

脉冲电泳核型分析在酿酒酵母菌分类学研究中的应用

白逢彦 贾建华

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

提 要:根据酵母属(*Saccharomyces* Meyen ex Reess)分类学研究最新进展,核实并更新了保藏于中国普通微生物菌种保藏中心的该属菌株的种类归属。在形态和生理生化性状,包括对 6 种糖的发酵能力、对 18 种碳源和 3 种氮源化合物的同化能力、在无维生素培养基中和 37℃ 下的生长情况、对放线菌素酮的抗性 etc 常规分类学研究的基础上,对部分疑难菌株进行了脉冲电泳核型比较分析。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、贝酵母(*S. bayanus*)和巴氏酵母(*S. pastorianus*)三者与少孢酵母(*S. exiguus*)在电泳核型上具有明显的差异,主要表现在前三者染色体 DNA 分子的大小范围均为 225~2200 kb,而 *S. exiguus* 缺少小于 365 kb 的染色体 DNA 分子。*S. cerevisiae* 的模式和权威菌株具有 12~14 条染色体 DNA 带;*S. bayanus* 和 *S. pastorianus* 的模式菌株均有 17 条带,但在带型上存在一定差异。原归于 *S. cerevisiae* 的菌株 AS 2.100 具有 16 条带,与 *S. cerevisiae* 区别明显而与 *S. bayanus* 相似;而原定名 *S. exiguus* 的 AS 2.1158 和原定名 *S. uvarum* 的 AS 2.1555 各具有 13 条带,均与 *S. cerevisiae* 相似。综合生理生化和脉冲电泳核型两方面的比较分析结果可以确定,AS 2.100 应属于 *S. bayanus*,而 AS 2.1158 和 AS 2.1555 的正确种名均应为 *S. cerevisiae*。

关键词:酿酒酵母,贝酵母,脉冲电泳核型分析

中图分类号:Q939.5 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2000)01-0009-13

染色体条数及其大小代表了一个生物所含有的遗传物质的多少及其组织形态,这一通常被称为核型(karyotype)的特征随物种的分化而改变,因而具有特定的系统分类学意义。高等生物如植物和动物的核型可以通过细胞学技术来分析。而真菌,尤其是单细胞真菌如酵母的染色体非常小,难以用常规的细胞学技术来观察。遗传学上的连锁群分析技术曾被用来研究一些有性型真菌,包括一些酵母菌的染色体条数。但这一技术繁琐复杂,且不能应用于无性型真菌或难以进行有性生殖的种。

一种新发展起来的电泳技术,即脉冲电场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis),简称脉冲电泳(PFGE)技术,可以在琼脂糖凝胶中用电泳分离完整的酵母染色体 DNA 分子,从而估算酵母细胞染色体条数及每条染色体 DNA 分子的大小^[1,2]这一被称为电泳核型分析(electrophoretic karyotyping)或分子核型分析(molecular karyotyping)的技术已被越来越多地应用于酵母菌及其它真菌的分类学研究中^[3,4]。已有许多研究表明脉冲电泳核型分析在酵母属(*Saccharomyces* Meyen ex Reess)中是一可靠的分类依据^[5~7]。

酵母属的分类,尤其是对酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen)种的

作者简介:白逢彦(1963-),男,山东省单县人,中国科学院微生物研究所研究员,博士,主要从事酵母菌的系统分类学研究

收稿日期:1998-08-11, **修回日期:**1998-12-01

界定,近年来发生了很大变化。主要是由于 DNA-DNA 同源性研究的结果,原来作为酿酒酵母异名的贝酵母(*S. bayanus*)、奇异酵母(*S. paradoxus*)和巴氏酵母(*S. pastorianus*)这三个种被重新独立出来^[8]。我们根据酵母属分类学研究的最新进展,对保藏于中国普通微生物菌种保藏中心的该属菌株进行了系统的分类学研究,在生理生化等常规性状测定的基础上,对部分疑难菌株进行了脉冲电泳核型分析。

1 材料和方法

1.1 供试菌株和常规分类

供试的 9 株酵母属菌株见表 1。AS 2.1879、AS 2.1882 和 AS 2.1885 分别是少孢酵母(*Saccharomyces exiguus*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和贝酵母(*Saccharomyces bayanus*)的模式菌株,AS 2.1883 是巴氏酵母(*Saccharomyces pastorianus*)的权威菌株,皆来自日本理化学研究所微生物系统保存施設(JCM)。AS 2.1419(= ATCC 7752)和 AS 2.1554(= ATCC 9080)为来自美国典型培养物保藏中心的 *S. cerevisia* 权威菌株。常规的形态及生理生化性状测定按照酵母菌分类标准方法进行^[9]。

1.2 脉冲电泳核型分析

完整酵母菌染色体 DNA 样品的制备是参照 Schwartz 和 Cantor 的方法^[1]加以改进。活化后的菌株接种于 5 mL YM 液体培养基(酵母抽提物 0.3%,麦芽抽提物 0.3%,蛋白胨 0.5%,葡萄糖 1%)中,25℃ 下 180 r/min 摇床上培养 20~24 h,离心收集菌体细胞并用 50 mmol/L EDTA(pH 8.0)洗 2 次,加 100 μ L SPG 缓冲液(10 mmol/L NaH_2PO_4 -50%甘油, pH 6.2)制成悬浮液,取 100 μ L 细胞悬液与 50 μ L 溶于 SPG 缓冲液的裂解酶(Lyticase, Sigma, 1000 单位/mL)混合,37℃ 下保温 5~10 min 破壁,加入 350 μ L 冷却至 42℃ 的用 125 mmol/L EDTA(pH 8.0)配制的 1% 低熔点琼脂糖(LMP agarose, BRL),混匀后注模(20 mm $\times$ 9 mm $\times$ 1.2 mm),4℃ 下凝固 30 min,胶块放入 2 mL LET(500 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris, pH 8.5)缓冲液中,加入 150 μ L β -巯基乙醇,37℃ 保温 24 h;弃 LET 缓冲液,胶块用 50 mmol/L EDTA, pH 8.0 洗 3 次后加入 2 mL 含蛋白酶 K(Merck)0.5 mg/mL 的 NDS(10 mmol/L Tris, 500 mmol/L EDTA, pH 8.0, 1% Lauroylsarcosine Na)缓冲液,50℃ 保温 24 h,弃 NDS 缓冲液,胶块用 50 mmol/L EDTA, pH 8.0 洗 3 次后放入 100 mmol/L EDTA-10 mmol/L Tris, pH 9.0 缓冲液中,4℃ 下保存备用。

脉冲电泳用 CHEF-DR II 型(Bio-Rad)脉冲电泳仪进行,琼脂糖浓度为 1%,电泳液为 0.5 $\times$ TBE,电泳程序设置为:200V,60s 脉冲间隔电泳 16 h,然后 90 s 脉冲间隔电泳 11 h,电泳液温度维持在 12~14℃。电泳后胶块在溴化乙锭水溶液(0.5 μ g/mL)中染色 30 min,然后在蒸馏水中浸泡进行背景脱色,在 302 nm 紫外灯下观察并照相,以 Bio-Rad 提供的酿酒酵母菌株 YNN295 的染色体 DNA 分子量标样作为标准计算每条带的大小。

2 结果

2.1 生理生化性状比较

常规分类学研究中,测定了保藏于中国普通微生物菌种保藏中心并编入《中国菌种目

录》(1992)中所有酵母属菌株的形态和生理生化性状,包括对 6 种糖的发酵能力、对 18 种碳源和 3 种氮源化合物的同化能力、在无维生素培养基中和 37℃ 下的生长情况、对放线菌素酮的抗性等。发现原来归于 *Saccharomyces cerevisiae* 的一株菌 AS 2.100,其生理特性与该种的标准描述及其模式和权威菌株(AS2.1419, AS2.1554, AS2.1882)的特性有显著差异,而与重新确立的 *S. bayanus* 的描述及其模式菌株(AS2.1885)的性状相似,主要表现在该菌株可同化甘露醇,并可在无外源维生素的培养基中生长(见表 1)。

表 1 供试菌株的生理生化性状比较

Table 1 Physiological characteristics of the *Saccharomyces* strains

Strain (AS)	Fermentation			Assimilation				Growth	
	Galactose	Maltose	Sucrose	Maltose	Cellobiose	Trehalose	Mannitol	Vit	Cycl
2.100	-	+	-	+	+	-	+	+	-
2.1158	+	-	+	-	-	+	-	-	-
2.1419	+	+	+	-	-	+	-	-	-
2.1554	+	+	+	+	-	+	-	+ W	-
2.1555	+	+	+	+	-	+	-	-	-
2.1879	+	-	+	-	-	+	-	-	+
2.1882	+	+	+	+	-	+	-	-	-
2.1883	+	+	+	+	-	+	-	-	-
2.1885	+	+	+	+	-	+	+	+	-

Vit = Vitamin free; Cycl = 100 µg/mL Cycloheximide; W = Weak.

来源于澳大利亚,用于酒精和单细胞蛋白生产的菌株 AS 2.1555,原定名为葡萄汁酵母(*Saccharomyces uvarum*),这一种名已被降为 *S. bayanus* 的异名^[10]。但这株菌不能同化甘露醇,不能在无外源维生素的培养基中生长(表 1),因此与 *S. bayanus* 的描述及其模式菌株的特性不一致,而与 *S. cerevisiae* 更相似。AS 2.1158 来自前苏联,原定名为少孢酵母,我们发现该菌株不具有 100 µg/mL 放线菌素酮的抗性,而这一特性是在常规分类中 *S. exiguus* 区别于 *S. cerevisiae* 的依据。

为了确证上述三株酵母菌的分类学位置,我们进一步对它们及相关种的模式和权威菌株进行了脉冲电泳核型比较分析。

2.2 脉冲电泳核型比较分析

在脉冲电泳核型分析中,直接比较了上述三个原鉴定有疑问的菌株与 *S. cerevisiae*、*S. bayanus*、*S. pastorianus* 和 *S. exiguus* 的模式菌株和权威菌株间电泳核型上的异同。从图 1 中可以看出, *S. cerevisiae*、*S. bayanus* 和 *S. pastorianus* 三者与 *S. exiguus* 在电泳核型上具有明显的差异,主要表现在 *S. exiguus* 缺少分子量小于 365 kb 的染色体 DNA 带,而前三者均具有 3~4 条分子量在 365 kb 至 225 kb 之间的 DNA 分子。

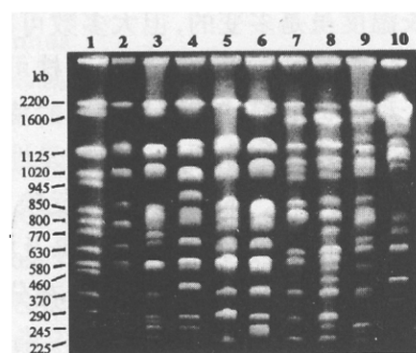


图 1 供试酵母属菌株的脉冲电泳核型比较

Fig. 1 Comparison of CHEF electrophoretic karyotypes among the *Saccharomyces* strains studied.

1. YNN 295; 2~6. *S. cerevisiae* (2. AS 2.1882, 3. AS 2.1419, 4. AS 2.1554, 5. AS 2.1555, 6. AS 2.1158); 7~8. *S. bayanus* (7. AS 2.100, 8. AS 2.1885); 9. *S. pastorianus* (AS 2.1883); 10. *S. exiguus* (AS 2.1879).

S. cerevisiae, *S. bayanus* 和 *S. pastorianus* 这三个种的染色体 DNA 分子的大小范围相似, 都在 225 kb 至 2200 kb 之间, 但后二者比前者具有更多的染色体。*S. cerevisiae* 的模式菌株 AS 2.1882 可分辨出 12 条带, 其权威菌株 AS 2.1419 和 AS 2.1554 各具有 14 条带。*S. bayanus* 的模式菌株 AS 2.1885 可分辨出 17 条带, *S. pastorianus* 的权威菌株 AS 2.1883 也可分辨出 17 条带。后两个种虽然具有相同的染色体 DNA 条数, 但在带型上具有一定差异, 如 *S. bayanus* 在 610~680 kb 之间、450~565 kb 之间和大约 365 kb 处各有一条带, 而 *S. pastorianus* 没有。

AS 2.1158 有 13 条带, 且有三条分子量小于 365 kb 的染色体 DNA 分子, 显然与其原定名称 *S. exiguus* 的核型差异明显, 而与 *S. cerevisiae* 相似。AS 2.1555 可分辨出 13 条带, 比 *S. bayanus* 少而与 *S. cerevisiae* 相似, 而且其带型也与后者更相似。AS 2.100 可看出有 16 条带, 数量上与 *S. bayanus* 和 *S. pastorianus* 接近, 但该菌株在 610~680 kb 之间、450~565 kb 之间和大约 365 kb 处各有一条带, 因此与 *S. bayanus* 更相似。

综合生理生化和脉冲电泳核型两方面的比较分析结果可以确定, AS 2.100 应属于 *S. bayanus*, 而 AS 2.1158 和 AS 2.1555 的正确种名均应为 *S. cerevisiae*。

3 讨论

酵母属目前包括 14 个种^[11], 一般将 *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* 和 *S. pastorianus* 这四个与酿造等工业生产有关的种归入狭义酵母组 (*Saccharomyces sensu stricto*), 其它种则归入广义酵母组 (*Saccharomyces sensu lato*)。虽然这两个组之间在生理生化性状上容易区分, 但同一组内的种, 尤其是狭义酵母组内的四个种, 在表型性状上则非常相似。*S. bayanus* 和 *S. paradoxus* 可分别以在无维生素培养基中的生长能力和对甘露醇的同化能力而区别于 *S. cerevisiae* 和 *S. pastorianus*, 后二者之间的区别更模糊, 一般来说, 属于 *S. pastorianus* 的菌株不能在高于 34 ℃ 的温度下生长, *S. cerevisiae* 菌株的最高生长温度虽是多变的, 但大多数可在 37 ℃ 或更高的温度下生长^[8, 11]。

典型的酿酒酵母及其相关菌株可借助上述方法进行鉴别, 但在实践中, 我们经常遇到于每个种的标准描述均不尽相同的菌株, 用常规分类学方法就难以对这类非典型菌株作出精确的鉴定。细胞和分子生物学性状的应用, 则可以为我们解决这类疑难菌株的分类学问题提供帮助。研究表明, 反映染色体条数和每条染色体 DNA 分子大小的脉冲电泳核型分析技术, 可作为酿酒酵母及相关菌种分类的辅助手段。

最近几年脉冲电泳核型分析在分类学、遗传学等领域中的大量应用显示, 在酵母菌及其它丝状真菌中, 普遍存在种内染色体组成多态性^[3, 12]。本研究中也发现, 同一种内的不同菌株, 其核型存在不同程度的差异, 如在 *S. cerevisiae* 种内, 包括其模式菌株 AS 2.1882 在内的 5 株菌 (图 1: 2~6) 的染色体 DNA 带型相互间均有差异。产生种内染色体组成多态性的原因主要是影响染色体长度或数目的突变或畸变的发生, 如染色体的非整倍性、部分 DNA 片段的缺失、扩增、易位及不等长交换等^[13]。染色体组成多态性的存在虽然使脉冲电泳核型分析在种内菌株间遗传差异的显示上具有一定价值, 但却影响了其作为种间鉴别特征的直观性。因此, 该技术在分类学研究中的应用, 应以形态、生理生化等性状为基础。

致谢 本文所用模式和权威菌株由日本理化学研究所微生物系统保存施設(JCM)的 Takashi Nakase 博士提供,特致谢意。

参 考 文 献

- [1] Schwartz D C, Cantor C R. *Cell*, 1984, 37:67~75.
- [2] Carle G F, Olson M V. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82: 3756~3760.
- [3] Boekhout T, Renting M, Scheffers W A, et al. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1993, 63:157~163.
- [4] Dewar K, Bernier L, Levesque R C. Electrophoretic karyotyping in fungi. In Birren B, Lai E eds. *Nonmammalian Genomic Analysis: A Practical Guide*. San Diego: Academic Press, 1996. 25~60.
- [5] Vaughan-Martini A, Martini A, Cardinali G. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1993, 63:145~156.
- [6] Cardinali G, Martini A. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, 44: 791~797.
- [7] Naumov G I, Naumova E S, Korhola M. *Syst Appl Microbiol*, 1995, 18:103~108.
- [8] Vaughan-Martini A, Martini A. *Syst Appl Microbiol*, 1993, 16:113~119.
- [9] Van der Walt J P, Yarrow D. Methods for isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. In Kreger-van Rij N J W ed. *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 3rd ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B V, 1984. 45~104.
- [10] Vaughan-Martini A, Martini A. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1987, 53:77~84.
- [11] Vaughan-Martini A, Martini A. 44. *Saccharomyces* Meyen ex Reess. In Kurtzman C P, Fell J W ed. *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4th ed. Amsterdam: Elsevier Science B V, 1998. 358~371.
- [12] Walz M. Electrophoretic Karyotyping. In Kück U ed. *The Mycota II, Genetics and Biotechnology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1995. 61~73.
- [13] Iwaguchi S-I, Homma M, Tanaka K. *J Gen Microbiol*, 1990, 136:2433~2442.

RECLASSIFICATION OF SACCHAROMYCES STRAINS BY COMPARATIVE ELECTROPHORETIC KARYOTYPING

Bai Fengyan Jia Jianhua

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

Abstract: The strains of *Saccharomyces* Meyen ex Reess preserved in China General Microbiological Culture Collection Center (CGMCC) were recharacterized and reidentified according to recent taxonomic improvement of the genus. The strains AS 2.100 (originally classified in *S. cerevisiae*), AS 2.1158 (from former USSR and originally classified in *S. exiguus*) and AS 2.1555 (from Australia and originally classified in *S. uvarum*) were found to be different from the standard descriptions of the species concerned in some physiological properties. Comparative CHEF electrophoretic karyotype analysis showed that the chromosomal DNA banding pattern of AS 2.100 was similar to that of the type strain of *S. bayanus*, while the electrophoretic karyotypes of AS 2.1158 and AS 2.1555 were similar to those of the type and authentic strains of *S. cerevisiae*. Therefore, AS 2.100 was reidentified as *S. bayanus*, and AS 2.1158 and AS 2.1555 were reclassified in the species *S. cerevisiae*.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, Electrophoretic karyotype