 10th International botrytic symposium,Heraklion,Cecele ,Geece,April 1992.109~112
- [3]Stein U,Blaich R.Studies on stilbene production and susceptibility to Botrytis in vitis specied[J].Vitis,1985,24(2):75~87
- [4] Dercks W., Greasy L.L., The significance of stilbene phytoalexin in the plasmopara vicicola and grapevine interaction. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1989, 34(3): 189-202
- [5] Jeander P., Besis R., Sbaghi M., *et al.*, Production of the phytoalexin resveratrol by grapes as a response to Botrytis attack under natural conditions.*Journal of Phytopathology (Berlin)*, 1995, 143(3):135-139
- [6] pont V,Pezet R.Relation between the chemical structure and the biological activity of hydroxystilbene against Botrytis cinerea[J].*J Phytopath*,1990,130(1):1~8
- [7] 冯永红, 许实波。白藜芦醇药理作用研究进展。国外医药·植物药分册, 1996, 11(4):155-157
- [8] Bertelli A .A. E., Giorannini L., Stradi R., Plasma murine and tissue levels of trans and cis-resveratrol after shortened or prolonged administration of red wine to rats. *International Journal of Tissue Reaction*, 1996, 18(2-3): 67-71
- [9] 闫静, 王振月, 刘丹宁等。白藜芦醇及其甙的生物活性研究进展。中医药学报, 2000, 2:39-40
- [10] Jang M., Cai L.,Udeani G,*et al.*,Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes.*Science*,1997, 275(5297):218-220
- [11] 赵霞, 陆阳, 陈泽乃。白藜芦醇的化学药理研究进展。中草药, 1998,29(12): 837-839
- [12] 唐旭东、周克元、丁航等。白藜芦醇诱导 CNE-2Z 细胞凋亡过程中 caspase-3 的活化。免疫学杂志, 2003, 19 (1) :23-29

- [13] Tsan M.F., White J.E.,Maheshwari J.G.,*et al.*,Resveratrol induces Fas signaling independent apoptosis in THP-1 human monocytic leukemia cells.Br J Haematol,2000,109(2):405-412
- [14] Wolter F., Akoglu B.,Clausnitzer A.,*et al.*,Downregulation of the cyclin D1/Cdk4 complex occurs during resveratrol induced cell cycle arrest in colon cancer cell lines.J Nutr,2001,131(8):2197-2203
- [15] Tinhofer I., Bernhard D., Senfter M., *et al.*, Resveratrol,a tumor-suppressive compound from grapes,induces apoptosis via a novel mitochondrial pathway controlled by Bel-2. FASEB J, 2001,15(9): 1613-1615
- [16] Mouria M., Gukovskaya A.S.,Jung Y.,*et al.*,Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis.Int J Cancer,2002,98(5):761-769
- [17] 田雪梅, 张展霞。白藜芦醇抑制 HepG2 细胞生长及诱导细胞凋亡的初步研究。中国药理学通报, 2001, 17 (5) :522-524
- [18]朱振勤, 张小铁, 陈季武等。白藜芦醇抑制 HeLa 细胞肿瘤活性的自由基机理。华东师范大学学报(自然科学版), 2002, (2) :98-103
- [19] Subbaramaiah K,Michaluart P,Chong Wenjing,*et al.*Resveratrol inhibits the expression of cyclooxygenase-2 in human mammary and oral epithelial cells[J].Pharm Bio,1998,36(Suppl),35~43
- [20]马会勤, 陈尚武, 葡萄中保健物质白藜芦醇[J].中外葡萄与葡萄酒, 1999, (3): 69~72
- [21] 冯永红, 许实波。白藜芦醇药理作用研究进展。国外医药·植物药分册, 1996, 11(4):155-157
- [22] Blond, Paul J., Pierre M., *et al.* , Antioxidant action of resveratrol in lipid peroxidation. Sciencesdes Aliments, 1995, 15(4): 347-358
- [23] Kimura, Yoshiyui, Hiroji O., Effect of stilbene compinents of roots of polyonum ssp on liver injury in pexoxidized oil-led rats. Plant meds, 1983, 49(1): 51-54
- [24] Belguendouz L., Fremont L., Limard A., Resveratrol inhibit metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. Biochemical

Pharmacology, 1997, 53(9): 1347-1355

[25] 杨迎暴, 朴英杰。白藜芦醇对急性骨髓损伤早期脂质过氧化反应和活性氧水平的抑制。中国临床药理学与治疗学, 2002, 7 (3) :193-196

[26] Schoepner A. Purification and properties of stilbene synthase from induced cell suspension cultures of peanut[J]. Biol Chem, 1984, 259(11): 6806~6811

[27] Liswidowati ME, Hohmann F. Induction of stilbene synthase by *Botrytis cinerea* in cultured grapevine cells[J]. Planta, 1991, 183(2): 307~314

[28] Langcake P, Pryce R. J. The production of resveratrol and the viniferins by grapevine in response to ultraviolet irradiation[J]. Phytochemistry, 1997, 16(8): 193~196

[29] Schwekendiek A., Pfeffer G., Kindl H., Pine stilbene synthase cDNA, a tool for probing environmental stress. FEBS, 1992, 301(1): 41-44

[30] Sparvoli F., Martin C., Scienza A., *et al.*, Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). Plant Mol. Biol., 1994, 24: 734-755

[31] Schubert T, Fischer R, Hain R, *et al.* An ozone-responsive region of the grapevine resveratrol synthase promoter differs from the basal pathogen-responsive sequence[J]. Plant mole Bio, 1997, 34(3): 417~426

[32] Schroder J, Lanz T, Schroder G. Genes for biosynthesis of stilbene-type phytoalexins [C]. UCLA. Aymp Mole Cell Biol, 1991, 34(3): 417~426

[33] Lanz T, Susanne T. The role of chalcone synthase: site-directed mutagenesis of resveratrol and chalcone synthase, two key enzymes in different plant specific pathways[J]. Biol Chem, 1991, 266(1): 9971~9976

[34] Schoppner A., Kindl H., Purification and properties of a stilbene synthase from induced cell suspension cultures of peanut. J Biochem Chem, 1984, 259(11): 6806-6811

[35] Morita H., Noguchi H., Schroder J., *et al.*, Novel polyketides synthesized with a higher plant stilbene synthase. Eur J Biochem, 2001, 268: 3759-3766

[36] Schroder G., Schroder J., A single change of histidine to glutamine alters the substrate preference of a stilbene synthase. J Biochem Chem, 1992, 267(29): 20558-20560

- [37] Schoppner A., Kindl H., Stilbene synthase (Pinosylvine synthase) and its induction by ultraviolet light. FEBS, 1979, 108(2): 349-352
- [38] Ryder T.B., Cramer C.L., Bell J.N., *et al.*, Elicitor rapidly induces chalcone synthase mRNA in *Phaseolus vulgaris* cells at the onset of the phytoalexin defense response. Proc Natl Acad Sci, 1984, 81: 5724-5728
- [39] Hain R., Bieseler B., Kindl H., *et al.*, Expression of a stilbene synthase gene in *Nicotiana tabacum* results in synthesis of the phytoalexin resveratrol. Plant Mol Biol, 1990, 15:325-335
- [40]<http://www.bspp.org.uk/icpp98/1.9/20.html>
- [41]Melchior F,Kindl H.Grapevine stilbene synthase cDNA only slightly differing from chalcone synthase cDNA is expressed in *Escherichia coli* into a catalytically active enzyme[J].FEBS Letters.1990,268(1):17~20
- [42]Calderon AA,Zapata JM ,Ros BA ,et al.Differential expression of a cell wall localized peroxidase isoenzyme capable of oxidizing 4,hydrox,the cell culture of grapevine [J].Plant cell –Tissue &Organ Culture,1994,37(2):171~127
- [43] Yamaguchi T., Kurosaki F., Suh D.Y., *et al.*, Cross-reaction of chalcone synthase and stilbene synthase overexpressed in *Escherichia coli* . FEBS , 1999,460:457-461
- [44] 邵莉, 李毅, 梁晓文等。查尔酮合酶基因转化矮牵牛。生物学通报, 1995, 30(6): 11-12
- [45] Tropf S., Lanz T., Rensing S.A., *et al.*, Evidence that stilbene synthases have developed from chalcone synthases several times in the course of evolution. J.Mol.Evol., 1994,38(6):610-618
- [46] Schuz R., Heller W., Hahlbrock K. , Substrate specificity of chalcone synthase from *Petroselinum hortense*. J.Biochem.Chem.,1983, 258(11):6730-6734
- [47] Jean L.F., Joseph M.J., Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis.Nature Structural Biology,1999,6(8):775-784
- [48] Ryder T.B., Cramer C.L., Bell J.N., *et al.*, Elicitor rapidly induces chalcone synthase mRNA in *Phaseolus vulgaris* cells at the onset of the phytoalexin defense

- response. Proc Natl Acad Sci, 1984, 81: 5724-5728
- [49] Melchior F., Kindl H., Coordinate and Elicitor-Dependent Expression of Stilbene Synthase and Phenylalanine Ammonia-Lyase Genes in Vitis cv. Optima. Arch Biochem Biophys, 1991, 288(2): 552-557
- [50] Heath M.C., Hypersensitive response-related death. Plant Mol Biol, 2000, 44: 321-334
- [51] McDowell J.M., Dang J.L., Signal transduction in the plant immune response. Trends Biochem Sci, 2000, 25: 79-82
- [52] Shirasu K., Schulze-Lefert P., Regulators of cell death in disease resistance. Plant Mol Biol, 2000, 44: 371-385
- [53] Grayer R.J., Kokubun T., Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. Phytochemistry, 2001, 56: 253-263
- [54] Hammerschmidt R., Phytoalexins: what have we learned after 60 years? . Annu Rev, Phytopathol, 1999, 37: 285-306
- [55] Rolfs C.H., Schon H., Steffens M., *et al.*, Cell-suspension culture of *Arachis hypogaea* L: model system of specific enzyme induction in secondary metabolism. Planta, 1987, 172: 238-244
- [56] Gehlert R., Schoppner A., Kindl H., Stilbene synthase from seedlings of *Pinus sylvestris* purification and induction in response to fungal infection . Mol Plant-Microbe Interactions, 1990, 3(6): 444-449
- [57] Chung I.M., Park M.R., Rehman S., *et al.*, Tissue specific and inducible expression of resveratrol synthase gene in peanut plants. Mol Cells, 2001, 12(3): 353-359
- [58] Hain G., Reif H.J., Krause Elvira., *et al.*, Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. Nature, 1993, 361: 153-156
- [59] Schroder G., Brown J.W., Schroder J., Molecular analysis of resveratrol synthase: cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase. Eur J Biochem, 1988, 172(1): 161-169

- [60]Hiroyuki Ohashi, Tsutomu Takayanagi, Tohru Okuda., *et al.*, Structure of grapevine stilbene synthase genes inducing different amounts of resveratrol under elicitor treatment. *Am J Enol Vitic*, 2001, 52(3):284
- [61]Hipskind J.D., Paiva N.L., Constitutive accumulation of a resveratrol glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2000, 13: 551-562
- [62] Tropf S., Karcher B., Schroder G., *et al.*, Reaction mechanisms of homodimeric plant polyketide synthases (stilbene and chalcone synthase) .*J Biochem Chem*, 1995, 270(14): 7922-7937
- [63]Fettig S., Hess D., Expression of a chimeric stilbene synthase gene in transgenic wheat lines. *Transgenic Research*, 1999,8(3): 179-189
- [64]Punja Z.K., Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens-a review of progress and future prospects. *Can J Plant Pathol*, 2001, 23: 216-235
- [65]Kobayashi S., Ding C.K., Nakamura Y., *et al.*, Kiwifruits (*Actinidia deliciosa*) transformed with a *Vitis* stilbene synthase gene product piceid (resveratrol-glucoside). *Plant Cell Reports*, 2000,19(9):904-910
- [66]Fischer R., Budde I., Hain R., Stilbene synthase gene expression causes changes in flower colour and male sterility in tobacco. *Plant Journal*, 1997, 11(3):489-498
- [67] Bathust IC. Protein expression in yeast approach to production of recombinant malaria antigens. *Am J Trop Med Hyg.* 1994,50(4):20~26
- [68] Hitzeman RA, Hagie FE, Lebine HL. *et al.* Expression of a human gene for interferon in yeast, *Nature*, 1981;293:717~722
- [69]Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, *et al.* Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast, *Nature*, 1982,298:347~350
- [70] Chen CY, Opperman H, Hitzeman RA. Homologous versus heterologous gene expression in the yeast, *Nucl Acids Res*, 1984,12:8951~8970
- [71] Innis MA, Hollande MJ, McCabe PC, *et al.* Expression glycosylation and secretion of an *Aspergillus* glucoamylase by *saccharomyces cerevisiae*, *Science*, 1985, 228:21~26

- [72] Wen D, Schelesingeer MJ. Regulated expression of sindbis and vesicular stomatitis virus glycoproteins in *saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83:3639~3643
- [73] Promrosse SB, Derbyshire P, Jones IM, et al. Hereditary instability of recombinant DNA molecules. *Soc Gen Microbiol*, 1983, 10:63~67
- [74] Srienc F, Campbell JL, Bailey JE. Analysis of unstable recombinant *saccharomyces cerevisiae* population growth in selective medium. *Biotechnol Bioeng*, 1986, 28:996~1006
- [75] Parulekar SJ, Semones GB, Rolf MJ, et al. Induction and elimination of oscillations in continuous culture of *saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 1986, 28:700~710
- [76] Wegner EH. Biochemical conversions by yeast fermentation at high-cell densities, US. Patent, 1983, 4414329
- [77] Ellis SB, Brust PF, Koutz PJ, et al. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol*, 1985, 5:1111~1121
- [78] Cregg JM, Baringer KJ, Hessler AY, et al. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol Cell Biol*, 1985, 5:3376~3385
- [79] Tachopp JF, Brust PF, Cregg JM, et al. Expression of the *lacZ* gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15:3859~3876
- [80] Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ. Foreign gene expression in yeast. *Yeast*, 1992, 8:423~428
- [81] Couderc R, Baratti J. Oxidation of methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, purification and properties of alcohol oxidase. *Biol Chem*, 1980, 44:2279~2289
- [82] Cregg JM, Madden KR. Development of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, as a host system for the production of foreign proteins. *Dev Ind Microbiol*, 1988, 29:33~41
- [83] Scorer CA, Clare JJ, McCombie WR, et al. Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene

- expression, *Bio/Technology*, 1994; 12: 181~184
- [84] Cregg JM, Tschopp JF, Stillman C, et al. High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia.pastoris*, *Bio/Technology*, 1987, 5: 479~485
- [85] Thill GP, Davis GR, Stillman C, et al. Positive and negative effects of multi-copy integrated expression vectors on protein expression in *Pichia pastoris*, *Proceedings of the 6th international symposium on genetics of microorganisms*, Societe Franscaise de Microbiologie, Paris, 1990, 2: 477~490
- [86] Sreekrishma K, Nelles L, Potenz R, et al, High-level expression, purification, and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia.pastoris*, *Biochemistry*, 1989, 28: 4117~4125
- [87] Vedbick T, Buckholz RG, Engel M, et al. High-level secretion of biologically active aprotinin from the yeast *Pichia.pastoris*, *J Ind Microbiol*, 1991, 7: 197~201
- [88] Cregg JM, Madden KN. Development of transformation systems and construction of methanol-utilization –defective mutants of *Pichia.pastoris* by gene disruption, *Biological Research on Industrial yeast*, 1987, 2: 1~18
- [89] Clare JJ, Rayment FB, Ballantine SP, et al. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integration of the gene, *Bio/Technology*, 1991, 9: 455~460
- [90] Romanos MA, Clare JJ, Beesley KM. Invertase gene (SUC2) of *saccharomyces cerevisiae* as a domain marker for transformation of *Pichia.pastoris*, *Gen*, 1987, 59: 115~125
- [91] Clare JJ, Romanos MA, Rayment FB, et al, High-level secretion of biologically active aprotinin from the yeast *Pichia.pastoris*, *J Ind Microbiol*, 1991, 7: 197~201

致 谢

本研究论文是在导师尉亚辉教授的悉心指导下完成的。从论文的选题、资料的搜集、实验的设计、文章和论文的撰写及修改，都倾注了恩师大量的精力和心血。三年来恩师为我的成长倾注了大量的心血，我所取得的每一点进步都离不开恩师的谆谆教诲。恩师严谨求实的治学态度、渊博的知识、忘我的工作作风以及对本学科前沿敏锐而准确的把握，令我受益匪浅，激励着我逐渐步入科学研究的殿堂。三年来，恩师的言传身教、谆谆教诲还让我明白了许多做学问、做人的道理。在此，特向恩师表示崇高的敬意和衷心的感谢！

此外，我还要特别感谢生命科学学院的殷迪、郝建国等老师，在我的实验过程中，他们给予我许多指导和帮助，使得论文可以顺利完成。

在本文的完成过程中得到了众多同门和师弟师妹和朋友：郭芝光、朱剑光、刘科、刘蕾、张儒、黄萱、张培楠、王瑛华、张永言等人的帮助，以及得到了陈德礼硕士的支持和帮助。在此，特向他们表示感谢。

我还要特别感谢我的父母，感谢他们给予我无限的关爱、理解和支持，我只有不断地努力，才能不辜负他们对我的期望。

感谢所有关心和爱护我的人！

金晓丽

二零零四年四月于西北大学