

FLO1 基因内重复序列对酿酒酵母絮凝能力及稳定性的影响

常琦^{1,2}, 岳峰^{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 A 对酵母菌絮凝能力及其遗传稳定性的影响, 为构建遗传性能稳定、工业应用前景优良的最小絮凝功能基因奠定理论基础。【方法】通过融合 PCR 方法构建了 *FLO1* 中全部重复 DNA 序列 A 发生缺失的衍生基因 *FLO1a*, 以含有 *FLO1* 基因的大肠杆菌为筛选模型, 通过连续传代培养及质粒快速分析获得 *FLO1* 内重复 DNA 序列 A 不同程度、不同位点缺失的系列衍生基因 *FLO1a1-FLO1a5*。完整 *FLO1* 基因和上述衍生基因转化非絮凝型酵母 YS58, 得到重组菌株 YSF1、YSF1a 及 YSF1a1-YSF1a5, 分析了上述不同酵母菌株絮凝特性及其遗传稳定性。【结果】絮凝基因 *FLO1* 中重复 DNA 序列 A 完全缺失使酵母细胞完全失去絮凝能力, 部分重复 DNA 序列 A 发生缺失导致絮凝能力降低, 絮凝基因中重复 DNA 序列 A 的个数与细胞絮凝能力成正相关, 但不是简单的比例关系。其中衍生基因 *FLO1a3* 含有的重复 DNA 序列 A 是 *FLO1* 基因的 33.3%, 但菌株 YSF1a3 的絮凝能力可达 YSF1 絮凝能力的 71.4%。而且菌株 YSF1a3 的絮凝特性比菌株 YSF1 的絮凝特性具有更好的环境适应性和遗传稳定性。【结论】重复 DNA 序列 A 是絮凝基因中非常活跃的序列, 是导致絮凝特性遗传不稳定的关键因素, 该序列的部分缺失不但可以使酵母细胞呈现适度的絮凝能力, 而且使絮凝特性具有更好的环境适应性和遗传稳定性。该研究为通过对絮凝基因内衔接重复序列的合理调控, 促进酵母絮凝特性在发酵工业及其他生物化工过程和环境修复中的广泛应用提供了重要的理论依据和解决策略。

关键词: 酵母菌, 絮凝基因, 重复序列, 絮凝特性, 稳定性

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 11-1360-09

大量重复序列存在于酵母菌基因组中, 在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 基因组中的 6591 个 ORF 中, 有 44 个存在基因内重复序列, 它们多数编码的是细胞表面蛋白^[1]。FLO 家族基因 (*FLO1*、*FLO5*、*FLO9*、*FLO10*、*FLO11*) 是酵母菌基因组中典型的含基因内重复序列的基因, 它们编码的细胞表面糖蛋白通过和其他细胞表面的寡聚甘露糖链之间

相互作用, 使酵母细胞之间相互聚集形成絮状物, 即产生絮凝表型或类似生物膜的结构^[2-3]。Flo 蛋白家族具有共同的结构域, 即氨基端、羧基端和中间重复序列区域。氨基端由疏水的信号序列组成, 它作为粘附表型特异性的主要功能区, 主要参与配体 (糖分子或糖链) 的识别和相互作用; 而羧基端的信号序列在加工过程中被 GPI 锚钩替换, 最终锚定在

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: 常琦 (1987-), 女, 山西临汾人, 硕士研究生, 主要从事酵母菌分子遗传与育种研究。E-mail: changqi1987@163.com

收稿日期: 2012-05-04; 修回日期: 2012-05-24

细胞壁上^[4-5]; Flo 蛋白家族的中间区是富含丝氨酸和苏氨酸的高度重复序列,也是发生 O-和 N-糖基化的主要部位^[6]。中间高度重复序列使蛋白不断伸展成杆状结构跨越细胞壁,从而将其氨基端呈现在细胞表面^[7],可见中间重复序列对 Flo 蛋白的空间构象具有重要的调控作用,中间重复序列的长短及特定氨基酸残基的改变可能会影响到蛋白的空间构象及其稳定性,进而导致蛋白功能和细胞表型的改变。

位于染色体 I 右臂上的 *FLO1* 基因决定了酵母细胞的 Flo1 型絮凝^[8]。Watari 等报道了完整的 *FLO1* 基因序列,它含有一个 4614 bp 的 ORF,中间部分包含大量的衔接重复序列,根据其序列特征及编码氨基酸的相似性可以分为四个重复 DNA 序列家族,即 135 bp 的重复 DNA 序列 A 重复 18 次、60 bp 的重复 DNA 序列 B 重复 2 次、153 bp 的重复 DNA 序列 C 重复 3 次和 27 bp 的重复 DNA 序列 D 重复 3 次^[9]。Verstrepen 等对 *FLO1* 基因内重复序列和细胞絮凝表型之间的关系进行了研究,他们通过基于 *URA3* 基因插入和敲除的 5-氟乳清酸抗性筛选模型获得基因内部重复序列拷贝数发生改变的大小在 2.9 - 5.4 kb 的 *FLO1* 的衍生基因,对这些基因的表达分析证实重复序列的拷贝数与细胞之间相互聚集产生絮凝的能力成正相关,基因内重复序列越长,细胞所表现的絮凝能力越强^[1]。郭文洁、Liu Nan 等从不同酿酒酵母菌株中分别克隆到絮凝基因 *FLO1G*、*FLONS*、*FLONL*。序列分析结果表明,它们与完整絮凝基因 *FLO1* 的区别主要在重复 DNA 序列 A 的数量上,*FLO1G* 是 *FLO1* 基因中 5 个重复 DNA 序列 A 缺失的衍生基因,这种缺失没有改变絮凝蛋白对糖识别和作用的特异性,使酵母细胞产生 Flo1 型絮凝^[10-11]; *FLONS* 和 *FLONL* 与 *FLO1* 基因相比除重复 DNA 序列 A 缺失外,还发生了重复序列的部分插入或 3 端部分编码序列的缺失,结果使酵母细胞产生的絮凝表型受多种糖(甘露糖、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、半乳糖)的抑制,是典型的新絮凝(NewFlo-type)表型^[12-13]。可见 *FLO1* 基因内部高度重复序列不仅可以改变酵母细胞的絮凝能力,还可以改变絮凝蛋白与不同糖相互作用的特异性。

在 DNA 复制过程中,重复序列驱动基因内或基因间发生滑移和重组,产生了絮凝表型的多样性^[7],但由此也引起了絮凝特性遗传不稳定的严重

问题,极大的限制了絮凝特性在发酵工业及环境修复中的应用^[2,14]。在 *FLO1* 的编码序列中重复 DNA 序列 A 有 2430 bp,占基因内重复序列的 78.6%,重复 DNA 序列 A 存在的数量对于絮凝特性的遗传稳定性可能有重要影响,但目前还未见相关报道。本研究通过分析含有不同重复 DNA 序列 A 的絮凝基因对絮凝蛋白功能及絮凝特性遗传稳定性的影响,将为构建遗传稳定的、具有良好工业应用潜力的最小絮凝功能基因奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基: 非絮凝酿酒酵母 (*Saccharomyces 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。质粒 pYCF1 含有完整 *FLO1* 基因(本研究组保存)^[15],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]。酵母菌培养和保存用 YEPD 培养基,酵母菌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 T₄ DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;DNA 胶回收试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒购自华大中生公司;酵母菌质粒提取试剂盒购自 Bio-tek 公司;荧光定量 RT-PCR 试剂盒购自天根生化科技公司;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、完整细胞转化、以及热酚法提取酵母总 RNA 参照文献 [17] 进行。通过甲醛变性胶电泳及紫外分光光度法检测 RNA 的纯度和浓度。以酵母菌 *ACT1* 基因为对照,利用 Quant 一步法荧光定量 RT-PCR 试剂盒(天根生化),采用 SYBR Green 方法对不同酵母菌中絮凝基因表达水平进行相对定量,反

应条件如下: 50°C 30 min 进行反转录反应; 95°C 2 min 进行预变性; 94°C 20 s, 55°C 20 s, 68°C 30 s, 40 个循环。使用 OMEGA 酵母质粒提取试剂盒 (Bio-tek, 美国) 提取酵母菌质粒, 参照文献 [15] 方法测定酵母细胞中质粒拷贝数。引物合成、序列测定由 Invitrogen 公司完成。序列分析比较采用 Vector NTI 9. 1. 0 软件 (Invitrogen Corporation)。

1.3 *FLO1* 基因重复 DNA 序列 A 的完全缺失或不同程度、不同位点的缺失

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), 各引物序列见表 1, 其中引物 P2 和 P3 之间有 30 bp 的互补序列。以质粒 pYCF1 为模板, 利用引物对 P1/P2 和 P3/P4 分别进行 PCR 扩增。反应体系: 100 ng 模板 DNA, 各 1.5 μ L 10 μ mol/L 引物, 5 μ L 2 mmol/L dNTPs, 5 μ L 10 \times PCR buffer, 2 μ L 25 mmol/L MgSO₄, 2 μ L 50% DMSO, 1 μ L KOD plus DNA 聚合酶, 加 ddH₂O 至 50 μ L 总体系。PCR 反应条件: 94°C 5 min; 94°C 15 s, 55°C 30 s, 68°C 3 min, 30 个循环; 68°C 10 min。PCR 扩增得到 1511 bp 和

2171 bp 的 DNA 片段, 分别命名为 P1P2 和 P3P4。P1P2 和 P3P4 纯化后等摩尔比混合作为模板, 利用引物 P1/P4 进行融合 PCR, 得到 3652 bp 融合 PCR 产物, 命名为 *FLO1a*。融合 PCR 反应体系: 等摩尔比混合的模板共 100 ng, 各 1.5 μ L 的引物 (10 μ mol/L) P1/P4, 5 μ L 2 mmol/L dNTPs, 5 μ L 10 \times PCR buffer, 2 μ L 25 mmol/L MgSO₄, KOD plus DNA 聚合酶 1 μ L, 加 ddH₂O 至 50 μ L 总体系。融合 PCR 反应条件: 94°C 5 min; 94°C 15 s, 55°C 30 s, 68°C 4 min, 30 个循环; 68°C 10 min。

为获得重复 DNA 序列 A 发生不同缺失的衍生基因, 建立了大肠杆菌筛选模型, 即将质粒 pYCF1 转化大肠杆菌 DH5 α , 在含氨苄青霉素的 LB 培养基上筛选重组菌株 DH5 α (pYCF1)。将重组菌株在含氨苄青霉素的 LB 培养基中 37°C 摇床 (200 r/min) 培养, 每 16 h 转接一次进行连续传代, 同时适当稀释后涂在含氨苄青霉素的 LB 培养基上培养, 快速提取质粒, 筛选大小不同于 pYCF1 的重组质粒, 并进行序列分析。



图 1 *FLO1* 基因结构物理图谱及本研究所用引物

Fig. 1 Physical structure of *FLO1* and primers used in this study. Region from +1 to 4614 is the ORF of *FLO1*; 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>. Primers P1, P2, P3 and P4 were used to construct *FLO1a*.

表 1 PCR 扩增所用引物序列

Table 1 Primers used for DNA amplification

Primers	Primers sequence (5'→3')	Size/bp	Restriction site
P1	TTGTCGACGGCTTCCAGTATGCTTTCAC	29	<i>Sal</i> I
P2	ATGATGACAATGTAGTGGTACTGACAGCAT	30	None
P3	ATGCTGTCAGTACCACTACATTGTTCATCATCTTCAGG	40	None
P4	ACAAGCTTFACTACACTT CCTGGGAACG	29	<i>Hind</i> III
P5	TTTGCCACCTAATATCGAAGGAACC	25	None
P6	CATCTGGAAGTGTACACTAATTGG	25	None
ACT1-F	TGATAACGGTTCTGCTATGTGTAAG	26	None
ACT1-R	ATGATACCTTGGTGTCTTGGTCTAC	25	None

1.4 表达质粒构建及酵母转化

分别用 *Sal*I 和 *Hind*III 双酶切 *FLO1a* 和载体 YCp50, 连接后转化 *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, 获得带有 *FLO1a* 基因的重组表达质粒 pYCF1a。各重组质粒及空载体 YCp50 通过醋酸锂完整细胞转化法^[16] 分别转化非絮凝酵母 YS58, 在含有色氨酸、亮氨酸和组氨酸的 SC 培养基

中筛选重组菌株。

1.5 絮凝能力测定

絮凝能力的常规测定参照文献 [18] 进行,略有改动。酵母细胞在 2 mL YEPD 培养基中 30℃ 摇床 (200 r/min) 培养 18 h, 按 1% (v/v) 接种量转接于 100 mL YEPD 中 30℃ 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 (pH 8.0) 和无菌水洗 2 遍; 将菌体悬浮在 5 mL 相应的缓冲液中, 充分振荡混匀, 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 (pH 4.5), 絮凝缓冲液为 50 mmol/L 乙酸钠 - 6.8 mmol/L 氯化钙 (pH 4.5)。

测定不同种类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 的甘露糖、葡萄糖、半乳糖、麦芽糖和蔗糖。

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, 50 mmol/L 乙酸钠缓冲液 (pH 2.0 - 6.0); 10 mmol/L Tris base 缓冲液 (pH 7.0 - 9.0)。经测试两种缓冲体系对菌株絮凝能力的影响没有明显差异。

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、5、30、50、100 mmol/L。

1.6 不同酵母菌株絮凝基因及絮凝特性遗传稳定性比较

将不同酵母菌株分别在 YEPD 液体培养基中 30℃ 摇床 (200 r/min) 培养, 每 18 h 转接一次进行连续传代, 共连续传代培养 10 次。每隔两代, 将培养液适当稀释后涂布在 YEPD 平板上, 30℃ 培养 48 h, 随机挑取 100 个单菌落于无菌水中, 室温静置 4 h, 分别点于含色氨酸、亮氨酸、组氨酸和尿嘧啶的 SC 培养基平板 (SC + Trp + Leu + His + Ura), 含色氨酸、亮氨酸和组氨酸的 SC 培养基平板 (SC + Trp + Leu + His), 以及含色氨酸、亮氨酸和尿嘧啶的 SC 培养基平板 (SC + Trp + Leu + Ura) 上, 30℃ 培养 48 h, 记录各单菌落生长情况, 分析酵母菌中质粒的稳定性。

同时将相应菌悬液接于 3 mL YEPD 培养基中, 30℃ 摇床 (200 r/min) 培养 24 h, 通过目测法初步比较不同单菌落絮凝能力, 对差异明显的单菌落按照 1.5 絮凝能力常规测定方法分别测定它们的絮凝能力。

2 结果和讨论

2.1 *FLO1* 不同衍生基因的获得及序列分析

以完整 *FLO1* 为模板, 通过融合 PCR 扩增得到重复 DNA 序列 A 完全缺失的衍生基因 *FLO1a* (3652 bp), 将其插入到载体 YCp50 的 *SalI* 和 *HindIII* 酶切位点, 获得重组质粒 pYCF1a。

带有完整 *FLO1* 基因的重组质粒 pYCF1 转化大肠杆菌 DH5 α 获得重组菌株 DH5 α (pYCF1)。重组菌株传代培养, 快速检测重组质粒大小变化。通过大肠杆菌筛选模型, 传代两次获得五个大小发生变化的重组质粒, 命名为 pYCF1a1 - pYCF1a5。酶切分析结果表明不同重组质粒中絮凝基因大小发生了明显变化 (图 2)。序列分析结果表明, 与完整 *FLO1* 相比, pYCF1 的衍生质粒 pYCF1a1 - pYCF1a5 中絮凝基因内部发生了重复 DNA 序列 A 不同程度和位点的缺失, 相应基因分别命名为 *FLO1a1* - *FLO1a5*。其中 *FLO1a* 是 *FLO1* 中重复 DNA 序列 A 全部缺失的衍生基因; *FLO1a1* - *FLO1a4* 是 *FLO1* 中连续的 16 个、14 个、12 个、11 个重复 DNA 序列 A 分别发生缺失的衍生基因; 而 *FLO1a5* 除缺失了 *FLO1* 中 10 个连续的重复 DNA 序列 A 外, 还缺失了第 17 和 18 个重复 DNA 序列 A 中 119 bp 的 DNA 序列。上述衍生基因中重复 DNA 序列 B、C 和 D 与完整 *FLO1* 基因完全相同, 说明重复 DNA 序列 A 相对于重复 DNA 序列 B、C、D 更容易引发基因内或基因间重组。这与不同研究者分离到的 *FLO1* 基因之间的差异主要在重复 DNA 序列 A 的数量上的报道相一致^[1,10-11]。

2.2 *FLO1* 及其衍生基因在酵母菌中的表达

将带有完整 *FLO1* 基因的重组质粒 pYCF1、衍生基因 *FLO1a* 的重组质粒 pYCF1a、衍生基因 *FLO1a1* - *FLO1a5* 的重组质粒 pYCF1a1 - pYCF1a5、空载体 YCp50 分别转化到非絮凝酿酒酵母 YS58 中, 利用尿嘧啶营养缺陷互补, 在含有色氨酸、亮氨酸和组氨酸的 SC 培养基上筛选转化菌株, 通过酵母菌质粒提取及 PCR 扩增分析对转化菌株进行验

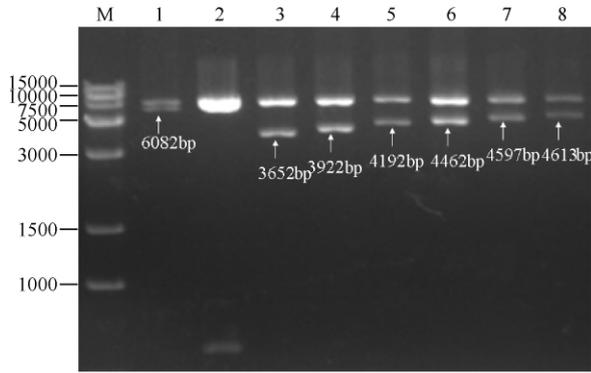


图2 不同重组质粒酶切分析

Fig. 2 Analysis of recombinant plasmids with restriction endonuclease (*SalI* and *HindIII*) digestion. Lane M: marker; Lane 1: pYCF1; Lane 2: YCp50; Lane 3: pYCF1a; Lane 4-8: pYCF1a1 - pYCF1a5.

证,并将其分别命名为 YSF1、YSF1a、YSF1a1 - YSF1a5 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数均为 2,符合 YCp 型质粒特点^[17]。从培养 20 h 的酵母细胞中提取各菌株总 RNA,利用引物对 ACT1 - F/ACT1 - R 及 P5/P6 分别进行 qRT-PCT 分析,以 *ACT1* 为对照,计算不同酵母菌株中各絮凝基因的相对表达水平,结果表明空载体转化菌株 YSP50 中没有检测到絮凝基因的表达,而在菌株 YSF1、YSF1a、YSF1a1 - YSF1a5 中均检测到絮凝基因的表达,而且各菌株中絮凝基因与 *ACT1* 表达水平比率基本一致(图 3),说明不同酵母菌株中絮凝基因的表达水平没有明显差异。

按常规方法测定各转化菌株的絮凝能力,发现空载体转化菌株 YSP50 及表达重复 DNA 序列 A 完全缺失的衍生基因 *FLO1a* 的酵母菌株 YSF1a 均没有明显的絮凝能力,完整 *FLO1* 表达可以使酵母菌 YSF1 产生很强的絮凝能力(94.5%),但 *FLO1* 中重复 DNA 序列 A 发生不同程度的缺失使酵母细胞絮凝能力降低(图 3)。保留了 2 个重复 DNA 序列 A 的衍生基因 *FLO1a1* 表达的酵母菌 YSF1a1 表现出较弱的絮凝能力(16.8%);表达带有 4 个重复 DNA 序列 A 的衍生基因 *FLO1a2* 的酵母菌 YSF1a2 表现出 38.2% 的絮凝能力;表达带有 6 个重复 DNA 序列 A 的衍生基因 *FLO1a3* 的酵母菌 YSF1a3 表现出 67.5% 的絮凝能力。可见絮凝基因中重复 DNA 序列 A 的数量与酵母菌株的絮凝能力成正相关^[1]。由于重复 DNA 序列 A 所编码的蛋白区域是 Flo1p

中参与跨越细胞壁功能的主要结构,重复 DNA 序列 A 越多越有利于絮凝蛋白跨越细胞壁展现在细胞表面,从而与邻近细胞表面的寡聚甘露糖链发生相互作用产生絮凝^[1,19-20];而重复 DNA 序列 A 发生不同程度的缺失,将影响絮凝蛋白在细胞表面呈现的状态或构象,从而表现出絮凝特性的差异。

衍生基因 *FLO1a3*、*FLO1a4* 和 *FLO1a5* 分别保留 6、7 及 7.1 个重复 DNA 序列 A,但转化菌株 YSF1a3、YSF1a4 和 YSF1a5 之间絮凝能力没有明显差异。可见,重复 DNA 序列 A 的数量尽管与絮凝能力成正相关,但不是简单的线性关系,其中 *FLO1a3* 含有的重复 DNA 序列 A 的数量是 *FLO1* 的 33.3%,而转化菌株 YSF1a3 却表现出较强的絮凝能力,可达 YSF1 的 71.4%。

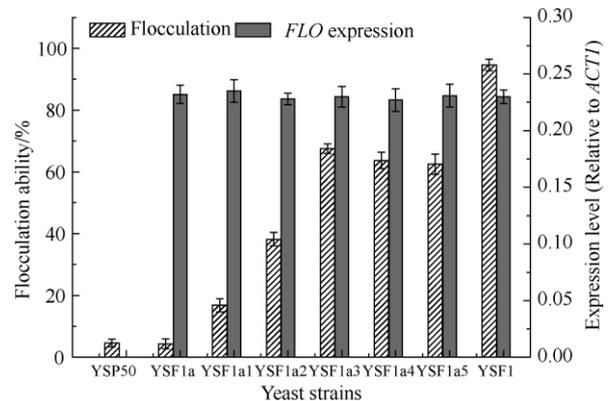


图3 不同酵母菌株絮凝基因表达及絮凝能力比较

Fig. 3 Comparison of expression levels of *FLO* gene and flocculation ability among different yeast strains. Values reflect the mean of three repeat experiments, and the error bars represent standard deviations.

2.3 环境因素对不同酵母菌株絮凝特性的影响

2.3.1 不同种类糖对酵母菌株絮凝能力的影响:

在絮凝测定缓冲液(50 mmol/L 乙酸钠, pH4.5)中,分别添加 0.5 mol/L 不同种类的糖,测定不同种类糖分子对酵母菌株絮凝能力的影响。从表 2 所示结果可以看出,甘露糖对酵母菌株 YSF1、YSF1a3、YSF1a4 和 YSF1a5 的絮凝特性有明显的抑制作用,在 0.5 mol/L 甘露糖存在下,絮凝能力分别降低了 41.6%、28.9%、35.7% 和 69.1%;其他游离糖对上述菌株的絮凝能力没有明显影响,说明絮凝基因 *FLO1* 中重复 DNA 序列 A 发生不同程度、不同位点的缺失没有影响絮凝蛋白与糖分子之间相互识别和作用的特异性,上述基因表达使酵母细胞产生典型

的 Flo1 型絮凝^[1,21]。

但不同酵母菌株的絮凝特性受甘露糖抑制的程度有明显的差异: 酵母菌株 YSF1 和 YSF1a5 的絮凝能力随甘露糖浓度增加迅速降低, 在 1.0 mol/L 甘露糖存在下, 絮凝能力分别降低了 78.7% 和 90.2%; 而菌株 YSF1a3 和 YSF1a4 随甘露糖浓度增加絮凝能力降低趋势比较平缓, 尤其是当缓冲液中甘露糖浓度高于 0.6 mol/L 时, 继续提高甘露糖浓度对絮凝能力几乎没有影响, 在 1.0 mol/L 甘露糖存在下, 絮凝能力分别降低了

39.6% 和 41.6% (图 4-A)。游离的甘露糖分子通过与絮凝蛋白结合一方面竞争性抑制邻近细胞表面甘露糖链与絮凝蛋白的结合, 另一方面可能导致絮凝蛋白构象的变化抑制絮凝的发生^[22]。可见, *FLO1* 基因中上述部分重复 DNA 序列 A 缺失后, 不但可以影响絮凝蛋白在细胞表面的充分呈现, 而且可能引起絮凝蛋白构象及其稳定性的变化, 存在于菌株 YSF1a3 和 YSF1a4 细胞表面的絮凝蛋白 Flo1a3p 和 Flo1a4p 与絮凝蛋白 Flo1p 和 Flo1a5p 相比可能具有更好的构象稳定性。

表 2 不同种类糖分子对酵母菌株絮凝能力的影响

Table 2 Inhibition on flocculation of different yeast strains by sugars

Strains	% Flocculation ability with					
	No sugar	Mannose	Glucose	Maltose	Sucrose	Galactose
YSF1	94.6 ± 1.7	55.2 ± 1.9	87.9 ± 2.9	90.3 ± 2.3	91.8 ± 3.6	92.5 ± 1.8
YSF1a3	67.5 ± 1.9	45.3 ± 2.1	61.6 ± 3.3	68.1 ± 1.7	61.2 ± 2.5	67.2 ± 2.7
YSF1a4	63.7 ± 3.4	40.9 ± 2.1	60.8 ± 3.3	61.8 ± 3.5	60.9 ± 2.4	63.3 ± 3.6
YSF1a5	62.5 ± 2.9	19.3 ± 1.7	60.6 ± 4.0	62.7 ± 1.7	57.9 ± 1.5	62.6 ± 3.4

The concentration for each sugar was 0.5 mmol/L.

2.3.2 pH 对酵母菌株絮凝能力的影响: 对不同酵母菌株在不同 pH 条件下的絮凝能力进行分析比较, 结果显示与菌株 YSF1 相同, 酵母菌株 YSF1a3、YSF1a4 和 YSF1a5 均在 pH4.5 时表现出最强的絮凝能力, 环境 pH 变化对表达完整絮凝基因 *FLO1* 的酵母菌株 YSF1 的絮凝能力有非常明显的影响, 而 *FLO1* 中重复 DNA 序列 A 发生不同程度、不同位点缺失后, 酵母细胞絮凝能力对环境 pH 变化的敏感性降低, 尤其在中性和偏碱性环境下, 酵母菌株

YSF1a3、YSF1a4 和 YSF1a5 均表现出明显高于 YSF1 的絮凝能力(图 4-B)。环境 pH 变化可能导致絮凝蛋白构象变化, 从而影响其与邻近细胞表面甘露糖链间的结合^[2]。可见絮凝蛋白 Flo1a3p、Flo1a4p 和 Flo1a5p 与絮凝蛋白 Flo1p 相比在中性和偏碱性环境下具有更好的构象稳定性。上述结果与 *FLO1* 中重复 DNA 序列 B、D 缺失有利于提高絮凝蛋白在酸碱性环境中的结构和功能稳定性相一致^[15]。

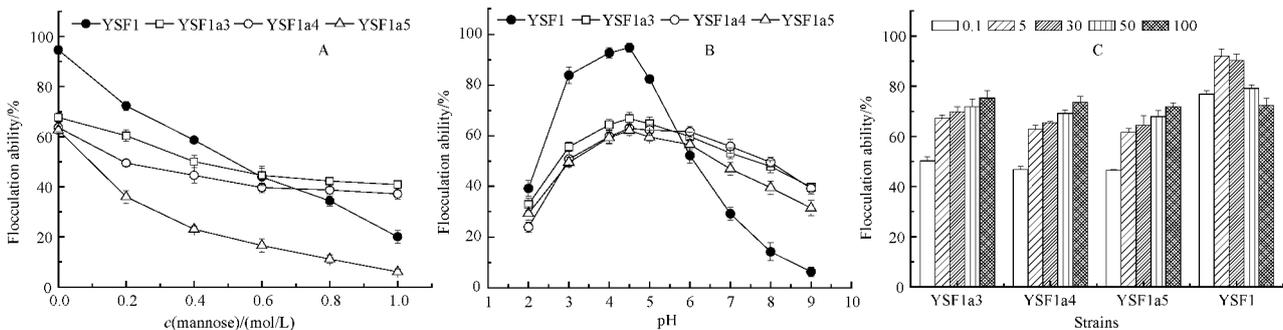


图 4 环境因素对不同酵母菌株絮凝能力的影响

Fig. 4 Effect of environmental factors on flocculation of different yeast strains. A: mannose concentration, B: pH, C: Ca²⁺ concentration. Each point represents the mean of experiments performed in triplicate, and error bars represent standard deviation.

2.3.3 不同钙离子浓度对酵母菌株絮凝能力的影响: 在 pH4.5 缓冲液中分析比较了钙离子浓度对不同酵母菌株絮凝能力的影响, 如图 4-C 所示, 与酵母

菌株 YSF1 相同, 菌株 YSF1a3、YSF1a4 和 YSF1a5 均表现出钙离子依赖型絮凝特性, 在没有钙离子的缓冲液中, 细胞没有表现出明显的絮凝, 当钙离子浓度

为 0.1 mmol/L 时各酵母细胞即表现出比较强的絮凝。菌株 YSF1 在含 5 mmol/L 钙离子的缓冲液中表现出最强的絮凝能力,而随着钙离子浓度的进一步提高,细胞絮凝能力呈现逐渐减弱的趋势;而酵母菌株 YSF1a3、YSF1a4 和 YSF1a5 的絮凝能力随着钙离子浓度逐渐增加表现出逐渐增强的趋势。因此当缓冲液中钙离子浓度为 100 mmol/L 时,表达重复 DNA 序列 A 发生部分缺失的衍生基因的酵母菌株 YSF1a3、YSF1a4 和 YSF1a5 产生了与表达完整絮凝基因 *FLO1* 的酵母菌株 YSF1 同样水平的絮凝。钙离子通过两种方式参与酵母菌的絮凝过程:一方面通过与絮凝蛋白中间结构域结合使蛋白的空间构象更加伸展和稳定,另一方面直接参与寡聚甘露糖链与絮凝蛋白的结合^[2,22]。钙离子能明显提高 *FLO1* 中部分重复 DNA 序列 A 发生缺失的酵母菌株的絮凝能力,说明这些重复 DNA 序列 A 的缺失可能导致絮凝蛋白空间构象的改变,使絮凝蛋白与钙离子结合的位点及亲和力发生改变。

2.4 不同酵母菌株絮凝特性的遗传稳定性比较

酵母菌株 YSF1、YSF1a3、YSF1a4 和 YSF1a5 分别在无选择压力条件下传代培养,每隔两代检测细胞在各种筛选培养基上的生长情况,发现各菌株连续传代培养 10 代后,检测的所有单菌落均可以在 SC + Trp + Leu + His + Ura 培养基和 SC + Trp + Leu + His 培养基平板上生长,而不能在 SC + Trp + Leu + Ura 培养基平板上生长;同样条件下,菌株 YS58 只能在 SC + Trp + Leu + His + Ura 培养基上生长,而不能在另外两种培养基上生长。可见由于重组质粒转化导致的酵母菌株 YSF1、YSF1a3、YSF1a4 和 YSF1a5 的尿嘧啶营养缺陷互补特性能够在连续传代过程中得到保留。对传代 10 次后酵母细胞质粒拷贝数分析,发现每个细胞中仍然含有两个拷贝的重组质粒,说明上述菌株中的重组质粒能够稳定遗传。

按常规方法分析比较上述菌株不同传代次数的细胞的絮凝能力,发现表达完整絮凝基因 *FLO1* 的酵母菌株 YSF1 连续传代培养 4 次后,在检测的单菌落中出现了絮凝能力的差异,而且随着传代次数的增加,絮凝能力出现差异的单菌落数也逐渐增加,连续传代培养 10 次的细胞的絮凝能力均比原始菌株 YSF1 的絮凝能力低;而菌株 YSF1 a3、YSF1a4 和 YSF1a5 的絮凝能力在连续传代培养过程中却没有明显的变化,能够保持稳定(图 5)。可见絮凝基因

FLO1 中部分重复 DNA 序列 A 缺失明显提高了酵母菌絮凝特性的遗传稳定性。

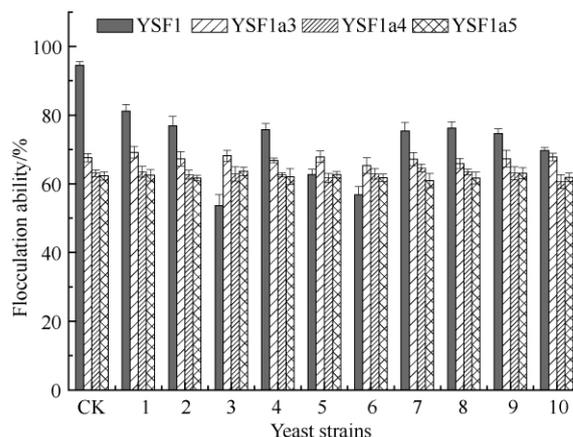


图 5 连续传代培养 10 次后酵母细胞絮凝能力比较

Fig. 5 Comparison of flocculation ability of yeast strains after ten generations of culture under non-selective conditions. CK: the original yeast cells of YSF1, YSF1a3, YSF1a4 and YSF1a5; 1 - 10: ten randomly selected colonies of the above strains after ten generations of successive subculture without selective pressure. Values reflect the mean of three repeat experiments, and the error bars represent standard deviations.

3 结论

由酵母细胞表面絮凝蛋白和邻近细胞表面甘露糖残基相互作用产生的絮凝特性可以使酵母细胞快速沉降到发酵液底部,因此良好的絮凝特性在发酵工业中具有重要的应用价值。编码絮凝蛋白的絮凝基因含有大量基因内重复序列,这些序列之间的重组是造成絮凝特性遗传不稳定的重要因素,极大限制了絮凝特性在发酵工业及其他方面的应用。重复 DNA 序列 A 是絮凝基因 *FLO1* 中序列最长、重复次数最多的衔接重复序列。本研究通过融合 PCR 方法构建了重复 DNA 序列 A 完全缺失的衍生基因 *FLO1a*,并对 *FLO1* 和 *FLO1a* 在酵母中表达对细胞絮凝能力影响进行比较分析,结果表明,重复 DNA 序列 A 对于絮凝蛋白功能体现至关重要,*FLO1* 中重复 DNA 序列 A 完全缺失后,酵母菌株完全失去絮凝能力。

国内外曾有不同的研究者从酵母菌中分离到重复 DNA 序列 A 发生缺失的絮凝基因,并研究了这些基因表达对酵母菌絮凝特性的影响,发现絮凝基因中重复 DNA 序列 A 的数量发生改变主要影响细

胞絮凝强度,个别情况下影响絮凝对游离糖的敏感性^[1, 9-13]。但重复 DNA 序列的缺失是如何发生的,以及不同位点的重复 DNA 序列 A 发生缺失对酵母菌絮凝的其他特性有何影响还很不清楚。本研究首次以带有 *FLO1* 基因的大肠杆菌为模型,通过连续传代快速筛选到大小不同的 *FLO1* 衍生基因 *FLO1a1*、*FLO1a2*、*FLO1a3*、*FLO1a4* 和 *FLO1a5*, 序列分析表明,这些衍生基因分别在不同位点缺失了不同个数的重复 DNA 序列 A,说明在絮凝基因的克隆过程中,带有絮凝基因的重组质粒在大肠杆菌细胞内复制过程中会发生重复序列间的重组,从而产生重复 DNA 序列 A 发生不同缺失的絮凝基因。不但说明在对具有内部重复序列的基因进行研究时,大肠杆菌操作过程是产生序列多样性的重要环节,而且重复序列的缺失是在没有任何选择压力下产生的,因此对其缺失位点的进一步分析更能反映实际应用中酵母菌自然培养过程中絮凝基因发生变化的特点。

上述 *FLO1* 衍生基因在酵母菌中表达使细胞产生的絮凝能力与基因内保留的重复 DNA 序列 A 的个数基本呈正相关,但不是简单的比例关系,其中 *FLO1a3* 中的重复 DNA 序列 A 只有 *FLO1* 中的 33.3%, 但该基因表达使酵母细胞 YSF1a3 产生的絮凝能力是表达 *FLO1* 菌株 YSF1 的 71.4%。而且菌株 YSF1a3 表现出的絮凝特性对环境甘露糖浓度变化、酸碱度变化等的敏感性明显低于菌株 YSF1 表现出的絮凝特性,同时在连续培养过程中菌株 YSF1a3 的絮凝能力具有更好的遗传稳定性。因此通过对絮凝基因 *FLO1* 中重复 DNA 序列 A 缺失位点及缺失程度的合理控制,不但可以使酵母细胞呈现适度的絮凝能力,而且可以提高絮凝特性对环境变化的适应性及遗传稳定性,对酵母絮凝特性在发酵工业及其他生物化工过程和环境修复中的广泛应用提供了重要的理论依据和解决策略。

参考文献

- [1] Verstrepen KJ, Jansen A, Lewitter F, Fink GR. Intragenic tandem repeats generate functional variability. *Nature Genetics*, 2005, 37 (9) : 986-990.
- [2] Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Verachtert H, Delvaux FR. Yeast flocculation: what brewers should know. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2003, 61 (3) : 197-205.
- [3] Bester MC, Pretorius IS, Bauer FF. The regulation of *Saccharomyces cerevisiae* *FLO* gene expression and Ca²⁺-dependent flocculation by Flo8p and Mss11p. *Current Genetics*, 2006, 49 (6) : 379-383.
- [4] Bony M, Thines-Sempoux D, Barre P, Blondin B. Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179 (15) : 4929-4936.
- [5] Kapteyn JC, Van Den Ende H, Klis FM. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, 1426 (2) : 373-383.
- [6] Zupancic ML, Frieman M, Smith D, Alvarez RA, Cummings RD, Cormack BP. Glycan microarray analysis of *Candida glabrata* adhesin ligand specificity. *Molecular Microbiology*, 2008, 68 (3) : 547-559.
- [7] Katty Goossens, Ronnie Willaert. Flocculation protein structure and cell-cell adhesion mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 2010, 32 (11) : 1571-1585.
- [8] Teunissen AW, Van Den Berg JA, Steensma HY. Physical localization of the flocculation gene *FLO1* on chromosome I of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1993, 9 (1) : 1-10.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [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] Liu N, Wang DL, Wang ZY, He XP, Zhang BR. Deletion of tandem repeats causes flocculation phenotype conversion from Flo1 to NewFlo in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2009, 16 (3-4) : 137-145.
- [14] Bauer FF, Govender P, Bester MC. Yeast flocculation and its biotechnological relevance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 88 (1) : 31-39.
- [15] 李娥娥, 常琦, 郭雪娜, 何秀萍, 张博润. 衔接重复序列对酵母菌絮凝蛋白功能的调控作用. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2012, 52 (1) : 69-76.
- [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] Kobayashi O, Hayashi N, Kuroki R, Sone H. Region of Flo1 proteins responsible for sugar recognition. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180 (24) : 6503-6510.
- [19] Frieman MB, Cormack BP. Multiple sequence signals determine the distribution of glycosylphosphatidylinositol proteins between the plasma membrane and cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 2004, 150 (10) : 3105-3114.
- [20] Frieman MB, McCaffery JM, Cormack BP. Modular domain structure in the *Candida glabrata* adhesin Epa1p, a β -1,6-glucan-cross-linked cell wall protein. *Molecular Microbiology*, 2002, 46 (2) : 479-492.
- [21] Stratford M, Assinder S. Yeast flocculation: Flo1 and NewFlo phenotypes and receptor structure. *Yeast*, 1991, 7 (6) : 559-574.
- [22] Veelders M, Brückner S, Ott D, Unverzagt C, Mösche 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.

Regulatory effect of *FLO1* tandem repeats on the flocculation characteristics and genetic stability in *Saccharomyces cerevisiae*

Qi Chang^{1,2}, Feng Yue^{1,2}, Xuena Guo¹, Xiuping He^{1*}, Borun Zhang¹

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

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

Abstract: [Objective] There are a large number of tandem repeats in *FLO1*, which are highly dynamic components in genome leading to the unstable flocculation profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. The effects of complete or partial deletion of repeated DNA sequence A in *FLO1* on the flocculation characteristics and genetic stability in yeast were studied to provide theoretical guide for construction genetically stable flocculation gene with minimal size. [Methods] We constructed the derived gene *FLO1a* with complete deletion of repeated DNA sequence A in the central domain by fusion PCR, and isolated the derived genes *FLO1a1* – *FLO1a5* with partial deletion of repeated DNA sequence A at different sites using *E. coli* DH5 α carrying the *FLO1* gene as selective model. We analyzed the physiological characteristics and genetic stability of flocculation in yeast strains YSF1, YSF1a, and YSF1a1 – YSF1a5 containing *FLO1*, *FLO1a* and *FLO1a1* – *FLO1a5* respectively. [Results] No obvious flocculation was observed for yeast strain YSF1a, but various levels of flocculation were observed for strains YSF1a1 – YSF1a5. Flocculation of YSF1a3, YSF1a4 and YSF1a5 were more tolerant to environmental changes than that of strain YSF1, and displayed more genetic stability. [Conclusion] Repeated DNA sequence A is important for the function of flocculation protein.

Keywords: Yeast, *FLO1*, repeated DNA sequence A, flocculation characteristics, stability

(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: 4 May 2012/Revised:24 May 2012