

研究报告

利用转录调控因子 Bas1p 和 Bas2p 协同作用提高
酿酒酵母 cAMP 产量的研究

徐欢欢 程丽娜 王凯 仇申坤 邹少兰*

(天津大学化工学院 天津 300072)

摘要:【目的】研究转录调控因子 Bas1p 和 Bas2p 协同作用对重组酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)胞外 cAMP 产生的影响, 初步优化发酵培养基。【方法】通过共整合表达策略, 在 cAMP 产生菌酿酒酵母 G5 中超表达 Bas1p 和 Bas2p, 摇瓶发酵实验考察了 Bas1p 和 Bas2p 协同作用对菌株生长及胞外 cAMP 产生的影响, 进一步考察了酵母粉和蛋白胨含量及前体物腺嘌呤对菌株生长和 cAMP 产生的影响。【结果】超表达 Bas1p 和 Bas2p 使菌株在 1×YP 培养基中发酵 120 h 时的 cAMP 产量较出发菌株提高 51.4%, 达到 2 253.8 μmol/L; 将 1×YP 中的酵母粉和蛋白胨含量翻倍(即 2×YP 培养基)发酵 120 h 时的 cAMP 产量提高至 4 450.4 μmol/L; 在 2×YP 培养基中添加 0.5 g/L 浓度的腺嘌呤时, cAMP 产量进一步提高至 5 314.3 μmol/L。【结论】强化 Bas1p 和 Bas2p 的协同作用及相应地优化培养基组分有助于酿酒酵母胞外 cAMP 生产。

关键词: 酿酒酵母, 整合载体, 环磷酸腺苷, BAS1-BAS2, 腺嘌呤

Reinforced cooperative interaction between Bas1p and Bas2p
improves cAMP production by *Saccharomyces cerevisiae*

XU Huan-Huan CHENG Li-Na WANG Kai QIU Shen-Shen ZOU Shao-Lan*

(College of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: [Objective] The effect of cooperative interaction between Bas1p and Bas2p on cAMP production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain was studied, and fermentation medium was preliminarily optimized. [Methods] Bas1p and Bas2p were over-expressed by using the co-integrated expressing strategy in the cAMP-producing strain G5. The growth and extracellular cAMP production of the resultant strain were investigated by fermentation in shaking flasks. The effects of the amount of yeast powder and peptone, and the precursor adenine added in media were studied. [Results] The cAMP concentration at 120 h produced by the G5 strain over-expressing Bas1p and Bas2p was 2 253.8 μmol/L when fermentation medium 1×YP was used, which was increased by 51.4% compared with control strain. The product concentration was further increased to 4 450.4 μmol/L when the content of yeast powder and peptone in media was doubled. By adding 0.5 g/L adenine in media, the cAMP concentration at 120 h was further increased to 5 314.3 μmol/L.

*Corresponding author: Tel: 86-22-27892075; E-mail: slzhou@tju.edu.cn

Received: February 06, 2015; Accepted: June 01, 2015; Published online (www.cnki.net): February 20, 2016

*通讯作者: Tel: 86-22-27892075; E-mail: slzhou@tju.edu.cn

收稿日期: 2015-02-06; 接受日期: 2015-06-01; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-02-20

[Conclusion] All those results proved that the reinforced cooperative interaction between Bas1p and Bas2p as well as medium optimization can improve cAMP production.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Integrating vector, Cyclic adenosine monophosphate, *BAS1-BAS2*, Adenine

环磷酸腺苷(Cyclic adenosine monophosphate, cAMP)是细胞内参与调节物质代谢和生物学功能的重要物质,它广泛参与机体内的各种生理活动,如细胞代谢、免疫轴的调控、生长轴的调控、神经应答等,是生物体内重要的第二信使。cAMP不仅对于失眠健忘、再障性贫血、免疫力低下、心脑血管疾病、恶性肿瘤等多种疾病均能达到好的治疗效果^[1-2],在畜牧业及养殖业也有重要的应用价值^[3]。

在cAMP生产的主要3种方式——化学合成法、酶合成法和微生物发酵法中,发酵法具有可实现持续生产、工艺简单、能利用廉价的碳源、降低生产成本等多种优势^[4]。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)作为最重要的工业微生物之一,不仅具有工业化应用技术成熟、抗逆性强、为食品安全性GRAS微生物的优点,同时作为最早实现全基因组测序的微生物菌种,又是分子生物学和遗传学研究的最重要模式生物之一^[5]。因此,通过遗传工程手段的改造实现以酿酒酵母为菌种的cAMP发酵法生产,预测具有其特殊的优势。

酿酒酵母中,通过腺苷酸环化酶转化ATP生成cAMP,而ATP的前体物AMP则通过两种方式合成^[6]。从头合成途径(De novo synthesis)中,以PRPP (5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphate, 5-磷酸核糖-1-焦磷酸)为前体物,经过一系列酶促反应生成AMP;编码这些酶的基因普遍受到腺嘌呤(Adenine)反馈调控,故统一简称为ADE基因。补救途径(Salvage pathway)中,培养基中的腺嘌呤被细胞运输到胞内,直接参与合成AMP。因此,AMP的合成直接影响到cAMP的生产水平。

包括AMP在内的嘌呤核苷酸的代谢的调控机制极为复杂^[6-8],蛋白质组学、转录组学分析和基因功能的研究结果显示^[6-19]:酿酒酵母AMP从头合成

途径基因即ADE基因的表达受2个转录调控因子Bas1p和Bas2p间的协同作用正调控。Bas1p是Myb族转录调控因子,涉及嘌呤、组氨酸生物合成途径代谢和一碳化合物代谢等多个途径的表达调控;Bas2p又名Pho2p,是同源域(Homeodomain)转录调控因子,除涉及嘌呤、组氨酸、色氨酸生物合成代谢外,还参与磷酸代谢调控。Bas1p-Bas2p复合物被证明通过与特定启动子区域结合,协同作用激活10个ADE基因的表达。研究显示Bas1p先结合到ADE基因的启动子上,而Bas2p能感知AMP合成中间产物SAICAR (5-Phosphoribosyl-4-succ-inocarboxamide-5-aminoimidazole, 5-氨基咪唑-4-氨基甲酰核苷酸)的浓度信号,在SAICAR积累到一定程度时与Bas1p相互作用而结合到启动子上。当胞内ADP、ATP浓度过高时,ADP、ATP通过反馈抑制从头合成途径第一个酶——Ade4p (PRPP酰胺转移酶,简称PRPPAT)的活性,使得SAICAR的合成下降,Bas1p/Bas2p间协同作用和相应的复合物形成受阻,ADE基因的转录水平下降,表达受到抑制。当培养基中有相当量的腺嘌呤存在时,腺嘌呤进入胞内,通过补救途径形成AMP,AMP进一步转化为ADP和ATP,进而导致整个从头合成途径合成受到抑制。

*BAS1*基因位于染色体XI上,大小为2 436 bp,编码811个氨基酸的酶蛋白^[10]; *BAS2*基因位于染色体IV上,大小为1 680 bp,编码559个氨基酸的酶蛋白^[16]。Bas1p酶C端107个氨基酸被证明对Bas1p功能没有明显的影响;以质粒为载体,将*BAS1*基因除编码C端107个氨基酸以外的核苷酸序列与*BAS2*基因全序列融合表达,结果显示腺嘌呤对ADE基因表达的抑制效应被解除,进一步证明了腺嘌呤通过影响Bas1p/Bas2p间协同作用而起作用^[10]。

为此,本研究拟在cAMP产生菌酿酒酵母G5

中, 采用将 *BAS1* 和 *BAS2* 基因融合后共整合到基因组上的超表达策略, 在保证融合基因稳定性的基础上, 便于直接合成 Bas1p/Bas2p 复合物^[10], 在一定程度上解除经 SAICAR 和 ADP/ATP、腺嘌呤介导的 *ADE* 基因表达抑制效应, 以求得 AMP 两个合成途径最佳平衡下的更高 cAMP 产量, 为构建 cAMP 高产菌株和获得相应的优化工艺奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α (*F-recA1 endA1 hsdR17* [*r_K-m_K*]*supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1*)为本室收藏, 用于整合载体的构建和扩增; 酿酒酵母菌株 W303-1a (*MATa leu2-3, 112 ura3-1 trp1-92 his3-11, 15 ade2-1 can1-100*)用作

基因 *BAS1*、*BAS2* 的供体, G5 为本室前期工作中构建的能产 cAMP 的菌株^[4]。整合载体 YIplac211 (*amp*, *URA3*) (图 1)为本室收藏^[20], 以其为出发材料构建得到整合载体 YIplac211-*BAS1-BAS2* (表 1、图 1), 构建流程如下:

(1) PCR法扩增*BAS1-BAS2*: 提取酿酒酵母菌株 W303-1a的全基因组染色体DNA为模板, 以表1所示引物PCR法合成*BAS1-BAS2*。先以P1、P2为引物扩增*BAS1*基因, 产物记为PCR1片段, 预期大小为 2 874 bp; 然后以P3、P4为引物扩增*BAS2*基因, 产物记为PCR2片段, 预期大小为1 680 bp。最后以P1、P4为引物, PCR1、PCR2片段为模板进行融合PCR, 扩增*BAS1-BAS2*融合片段, 记为PCR3, 预期大小 4 554 bp。PCR反应体系为 50 μL, 组分为: 水

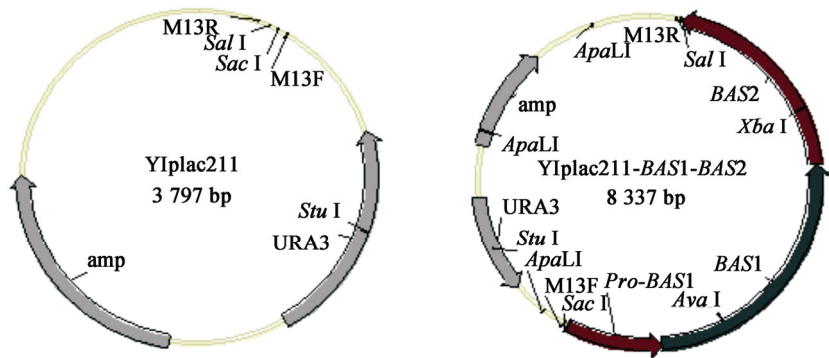


图 1 YIplac211 和 YIplac211-*BAS1-BAS2* 质粒图谱
Figure 1 Schematic illustration of plasmids YIplac211 and YIplac211-*BAS1-BAS2*

表 1 实验所用引物 Table 1 All the primers used in this study	
引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')
P1	GGGCCCgagctcTCTTTAGCCGTAATTGCGAA (<i>Sac</i> I)
P2	gtacgagaattcttccatcatGGATGTAGTCCTTGATATCTC
P3	ATGATGGAAGAATTCTCGTAC
P4	GGGCCCgtcgacTCATATCCATCTATGCTCGTC (<i>Sal</i> I)
P5	AAGGAAGAACGAAGGAAGG
P6	CTGGCGAGGTATTGGATAG
M13F	TGTAACACGACGGCCAGT
M13R	CAGGAAACAGCTATGACC

40 μL , $10\times$ 缓冲液 5 μL , dNTPs (10 mmol/L) 1 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物和下游引物各 1 μL , (2.5 U/ μL) Fast *Pfu* DNA polymerase 1 μL , 染色体 120 mg/L 或 PCR 产物 10 mg/L DNA 模板 1 μL 。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2–5 min, 循环 30 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

(2) 整合载体 YIplac211-BAS1-BAS2 构建: 将 PCR3 片段用琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒回收纯化后, 利用 *Sal* I 和 *Sac* I 同时酶切此片段和整合载体 YIplac211, 酶切产物用 T4 DNA 连接酶连接, 然后用 CaCl_2 法转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂布含有氨苄青霉素的 LB 平板(LB+Ap)进行培养, 挑取平板生长菌落, 接种到含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 液体培养基培养过夜, 限制性内切酶酶切分析、鉴定其质粒提取物, 最后提交经酶切鉴定为阳性克隆的转化子菌株进行测序。

将 YIplac211 和 YIplac211-BAS1-BAS2 分别转化菌株 G5, 得到相应的菌株 G5-Y211 和 G5-BAS1-BAS2。操作如下: 将 YIplac211-BAS1-BAS2 首先用 *Stu* I 单切线性化, 然后用醋酸锂法^[21]转化菌株 G5 感受态细胞, 用 $\text{CM}^+\text{G}^{-\text{URA}}$ 平板进行筛选, 提取平板生长菌落的 YPD 液体培养物染色体进行 PCR 鉴定, 引物对使用表 1 中的 M13F、M13R (预期产物大小 4 616 bp, 引物位置见图 1) 和 P5、P6 (预期产物大小 9 400 bp)。整合载体 YIplac211 也进行类似的操作, 获得的菌株 G5-Y211 用作对照菌株。这里利用整合载体上的 *URA3* 基因被 *Stu* I 酶切分开的两个片段分别作为左、右同源臂整合到 G5 菌株染色体的 *URA3* 位点。

1.1.2 主要试剂和仪器: 鲑鱼精 DNA, 购自美国 Clontech 公司; LiAC、PEG4000, 购自美国 Sigma 公司; 内切酶 *Sal* I、*Sac* I、T4 DNA 连接酶、DNA 标准分子量 Marker、*Taq* 等工具酶, 购自大连 TaKaRa 公司; 其余实验所需试剂均购自上海生工技术有限公司; 琼脂糖凝胶片段回收试剂盒以及质粒抽提试剂盒, 购自美国 Omega 公司; 引物合成及

序列测定由北京奥科生物技术公司完成。

用到的主要仪器有: Waters Alliance 2695 高效液相色谱仪 HPLC, 购自美国 Waters 公司; 紫外分光光度计, 购自美国 Unico 公司, PCR 仪, 购自德国 Biometra 公司; 恒温培养箱, 购自德国 Memmert 公司。

1.2 培养基及培养条件

Luria-Bertani (LB) 培养基(g/L): 酵母抽提物 5, 胰化蛋白胨 10, NaCl 10, pH 7.0, 固体培养基添加琼脂粉 15, 用于转化子筛选时添加氨苄青霉素至终浓度 100 mg/L。大肠杆菌固体培养条件: 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱倒置; 液体培养条件: 37 $^{\circ}\text{C}$ 、240 r/min。

YPD 培养基(g/L): 酵母抽提物 10, 蛋白胨 A 20, D-葡萄糖 20, 固体培养基则添加琼脂粉 15。

$\text{CM}^+\text{G}^{-\text{URA}}$ 培养基(g/L): YNB 6.7, D-葡萄糖 20, 补加除尿嘧啶之外的适量的必需元素(苏氨酸 0.15, 酪氨酸 0.03, 缬氨酸 0.15, 赖氨酸 0.03, 谷氨酸 0.1, 丝氨酸 0.15, 天冬氨酸 0.1, 甲硫氨酸 0.02, 苯丙氨酸 0.05, 异亮氨酸 0.03, 精氨酸 0.02, 腺嘌呤 0.05, 尿嘧啶 0.05, 组氨酸 0.1, 亮氨酸 0.1, 色氨酸 0.1), 固体培养基添加琼脂粉 15。

酿酒酵母固体培养条件: 30 $^{\circ}\text{C}$ 倒置; 液体培养条件: 30 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min。

酿酒酵母整合菌株发酵培养基: (1) 1 \times YP (g/L): 酵母提取物 10, 蛋白胨 20, 葡萄糖 150, pH 自然; (2) 2 \times YP (g/L): 酵母提取物 20, 蛋白胨 40, 葡萄糖 150, pH 自然。需要在 2 \times YP 中添加不同浓度的腺嘌呤。

1.3 酿酒酵母共整合 BAS1-BAS2 菌株的发酵评价

种子液培养: 挑取固体培养基平板上生长的菌落, 接入装有 5 mL YPD 培养液的试管中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养过夜, 然后转接进行二次扩大培养, 所得菌液为种子液。

发酵培养: 使用 1 \times YP 和 2 \times YP, 发酵条件为: 新鲜种子液接种到装有 25 mL 发酵培养基的 100 mL

摇瓶中, 控制初始 OD_{600} 值在 1.0 左右, 30 °C、220 r/min 发酵, 间隔 12 h 或 24 h 取样进行分析。

发酵液的分析: (1) OD_{600} 测定: 将发酵样品适当稀释后测定 OD_{600} , 检测生长情况; (2) HPLC分析 cAMP和腺嘌呤浓度: 将发酵样品在13 000 r/min离心1 min, 取上清进行适当稀释, 用孔径0.22 μ m的滤膜过滤, 滤液用于色谱检测: 检测波长258 nm, Thermo Synchronis C₁₈色谱柱, 流动相组分为(5.78 g/L KH₂PO₄, 2.72 g/L四丁基溴化铵, 用磷酸调节pH至4.3): 乙腈=85:15 (体积比), 流速1 mL/min, 柱温35 °C。

所有发酵实验均进行 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 整合载体构建

以 W303-1a 染色体 DNA 为模板, PCR 扩增所得片段 PCR1 含有 *BAS1* 基因起始密码子 ATG 上游 762 bp 序列和包括 ATG 在内的 2 112 bp ORF 序列, 删除了 ORF 的 3'端 324 bp 序列; PCR2 为 *BAS2* 基因全部 ORF 序列 1 680 bp; 故 PCR3 即 *BAS1-BAS2* 融合片段含有 *BAS1* 基因启动子区、2 112 bp ORF 序列、*BAS2* 基因 ORF 序列(含终止密码子), 中间没有间隔序列。琼脂糖凝胶电泳检查显示 PCR 产物的电泳条带大小与预期产物大小一致, 证明为目的 PCR 产物。将连接产物转化所得转化子菌株的质粒提取物分别用不同的限制性内切酶进行酶切鉴定, 相应的琼脂糖凝胶电泳检查显示酶切片段大小与预期相符, 证明为目的整合载体 YIplac211-*BAS1-BAS2* (图 1)。

2.2 酿酒酵母整合菌株构建

整合载体 YIplac211-*BAS1-BAS2* 和 YIplac211 的 *Stu* I 线性化片段转化 G5 菌株, 利用 *URA3* 基因被 *Stu* I 酶切分开的两个片段分别作为左、右同源臂整合到 G5 菌株的 *URA3* 位点, 所得转化子进行培养, 提取染色体 DNA, 分别以 M13F、M13R 引物对和 P5、P6 引物对进行 PCR 鉴定, PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图谱见图 2。可以看到 3 个转化子样

品均有预期大小的 PCR 产物片段。M13F、M13R 引物对在载体上有相应序列, 而 P5、P6 引物序列分别对应于染色体上整合用同源臂以外位置的序列, 其 PCR 产物大小能证明确实整合到预期的染色体位置上。对 YIplac211 转化所得转化子也进行了类似的鉴定。对两个整合载体转化后获得的目的转化子菌株分别命名为 G5-*BAS1-BAS2*、G5-Y211。

2.3 酿酒酵母整合菌株的生长、发酵评价

2.3.1 初步生长、发酵评价: YPD 培养基是酿酒酵母培养最常用、最简便的丰富培养基, 本课题组以往对 G5 菌株的生长、发酵最初在 YPD 中进行, 后来发现提高葡萄糖浓度可以提高 cAMP 产量, 最终选择 15%葡萄糖浓度的 1×YP 培养基; 在 1×YP 培养基中进行的实验结果显示其 OD_{600} 值和 cAMP 浓度均在 ≤ 120 h 时可达最大值。故这里先选择 1×YP 培养基中发酵 120 h 来初步对比考察一下菌株 G5-*BAS1-BAS2* 与 G5-Y211 的生长和胞外 cAMP 产生情况。表 2 结果初步证明了整合共表达 *BAS1*、*BAS2* 基因在没有造成明显的表达负担、不影响生长的同时, 确能提高胞外 cAMP 的产量。

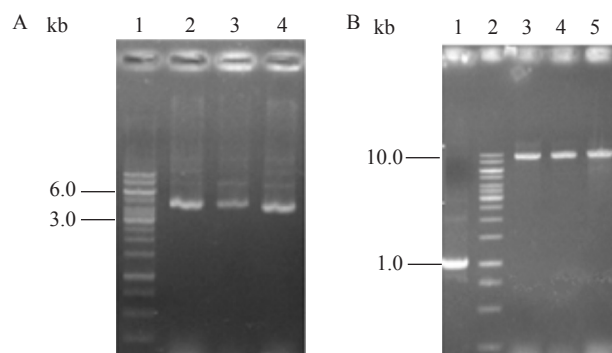


图 2 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳鉴定转化子

Figure 2 Transformant identification by agarose gel electrophoresis of PCR products

注: A: M13F、M13R 引物对, 预期产物大小 4 616 bp; 2-4: 转化子 1#-3#。B: P5、P6 引物对, 预期产物大小: 9 400 bp (阳性转化子)或 1 120 bp (宿主菌株 G5); 1: G5; 3-5: 转化子 1#-3#。

Note: A: M13F/M13R primer pair, expected product size 4 616 bp; 2-4: Transformants 1#-3#. B: P5, P6 primer pair, expected product size 9 400 bp (for positive transformants) or 1 120 bp (for host strain G5); 1: G5; 3-5: Transformants 1#-3#.

表 2 菌株 G5-BAS1-BAS2 与 G5-Y211 的生长和胞外 cAMP 生产初步评价
Table 2 Preliminary evaluation for the growth and extracellular cAMP production of strains G5-BAS1-BAS2 and G5-Y211 (1×YP, 120 h)

菌株名称及增长比例 Strain name and ratio	细胞密度 Cell density (OD_{600})	cAMP 产量 Output of cAMP ($\mu\text{mol/L}$)	产率 Productivity ($\mu\text{mol/L}$)
G5-BAS1-BAS2	60.40±0.03	2 253.81±17.62	37.31
G5-Y211	55.38±0.15	1 488.40±19.03	26.87
增长比例 Ratio (%)	9.06	51.40	38.85

2.3.2 酵母粉和蛋白胨含量对菌株 G5-BAS1-BAS2 生产 cAMP 的影响: 众所周知, 酵母提取物(简称为 Y)、蛋白胨(简称为 P)和葡萄糖即可保证酿酒酵母良好的生长, 但鉴于 cAMP 合成所需组分(分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6\text{P}$), 推测培养基中氮、磷的含量尤其是氮的含量可能成为 cAMP 合成的首要制约因素, 合理的碳/氮比有助于 cAMP 的合成。故这里考察将前述培养基 1×YP 中的 Y 和 P 含量分别增加一倍(即 2×YP)的效果。结果见图 3 和表 3。可以看出, 提高酵母粉和蛋白胨浓度对 G5-BAS1-BAS2 菌株生长和胞外 cAMP 生产的效应明显: 2×YP 培养基下的生长明显较 1×YP 培养基下的生长快, 最大 OD_{600} 值提高; 2×YP 培养基下的胞外 cAMP 产量也显著高于 1×YP 培养基下的产量, 达到最大值的时间大大延长。另外, 两种培养基下的生长与 cAMP 生产之间的关联情况呈现出不同的特征: 2×YP 培养基

中整体上基本是同步的, 都于 96 h 进入平台期, 而 1×YP 培养基中的生长和 cAMP 生产则并不同步, 一个可能的原因是如前所述, 合成 cAMP 的关键营养成分在 1×YP 培养基中严重不足, 其对 cAMP 合成的影响远远大于对菌体合成的影响。因此, 优化培养基的组分、最大程度地提高 cAMP 合成的产量, 是十分必要的。

2.3.3 外加腺嘌呤前体物对菌株 G5-BAS1-BAS2 生产 cAMP 的影响: 如引言所述, 从头合成途径和补救途径间存在一个动态的平衡, 外加腺嘌呤前体物的情况下, 腺嘌呤使得从补救途径合成 cAMP 得以存在、cAMP 产量提高的同时, 也会通过生成的 ADP、ATP 抑制从头合成途径关键酶 Ade4p 的活性而降低从此途径合成 cAMP 的产量; 另一方面, BAS1、BAS2 的融合共表达, 预期会缓解腺嘌呤对从头合成途径的抑制作用。为了考察所有这些调控

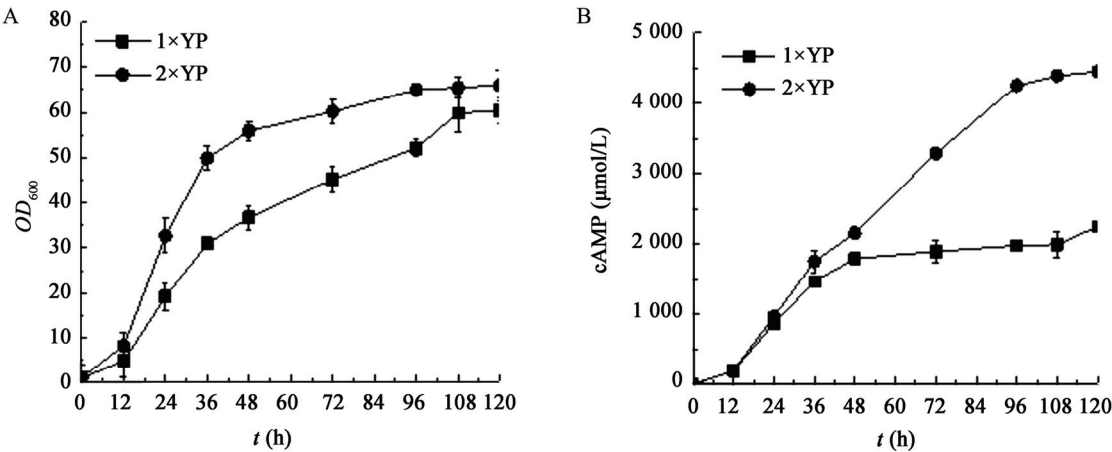


图 3 G5-BAS1-BAS2 在 1×YP 和 2×YP 中的生长(A)和发酵曲线(B)
Figure 3 The growth (A) and cAMP fermentation (B) curves of strain G5-BAS1-BAS2 in 1×YP and 2×YP media

表3 菌株 G5-BAS1-BAS2 在 1×YP、2×YP 中的生长和胞外 cAMP 生产
Table 3 The growth and extracellular cAMP production of strain G5-BAS1-BAS2 in 1×YP and 2×YP media (120 h)

培养基及增长比例 Culture medium and ratio	细胞密度 Cell density (OD_{600})	cAMP 产量 Output of cAMP ($\mu\text{mol/L}$)	产率 Productivity ($\mu\text{mol/L}$)
1×YP	60.4±2.79	2 250.3±25.37	37.2
2×YP	66.2±3.37	4 450.4±26.51	67.2
增长比例 Ratio (%)	9.6	97.7	80.6

机制对 cAMP 合成产量的最终的综合效应,这里在前述发酵条件下,进一步考察在 2×YP 培养基中加入不同浓度腺嘌呤的效应。结果见图 4 和表 4。

图 4A 和表 4 表明:不同腺嘌呤浓度下,菌株生长在 36–96 h 呈现出一定的差异,之后差别缩小、趋向一致。

图 4B 和表 4 表明:首先,在不同腺嘌呤浓度下,cAMP 产量均随发酵时间一直上升;其次,在发酵初期,腺嘌呤浓度对 cAMP 产量几乎没有影响,推测这与胞外腺嘌呤被吸收、转运到胞内需要一定时间有关;最后,不同腺嘌呤添加量下 cAMP 产量的差异,到 120 h 时简化为 0、0.25 g/L 添加量下的 cAMP 产量与添加量 0.5、1.0、1.25 g/L 下的 cAMP 产量的差异,即前者彼此接近,后者彼此接近,0.5 g/L 添加量下的 cAMP 产量较不添加腺嘌呤的对照产量增加了 14.6%。

图 4C 和表 4 表明:腺嘌呤的添加量以 0.5 g/L 为宜,超过此浓度的腺嘌呤也无法为菌株所消耗,cAMP 产量不再上升。

综上,在 2×YP 培养基中添加腺嘌呤可进一步提高胞外 cAMP 产量,腺嘌呤的最适添加量为 0.5 g/L,在此浓度下发酵 120 h 时的 cAMP 产量为 5 314.30 $\mu\text{mol/L}$,较不添加腺嘌呤的对照同期产量提高 14.7 %。

3 讨论

酿酒酵母中 AMP 的合成涉及相当复杂的代谢途径和调控机制。本研究结果初步证明了融合共表

达转录调控因子 Bas1p、Bas2p 对提高 cAMP 产量的效应,推测此效应来自于 Bas1p、Bas2p 融合共表达复合物部分解除了末端产物 ADP、ATP 对 *ADE* 基因的抑制效应,推动了经由从头合成途径合成 AMP 的通量。另一方面,在添加腺嘌呤的情况下,分析 0.5 g/L 的腺嘌呤浓度即达最适添加量、cAMP 产量不再提高的原因,一是受制于转运腺嘌呤进入胞内的透性酶载体^[7]的数量,过多的腺嘌呤因无法进入胞内而不能发挥作用;二是在从头合成途径和补救途径同时存在的情况下,尽管有整合态 *BAS1-BAS2* 基因的融合共表达合成的 Bas1p-Bas2p 复合物存在,但单拷贝基因的表达量可能不足以完全解除经腺嘌呤生成的 ADP、ATP 对 *ADE* 基因的抑制效应,二者在 0.5 g/L 的腺嘌呤剂量下已经达成了使 cAMP 产量最大化的最佳平衡。以 *ACT1* 基因为内参的 RT-PCR 初步对比分析结果显示:除 *ADE16* 基因外,菌株 G5-BAS1-BAS2 在不含腺嘌呤的 2×YP 培养基中的 *ADE* 基因的表达水平,确实高于含腺嘌呤的 2×YP 培养基中的 *ADE* 基因的表达水平,证明了在含腺嘌呤条件下的抑制效应仍然存在,也与文献中 *ADE16* 基因表达不受腺嘌呤影响的观察一致^[9]。另外,鉴于提高酵母粉和蛋白胨含量对 cAMP 产量的显著效应,全面、细致评价和优化培养基组分、培养条件,预计会进一步发挥 G5-BAS1-BAS2 菌株的 Bas1p、Bas2p 融合共表达的正调控作用,实现更高 cAMP 产量下的两个途径的最佳平衡。

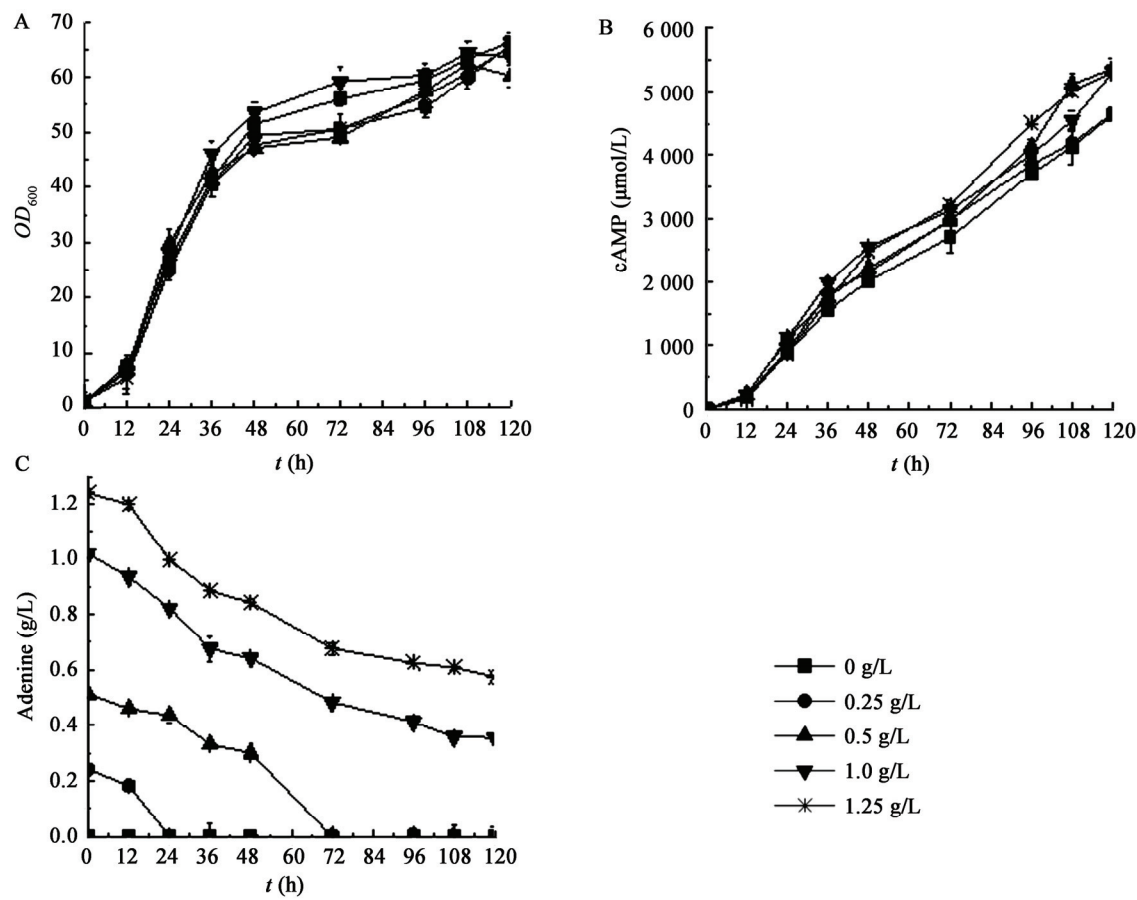


图 4 G5-BAS1-BAS2 在不同腺嘌呤浓度下的生长和发酵曲线

Figure 4 The growth and fermentation curves of strain G5-BAS1-BAS2 in media with different adenine concentration

注: A: G5-BAS1-BAS2 菌株生长曲线; B: G5-BAS1-BAS2 菌株胞外 cAMP 生产曲线; C: G5-BAS1-BAS2 菌株腺嘌呤消耗曲线.

Note: A: The growth curves of strain G5-BAS1-BAS2; B: The extracellular cAMP production of strain G5-BAS1-BAS2; C: The adenine consumption curves of strain G5-BAS1-BAS2.

表 4 G5-BAS1-BAS2 在不同腺嘌呤浓度下的生长和胞外 cAMP 生产

Table 4 The growth and extracellular cAMP production of strain G5-BAS1-BAS2 in media with different adenine concentration (2×YP, 120 h)

腺嘌呤浓度 Concentration of adenine (0 h) (g/L)	细胞密度 Cell density (OD ₆₀₀)	腺嘌呤消耗量 Consumption of adenine (g/L)	cAMP 产量 Output of cAMP (μmol/L)	比值 Ratio	cAMP/腺嘌呤消耗 cAMP/adenine consumption (mol/g)
0	66.40±1.51	0	4 632.04±53.37	1	—
0.25	66.00±1.42	0.25±0.004	4 655.61±59.14	1.005	18.62
0.5	60.20±1.39	0.50±0.010	5 314.30±10.87	1.147	10.62
1.0	63.70±1.59	0.65±0.014	5 309.18±32.94	1.146	8.16
1.25	65.60±1.19	0.65±0.020	5 312.17±36.79	1.147	8.17

目前,酿酒酵母中生产 cAMP 的报道基本上都是基于 cAMP 信号传导途径的基础研究^[6-7,22],本实验室通过酿酒酵母发酵生产 cAMP 的报道尚属首次。本研究将有助于推动高值医药产品的绿色清洁生产,具有重要的应用意义。

参考文献

- [1] Hui HS, Liang GY, Wu K. Clinical efficacy of chronic congestive heart failure exacerbations cAMP[J]. Chinese Journal of Postgraduates of Medicine, 2005, 28(4): 32-33 (in Chinese)
回皓升, 梁高燕, 吴铿. 环磷腺苷治疗慢性充血性心力衰竭急性加重期的临床疗效研究[J]. 医师进修杂志, 2005, 28(4): 32-33
- [2] Xue GX, Liu SF. cAMP gastrectomy prevention of myocardial ischemia efficacy[J]. Journal of Practical Diagnosis and Therapy, 2006, 19(10): 739-740 (in Chinese)
薛广星, 刘松峰. 环磷腺苷防治胃大部切除术中心肌缺血的效果观察[J]. 实用诊断与治疗杂志, 2006, 19(10): 739-740
- [3] Wang SF, Chen AG. Physiological function of cyclic AMP and its application in animal production[J]. China Feed, 2003(10): 3-5 (in Chinese)
汪善锋, 陈安国. 环腺苷酸的生理功能及在动物生产中的应用[J]. 中国饲料, 2003(10): 3-5
- [4] Ji XB, Wang K, Chen X. Effects of overexpression of key enzyme genes involved in the purine synthesis pathway on cAMP production with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Strain[J]. The Journal of Process Engineering, 2014, 14(5): 853-859 (in Chinese)
姬晓兵, 王凯, 陈洵. 过表达嘌呤合成途径关键酶基因对重组酿酒酵母菌株生产 cAMP 的影响[J]. 过程工程学报, 2014, 14(5): 853-859
- [5] Wang TH. Molecular Breeding[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 207 (in Chinese)
汪天虹. 微生物分子育种原理与技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 207
- [6] Rébora K, Desmoucelles C, Borne F, et al. Yeast AMP pathway genes respond to adenine through regulated synthesis of a metabolic intermediate[J]. Molecular and Cellular Biology, 2001, 21(23): 7901-7912
- [7] Ljungdahl PO, Daignan-Fornier B. Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Genetics, 2012, 190(3): 885-929
- [8] Subramanian M, Qiao W, Khanam N, et al. Transcriptional regulation of the one-carbon metabolism regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by Bas1p[J]. Molecular Microbiology, 2005, 57(1): 53-69
- [9] Denis V, Boucherie H, Monribot C, et al. Role of the myb-like protein bas1p in *Saccharomyces cerevisiae*: a proteome analysis[J]. Molecular Microbiology, 1998, 30(3): 557-566
- [10] Pinson B, Kongsrud TL, Ording E, et al. Signaling through regulated transcription factor interaction: mapping of a regulatory interaction domain in the Myb-related Bas1p[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(23): 4665-4673
- [11] Zhang F, Kirouac M, Zhu N, et al. Evidence that complex formation by Bas1p and Bas2p (Pho2p) unmasks the activation function of Bas1p in an adenine-repressible step of *ADE* gene transcription[J]. Molecular and Cellular Biology, 1997, 17(6): 3272-3283
- [12] Som I, Mitsch RN, Urbanowski JL, et al. DNA-bound Bas1 recruits Pho2 to activate *ADE* genes in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Eukaryotic Cell, 2005, 4(10): 1725-1735
- [13] Springer C, Künzler M, Balmelli T, et al. Amino acid and adenine cross-pathway regulation act through the same 5'-TGACTC-3' motif in the yeast *HIS7* promoter[J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(47): 29637-29643
- [14] Pinson B, Gabrielsen OS, Daignan-Fornier B. Redox regulation of AMP synthesis in yeast: a role of the Bas1p and Bas2p transcription factors[J]. Molecular Microbiology, 2000, 36(6): 1460-1469
- [15] Rolfes RJ, Zhang F, Hinnebusch AG. The transcriptional activators *BAS1*, *BAS2*, and *ABF1* bind positive regulatory sites as the critical elements for adenine regulation of *ADE5*, 7[J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(20): 13343-13354
- [16] Berben G, Legrain M, Hilger F. Studies on the structure, expression and function of the yeast regulatory gene *PHO2*[J]. Gene, 1988, 66(2): 307-312
- [17] Liu C, Yang Z, Yang J, et al. Regulation of the yeast transcriptional factor *PHO2* activity by phosphorylation[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(41): 31972-31978
- [18] Hannum C, Kulaeva OI, Sun H, et al. Functional Mapping of Bas2 identification of activation and Bas1-interaction domains [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(37): 34003-34009
- [19] Pinson B, Vaur S, Sagot I, et al. Metabolic intermediates selectively stimulate transcription factor interaction and modulate phosphate and purine pathways[J]. Genes & Development, 2009, 23(12): 1399-1407
- [20] Gietz RD, Akio S. New yeast-Escherichia coli shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites[J]. Gene, 1988, 74(2): 527-534
- [21] Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, et al. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS - DNA/PEG procedure[J]. Yeast, 1995, 11(4): 355-360
- [22] Gonzales K, Kay/kçl Ö, Schaeffer DG, et al. Modeling mutant phenotypes and oscillatory dynamics in the *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-PKA pathway[J]. BMC Systems Biology, 2013, 7(11): 40