

酵母乙醇耐受性状遗传不稳定的表观遗传探讨

孟春* 王航 任鸿桢 李锋 郭养浩

(福州大学生物科学与工程学院 福建 福州 350108)

摘要: 诱变、驯化等传统手段获得理想性状的酵母菌株, 其性能在传代和保存过程中很容易发生性状丢失现象。从表观遗传学的角度出发, 初步探讨酵母菌株在传统的诱变、驯化等育种过程及其性状丢失的表观遗传的分子机理。采用驯化等手段选育耐乙醇酵母, 并通过无压力方式传代, 研究此过程中酵母乙醇耐受性状遗传的稳定性与耐受相关的 *pro1*、*tps1*、*sod1* 基因启动子区域结合组蛋白上 H3K4 甲基化水平的关系。结果表明酵母乙醇耐受性状的变化受到酵母表观遗传控制。控制表观遗传的修饰过程易受环境改变的影响, 因此经过选育获得的乙醇耐性性状遗传的不稳定性可能与表观遗传分子机理密切相关。

关键词: 诱变育种, 遗传性状不稳定, H3K4 甲基化, 表观遗传分子修饰, 环境因素

The study of epigenetic mechanism of ethanol tolerance genetic instability of yeast

MENG Chun* WANG Hang REN Hong-Zhen LI Feng GUO Yang-Hao

(College of Biological Science and Biotechnology, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350108, China)

Abstract: The improved yeast strains obtained through classical breeding methods, such as the mutation and the acclimatization, easily lost their acquired characteristics during the process of passage or conservation. We investigated the epigenetic molecular mechanism of genetic instability about the yeast acquired traits. The relationship between the genetic stability of ethanol tolerance and the change of H3K4 methylation level of promoters of *pro1*, *tps1*, *sod1* was studied in the process of yeast strain breeding for improving ethanol tolerance or passage of improved strains without ethanol stress. The results showed that the genetic stability of ethanol tolerance was regulated by epigenetic variation of some genes in the yeast. The genetic instability of acquired traits of yeast might result from its epigenetic variation of relative genes because many environmental factors influenced on the epigenetic molecular modification in cells.

Keywords: Mutation breeding, Genetic stability, Methylation of H3K4, Epigenetic molecular modification, Environmental factors

基金项目: 福建省自然科学基金项目(No. 2010J01204); 福州大学人才基金资助项目(No. XSJRC2007-22)

* 通讯作者: Tel: 86-591-22866379; ✉ mengchun@fzu.edu.cn

收稿日期: 2010-10-15; 接受日期: 2010-12-17

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

高乙醇浓度对酵母菌作用的机理十分复杂,其耐受性状不是由一个或数个基因控制,而是涉及到大量的基因及其相关的代谢途径,其具体机理还不完全清楚^[1-3]。如酿酒酵母乙醇耐受性的机制与其响应热、氧化等逆境的反应有相通之处,许多参与乙醇应激基因同样参与抗氧化、热保护等多种抗逆境反应。例如,在乙醇胁迫下,应激多种逆境产生保护物质有关基因出现表达变化。乙醇毒性诱导活性氧产生,为了减少活性氧对细胞的破坏,*sod1*、*sod2*、*ctl1*、*ahp1*、*grx1*、*grx4* 等与抗氧化有关的基因被激活。当环境中存在高浓度乙醇时,受乙醇胁迫,酿酒酵母会对乙醇产生应激反应,这可能需要消耗大量能量,因此与能量代谢相关的基因 *glk1*(Glucokinas)、*tdh1*(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, isozyme 1)、*ald4* (acetaldehyde dehydrogenase 4)、*cit2* (cytosolic citrate synthase)等基因表达会上调,用于调动细胞合成与抵抗环境变化所需的物质^[4]。

目前依赖遗传信息和分子生物学操作工具的理性育种方法如基因工程、代谢工程等,还主要用于生物体系简单的基因分子改造,提高耐性这类多基因控制性状,可能需要对细胞进行多个基因共同改造。由于缺乏相关的遗传学知识和工具,用目前的分子生物学技术还很难实现,传统的驯化、诱变等手段对于提高多基因控制的性状尽管费时费力,但还是目前行之有效的方法。在乙醇对酵母细胞本身的作用机制完全阐明以前,人们很难通过高效理性的方法来提高抗性等方面的性能。但是经过诱变、驯化等手段获得高性能菌株,其性能在传代和保存过程中很容易发生性状丢失的现象。特别是在保存过程中,细胞几乎处于不生长的状态,DNA 序列发生改变的几率较小,但是经过长期保存的酵母菌株,其性能往往与保存前发生较大的差异,其分子机理用传统的遗传学观点还很难解释。本研究从表观遗传学的角度出发,初步探讨酵母菌株在传统的诱变、驯化等育种过程中的表观遗传的分子机理变化,对诱变后菌株遗传性状易于变化的原因提出一种新的解释。

1 材料与方法

1.1 菌株与引物

耐高温酿酒酵母菌株,购于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。本文 PCR 所用引物序列见表 1。

表 1 本研究中所使用的引物 Table 1 Primers used in this study		
碳源引物名称 Primers	引物序列 Sequences (5'→3')	
β-actin	Forward	GGTCTCAAACATGATCTGGG
	Reverse	GGGTCAGAAGGACTCCTATG
Promoter of <i>pro1</i>	Forward	CATTAAGCATGTTTTG
	Reverse	TTTTAACGGATCACAA
Promoter of <i>tps1</i>	Forward	GGGCCTATACGGTGAA
	Reverse	ACCCGATGCAAATGAG
Promoter of <i>sod1</i>	Forward	CGCTACAGACAGGCGTTAA
	Reverse	ACCCGATGCAAATGAGAC
<i>pro1</i>	Forward	GCTATTGGGCAGGGTA
	Reverse	TGGCATCTGGGTTTGT
<i>tps1</i>	Forward	AAGCAGGCTAACAAAC
	Reverse	TCAGGAAGATGGGTAC
<i>sod1</i>	Forward	AGCAGTCGCAGTGTTA
	Reverse	AGTGAGGACCAGCAGA

1.2 培养基及耐乙醇菌株选育方法

本实验通过传统的诱变驯化育种方法,选育具备乙醇耐受性有提高的菌株。我们以耐高温酿酒酵母菌株作为出发菌株进行选育。以培养中含有 7%、9%、11%、13%等系列乙醇浓度(*V/V*)的平板作为筛选耐乙醇酵母的条件。为了降低平板培养基中的乙醇挥发,采用透明胶带先将培养皿封住,然后再将平板放置在密封袋内密封培养。通过提高培养环境中温度和乙醇的浓度,将酵母在平板上生长出菌落的时间可作为衡量细胞耐受性的标志之一。是在同等条件下,最先生长出菌落的菌株,耐受性能最好,即在相同的温度和乙醇浓度条件下,菌落生长出来的天数越短,菌株的耐受性越强。

采用生长期细胞浓度约为 10⁷ 个/mL 的酵母,3 500 r/min 离心 10 min 去除液体培养基,沉淀物用生理盐水洗涤 2 次,并用等量生理盐水稀释配制菌悬液;2 mL 酵母菌悬液平铺到一个无菌培养皿中,

在磁力搅拌条件下, 放置在紫外灯下 10 cm 处照射 5 min; 转入到无菌试管中, 置冰上冰浴 1 h, 最后取出诱变后的酵母菌悬液涂布到筛选平板上进行培养。

1.3 酵母 H3K4 三甲基化 CHIP 检测

实验流程: 甲醛处理细胞, 收集细胞, 超声破碎, 加入目的蛋白的抗体, 与靶蛋白-DNA 复合物相互结合, 加入 Protein A, 结合抗体-靶蛋白-DNA 复合物并沉淀, 对沉淀下来的复合物进行清洗, 除去一些非特异性结合, 洗脱, 得到富集的靶蛋白-DNA 复合物, 解交联, 纯化富集的 DNA 片断, PCR 分析。试剂盒采用罗氏 Nimblegen 产品, 具体步骤参考产品说明书。

1.4 目标基因表达的 RT-PCR 检测

酵母 RNA 的提取采用 Invitrogen RNA 提取试剂盒。采用 Revert Aid TM First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), 将细胞总 RNA 反转录合成第一链 cDNA。然后根据目的基因的上游引物及下游引物, 以第一链 cDNA 为模板进行 25 μ L 体系 PCR 扩增检测。扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶中 4 V/cm 电泳 40 min, 凝胶成像系统中检测目的条带。以 β -ACTIN 为内参, 在 β -ACTIN 表达量相同的情况下, 检测其它基因表达量变化。半定量 PCR 采用 SYBR green I (Invitrogen) 方法测定。

2 结果与讨论

2.1 原始出发菌株的耐乙醇性能及驯化研究

本实验中, 采用液体培养基中添加 14% 的乙醇来驯化筛选酵母, 菌株耐乙醇的性能用菌株在含 14% 乙醇的固体培养基中菌落可见的时间长短来判定。

原始出发菌株 F1、F2、F3 经过诱变后, 在含 14% 乙醇的液体培养基中 30 $^{\circ}$ C 培养 3 d 后, 取 1 mL 接种到 14% 乙醇新固体培养基中, 再次培养。经过多次培养后取样, 然后涂无乙醇平板, 挑单菌落重新接种到含有 14% 浓度乙醇的培养基中培养。通过测定菌体的生长延迟期研究不同驯化程度菌株对乙醇耐受性的差异。结果表明(图 1), 原始出发

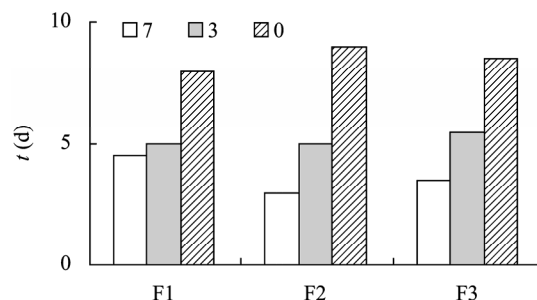


图 1 原始出发菌株的耐乙醇性能在驯化过程中的变化
Fig. 1 The variation of ethanol tolerance of original strain in the process of acclimatization

Note: 7: the stains were acclimatized after 7 times passage; 3: The stains were acclimatized after 3 times passage; 0: Starting strains.

菌株在含 14% 乙醇浓度的培养中长出可见菌落需要 8 d 以上, 而经过 7 次传代驯化后其延迟期缩短到 3~4 d。

2.2 驯化后菌株耐乙醇性状遗传稳定性的研究

如果经过驯化的菌株, 其 DNA 序列在驯化过程中发生突变, 然后经过环境的选择获得生长优势, 那该菌株在一定传代时期内抗性应该保持相对的稳定。为了研究经过驯化后的菌株乙醇抗性的遗传稳定性, 我们将上面经过多次驯化获得的具有较好乙醇抗性的 20 株菌株, 在无乙醇压力的固体平板上传代培养。分别通过 5 代和 10 代单菌落挑选的传代后, 进行其抗乙醇的抗性研究。根据其生长延迟期的变化研究其抗性的遗传稳定性。

20 株酵母抗性遗传稳定性的实验结果见图 2, 经过 5 次传代后的酵母, 大约有 3 株抗性降低至基本与出发菌株相似, 大约 10 株菌株的抗性下降, 还有 6 株细胞的抗性显著降低。经过 10 代培养后可以看到, 只有 3 株(7、8、16)还具有较好的乙醇抗性, 其他菌株的乙醇抗性显著降低或消失。

基因结构的稳定性是生物生存的基础, 实验结果表明, 酵母细胞经过驯化获得的抗性表型虽然具有一定的遗传特性, 但是具有遗传不稳定性。如果在驯化过程中其抗性是通过基因突变和环境选择获得, 菌株在无压力的环境中基因突变效率应远低于我们实验中抗性形状消失的速率。应用传统的通过基因突变的遗传学观点解释经过驯化后获得抗性性状消失的机理有一定的难度。

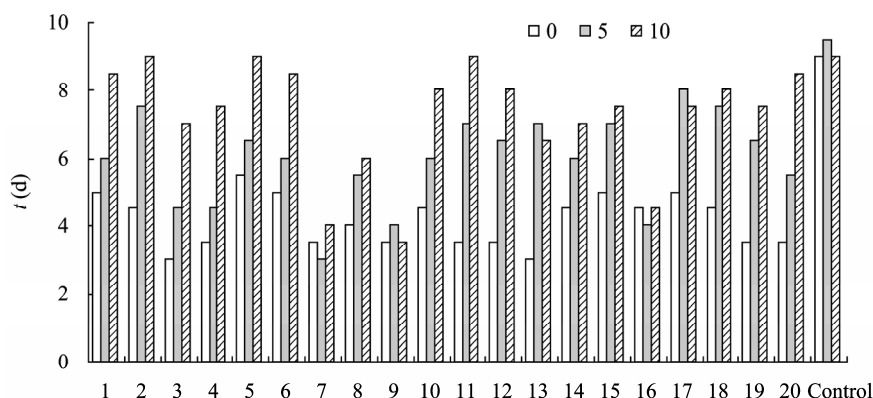


图 2 酵母乙醇抗性传代稳定性的研究

Fig. 2 The genetic stability of yeast ethanol tolerance in the process of passage

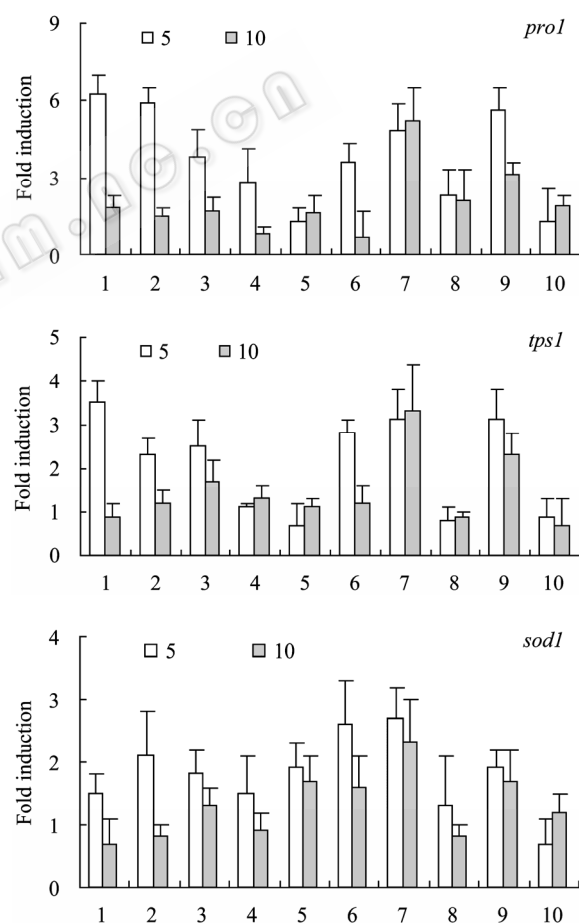
2.3 酵母驯化过程中表观遗传特性的研究

表观遗传学主要的分子机理包括 DNA 甲基化、组蛋白的修饰等, 这些修饰在体内存在可逆的变化过程, 这种可逆修饰使得基因表达可以受激素、饮食以及药物等外界因素的调控, 并具有一定的遗传性。由于在酵母细胞中很少有 DNA 甲基化的现象发现, 本实验就驯化对酵母组蛋白的修饰进行了初步研究。

组蛋白的修饰主要是赖氨酸或精氨酸残基氨基上的甲基化和乙酰化, 这是一个可逆的动态过程。染色质活性区域均有去甲基化 DNA 和高水平的乙酰化组蛋白, 相反在染色质非活性区域, 有甲基化 DNA 和高水平的去乙酰化组蛋白。其中, H3K4 甲基化是芽殖酿酒酵母染色质处于激活状态利于基因表达的一个重要标志^[5-6]。H3K4 甲基化对激活基因表达的研究表明, 基因启动子区域 H3K4 的三甲基化有利于基因转录的激活。

本研究初步采用染色质免疫共沉淀(ChIP)来研究与酵母耐性相关的基因 *pro1*、*tps1*、*sod1* 启动子区域与其结合的 H3K4 甲基化的状况^[4]。

首先比较了乙醇驯化处理筛选酵母与出发菌株抗性相关基因 *pro1*、*tps1*、*sod1* 启动子区域结合组蛋白 H3K4 甲基化的差异。我们对上述实验获得的前 10 株菌的 ChIP 检测结果如图 3 所示(PCR 相对定

图 3 经过 5 次和 10 次传代后酵母细胞 *pro1*、*tps1*、*sod1* 启动子区域 H3K4 甲基化分析Fig. 3 The methylation analysis of H3K4 on the promoters of *pro1*、*tps1*、*sod1* after 5 and 10 times passage

量分析,实验值为菌株的表达量与出发菌株表达量的比值),经过驯化后的细胞中与 *pro1*、*tps1* 基因启动子区域结合的 H3K4 甲基化水平高于出发菌株细胞^[4]。比较经过 5 代无压力培养后维持乙醇抗性和抗性显著降低的菌株相关基因启动子区域甲基化水平的差异发现,大部分抗性降低的菌株其与抗性相关的基因启动子区域的甲基化水平也明显降低。经过 10 代无压力培养筛选的菌株显现出类似的实验结果,即高乙醇耐受性的菌株,基因 *pro1*、*tps1* 启动子区域结合的 H3K4 的甲基化水平高于乙醇耐受性降低的菌株。*sod1* 基因始终维持在较高的水平,其启动子结合区的 H3K4 甲基化水平始终较高。实验结果表明(图 4),抗性相关基因的激活状态可能与该基因启动子区域结合的 H3K4 的甲基化水平较高有关。

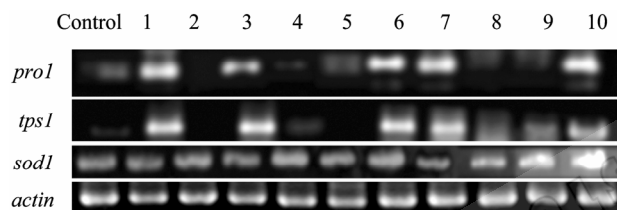


图 4 *pro1*、*tps1*、*sod1* 表达水平的对比

Fig. 4 Comparison of *pro1*, *tps1*, *sod1* expression level in different strains

大量的研究表明, H3K4 的甲基化标志着其结合基因具有调控活性,而这些甲基化位点主要存在于活性基因的启动子区域,研究表明完全激活的启动子与 H3K4 甲基化有密切的关系^[8-11]。本实验应用 ChIP 检测到乙醇耐受菌株的乙醇抗性相关基因启动子区域结合的 H3K4 的甲基化水平高于出发菌株,表明酵母在驯化过程中体现的一些遗传性状的变化可能更多与其表观遗传特性相关。而表观遗传性状的稳定性受环境的影响较大,相关的甲基化酶、多甲基化酶的活性调控与环境变化有极大关系,因此实验中通过驯化获得的耐受性菌株,其性状在正常状态下经过多次传代,改进的性状会发生改变甚至消失的现象。

在传统的育种过程中,我们常常会遇到经过选育后获得的高性能菌株其性状较容易衰退的现象。

除与细胞内质粒表达量及丢失有关外,很多观点认为获得的性状消失与相关基因的突变有较大关系。本工作通过对酵母乙醇抗性表观遗传学的初步研究表明,菌株的选育步骤中一些环境因子可能会造成基因表观遗传的改变,如组蛋白的甲基化、乙酰化修饰、DNA 甲基化等。这些表观遗传分子的改变同样会改变菌株的遗传特性及经过筛选获得的所需性状。但是此类性状的获得并不涉及基因序列的改变,遗传稳定性远低于基因改变导致的遗传稳定性,因此当环境改变后,该性状经过一定时间后菌株相关性状可能会发生改变。

环境因子的改变有可能导致许多基因的表观遗传分子发生修饰,因此对于由多基因控制的如耐性等相关性状,在选育过程中发生表观遗传改变的几率会更高。本实验结果表明,经过传统选育手段获得的菌株,其性状的改变及遗传不稳定性的分子机理可能是源于表观遗传特性。而控制表观遗传性状的 DNA 甲基化、组蛋白修饰等过程受到环境因素的影响较大,因此环境的改变会导致遗传性状的变化,即使是在低温保存过程中酵母生长基本受限, DNA 发生突变的几率较小。本研究只检测了 3 个基因的表观遗传特性,研究表明,与乙醇等耐受相关的基因达到 200 多个,因此通过基因芯片等技术可以检测更多基因的表观修饰位点,更能显示酵母乙醇抗性性状的分子表现遗传机理。

参 考 文 献

- [1] Aguilera A, Benítez T. Role of mitochondria in ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Arch Microbiol, 1985, 142(4): 389-392.
- [2] Hu XH, Wang MH, Tan T, et al. Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Genetics, 2007, 175(3): 1479-1487.
- [3] Jeffries TW, Jin YS. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts[J]. Adv Appl Microbiol, 2000, 47: 221-268.
- [4] Chandler M, Stanley GA, Rogers P, et al. A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Ann Microb, 2004, 54(4): 427-454.

[5] Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, et al. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3[J]. Nature, 2002, 419(6905): 407–411.

[6] Morillon A, Karabetsov N, Nair A, et al. Dynamic lysine methylation on histone H3 defines the regulatory phase of gene transcription[J]. Mol Cell, 2005, 18(6): 723–734.

[7] Pokholok DK, Harbison CT, Levine S, et al. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast[J]. Cell, 2005, 122(4): 517–527.

[8] Shilatifard A. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression[J]. Annu Rev Biochem, 2006, 75: 243–269.

[9] Roguev A, Schaft D, Shevchenko A, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* Set1 complex includes an Ash2 homologue and methylates histone 3 lysine 4[J]. EMBO J, 2001, 20(24): 7137–7148.

[10] Briggs SD, Bryk M, Strahl BD, et al. Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Genes Dev, 2001, 15(24): 3286–3295.

[11] Nagy PL, Griesenbeck J, Kornberg RD, et al. A trithorax-group complex purified from *Saccharomyces cerevisiae* is required for methylation of histone H3[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(1): 90–94.



2011 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-2)

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
10	第九届全国病毒学学术研讨会	中国微生物学会病毒学专业委员会	9 月	150	陕西西安	梁华 010-58900644
11	第三届微生物资源学术研讨会	中国微生物学会微生物资源专业委员会	9 月	150	甘肃兰州	阮志勇 13301101231
12	病原菌与宿主相互作用研讨会	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	9-10 月	100	湖北武汉	陈铁 tiechen2005@yahoo.com
13	第十九届全国生物固氮学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	9-10 月	100	四川雅安	张忠明 zmzhang@mail.hzau.edu.cn
14	2011 年中国微生物学会学术年会暨第十次全国会员代表大会	中国微生物学会	10 月	500	福建福州	王旭 010-64807200
15	第十四次全国环境微生物学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	11 月	500	福建厦门	朱建春 microb@njau.edu.cn
16	CBS-中国医学真菌学高级培训班	中国微生物学会真菌学专业委员会	11 月	80	江苏南京	刘维达 13605178767
17	全国酶工程学术研讨会	中国微生物学会酶工程专业委员会	11 月	150	广东广州	金城 010-64807425
18	第五届芽胞杆菌青年工作者学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	12 月	50	湖北武汉	孙明 027-87283455