

衔接重复序列对酵母菌絮凝蛋白功能的调控作用

李娥娥^{1,2}, 常琦^{1,2}, 郭雪娜¹, 何秀萍^{1*}, 张博润¹

¹中国科学院微生物研究所, 北京 100101

²中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要: 【目的】了解絮凝基因 *FLO1* 中重复 DNA 序列 B 和 D 对絮凝蛋白 Flo1p 功能的影响, 为构建遗传稳定的最小絮凝功能基因奠定理论基础。【方法】通过 PCR 和融合 PCR 方法分别克隆到完整的絮凝基因 *FLO1*、重复 DNA 序列 B 和 D 分别缺失的衍生基因 *FLO1b* 和 *FLO1d*, 分析这些基因在非絮凝酵母中表达对细胞絮凝特性的影响。【结果】与完整絮凝基因相比, 重复 DNA 序列 B 和 D 分别缺失后对酵母细胞絮凝强度没有明显影响, 但不同基因在酵母菌中表达产生的絮凝特性受环境因素, 如甘露糖浓度和 pH 等的影响有明显差异。 *FLO1* 中重复 DNA 序列 B 和 D 缺失后, 细胞絮凝特性受甘露糖抑制的敏感性降低; 同时对环境 pH 的改变具有更广泛的适应性。【结论】重复 DNA 序列 B 和 D 对絮凝蛋白 Flo1p 结构和功能具有调控作用, 二者缺失后, 特别是 D 缺失后会使絮凝蛋白在极端酸碱环境下更稳定。

关键词: 絮凝, 絮凝基因, 衔接重复序列, 缺失, 絮凝蛋白功能

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 01-0069-08

酵母菌絮凝是指酵母细胞之间相互聚集形成絮状或颗粒状细胞团, 并迅速沉降到发酵液底部的一种生理特性, 絮凝的发生是一种无性的、钙依赖的、可逆的过程^[1]。良好的絮凝特性有利于工业发酵过程中酵母细胞和发酵液的有效分离, 因此对简化生产工艺、降低生产成本、提高产品品质具有重要意义^[2-3]。另外, 近期研究发现, 利用酵母菌的絮凝特性可以有效去除工业废水中的 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Zn^{2+} 等重金属, 这使可絮凝的酵母菌应用于废水处理成为可能^[4-5]。

絮凝是由存在于细胞表面的絮凝蛋白选择性的与相邻细胞表面的甘露糖寡糖链之间相互作用引起的, 因此环境中游离的糖可能对酵母细胞絮凝产生竞争性抑制。Stratford 和 Assinder 依据对不同糖的

敏感性将絮凝分为两种类型: Flo1 型, 只被甘露糖抑制; NewFlo 型, 可被甘露糖、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖等抑制^[5-6]。细胞表面的絮凝蛋白由絮凝基因 (*FLO*) 编码, *FLO1* 是目前了解较多的絮凝基因, 它可以赋予酵母细胞典型的 Flo1 型絮凝。 *FLO1* 编码包含 1537 个氨基酸残基的絮凝蛋白 Flo1p, 其氨基端是疏水的信号序列, 主要参与配体 (糖分子或寡糖链) 的识别和相互作用, 是产生絮凝表型的主要功能域; 羧基端与 GPI 锚定蛋白有很高的同源性, 末端包括一个 GPI 锚钩, 把絮凝蛋白锚定在细胞壁上; 蛋白的中间区域是富含丝氨酸和苏氨酸的高度重复序列, 是发生 N-和 O-糖基化的主要区域, 高度重复序列使蛋白不断伸展、跨越细胞壁, 从而将蛋白的氨基端呈现在细胞表面, 而中间高度重复序列的糖基化使絮

基金项目: 国家自然科学基金 (30970087)

* 通信作者。Tel: +86-10-64807356; Fax: +86-10-64807427; E-mail: hexp@im.ac.cn

作者简介: 李娥娥 (1986-), 女, 山东德州人, 硕士研究生, 主要从事酵母菌分子遗传与育种研究。E-mail: liminlibei@126.com

收稿日期: 2011-10-24; 修回日期: 2011-11-25

凝蛋白形成更加扩展的空间构象^[1,7-8]。依据氨基酸序列特点,中间重复序列可划分为4个重复单元:重复单元A包含45个氨基酸残基,重复18次;重复单元B由20个氨基酸残基组成,重复2次;重复单元C由51个氨基酸残基组成,重复3次;重复单元D由9个氨基酸残基组成,重复3次。高度重复DNA序列是絮凝基因中非常活跃的成分,它们通过在DNA复制过程中驱动基因内部或基因之间的滑移和重组,导致不断产生新的FLO基因或假基因,结果一方面产生了絮凝表型的多样性,同时也存在着表型不稳定的严重问题。

不同的研究者分别从酵母菌中分离到大小不同的絮凝基因,序列分析比较发现,这些基因的差异主要在于基因内部重复DNA序列A拷贝数发生了改变,从而导致细胞絮凝能力^[7-10]、絮凝类型的变化^[11-12]、甚至使酵母细胞呈现黏附、生物膜等多种表型^[13-15]。可见中间重复序列对絮凝蛋白的结构和功能可能具有重要的调控作用。除重复单元A外,絮凝蛋白中间区域还有其他的重复单元,它们对絮凝蛋白功能的影响一直未见报道,本研究的目的就是探索重复单元B和D缺失对絮凝蛋白功能的影响,为构建遗传稳定的最小絮凝功能基因提供理论依据,为絮凝特性在发酵工业中的应用提供新的解决策略。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基:酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) YS59 (*MAT α FLO1 ura3 - 52 leu2 - 3, 112 his4 - 519 trp1 - 789*)作为FLO1基因的供体菌株,非絮凝酿酒酵母(*S. cerevisiae*) YS58 (*MAT α flo1 ura3 - 52 leu2 - 3, 112 his4 - 519 trp1 -*

789)作为絮凝基因表达的宿主,大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 用于质粒构建和保存。大肠杆菌-酵母菌穿梭载体YCp50 (*amp^r, ARS1, CEN4, URA3*)用于重组表达质粒构建。大肠杆菌保存和培养用LB培养基,筛选大肠杆菌转化子用含有50 μ g/mL氨苄青霉素的LB培养基^[16]。酵母菌保存和培养用YEPD培养基,酵母重组菌株筛选用含有色氨酸、亮氨酸和组氨酸的基本培养基SC^[17]。

1.1.2 工具酶和试剂:本实验所用DNA聚合酶为高保真DNA聚合酶KOD plus,购自TOYOBO公司;限制性内切酶和T₄DNA连接酶均购自TaKaRa;DNA胶回收试剂盒和PCR产物纯化试剂盒购自华大中生;酵母菌质粒提取试剂盒购自Bio-tek;DNA marker购自全式金公司;氨苄青霉素购自华北制药股份有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 DNA操作和序列分析

大肠杆菌感受态细胞制备、转化及质粒DNA的提取参照文献[16]进行。酵母菌基因组DNA提取及完整细胞转化参照文献[17]进行。使用OMEGA酵母质粒提取试剂盒(Bio-tek,美国)提取酵母菌质粒,通过紫外分光光度法(岛津UV-1800型分光光度计)对提取的质粒进行定量,按照文献[16]计算溶液中质粒的拷贝数:质粒拷贝数(copies/mL) = $(C \times 10^{-6} \times 6.02 \times 10^{23}) / MW$,其中C为质粒浓度,MW为质粒分子量。根据提取质粒所用酵母细胞的量计算出酵母细胞中质粒的拷贝数。引物合成由上海生工完成,序列测定由Invitrogen公司完成。序列分析采用DNAMAN软件(Lynnon Biosoft, Canada)。

1.3 完整FLO1基因的扩增及重复单元B、D缺失衍生基因的构建

根据GenBank中酵母菌完整FLO1基因核苷酸序列(X78160)分别设计和合成引物P1、P2、P3、P4、

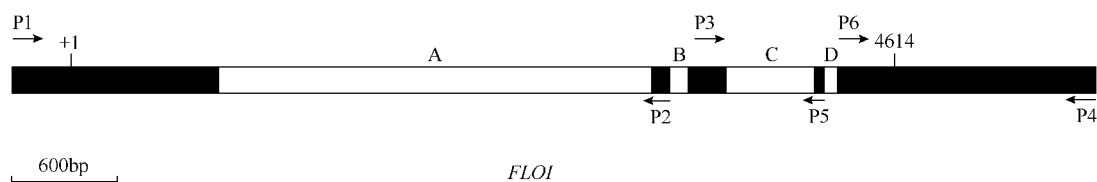


图1 FLO1基因结构物理图谱及本研究所用引物

Fig. 1 Structure of FLO1 and primers used in this study. Region from +1 to 4614 is its ORF; the A, B, C and D are four repeated regions according to the features of Flo1p got from SIB Bioinformatics Resource Portal: <http://expasy.org>. Sequence from P1 to P4 is the intact FLO1 gene. Primers P1, P2, P3 and P4 were used to construct FLO1b, Primers P1, P5, P6 and P4 were used to construct FLO1d.

P5 和 P6 (图 1), 各引物序列见表 1。以絮凝型酵母菌株 YS59 基因组 DNA 为模板, 以 P1 和 P4 为引物对, 进行 PCR 扩增。反应体系 50 μL : 100 ng 模板 DNA, 各 1.5 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 引物 P1 和 P4, 5 μL 10 \times PCR buffer, 2 μL 25 mmol/L MgSO_4 , 5 μL 2 mmol/L dNTPs, 2 μL 50% DMSO, 1 μL

KOD plus DNA 聚合酶, 加 ddH₂O 至总体积为 50 μL 。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ / 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ / 15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ / 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ / 7 min, 30 个循环; 68 $^{\circ}\text{C}$ / 10 min。通过上述反应获得大小为 6082 bp 的 PCR 产物, 包括 *FLO1* 的编码区和上下游调控序列。PCR 产物纯化后, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

表 1 PCR 扩增所用引物

Table 1 Primers used for DNA amplification

Primers	Primers sequence (5'→3')	Size /bp	Restriction site
P1	TTTGTCGACGGCTTCCAGTATGCTTTCAC	29	<i>Sal</i> I
P2	ATTTAGATGAAGAAGTTCATTGCTAGGAT	30	
P3	ATCCTAGCAATGGAACCTTCTCATCTAAATCATCCGTCAT	40	
P4	ACAAGCTTTACTACACTT CCTGGGAACG	29	<i>Hind</i> III
P5	TTTTCTCTCACCGGTAGCACTGTTTCATTT	30	
P6	AAATGAACAGTGCTACCGGTGAGACGAAAACAGTAGTCAC	40	

以纯化的 *FLO1* 为模板, 分别利用引物对 P1/P2 和 P3/P4 扩增得到 4031 bp 和 1961 bp 的 DNA 片段, 分别命名为 P1P2 和 P3P4。纯化后的 P1P2 和 P3P4 等摩尔混合, 以此为模板, 利用引物 P1 和 P4 进行融合 PCR, 得到 5962 bp 重复 DNA 序列 B 缺失的衍生基因 *FLO1b*。

以纯化的 *FLO1* 为模板, 分别利用引物对 P1/P5 和 P6/P4 扩增得到 4901 bp 和 1130 bp 的 DNA 片段, 分别命名为 P1P5 和 P6P4。以纯化后的 P1P5 和 P6P4 为模板, 利用引物 P1 和 P4 进行融合 PCR, 得到 6001 bp 重复 DNA 序列 D 缺失的衍生基因 *FLO1d*。

融合 PCR 反应体系 50 μL : 各 1.5 μL 的引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) P1 和 P4, 5 μL 10 \times PCR buffer, 2 μL 25 mmol/L MgSO_4 , 5 μL 2 mmol/L dNTPs, 等摩尔混合的模板共 100 ng, KOD plus DNA 聚合酶 1 μL , 加 ddH₂O 补足体积。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ / 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ / 15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ / 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ / 7 min, 30 个循环; 68 $^{\circ}\text{C}$ / 10 min。

1.4 表达质粒构建及酵母转化

分别用 *Sal*I 和 *Hind* III 双酶切获得的 *FLO1*、*FLO1b* 和 *FLO1d*, 经 PCR 纯化试剂盒纯化后, 与经同样酶切并纯化的载体 YCp50 进行连接, 连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 在含氨苄青霉素的 LB 平板上筛选转化菌株, 提取质粒, 进行酶切分析验证, 获得分别带有 *FLO1*、*FLO1b* 和 *FLO1d* 基因的重组表达质粒 pYCF1、pYCF1b 和 pYCF1d。重组质

粒通过醋酸锂完整细胞转化法^[17] 转化非絮凝酵母 YS58。

1.5 细胞表面絮凝蛋白检测

参照文献 [18] 方法, 略有改动, 利用异硫氰酸荧光素标记的抗生物素蛋白 (Avidin-FITC) 为探针, 对酵母细胞表面絮凝蛋白进行定量分析。酵母细胞在 2 mL YEPD 培养基中 30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床 (200 r/min) 培养 18 h, 按 1% (v/v) 接种量转接于 50 mL YEPD 中 30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 24 h; 离心收集细胞, 酵母细胞重新悬浮于 50 mmol/L 醋酸纳缓冲液中 (pH4.5), 使 OD_{600} 为 1.0, 依次加入终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的偶联有甘露糖分子的 Avidin-FITC (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 和终浓度为 6.8 mmol/L 的氯化钙, 充分混匀, 避光条件下 25 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min; 同时分别设不加氯化钙或不加 Avidin-FITC 的混合液为对照。测定细胞悬液的荧光强度, 3000 \times g 离心 3 min, 倒出上清液, 测定上清液荧光强度。通过离心前后荧光强度的变化水平定量酵母细胞表面絮凝蛋白。利用 BioTek Synergy HT 多功能酶标仪测定荧光强度, 其中激发光波长为 494 nm, 发射光波长为 520 nm。

1.6 絮凝能力测定

絮凝能力的常规测定参照文献 [19] 进行, 略有改动。酵母细胞在 2 mL YEPD 培养基中 30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床 (200 r/min) 培养 18 h, 按 1% (v/v) 接种量转接于 50 mL YEPD 中 30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 24 h; 离心收集菌体, 分别称取 0.1 g 湿菌体于 7 mL 离心管中, 并分别用 0.05 mol/L EDTA (pH8.0) 和无菌水洗 2 遍; 将菌

体悬浮在 5 mL 相应的缓冲液中,充分震荡混匀,30℃ 静置 30 min;吸取上层 3 mL 菌液测定 OD_{600} 。絮凝能力 (%) = (非絮凝缓冲液 OD_{600} - 絮凝缓冲液 OD_{600}) / 非絮凝缓冲液 OD_{600} × 100%。常规分析时,所用非絮凝缓冲液为 50 mmol/L 乙酸钠 (pH4.5),絮凝缓冲液为 50 mmol/L 乙酸钠 - 6.8 mmol/L 氯化钙 (pH4.5)。

测定不同糖对絮凝能力影响时,在缓冲液中分别加入终浓度为 0.5 mol/L 的葡萄糖、蔗糖、甘露糖、麦芽糖和半乳糖。

测定不同甘露糖浓度对絮凝能力影响时,在缓冲液中分别加入终浓度为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mol/L 的甘露糖。

测定 pH 对絮凝能力影响时,为了避免钙离子沉淀,使用不同的缓冲液, pH2.0 - 6.0 时使用 50 mmol/L 乙酸钠缓冲液; pH7.0 - 10 时使用 10 mmol/L Tris base 缓冲液。两种缓冲体系对菌株絮凝能力的影响没有差别。

测定不同钙离子浓度对絮凝能力影响时,絮凝缓冲液中钙离子浓度分别为:0.1、0.5、1.0、5.0、10 mmol/L。

2 结果和讨论

2.1 *FLO1* 及其衍生基因在酵母菌中表达

利用图 1 所示引物 P1 和 P4,通过 PCR 扩增从具有 Flo1 型絮凝表型的酿酒酵母 YS59 中克隆到 6082 bp 的 DNA 片段,它含有完整的 *FLO1* 编码序列 (Open Reading Frame, ORF) 和上下游调控序列。通过融合 PCR 方法,以完整 *FLO1* 为模板构建了重复 DNA 序列 B 和 D 分别缺失的衍生基因 *FLO1b* (5962 bp) 和 *FLO1d* (6001 bp)。序列分析结果表明,与完整 *FLO1* 基因相比,*FLO1b* 和 *FLO1d* 分别缺失了重复 DNA 序列 B 和 D 区域 (图 2)。将带有完整 *FLO1* 基因及其衍生基因 *FLO1b* 和 *FLO1d* 的重组质粒 pYCF1、pYCF1b、pYCF1d 和空载体 YCp50 分别转化到非絮凝型酿酒酵母 YS58 中,利用尿嘧啶营养缺陷互补,在含有亮氨酸、组氨酸和色氨酸的酵母菌基本培养基 SC 上筛选转化菌株,通过酵母质粒提取及 PCR 分析对转化菌株进行验证,分别命名为 YSF1、YSF1b、YSF1d 和 YSp50。对酵母细胞内质粒拷贝数分析表明上述菌株每个细胞的质粒拷贝



图 2 完整絮凝基因 *FLO1* 与衍生基因 *FLO1b* 和 *FLO1d* 的序列分析比较

Fig. 2 Alignment between *FLO1b* and *FLO1*, *FLO1d* and *FLO1*. Only the repeated regions and part of their adjacent sequences were presented. A is the sequence alignment between *FLO1b* and *FLO1*, and B is the sequence alignment between *FLO1d* and *FLO1*.

数均为 2,符合 YCp 型质粒特点^[17]。

按常规方法分析不同酵母菌株的絮凝能力,结果发现宿主菌 YS58 和空载体转化菌株 YSp50 均没有表现出絮凝特性;酵母菌 YS59 和转化菌株 YSF1、YSF1b、YSF1d 都表现出很强的絮凝能力,说明不同

的絮凝基因在酵母细胞中得到了功能性表达,其中由于基因拷贝数的增加转化菌株的絮凝能力约为菌株 YS59 的二倍 (图 3)。YSF1b 和 YSF1d 具有与 YSF1 基本相同的絮凝能力,说明重复单元 B 和 D 的缺失对絮凝蛋白与邻近细胞表面寡聚甘露糖链之

间相互作用强度没有明显影响。利用生物信息学对絮凝蛋白 Flo1p 的二级结构进行分析预测, 发现除了在氨基端和羧基端可以形成少量 α -螺旋 (α -helix) 外, 其中间部分可能主要是 β 折叠片 (β -sheet) 和不规则卷曲 (coil), 构成 Flo1p 棒状的跨壁结构^[20]。重复单元 B 和 D 是中间部分靠近羧基端的区域, 它们的缺失在正常条件下可能没有导致氨基端絮凝结构域构象的明显变化。Veelders 等利用 Flo5p 的氨基端与其他絮凝基因的中间区和羧基端构成不同的嵌合蛋白, 结果表明不同嵌合蛋白表达使酵母细胞产生的絮凝能力基本相同^[21]。

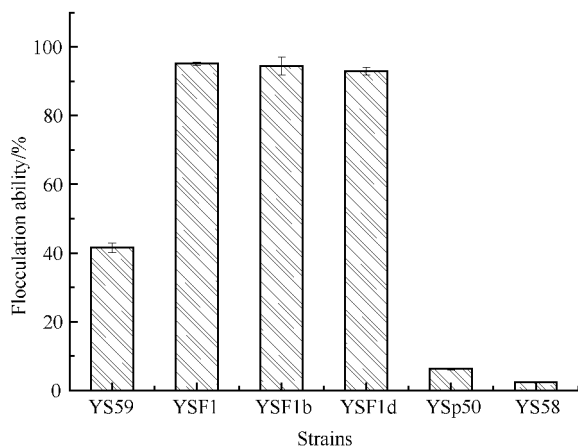


图3 YS59、YS58 及各转化菌株的絮凝能力比较

Fig. 3 Flocculation ability of YS59, YS58 and the transformed strains. Flocculation was determined using the method as described in Materials and Methods. Values reflect the mean of three repeat experiments, and the error bars represent standard deviations.

表2 不同酵母菌株细胞表面荧光强度

Table 2 Fluorescence intensity displayed on yeast cell surface

Strains	YSp50	YS59	YSF1	YSF1b	YSF1d
FI/OD ₆₀₀	27 ± 5	302 ± 17	520 ± 11	532 ± 4	519 ± 7

FI means fluorescence intensity. Results are represented as average and standard deviation of data from three independent experiments.

2.2 环境因素对不同絮凝蛋白功能的影响

2.2.1 不同糖对酵母菌株絮凝能力的影响: 在含和不含 CaCl₂ 的 50 mmol/L 乙酸钠 (pH4.5) 缓冲液中, 分别添加 0.5 mol/L 不同的糖, 测定游离糖分子对絮凝蛋白功能的抑制作用。结果发现, 不同絮凝基因表达菌株的絮凝能力只受到甘露糖不同程度的抑制, 而其他游离糖分子对酵母细胞的絮凝能力几乎没有影响 (图 4-A)。说明重复单元 B 和 D 的缺失没有改变絮凝蛋白与糖分子之间相互识别的特异性。但不同基因表达产生的絮凝特性受甘露糖抑制

的程度有明显差异, 在 0.5 mol/L 甘露糖存在下, 表达 FLO1 基因的酵母菌株 YSF1 细胞絮凝能力降低了 42.1%、表达 FLO1b 基因的酵母菌株 YSF1b 细胞絮凝能力降低了 40.4%、表达 FLO1d 基因的酵母菌株 YSF1d 细胞絮凝能力降低了 18.4%; 当缓冲液中甘露糖浓度提高到 1.0 mol/L, 菌株 YSF1 的絮凝能力降低到 20.1%, 而菌株 YSF1b 和 YSF1d 的絮凝能力分别保持在 32.2% 和 64.7% (图 4-B)。利用 Avidin-FITC 对酵母细胞表面絮凝蛋白进行定量分析, 发现不同酵母菌株细胞表面结合的荧光染料量没有明显差异, 说明各菌株絮凝蛋白的表达水平基本一致 (表 2)。上述结果表明, 与完整絮凝蛋白 Flo1p 相比, 重复单元 B 缺失后絮凝蛋白功能受甘露糖分子抑制的程度没有明显变化, 但重复单元 D 缺失的絮凝蛋白 Flo1dp 功能受游离甘露糖分子抑制的程度则明显降低。对 Flo5p 氨基端结构分析发现絮凝蛋白与游离甘露糖分子结合后, 使其空间构象发生改变, 从而不能与相邻细胞表面的寡聚甘露糖链结合^[21]。重复单元 D 缺失后, 蛋白空间构象的

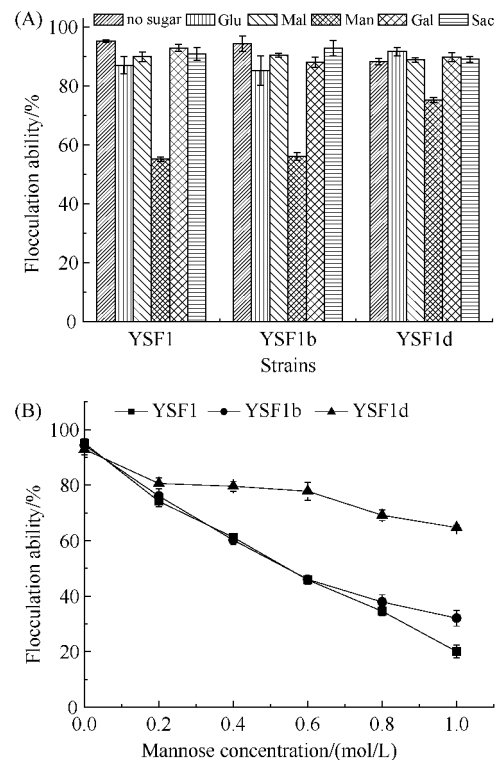


图4 游离糖分子对不同菌株絮凝能力的影响

Fig. 4 Inhibition of flocculation by sugar. The concentration of sugar in A is 0.5 mol/L. Values reflect the mean of three repeat experiments, and the error bars represent standard deviations.

刚性可能增强,游离甘露糖分子结合后对空间构象的影响减小,从而使絮凝蛋白在较高浓度游离甘露糖存在下,仍然能够与相邻细胞表面的寡聚甘露糖链相互作用,产生絮凝。

2.2.2 pH 对絮凝能力的影响:对不同环境 pH 条件下各酵母菌株絮凝能力进行分析比较,发现各菌株均在 pH4.5 时表现出最强的絮凝能力。菌株 YSF1 在 pH 为 3.0–5.0 之间表现出很高的絮凝能力;但在上述 pH 范围之外,细胞絮凝能力迅速降低, pH2.0 和 pH7.0 时细胞絮凝能力分别只有 31.7% 和 29.7%;在 pH 为 10 的碱性环境下,细胞完全失去絮凝能力。絮凝蛋白中重复序列单元 B、D 缺失的酵母菌株 YSF1b 和 YSF1d 的絮凝特性对环境酸碱度变化具有更好的适应性和稳定性,在偏酸或偏碱性环境中均表现出明显优于菌株 YSF1 的絮凝特性(图 5)。尤其菌株 YSF1d 所表现出的优势更加明显,在整个检测的 pH 范围内均表现出明显的絮凝特性, pH2.0 和 pH10.0 条件下细胞絮凝能力仍保持在 50% 以上。环境酸碱度的改变可以通过调控絮凝基因的表达或改变细胞表面絮凝蛋白静电荷状态而影响细胞絮凝能力,絮凝蛋白表面静电荷发生改变导致蛋白空间构象发生变化,甚至使蛋白失去活性^[2]。上述结果表明,与完整絮凝蛋白 Flo1p 相比,重复单元缺失,特别是重复单元 D 缺失有利于提高絮凝蛋白在酸碱环境中的结构和功能稳定性。

2.2.3 钙离子对絮凝的影响:酵母菌株 YSF1、

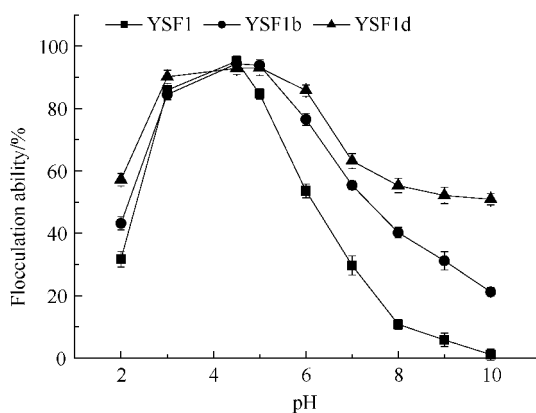


图 5 pH 对菌株絮凝能力的影响

Fig. 5 Effect of pH on flocculation of YSF1, YSF1b and YSF1d. Flocculation was determined using the method as described in Materials and Methods. Each point represents the mean of experiments performed in triplicate, and error bars represent standard deviation.

YSF1b 和 YSF1d 均表现出钙离子依赖型絮凝。钙离子浓度为 0.1 mmol/L 时酵母细胞即表现出比较强的絮凝,钙离子浓度提高到 1 mmol/L 时,细胞絮凝能力迅速提高,进一步提高缓冲液中钙离子浓度,细胞絮凝能力没有明显改变(图 6)。尽管不同菌株在相同钙离子浓度条件下的絮凝能力有一些差异,但不同菌株絮凝能力随钙离子浓度变化趋势是基本一致的。钙离子参与酵母菌絮凝过程,一方面发挥着结构稳定剂的作用,通过与絮凝蛋白中间结构域的结合维持蛋白空间构象的稳定性;另一方面钙离子直接参与寡聚甘露糖链与絮凝蛋白的结合^[2,21]。上述结果表明重复单元 B 或 D 缺失对絮凝蛋白的钙离子结合位点及与钙离子亲和力没有明显的影响,这与本实验室前期对 *FLONS* 基因功能的研究结果一致^[12]。

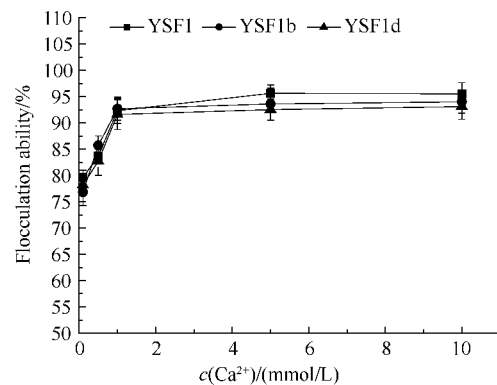


图 6 钙离子浓度对各菌株絮凝能力的影响

Fig. 6 Effect of calcium on flocculation of YSF1, YSF1b and YSF1d. Flocculation was determined using the method as described in Materials and Methods. Each point represents the mean of experiments performed in triplicate, and error bars represent standard deviation.

3 结论

本研究通过构建和表达重复 DNA 序列 B、D 分别缺失的絮凝衍生基因,比较分析了重复 DNA 序列对絮凝蛋白功能及稳定性的影响。结果表明絮凝蛋白中重复单元 B 或 D 缺失对酵母菌株絮凝水平、絮凝类型(对不同糖的敏感性)、以及絮凝的钙离子依赖性均没有明显影响,但重复单元 B 或 D 的缺失有利于提高絮凝蛋白在酸碱环境中和高甘露糖浓度下的功能稳定性,从而使相应酵母菌株在一些极端环境下仍然具有较高的絮凝能力,其中重复单元 D 缺

失的絮凝蛋白具有更高的功能稳定性。这种功能的稳定性对扩大酵母菌絮凝特性的应用范围具有重要意义。

絮凝基因 *FLO1* 中重复单元 A 完全缺失使酵母细胞失去絮凝能力, 而重复单元 A 中的重复序列发生部分缺失影响的是酵母细胞絮凝能力的强弱, 缺失的序列越长, 细胞的絮凝能力越弱; 而对絮凝的其他特性没有明显影响。这可能是由于重复单元 A 编码的区域靠近絮凝蛋白的氨基端, 主要影响絮凝蛋白空间结构的延伸性^[1,7-8], 它们不同程度的缺失使絮凝蛋白不能很好地展示在细胞表面, 从而影响与相邻细胞表面甘露糖链的相互作用及强度。而重复单元 D 编码的区域靠近絮凝蛋白的羧基端, 主要影响絮凝蛋白的结构稳定性。

重复 DNA 序列是基因组中非常活跃的因素, 基因内重复序列之间重组或滑移是造成絮凝特性遗传稳定性低的主要原因, 本研究将为构建遗传稳定的最小絮凝功能基因奠定理论基础。絮凝基因除重复单元 A、B、D 外, 还有重复单元 C, 这部分序列对絮凝蛋白功能有何调控作用还需进一步分析研究。蛋白质功能稳定的结构基础是空间构象的稳定, 重复单元缺失对絮凝蛋白的结构产生了怎样的影响, 特别是在极端条件下, 重复单元缺失的絮凝蛋白与完整絮凝蛋白 Flo1p 在空间构象上的变化有何不同, 还需要进一步借助结构生物学的相关研究揭示其详细机制, 为将来更好的控制和利用絮凝特性提供理论依据和新的解决策略。

参考文献

- [1] Bony M, Thines-Sempoux D, Barre P, Blondin B. Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* protein Flo1p. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179 (15) : 4929-4936.
- [2] Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Verachtert H, Delvaux FR. Yeast flocculation: what brewers should know. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 61 (3) : 197-205.
- [3] Ma K, Wakisaka M, Sakai K, Shirai Y. Flocculation characteristics of an isolated mutant flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain and its application for fuel ethanol production from kitchen refuse. *Bioresource Technology*, 2009, 100 (7) : 2289-2292.
- [4] Machado MD, Santos MS, Gouveia C, Soares HM, Soares EV. Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: the flocculation as a separation process. *Bioresource Technology*, 2008, 99 (7) : 2107-2115.
- [5] Bauer FF, Govender P, Bester MC. Yeast flocculation and its biotechnological relevance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 88 (1) : 31-39.
- [6] Stratford M, Assinder S. Yeast flocculation: Flo1 and NewFlo phenotypes and receptor structure. *Yeast*, 1991, 7 (6) : 559-574.
- [7] Watari J, Takata Y, Ogawa M, Sahara H, Koshino S, Onnela ML, Airaksinen U, Jaatinen R, Penttilä M, Keränen S. Molecular cloning and analysis of the yeast flocculation gene *FLO1*. *Yeast*, 1994, 10 (2) : 211-225.
- [8] Verstrepen KJ, Jansen A, Lewitter F, Fink GR. Intragenic tandem repeats generate functional variability. *Nature Genetics*, 2005, 37 (9) : 986-990.
- [9] 郭文洁, 何秀萍, 铁翠娟, 张博润. 絮凝基因的克隆和在工业酵母菌中的表达. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2002, 42 (1) : 110-113.
- [10] 何秀萍, 郭文洁, 张博润. 絮凝基因 (*FLO1G*) 的序列测定及分析. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2002, 42 (2) : 242-245.
- [11] Liu N, Wang DL, Wang ZY, He XP, Zhang BR. Deletion of Tandem repeats causes flocculation phenotype conversion from Flo- to NewFlo-type in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2009, 169 (1) : 137-145.
- [12] Liu N, Wang DL, Wang ZY, He XP, Zhang BR. Genetic basis of flocculation phenotype conversion in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 2007, 7 (8) : 1362-1370.
- [13] Verstrepen KJ, Klis FM. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular Microbiology*, 2006, 60 (1) : 5-15.
- [14] Smukalla S, Caldara M, Pochet N, Beauvais A, Guadagnini S, Yan C, Vincens MD, Jansen A, Prevost MC, Latgé JP, Fink GR, Foster KR, Verstrepen KJ. *FLO1* is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. *Cell*, 2008, 135 (4) : 726-737.
- [15] Beauvais A, Loussert C, Prevost MC, Verstrepen KJ, Latgé JP. Characterization of a biofilm-like extracellular matrix in *FLO1*-expressing *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEMS Yeast Research*, 2009, 9 (3) : 411-419.

- [16] Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [17] Adams A, Gottschling DE, Kaiser CA, Stearns T. *Methods in Yeast Genetics, A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
- [18] Patelakis SJJ, Ritcey LL, Speers RA. Density of lectin-like receptors in the *FLO1* phenotype of *Saccharomyces cerevisiae*. *Letters in Applied Microbiology*, 1998, 26 (4) :279-282.
- [19] Kobayashi O, Hayashi N, Kuroki R, Sone H. Region of Flo1 protein responsible for sugar recognition. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180 (24) :6503-6510.
- [20] Goossens K, Willaert R. Flocculation protein structure and cell - cell adhesion mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 2010, 32 (11) :1571-1585.
- [21] Veelders M, Brückner S, Ott D, Unverzagt C, Mösch HU, Essen LO. Structural basis of flocculin-mediated social behavior in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107 (52) :22511-22516.

Regulation of tandem repeats on the function of flocculation protein in *Saccharomyces cerevisiae*

Ee Li^{1,2}, Qi Chang^{1,2}, Xuena Guo¹, Xiuping He^{1*}, Borun Zhang¹

¹ Laboratory of Yeast Molecular Genetics and Breeding, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

² Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Objective] There are a large numbers of tandem repeats in *FLO1*, which are highly dynamic components in genome leading to the unstable flocculation profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. The effects of repeated unite B or D deletion on the function of flocculation protein was studied to provide theory basis for constructing genetically stable flocculation gene with minimal size. [Methods] We cloned the intact flocculation gene *FLO1* from *S. cerevisiae* YS59 by PCR, and constructed the derived genes *FLO1b* and *FLO1d* with repeated unite B or D deletion respectively by fusion PCR. We analyzed the physiological characteristics of flocculation in yeast strains YSF1, YSF1b and YSF1d containing *FLO1*, *FLO1b* and *FLO1d* respectively. [Results] YSF1b and YSF1d displayed almost the same level of Flo1-type flocculation as YSF1. However, flocculation of YSF1b and YSF1d, especially YSF1d was more tolerant to pH change and mannose concentration than strain YSF1. [Conclusion] Tandem repeats regulate the function of flocculation protein. Deletion of repeated unite B or D, especially D increases the stability of flocculation protein.

Keywords: flocculation, *FLO1*, tandem repeats, deletion, flocculation ability

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30970087)

* Corresponding author. Tel: +86-10-64807356; Fax: +86-10-64807427; E-mail: hexp@im.ac.cn

Received: 24 October 2011/Revised: 25 November 2011