

原生质体电融合酵母多倍体生理特性的研究

左小明 曾云中 吴雪昌 张冬妮 朱晓平

(杭州大学生命科学学院 杭州 310012)

摘 要 对原生质体电融合技术获得的 11 株酵母多倍体融合株, 进行了一系列生理特性的分析比较, 结果发现, 在电融合过程中, 融合株的细胞体积及 DNA 含量并不随着核倍性呈线性递增, 而是有其特殊的变化规律。当糖化酵母 *sta1*、*sta2* 和 *sta3* 在细胞核中各自纯合时, 明显表现出表达的剂量效应。其中 *sta1*、*sta2* 纯合的融合株, 在 YEPS 培养中, GA 分泌可被淀粉大量诱导, 表现出一定的二次生长特性。从分析结果推测, 在亲株 5301-14D 及 HU-TY-1A 中可能有对 GA 分泌不利的因素。

关键词 酵母, 电融合, 多倍体, 生理特性

本实验室从糖化酵母(*Saccharomyces diastaticus*)单倍体 5101-7C、5206-1B、5301-14D 及酿酒酵母(*S. cerevisiae*)单倍体 HU-TY-1A 出发, 应用原生质体电融合技术, 成功地避开 MAT 杂合对 *sta* 基因的表达抑制^[1], 获得糖化酵母不同组合的二倍体、四倍体和八倍体, 以及糖化酵母与酿酒酵母的种间融合株^[2]。对于这些融合株, 本文通过一系列重要生理特性, 着重作了亲株与融合株间的比较, 以考察细胞核多倍性时所表现出的酵母 *sta* 基因剂量效应及 *sta* 基因不同组合的表达效应, 并探索通过原生质体电融合技术将 *sta* 基因导入酿酒酵母的可能途径。

1 材料与方 法

1.1 菌株和培养基

1.1.1 菌株: 所用菌株列于表 1, 均为 MATa。其中 HU-TY-1A 不能利用淀粉和山梨醇作为碳源。

1.1.2 培养基: 含葡萄糖完全培养基(YEPD)、含葡萄糖基本培养基(SD)参照文献[3]配制; 含淀粉完全培养基(YEPS)、含淀粉基本培养基(SS)参照文献[4]配制; 高淀粉含量完全培养基(YEPS₃) 在 YEPS 基础上将淀粉含量提高到 3%。遗传标记鉴定培养基则根据所用菌株的营养要求, 在适当的基本培养基上添加相应的氨基酸成分^[5]。

以上培养基加入 2% 的纯化琼脂即为固体培养基, 用于制备斜面和平板。所有培养基均经高压蒸汽灭菌(0.06MPa, 113℃, 30min)。

1.2 试剂

1.2.1 过氧化物酶-葡萄糖氧化酶试剂(POD-GOD): 取辣根过氧化物酶(250 u/mg, RZ

国家自然科学基金资助项目。

本校 95 届毕业生傅文文参与部分工作。

本文于 1995 年 8 月 8 日收到。

≥3) 0.6mg, 葡萄糖氧化酶 (SIGMA, Essentially free of amylase, maltase, invertase and glycogenase) 100u, 4-氨基安替吡啉 10mg, 二甲基苯胺 50μl, 用 0.1mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液^[6](pH6.6)溶解, 并定容至 200ml。试剂需置 0~5℃ 避光保存, 溶液显淡红色则不宜再用。

1.2.2 含 0.1% I₂-KI 的 95% 乙醇: 取碘 (I₂) 40mg、碘化钾 (KI) 60mg, 加 95% 乙醇 100ml 溶解(简称碘液)。

表 1 所用菌株
Table 1 The strains used in this work

Strain	Used as	Relevant phenotype(genotype)	Source
<i>S. cerevisiae</i>			
HU-TYP-1A	parent	Sta ⁻	This lab.
<i>S. diastaticus</i>			
5101-7C	Parent	Sta ⁺ (sta1) Arg ⁻ (arg4)	H. Tamaki(Japan)
5206-1B	Parent	Sta ⁺ (sta2) Arg ⁻ (arg4)	H. Tamaki(Japan)
5301-14D	Parent	Sta ⁺ (sta3) Leu ⁻ (leu1)	H. Tamaki(Japan)
		Met ⁻ (met1) His ⁻ (his1)	
CCF-54	Fusant and parent	Sta ⁺ Arg ⁻	This lab.
BBF-2	Fusant and parent	Sta ⁺ Arg ⁻	This lab.
DDF-18	Fusant and parent	Sta ⁺ Leu ⁻ Met ⁻ His ⁻	This lab.
4CF-121	Fusant and parent	Sta ⁺ Arg ⁻	This lab.
4BF-11	Fusant and parent	Sta ⁺ Arg ⁻	This lab.
4DF-8	Fusant and parent	Sta ⁺	This lab.
4CDF-4	Fusant	Sta ⁺	This lab.
4BDF-53	Fusant	Sta ⁺	This lab.
8CF-21	Fusant	Sta ⁺ Arg ⁻	This lab.
<i>S. diastaticus</i> × <i>S. cerevisiae</i>			
5CHF-32	Fusant	Sta ⁺	This lab.
SBHF-22	Fusant	Sta ⁺	This lab.

1.3 菌株的鉴定与分析

1.3.1 细胞形态观察及体积测定: 将待测菌株转接 YEPD 斜面, 30℃ 活化培养 24h, 接种于 YEPD, 150r/min 振荡培养 15h, 取培养液 1 滴, 用石炭酸复红染色液^[7]染色, 显微测微尺测量细胞的长轴与短轴, 并计算细胞体积。

1.3.2 细胞核染色: 待测菌株接种于 YEPD, 振荡培养 15h, 离心收集菌体, 无菌水充分离心洗涤后作 Feulgen 染色^[7]。显微镜观察时用同样处理的亲株作对照。

1.3.3 遗传稳定性及营养要求测定: 待测菌株经适当稀释, 涂布于 YEPD 平板, 培养至形成单菌落, 随机挑取 200 个单菌落, 分别用无菌牙签对应点种于基本培养基、遗传标记鉴定培养基及完全培养基上, 以亲株为对照记录培养结果。所挑取 200 个单菌落营养要求应完全一致, 否则视为遗传不稳定或异核体。

1.3.4 DNA 含量测定：待测菌株接种于 YEPD，振荡培养 60h，离心收集菌体，并计数菌体总数。然后，将菌体置于 60℃ 干燥至恒重，按 Ogur 等^[8]的方法提取 DNA，用二苯胺显色，分光光度法^[6]测定 DNA 的单位细胞含量。

1.3.5 胞外淀粉糖化酶(Extracellular glucoamylase, GA)活力测定：采用 Kim 等^[9]的方法略加修改。以 POD-GOD 为显色剂，用分光光度法测定菌株 YEPS 培养液中 GA 水解淀粉所释放的葡萄糖，根据酶活定义计算样品中的 GA 活力。GA 一个活力单位(u)的定义为：pH5.0，温度 55℃ 时，每分钟水解淀粉释放 1μmol 葡萄糖。

1.3.6 淀粉水解圈直观比较：按 Lalluce 等人^[10]的方法加以改进。将所有待比较的菌株分别接种 YEPD，振荡培养 24h，培养液经适当稀释后涂布 YEPD 平板，培养至形成单菌落，无菌牙签挑取，点种于 YEPS₃ 平板，30℃ 培养 72h，取出后用碘液浸没，静置放置 10h 以上，倒去碘液，直观比较淀粉水解圈与菌落的大小比例。

1.3.7 生长曲线测定：按邱鸿芳等^[11]的方法进行。

1.3.8 生物量测定：按蔡金科等^[12]的方法稍加改进。菌株在 YEPD 中的培养时间为 24h，在 YEPS 中的培养时间为 26h。

2 结果与讨论

2.1 亲株及融合株 DNA 含量和细胞体积

各菌株经细胞核染色，未发现异核体。DNA 含量及细胞体积测定结果见表 2。

表 2 各菌株的细胞体积和 DNA 含量

Table 1 Cell volume and DNA content of strains

Strain	Cell size		Nuclear ploidy		
	S×L	Cell volume	S. P. *	DNA content	R. D. F. P*
	/μm ²	/μm ³	(n)	(× 10 ⁻⁸ μg/cell)($\bar{X} \pm SD$)	(n)
HU-TY-1A	4.55×4.68	50.73	1	3.34±0.18**	1.0
5101-7C	4.31×4.55	44.26	1	3.10±0.16**	1.0
5206-1B	5.05×5.91	78.92	1	3.22±0.16**	1.0
5301-14	5.29×5.78	84.69	1	3.39±0.18**	1.0
CCF-54	5.42×5.78	88.90	2	5.79±0.13	1.9
BBF-2	6.28×6.52	134.62	2	6.05±0.13	1.9
DDF-18	6.52×6.89	153.36	2	6.32±0.12	1.9
4CF-121	6.65×7.63	176.67	4	10.83±0.17	3.5
4BF-11	6.77×7.63	183.11	4	11.04±0.18	3.4
3DF-8	6.52×7.87	175.17	4	11.71±0.43	3.5
4CDF-4	7.14×8.12	216.75	4	11.41±0.15	3.5
4BDF-53	7.38×8.12	231.56	4	11.35±0.23	3.4
8CF-21	8.25×8.62	307.19	8	15.82±0.45	5.1
5CHF-32	7.88×8.12	264.00	5	12.82±0.31	4.1
5BHF-22	7.75×8.00	251.59	5	12.89±0.29	4.0

* S×L:Short axis×Long axis

S. P. :Ploidy of Strains

R. D. F. P:Rate of DNA contents between fusants and parents(F/P)

** As basal contents for calculating R. D. F. P.

从表 2 所列数据可以看出，融合株细胞 DNA 含量并不与融合株的核倍性成直线函

数关系,说明在电融合过程中融合株细胞核 DNA 发生了重新组合,并有 DNA 的流失。类似现象已有所报道^[13,14]。实验结果提示,与亲株 DNA 含量之和相比,当融合株的核倍性为 $2n$ 、 $4n$ 及 $5n$ 时,每次融合都会造成约 $6.1\% \sim 12.9\%$ 的 DNA 流失。当融合株核倍性为 $8n$ 时,最后一次融合所引起的 DNA 流失达 27.0% 。

细胞体积测定结果表明,随着核倍性的增高,体积有增大的趋势,但非简单的线性函数关系,与亲株的体积之和相比,融合株体积增加的最大值为 16.11% (5CHF-32),体积减少的最大值为 42.89% (4DF-8)。各菌株间有较大的差异。

2.2 营养要求

结果表明,单一亲株融合所得融合株 (CCF-54, BBF-2, DDF-18, 4CF-121, 4BF-11, 4DF-8, 8CF-21), 除 4DF-8 外,均未改变原亲株的营养要求,原有缺陷型遗传标记依然存在。而两种亲株间的融合株 (4CDF-4, 4BDF-53, 5CHF-32, 5BHF-22) 则由于营养缺陷的互补而改变成原养型。融合株 4DF-8 在实验过程中转变为原养型,推测可能与缺陷型的回复突变有关。

2.3 GA 活力与 *sta* 基因的若干表达效应

各菌株 GA 活力测定结果见表 3

表 3 融合株 GA 活力及 *sta* 基因型

Table 3 GA activity and genotypes of *sta* genes

Strain	GA activity		<i>sta</i> genotype*
	$\times 10^{-2}$ u/ml	$\times 10^{-10}$ u/cell	
5101-7C	2.8	2.8	<i>sta1</i>
CCF-54	3.6	4.2	$2 \times sta1$
4CF-121	4.2	4.9	$4 \times sta1$
8CF-21	10.8	9.9	$8 \times sta1$
5206-1B	5.5	4.8	<i>sta2</i>
BBF-2	10.0	8.7	$2 \times sta2$
4BF-11	13.3	10.9	$4 \times sta2$
5301-14D	0.2	0.1	<i>sta3</i>
DDF-18	0.5	0.3	$2 \times sta3$
4DF-8	0.6	0.8	$4 \times sta3$
4CDF-4	0.4	0.2	$2 \times sta1/2 \times sta3$
4BDF-53	0.7	0.3	$2 \times sta2/2 \times sta3$
5CHF-32	0.2	0.4	$4 \times sta1/sta$
5BHF-22	0.3	0.5	$4 \times sta1/sta$
HU-TY-1A	0.0	0.0	<i>sta</i>

*Here the genotype was not tested by DNA hybridization.

结果可见, *sta1*, *sta2* 及 *sta3* 所表达的 GA 活力,在基因各自纯合时都有随剂量增加而增强的趋势。*sta* 基因杂合的四倍体 4CDF-4 及 4BDF-53, GA 分泌能力较弱,接近于亲株 5301-14D,而与另一亲株相比有较大的差异。糖化酵母纯合四倍体 4CF-121, 4BF-11 与酿酒酵母单倍体 HU-TY-1A 的种间融合株 5CHF-32 及 5BHF-22, GA 的分泌能力与其糖化酵母亲株相比明显减弱。

淀粉水解圈直观比较结果与酶学方法测得的 GA 活力间存在着非常一致的相关性 (图 1)。Pretorius 等^[3]、Laluce 和 Mattoon^[10]、Sakai 等^[13]、Erratt 和 Stewart^[15] 及 Vanoni 等^[16] 从不同角度有效地证明了 *sta* 基因剂量效应 (Dosage effect) 的存在,但

主要是从核低倍性 ($2n$) 菌株和多拷贝质粒出发来考察 *sta* 基因。本文则从原生质体电融合手段入手,获得细胞核性多拷贝 *sta* 基因的糖化酵母融合株,在分析中可观察到,即使

在融合过程中有 DNA 的流失现象,但随着核倍性的增加,纯合的 *sta* 基因表达仍然可见明显的剂量效应。

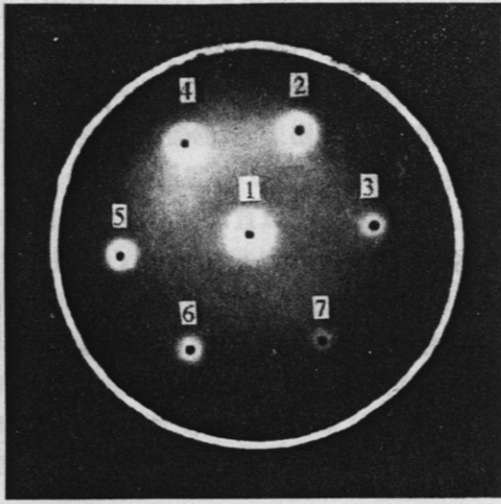


图 1 各菌株淀粉水解圈直观比较

Fig. 1 Direct comparison of starch-lysis halo for the strains

1. 4BF-11, 2. BBF-2, 3. 5206-1B, 4. 8CF-21,
5. 4CF-121, 6. CCF-54, 7. 5101-7C

实验结果显示当 DDF-18 与 *sta* 基因表达相对较强的 CCF-54 及 BBF-2 融合时,并未获得 GA 分泌有进一步提高的融合株。Sakai 等^[13]在对带有 *sta1* 和 *sta3* 的融合株的研究中,曾推测可能有一些调节细胞生长速度(或调节 GA 分泌量)的基因与 *sta3* 相连锁,本文所得结果,可作相同推测。在对融合株 5CHF-32 及 5BFH-22 的分析中,不难发现在 HU-TY-1A 中可能也存在着某种不利 *sta* 表达的因子,其作用比已报导的抑制基因 *sta10*(INH1)^[17] 相对较弱。然而,到目前为止,出现 *sta* 基因表达减弱现象,还不能完全排除在融合时 *sta* 基因随亲株 DNA 部分流失的可能性。

2.4 在 YEPD 及 YEPS 中的生长状况

在 YEPD 液体培养中,糖化酵母纯合多倍体融合株,随着细胞核倍性的增高,处于同一时期的细胞生长密度(OD_{650nm})也

有随之增大的趋势。在 YEPS 液体培养中,5101-7C, CCF-54, 4CF-121, 8CF-21, 5206-1B, BBF-2, 4BF-11 七个菌株的生长曲线,明显可观察到两个对数生长期,表现出二次生长特性(图 2)。5301-14D, DDF-18, 4DF-8, 4CDF-53, 5CHF-32, 5BHF-22 七个菌株在 YEPS 中生长相对较弱,未见二次生长现象。HU-TY-1A 在 YEPS 中不生长。结合各菌株 GA 活力测定结果,则可发现各菌株在 YEPS 中的生长状况与 GA 的分泌密切相关。

各菌株生物量测定结果见图 3。结果表明在 YEPS 中 GA 分泌较强的菌株,其 YEPD 与 YEPS 中的生物量间不存在统计学上有显著意义的差异($t < t_{0.05}$),提示菌株对葡萄糖及淀粉都有较好的利用。而 YEPS 中 GA 分泌较弱的菌株,在两种培养基中的生物量间却存在着显著的差异($t > t_{0.01}$),提示这些菌株对葡萄糖利用较好而对淀粉的利用则相对较差。

综上所述,本文对已经获得的 11 株酵母融合株,作了一系列生理特征的比较分析,尤其是从核倍性角度考察了 *sta1*、*sta2* 及 *sta3* 的表达效应。其中表现出的剂量效应为今后通过原生质体电融合构建 GA 强分泌的新型酒精发酵酵母菌株展示了良好前景。亲株 5301-14D 及 HU-TY-1A 中可能含有的对 GA 分泌不利的因素,在今后的育种工作中值得进一步研究。

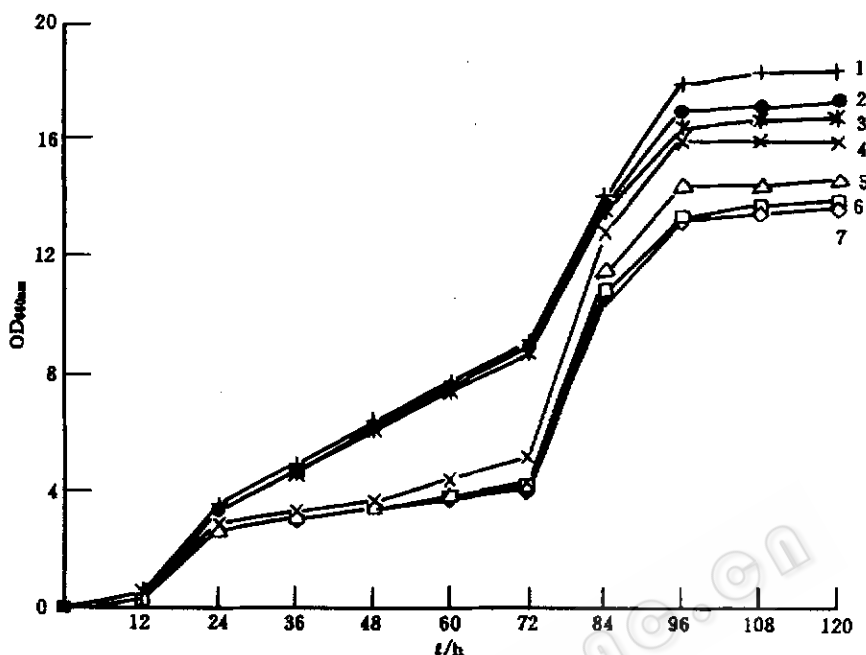


图2 菌株在 YEPS 中的生长曲线(示二次生长)

Fig.2 Growth curves of the strains in YEPS(show the secondary growth) The legends are the same as in Fig. 1

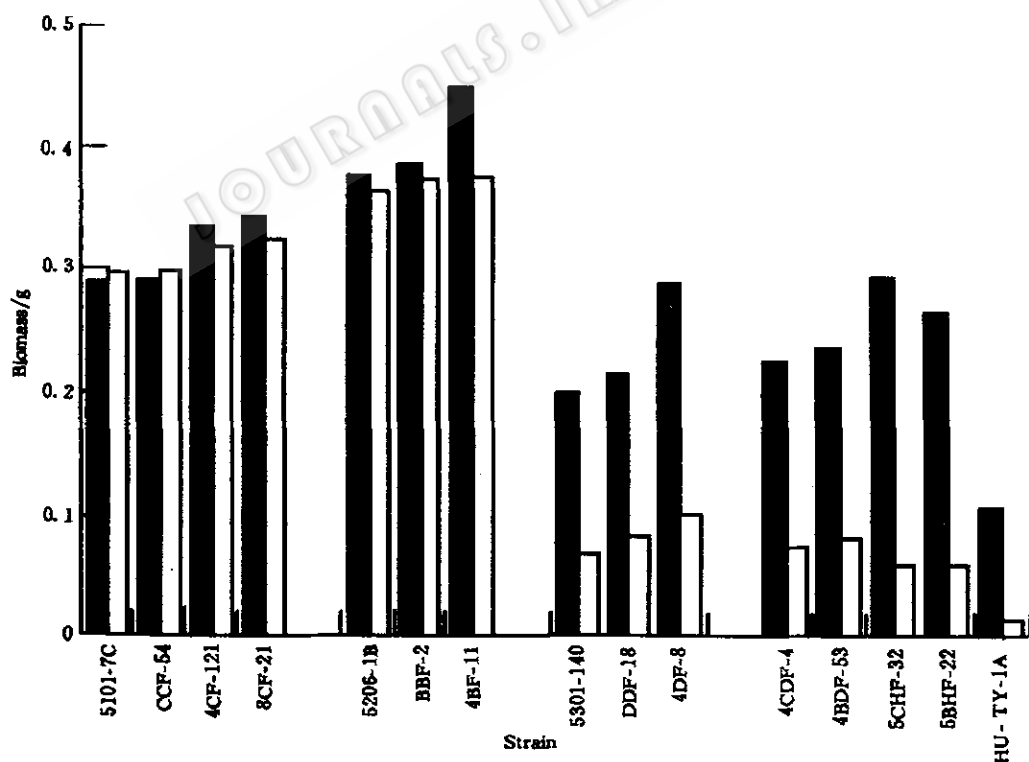


图3 各菌株在 YEPD 及 YEPS 中的生物量

Fig.3 Biomass of the strains in YEPD and YEPS

■ In YEPD □ In YEPS

参 考 文 献

- [1] Yamashita I, Takano Y, Fukui S. J Bacteriol, 1985, 164(2): 769~773.
- [2] 曾云中, 左小明, 吴雪昌等. 微生物学报, 1995, 35(4): 264~270.
- [3] Pretorius I S, Modena D, Vanoni M *et al.* Mol Cell Biol, 1986, 6(9): 3034~3041.
- [4] Okimoto Y, Yoshimoto H, Shima H *et al.* Agric Biol Chem, 1989, 53(10): 2797~2800.
- [5] Guthrie C, Fink G R. Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, vol. 194, San Diego: Academic Press, Inc., 1991, 15.
- [6] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术, 北京: 高等教育出版社, 1981, pp. 219~220, 372.
- [7] 范秀容, 沈 萍. 微生物学实验, 第二版, 北京: 高等教育出版社, 1991, pp. 64~65, 257.
- [8] Ogur M, Minckler, Lindegren C E *et al.* Arch Biochem Biophys, 1952, 40: 177~184.
- [9] Kim K, Park C S, Mattoon J R. Appl Environ Microbiol, 1984, 54(4): 966~971.
- [10] Laluece C, Mattoon J R. Appl Environ Microbiol, 1984, 48(1): 17~25.
- [11] 邱鸿芳, 陈士怡. 遗传学报, 1985, 12(3): 175~182.
- [12] 蔡金科, 刘玉方, 张博润. 微生物学报, 1985, 25(2): 124~148.
- [13] Sakai T, Koo K, Saitoh K *et al.* Agric Biol Chem, 1986, 50(2): 297~306.
- [14] Spencer J F T, Spencer D M, Bizeau C *et al.* Curr Genet, 1985, 9: 623~625.
- [15] Erratt J A, Stewart G G. Dev Ind Micro, 1981, 22: 577~588.
- [16] Vanoni M, Lotti M, Alberghina L. Biochim Biophys Acta, 1989, 1008: 168~176.
- [17] Polaina J, Wiggs M Y. Curr Genet, 1978, 164: 205~209.

Physiological Characteristics Studies of Yeast Polyploids Obtained from Protoplast Electrofusion

Zuo Xiaoming Zeng Yunzhong Wu Xuechang Zhang Dongni Zhu Xiaoping
(College of Life Science, Hangzhou University, Hangzhou 310012)

Abstract Eleven yeast polyploids obtained by protoplast electrofusion technique were identified and analyzed physiologically and biochemically. The results indicated that the cell volumes and DNA contents of the fusants did not increase linearly with the nuclear ploidies. They had their own special rules in changing. When *sta1*, *sta2* and *sta3* genes were respectively homozygous in *S. diastaticus* fusants, the expression of these genes showed distinct dosage effects. The fusants being homozygous in *sta1* or *sta2* displayed secondary growing in the culture of YEPS. Their GA secretion could be induced obviously by starch. The results also suggested that there might be some negative regulating factors in the parental strains 5301-14D and HU-TY-1A respectively to control the GA secretion.

Key words Yeast, electrofusion, polyploid, physiological characteristics