

酵母菌细胞自溶突变株的研究

何秀萍 刘增然 刘春秀 张博润*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

关键词: 酵母菌, 低渗透敏感, 自溶突变株

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2003)02-0283-05

细胞壁是酵母菌的重要细胞器,参与细胞内外多方面的生理生化过程,如细胞絮凝、信号转导、致病性等,在决定细胞结构完整性方面起着重要的作用。酵母细胞壁是由 β -1,3-葡聚糖、 β -1,6-葡聚糖、甘露聚糖蛋白及几丁质等相互交链构成的复杂的双层网状结构^[1]。细胞壁组成或结构的改变会使细胞产生对温度或低渗透压的敏感性,在相应的条件下发生自溶,使细胞内容物释放到胞外。产生上述效应的突变株称为温度敏感自溶突变株和低渗透敏感自溶突变株^[2-4]。对此类突变株的研究一方面有利于进一步阐明酵母菌细胞壁代谢及组装的调控机制。同时利用其条件性自溶特性将有利于构建能有效释放外源蛋白的基因表达宿主系统^[5]。本研究分离筛选到3个对低渗透敏感的酵母菌细胞自溶突变株,对其生理生化分析表明它们是3个新的突变株。

1 材料和方法

1.1 菌株

酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*) SH208-15(*MATa leu2*)和 SH208-8(*MATa ade2*)均由本实验室保存。突变株 HF122, HF173 和 HF192 由本研究分离获得。

1.2 培养基与培养条件

酵母菌常规培养用 YEPD 培养基^[6]。突变株的筛选及分析鉴定用 YEPDK(YEPD 中添加 4.5% 氯化钾) YEPDS(YEPD 中添加 0.004% 十二烷基磺酸钠) YEPS(用 2% 蔗糖代替 YEPD 中的葡萄糖) SD^[6]、SDK(SD 中添加 4.5% 氯化钾)培养基。酵母菌生孢测定用 McClary 培养基^[6]。28℃ 静置或振荡培养。

1.3 突变株分离

用 0.5mg/mL 亚硝基胍(NMMG)处理对数生长期的酵母菌 SH2108-15 细胞(28℃, 30min)后,离心收集细胞,沉淀用无菌水洗两次,再用 YEPDK 洗 1 次后,细胞重悬于 2 mL YEPDK 中,28℃ 培养 12h。3 000 r/min 离心 2min,取上清液进行梯度稀释后涂布于 YEPDK 平皿上,28℃ 培养 48h。将生长的单菌落分别影印到 YEPDK 和 YEPDS 平皿上,28℃ 培养 48h,在 YEPDK 上正常生长,而在 YEPDS 不能生长的单菌落即为可能的突变株。

1.4 酵母菌遗传分析

交配型分析,生孢及随机孢子分析均参照文献[6]。

1.5 酵母菌细胞壁完整性分析

参照文献[7]。

* 通讯作者。E-mail: zhangbr@sun.im.ac.cn

作者简介:何秀萍(1966-),女,河北省蔚县人,中国科学院微生物研究所助理研究员,博士。主要从事酵母菌分子遗传与育种研究。E-mail: hzhty9822@sina.com.cn

收稿日期:2002-08-20,修回日期:2002-12-02

1.6 细胞自溶的测定

在渗透保护培养基中培养细胞至对数中期,测定 600 nm 光吸收值。离心收集细胞,用 4.5% 氯化钾洗 2 次后,将细胞悬于与培养液等体积的无菌水中,剧烈震荡 1 min,10 000 r/min 离心 5 min,分别测定上清液在 260 nm 和 280 nm 的光吸收值 (OD_{260} , OD_{280})。细胞自溶程度 (Lysis degree, LD) 用 OD_{260}/OD_{600} 或 OD_{280}/OD_{600} 表示。

1.7 内源转化酶 N-糖基化水平的测定

参考文献 [8]

1.8 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

参考文献 [10]

1.9 蛋白质含量测定

参考文献 [6] 破碎细胞,按考马斯亮兰 G-250 染色法测定蛋白质含量^[11]。

2 结果

2.1 酵母菌低渗透敏感突变株的分离筛选

按方法所述,从约 20 000 个诱变单菌落中筛选到 32 个可能的突变株,分别命名为 HF1 ~ HF32。液体培养验证了这些突变株的低渗透压敏感性。在低渗透条件下,它们均表现出细胞自溶特性,突变株的 LD_{260} 分别是野生型菌株的 2 ~ 8 倍。其中 HF7 的 LD_{260} 最高, HF2 和 HF9 次之。进一步分析表明这 3 个突变株同时具有低渗透敏感性和温度敏感性,如表 1 所示,当培养温度为 28℃ 时,在渗透保护培养基 (YEPDK) 上 3 个突变株均能很好生长,在低渗透培养基 (YEPDS) 上生长完全被抑制,在 37℃ 培养时,即使在渗透保护培养基上它们也不能生长,这与 PKC1 信号转导途径突变株是不同^[12]。但是这 3 个突变株存在一些特性差异,在酵母菌常规培养基 (YEPD) 上, HF2 能够正常生长,而 HF7 和 HF9 却不能生长;当在低渗透培养基中添加 4.5% 氯化钾后, HF7 的生长得到部分恢复,而 HF2 和 HF9 仍不能生长。在上述不同培养条件下,野生型菌株均能正常生长。因此选择上述 3 个突变株进一步分析。

表 1 野生型和突变株在不同培养条件下的生长比较

菌株	YEPDK		YEPD		YEPDS		YEPDS + 4.5% KCl	
	28℃	37℃	28℃	37℃	28℃	37℃	28℃	37℃
SH208-15	+	+	+	+	+	+	+	+
HF2	+	-	+	-	-	-	-	-
HF7	+	-	-	-	-	-	+/-	-
HF9	+	-	-	-	-	-	-	-

注: + 生长; - 不生长; +/- 微弱生长。

2.2 突变株胞内蛋白向胞外的释放

按方法所述用 OD_{600} 相同的菌悬液制备细胞自溶液,各取 20 μ L 进行 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。图 1 结果显示野生型菌株的处理液中没有检出任何蛋白,而突变株的细胞自溶液中均有蛋白带出现,尤其 HF7 表现最为突出。对细胞总蛋白和自溶释放到胞外的蛋白含量的测定表明,在低渗透条件下, HF7 约有 36% 的胞内蛋白释放到胞外, HF2 和 HF9 约分别有 21% 和 17% 的蛋白释放到胞外。

2.3 突变株的细胞壁缺陷

酵母菌细胞壁发生缺陷后,细胞对细胞壁降解酶 (Zymolyase) 的敏感性增强^[7]。按照 Ovalle 等的方法,测定了不同菌株对 Zymolyase 的敏感性。表 2 结果表明,与野生型菌株 SH208-15 相比,3 个突变株均表现出细胞发生快速自溶所需要的时间 (Lag time, LT) 缩短;细胞自溶速率 (MLR) 明显提高。说明 3 个突变株的细胞壁结构或组成与野生型菌株是不同的,突变株的低渗透敏感性与细胞壁缺陷有关。

表 2 野生型菌株和突变株对细胞壁降解酶(Zymolyase)的敏感性比较

菌株	LT ^a /min	MLR ^b /min ⁻¹	RI ^c
SH208-15	33.2	0.11×10^{-2}	0.03×10^{-3}
HF2	15.3	0.99×10^{-2}	0.65×10^{-3}
HF7	6.1	0.89×10^{-2}	1.46×10^{-3}
HF9	9.6	0.66×10^{-2}	0.68×10^{-3}

a. LT(Lag Time):细胞悬液的 OD_{660} 降低 0.05 所需要的时间;

b. MLR(The Maximum rate of lysis):以时间为横坐标, OD_{660} 为纵坐标所做细胞自溶曲线的最大斜率;

c. RI(The Rate Index):MLR/LT.

2.4 内源转化酶 N-糖基化水平检测

将待测菌的对数生长期细胞转移到 YEPS 培养基中诱导培养 3h,提取细胞总蛋白,进行 7% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,按文献 [8] 方法进行活性染色。结果显示野生型菌株和 3 个突变株所分泌的内源转化酶的 N-糖基化水平没有明显的差异(图 2)。而 Hashimoto 和 Yoda 等曾报道酵母菌细胞壁缺陷突变株 *srb1/vig9* 中的内源转化酶 N-糖基化水平与野生型菌株相比明显降低^[8,9],因此本研究筛选到的 3 个突变株与报道的 *srb1/vig9* 突变株是不同的。

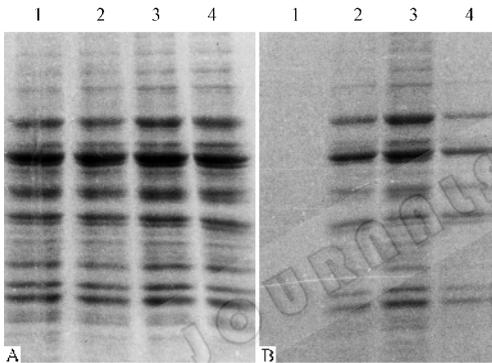


图 1 胞内蛋白在低渗透条件下向胞外的释放

A. 胞内总蛋白;B. 细胞自溶液.

1. 野生型菌株 SH208-15;2. HF2;3. HF7;4. HF9.

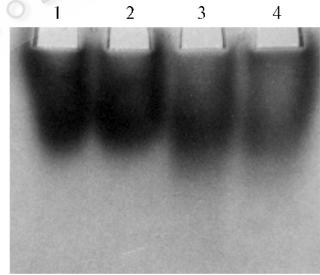


图 2 不同菌株内源转化酶糖基化水平的比较

1. 野生型菌株 SH208-15;2. HF2;3. HF7;4. HF9.

2.5 突变菌株遗传分析

突变株与野生型菌株具有相同的交配型,它们分别与同源的单倍体菌株 SH208-8 进行杂交,获得的二倍体菌株均表现的是野生型表型。对杂交的二倍体菌株进行随机孢子分析,没有发现突变表型发生重组的现象,说明突变是核内单基因的隐性突变。可用作克隆相关基因的宿主。

3 讨论

酵母菌的细胞壁是一个复杂的动力学结构。细胞壁的化学组成和空间构象受到细胞发育分化周期及外界环境条件变化的严格调控^[1,44],但其复杂的调控机制及究竟有多少基因(蛋白质)参与了细胞壁代谢及其调控目前还不清楚。本研究获得的 3 个不同的细胞壁缺陷、低渗透敏感突变株具有与文献报道突变株不同的表型特征,对其生物学特征及相关基因的研究将为阐明上述机制提供重要的理论依据。

另外,酵母菌,尤其是酿酒酵母是生物技术领域非常有用的外源蛋白表达系统,但其坚硬的细胞壁是有效裂解细胞释放外源蛋白的一个主要障碍,分泌型表达虽然是一个有效的解决方法,但外源蛋白在分泌过程中的过分糖基化对其生物活性有很大的不利影响^[13]。同时酵母菌细胞内有许多功能性化合

物可用作食品添加剂、调味品及药物,同样需要有效的释放,以便不破坏产品的营养及感官特性。本研究获得的低渗透敏感自溶突变株能将 20% ~ 36% 的胞内蛋白释放到外部介质,为构建遗传稳定的、可调控裂解的基因表达受体系统奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Klis F M. Cell wall assembly in yeast. *Yeast*, 1994, **10** :851 ~ 869.
- [2] Shimizu J, Yoda K, Yamasaki M. The hypo-osmolarity-sensitive phenotype of the *Saccharomyces cerevisiae* *hpo2* mutant is due to a mutation in *PKC1*, Which regulates expression of β -glucanase. *Mol Gen Genet*, 1994 **242** :641 ~ 648.
- [3] Shimizu J, Okumura Y, Yoda K, *et al.* A glutamine synthetase mutant of *Saccharomyces cerevisiae* shows defect in cell wall. *J Gen Appl Microbiol*, 1997 **43** :157 ~ 162.
- [4] Ciod V J, Sanchez M, Nombela C. Characterization of therosensitive autolytic mutants from diploid *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 1994 **140** :559 ~ 568.
- [5] Alvarez P, Sampetro A, Molina M, *et al.* A new system for the release of heterologous proteins from yeast based on mutant strains deficient in cell integrity. *Journal of Biotechnology*, 1994, **38** :81 ~ 88.
- [6] Adams A, Gottschling D E, Kaiser C A, *et al.* Methods in Yeast Genetics : A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. New York : Cold Spring Harbor Labortory Press. 1997.
- [7] Ovalle R, Lim S T, Holder B, *et al.* A spheroplast rate assay for determination of cell wall integrity in yeast. *Yeast*, 1998, **14** :1159 ~ 1166.
- [8] Hashimoto H, Sakakibara M, Yamasaki M, *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* *VIG9* encodes GDP-mannose pyrophosphorylase, which is essential for protein glycosylation. *J Biol Chem*, 1997, **272** :16308 ~ 16314.
- [9] Yoda K, Kawada T, Kaibara C, *et al.* Defect in cell wall integrity of the yeast *Sacchromyces cerevisiae* caused by a mutation of the GDP-mannose pyrophosphorylase gene *VIG9*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, **64** :1937 ~ 1941.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- [11] 李建武 萧能虞 余瑞元 等. 生物化学实验原理和方法. 北京 北京大学出版社. 1994.
- [12] Levin D E, Bartlett H E. Mutants in the *S. cerevisiae* *PKC1* gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *J Cell Biol*, 1992, **116** :1221 ~ 1229.
- [13] Romanos M A, Scorer C A, Clare J J. Foreign gene expression in yeast : a review. *Yeast*, 1992, **8** :423 ~ 488.
- [14] 何秀萍 张博润. 酵母菌细胞完整性信号途径及其上游调控因子的研究. 微生物学报, 2002 **42** (3) :384 ~ 387.

Studies on Yeast Mutants that Autolyse Under Hypo-osmolarity Condition

He Xiuping Liu Zengran Liu Chunxiu Zhang Borun*

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract : *Saccharomyces cerevisiae* osmotic fragile mutants were obtained from parental strain SH208-15 by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG) treatments. Three mutants, HF2, HF7 and HF9 showed high degree of release of the intracellular components into medium under hypo-osmotic condition and were studied in details. They showed some similar phenotypes to the previously reported fragile mutants, including hypo-osmolarity sensitivity, temperature-sensitivity

* Corresponding author. E-mail zhangbr@sun.im.ac.cn

and sensitivity to zymolyase indicating the existence of cell wall integrity defect. However, the three mutants differ from the reported mutants in some respects. Firstly, The temperature sensitivity of the isolated three mutants could not be complemented by osmotic stabilizer, while that of the PKC1 pathway mutants could be restored. Secondly, the degree of glycosylation of invertase in HF2, HF7 and HF9 did not decrease as that of *srb1/vig9* mutants when compared with invertase in wild-type strain respectively. In addition, the three mutants differ from each other. Hence, the three mutants are putative novel fragile mutants defect in cell wall. They can be used to further study the metabolism of yeast cell wall in biochemical and genetic levels and have the potential value to release intracellular heterologous proteins in high yield.

Key words: Yeast, Mutant, Hypo-osmolarity, Autolysis

《微生物学报》投稿须知(增补)

从 2003 年起,为增加信息量以及规范化,我刊需要补充一些信息。

1 投稿要求

(1) 投稿须一式两份 (2) 就论文是否涉及保密、署名是否无误等问题,务请出示研究内容所涉及单位的介绍信 (3) 100 元审稿费,收款人一栏写《微生物学报》编辑部 (4) 为便于联系请提供 E-mail 地址; (5) 与国外作者合写的论文,应出示国外作者同意以中文形式发表及署名顺序的说明。

2 中英文脚注

需要增补以下信息,如有些项目没有可缺项。

中文脚注(正文首页下方)

基金项目:.....基金资助(项目编号)

* 通讯作者。Tel 86- Fax 86- E-mail:

作者简介 姓名(出生年-),性别(民族),籍贯,职称,学位及研究方向。E-mail:(本项指的是第一作者)

收稿日期 2003-01-01,修回日期 2003-04-01

英文脚注(英文摘要下方):

Supported by

* Corresponding author. Tel 86- Fax 86- E-mail:

Received 01-31-2003

3 参考文献

补充文章题目,其它请详见刊登在 2003 年第 1 期上的“投稿须知”。

4 图和表

文中图、表力求精简,避免图、表的内容重复。

图:在文中插图位置要用一长方形示意,图题中英文对照置于框下,图注全部用英文表示;原图集中心另纸打印附图后,只需标出图号即可。照片要清晰,线图要精绘,照片图最好附软盘或原照片。

表:随正文排,表序及表题(中英文)置表上方,表注(英文)置于表下。表的内容全部用英文表述。一般使用三线表。

5 英文摘要

用第三人称概述研究的目的、方法、结果和讨论,也可以加入自己的一些观点。要求语法应正确,句子要通顺。使读者通过英文摘要、图和表就可以了解全文的研究内容。