

# 酵母菌 3-磷酸甘油脱氢酶基因(*gpd1*)的克隆及其在高渗透胁迫下 mRNA 转录水平的差异

张 凡<sup>1</sup> 马向东<sup>2,3</sup> 余华顺<sup>2</sup> 姚 娟<sup>2</sup> 郭永豪<sup>3</sup> 邢学森<sup>4</sup> 阎淳泰<sup>1</sup> 梁运祥<sup>1</sup>

1(华中农业大学农业微生物国家重点实验室, 武汉, 430070) 2(湖北安琪酵母股份有限公司博士后工作站, 宜昌, 443003)

3(河南农业大学生物技术与食品科学学院, 郑州, 450002) 4(湖北三峡大学医学院, 宜昌, 443003)

**摘 要** YY、FHS 和 WFB 是生产中常用的酵母菌株。在高渗透胁迫下的生长速度依次为 FHS、YY、WFB。克隆 *gpd1* 基因片段并测序, 再与 NCBI 公布的 *gpd1* 序列(X76859)比较, WFB、YY、FHS 的同源性分别为 99.32%、99.83%、99.83%, YY、FHS 菌株的 *gpd1* 序列与 NCBI 上的 *gpd1* 序列(X76859)对应的氨基酸序列完全一致, WFB 与它们的同源性只有 98.5%。用不同浓度的 NaCl 培养酵母细胞进行渗透胁迫处理, RNA 点杂交显示 YY、FHS 菌株 *gpd1* 基因的 mRNA 表达量在 NaCl 浓度上升时候有上升的趋势; WFB 菌株 *gpd1* 基因的 mRNA 表达量随 NaCl 浓度的上升逐渐降低。实验结果显示, *gpd1* 基因 mRNA 转录水平与抗高渗能力相关。

**关键词** *gpd1*, 酵母, 渗透压

酵母细胞具有适应环境不同渗透压的能力, 当环境的渗透压上升时, 细胞内部会积累一些特殊溶质使细胞内外的渗透压保持平衡。这些能高浓度存在而不对胞内酶产生抑制或失活作用的溶质就被称为相容性溶质。相容性溶质可分为 3 大类: 离子、氨基酸、多羟基化合物及它们的衍生物。甘油是酵母细胞中最主要的相容性溶剂<sup>[1,2]</sup>。在高渗条件下酵母细胞主要是通过增加甘油的合成来实现胞内甘油的积累。在这一过程中 3-磷酸甘油脱氢酶 GPD1 的作用至关重要。糖酵解途径中的中间产物磷酸二羟丙酮在 GPD1 的作用下生成 3-磷酸甘油, 通过 3-磷酸甘油磷酸酶的作用生成甘油。*gpd1* 基因的突变株无法在高渗透压的环境(1.0 mol/L NaCl)中生长。并且, 野生型菌株在高渗透胁迫下 *gpd1* 基因转录的 mRNA 量会明显上升<sup>[3,4]</sup>。

在工业生产中使用耐高渗能力强的菌种会极大地提高生产效率, 因此筛选耐高渗能力强的菌株已成为酵母菌种选育的一个重要方向。文中通过对比生产中常用的 3 个酵母菌株(YY、FHS、WFB)编码 3-磷酸甘油脱氢酶的基因序列及其在高渗透胁迫下 *gpd1* 基因转录 mRNA 水平的差异, 再联系这 3 个酵母菌株耐高渗能力的差异, 试图找出 *gpd1* 基因的序列及在高渗透胁迫下 *gpd1* 基因转录 mRNA 水平对酵母菌株耐高渗能力的影响, 为今后的菌种改良建立一定的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与质粒

菌株: 酵母菌株 YY、FHS 和 WFB 均由安琪酵母股份有限公司提供。宿主菌: *E. coli* DH5 $\alpha$  菌株, 由安琪酵母股份有限公司提供。克隆载体: pUCm-T 载体(上海生物工程技术服务有限公司)。

### 1.2 主要试剂及试剂盒

*Xba*I、*Hind* III(华美生物工程公司); Pfu 酶(Bio Basic 公司); 生物素标记试剂盒、光检测试剂盒和 DNA Ladder(纽英伦生物技术(北京)有限公司); UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒、TRIZOL(上海生物工程技术服务有限公司)。

### 1.3 培养基和培养条件

LB 培养基<sup>[6]</sup>用于培养细菌, 大肠杆菌在 37℃ 培养; YPD 培养基(成分: 蛋白胨 10g、葡萄糖 20g、琼脂 15~20g、蒸馏水 1 000 mL)用于酵母菌培养, 培养温度 30℃。

### 1.4 DNA 和 RNA 的提取

酵母基因组 DNA 参考文献[5]的方法, 总 RNA 用 Trizol 一步法提取, 按产品说明书进行操作。

### 1.5 以酵母基因组 DNA 为模板的 PCR 扩增

#### 1.5.1 引物的设计合成

参考 NCBI 上的 *gpd1* 的基因序列(X76859), 利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计能扩增至 *gpd1* 全序列的一对引物, 上游引物 *gpd1* L: TTGAATTCATGTCTGCTGCTGCT(含 *Eco*R I 酶切位点); 下游引物: *gpd1* R: CTACATGAAG

第一作者: 硕士研究生。

收稿日期: 2004-11-19

ATTAGAAGCTTGC(含 *Hind* III 酶切位点)。

### 1.5.2 PCR 扩增

参考文献[6]的方法,采用 50  $\mu$ L 反应体系:10 $\times$ 缓冲液 5  $\mu$ L、dNTP(20 mmol/L)1  $\mu$ L、Pfu 酶(5U/ $\mu$ L)0.5  $\mu$ L、*gpd1* L(20  $\mu$ mol/L)2.5  $\mu$ L、*gpd1* R(20  $\mu$ mol/L)2.5  $\mu$ L、模板的 DNA 5  $\mu$ L、H<sub>2</sub>O 33.5  $\mu$ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,54 $^{\circ}$ C 3 min,72 $^{\circ}$ C 1 min 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。

### 1.6 扩增产物的纯化与克隆

用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收 PCR 扩增片段,与 pUCm-T 载体连接、CaCl<sub>2</sub> 转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。蓝白斑筛选转化子,酶切鉴定阳性克隆。

### 1.7 克隆片段测序与氨基酸序列分析

由上海生物工程技术服务有限公司测序,用 Vector NTI 7.0 软件分析 DNA 与氨基酸序列的同源性,核酸序列的翻译采用 Primer Premier 5.0 软件进行。

### 1.8 RNA 的点杂交

用生物素标记试剂盒标记目的探针,按产品说明书进行操作。RNA 点杂交按照参考文献[5]的方法,用紫外分光光度计检测 RNA 样品的 OD<sub>260</sub> 和 OD<sub>280</sub> 的值,计算 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值,判断 RNA 的纯度,根据 OD<sub>260</sub> 的值计算样品中 RNA 的浓度,为了避免膜上点样过多,RNA 的总量不应超 5  $\mu$ g,现在使每份上样溶液中均含 5  $\mu$ g RNA,根据样品中 RNA 的浓度计算每个样品的上样体积,然后按照计算的体积吸取样品点在杂交膜上,用光检测试剂盒检测杂交信号的强弱并用 X 光胶片记录杂交信号,用 LabWorks 软件对 X 光胶片的扫描图片进行分析。

### 1.9 酵母菌株在高渗胁迫下生长速度的检测

活化菌种,至 OD<sub>660</sub> = 1.0,接种 2 mL 菌液到待测管(原有 8 mL YPD 培养基)中,每一个菌株设 3 个处理和 1 个对照管,再向 3 个处理管样品中分别加入一定量无菌的 NaCl,使其 NaCl 的终浓度分别达到 1%、3%、5%,30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 6 h,取出所有样品迅速冰浴,然后将样品取出进行稀释平板计数(稀释平板计数参考文献[6]的方法)。

### 1.10 点杂交样品的处理

活化菌种,至 OD<sub>660</sub> = 1.0,接种 1 mL 菌液到待测管(原有 5 mL YPD 培养基)中,培养 5 h 进入对数生长期。每一个菌株设 3 个处理和 1 个对照管,向 3 个处理管样品中分别加入一定量无菌的 NaCl,使其

NaCl 的终浓度分别达到 1%、3%、5%,所有样品 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 30 min,取出所有样品迅速冰浴,抽提各样品的总 RNA。

## 2 结果与分析

### 2.1 3 株酵母菌株 YY、FHS、WFB 耐高渗能力的强弱

设对照组的菌数为 100,当 NaCl 为 1%,相对应 YY 的菌数为 65.3、FHS 79.0、WFB 51.9;当 NaCl 为 3%,YY 38.6、FHS 49.1、WFB 38.3;YY 20.2、FHS 18.2、WFB 19.5。

由表 1 和图 1 可见,FHS 菌株在 NaCl 的浓度为 1%和 3%时生长速度明显高于 YY 和 WFB 菌株,另外 YY 菌株只在 NaCl 的浓度为 1%时生长速度明显高于 WFB 菌株。当 NaCl 的浓度为 5%时,这 3 个菌株的生长速度均很慢,显然培养 6 h 无法显示其生长速度的差异。因此,FHS 菌株耐高渗能力最强、YY 菌株次之、WFB 菌株最差。

表 1 3 个酵母菌株在不同浓度 NaCl 处理下的菌体浓度及不同处理之间的比例关系

样 品	菌数 $\times 10^{-7}/\text{mL}$	不同处理之间的比例关系/%(设对照组的菌数为 100%)
对照(YY)	11.8	100
1% NaCl 处理(YY)	7.70	65.3
3% NaCl 处理(YY)	4.55	38.6
5% NaCl 处理(YY)	2.38	20.2
对照(FHS)	11.2	100
1% NaCl 处理(FHS)	8.85	79.0
3% NaCl 处理(FHS)	5.50	49.1
5% NaCl 处理(FHS)	2.04	18.2
对照(WFB)	8.48	100
1% NaCl 处理(WFB)	4.40	51.9
3% NaCl 处理(WFB)	3.25	38.3
5% NaCl 处理(WFB)	1.65	19.5

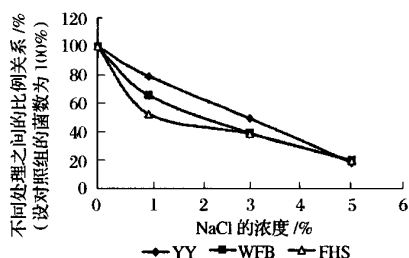


图 1 酵母生物量随 NaCl 浓度变化曲线图

### 2.2 *gpd1* 基因克隆

抽提酵母基因组 DNA,以 *gpd1* L 和 *gpd1* R 为引物对基因组 DNA 进行 PCR 扩增。结果如图 2 和图 3 所示,PCR 片段大小约为 1.2kb。用 *Eco*R I、

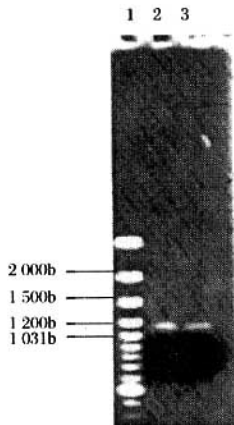


图2 WFB菌株基因 *gpd1* PCR 扩增图谱  
1:DNA ladder, 2,3:WFB菌株 PCR 产物

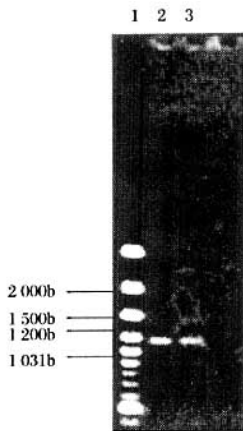


图3 YY、FHS菌株基因 *gpd1* PCR 扩增图谱  
1:DNA ladder, 2:YY菌株 PCR 产物,3:FHS菌株 PCR 产物

*Hind* III 双酶切筛选阳性重组克隆子,结果如图4所示,片段大小约为1.2 kb。

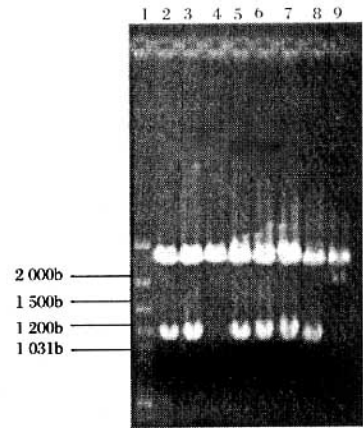


图4 重组克隆子限制性内切酶电泳图谱  
1:DNA ladder, 2,3:YY 4~6:FHS 7~9:WFB  
(用 *E. coli* RI、*Hind* III 双酶切重组质粒)

### 2.3 克隆片段与 *gpd1* 序列(X76859)间同源性分析

测序结果已上传国际基因库(GenBank),序列号分别为 AY598965 (WFB)、AY598968 (FHS)、AY598967(YY)。用 Vector NTI 软件与克隆到的 *gpd1* 基因片段 *gpd1* 序列(X76859)进行比对,同源性分别为 99.32%、99.83%、99.83%。

将这些序列用 Primer Premier 5.0 转化为氨基酸序列,再用 Vector NTI 比对氨基酸序列结果,WFB、YY、FHS 菌株的 *gpd1* 序列对应的氨基酸序列与 NCBI 上查到的 *gpd1* 序列对应的氨基酸序列的同源性分别为 98.5%、100%、100%

#### 核苷酸序列对比结果:

	1	46	234	303	375	427	491	548	588	673	738
(FHS- <i>gpd1</i> )	ATG..TGAA..A C G..TGC..TTC..TTC..CTA..AAC..CCG..ACC..ACG										
(WFB- <i>gpd1</i> )	ATG..TG G A..ATG..TAC..T C C..T G C..C C A..AGC..CCG..A T C..A T G										
(YY- <i>gpd1</i> )	ATG..TGAA..ATG..TAC..TTC..TTC..CTA..AAC..C T G..ACC..ACG										
<i>gpd1</i> (X76859)	ATG..TGAA..ATG..TAC..TTC..TTC..CTA..AAC..CCG..ACC..ACG										
	767	810	1176								
(FHS- <i>gpd1</i> )	..GAA..GAG..TAG										
(WFB- <i>gpd1</i> )	..G T A..GAG..TAG										
(YY- <i>gpd1</i> )	..GAA..G G G..TAG										
<i>gpd1</i> (X76859)	..GAA..GAG..TAG										

#### 氨基酸序列对比结果:

	16	143	164	183	225	256	401
(FHS- <i>gpd1</i> )	MSA..LNA..DSH..LLS..ANI..RPY..VEG..DLHED						
(WFB- <i>gpd1</i> )	MSA..L D A..D A H..L P S..A S I..R S Y..V V G..DLHED						
(YY- <i>gpd1</i> )	MSA..LNA..DSH..LLS..ANI..RPY..VEG..DLHED						
<i>gpd1</i> (X76859)	MSA..LNA..DSH..LLS..ANI..RPY..VEG..DLHED						

## 2.4 在高渗胁迫下这 3 个酵母菌株 *gpd1* 基因 mRNA 转录水平的差异

测序结果表明 *gpd1* 基因片段的同源性很高,酶切并回收了 YY 菌株上的 *gpd1* 基因片段作为的模板标记杂交探针。抽提总 RNA,样品  $OD_{260}/OD_{280}$  的比值  $>1.9$  可用于点杂交。用 LabWorks 软件分析在不同浓度的 NaCl 处理下 3 个菌株的 *gpd1* 基因的表达(图 5),并根据各点的亮度对应值推测 3 个菌株在 NaCl 处理下 *gpd1* 表达的 mRNA 量的变化趋势(图 6)。

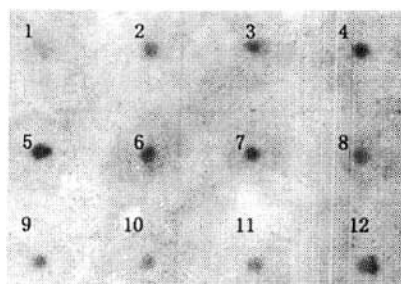


图 5 在不同浓度的 NaCl 处理下 3 个菌株的 *gpd1* 基因 mRNA 的转录

1~4:分别为 YY 菌株的对照、1% NaCl 处理、3% NaCl 处理、5% NaCl 处理的杂交信号。

5~8:分别为 WFB 菌株的对照、1% NaCl 处理、3% NaCl 处理、5% NaCl 处理的杂交信号。

9~12:分别为 FHS 菌株的对照、1% NaCl 处理、3% NaCl 处理、5% NaCl 处理的杂交信号。

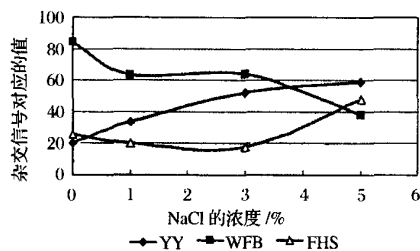


图 6 3 个菌株在 NaCl 处理下 *gpd1* 表达的 mRNA 量的变化趋势

各杂交点亮度对应值分别为:对照组 WFB 84、YY 20、FHS 26;1% NaCl 处理组 WFB 63、YY 34、FHS 20;3% NaCl 处理组 WFB 64、YY 52、FHS 18;5% NaCl 处理组 WFB 38、YY 59、FHS 48。

数据可以看出 YY 菌株在 NaCl 处理下 mRNA 的表达量随 NaCl 浓度的上升明显增加,WFB 菌株的在 NaCl 处理下 mRNA 的表达量随 NaCl 浓度的上升逐渐降低。FHS 菌株的 mRNA 的表达量在 NaCl 浓度为 1% 和 3% 时较正常状态 mRNA 的表达量略有

下降,但当浓度达到 5% mRNA 的表达量急剧上升。

## 3 讨论

WFB 菌株耐高渗能力较弱可能与其 *gpd1* 基因序列有关。从序列对比可以看出 WFB 菌株的 *gpd1* 基因序列较其他菌株差异最大,尤其是氨基酸序列,而其他的几个菌株的序列完全一样,而 WFB 则有 6 个氨基酸残基与其他的菌株不同,这很有可能是导致耐高渗能力较差的原因之一。由于现在还没有酵母甘油-3-磷酸脱氢酶由 X 衍射构建得到的三维立体图,因此无法推断这 6 个氨基酸残基所处的空间位置,如果,其中的几个恰好位于甘油-3-磷酸脱氢酶的活性中心,极有可能导致酶活力的降低,使 WFB 菌株对高渗胁迫的抵御能力下降。

在不同浓度 NaCl 处理下, *gpd1* 基因转录水平的变化趋势与菌株的抗高渗能力具有一定的相关性。随着 NaCl 的浓度的增加,YY 和 FHS 的 *gpd1* 基因转录的 mRNA 量明显升高,WFB 则正好相反,它的 *gpd1* 基因转录的 mRNA 量随 NaCl 浓度上升而降低,同时 WFB 菌株在高 NaCl 的浓度下的生长速度明显低于 FHS 和 YY。这说明在高渗胁迫下, *gpd1* 基因 mRNA 转录水平呈上升趋势的菌株更能适应高渗环境。导致 *gpd1* 基因 mRNA 转录水平的变化趋势不同的原因可能是由于 WFB 菌株 *gpd1* 基因的上游调控序列与 YY 和 FHS 存在着一定的差异,导致一些受高渗调控的转录因子如 HOG1、HOT1 与上游调控序列的结合能力下降<sup>[7,8]</sup>,最终导致 WFB 菌株的基因会在环境渗透压上升时转录受到抑制。另外,还有一种可能是 WFB 菌株传导渗透信号的 HOG 途径上的一些激酶的酶活力丧失或降低,导致信号无法正常传导,最终导致 WFB 菌株的 *gpd1* 基因会在环境渗透压上升时无法增加转录。

从上面的分析可以认为有可能是 WFB 菌株 GPD1 酶活力下降和 WFB 菌株的 *gpd1* 基因在环境渗透压上升时降低转录共同导致了 WFB 菌株耐高渗能力弱于 FHS 和 YY 菌株。酵母对高渗环境的适应过程是一个极其复杂的过程,如与酵母细胞耐高渗有关联的胞内甘油的积累,就有 4 种途径(1)通过合成代谢途径增加甘油的合成;(2)关闭细胞膜上的促进扩散蛋白避免新合成的甘油扩散到细胞外;(3)调控甘油分解代谢的作用;(4)从环境吸取甘油, *gpd1* 基因只在甘油的生物合成途径中扮演重要的作用<sup>[9,10]</sup>。因此,不能仅仅从 *gpd1* 基因的序列和

*gpd1* 基因在环境渗透压上升时的诱导表达的 mRNA 量的差异来解释不同菌株抗高渗能力的差异。

酵母对高渗环境的适应过程是一个极其复杂的过程,本文的工作只是从一个侧面分析了生产中常用的 3 个菌株抗高渗能力的差异的原因,并将展开更加深入地研究以揭示问题的本质,如:通过 X 衍射构建甘油三磷酸脱氢酶的三维立体结构图,通过三维立体结构图分析 3 个菌株的甘油三磷酸脱氢酶氨基酸序列存在差异的具体位置,由此分析它们的酶活力是否存在差异;克隆并对比分析 3 个菌株 *gpd1* 基因上游的调控序列,从这个角度推测导致 3 个菌株 *gpd1* 基因转录 mRNA 水平的差异的原因。完成这一系列的研究将为今后改造筛选耐高渗酵母菌株提供理论基础。

#### 参 考 文 献

- 1 余秉琦, 诸葛健. 酵母细胞对高渗环境的适应与胞内甘油的积累[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(2): 25~28
- 2 Rep M, Albertyn J, Thevelein J M, et al. Different signalling pathways contribute to the control of GPD1 gene expression by osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Microbiology, 1999, 145: 715~727
- 3 Albertyn J, Hohmann S, Thevelein J M, 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[J]. Molecular and Cellular Biology 1994, 14(6): 4 135~4 144
- 4 Larsson K, Ansell R, Eriksson P, et al. A gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Mol. Microbiol, 1993, 10(5): 1 101~1 111
- 5 Sambrook J, Russell D. 分子克隆实验指南(第三版)(中译版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002
- 6 赵 斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 69~72
- 7 Hohmann S. Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in yeasts microbiology and molecular [J]. Biology Reviews, 2002, 66(2): 300~372
- 8 Raitt D C, Posas F, Saito H. Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAP kinase pathway[J]. The EMBO Journal, 2000, 19(17): 4 623~4 631
- 9 Tamas M J, K Luyten K, Sutherland F C, et al. Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation[J]. Mol Microbiol, 1999, 31(4): 1 087~1 104
- 10 Holst B, Lunde C, Lages F, et al. GUP1 and its close homologue GUP2, encoding multimembrane-spanning proteins involved in active glycerol uptake in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Molecular Microbiology, 2000, 37(1): 1 365~2 958

## Study on Yeast Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase Gene Cloning and Its mRNA Transcriptional Level in the Hyper-osmotic Conditions

Zhang Fan<sup>1</sup> Ma Xiangdong<sup>2</sup> Yu Huashun<sup>2</sup> Yao Juan<sup>2</sup> Guo Yonghao<sup>3</sup>  
Xing Xueseng<sup>4</sup> Yan Chuntai<sup>1</sup> Liang Yunxiang<sup>1</sup>

1 (College of Life Science & National Key laboratory of Agriculture Microbiology, Wuhan, 430070, China)

2 (Postdoctoral Programme of Hubei Angel Yeast Co., Ltd, Yichang, 443003, China)

3 (College of Biotechnology & Food Science, Henan Agriculture University, Zhengzhou, 450002, China)

4 (Medicine School of China Three Gorges University, Yichang, 443003, China)

**ABSTRACT** YY, FHS and WFB are most commonly used yeast strains. When cultivated in hyper-osmotic conditions, the growth rate of FHS is high, followed by YY and WFB. The results of cloning and sequencing of *gpd1* gene from these strains indicate that the nucleotide homologies of the *gpd1* gene fragments from strains WFB, YY, FHS 99.32%, 99.83%, 99.83% compared with the sequences presented on the NCBI website (X76859). As to amino acids, the compared homology are 98.5%, 100%, 100% respectively. Disposed with different concentration of NaCl as hyper-osmotic stress, the RNA Dot blotting results show that the mRNA transcriptional levels of *gpd1* gene increased for YY, FHS strains whereas decrease for strain WFB as the concentration of NaCl increase. It is found that the yeast ability to endure hyper-osmotic environment could be strengthened by improve the transcriptional mRNA levels of *gpd1* gene.

**Key words** *gpd1*, yeast, osmolarity