

# 嗜杀酿酒酵母毒素蛋白及其杀伤质粒的研究

秦玉静<sup>1</sup> 高 东<sup>2</sup>

(山东大学微生物系 济南 250100)

**关键词:** 酿酒酵母, 毒素蛋白, 杀伤质粒

**中图分类号:** Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2000) 01-0105-07

某些酿酒酵母具有嗜杀活性,即能分泌产生蛋白质类毒素,从而杀死其它酵母菌株,但是自身具有免疫力<sup>[1]</sup>。由于酿酒酵母是常用工业生产菌株,而嗜杀酵母具有的独特嗜杀特性可以用于避免发酵体系中杂酵母的污染,净化发酵体系,因此在发酵工业上有着广泛的应用前景和重要意义。我们提取了嗜杀酿酒酵母产生的毒素蛋白及其遗传物质杀伤质粒,现报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)嗜杀菌株 SK 和敏感菌株 ERS 由本实验室保存。

### 1.2 培养基

以 YEPD 培养基作为酿酒酵母的丰富培养基,以 MM 培养基<sup>[2]</sup>作为酿酒酵母的基本培养基,用于毒素蛋白的提取。

### 1.3 毒素蛋白的提取

2L 含毒素蛋白的培养液 4℃ 超滤浓缩至 20mL, 12000 r/min 离心 15 min 去沉淀,上清液中加入 1/3 体积的 30% 聚乙二醇(PEG)6000,冰浴过夜,12000 r/min 离心 15 min,沉淀用 10% PEG6000 洗涤,最后将沉淀用 1mL 50 mmol/L 乙酸钠缓冲液(pH4.6)溶解。

### 1.4 毒素蛋白的活性分析<sup>[3]</sup>

敏感酵母与融化冷却至 50℃ 的 YEPD 培养基混匀后,倾注平板,凝固后,在培养基上打直径为 12 mm 的孔,孔内加入含有毒素蛋白的培养滤液,22℃ 培养 72 h,通过抑菌圈宽度,分析毒素蛋白的嗜杀活性。

### 1.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

采用 Laemmli 不连续缓冲系统<sup>[4]</sup>。浓缩胶浓度 15%,分离胶浓度 5%。

### 1.6 杀伤质粒的提取<sup>[5]</sup>

嗜杀酵母细胞在碱性条件(pH9.3)下,用  $\beta$ -巯基乙醇预处理后,直接用 SDS-苯酚抽提,上清液用乙醇沉淀,以 TE(pH8.0)溶解后待用。

1 现工作单位:中国科学院化学研究所

2 联系人

**作者简介:** 秦玉静(1971-),女,山东济南人,山东大学微生物系博士,中国科学院化学研究所博士后,主要从事微生物学研究

**收稿日期:** 1999-02-01, **修回日期:** 1999-04-08

2 结果

2.1 毒素蛋白的分离和纯化

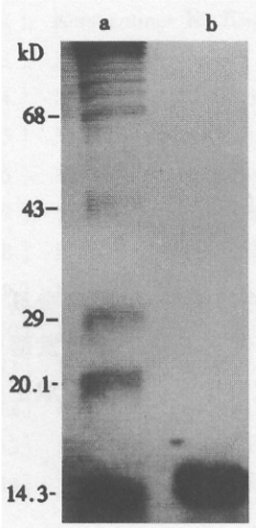


图1 嗜杀毒素蛋白的 SDS-PAGE 分析  
a. 蛋白分子量标准; b. 毒素蛋白.

由于嗜杀酵母中产生的毒素蛋白是一种分泌性蛋白,在发酵液中含量很低,须经大量培养才能保证毒素蛋白的得率,因此,选择 MM 培养基作为酵母菌生长培养基以避免提取中其它杂蛋白对毒素蛋白的干扰。嗜杀酵母 SK 的发酵液经超滤浓缩后,高速离心,用 10% 聚乙二醇 6000 沉淀,可以得到纯化的嗜杀毒素蛋白。毒素蛋白的纯化结果见表 1,用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测纯化的嗜杀毒素蛋白(图 1),表明 SK 菌产生的毒素蛋白的分子量大约为 15 000 道尔顿。

表 1 毒素蛋白的纯化

	原液	超滤浓缩	PEG 沉淀
总活性/(u/mL)	100	90	85
总蛋白/(g/L)	258	5.12	0.267
比活/(u/g)	0.39	17.58	318.4
提纯倍数	—	45	860

2.2 毒素蛋白的嗜杀作用

在敏感酵母菌的培养液中加入毒素蛋白会抑制敏感细胞的生长繁殖,SK 分泌产生的毒素蛋白对不同生长期的敏感酵母的作用见图 2。由实验结果可知,SK 产生的毒素蛋白对繁殖期敏感酵母的致死作用在敏感细胞的指数生长期最显著,当敏感酵母细胞进入稳定期后,对毒素蛋白的作用有抗性,

毒素蛋白的致死作用逐渐减弱。

2.3 嗜杀酵母的杀伤质粒

嗜杀酵母的嗜杀现象是由具有自我复制能力的细胞质因子—双链线状 RNA(dsRNA)决定的,由于这种通常由蛋白质外壳包裹着的 dsRNA 不具有体外感染能力,只能通过细胞质融合等方法在细胞之间传递,故将这种粒子称为杀伤质粒。嗜杀毒素蛋白的产生是由杀伤质粒负责编码产生的。对嗜杀酵母 SK 的杀伤质粒进行提取,琼脂糖凝胶电泳结果见图 3,分子量测定发现 SK 的杀伤质粒 M-dsRNA 约为 1.7kb, L-dsRNA 质粒为 4.0kb。

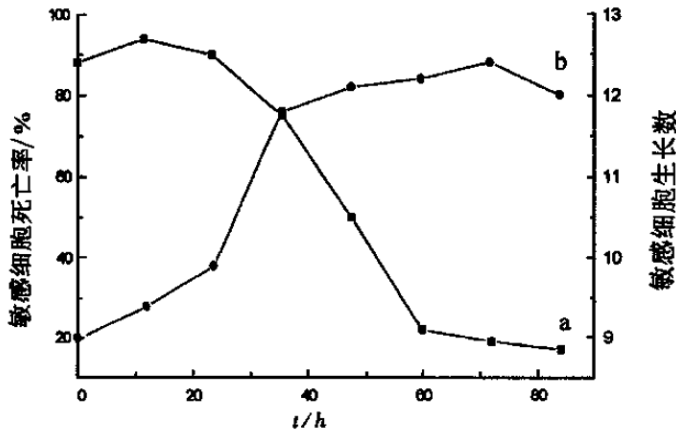


图2 毒素蛋白对敏感酵母的致死作用  
a. SK 毒素蛋白作用曲线; b. ERS 生长曲线.

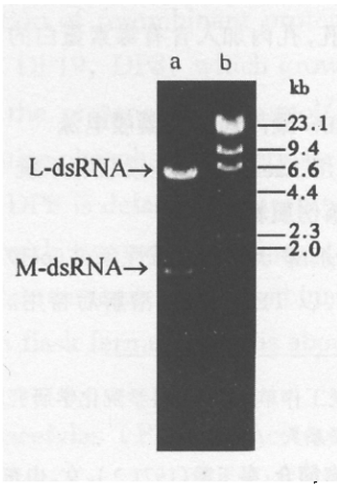


图3 琼脂糖凝胶电泳分析杀伤质粒  
a. SK 杀伤质粒; b. λDNA/HindⅢ.

### 3 讨论

一般认为<sup>[6]</sup>,嗜杀酿酒酵母产生的毒素蛋白对敏感菌株致死的作用原理是它能在敏感酵母细胞的细胞膜中产生离子透过空间,使  $K^+$ , ATP 等物质外泄,而使蛋白质,核酸等大分子物质在细胞内的合成停止,导致细胞的死亡,这一过程依赖能量。当敏感细胞进入稳定期后,代谢逐渐缓慢,能量产生较低,所以对毒素蛋白的敏感性降低。

酵母菌的嗜杀特性是由存在于细胞质中的遗传因子 M-dsRNA 质粒的遗传信息决定的,这可以通过质粒消除实验证实<sup>[7]</sup>,并且 M-dsRNA 质粒只能从嗜杀酵母细胞中检出,而敏感酵母及嗜杀现象消除菌株中均不存在 M-dsRNA 质粒,表明 M-dsRNA 质粒的存在是嗜杀酵母产生杀伤因子不可缺少的细胞质遗传物质。

### 参 考 文 献

- [1] Wickner R B. *Plasmid*, 1978, **2**:303~322.
- [2] Halvorson H O. *Biochem Biophys Acta*, 1958, **27**:267~276.
- [3] Russell I J. *Am Soc Brew Chem*, 1986, **44**:123~144.
- [4] Laemmli U K. *Nature*, 1970, **227**:680.
- [5] Fried M, Fink H. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 1978, **75**:4224~4228.
- [6] Bussey H, Meaden P. *Current Genetics*, 1985, **9**:285~291.
- [7] Radler F, Pfeiffer P. *Arch Microbiol*, 1984, **137**:357~361.

## RESEARCH OF TOXIN AND PLASMIDS OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Qin Yujing Gao Dong

(Department of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100)

**Abstract:** Killer toxin from *Saccharomyces cerevisiae* SK was isolated by ultrafiltration of culture supernatants and purified by poly(ethylene glycol). The toxin migrates as one single protein band on SDS-PAGE and its molecular weight is 15kD. The SK toxin has the greatest lethal effect on the sensitive yeast strain in the lat-lag phase. Extraction and purification of killer heretity factor(dsRNA) from SK found that M-dsRNA plasmid and L-dsRNA plasmid have different molecular lengths being 1.7kb and 4.0kb.

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae*, Toxin, Killer plasmid