

不同传代次数的酿酒酵母细胞壁蛋白组学分析

姚继兵¹ 祖国仁¹ 朴永哲² 成建国¹ 赵长新^{1*}

(1. 大连工业大学 生物工程学院 辽宁 大连 116034)

(2. 大连民族学院 生命科学学院 辽宁 大连 116600)

摘要: 【目的】探讨酿酒酵母衰老过程中细胞壁蛋白变化,从蛋白水平上解释酿酒酵母衰老的原因。【方法】以酿酒酵母 FFC2146 为研究对象,采用显微镜观察法比较了经 2、10、15 次连续传代酿酒酵母的细胞形态;用计算细胞沉降速率的方法考查酵母凝絮性;通过 3,5-二硝基水杨酸法测定降糖速率来表征酵母代谢活力;采用二硫苏糖醇溶解法结合苯酚萃取法抽提不同传代次数的酿酒酵母细胞壁蛋白;并且通过双向电泳进行差异性分析。【结果】结果显示随着传代次数的增加酿酒细胞个体表面变得粗糙,凝絮能力明显增强,降糖能力明显减弱,表明多次传代后的酵母体现出衰老现象。双向电泳结果共得到 309 个胞壁蛋白点,其中 11 个蛋白质点存在明显差异。6 个蛋白质点在第 15 代丰度小于第 2 代丰度 2 倍以上,4 个蛋白质点只在第 15 代酵母细胞壁中出现,1 个蛋白质点只在第 2 代酵母细胞壁中出现。【结论】酿酒酵母 FFC2146 经过 15 次连续传代培养后 11 个细胞壁蛋白丰度发生明显变化,此 11 个细胞壁蛋白的表达水平与酿酒酵母衰老相关。

关键词: 酿酒酵母, 酵母衰老, 传代次数, 细胞壁蛋白, 双向电泳

*通讯作者: ✉: zhaochangxin@126.com

收稿日期: 2012-12-04; 接受日期: 2013-01-11

Proteomic analysis of cell wall proteins from *Saccharomyces cerevisiae* with different generation numbers

YAO Ji-Bing¹ ZU Guo-Ren¹ PIAO Yong-Zhe²

CHENG Jian-Guo¹ ZHAO Chang-Xin^{1*}

(1. College of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China)

(2. College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian, Liaoning 116600, China)

Abstract: [Objective] To find out the mechanisms of yeast aging. [Methods] We performed continuous inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* FFC2146 from generation to generation. We also observed the morphogenesis of *Saccharomyces cerevisiae* which has different generation numbers (2, 10, 15) through microscope, and measured absorbance in 600 nm to signify flocculation after sedimentation and determined residual glucose by DNS. Proteomic analysis of yeast cell wall proteins from the 2th and 15th generation was observed by Two-dimensional electrophoresis. [Results] Results showed that, the 15th generation yeast has rougher cell surface, higher flocculating velocity and lower metabolic level than the 2th and 10th generation, indicated that continuous inoculation accelerates yeast recession. Proteins were obtained by dithiothreitol and phenol abstraction. 309 proteins were detected and presented 11 changes responded to cell recession, 6 spots reduced by more than 2-fold in the 15th gel, 4 spots appeared in the 15th gel only and 1 spot appeared in the 2th only. [Conclusion] 11 Proteins from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall changed after continuous inoculation 14 times, the changes of expression levels among these proteins were connected to yeast aging.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Yeast aging, Generation times, Cell wall proteins, Two-dimensional electrophoresis

酿酒酵母作为一种模式真核生物在生物学领域研究广泛,近年来针对酿酒酵母的蛋白质组学研究成为热点。酿酒酵母作为一种工业生产菌,生长周期短、发酵能力强、产物高度修饰,在医药、食品、化妆品等领域广泛应用。但在工业生产过程中,酿酒酵母随着传代次数的增加发酵能力会大幅下降,体现出衰老现象。酵母抗衰老研究一直是国际上的热点,但至今没有明确答案来解释酵母衰老原因。

酵母细胞壁位于酵母细胞最外层,是与外界

环境直接接触的部分,酵母细胞壁成分的变化直接影响细胞形态和物质能量代谢。酵母细胞壁由葡聚糖和甘露糖蛋白组成,对维持细胞渗透压、保护细胞免受外部伤害起着重要作用^[1],其中细胞壁蛋白对酵母细胞物质代谢、细胞免疫识别、菌落形态、酵母絮凝等方面也有不可替代的作用^[2-3]。更重要的是酵母的衰老直接体现在细胞壁蛋白的变化上,Muriel Bony 等定位了酵母细胞壁上的絮凝蛋白 Flo1p,认为 Flo1p 是引起酵母絮凝的内在因素之一^[3]。Troy Ketela 等认为 Mid2p 是

酿酒酵母细胞壁上传导环境压力的信号因子,并作为 PKC1-MPK1 传导途径的逆向传导激活剂^[4]。Hitoshi Shimoi 等发现了酿酒酵母细胞壁中抵御蛋白自溶酶作用的蛋白 Sed1p^[5]。此外 Jose Manuel 等发现了酿酒酵母细胞壁上生命周期调节蛋白家族^[6]。现阶段对酿酒酵母细胞壁衰老相关蛋白的研究主要集中于单一蛋白,或一族蛋白上,而在总体蛋白组上的研究还较少。

鉴于酿酒酵母的衰老与酵母胞壁蛋白密切相关,本研究试图从蛋白组学上考查不同传代次数的酿酒酵母 FFC2146 细胞壁蛋白差异性,从而直观体现发酵能力较低的酿酒酵母细胞壁上蛋白相对正常酵母的细微变化,并希望日后通过质谱检测确定此差异蛋白性质,寻找酿酒酵母衰老蛋白基因,确定酵母衰老原因,为发酵工业解决菌种老化问题、提高发酵产量提供借鉴与参考。

1 材料与方法

1.1 菌种和试剂

实验菌种: *Saccharomyces cerevisiae* FFC2146, 大连工业大学菌种保藏所提供。培养基采用调整后的 YPD 培养基: 葡萄糖 11%, 蛋白胨 2%, 酵母膏 1%。实验所用试剂: DTT、IPG 两性电解质均来自 Sigma 公司、Protein Molecular Weight Marker 来自大连宝生物试剂公司, 其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 酿酒酵母细胞培养: 以斜面保藏酵母种子经过液体培养二次活化后, 按 5% 的接种量接入 250 mL YPD 培养基罐中, 培养 72 h 后作为第 2 代(Generation number)菌株, 连续转接 9 次后作为第 10 代菌株, 转接 14 次后为第 15 代菌株。

1.2.2 扫描电镜观测不同衰老程度菌体形态变化: 取每个代数培养 20 h 的酿酒酵母发酵液 5 mL, 4 000 r/min 离心 10 min, 去上清, 用无菌去

离子水清洗细胞表面附着的培养基 3 次。再用无菌去离子水稀释细胞悬液到适当的浓度, 涂布于干净的盖玻片上, 置于冷冻干燥机中冻干(15 min)迅速除去多余的水分。干燥结束后在细胞表面镀上氯化金, 用电子扫描电镜观察细胞形态。

1.2.3 酵母凝絮能力测定: 取经过反复洗涤的酵母菌体用生理盐水稀释至 $(1-3) \times 10^6$ 个/mL, 摇匀。每管 20 mL 分装到玻璃试管中, 摇匀后静置, 每隔 3 min 从管中取样 4 mL 检测其 600 nm 处吸光度。悬浮细胞浓度以 600 nm 处吸光度值表征。

1.2.4 酵母代谢活力测定: 酵母葡萄糖代谢活力以培养基中残留葡萄糖浓度来表示, 残留葡萄糖浓度越低代谢越快, 残留葡萄糖浓度的测定采用 3,5-二硝基水杨酸法(DNS 法)^[7], 初始葡萄糖浓度为 11%。

1.2.5 二硫苏糖醇溶解结合苯酚萃取法抽提酵母胞壁蛋白: 取 1 L 第 2 代与第 15 代 20 h 发酵液, 于 4 °C、5 000 r/min 离心 5 min 收集细胞, 用 50 mL 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)清洗 3 次。用含用 2 mmol/L DTT、1 mmol/L PMSF 的 50 mL 上述缓冲液于冰浴中剧烈振荡 2 h。4 °C、10 000 r/min 离心 10 min 收集上清^[8]。上清液中加入等体积的 Tris-平衡酚(pH 8.0)振荡萃取 1 h 后, 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min 收集酚相与中间层。收集液加入到 5 倍体积预冷 100 mmol/L 乙酸铵/甲醇溶液中, -20 °C 静置过夜后于 10 000 r/min 离心 10 min。蛋白沉淀用含有 10 mmol/L DTT 的丙酮溶液洗涤 2 次, 最后用丙酮清洗 1 次后冷冻干燥得酵母细胞壁蛋白。

1.2.6 蛋白质双向电泳解析: 将 0.3 g 尿素、270 μ L 双蒸水、100 μ L 30%丙烯酰胺溶液、2.4 μ L IPG buffer pH 4.0-6.0、14.4 μ L IPG buffer pH 3-10、2.5 μ L 10%过硫酸铵溶液、1 μ L TEMED 轻缓混匀后注入玻璃管中(长 8 mm, 内径 1 mm),

室温聚合 1 h^[7]后备用。

将冻干蛋白样品溶于适量蛋白溶解液 (7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、40 mmol/L DTT、4% CHAPS、2% IPG buffer pH 3–10、0.4% IPG buffer pH 4–6), 使蛋白终浓度为 10 g/L (蛋白定量方法采用 Bradford 法^[9]), 以每根胶条 100 μg 的蛋白注入胶条中进行第一维电泳, 阴极缓冲液采用 20 mmol/L NaOH 溶液, 阳极缓冲液采用 10 mmol/L H₃PO₄ 溶液, 阴极上样, 电压从 200 V 缓慢增加至 1 500 V, 控制总伏时为 5 000 V 时。

电泳结束后从玻璃管中挤出胶条, 置于平衡液 1 [0.2% DTT、50 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8)、30% (V/V)甘油、2% SDS、6 mol/L 尿素、微量溴酚兰]中平衡 10 min, 再于平衡液 2 [1%碘乙酰胺、50 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8)、30% (V/V)甘油、2% SDS、6 mol/L 尿素、微量溴酚兰]中平衡 10 min 后进行第二维 SDS-PAGE 电泳, 分离胶浓度为 12%, 恒电流 20 mA 电泳至指示剂跑至胶底端, 电泳后凝胶进行考马斯亮蓝染色。

脱色后的凝胶通过 BINTA2020D 型凝胶成像系统进行成像, 利用 Pdquest 8.0 软件对图像进行

裁剪、斑点检测、蛋白点匹配、蛋白丰度量化比对等分析。

2 结果与分析

2.1 不同传代次数酵母细胞形态比较

不同传代次数酵母细胞从电镜图片可以看出形态差异很大(图 1)。图 1A 中第 2 代的酵母细胞个体较小, 表面光滑无褶皱, 图 1B 中第 15 代细胞个体较大, 且表面布满褶皱。说明随着传代次数的增加, 细胞衰老明显, 细胞多次分裂后芽痕增多, 并使得细胞形态趋向于圆形, 这可能是由于细胞内蛋白微丝的变化引起的。

2.2 不同传代次数酵母凝絮能力比较

从图 2 可以看出, 当酵母悬液在静置 18 min 后第 15 代酵母基本完全沉降, 第 10 代酵母只有一半左右沉降, 而第 2 代酵母则基本不沉降, 第 15 代酵母沉降速率明显大于第 2、10 代的酵母, 这说明 FFC2146 酿酒酵母随着传代次数的增加其絮凝性逐渐增强。引起酵母絮凝性增强的因素可能是由于酵母在衰老过程中由于细胞壁褶皱程度增加, 导致了细胞与细胞表面的粘附力增强, 从而促进了细胞的聚集引起絮凝速率加

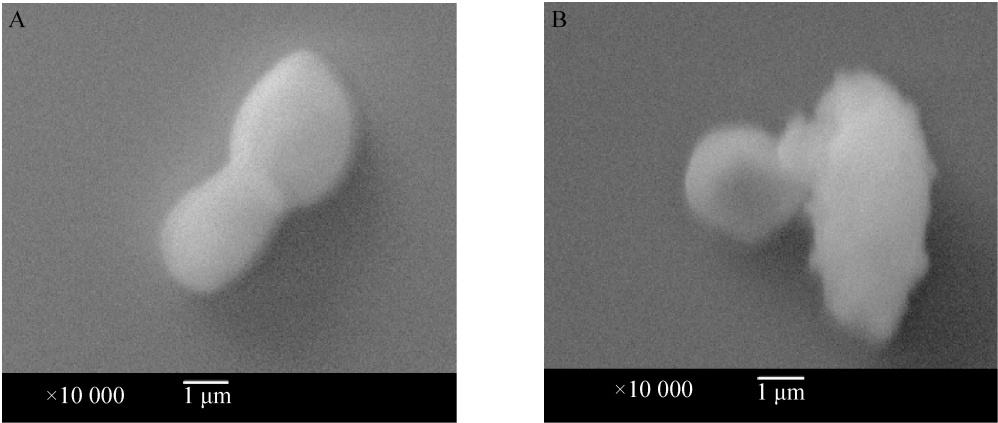


图 1 第 2 代和第 15 代 FFC2146 酿酒酵母细胞扫描电镜图

Fig. 1 Electron micrograph photograph of the 2th and 15th generation *Saccharomyces cerevisiae* FFC2146
注: A: 第 2 代酵母; B: 第 15 代酵母.
Note: A: The 2th generation yeast; B: The 15th generation yeast.

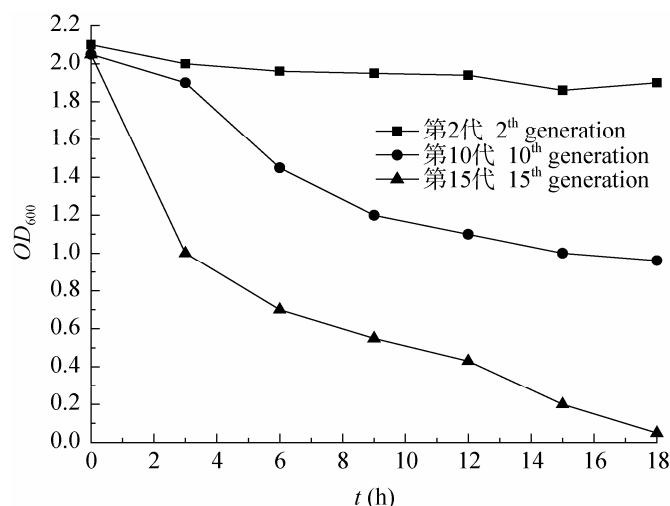


图2 不同传代次数 FFC2146 酿酒酵母絮凝曲线

Fig. 2 The flocculation curves of different generation *Saccharomyces cerevisiae* FFC2146

快,也可能是细胞壁表面的絮凝蛋白 Flo1p 受诱导后表达量增加从而导致细胞絮凝速率加快。

2.3 不同传代次数酵母代谢活力比较

由图3可以看出,第2、10、15代的FFC2146酿酒酵母生长曲线基本一致,最大菌体浓度都在17左右。但随着酵母传代数的增加酵母细胞对葡

萄糖的代谢能力逐渐变慢,当培养到第10代时与第2代相比降糖速率略有降低,而当培养到第15代时与第10代相比降糖速率明显降低。此外,在菌体指数生长期(20 h之前)3个不同代数酵母降糖速率基本一致,可见指数期酵母分解葡萄糖用于细胞增殖;而在酵母生长平衡期(20–60 h)3个

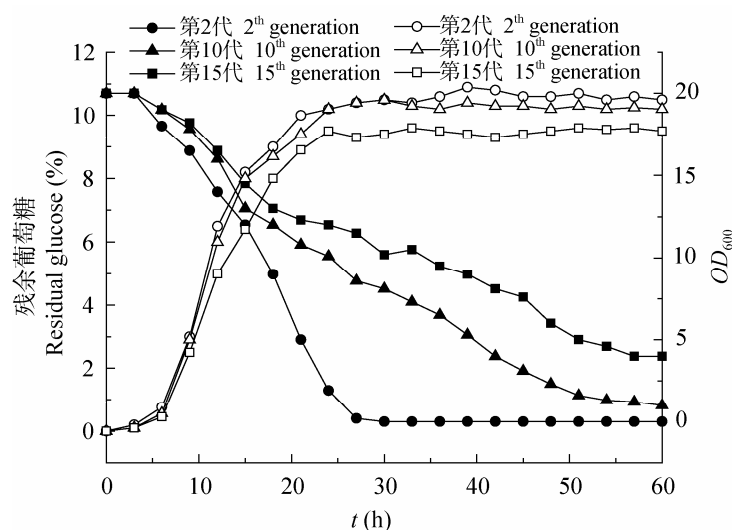


图3 不同传代次数 FFC2146 酿酒酵母生长速率与降糖能力比较

Fig. 3 The growth curves and residual glucose curves of different generation *Saccharomyces cerevisiae* FFC2146 during fermentation in liquid medium

不同代数酵母降糖速率有明显差异, 第 15 代酵母到 60 h 仍有 2.5%残糖在培养基中, 而第 2 代酵母基本降糖完全, 可见传代次数越多, 酵母衰老越严重, 平衡期酵母代谢越加缓慢, 发酵能力越低。

2.4 不同传代次数酵母细胞壁蛋白组学差异

从第2代与第15代的酿酒酵母细胞壁蛋白双向电泳图可以看出: FFC2146 酿酒酵母细胞壁蛋白主要集中于分子量 20–90 kD, pH 4–8 范围内, 且碱性端蛋白点相对较少。在碱性端蛋白还出现了垂直拖尾, 这可能由细胞壁蛋白的糖基化造成分子量不均一引起的^[10]。

图 4 表明 FFC2146 酿酒酵母细胞壁蛋白在经历不同传代次数后总体变化不明显, 总蛋白点数相差不大(经 Pdquest 8.0 软件检测得到斑点数为 309 个), 大多数蛋白丰度无变化。然而由图 5 三维丰度对比图得到 11 个蛋白的丰度明显发生改变。这些差异蛋白可区分为 3 类: a、b、c、d、e、f 6 个在 15 代酵母的丰度相对于 2 代

中减少的蛋白; g、h、i、j 4 个只在第 15 代酵母中出现的蛋白; 1 个只在第 2 代酵母出现的蛋白 k。

经 15 次传代后的 FFC2146 酿酒酵母胞壁出现了 a、b、c、d、e、f 6 个丰度下降的蛋白, 其中点 d、e、f 丰度减少了 2 倍, 点 a、b、c 丰度减少了 4 倍以上, 说明 a、b、c、d、e、f 蛋白基因表达水平大幅度降低。

经 15 次传代后的 FFC2146 酿酒酵母胞壁出现了 g、h、i、j 4 个蛋白点, 而这 4 个蛋白在第 2 代酵母中未出现, 这说明此 4 个蛋白受传代次数增加而诱导产生。又由图 2、3 结果得出酵母传代次数越多衰老越严重, 因此这 4 个蛋白的表达水平与酵母衰老程度密切相关。

k 蛋白只在第 2 代酵母细胞壁蛋白电泳图中出现而未在第 15 代酵母中出现, 且丰度值较小。这说明此蛋白在正常条件下表达水平较低, 在经历 15 次传代培养后表达又明显受抑制。

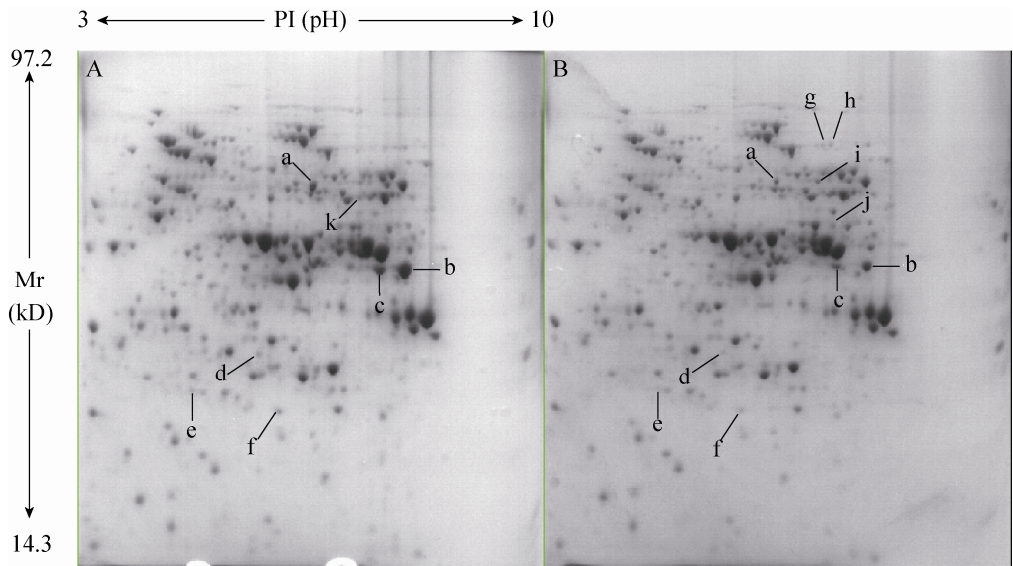


图 4 第 2 代和 15 代 FFC2146 酿酒酵母细胞壁蛋白双向电泳图

Fig. 4 2-DE images of the 2th and the 15th generation *Saccharomyces cerevisiae* FFC2146 after cultivated 20 h
注: A: 第 2 代酵母; B: 第 15 代酵母.
Note: A: The 2th generation yeast; B: The 15th generation yeast.

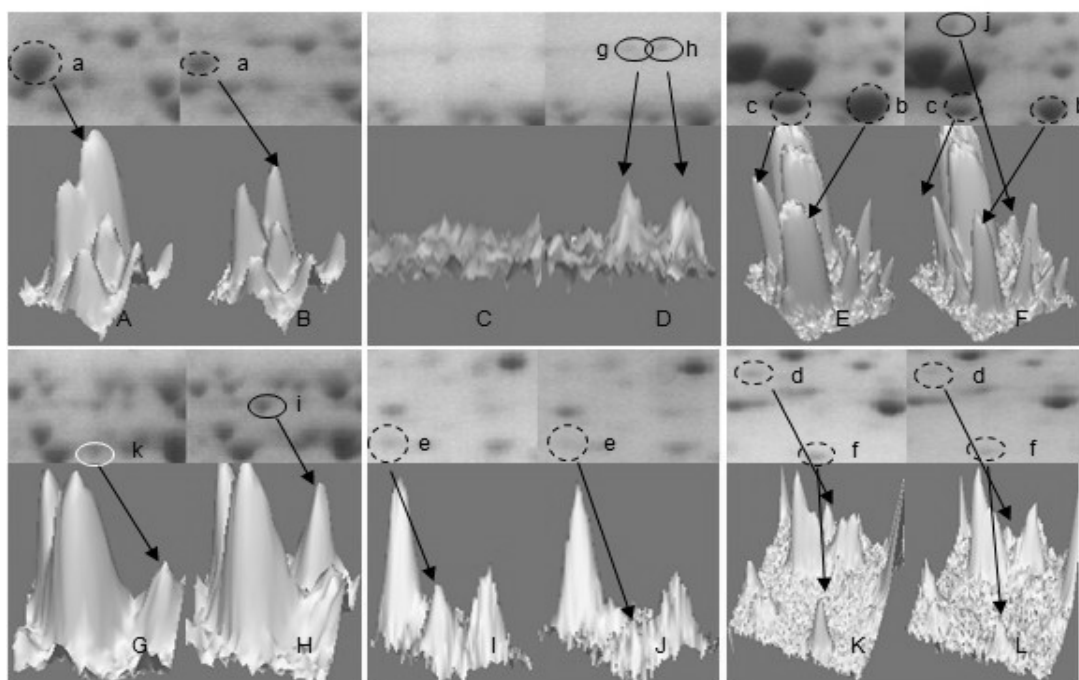


图5 第2与15代FFC2146酿酒酵母细胞壁差异蛋白点a-k的三维丰度比较图

Fig. 5 3D view of spots's abundance which changed between the 2th and the 15th generations

注: A、C、E、G、I、K: 第2代酵母; B、D、F、H、J、L: 第15代酵母。

Note: A, C, E, G, I, K: The 2th generation yeast; B, D, F, H, J, L: The 15th generation yeast.

3 讨论

测定了不同传代次数酿酒酵母的细胞形态、群体凝絮性和代谢活力, 结果表明随着传代次数增加, FFC2146 酿酒酵母呈现衰老趋势, 酵母细胞表面变得粗糙、凝絮性增强、代谢活力下降。通过双向电泳方法比较了第2代与第15代酵母细胞壁蛋白差异性, 发现衰老的酿酒酵母, 其细胞壁蛋白与正常细胞相比发生了明显变化, 其中11个蛋白差异明显: 4个只在第15代出现的蛋白、6个15代中丰度减少的蛋白、1个只在第2代出现的蛋白。由于这些蛋白表达水平的变化直接改变了酵母细胞形态, 提高了酵母的絮凝能力, 并且大幅降低了酵母代谢活力。

经连续15次传代后的FFC2146酿酒酵母胞壁蛋白与第2代酵母相比, 表达水平上有明显差异。

一些蛋白在酵母受自身抗衰老调节等机制的调控出现表达上升, 如基因表达过程中 rDNA 的循环积累, 特别是控制 rDNA 转录和核糖体合成区域的变异, 诱发自我修复机制的运转; 一些蛋白在相关信号因子刺激下表达量下降, 如絮凝造成局部营养物质缺乏造成代谢不旺盛^[1]。另一些可能为酵母生命周期蛋白, 其蛋白表达量直接控制酵母繁殖速度, 导致酿酒酵母细胞分化变缓, 从而造成繁殖速率降低, 影响酵母活力。希望本研究能对酵母衰老机制研究提供新的角度, 为维持酵母发酵活力, 提高发酵工业产量提供一定参考价值。

参考文献

- [1] Frans MK, Andre B, Piet WJ, et al. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Yeast, 2006, 23(3): 185–202.
- [2] Smits GJ, Kapteyn JC, van den Ende H, et al. Cell

- wall dynamics in yeast[J]. Microbiology, 1999, 2(4): 348–352.
- [3] Bony M, Thines-Sempoux D, Barre P, et al. Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(15): 4929–4936.
- [4] Ketela T, Green R, Bussey H. *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(11): 3330–3340.
- [5] Shimoi H, Kitagaki H, Ohmori H, et al. Sed1p is a major cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase and is involved in lytic enzyme resistance[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(13): 3381–3387.
- [6] Manuel J, Víctor JC, Javier A, et al. A novel family of cell wall-related proteins regulated differently during the yeast life cycle[J]. Molecular and Cellular Biology, 2000, 20(9): 3245–3255.
- [7] 翟明昌, 朴永哲, 王祥余, 等. 混菌发酵中不同分子量代谢产物对非酿酒酵母胞内蛋白及酒体有机酸的影响[J]. 微生物学通报, 2011, 38(9): 1443–1448.
- [8] Insenser MR, Hernáez ML, Nombela C, et al. Gel and gel-free proteomics to identify *Saccharomyces cerevisiae* cell surface proteins[J]. Journal of Proteomics, 2010, 73(6): 1183–1195.
- [9] 程君生, 毛开荣, 丁家波, 等. 微量 Bradford 法测定提纯禽结核菌素蛋白含量[J]. 中国兽药杂志, 2007, 41(6): 9–11.
- [10] Pasikowska M, Palamarczyk G, Lehle L. The essential endoplasmic reticulum chaperone Rot1 is required for protein N- and O-glycosylation in yeast[J]. Glycobiology, 2012, 22(7): 939–947.
- [11] 成建国, 董亮, 付莹莹, 等. 不同菌龄酿酒酵母细胞壁蛋白差异性分析[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(4): 116–119.



稿件书写规范

论文中阿拉伯数字的使用

凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方均应使用阿拉伯数字。世纪、年代、年、月、日、时刻必须使用阿拉伯数字, 年份必须用全称。对科技期刊来说, 凡处在计量单位和计数单位前面的数字, 包括 9 以下的各位数字, 除个别特例外, 均应使用阿拉伯数字。不是表示科学计量和有统计意义数字的一位数可以用汉字, 例如: 一本教材、两种商品等。