

耐高温酿酒酵母单倍体的 RAPD 分析

朱旭芬 吴雪昌 林 靓 曾云中*

(浙江大学生命科学院, 杭州 310012)

摘 要 采用随机孢子分析的方法, 从酿酒酵母的耐热菌株 HU-TY-1 中分离了单倍体 HZ 系列, 对其进行生长曲线和发酵力的测定。选取 HZ-21、HZ-84 菌株进行随机扩增多态性 DNA 片段的分析, 显示单倍体菌株与它们的二倍体亲株以及原始出发菌株 LK 的基因组之间确实存在着多态性 DNA 片段, 其中有些可能与菌株的耐热性相关。

关键词 酿酒酵母, 单倍体, RAPD, 发酵力

中图分类号 Q939.403 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)05-0557-04

我们曾对酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*) 耐热菌株 HU-TY-1 以及其出发菌株 LK 的基因组 DNA 进行了随机扩增多态性 DNA (RAPD) 的研究, 发现了两基因组 DNA 之间确实存在着一些多态性 DNA 片段, 推测这些片段中部分可能与耐热性状有关^[1]。但由于 HU-TY-1 和 LK 菌株都是二倍体菌株, 而 RAPD 的分析又是一个显性标记, 所以有必要通过分离单倍体菌株作进一步分析, 以便确定与耐热相关的基因片段。本实验以耐热菌株 HU-TY-1 为亲本, 通过产孢随机分离单倍体菌株 HZ 系列, 并对它们进行交配型鉴定、生长曲线、发酵效率的测定以及 RAPD 的分析。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种: 所用菌株为酿酒酵母 *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* 系列的单倍体与二倍体菌株, 见表 1。

表 1 实验菌株

Table 1 Experimental strain

Strain	Gene type	Source or reference
LK	a/a diploid	[1]
HU-TY-1	a/a diploid	Selected from LK strain ^[2,3]
Y30	Haploid, <i>MATa his1</i>	Provided by professor LI YY
Y162	Haploid, <i>MATa leu1 trp1 ura3-52</i>	Provided by professor LI YY

1.1.2 试剂: 蜗牛酶, Lyticase, RNaseA 与 *Taq* 酶等

购自上海生工生物工程公司。PCR Marker 是以 pBR322 用 6 种内切酶水解获得的产物, 购自华美生物工程公司。10mer 随机引物购自浙江博联生物技术有限公司, SANGON 公司的产品。

1.2 方 法

1.2.1 单倍体的获得: 首先将在 YEPD 培养基^[4]上活化的耐热菌株 HU-TY-1 的菌悬液置于 58℃ 恒温水浴中加热, 不断振荡, 隔一定的时间取样稀释涂平板, 37℃ 培养 2 天, 通过平板菌落记数, 确定营养菌株的致死处理时间。

HU-TY-1 菌株在预产孢培养基^[5]经 4d 培养后, 转接至产孢培养基^[4]上 25℃ 培养 1 周。收集菌体, 用 0.85% 生理盐水悬浮洗涤 1~2 次, 加入最终浓度 2% 蜗牛酶 33℃ 培养 4h 破子囊壁, 使孢子释放。利用孢子比营养细胞耐热特性^[6], 采用 58℃ 高温致死处理营养细胞, 然后适量稀释涂平板进行培养, 挑取小菌落, 并利用甘油培养基^[7]除去呼吸缺陷型菌株。通过 DNA 含量、细胞体积测定以及产孢培养基上生长情况等确认单倍体, 并用标准单倍体菌株 Y30、Y162 与其交配, 确定交配型^[8]。

1.2.2 生长曲线和发酵曲线的测定: 将待测菌株于 YEPD 斜面上活化 2 次, 接入液体培养基上, 适当温度下振荡培养, 在 650nm 波长条件下测定 OD 值, 绘制生长曲线。以相同接种量接入 YEPD 液体培养基, 分别在 33℃ 或 40℃ 条件下静止培养 72h, 每隔 12h 测 CO₂ 失重, 并计算发酵效率^[3]。

收稿日期: 2001-01-11, 修回日期: 2001-05-29。

基金项目: 浙江省自然科学基金资助 (395177)。

* 通讯作者。Tel: 86-571-88805551; Fax: 86-571-87961267; E-mail: zhuxufen@mail.hz.zj.cn

发酵效率 = CO₂ 失重量 / (培养基中葡萄糖量 × 0.49) × 100%

1.2.3 RAPD 分析:参照少量制备方法^[9],进行菌株的 DNA 提取,用作 RAPD 反应的模板。利用前期实验优化后的 RAPD 反应程序^[1],进行 RAPD 分析。

2 结 果

2.1 单倍体菌株获得与鉴定

将酿酒酵母 HU-TY-1 菌株的营养细胞在 58℃ 水浴中热处理不同时间,并通过平板菌落计数计算其存活率(图 1)。结果显示,随着处理时间的增加,

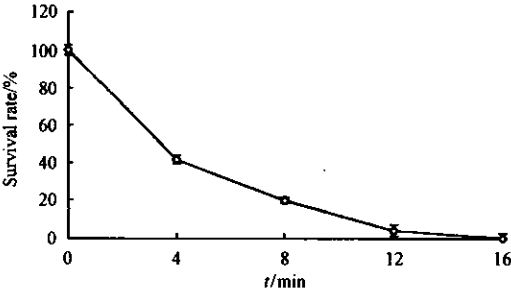


图 1 营养细胞 58℃ 处理不同时间后的存活率
Fig.1 Survival rate of strain at 58℃

营养细胞的存活率逐渐下降,到 16min 时,存活率几乎等于零。所以将产孢培养基获得 HU-TY-1 培养物破壁处理,经 58℃ 15min 的热处理后进行培养。并根据表 2 情况进行单倍体筛选,初步获得单倍体 147 株。利用标准单倍体菌株 Y30、Y162 对分离获得的单倍体菌株进行交配型鉴定,观察单倍体、双倍体以及交配结合的哑铃型细胞形态结构(图 2)。测

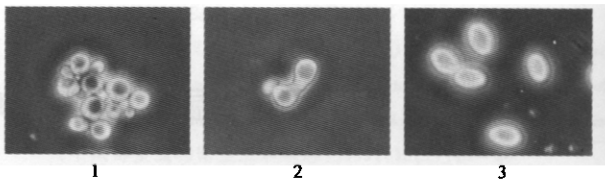


图 2 酵母细胞形态
Fig.2 Cell morphology of *S. cerevisiae*
1. Haploid; 2. Mating of haploid and Y30; 3. Diploid

定其 DNA 含量、细胞大小、推测核倍性。确定了 HZ 系列 6 株典型的单倍体菌株(表 3)。

2.2 生长曲线与发酵曲线测定

对 HZ 系列的单倍体菌株分别在 37℃ 和 40℃ 条件下,进行生长曲线的测定(图 3、图 4),结果显示所得的单倍体菌株在 37℃ 时的生长情况比 40℃ 要好,表明获得的多数单倍体菌株对热较为敏感。其中 HZ-21 菌株在两个不同温度下生长情况变化不大,

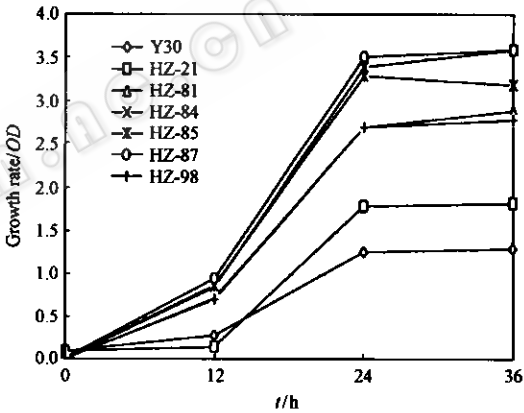


图 3 单倍体在 37℃ 时的生长曲线
Fig.3 Growth curve of haploid at 37℃

表 2 酵母单倍体与二倍体比较

Table 2 Comparison of haploid and diploid of *S. cerevisiae*

Strain	Cell morphology	Colony	Liquid culture	Sporulated medium	Budding
Haploid	Spheroid	small, different shape	Cell gather	No sporulation	Any buds one cell
Diploid	Ellipsoid	large, same shape	Cell disperse	Sporulation	One bud one cell

表 3 来源 HU-TY-1 的单倍体菌株

Table 3 Haploid strains from HU-TY-1

Strain	Mating type	DNA content(10 ⁻⁸ μg/cell)	Multiplidy	Cell diameter or size/μm	Cell volume/μm ³
HU-TY-1	a/a	6.5 ± 0.3	2n	7.22 × 6.48	176.78
HZ-21	a	3.4 ± 0.1	n	5.7	96.92
HZ-81	a	3.3 ± 0.2	n	5.13	70.65
HZ-84	a	3.4 ± 0.2	n	5.7	96.92
HZ-85	a	3.4 ± 0.2	n	5.32	78.80
HZ-87	a	3.4 ± 0.1	n	5.51	78.80
HZ-98	a	3.3 ± 0.1	n	5.13	70.65

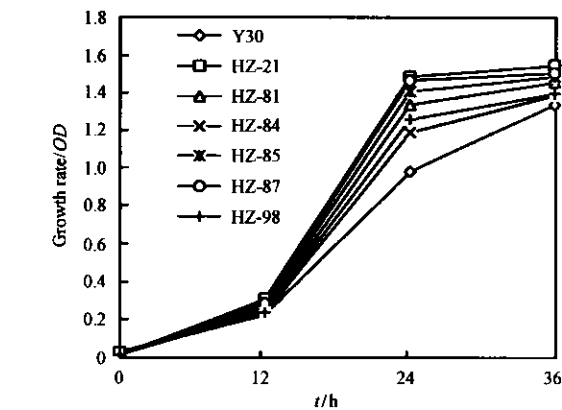


图4 单倍体在 40℃时的生长曲线

Fig.4 Growth curve of haploid at 40℃

而 HZ-84 菌株在 37℃下明显比 40℃下生长要好,推测 HZ-84 菌株对热的变化比 HZ-21 菌株要敏感。

利用 CO₂ 失重法,对单倍体 HZ-21、HZ-84 菌株以及二倍体亲株 LK、HU-TY-1 在 33℃及 40℃条件下的葡萄糖发酵率进行测定,图 5 显示了无论是单倍体还是二倍体在 33℃时,它们的发酵能力没有多大区别(数据略),但在 40℃培养的条件下,二倍体耐热菌株 HU-TY-1 的发酵能力明显优于 LK 以及两个单倍体菌株。

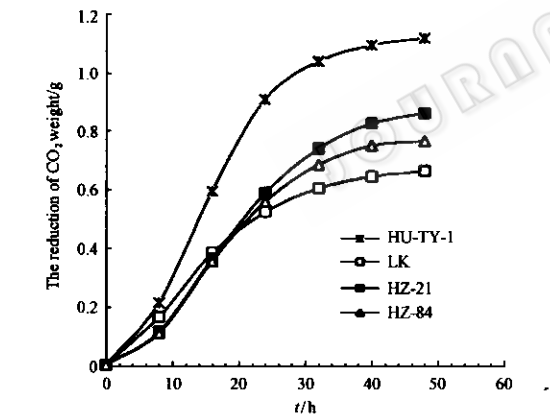


图5 不同菌株在 40℃时的发酵曲线

Fig.5 Fermentation curve of various strains at 40℃

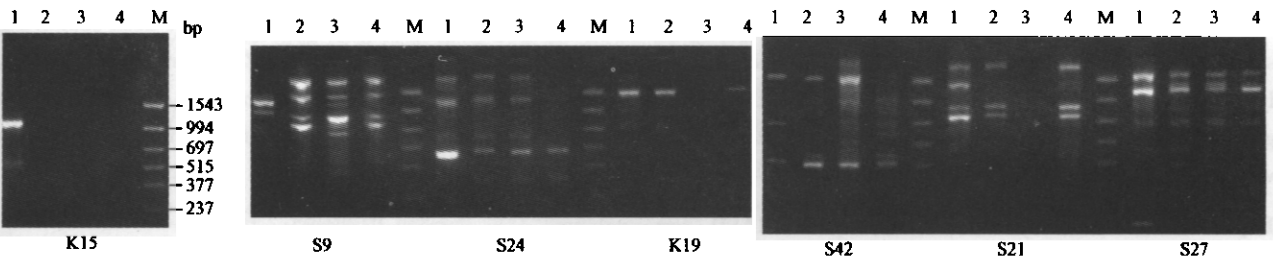


图6 各菌株基因组 DNA 的 RAPD 分析

Fig.6 RAPD analysis of genomic DNA of various strains

1. LK strain; 2. HU-TY-1 strain; 3. HZ-21 strain; 4. HZ-84; M. Marker

2.3 RAPD 分析

利用小量制备法提取 LK、HU-TY-1 以及单倍体 HZ-21 和 HZ-84 菌株的基因组 DNA 作为模板。选用前期实验中^[1]呈现多态性扩增结果的引物及其他引物 5 个系列 30 种,进行 RAPD 分析。结果除了 6 个引物未扩增出条带外,其余的引物均获得重复性较好的条带。片段大小范围在 0.1 ~ 4.0kb 之间,并且 k15、k19、s9、s21、s24、s27、s42 等 7 个引物在 4 种菌株间扩增出多态性条带 15 种(图 6),其中一种是出发菌株 LK 与 HU-TY-1、HZ-21、HZ-84 之间存在有差异的引物为 6 种,扩增出 8 条多态性 DNA 片段;另一种是双倍体菌株 LK 与 HU-TY-1 间无差异,而 HU-TY-1 与 HZ-21、HZ-84 间有差异的引物有 4 种,扩增出 7 条多态性 DNA 片段(表 4)。

表 4 4 菌株间多态性引物的扩增差异

Table 4 Amplified difference of the polymorphic primers in four strains

Primer	Bands		Strains			
	Size	Amount	LK	HU	HZ-21	HZ-84
K15	1.0 ~ 1.5	1	+	—	—	—
S9	~ 1.0	1	+	—	—	—
S21	1.0 ~ 1.5	1	+	—	—	—
S27	0.2	1	+	—	—	—
S42	0.7	1	+	—	—	—
S9	~ 0.7	3	—	+	+	+
K19	~ 1.5	1	+	+	—	+
S21	~ 0.7	2	+	+	—	+
S24	1.5	2	+	+	+	—
S42	~ 1.5	2	+	+	+	—

+ Indicate there is polymorphic DNA fragment;
— Indicate there is not polymorphic DNA fragment

3 讨论

利用酿酒酵母 LK 生产菌株选育出耐高温

HU-TY-1 菌株,并对它们进行了热击蛋白(Heat shock protein, HSP)电泳图谱和 RAPD 的分析,发现两种热休克蛋白 HSP72 及 HSP84 与菌株的耐热性是相关的,且 RAPD 分析也显示了原始出发菌株与耐热菌株 HU-TY-1 两基因组之间存在着差异^[1]。为了确定其中与耐热相关的多态性片段,我们在前期实验的基础上,将耐热菌株 HU-TY-1 在产孢培养基上进行培养,利用孢子比营养细胞更耐热的特性,采用热处理分离随机孢子,从中获得了单倍体细胞 HZ 系列 147 株,并将这些单倍体菌株与标准结合型菌株 Y30(α 型)、Y162(α 型)进行交配,只鉴定出 6 株较稳定的 α 型单倍体菌株。这可能是由于不规则减数分裂过程中染色体不等分配,形成非等倍体 α 型的结果,也可能是二倍体带有隐性致死基因或者带有能使孢子不育的遗传因子,因而使得 α 型单倍体很难产生。

选取 2 株(HZ-21、HZ84)有特征的菌株,与二倍体耐热菌株 HU-TY-1 与原始菌株 LK 进行 RAPD 分析。结果显示了这 4 种菌株在 DNA 水平上存在着差异,表现为两种情况:一种二倍体出发菌株 LK 与耐热菌株 HU-TY-1 之间存在差异,而耐热菌株 HU-TY-1 与从其分离的单倍体菌株 HZ-21、HZ-84 菌株间没有差异。反应了 LK 菌株经高温驯化、紫外线诱变和热冲击作用,其基因组 DNA 发生变异,包括碱基突变, DNA 缺失、插入等变化,并且这种突变在 HU-TY-1 的 DNA 双链中是纯合的;另一种情况是二倍体菌株即 LK 与 HU-TY-1 间无差异,但耐热菌株与由其分离得到菌株间有差异,表明出现这些片段的 DNA 在耐热 HU-TY-1 中是杂合的,即等位基因存在着差异。前一种情况的出现,可能与菌株的耐热性状是相关的。特别 k15 引物扩出的多态性 DNA

的条带是明亮清晰、且又是单一的条带。因此可以用这类扩增出的多态性片段作为探针,筛选由耐热菌株 HU-TY-1 构建的基因文库,进行相关片段的基因克隆和序列的测定以及基因表达的研究,以进一步确定与耐高温性状相关的多态性片段。

REFERENCES(参考文献)

- [1] ZHU X F(朱旭芬), ZENG Y Z(曾云中), WU X C(吴雪昌) *et al.* Analysis of DNA fragment linked to thermotolerance-related gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycosystema* (菌物系统), 2000, 19(2): 248 ~ 253
- [2] ZENG Y Z(曾云中), WU X C(吴雪昌), ZHU X P(朱晓平) *et al.* Screening of thermotolerant yeast producing ethanol I. Selection of the original strain and analysis of the characters of fermentation. *Journal of hangzhou University: Science Edition* (杭州大学学报自然科学版), 1991, 18(4): 468 ~ 472
- [3] ZENG Y Z(曾云中), WU X C(吴雪昌), JIN S(金珊) *et al.* Screening of thermotolerant yeast producing ethanol II: The primary study of screening of strain and the characteristic of ethanol fermentation. *Journal of Hangzhou university: Science Edition* (杭州大学学报自然科学版), 1992, 19(3): 327 ~ 335.
- [4] CHEN S Y(陈仕怡), XU H J(徐洪基). *Yeast genetics*. Beijing: Science Press(科学出版社), 1989, pp. 204 ~ 206, 212
- [5] ZHANG D N(张冬妮), ZENG Y Z(曾云中), WU X C(吴雪昌) *et al.* The studies on sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of hangzhou University: Science Edition* (杭州大学学报自然科学版), 1994, 21(4): 452 ~ 457
- [6] CHENG G S(程光胜). *Microbiology experimentation*. Beijing: Science Press(科学出版社), 1981, p. 243
- [7] XIA S L(夏淑兰). *Current Protocol for applied microbiology*. Beijing: Chinese Light Industry Press(中国轻工出版社), 1988, 69 ~ 72
- [8] ZHU G J(诸葛健). *Experiment protocol of industrial microbiology*. Beijing: Chinese Light Industry Press(中国轻工出版社), 1994
- [9] Fang-Jen S Lee. Modified protocol for yeast DNA mini-preparation. *Biotechniques*, 1992, 12: 677

The RAPD Analysis of Haploid Strain of Thermotolerant Yeast

ZHU Xu-Fen WU Xue-Chang LIN Liang ZENG Yun-Zhong*

(College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China)

Abstract The haploid strains HZ line from the thermotolerant strain HU-TY-1 of *Saccharomyces cerevisiae* have been obtained by sporulation, and the analysis of growth and fermentation test was performed. The strains HZ-21 and HZ-84 were used as the analysis of random amplified polymorphic DNA (RAPD). The result showed that there were some polymorphic DNA fragments of genomic DNA among haploid, the diploid parent strain HU-TY-1 and the original strain LK, some of them may be correlation with thermotolerant property.

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, haploid, RAPD, fermentability

Received: January 11, 2001

This work was supported by Grant from Zhejiang province natural science foundation of China.

* Corresponding author. Tel: 86-571-88805551; Fax: 86-571-87961267; E-mail: zhuxufen@mail.hz.zj.cn