

絮凝基因的克隆和在工业啤酒酵母菌株中表达*

郭文洁 何秀萍 铁翠娟 张博润**

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

张 沛 梁 刚 潘学启

(青岛啤酒集团公司科研中心 青岛 266101)

关键词: 啤酒酵母, 絮凝基因, 克隆和表达

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2002) 01-0110-04

在发酵工业中, 酵母菌细胞的絮凝能力是评价菌种优劣的一个重要指标。具有絮凝能力的细胞之间能够相互聚集形成絮凝颗粒并沉淀, 从而有利于与发酵液的分离, 可大大简化后处理工艺。近年来, 国外有关学者对酵母菌絮凝机理及其分子遗传学进行了较广泛的研究^[1-3], 国内相关研究较少^[4]。本文报道了絮凝基因的克隆及其在工业啤酒酵母菌中表达的研究结果。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

本实验所用菌株和质粒见表 1。

表 1 菌株和质粒

菌株或质粒	遗传型及性状	来源
<i>S. cerevisiae</i> FI.189	<i>a/α, FLO</i>	本组保存
<i>S. cerevisiae</i> YS58	<i>MATa flo⁺ ura3-52 leu2-3,112 his4-519 trp1-789</i>	Rebecca C 教授赠送
<i>S. cerevisiae</i> PJ208-5	<i>MATa flo</i>	本工作获得
<i>S. cerevisiae</i> PJ208-5-15	<i>MATa leu⁻ ura⁻ flo</i>	本工作获得
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44 Δlac U169 hsdR17 rec A1 endA1 gyrA96 thi-1 rel A1</i>	本组保存
YCp50	<i>amp^R tet^R URA</i>	本组保存
pCR-1	YCp50::FLO	本研究构建
pYY105	pBR322::FLO	Steensma H Y 教授赠送

1.2 培养基与培养条件

酵母菌及酵母转化子用 YEPD 培养基、麦芽汁培养基或 YNB 培养基[5], 28℃静置或振荡培养; 大肠杆菌及转化子用 LB 培养基[6], 37℃静置或振荡培养。

* 国家自然科学基金资助项目(39970010)

作者简介: 郭文洁(1974-), 女, 天津市人, 中国科学院微生物研究所微生物分子遗传与育种专业 98 级硕士生, 从事酵母菌分子遗传与育种学研究。

** 联系人

收稿日期: 2001-03-12, 修回日期: 2001-05-14

1.3 酶、抗生素及试剂

实验所用内切酶、抗生素为华美生物工程公司产品。所用化学试剂为分析纯。絮凝缓冲液为 0.1mol/L 柠檬酸钠缓冲液(pH4.0, 含 10mmol/LCaCl₂)。

1.4 酵母菌的诱变

参考文献[6]。

1.5 酵母菌絮凝能力的测定

参考文献[4]。

1.6 交配型和营养缺陷型的测定

参考文献[7]。

1.7 总 DNA 及质粒 DNA 的提取、Southern blot 杂交实验

参考文献[8]。

1.8 酵母转化方法

参考文献[8]。

2 结果和讨论

2.1 工业啤酒酵母受体菌的获得

参照文献[4]对本实验室保存的工业啤酒酵母菌株进行絮凝能力的测定,其中 *S. cerevisiae* PJ208-5 无絮凝能力。然后用甲基磺酸乙酯(EMS)进行诱变,通过营养缺陷型筛选,获得了一株带有亮氨酸和尿嘧啶缺陷的双突变菌株(编号为 PJ208-5-15),用该菌株作为絮凝基因表达的受体菌。

2.2 絮凝基因的克隆及其在工业啤酒酵母菌中的表达

2.2.1 絮凝基因在非絮凝啤酒酵母菌 YS58 中的克隆和表达:根据 Watari J 等人^[1]有关絮凝基因克隆及序列分析的报道,提取强絮凝能力的酵母菌 FL189 菌株的总 DNA,经 *Bam*HI 和 *Eco*RI 完全酶切,回收 4~6kb 左右的 DNA 片段,将其连接到经 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切的 YCp50 上,构建成重组质粒,转化感受态 *E. coli* DH5a,通过四环素抗性插入失活,在选择培养基上筛选得到约 8000 个重组转化子,构建了酵母菌 FL189 菌株的部分基因组文库。

由于 YCp50 是 *E. coli*-酵母菌穿梭载体并带有 *URA3* 基因,而实验室啤酒酵母菌株 YS58 无絮凝能力,又带有 *ura3* 营养缺陷标记,直接将所获得的含有 4~6kb 左右 NDA 插入片段的重组质粒转化 YS58,在选择培养基上筛选,获得了大量的酵母转化子,挑取转化子于 2mL 麦汁液体培养基中静置培养 48h 以后检测其絮凝能力,从约 2 万株转化子中得到了 20 个具有强絮凝能力的转化子。提取这些转化子的重组质粒,经酶切分析均带有一段约 4.3kb 的插入片断。用以 *Eco*RV 酶切质粒 pYY105^[9]所得的 2.6kb 片断(编码不完整的絮凝基因)为探针进行 Southern blot 杂交,结果表明 4.3kb 的插入片断与探针有很强的杂交信号,故初步认定该片断上带有絮凝基因。将所得重组质粒命名为 pCF1,所得的带有絮凝基因的阳性酵母转化子命名为 YS58 (pCF1)。

2.2.2 絮凝基因在工业啤酒酵母菌中的表达:用重组质粒 pCF1 转化带有亮氨酸和尿嘧啶缺陷、无絮凝能力的工业啤酒酵母菌株 PJ208-5-15,在 YNB + Leu 选择培养基上筛选转化子,获得了大量的转化子,通过转化子的絮凝能力测定,从中筛选出 6

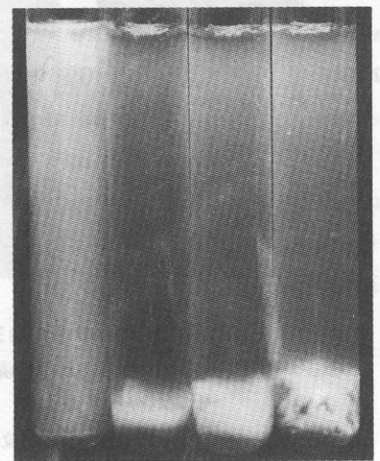


图 1 转化子絮凝能力的测定结果

A. PJ208-5-15; B. BL189;
C. PJ208-5-15-1(pCF1);
D. PJ208-5-15-2(pCF1)。

株具有强絮凝能力的转化子,命名为 PJ208-5-15-1(pCF1)~PJ208-5-15-6(pCF1)。

2.3 转化子的鉴定

2.3.1 转化子絮凝能力的测定:按文献[7],测定了转化子 PJ208-5-15-1(pCF1)及 PJ208-5-15-2(pCF1)的絮凝能力,结果如图 1 所示,受体菌 PJ208-5-15 无絮凝能力,而转化子均具有与絮凝基因供体菌 FL189 相似的絮凝能力。

2.3.2 转化子营养缺陷型的分析:由于受体菌 PJ208-5-15 为 *leu* 和 *ura* 缺陷,只能在添加了 *Leu* 和 *Ura* 的基本培养基上生长,在仅添加有 *Leu* 的基本培养基上不能生长。而转化子所含的重组质粒 pCF1 带有 *URA* 基因,互补了受体的 *ura* 缺陷,可以在添加有 *Leu* 的基本培养基上生长。营养缺陷互补测定的部分结果如图 2 所示:所有转化子都能在仅添加有 *Leu* 的基本培养基上生长,但受体菌不能生长。

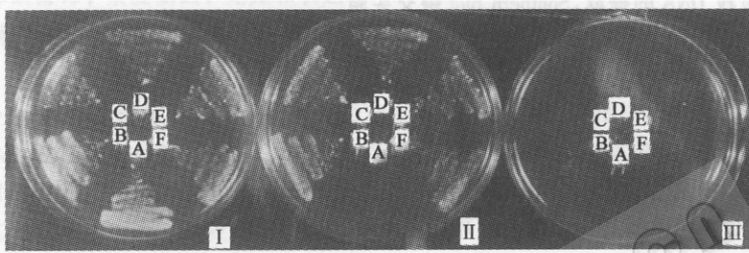


图 2 转化子的营养缺陷型的分析

I. YNB + URA; II. YNB + LEU; III. YNB + URA + LEU.

A. PJ208-5-15; B ~ F. 为转化子 PJ208-5-15-1(pCF1)~PJ208-5-15-5(pCF1)。

2.3.3 转化子的交配型的测定:由于使用的受体菌 PJ208-5-15 是 α 交配型,通过转化不可能使交配型发生改变,即所得转化子的交配型应与受体菌一致,因此对转化子进行了交配型的测定,结果表明所得转化子的交配型均与受体菌 PJ208-5-15 一致,均为 α 型。

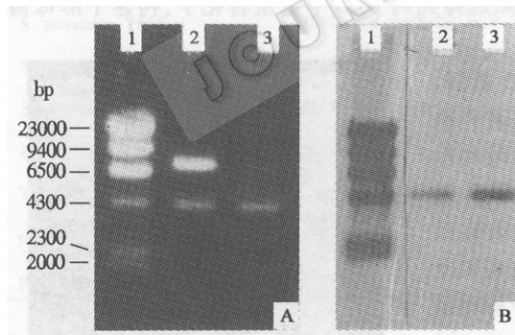


图 3 重组质粒的 Southern 杂交分析

A. 琼脂糖凝胶电泳; B. Southern 杂交。

1. λ DNA/*Hind* III;

2. 用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切重组质粒(pCF1);

3. 从重组质粒(pCF1)回收的约 4.3kbDNA 插入片断。

2.3.4 重组质粒的 Southern 杂交分析:从酵母转化子 PJ208-5-15-1(pCF1)~PJ208-5-15-6(pCF1)中提取质粒,电泳检测质粒大小相同,用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切重组质粒,电泳结果表明重组质粒的插入片段大小均约为 4.3kb。用以 *Eco*RV 酶切质粒 pYY105^[11] 所得的 2.6kb 片断(编码不完全的絮凝基因)为探针进行 Southern 杂交,结果表明重组质粒的 4.3kbDNA 插入片断与探针有很强的杂交信号(图 3)。

2.3.5 重组质粒 pCF1 在工业啤酒酵母转化子中的遗传稳定性分析:参照文献[10]测定了工业啤酒酵母转化子中的重组质粒 pCF1 的遗传稳定性,结果表明重组质粒 pCF1 在转化子中的稳定性较高,在非选择性条件下转接 30 次后仍有 90% 以上的转化子细胞保留有重组质粒,并且仍保持强的絮凝能力。

上述研究结果表明,通过随机克隆的方法克隆到了含有絮凝基因的 DNA 片段,并在实验室啤酒酵母菌株 YS58 和工业啤酒酵母菌株 PJ208-5-15 中获得表达。有关该基因的酶切图谱和 DNA 序列分析等研究正在进行之中。

参 考 文 献

- [1] Watari J, Takata Y, Ogawa M, *et al.* *Yeast*, 1994, **10**: 211 ~ 225.
- [2] Domingues L, Teixeira J A, Lima N. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **51**: 621 ~ 626.
- [3] Domingues L, Danras M M, Lima N, *et al.* *Biotechnol Bioen*, 1999, **64**(6): 692 ~ 697.
- [4] 张博润, 陈蔚, 铁翠娟, 等. 微生物学报, 1999, **39**(5): 67 ~ 72.
- [5] 贾盘兴, 蔡金科, 马德钦, 等. 微生物遗传学实验技术. 北京: 科学出版社, 1992.
- [6] 《微生物诱变育种》编写组. 微生物诱变育种. 北京: 科学出版社, 1973.
- [7] 张博润, 姜书勤, 徐婉学, 等. 生物工程学报, 1986, **2**(4): 29 ~ 34.
- [8] Adams A, Gottschling D E, Kaiser C A, *et al.* *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1997.
- [9] Teunissen A W R H, Berg J A V D, Steensma A H Y. *Yeast*, 1993, **9**: 1 ~ 10.
- [10] 霍克克, 虞兰兰, 陈新杰, 等. 中国科学(B辑), 1992, **9**: 922 ~ 929.

Cloning of Flocculent Gene and Expression in Industrial Yeast Strain *

Guo Wenjie He Xiuping Tie Cuijuan Zhang Borun * *

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

Zhang Pei Lian Gang Pan Xueqi

(The Research Center of Tsingtao Brewery Group Co. Ltd, Tsingtao 266101, China)

Abstract: The partial genomic library of *Saccharomyce cerevisiae* FL189 possessing strong flocculation ability was constructed using Yeast-*E. coli* shuttle plasmid YCp50 as vector. Recombinant plasmid containing flocculation gene was obtained by screening the growth of transformants on the selective medium and measurement flocculation, designated as pCF1. pCF1 was introduced into industrial yeast strain PJ208-5-15. Six transformants PJ208-5-15-1 (pCF1) ~ PJ208-5-15-6 (pCF1) possessing strong flocculation ability were obtained. The results of Southern blot and restriction endonuclease analysis showed that the insert is about 4.3kb and could hybridize with the probe (2.6kb *EcoRV* fragment of FLO1). Flocculation ability assay indicated that the transformants possess strong flocculation ability. Hence, the gene controlling flocculation phenotype exists in the cloned DNA fragment. The restriction endonuclease analysis and the sequence analysis of the insert DNA fragment are in progress.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, Flocculation gene, Cloning and expression

* Project of Chinese National Natural Science Fund(39970010)

** Corresponding author