酿酒酵母的同步培养方法及其应用*

李伟军　丛　威**　徐　方　欧阳藩

(中国科学院化工冶金研究所　北京　100080)

关键词：同步培养，同步化系数，酿酒酵母

中图分类号：Q93-335　**文献标识码**：C　**文章编号**：0253-2654(1999)-06-0433-04

同步培养是指通过一定的化学或物理方法使培养的微生物或动植物细胞处于比较一致的生理状态，生长发育在同一阶段的培养方法。它不同于分批培养，在分批培养中，细胞处于不同的生长阶段，生理状态与代谢活动都不一样。显然，分批培养中的群体表现行为不能代表单个细胞的生理生化特性。而利用同步化技术，可以使同步生长群体与个体行为基本一致，这样就能用研究群体行为的方法来研究细胞水平的问题。

需要指出，细胞的同步化既可以在自然条件下发生，又可以经人为处理得到。前者称为自然同步化，后者称为人工同步化，本文主要讨论人工同步化的情况。

酿酒酵母(*Saccaromyces cerevisiae*)是广泛用于工业生产与科学研究的常用菌种之一，本文拟对酿酒酵母同步培养方法及其在科研中的应用作一综述。

1　酿酒酵母的生活周期与特性

酿酒酵母是一种结构简单的真核微生物。一般情况下，酿酒酵母以出芽的方式无性繁殖，只有在特定条件下，才会出现多倍体有性生殖现象。酿酒酵母是研究细胞生长和分裂的理想对象。其细胞周期与高等真核生物类似，可以分为四个时期：G1、S、G2、M期，细胞周

---

* 中国科学院生物科学与技术研究特别支持项目(STZ-3-08)

** 通讯联系人

收稿日期：1998-08-04，**修回日期**：1998-12-10

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

期各阶段有明显的形态变化，在显微镜下容易观察。同时，酿酒酵母培养方便，在固体与液体培养基中均可迅速生长，代时约为 1～3h；有大量的细胞周期突变缺陷型菌株，这些都为细胞周期研究带来方便。

2 酵母细胞同步培养的基本原理与方法

人工同步培养方法按其原理主要分为选择同步法与诱导同步法两类，这两类方法均适用于酵母细胞[1]。

选择同步法是从分批生长的细胞群体中选择出处于同一生长阶段的细胞来培养的方法，多数情况是专门选择细胞分裂后子细胞形态有明显变化的那一生长阶段。选择同步法的主要选择依据是细胞的物理性质，如大小、密度、形状、表面电荷差异等。常见的过滤法、密度梯度离心法、膜吸附法均属于选择同步方法。其中，出现较早也较为成熟的方法有差异沉降离心法[2]和平衡密度梯度离心法[3]。前者利用不同大小的细胞在蔗糖密度梯度中迁移速率不同，而将不同生长阶段的细胞区分开来，这种方法可以在低速离心机上实现。后者选用了一种特殊的以蔗糖为单体的多聚物 Ficoll（Pharmacia 公司的商品名，分子量约为 400kD）制成稳定的线性梯度，经过超速离心（> 20，000r/min）后，不同密度的细胞将稳定位于与之相当的密度梯度范围内。

诱导同步法通过改变细胞群体的生长环境，使细胞专一地停留在某一生长阶段，然后解除限制生长的环境因素，细胞即开始同步分裂或同步生长。常用的限制生长的方法包括：温度变化抑制分裂；光照变化影响分裂；特定营养物质的饥饿；化学抑制剂抑制细胞染色体复制等[1]。由于饥饿法操作简单，因此应用较广。

无论用哪类同步化方法，每次处理后的同步化细胞最多只能维持 2～3 代就趋向混乱生长。尽管如此，用同步化方法研究个体细胞的生长仍然很有意义，例如，研究与细胞分裂相关的细胞周期调控因子及基因表达的时相性；研究外界物理、化学因素对不同时相细胞生理与形态的影响，以及特定酶、蛋白质及核酸的合成与衰减规律。此外，还可以用来研究不同生长时相细胞对特定底物与产物的代谢动力学，可以为生化工程、发酵工程的条件优化提供一定理论依据。

3 同步化程度的定量描述

同步生长明显的特征是细胞的增殖过程不连续，细胞数目呈阶梯式增长，这不同于随机生长对数期的指数增长方式。理想化的同步生长可看作细胞数对时间的不连续函数，其阶高为 lg2，如(1)式所示。

$$\lg(CN_t) = \mathrm{int}\left(\frac{t - t_0}{T_g}\right)\lg 2 + \lg(CN_0) \qquad (1)$$

t 为生长时间，t_0表示第一次同步分裂时刻；CN_t表示 t 时刻的细胞数，CN_0表示第一次同步分裂结束时的细胞数；T_g为代时；lg 为常用对数，int 为高斯取整函数。

同步培养不可能得到完全同步的培养物，总存在一定程度的随机生长，因此需要对同步化程度进行定量描述。通常采用同步化系数（Synchronous Index，SI）来衡量同步化程度。常用的计算同步化系数的方法是 Engelberg 方法与 Scherbaum 方法。

3.1 Engelberg 方法 Engelberg 根据同步培养细胞分裂时的细胞数目增加的速度来计算同步化系数[4]。为简略起见，本文仅给出其结论。

设同步培养细胞数在 0～t_g时间段内由初始值 n_0倍增为 $2n_0$。R_t表示细胞分裂速率的变化，亦称比生长率，R_t随 t 变化的曲线呈一峰形。R_0表示 R_t 在 0～t_g期间的平均值。设 R_t 与 R_0在 t_1、t_2时刻相交，对应的细胞数为 n_1、n_2。同步化系数 SI 定义为 R_t 在 t_1～t_2内的定积分与 R_0 在 0～t_g内的定积分之比。同步化程度愈高，则 SI 值越接近于 1。SI 的具体计算过程如下。

由(2)、(3)式求比生长率 R_t 及其平均值 R_0：

$$R_t = \frac{dn/dt}{n} \qquad (2)$$

$$R_0 = \frac{\int_0^{t_g} R_t\,dt}{t_g} = \ln 2/t_g \qquad (3)$$

由(4)式计算同步化系数：

$$SI = \frac{\int_{t_1}^{t_2} R_t\,dt}{\int_0^{t_g} R_t\,dt} \times 100\% = \frac{\ln(n_2/n_1)}{\ln 2} \times 100\% \qquad (4)$$

3.2 Scherbaum 方法 Scherbaum 的方法则直接依据同步生长曲线求出同步化系数[5]。

设 n_0为一次同步分裂开始的细胞数，n 为同步分裂一代结束时的细胞数，t_d为一次同步分裂开始至分裂结束的时间间隔，T_g为代时。以上各值均可由实验测得。

SI 值按以下定义式计算：

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

$$SI = (n/n_0 - 1)(1 - t_d/T_g) \quad (5)$$

(5)式中 n/n_0 比值在 1 与 2 之间。t_d/T_g 愈小，则 SI 值愈大，说明细胞分裂时间愈集中，同步化效果愈好，反之，则 SI 值愈小，同步化效果愈差。

以上关于同步化系数 SI 的测定方法有一定普遍性。考虑到方法的简便性，许多作者在测定酿酒酵母同步化系数时采用了 Scherbaum 的方法。

4　酵母细胞同步培养法的应用

本世纪六十年代以来，随着分子生物学的发展，酿酒酵母一直是生物学研究的热点。对酿酒酵母细胞的同步化方法的研究始于本世纪五十年代后期，其中，D. H. Williamson 与 A. W. Scopes 基于 G1 期阻抑的营养—饥饿方法(1962 年)和 J. M. Mitchison 与 W. S. Vincent 基于不同时期细胞大小、密度差异的蔗糖密度梯度离心法(1965 年)较具有代表性。

早在 1954 年，Beam 等发现 *S. cerevisiae* 在饥饿状态下存在部分同步化[6]。Campbell 通过周期性改变营养供应的方法在连续培养中诱导出轻微的同步化，但通过改变温度、pH 及单一的葡萄糖饥饿诱导同步生长则均未获成功[7]。其后，Sylvén等通过在琥珀酸存在下饥饿处理一 *S. cerevisiae* 四倍体菌株，获得了较为理想的同步培养物。Spoerl 和 Looney 发现用 X 射线抑制分裂的芽殖酵母细胞群体虽有 36% 的细胞死亡，恢复生长后可以获得相当程度的同步。直到 D. H. Williamson 与 A. W. Scopes 发表一系列有关 *S. cerevisiae*(菌株编号 N. C. Y. C. 239)同步培养的文章，才真正能获得较稳定的同步化细胞[8]。这是一种基于营养饥饿的诱导方法，基本思路是：首先将一定浓度培养物中大小不同的细胞沉降分离，得到大细胞；然后将大细胞接种在 Wickerham 培养基与另一种饥饿培养基中反复循环培养 2～3 次，可以得到同步培养物。美中不足的是，该方法十分烦琐，最初为获得同步化酵母细胞要两周以上时间，改进后仍需至少 3～4d。另外，此方法适用的菌株类型较特殊，没有普遍性，在此基础上人们进行了一些改进以适用于其它酵母菌株。较为典型的有 N. Sando 与 P. Tauro 等[9]的工作，他们将营养饥饿法与高密度预培养相结合，缩短了实验周期，简化了实验方法。

由于诱导同步化方法对细胞正常代谢行为干扰较大，人们一直在寻找其它原理的同步方法。随着离心技术的发展，人们相继创建了差异沉降离心法[2]与平衡密度梯度离心法[3]应用于酿酒酵母同步化，获得同步化的幼龄酵母细胞。离心选择方法所获得的同步化细胞产率较低，但是得到的同步细胞形态均一，与诱导方法相比对细胞的生理影响较小。因此，在条件许可时，应首先考虑使用选择同步方法。70 年代，J. Sebastian 等采用区带离心法[10]，将梯度液的制备与细胞分离集中在一个区带离心转头中完成，离心后的酵母细胞大小分级更加精细，可同时获得不同尺寸大小细胞的同步培养物。为了得到较大量的同步细胞，D. lloyd 等[11]对离心装置进行改造，使酵母培养液连续流入特制离心转头内，离心分离出的幼龄细胞流出后可直接同步培养，此装置可以连续操作，使迅速而简便获得大量同步酵母细胞成为可能。

在建立一系列同步培养方法的基础上，人们开展了对同步化酿酒酵母细胞生理生化方面的研究。D. H. Williamson 与 A. W. Scopes 研究了同步分裂酿酒酵母的核酸含量的变化，比较了 DNA、RNA 合成与出芽之间的联系，研究了同步生长与耗氧之间的关系，发现耗氧呈阶梯式的增长。随后，一些学者又对酿酒酵母的酶合成开展研究，结果表明在同步生长条件下，一些酶的合成具有时期性[9]。70 年代前后，J. Wildenberg[12]等人进行了一系列有关同步化酵母的遗传学方面的研究，包括遗传重组、染色体着丝粒重组、DNA 复制、核糖体 rDNA 复制等。

5　展望

关于酿酒酵母的同步机理目前尚无定论。近年来，对酿酒酵母连续培养中的同步振荡(synchrony oscillations)现象的研究成为热点之一[13]。酿酒酵母在连续培养中的同步振荡是一种特定条件下的部分同步化过程，该现象仅在酿酒酵母中发现。当液体培养基流加速率低于一临界值时，酿酒酵母会自发同步，并出现一些周期性振荡行为，例如耗氧量、糖耗和乙醇产率的振荡等。Martegani 等[14]认为自发同步是由于外界环境的刺激改变了细胞分裂的临界蛋白含量或临界细胞大小所致；Münch等用流式细胞术深入研究了此现象，认为自发同步与菌株性质关系不大，而主要取决于外界培养条件，只要进入同步容许条件(permissive conditions for synchrony)即可诱发自发同步振荡。Münch[15]通过瞬变实验(transient experiments)来检测酿酒酵母的细胞周期动力学行为。随着研究手段的进步，对细胞同步

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

机制研究的逐步深入,相信最终将弄清其机理并加以应用。

参 考 文 献

[1] Elliott S G, Mclaughlin C S. Progr Nucleic Acid Res Mole Biol, 1983, **28**:143~176.

[2] Mitchison J M, Vincent W S. Nature, 1965, **205**: 987~989.

[3] Sitz T O, Kent A B, Hopkins H A *et al*. Science, 1970, **168**:1231~1232.

[4] Engelberg J. Exptl Cell Res, 1961, **23**:218~227.

[5] Scherbaum O H. J Protozool, 1959, 6(supp.):17.

[6] Beam C A, Mortimer R K, Wolfe R G *et al*. Arch Biochem Biophys, 1954, 49:110.

[7] Campbell A. J Bacteriol, 1957, **74**:559~564.

[8] Williamson D H, Scopes A W. Nature, 1962, 193: 256~257.

[9] Tauro P, Halvorson H O. J Bacteriol, 1966, **92**(3): 652~661.

[10] Sebastian J, Carter B L A, Halvorson H O. J Bacteriol, 1971, **108**(3):1045~1050.

[11] Lloyd D, John L, Edwards C *et al*. J Gen Microbiol, 1975, **88**:153~158.

[12] Wildenberg J. Genetics, 1970, **66**:291~304.

[13] Keulers M, Satroutdinov A D, Suzuki T *et al*. Yeast, 1996, **12**:673~682.

[14] Martegani E, Porro D, Ranzi B M *et al*. Biotechnol Bioeng, 1990, **36**:453~459.

[15] Münch T, Sonnleitner B, Fiechter A *et al*. J Biotechnol, 1992, **22**:329~352.

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