

## 产甘油假丝酵母胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶基因 (*CgGPD*) 功能分析

陈献忠<sup>1, 2</sup>, 方慧英<sup>3</sup>, 饶志明<sup>1, 3</sup>, 沈微<sup>1, 2</sup>, 诸葛斌<sup>1, 3</sup>, 王正祥<sup>1, 2</sup>, 诸葛健<sup>1, 3\*</sup>

(江南大学, <sup>1</sup>工业生物技术教育部重点实验室, <sup>2</sup>生物工程学院生物资源与生物能源研究中心,  
<sup>3</sup>工业微生物生物反应过程研究中心, 无锡 214122)

**摘要:**【目的】从高产甘油生产菌株产甘油假丝酵母(*Candida glycerinogenes*)基因组中克隆了 NAD<sup>+</sup> 依赖 3-磷酸甘油脱氢酶编码基因(*CgGPD*), 但是该基因及其上游调控序列具体的功能还是未知的。本文研究了 *CgGPD* 基因及其上游调控序列的功能。【方法】本文以酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)及其渗透压敏感型突变株为宿主, 构建 3 种不同的酵母表达载体导入酵母细胞, 研究了不同酵母转化子在渗透压胁迫条件下 *CgGPD* 基因表达对细胞的耐高渗透压胁迫应答及其细胞的甘油合成能力的影响。【结果】实验结果表明无论是以来源于 *S. cerevisiae* 的 TPI 启动子还是来源于 *CgGPD* 基因的启动子, 过量表达 *CgGPD* 基因的转化子均能够显著加速葡萄糖消耗速度和提高甘油合成能力, 在 *gpd1/gpd2* 突变株中表达 *CgGPD* 基因能够消除细胞对外界高渗透压的敏感性, 同时转化子胞内甘油大量积累。【结论】*CgGPD* 基因在野生型酵母 *S. cerevisiae* W303-1A 表达显著提高细胞的甘油合成能力, 在 *gpd1/gpd2* 突变株中能够互补 *GPD1* 基因的功能, *CgGPD* 基因表达受渗透压诱导调控。

**关键词:** 产甘油假丝酵母; 3-磷酸甘油脱氢酶; 甘油合成; 渗透压胁迫

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 12-1602-07

在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的生长或发酵过程中, 甘油是最重要的代谢副产物之一。甘油积累对酵母细胞起着至少 2 种生理功能: 渗透压调节和氧化还原平衡<sup>[1, 2]</sup>。当细胞突然受到外界高渗透压胁迫时, 甘油会在胞内迅速合成并大量积累以提高胞内渗透压强度, 阻止了细胞水分向外扩散从而保护细胞免受伤害甚至死亡的几率, 在这种条件下, 甘油是最主要且最重要的生物相容物质存在的。当细胞处于厌氧培养条件时, 细胞会产生剩余的还原力 NADH, 这对细胞是有害的, 此时细胞会通过合成甘油使 NADH 重新氧化为 NAD<sup>+</sup>, 使得胞内的氧化还原

电势处于平衡状态。甘油的形成过程一般从糖酵解中间产物磷酸二羟丙酮(DHAP)经 3-磷酸甘油脱氢酶(glycerol-3 phosphate dehydrogenase, GPD)催化形成 3-磷酸甘油(G3P, glycerol-3 phosphate), 后者再由 3-磷酸甘油酯酶反应而得。在这个过程中, 代谢控制分析表明 GPD 是决定细胞甘油能力的关键因素<sup>[3]</sup>。在酿酒酵母中, 编码胞浆 NAD<sup>+</sup> 3-磷酸甘油脱氢酶的 *GPD1* 基因是高渗透压甘油应答途径(HOG, High-Osmolairty- Glycerol)调控的靶基因<sup>[4-6]</sup>。

*Candida glycerinogenes* 是优良的甘油生产酵母, 已经成功地应用于发酵甘油工业中<sup>[1, 7]</sup>。王正祥等对

基金项目: 国家自然科学基金(30570142, 20676053); 长江学者和创新团队发展计划(IRT0532)

\*通讯作者: Tel: +86-510-85918109; Fax: +86-510-85125322; E-mail: jianzhuge@hotmail.com

作者简介: 陈献忠(1980-), 男, 安徽界首人, 博士, 研究方向为酵母分子遗传学。E-mail: cxzcool2000@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-05-21; 修回日期: 2008-09-02

*C. glycerinogenes* 过量合成甘油机理的研究发现细胞的耐高渗性可能与其生长相偶联,并且在甘油的高速积累期,胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶是甘油的合成的关键限速酶<sup>[8]</sup>。最近,我们成功克隆了来源于 *C. glycerinogenes* 基因组的胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶基因 (*CgGPD*)<sup>[9]</sup>,但是该基因表达调控机理和相关功能还知之甚少。同时,*C. glycerinogenes* 菌株的遗传知识极为缺乏,要想以此为系统研究基因的表达调控暂时存有困难。

鉴于此,本文以 *S. cerevisiae* 及其 *gpd1/gpd2* 缺失突变株为表达系统,研究了 *CgGPD* 基因表达对细胞的高渗透压生理应答反应和甘油合成能力的影响。同时,鉴定了该基因的调控序列在酿酒酵母中是否具有作用,为以该基因调控序列为启动子构建新型酵母表达载体提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒:**产甘油假丝酵母 (*C. glycerinogenes*) WL2002-5 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 均由本实验室保藏;酿酒酵母 YSH642(W303-1A *gpd1Δ::TRP1 gpd2Δ::URA3*) 和 YSH392 (W303-1A *gpd1Δ::TRP1*) 以及穿梭质粒 YEplac181 由瑞典 Goteborg 大学 Hohmann 教授馈赠。酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) W303-1A 和酿酒酵母表达载体 pYX212 由南非 Stellenbosch 大学 Prior 教授馈赠。pGEM T-Vector, 购自 Promega 公司。pYX212 和 YEplac181 用于基因在酵母的表达, pGEM T-Vector 用于基因的亚克隆和序列测定。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**实验用各种限制性内切酶和 *Ex Taq*、*LA Taq* DNA 聚合酶以及 CIAP、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限公司。Zymolyase 20<sup>T</sup> 购自日本 SEIKAGAKV 公司;RNase 和麦角固醇购自 Sigma 公司;山梨醇购自 AMRESCO 公司;其余均为国产试剂纯。PCR 仪: Eppendorf 5332 小型 PCR 仪;电转化仪: BIO-RAD pulse controller (Gene Pulser<sup>TM</sup>);生物传感仪 SBA-40B: 山东省科学院;高效液相色谱 HPLC: 戴安(中国);色谱柱 Aminex HPX-87H: Bio-Rad (美国);MSE 型超声波细胞破碎仪: 美国 SONICS & MATERIALS 公司。

### 1.2 培养条件

**1.2.1 培养基:**LB 培养基用于 *E. coli* JM109 的生长,培养温度 37<sup>o</sup>。YEPD 培养基用于 *C. glycerinogenes* WL2002-5 和 *S. cerevisiae* 的培养、保藏;添加相应氨基酸的 YNB 培养基用于 *S. cerevisiae* W303-1A 转化子的筛选;LB, YNB 和 YEPD 培养基的组成和配制见参考文献[10]。

**1.2.2 渗透压胁迫实验:**细胞在 YEPD 培养液中预培养至对数生长期后期,加入等体积的预热至 30<sup>o</sup> 的 1.4 mol/L NaCl 的 YEPD,在 30<sup>o</sup> 摇床继续培养,以未加入高盐培养基时作为对照,分别在规定的时间点取样测定胞内甘油含量和 GPD 酶活。固体培养基渗透压胁迫试验:预培养细胞至浓度 10<sup>6</sup>/mL,按 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> 和 10<sup>-5</sup> 进行稀释,然后取 4 μL 点种至含有不同浓度 NaCl、山梨醇或葡萄糖的 YEPD 平板上。

**1.2.3 高浓度葡萄糖发酵试验:**酵母细胞预培养至对数生长期中期 (*OD*<sub>600</sub> 在 0.7~0.9 左右) 然后按 1% 的接种量转接于含 10% 葡萄糖的 YEPD 液体培养基中,于 30<sup>o</sup> 摇床 150 r/min 培养,定时取样测定所需参数。

### 1.3 DNA 操作

*C. glycerinogenes* 和 *S. cerevisiae* 酵母基因组 DNA 的提取按参考文献[10]操作,其余常规的分子操作实验均按参考文献[11]进行。

### 1.4 表达载体的构建

**1.4.1 表达载体 YEplac-CgGPD 的构建:**设计一对引物 CgYE-F 和 CgYE-R (本文所用的引物均列于表 1),并在上下游引物的 5' 端分别引入 *Hind*III 和 *Kpn* 限制酶位点,以产甘油假丝酵母基因组为模板利用 *LA Taq* DNA 聚合酶 PCR 扩增 *CgGPD* 基因及其上下游调控序列共 3.2 kb。胶回收 3.2 kb 的 PCR 产物后分别用 *Hind*III 和 *Kpn* 酶切,然后与经过同样限制酶作用的载体 YEplac181 进行连接、转化,获得重组载体即为 YEplac-CgGPD。

**1.4.2 表达载体 pYX212-CgGPD 的构建:**设计一对引物 CgpYX-F 和 CgpYX-R,并在上下游引物的 5' 端分别引入 *Eco*RI 和 *Sal*I 限制酶位点,以 *C. glycerinogenes* 基因组 DNA 为模板,利用 *Ex Taq* DNA 聚合酶用于扩增 *CgGPD* 基因 1.17 kb 完整的编码框。胶回收 1.2 kb 的 PCR 产物后分别用 *Eco*RI 和 *Sal*I 酶切,然后与经过同样限制酶作用的酵母表达载体 pYX212 进行连接、转化,获得重组质粒命名为 pYX212-CgGPD。

表 1 本文构建载体所用的寡核苷酸引物  
Table 1 Oligonucleotide primers used in this chapter and its location

Primer name	Sequence (5' 3')	Primer location*	Length/mer	Restriction sites introduced
CgYE-F	CCCAAGCTTATGCCGTGCAAAAACAGTATC	-1957~ - 1937	30	Hind
CgYE-R	CGGGGTACCAAGTGGAAATGCAGCTAAAGG	1268~1288	30	Kpn
CgpYX-F	CCGGAATTCAAAATGGTGTCCCTGCTGAA	-3~17	30	EcoR
CgpYX-R	CGCGTGCAC ATGCCAAAGTTCTCCTTGAGG	1172~1192	30	Sal
CgpYt-F	ATTCTGAGGCAGTTCCTCCGTTTCCATTC	-955~-935	30	Bsu36
CgpYt-R	CGCGGATCCAAGTGGAAATGCAGCTAAAGG	1172~1192	30	BamH

\* indicates the first letter of ATG in the open reading frame for *CgGPD* as +1

**1.4.3 表达载体 pYXtpi-CgGPD 的构建** :设计一对引物 CgpYt-F 和 CgpYt-R 并在上下游引物的 5' 端分别引入 *Bsu36* 和 *BamH* 限制酶位点,用于扩增包含部分上游调控序列的 *CgGPD* 基因。利用 *Ex Taq* DNA 聚合酶 PCR 反应获得 2.1 kb 的产物,胶回收纯化后分别用限制酶 *Bsu36I* 和 *BamHI* 酶切。酵母表达载体 pYX212 经过同样限制酶进行双酶切后会释放出 0.6 kb 的 TPI 启动子片段,琼脂糖电泳酶切产物,回收大片段后与酶切后的 PCR 产物进行连接、转化,获得重组质粒命名为 pYXtpi-CgGPD。

酵母转化按参考文献[10]利用醋酸锂方法进行。

## 1.5 分析方法

**1.5.1 细胞粗提液的制备** :粗酶提取物的制备参照文献[6]并略作改动:将发酵液样品离心收集菌体,菌体先经预冷的相同渗透压的培养基和破壁缓冲液各洗涤一次,再重悬于破壁缓冲液(100 mmol/L pH 7.5 的磷酸盐缓冲液,含 1 mmol/L DTT、2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 中。洗涤后的菌体按菌体湿重:总悬浮体积为 1:(8~10) 的比例用破壁缓冲液悬浮,再于 4 超声波(MSE 型)破壁(工作 1 s,间隔 3 s) 15 min。未破碎的细胞于 4 冷冻离心机中 10000 r/min 离心 20 min 而被除去,上清液即为用于酶活测定的粗酶提取物。

**1.5.2 胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶(ctGPD)酶活测定** :按 Blomberg 等<sup>[5]</sup>的方法,并略做改动。反应体系由 20 mmol/L 咪唑-HCl buffer(pH 7.0) 1 mmol/L DTT、1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.09 mmol/L NADH 和 0.67 mmol/L DHAP 组成。反应温度 30 ,以加入 DHAP 为 0 时,线性范围为 2 min。在 340 nm 处测定 30 s 和 90 s 时的吸光度。一个单位酶活定义为一分钟消耗 1 μmol/L NADH 所需的酶量。本文所有实验均进行 3 次重复,误差在允许范围之内。

**1.5.3 蛋白质含量的测定** :采用 Bradford 法[12]测定,以 BSA 为标准蛋白。

**1.5.4 胞内甘油测定** :取两份等量的 10 mL 培养液离心收集细胞,用相同的培养基洗涤细胞两次,其中一份用于细胞干重的测定。另一份悬浮于 2 mL 无菌

水中,细胞在沸水中煮沸 12 min,12000×g 高速离心 15 min,取上清液用于测定胞内甘油含量。胞外甘油:取适量发酵液 12000×g 高速离心 15 min 后,取上清液用于测定胞外甘油含量。甘油含量用 HPLC 测定(色谱柱:Bio-Rad Aminex HPX-87H;柱温 60 ;流动相:5 mmol/L 硫酸;流速:0.6 mL/min;检测器:RI, Dionex),所有样品先经 0.2 μm 纤维素微孔滤膜过滤处理。

**1.5.5 葡萄糖** :其浓度用生物传感仪 SBA-40B 测定。

**1.5.6 生物量的测定** :取 10 mL 发酵液于 1860×g 下离心 15 min,菌体用去离子水洗涤、离心两次,再于 80 干燥至恒重,测得菌体干重(DCW)。

## 2 结果

### 2.1 酵母表达载体的构建

为了研究在酿酒酵母及其衍生突变株中表达 *CgGPD* 基因对甘油合成能力和耐高渗能力的影响,分别构建了 3 种酵母表达载体。在载体所含的磷酸丙糖异构酶基因启动子(TPI)下游的多克隆位点定向插入来源于产甘油假丝酵母 *CgGPD* 基因的编码框序列,用于鉴定所克隆的该基因开放阅读框在酿酒酵母中是否具有功能。构建了重组质粒 pYXtpi-CgGPD 来鉴定 *CgGPD* 基因上游调控序列在酿酒酵母中是否具有功能。质粒 pYX212 经限制酶 *Bsu36I* 和 *BamHI* 双酶切释放出载体中 0.6 kb 的 TPI 启动子片段,然后插入 2.1 kb 包含部分上游调控序列的 *CgGPD* 基因,用于转化野生型酵母 *S. cerevisiae* W303-1A。在酵母多拷贝载体 *YEplac181* 多克隆位点的 *HindIII* 和 *Kpn* 处中定向插入 3.2 kb 的包含上游和下游调控序列的 *CgGPD* 基因,重组载体用于转化 *S. cerevisiae* 及渗透压敏感突变株 YSH642 和 YSH392,考察在渗透压敏感的突变株 *gpd1/gpd2* 和 *gpd1* 异源表达 *CgGPD* 对转化子耐高渗能力的影响。

### 2.2 *CgGPD* 基因表达提高酵母的甘油合成能力

将质粒 pYX212、pYX-CgGPD 和 pYXtpi-CgGPD

分别导入 *S. cerevisiae* W303 中获得阳性酵母转化子分别称之为 wt (pYX212)、wt (pYX-CgGPD)和 wt (pYXtpi-CgGPD)。将 3 种酵母转化子分别接种于 11% 高浓度葡萄糖的 YEPD 培养基中,分别考察了葡萄糖消耗、细胞生长和甘油合成的变化,结果如图 1 所示。由图 1-A 可知,在发酵前期 3 种转化子的糖耗速度没有显著差异,但是在发酵后期 wt (pYX-CgGPD)的糖耗速度明显加快,而 wt (pYXtpi-CgGPD)转化子也快于对照菌株 wt (pYX212),发酵结束时三者的残糖浓度分别为 2.4%、4.1%和 5.9% (W/V)。结果表明高浓度葡萄糖下表达有 *CgGPD* 基因的酵母细胞要快于对照菌株的耗糖速度。然而在整个发酵过程,3 种转化子的细胞最大生物量和细胞生长速度均没有明显的差别,其生长趋势也是一致的 (1-B)。但是由图 1-C 可以看出,3 种转化子的甘油合成能力差异显著,wt (pYX-CgGPD)菌株产甘油能力相对最高,发酵结束时甘油浓度达到 2.5%左右,wt (pYXtpi-CgGPD)酵母转化子达到 2%。而对照菌株的甘油终浓度仅为 1.1%左右,与 wt (pYX-CgGPD)相比,二者相差 2.5 倍。这一结果表明 *CgGPD* 基因及其自身调控序列能够在酿酒酵母中可表达其功能,同时 *CgGPD* 基因的表达能够显著提高酿酒酵母的甘油合成能力。

### 2.3 *CgGPD* 基因在渗透压敏感突变株 *gpd1/gpd2* 中表达当酿酒酵母细胞 *GPD1* 或 *GPD1/GPD2* 基因功能

缺失后,突变株对环境渗透压的改变十分敏感,当培养基中含有高盐或其他渗透压促进剂时,突变株的生长受到严重的抑制,甚至发生细胞死亡<sup>[6, 13]</sup>。把 YEplac-CgGPD 转化突变株 YSH642 中,获得阳性转化子。酵母转化子和阳性对照菌株 *S. cerevisiae* W303-1A 经预培养至对数生长期,以  $10^{-1}$  进行系列浓度稀释后分别点种于含有 0.6 mol/L NaCl 的 YEPD, 25% 的 YEPD 和普通 YEPD 固体培养基上,培养 3~4 d 后观察菌落生长状况,结果如图 2 所示。在不含盐的 YEPD 培养基上,无论是阴性对照菌株 (导入空载体 YEplac181 的 *gpd1/gpd2* 细胞),还是含有 *CgGPD* 的酵母转化子和阳性对照菌株,都能良好的生长,菌落形态基本一致。但是当培养基中添加 0.6 mol/L 的 NaCl 时,阴性对照菌株的生长严重受到抑制,在高渗透压胁迫环境下菌落生长缓慢,稀释至  $10^{-3}$  进行点种后已不能形成菌落。而阳性对照菌株和含有 *CgGPD* 基因的酵母转化子仍能够正常生长 (图 2)。当不同的转化子点种于高葡萄糖培养基时, *gpd1/gpd2* (YEplac-CgGPD)转化子和 *S. cerevisiae* W303-1A 能够正常生长,但 *gpd1/gpd2* (YEplac181) 对照菌株的生长能力受到一定的损伤,当细胞稀释至  $10^{-3}$  点种后,基本丧失了生长能力,而前两者细胞稀释至  $10^{-5}$  后仍然能够在高糖培养基中生长繁殖。

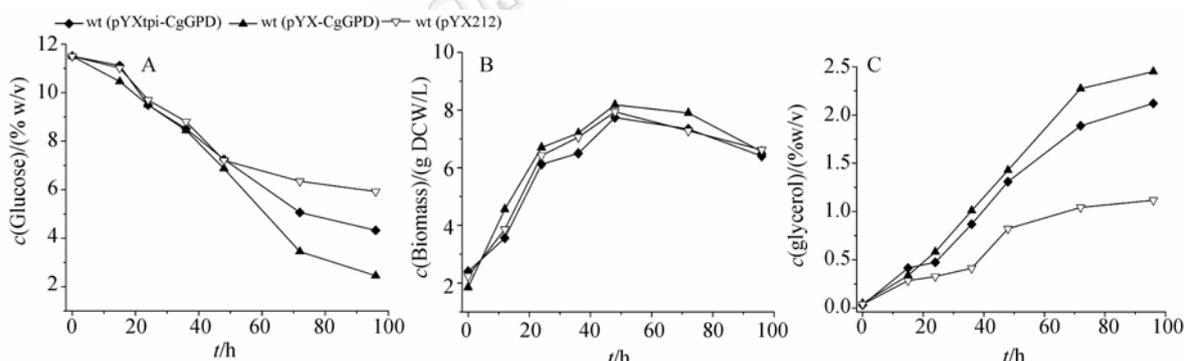


图 1 在高浓度葡萄糖培养条件下中转化子的葡萄糖消耗 (A)、菌体生长(B)和甘油合成(C)的变化过程曲线  
Fig. 1 Time courses of transformants of glucose consumption (A), cell growth (B) and lycerol production (C) in YEPD with high concentration glucose, respectively.

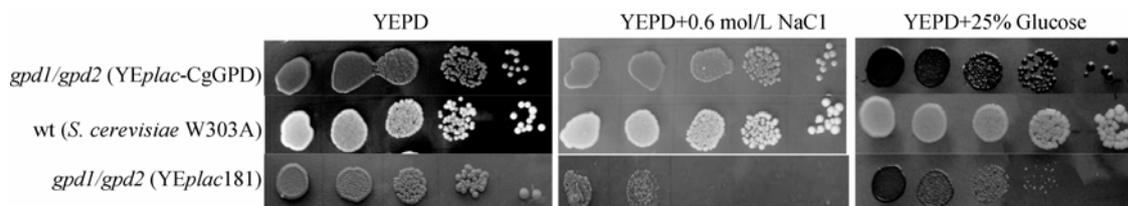


图 2 在 *gpd1/gpd2* 突变株中表达 *CgGPD* 对细胞耐高渗透压能力的影响

Fig.2 Effect of expression of *CgGPD* in wild type *S. cerevisiae* and isogenic osmosensitive mutant on osmotolerance in 0.6 mol/L NaCl YEPD and 25% glucose plate. Serial dilutions ( $10^{-1}$ - $10^{-5}$ ) of the exponentially growing cells of the strains were spotted (4  $\mu$ L) onto YEPD plates containing sodium chloride at the concentrations indicated and incubated at 30  $^{\circ}$ C for 3-4 days.

## 2.4 CgGPD 基因受渗透压胁迫诱导表达

将表达有 *CgGPD* 基因的突变株 *gpd1/gpd2* 细胞培养至对数生长后期, 加入 0.7 mol/L NaCl 后进行短时间渗透压冲击, 分别在不同时间点测定 GPD 酶活水平的变化和胞内甘油含量, 结果见表 2。在细胞未受到渗透压冲击时, 阴性对照胞内甘油含量较低, 当经高浓度盐胁迫后, 胞内甘油含量有一定的升高, 但与阳性转化子相比始终低于后者, 同时结果显示胞内 GPD 酶活的在整个过程是较低的, 并且处于稳定状态 (表 2), 说明由于缺

失 HOG 途径调控的靶基因, 突变株细胞基本失去了胞内甘油合成能力和抗渗透压胁迫的能力。对于阳性转化子而言, 当细胞受到高浓度盐冲击后, 转化子酵母能够在胞内迅速合成并积累甘油, 在 60 min 和 90 min 分别达到 14.3 和 11.7 (mg/g dw), 同时胞内 GPD 酶活在短时间内显著升高, 在 60 min 和 90 min 分别达到了 347.1 和 184.3, 与未受盐胁迫时 (0 min) 胞内 GPD 酶活相比分别提高了 10 倍和 6 倍左右 (表 2)。结果表明高渗透压胁迫环境能够显著诱导 *CgGPD* 基因的表达。

表 2 高渗透压冲击条件下 *CgGPD* 基因表达和胞内甘油的积累\*

Table 2 The induction of *CgGPD* expression and accumulation of intracellular glycerol content in *S. cerevisiae gpd1/gpd2* mutant under high osmotic stress condition

Strains	GPD specific activities (mU/mg protein)			Intracellular glycerol content (mg/g dw)		
	0 min	30 min	90 min	0 min	30 min	90 min
YEplac181	3.9	6.4	5.5	1.4	4	4.2
YEplac-CgGPD	32	327.1	184.3	5.5	14.3	11.7

\*Equal volume YEPD containing 1.4 mol/L NaCl was added to precultured samples in YEPD and then incubated. Samples were withdrawn at indicated time points and specific GPD enzyme activity and intracellular glycerol was detected.

将 *gpd1/gpd2* (YEplac-CgGPD) 转化子在高浓度葡萄糖培养基中进行甘油发酵, 结果如图 3 所示。与野生型对照菌株 wt (pYX212) (图 1) 相比, 转化子的耗糖速度、菌体生长和甘油合成能与前者没有显著差别, 发酵结束时残糖浓度和甘油含量分别为 3.3% 和 1.7%。结果表明在高糖环境中 *CgGPD* 基因的表达能够互补酿酒 *GPD1* 基因的缺失。

靶基因之一, 当 *GPD1* 基因缺失后, 酵母突变株表现出高度渗透压敏感性, 同时细胞的甘油合成能力显著下降<sup>[6]</sup>, 在野生型酵母中过量表达该基因能够显著提高细胞的甘油合成能力<sup>[14, 15]</sup>。在 *S. cerevisiae* W303-1A 中过量表达 *CgGPD* 基因的编码框能够显著提高细胞的甘油能力, 同时利用 *CgGPD* 基因自身的上游自身启动子调控该基因表达也具有相似的结果, 发酵液中甘油含量稍低于 wt (pYX-CgGPD) 转化子 (图 1-C)。结果表明 *CgGPD* 基因的自身调控序列能够在酿酒酵母中有效的表达调控, 但是其效率不及来源于酿酒酵母自身的启动子, 另一方面过量表达 *CgGPD* 不仅能够功能互补 *gpd1/gpd2* 基因的缺失, 同时可以进一步提高酿酒酵母的甘油合成能力。在酿酒酵母中, *GPD1* 基因受外界环境渗透压胁迫诱导表达调控<sup>[6]</sup>, 与非胁迫条件下相比, 其酶活水平提高 6 倍左右<sup>[16]</sup>, 然而与酿酒酵母不同的是, 当耐高渗透酵母 *Z. rouxii* 细胞受到高渗透压冲击时, *ZrGPD1* 和 *ZrGPD2* 的转录水平表达并没有显著的影响<sup>[17]</sup>, 即使在在 *S. cerevisiae gpd1/gpd2* 突变株中过量表达 *ZrGPD1* 基因, 也是相似的结果<sup>[18]</sup>。对于另一种耐高渗透酵母 *D. hansenii* 而言, 在基本培养基中胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶酶活要比相同条件下酿酒酵母细胞相应的酶活水平高 10 倍左右, 但是在渗透压诱导条件下 *DhGPD1* 基因的酶活表达水平没有酿酒酵母提高

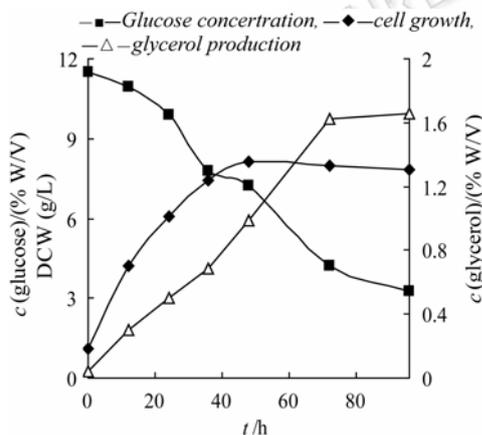


图 3 转化子 *gpd1/gpd2* (YEplac-CgGPD) 高浓度葡萄糖发酵甘油过程

Fig. 3 Growth profile, glucose consume and glycerol production of *S. cerevisiae gpd1/gpd2* mutant expressing *CgGPD* in 10% glucose YEPD medium.

## 3 讨论

在酿酒酵母中, *GPD1* 基因是 HOG 途径调控的

显著<sup>[19]</sup>。*DhGPD1* 基因能够功能互补 *S. cerevisiae* *gpd1* 突变株, 但是其表达效率并不高<sup>[20]</sup>, 说明二者的调控机制存在着一定差异。本课题组前期研究表明 *CgGPD* 基因在产甘油假丝酵母中在一定程度上受渗透压调控的<sup>[21]</sup>, 本文研究表明在酿酒酵母中 *CgGPD* 基因的表达受到渗透压诱导, 并且诱导幅度与酿酒酵母 *GPD1* 相似, 结果预示着 *CgGPD* 基因是 HOG 途径调控的靶基因之一。

### 参 考 文 献

- [1] Wang ZX, Zhuge J, Fang H, *et al.* Glycerol production by microbial fermentation: a review. *Biotechnol Adv*, 2001, 19(3): 201–223.
- [2] Hohmann S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, 66(2): 300–372.
- [3] Cronwright GR, Rohwer JM, Prior BA. Metabolic control analysis of glycerol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(9): 4448–4456.
- [4] Rep M, Albertyn J, Thevelein JM, *et al.* Different signalling pathways contribute to the control of *GPD1* gene expression by osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 1999, 145 (3): 715–727.
- [5] Blomberg A, Adler L. Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1989, 171(2): 1087–1092.
- [6] Albertyn J, Hohmann S, Thevelein JM, *et al.* *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(6): 4135–4144.
- [7] Zhuge J, Fang HY, Wang ZX, *et al.* Glycerol production by a novel osmotolerant yeast *Candida glycerinogenes*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 55(6): 686–692.
- [8] 王正祥, 诸葛健, 曹钰, 等. 产甘油假丝酵母甘油代谢关键酶的研究. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2000, 40(2): 180–187.
- [9] 陈献忠, 方慧英, 沈微, 等. 产甘油假丝酵母甘油合成关键酶编码基因的克隆. 遗传 [HEREDITAS (Beijing)], 2008, 30(4): 508–514.
- [10] Rose MD, Winston F, Hieter P. Methods in yeast genetics: a laboratory course manual. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000
- [11] Sambrook J, Fritsch, E F, Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 1st ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [12] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248–254.
- [13] Ansell R, Granath K, Hohmann S, *et al.* The two isoenzymes for yeast NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *Embo J*, 1997, 16(9): 2179–2187.
- [14] Cambon B, Monteil V, Remize F, *et al.* Effects of *GPD1* overexpression in *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine yeast strains lacking *ALD6* genes. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(7): 4688–4694.
- [15] Remize F, Roustan JL, Sablayrolles JM, *et al.* Glycerol overproduction by engineered *saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in By-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(1): 143–149.
- [16] Andre L, Hemming A, Adler L. Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>). *FEBS Lett*, 1991, 286(1-2): 13–17.
- [17] Iwaki T, Kurono S, Yokose Y, *et al.* Cloning of glycerol-3-phosphate dehydrogenase genes (*ZrGPD1* and *ZrGPD2*) and glycerol dehydrogenase genes (*ZrGCY1* and *ZrGCY2*) from the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Yeast*, 2001, 18 (8): 737–744.
- [18] Watanabe Y, Tsuchimoto S, Tamai Y. Heterologous expression of *Zygosaccharomyces rouxii* glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene (*ZrGPD1*) and glycerol dehydrogenase gene (*ZrGCY1*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 2004, 4(4-5): 505–510.
- [19] Thome P E, Trench RK. Osmoregulation and the Genetic Induction of Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase by NaCl in the Euryhaline Yeast *Debaryomyces hansenii*. *Mar Biotechnol (NY)*, 1999, 1(3): 230–238.
- [20] Thome PE. Heterologous expression of glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene [*DhGPD1*] from the osmotolerant yeast *Debaryomyces hansenii* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Microbiol*, 2005, 51(2): 87–90.
- [21] 王正祥, 诸葛健. 产甘油假丝酵母胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶编码基因的克隆. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 1999, 39(04): 321–326.

## Characterization of glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene (*CgGPD*) from the glycerol producing *Candida glycerinogenes*

Xianzhong Chen<sup>1,2</sup>, Huiying Fang<sup>3</sup>, Zhiming Rao<sup>1,3</sup>, Wei Shen<sup>1,2</sup>, Bin Zhuge<sup>1,3</sup>, Zhengxiang Wang<sup>1,2</sup>, Jian Zhuge<sup>1,3\*</sup>

(<sup>1</sup>Key Lab of Industrial Biotechnology, Education Ministry, <sup>2</sup>Center of Bioresource and Bioenergy, School of Biotechnology, <sup>3</sup>Research Center of Industrial Microbiology & Bio-process, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** [Objective] *Candida glycerinogenes*, an excellent glycerol producer, has been used for commercial scale glycerol production. Recently, we cloned and sequenced the gene encoding NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase (*GPD*) from *C. glycerinogenes* and this gene was named *CgGPD*, which plays an important role in glycerol production. However, compared with *GPD1* and *GPD2* from *S. cerevisiae*, the function of *CgGPD* was unclear to date. [Methods] In this study, a functional characterization of *CgGPD* was undertaken, using *S. cerevisiae* and its isogenic *gpd1/gpd2* mutant as expression host under high osmotic stress. [Results] Expression of *CgGPD* in wide type *S. cerevisiae*, using either TPI promoter from *S. cerevisiae* or upstream regulatory sequence of *CgGPD* accelerated glucose consumption rate and improved glycerol production significantly. In osmosensitive mutant, expression of *CgGPD* including regulatory sequence increased cells osmotic tolerance and growth profile of transformants restored similar to wide type strain under the high osmotic stress condition. Furthermore, mutants harbouring *CgGPD* accumulated the intracellular glycerol content markedly and *GPD* specific enzyme activity increased abruptly when exposed to high osmolarity medium. [Conclusion] *CgGPD* from *C. glycerinogenes* compensate the *GPD1* in *S. cerevisiae* functionally.

**Keywords:** *Candida glycerinogenes*; NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase; osmotic stress; glycerol production

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570142, 20676053) and the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (IRT0532)

\*Corresponding author. Tel: +86-510-85918109; Fax: +86-510-85125322; E-mail: jianzhuge@hotmail.com

Received: 21 May 2008/ Revised: 2 September 2008

### 科技写作中应正确使用英语缩写语

科技文章的发表是科学研究的重要组成部分。科研成果如果没有发表,就意味着科研工作没有完成。而科技文章发表的目的,就是要把科研中的新发现、或者在原有基础上的提高传播给同行、乃至跨领域以及广大普通的读者。因此,科技写作在道义上来讲,作者应该对读者负责,即:要准确、简洁、清晰地向读者传达科学研究的目的、方法、结果、结论和意义。

在科技论文的写作中,初学者经常会滥用英文缩写语。有些缩写语出现在正文、摘要、甚至题目中,让读者丈二和尚摸不着头脑。这种滥用缩写语的做法危害之深,让一个辛辛苦苦的实验结果失去了传播知识的价值和机会!因为除了作者自己,没有人能够看懂作者要传播什么信息。其实,许多年后,这些作者自己再来看自己文章中这些莫名其妙的缩写语时,他一定会后悔莫及。借此机会,根据自己学习的体会和国际上科技文章缩写语使用的惯例,和大家探讨正确使用英语缩写语的方法。

原则上,不鼓励使用缩写语。(1) 题目:根据常规,题目中一律不用缩写语。因为题目是一个非常重要的检索工具,如果作者在题目中使用缩写语,会造成人们通过检索系统找不到这篇文章,因此也就失去了传播科学技术的作用和意义。找不到文章,就更谈不上文章被人引用的次数了。(2) 摘要:同样,摘要往往是独立的,一般和正文分开被检索利用,因此也不用缩写语。对于摘要中出现的真正十分冗长的名词或短语,如果出现频率较高,例如大于6次,则可以考虑使用缩写。但是在第一次出现这个缩写语时,要把缩写语放在括号内并紧跟在缩写语所代表的名词或短语(全拼)之后,即:名词或短语全拼(缩写语),而此后就不再使用该缩写语的全名。(3) 正文:正文中缩写语的使用规则和摘要中万不得已要使用的情况一样。我这里强调万不得已就是要强调尽量不用缩写语。

有一些例外的缩写语,包括度量单位如毫升(mL)、公斤(kg)、分钟(min)等,则不必全拼全名给予解释。其实即使记不住那么多的惯例和规则,始终记住你文章的可读性和信息传播的目的,你就会负责任地正确使用科技写作的英语缩写语。期待《微生物学报》能够迅速成为一个正确使用英语缩写语的净土。

注:在中文稿件中,对于正文中第一次出现的西文缩写语,应附上完整的西文名,以避免由于翻译上的不统一而造成误解。应写为:中文名(西文全名,缩写)。

(朱阳 供稿)