

利用基因敲除技术破坏酿酒酵母乙醇脱氢酶Ⅱ基因的初步研究

赵丽娟¹ 王德良^{2,3} 程玉来¹ 周建中⁴ 葛邦国⁴

1(沈阳农业大学食品学院,沈阳,110161) 2(中国农业大学食品学院,北京,10009)

3(中国食品发酵工业研究院酿酒工程部,北京,100027)

4(新疆农业大学食品学院,乌鲁木齐,830052)

摘 要 文中采用醋酸锂转化法,将一段目的基因转入到酵母体内,破坏酵母乙醇脱氢酶Ⅱ基因的表达。通过对目的基因的扩增和乙醇脱氢酶Ⅱ酶活检测验证基因敲除情况,并通过传代抗性试验验证突变株遗传稳定性良好。

关键词 酿酒酵母,基因敲除,乙醇脱氢酶Ⅱ活性检测

啤酒的风味、泡沫及色泽是影响消费者消费的3大重要因素,其中又以风味最为突出^[1]。啤酒中乙醛含量超过50 mg/L时,产生无法下咽感;超过25 mg/L时有强烈的刺激性和辛辣感;超过10 mg/L时有不成熟的口感,成熟优质啤酒中乙醛含量一般在3~8 mg/L以下^[2]。

国内外关于降低啤酒发酵过程中乙醛的研究主要集中于工艺条件、杂菌污染等方面^[3~5],而采用基因工程技术降低乙醛的研究相对较少。从酵母代谢途径可知,控制乙醛含量的2个关键酶是乙醇脱氢酶Ⅰ(ADHⅠ)与乙醇脱氢酶Ⅱ(ADHⅡ),ADHⅠ的作用是将乙醛变成乙醇,ADHⅡ的作用是将乙醇转变成乙醛。

对于酵母DNA同源区有40bp即可进行相当高效率的重组^[6]。本文通过PCR技术获得一段带有筛选标识和同源区域的目的基因,通过醋酸锂转化法,使目的基因与酵母ADHⅡ基因发生同源重组,得到一株ADHⅡ酶活降低且遗传性能稳定的工业酿酒酵母。

1 材料与方法

1.1 菌种及质粒

C-0011酵母:中国食品发酵工业研究院菌种保

藏中心保藏,是一株工业酵母,用于酿酒。

pFA6a-kanMX4质粒:清华大学陈国强教授馈赠,是一种穿梭质粒,在大肠杆菌中对氨苄青霉素有抗性,在酵母菌中对遗传霉素G418有抗性。

1.2 培养基及试剂

1.2.1 培养基

HYLB培养基(体积比):4.3% HYLB, 2%的3-葡萄糖糖溶液, 10% 0.17mol/L KH₂PO₄ 和0.72mol/L K₂HPO₄ 磷酸盐缓冲液,用于培养大肠杆菌。

YPD培养基:1%酵母提取物,2%蛋白胨,2%葡萄糖,用于培养酵母菌。

1.2.2 主要试剂

Taq, Pfu酶由上海生工提供,AMP、G418、NAD酶由鼎国生物公司提供。

1.3 引物

引物由上海生工合成,各引物序列见表1。

为了敲除乙醇脱氢酶Ⅱ(ADHⅡ)基因,设计了一对引物F718、R719,此对引物是依酿酒酵母ADHⅡ基因和pFA6a-kanMX4质粒中kanMX基因而设计的,酿酒酵母ADHⅡ基因的序列可以通过网站<http://www.yeastgenome.org/>查询,该引物是用来扩增转入目的基因的-对引物。F718(R719)有41

表1 引物序列表

primer	Sequence 5' to 3'
F718	ACTGCTCCTTGTGTTTATATCACTTCTTGTTTCTTCTGCGTACGCTGCAGGTCGAC
R719	AAACTTCGAACACTGTGCATCTAAAGATGCTATATACTAATATCGATGAATTCGAGCTCG
F1	TAC AAT CAAC TAT CAA CTAT
R1	AAA CTA TAAA TCG TAA AGAC

(40)个碱基与酵母染色体ADHⅡ基因相同,用来进行同源重组。而F718(R719)有18(19)个碱基与质

第一作者:硕士研究生。

收稿日期:2005-06-01,改回日期:2005-08-10

粒 pFA6a-kanMX4 中 kanMX 基因相同,用来扩增 kanMX 基因以筛选转化菌株。

为了验证染色体整合情况我们设计了 F1、R1 引物,这对引物是依酵母 ADH II 基因 ORF 外侧而设计的,位于 ADH II 基因发生同源重组部位的内侧。

1.4 方法

1.4.1 聚合酶链式反应^[7]

聚合酶连式反应获得目的片段。

1.4.2 醋酸锂转化法^[8]

醋酸锂转化法转化酵母 DNA。

1.4.3 菌种验证

通过抗性验证、PCR 产物大小、PCR 产物单酶切验证。

1.4.4 单酶切实验

单酶切体系:目的 DNA 4 μL ; Buffer 0^+ 2 μL ; 酶 1 μL ; 双蒸水补加至 20 μL 。

酶切条件:37 $^{\circ}\text{C}$, 保温 2~3 h; 加入 0.5 μL 0.5 mol/L EDTA 终止反应。

1.4.5 乙醇脱氢酶 II 酶活检测^[9]

通过研磨法^[10]获得粗酶液,每隔 15 s 测定 340 nm 波长下 NADH 的吸光值。

酶活定义:单位湿细胞在单位时间使吸光值每发生 0.001 的改变定义为一个酶活。

1.4.6 突变株遗传稳定性试验

将突变株从保存的原始斜面开始,一代一代地传至新的 YPD 斜面,共传 20 代,然后进行抗性验证。

2 结果与讨论

2.1 转化目的片断的获得

以 F718、R719 为引物,以质粒 pFA6a-kanMX4 为模板进行 PCR 扩增,获得转化目的片段。

PCR 反应体系:10 \times Pfu DNA plo.buffer 2.5 μL ; 20mmol/L dNTP'S 1 μL ; 5 U/ μL Pfu polymerase 0.5 μL ; Template 2 μL ; 8.5 $\mu\text{mol/L}$ F718、R719 各 1 μL ; 加双蒸水至 25 μL 。

PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 35 cycles, 每个循环包括:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2.5 min; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

0.8% 琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 所示,转化目的片段大小为 1587bp。

2.2 突变菌株的验证

2.2.1 抗性验证

将转化菌株、原菌株,重新划含 G418 的抗性平

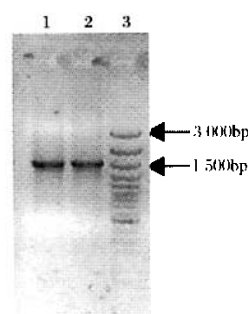


图 1 PCR 质粒 DNA 电泳结果

Lane 1,2 PCR 产物; Lane 3 GeneRulerTM100bp DNA ladder plus 板,转化菌株仍能够长出如图 2 所示,表明其体内含有 Kan^r 抗性。而原菌株在抗性平板上不长(未附)。

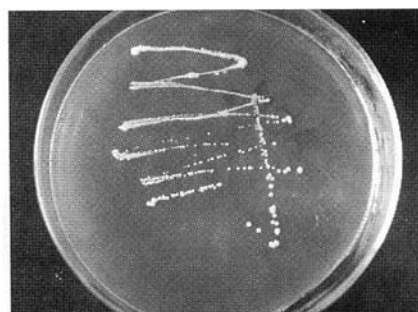


图 2 突变菌株生长于抗性平板

2.2.2 PCR 产物验证

用玻璃珠法^[7]提酵母 DNA,以 F718、R719 为引物,分别以突变株、原菌株酵母 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。

PCR 反应体系:10 \times Taq DNA plo.buffer 2.5 μL ; 20 mmol/L dNTP'S 1 μL ; 5 U/ μL Taq polymerase 0.5 μL ; Template 2 μL ; 8.5 $\mu\text{mol/L}$ F718、R719 各 1 μL ; ddwater 加至 25 μL 。

PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 35 个循环,每个循环包括:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min。

0.8% 琼脂糖凝胶电泳结果如图 3 所示,目的片段大小为 1587bp。原菌株没有转入目的片段所以扩增不出来(未附)。

上述 PCR 产物经 Hind III 单酶切得到大小为 1081bp、569bp 2 个片断,酶切结果如图 4 所示。

经过如上验证可以判定突变菌株已经含有 Kan^r 基因。

2.3 染色体整合情况的判定

以 F1、R1 为引物,以原菌株、突变株酵母 DNA

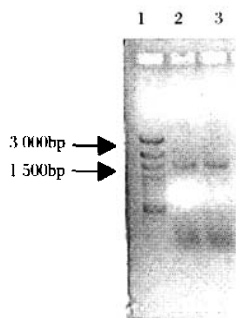


图3 PCR转化酵母DNA电泳结果

1 - GeneRuler™100bp DNA ladder plus; 2, 3 - PCR产物

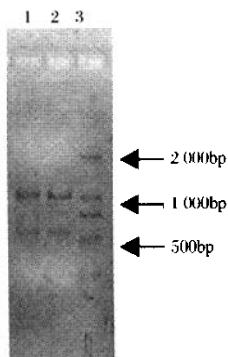


图4 转化酵母PCR产物单酶切电泳结果

1, 2 - HindⅢ单酶切结果; 3 - DNA Marker DL2000

为模板分别进行PCR扩增, PCR反应体系和反应程序同菌种验证的方法。所得结果如图5所示, PCR片段大小为1120bp。

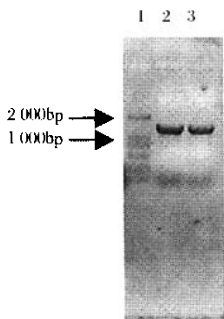


图5 PCR转化菌株分析染色体整合情况电泳结果

1 - DNA Marker DL2000; 2 - 原菌株PCR产物;

3 - 突变株PCR产物

试验表明突变株还含有ADHⅡ基因, 外源DNA片段并没有整合到酵母全部染色体上。

2.4 乙醇脱氢酶Ⅱ酶活检测

酵母乙醇脱氢酶Ⅱ在酵母发酵24 h时酶活力最强^[11], 以出发菌株为对照菌株进行比较。通过氧化铝研磨使酵母细胞破壁, 用50 mmol/L磷酸钾(pH

7.6)作为酶的缓冲液, 加少量巯基乙醇防止被氧化, 测定酶活要求过量底物限量酶。

3 mL酶活反应体系(按顺序添加): 2.5 mL 0.1 mol/L Tris-HCl buffer pH 8.8; 200 μL 30 mmol/L NAD; 25 μL粗酶液; 100 μL 15 mol/L乙醇。

酵母经24 h发酵, 原菌株酶活力为6 560U, 突变株酶活力为2 880U, 突变株乙醇脱氢酶Ⅱ活性降低到原来的50%, 进一步说明基因突变并没有发生在酵母的全部染色体上。

2.5 酵母突变株遗传稳定性试验

原菌株在含有20 μg/mL G418的YPD平板上不能生长, 而突变株在含有200 μg/mL G418的YPD平板上能够生长, 那么突变株的遗传稳定性可以通过是否对200 μg/mL G418有抗性来判定。

将传代的每一代酵母, 共20代重新涂布含200 μg/mL G418的YPD平板, 抗性传代稳定性试验结果如表2。

表2 突变株抗性传代稳定性试验¹⁾

菌株代数	原菌株	突变株
1	---	+++
2	---	+++
3	---	+++
4	---	+++
5	---	+++
6	---	+++
7	---	+++
8	---	+++
9	---	+++
10	---	+++
11	---	+++
12	---	+++
13	---	+++
14	---	+++
15	---	+++
16	---	+++
17	---	+++
18	---	+++
19	---	+++
20	---	+++

1) ---表示不长; +++表示生长。

3 结论

(1)由于ADHⅠ与ADHⅡ有较强的同源性, 通过DNAMAN、DNASTAR软件分析比对, 找出非同源区域, 成功设计PCR引物。

(2)通过基因敲除技术获得了一株ADHⅡ基因突变的工业酿酒酵母, 这使得有目的改造酵母菌株成为可能。

(3)通过突变株初步酶活测定, 显示乙醇脱氢酶

II 酶活力已降为原来的 50%。

(4) 突变株抗性遗传稳定性良好, 没有发生随着传代基因丢失现象。

有关这株突变株的其他性能指标及发酵稳定性试验还有待做进一步研究。

参 考 文 献

- 1 廖 惟, 顾国贤. 啤酒风味老化—老化机理及抗老化的研究进展[J]. 酿酒, 1996, 112(1): 1~15
- 2 顾国贤主编. 酿造酒工艺学(第二版)[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996
- 3 杨 毅, 冯景章. 啤酒酿造过程中影响乙醛变化因素的研究[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(10): 25~30
- 4 Geiger E, Pendl A. Technological factors in the formation of acetaldehyde during fermentation[J]. MBAA Technical Quarterly, 1976, 13(1): 51~63
- 5 李 宏. 啤酒中乙醛的研究[D]. 中国食品发酵工业研究院硕士学位论文. 2004
- 6 亚当斯 A, 戈特施林 D E, 凯泽 C A, 斯特恩斯 T 著. 刘子铎译. 酵母遗传方法实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2000
- 7 奥斯伯 F, 布伦特 R 等著. 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学实验指南(第三版)[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- 8 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W 著. 黄培堂等译. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002
- 9 Blandino A, Caro I, Cantero D. Comparative study of alcohol dehydrogenase activity in flor yeast extracts[J]. Biotechnology Letters, 1997, 19(7): 651~654
- 10 Fernández M a J, Gómezmoreno C, Ruizamil M. Induction of isoenzymes of alcohol dehydrogenase in “flor” yeast[J]. Arch Mikrobiol, 1972, 84: 153~160
- 11 Millán C, Mauricio J C, Ortege J M. Alcohol and aldehyde dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*: specific activity and influence on the production of acetic acid, ethanol and higher alcohols in the first 48h of fermentation of grape must[J]. Microbios, 1990, 64: 93~101

Research on Deletion of *Saccharomyces cerevisiae* Alcohol Dehydrogenase II Gene

Zhao Lijuan¹ Wang Deliang^{2,3} Cheng Yulai¹ Zhou Jianzhong⁴ Ge Bangguo⁴

1 (Shenyang Agricultural University, Shenyang, 110034, China)

2 (College of Food Science, China Agricultural University, Beijing, 100094, China)

3 (China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing, 100027, China)

4 (Xinjiang Agricultural University, Wulumuqi, 830052, China)

ABSTRACT In this paper, we transformed a gene into yeast genome so as to delete Alcohol Dehydrogenase II (ADH II) by LiAc method. The mutant gene could be identified by PCR and test enzyme activity of ADH II. The mutant strain inheritance was well by transfer of culture in addition of G418 inhibitor.

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, gene knock-out, ADH II activity test

行业动态

安德利大连厂投产

安德利公司的第 6 个浓缩苹果汁企业——大连安德利果蔬有限公司于 2005 年 10 月 18 日在大连瓦房店举行了投产仪式。瓦房店是我国少有的小国光苹果树保留较好的苹果产区, 与山东、陕西等苹果产量大幅下降的产区比较, 瓦房店 2005 年的苹果可谓是大丰收, 这对安德利公司提高高酸浓缩苹果汁产量, 并部分弥补其他工厂产量的不足, 起到一定作用。

安德利大连工厂于 2005 年 5 月开工建设, 实现了当年立项、当年开工、当年竣工、当年试车、当年投产, 完成一期投资 1 亿元, 占地 8.6 万 m², 年加工 12 万 t, 今后将再投资二期、三期工程, 用于扩大苹果加工能力和对葡萄的加工。

2005 年全国性苹果原料减产, 比 2004 年减产约 50%, 企业的苹果收购价已达 600 元/t, 比上年上涨 50%, 预计今后还会上涨。目前浓缩苹果汁在我国已成为资源制约性的产业。