

FLO1 基因靠近 3'端重复序列对酵母菌絮凝蛋白功能的调控

岳峰^{1,2}, 杜昭励^{1,2}, 郭雪娜¹, 何秀萍^{1*}, 张博润¹

¹中国科学院微生物研究所, 北京 100101

²中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 【目的】研究絮凝基因 *FLO1* 中靠近 3'端重复 DNA 序列缺失对絮凝蛋白 Flo1 功能的影响, 为遗传稳定的最小絮凝功能基因的构建及酵母菌絮凝特性的可控改造提供理论依据。【方法】通过融合 PCR 的方法得到 *FLO1* 内靠近 3'端重复 DNA 序列 B、C 和 D 全部缺失的衍生基因 *FLO1bcd*, 比较 *FLO1* 及 *FLO1bcd* 在非絮凝酵母细胞中表达后, 菌株在不同条件下絮凝特性的差异。【结果】与表达完整絮凝基因 *FLO1* 的酵母菌株 YSF1 相比, *FLO1* 内靠近 3'端重复 DNA 序列全部缺失的酵母菌株 YSF1bcd 的絮凝强度仅略有降低, 而且其絮凝特性对钙离子的依赖性、金属离子的敏感性及乙醇敏感性均没有明显变化, 但对环境 pH 以及温度的变化表现出更广泛的适应性, 受甘露糖抑制的敏感性也有所降低。【结论】*FLO1* 中重复 DNA 序列 B、C 和 D 全部缺失与单独缺失 C 或 D 一样可以提高絮凝蛋白的构象和功能稳定性, 使酵母细胞在极端酸碱环境下仍然表现出明显的絮凝特性; 这些重复序列的完全缺失对其他絮凝特性没有明显影响。因此可以通过重复序列删减策略构建遗传稳定的最小絮凝功能基因, 为絮凝特性在发酵工业及环境修复方面的可控应用奠定理论基础。

关键词: 酿酒酵母, 絮凝基因, 重复序列, 絮凝蛋白功能, 絮凝特性

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 12-1276-09

酵母菌絮凝, 作为细胞之间粘附的一种方式, 有着非常重要的科学研究及工业应用价值^[1]。良好的絮凝特性既是酵母细胞应对环境胁迫产生的一种群体保护机制, 同时为工业发酵过程提供了一种更加有效的、环境友好的、低廉的细胞分离及产品澄清途径。此外, 利用酵母菌的絮凝特性能够有效的去除工业废水中的 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cr^{3+} 等重金属离子^[2-3], 在环境修复方面有着良好的应用前景。

絮凝的发生依赖于絮凝蛋白与邻近细胞表面甘露糖残基的结合。Flo1p 是酵母菌絮凝蛋白的典型

代表, 该蛋白有着非常明显的模块式结构, 其中羧基端含有细胞膜糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 结合区, 该结构域在蛋白分泌过程中被修饰, 最终使絮凝蛋白定位到细胞壁上; 氨基端是主要的絮凝功能域, 负责对糖基的识别和特异性结合; 蛋白的中间区域是富含丝氨酸及苏氨酸残基的高度重复序列, 形成絮凝蛋白的棒状跨壁结构, 使氨基端糖基结合域呈现在细胞表面^[4-6]。依据氨基酸序列一致性, Flo1p 中间区域的重复序列可分为四种类型, 即重复单元 A、B、C 和 D, 其中重复单元 A 构成的重复区域靠近氨基端,

基金项目: 国家自然科学基金 (30970087)

* 通信作者。Tel: +86-10-64807356; Fax: +86-10-64807427; E-mail: hexp@im.ac.cn

作者简介: 岳峰 (1989 -), 男, 山东枣庄人, 硕士研究生, 主要从事酵母分子遗传与育种研究。E-mail: Fengyue453@163.com

收稿日期: 2013-04-22; 修回日期: 2013-05-22

重复单元 B、C、D 构成的重复区域靠近羧基端^[7-8]。已有研究表明,重复序列对絮凝蛋白功能有重要的调控作用,重复单元 A 拷贝数与酵母细胞絮凝能力呈正相关^[9-10]、而且特定重复单元的变化影响絮凝蛋白与糖识别和相互作用的特异性^[11-12]、甚至使酵母细胞絮凝特性表现出黏附、类生物膜等特征^[13-14];重复单元 B、C、D 拷贝数分别发生变化不影响絮凝蛋白与邻近细胞表面甘露糖残基相互作用强度,即酵母细胞的絮凝能力,但影响絮凝蛋白的构象稳定性,分别缺失了重复单元 B、C、D 的絮凝蛋白在环境酸碱变化中表现出明显优于絮凝蛋白 Flo1p 的构象稳定性,使酵母细胞絮凝特性表现出对环境酸碱变化的广泛适应性^[8,15]。此外,大量重复序列的存在使编码絮凝蛋白的基因 *FLO1* 在 DNA 复制过程中发生高频率的基因内或基因间不对称配对和重组,导致酵母菌絮凝特性的遗传不稳定性,是限制絮凝特性广泛应用的重要因素^[9,16]。

本研究将在前期研究工作基础上,进一步分析 *FLO1* 内靠近 3' 端重复 DNA 序列全部缺失后对絮凝蛋白功能及酵母菌絮凝特性的影响,为通过重复序列删减策略构建遗传稳定的最小絮凝功能基因提供理论依据,促进絮凝特性在发酵工业及环境修复方面的可控应用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) YS59 (*MAT α FLO1 ura3-52 leu2-3, 112*

his4-519 trp1-789)、YS58 (*MAT α flo1 ura3-52 leu2-3, 112 his 4-519 trp1-789*), 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α , 大肠杆菌-酵母菌穿梭载体 YCp50 (*amp^r, ARS1, CEN4, URA3*) 及含有完整 *FLO1* 基因的质粒 *pYCF1* 均为本实验室保存。

1.1.2 培养基: 大肠杆菌保存和培养用 LB 培养基,筛选大肠杆菌转化子用含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 培养基^[17];酵母菌常规培养用 YEPD 培养基,酵母菌重组菌株筛选用含有色氨酸、亮氨酸和组氨酸的基本培养基 SC^[18]。

1.1.3 主要试剂和工具酶: 高保真 DNA 聚合酶 KOD 及三磷酸脱氧核苷酸混合物 (dNTP) 购自 TOYOBO 公司, T4 DNA Ligase 和限制性内切酶购自 TaKaRa 公司, DNAmarker 购自全式金公司, DNA 胶回收试剂盒和 PCR 产物回收试剂盒购自华大中生公司, 酵母菌质粒提取试剂盒购自 Bio-tek, qRT-PCR 试剂盒购自天根生化科技公司, 氨苄青霉素购自华北制药股份有限公司, 其他试剂均为分析纯; PCR 引物由上海生工合成。

1.2 引物设计及 *FLO1* 衍生基因构建

根据 GenBank 中酿酒酵母完整 *FLO1* 基因核苷酸序列 (X78160), 分别设计和合成引物 P1 (5'-CATGTGCGACGGCTTCCAGTATGCTTTTCACT-3')、P2 (5'-ATTTAGATGAAGAAGTTCATTGCTAGGAT-3')、P3 (5'-ATCCTAGCAATGGAAGTTCCTTCATCTAAATCAGTAGTCAC-3') 和 P4 (5'-ACAAGCTTTACTACTTCCTGGGAACG-3'), 其中引物 P2 和 P3 之间有 30 bp 的反向互补序列。各引物序列在 *FLO1* 上的位置见图 1。

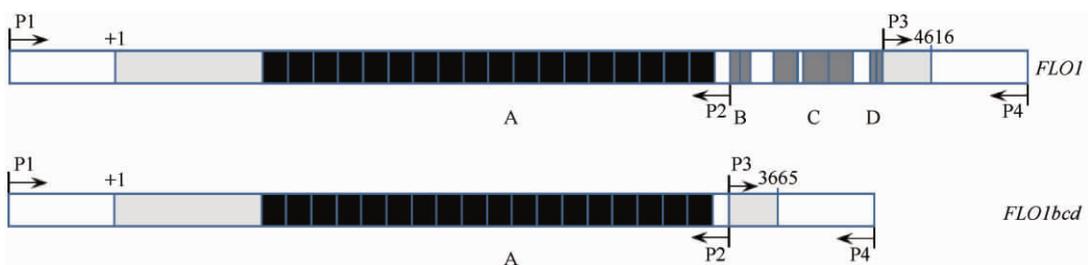


图 1. *FLO1* 及其衍生基因 *FLO1bcd* 结构物理图谱及本研究所用引物

Figure 1. Physical maps of *FLO1* and its derived gene *FLO1bcd* and primers used in this study. Region from +1 to 4616 is the ORF of *FLO1*; A, B, C and D represent four repeated regions of *FLO1* according to the features of Flo1p got from SIB Bioinformatics Resource Portal: <http://expasy.org>.

以质粒 *pYCF1*^[8] 为模板,利用引物对 P1/P2 和 P3/P4 分别进行 PCR 扩增。反应体系: 5 μL 10 \times

PCR buffer, 1 ng 模板 DNA、1.5 μL 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 引物、5 μL 2 mmol/L dNTPs、2 μL 50% DMSO、2 μL

25 mmol/L MgSO₄、1 μL KOD plus DNA 聚合酶、加 ddH₂O 至 50 μL 总体系。PCR 反应条件: 94℃ 2 min, 94℃ 15 s, 55℃ 30 s, 68℃ 3 min、32 个循环, 68℃ 10 min。PCR 扩增得到 4023 和 1099 bp 的 DNA 片段, 分别命名为 P1P2 和 P3P4。纯化后的 DNA 片段等摩尔混合, 以此作为模板, 利用引物对 P1/P4 进行融合 PCR, 得到 5122 bp 的融合 PCR 产物, 命名为 *FLO1bcd*。融合 PCR 反应体系及反应条件同上。融合 PCR 产物序列由上海生工测定。

1.3 重组表达质粒构建及遗传转化

用 *SalI* 和 *HindIII* 双酶切融合 PCR 产物 *FLO1bcd* 及载体 YCp50, 纯化回收后进行连接, 连接产物转化 *E. coli* DH5α, 大肠杆菌感受态细胞的制备、转化子筛选、质粒提取及酶切分析等均参照文献 [17] 所述方法进行, 获得的带有 *FLO1bcd* 的重组表达质粒命名为 pYCF1bcd。酵母菌感受态细胞制备、遗传转化及重组菌株筛选参照文献 [18] 进行, 酵母菌质粒提取参照 OMEGA 酵母质粒提取试剂盒 (Bio-tek, 美国) 使用说明进行, 酵母细胞内质粒拷贝数分析参照文献 [8, 17] 进行。酵母菌絮凝特性遗传稳定性分析参照文献 [10] 进行。

1.4 基因表达水平检测

参照文献 [18] 所述热酸酚法提取酵母总 RNA, 通过甲醛变性胶电泳及紫外分光光度法检测 RNA 的浓度和纯度。以 *ACT1* 基因为对照, 利用 Quant 一步法荧光定量 RT-PCR 试剂盒 (天根生化, 北京) 对酵母细胞内絮凝基因表达水平进行相对定量。所用引物序列如下: ACT1-F (5'-TGATAACGGTCTGGTATGTGTAAG-3'), ACT1-R (5'-ATGATACCTTGGTGTCTTGGTCTAC-3'), FLO-F (5'-TTTGCCACCTAATATCGAAGGAACC-3'), FLO-R (5'-CATCTGGAAGTGTCACACTAATTGG-3')。反应条件如下: 50℃ 30 min 进行反转录反应; 95℃ 2 min 进行预变性; 94℃ 20 s, 55℃ 20 s, 68℃ 30 s, 40 个循环。

1.5 酵母菌絮凝能力测定

絮凝能力的常规测定参照文献 [8] 进行。酵母细胞在 2 mL YEPD 培养基中 30℃ 摇床 (200 r/min) 培养 18 h, 按 1% (V/V) 接种量转接于 100 mL YEPD 中 30℃ 摇床培养 24 h; 离心收集菌体, 分别称取 0.1 g 湿菌体于 7 mL 离心管中, 并分别用 0.05 mol/L EDTA (pH 8.0) 和无菌水洗 2 遍; 将菌体悬浮在 5 mL 相应的缓冲液中, 充分振荡混匀,

30℃ 静置 30 min; 吸取上层 3 mL 菌液测定 *OD*₆₀₀; 计算絮凝能力。常规分析时, 所用非絮凝缓冲液为 50 mmol/L 乙酸钠 (pH 4.5), 絮凝缓冲液为含 6.8 mmol/L 氯化钙的 50 mmol/L 乙酸钠 (pH 4.5)。

测定不同糖对酵母菌絮凝能力影响时, 在缓冲液中分别加入终浓度为 1 mol/L 葡萄糖、蔗糖、甘露糖、麦芽糖和半乳糖。

测定不同甘露糖浓度对酵母菌絮凝能力影响时, 在缓冲液中分别加入终浓度为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mol/L 的甘露糖。

测定 pH 对酵母菌絮凝能力影响时, 为了避免钙离子沉淀, 使用不同的缓冲液, pH 2.0 - 6.0 时使用 50 mmol/L 乙酸钠缓冲液; pH 7.0 - 10 时使用 10 mmol/L Tris base 缓冲液。两种缓冲体系对菌株絮凝能力的影响没有差别。

测定不同金属离子对酵母菌絮凝能力影响时, 在乙酸钠缓冲液中分别添加浓度为 1 mmol/L 的各种金属离子; 测定絮凝的钙离子依赖性时, 分别在缓冲液中添加 0.1、0.5、1.0、5.0、10 mmol/L 钙离子。

测定温度对酵母菌絮凝能力影响时, 菌悬液在各温度条件下静置 5 min 后充分振荡混匀, 然后在各温度下静置 30 min, 吸取上层 3 mL 菌液, 测定 *OD*₆₀₀。

测定乙醇对酵母菌絮凝影响时, 在菌悬液中分别添加不同浓度乙醇。

2 结果和讨论

2.1 *FLO1* 和 *FLO1bcd* 基因在酵母中的表达

通过融合 PCR 的方法, 以完整 *FLO1* 基因为模板, 获得靠近 3' 端的重复 DNA 序列 B, C 和 D 完全缺失的衍生基因 *FLO1bcd*。用分别带有完整 *FLO1* 基因、衍生基因 *FLO1bcd* 的重组表达质粒 pYCF1、pYCF1bcd 及空载体 YCp50 转化非絮凝型酿酒酵母 YS58, 通过尿嘧啶营养缺陷型互补, 在含有组氨酸、色氨酸和亮氨酸的酵母基本培养基 SC 上筛选转化菌株。转化菌株经酵母质粒提取及 PCR 分析验证后分别命名为重组菌株 YSF1、YSF1bcd 和 YSP50。

质粒拷贝数分析发现重组菌株 YSF1、YSF1bcd 和 YSP50 每个细胞内均含有 2 个拷贝的质粒, 符合 YCp 型质粒的特点^[18]。通过 qRT-PCR 分析不同酵母细胞中絮凝基因的表达水平, 结果表明宿主 YS58 及空载体转化菌株 YSP50 细胞中均没有检测到絮

凝基因的表达,而絮凝阳性对照菌株 YS59 和重组菌株 YSF1、YSF1bcd 均检测到絮凝基因的表达。以 *ACT1* 表达水平为参照,重组菌株 YSF1 和 YSF1bcd 细胞之间絮凝基因表达水平没有明显差异,是菌株 YS59 絮凝基因表达水平的 2 倍(图 2)。

对不同酵母细胞絮凝能力分析结果表明,宿主菌 YS58 及空载体转化菌株 YSP50 均没有表现出絮凝特性,而重组菌株 YSF1、YSF1bcd 及阳性对照菌株 YS59 均表现出明显的絮凝特性,其中带有两个拷贝 *FLO1* 基因的菌株 YSF1 的絮凝能力最高(92.1%),是带有单拷贝 *FLO1* 的菌株 YS59 的 1.76 倍;*FLO1* 内重复 DNA 序列 B、C 和 D 完全缺失使酵母细胞絮凝能力略有降低,菌株 YSF1bcd 的絮凝能力是菌株 YSF1 的 96%(图 2)。上述结果表明絮凝基因 *FLO1* 及其衍生基因 *FLO1bcd* 在酵母细胞内实现了水平基本一致的功能性表达。已有研究表明菌株的絮凝能力与 *FLO1* 基因内重复序列单元 A 的拷贝数呈正相关,但不是简单的比例关系,重复序列拷贝数减少到一定程度将影响絮凝蛋白跨越细胞壁展现在细胞表面,从而影响絮凝蛋白和邻近细胞表面甘露糖残基之间的相互作用^[9-10]。*FLO1* 内重复序列单元 B、C 或 D 分别缺失不影响酵母细胞的絮凝能力^[8,15],当这些重复序列同时缺失后酵母细胞的絮凝能力略有降低,与完整絮凝蛋白 Flo1p 相比,絮凝蛋白 Flo1bcd 少了靠近羧基端的 320 个氨基酸残基,说明这些重复单元对支撑絮凝蛋白的跨壁呈现可能也有一定的作用。絮凝特性遗传稳定性分析,发现连续传代培养 10 次,酵母菌株 YSF1 和 YSF1bcd 的营养缺陷标记没有发生变化,说明细胞内质粒能够稳定遗传;但随传代次数的增多,酵母菌株 YSF1 和 YSF1bcd 的单菌落中出现絮凝能力降低的比例增加;而且传代 10 次,菌株 YSF1 出现絮凝能力降低的单菌落数是菌株 YSF1bcd 的 1.6 倍,说明 *FLO1* 内重复序列单元 B、C 和 D 完全缺失可以适当提高絮凝特性的遗传稳定性,但完整重复序列单元 A 的存在依然是导致絮凝基因遗传不稳定的重要因素。

2.2 环境因素对不同酵母菌株絮凝能力的影响

2.2.1 絮凝型的测定:絮凝的发生依赖于絮凝蛋白与邻近细胞表面甘露糖残基之间的相互作用,因此环境中游离糖分子可以通过竞争性结合对絮凝产生抑制作用,根据絮凝对游离糖的敏感性,可将酵母菌

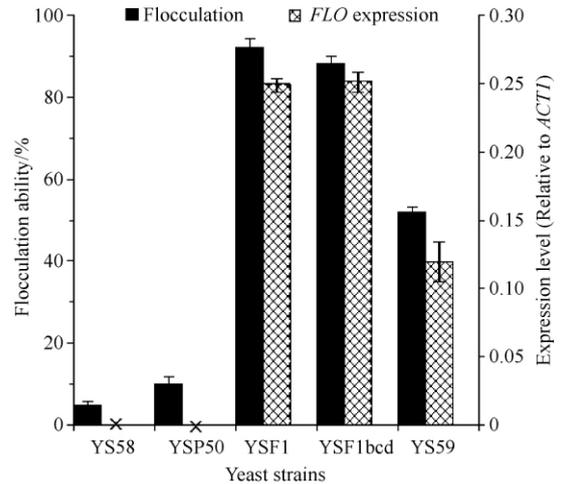


图 2. 不同酵母菌株絮凝基因表达水平及絮凝能力比较

Figure 2. Comparison of relative expression level of *FLO* genes and flocculation ability among yeast strains. Values reflect the means of three repeat experiments, and the error bars represent standard deviations.

絮凝分为 Flo1 型和 NewFlo1 型,其中 Flo1 型的絮凝仅受甘露糖的抑制,而 NewFlo 型絮凝同时受甘露糖、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖等的抑制^[19]。甘露糖对菌株 YSF1 和 YSF1bcd 的絮凝有明显的抑制作用,而其他糖对上述菌株的絮凝能力几乎没有影响(图 3-A)。说明 *FLO1* 内重复 DNA 序列 B、C、D 完全缺失不影响絮凝蛋白和糖分子识别及相互作用的特异性,表现出与单独缺失上述重复序列单元的絮凝蛋白同样的糖识别特异性,均赋予酵母细胞 Flo1 型絮凝^[8,15]。而且与单独缺失重复 DNA 序列 C 或 D 相似,同时缺失 *FLO1* 内重复 DNA 序列 B、C 和 D 使酵母菌株 YSF1bcd 絮凝对甘露糖抑制的敏感性降低,在高甘露糖浓度下(1 mol/L),YSF1 的絮凝能力仅为 20.5%,而 YSF1bcd 的絮凝能力为 52.3%(图 3-B)。Veelders 等人对 Flo5p 氨基端结构域的研究发现,絮凝蛋白与游离甘露糖分子的亲和力仅为寡聚甘露糖链的 1/10 左右,但絮凝蛋白与甘露糖结合后其空间构象会发生变化,影响其与相邻细胞表面寡聚甘露糖链的相互作用^[7]。靠近羧基端重复单元 B、C 和 D 完全缺失后,一方面可能影响絮凝蛋白和游离甘露糖分子的亲和力,另一方面可能影响絮凝蛋白空间构象的刚性,从而使絮凝蛋白在较高浓度甘露糖存在的情况下依然有很强的与细胞表面甘露糖链结合的能力。

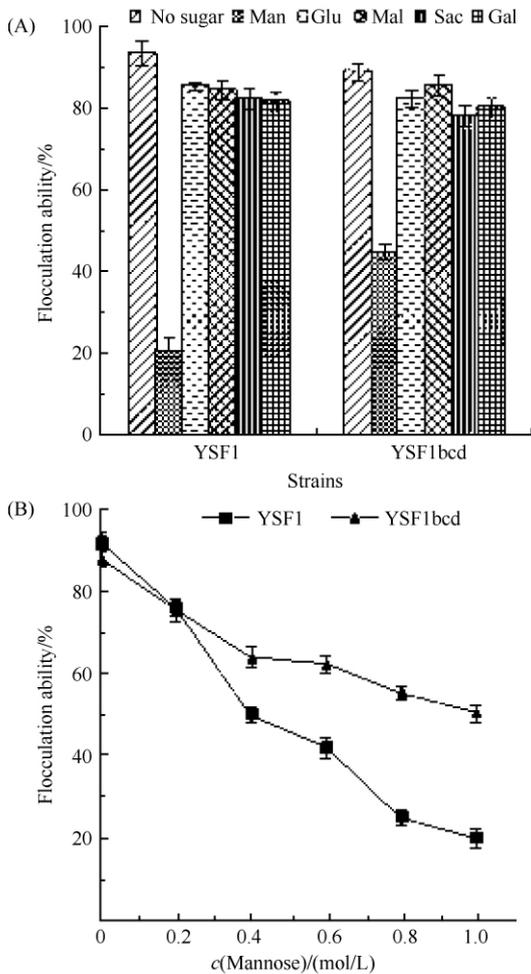


图 3. 不同糖对酵母菌株絮凝能力的影响

Figure 3. Inhibition of different sugars on flocculation of yeast strains. Concentration of each kind of sugar in A is 1 mol/L. Values reflect the means of three repeated experiments, and the error bars represent standard deviations.

2.2.2 pH 对不同酵母菌株絮凝能力的影响: 尽管环境酸碱度对絮凝能力的影响具有明显的菌株特异性, 但酵母菌发生絮凝的最适 pH 一般均为 pH 3.0 - 5.0^[20]。酵母菌株 YSF1 和 YSF1bcd 均在 pH 4.5 时表现出最强的絮凝能力, 并在 pH 3.0 - 5.0 之间保持相对稳定; 而当环境 pH 低于 3 或高于 5 时, 菌株 YSF1 和 YSF1bcd 的絮凝能力均有所降低, 但 *FLO1* 内重复 DNA 序列 B、C 和 D 完全缺失使酵母细胞絮凝对环境酸碱变化的敏感性降低, 在 pH 2.0 和 8.0 条件下, 絮凝能力分别是菌株 YSF1 的 1.6 和 4.2 倍 (图 4)。回收不同 pH 条件下的酵母细胞, 并将其重新悬浮于 pH 4.5 的缓冲液中, 结果所有细胞均表现出最强的絮凝能力, 说明偏酸和偏

碱条件没有影响细胞表面絮凝蛋白和自身细胞壁的结合, 而是引起了絮凝蛋白的可逆变性。菌株 YSF1bcd 在偏酸和偏碱环境中具有优于菌株 YSF1 的絮凝能力, 表明重复单元 B、C 和 D 缺失有利于提高絮凝蛋白在酸碱环境下的结构和功能稳定性。上述结果与单独缺失 *FLO1* 内重复 DNA 序列 C 或 D 的结果一致^[8, 15]。

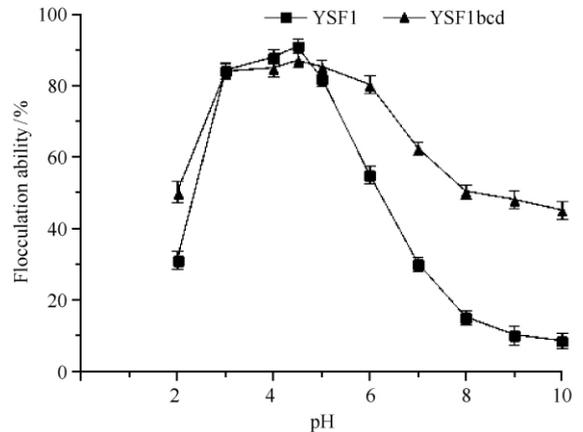


图 4. pH 对酵母菌株絮凝能力的影响

Figure 4. Effect of pH on the flocculation ability of YSF1 and YSF1bcd. Values reflect the means of three repeat experiments, and the error bars represent standard deviations.

2.2.3 金属离子对酵母菌絮凝的影响: 絮凝的发生是一个需要钙离子参与的过程, 钙离子一方面通过和絮凝蛋白中间结构域结合维持絮凝蛋白空间构象的稳定性, 另一方面钙离子直接参与絮凝蛋白与寡聚甘露糖链的结合^[7]。菌株 YSF1 和 YSF1bcd 均表现为钙离子依赖性絮凝, 很低的钙离子浓度 (0.1 mmol/L) 就可以激发菌株絮凝的发生; 当钙离子浓度达到 1 mmol/L 时, 两菌株均表现出最强的絮凝能力 (分别为 92.3% 和 88.5%); 随钙离子浓度的进一步提高菌株的絮凝能力维持稳定; 在检测的钙离子浓度范围内, 菌株 YSF1 均表现出略强于 YSF1bcd 的絮凝能力, 但两者絮凝能力随钙离子浓度变化趋势基本一致 (图 5-A)。除钙离子外, 其它金属离子如 Cr^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 等也可以使酵母细胞产生明显的絮凝能力 ($\geq 40\%$), 而且除 Cr^{3+} 外, 其他金属离子存在下, 菌株 YSF1bcd 的絮凝能力均高于菌株 YSF1; 此外金属离子 Pb^{2+} 和 Sr^{2+} 也可以使酵母细胞产生一定的絮凝能力 (图 5-B)。在钙离子和上述金属离子同时存在的条件

下, 酵母细胞均表现出最高的絮凝能力, 说明絮凝的钙离子依赖性不受环境中其他金属离子的影响。

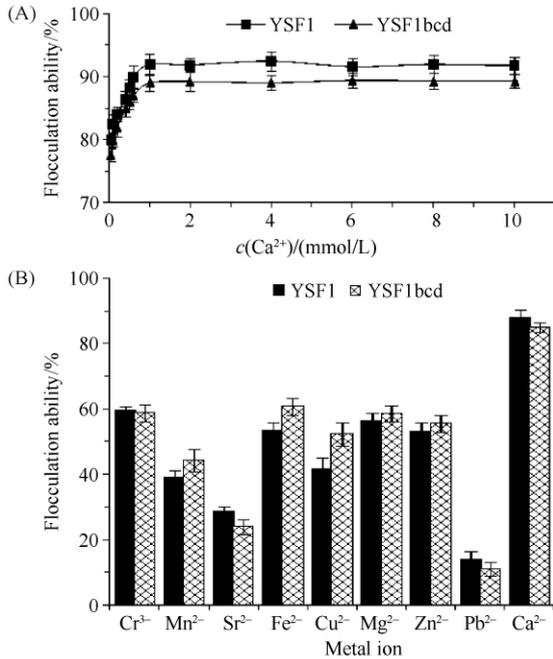


图 5. 金属离子对酵母菌絮凝能力的影响

Figure 5. Effect of metal ion on the flocculation ability of YSF1 and YSF1bcd. A: Dependence of flocculation on Ca^{2+} ; B: Different metal ions at concentration of 1 mmol/L. Values reflect the means of three repeat experiments, and the error bars represent standard deviations.

2.2.4 温度对絮凝的影响: 环境温度对酵母菌絮凝的影响至今还很不确定, 一般认为在生理温度 (15–32°C) 范围内, 酵母细胞均可以表现出良好的絮凝能力, 温度高于 60°C 或低于 10°C, 絮凝受到明显抑制; 但对有些酵母菌株低温 (5°C) 条件有利于絮凝的发生, 生理温度 (25°C) 下絮凝受到明显抑制^[20–21]。酵母菌株 YSF1 和 YSF1bcd 均在 46°C 表现出最高的絮凝能力, 随着温度降低絮凝能力只略有下降, 在 0°C 时仍分别保持 88.3% 和 85.8% 的絮凝能力; 温度高于 54°C 时, 两菌株的絮凝能力均随温度升高而迅速降低; 但温度变化对菌株 YSF1 的影响更加明显, 菌株 YSF1bcd 在高温条件下表现出高于 YSF1 的絮凝能力 (图 6)。高温引起絮凝蛋白的变性可能是产生絮凝抑制的重要因素, 絮凝蛋白内重复单元 B、C 和 D 发生缺失能够提高菌株在高温条件下的絮凝能力, 说明絮凝蛋白 Flo1bcdp 比 Flo1p 在高温下可能具有更高的功能稳定性。

2.2.5 乙醇对酵母菌絮凝的影响: 在不同乙醇浓度

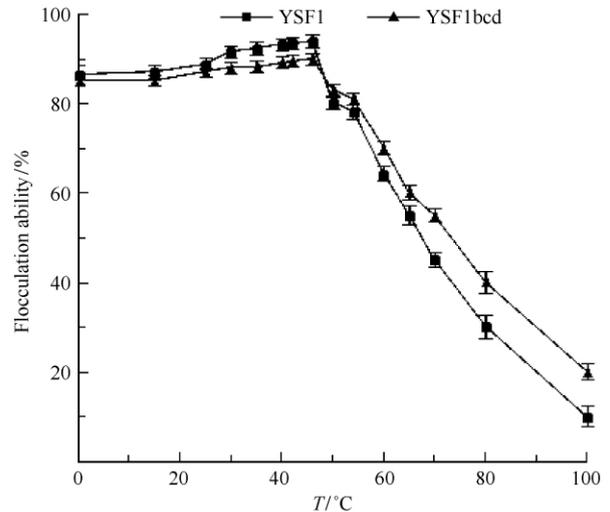


图 6. 温度对酵母菌絮凝能力的影响

Figure 6. Effect of temperature on the flocculation of YSF1 and YSF1bcd. Flocculation was determined using the method described in Materials and Methods. Values reflect the means of three repeat experiments, and the error bars represent standard deviations.

条件下, 分别测定酵母菌株 YSF1 和 YSF1bcd 的絮凝能力, 发现乙醇对两酵母菌株的絮凝能力没有明显影响 (图 7)。絮凝是酵母细胞应对环境胁迫的一种群体保护机制, 环境中高浓度乙醇一方面作为一种胁迫因素可以诱导絮凝基因的表达, 另一方面乙醇对酵母细胞壁构象及表面电荷等也会产生影响, 进而影响到细胞之间的相互作用, 对絮凝是增强还是抑制作用可能具有一定的菌株特异性^[20–21]。本研究中收集对数生长后期的酵母细胞进行絮凝能力的测定, 细胞内絮凝蛋白已得到有效表达, 缓冲液中乙醇浓度不影响絮凝蛋白的表达, 但对细胞表面结构或电荷可能产生影响, 但不足以改变细胞的絮凝能力; 同时絮凝蛋白内重复单元 B、C、D 缺失也没有影响到絮凝对乙醇的敏感性。

3 结论

衔接重复的 DNA 序列是基因组中高度动态化的成分, 酿酒酵母编码絮凝蛋白的基因内存在大量衔接重复序列, 它们驱动基因内或基因间的滑移和重组, 导致絮凝基因内重复序列的增减, 引起细胞絮凝特性的多样性变化和絮凝特性的遗传不稳定性, 从而影响絮凝特性的可控应用。研究这些重复

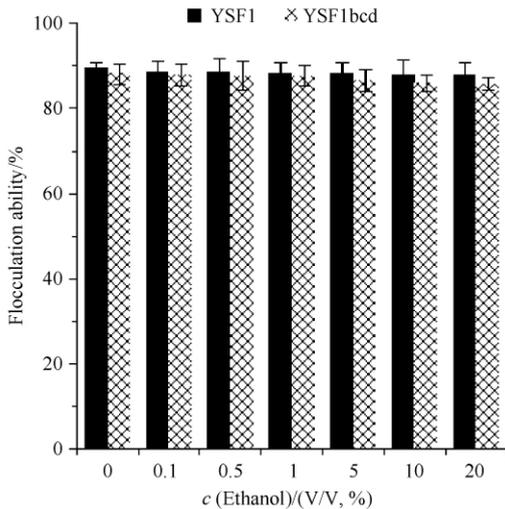


图 7. 乙醇对酵母菌絮凝能力的影响

Figure 7. Effect of ethanol on the flocculation of YSF1 and YSF1bcd. Flocculation was determined using the method described in Materials and Methods. Values reflect the means of three repeat experiments, and the error bars represent standard deviations.

DNA 序列变化对絮凝蛋白功能及细胞絮凝特性的影响,有助于理解不同重复序列在蛋白质功能呈现中的具体作用及必要性,从而为基于序列调控策略实现絮凝特性在发酵工业及环境修复方面的可控应用提供理论依据。

FLO1 基因内重复 DNA 序列 B、C、D 分别缺失后对酵母细胞絮凝能力没有影响,但可以提高絮凝特性对环境酸碱变化的适应性,使酵母细胞在极端酸碱环境中仍然表现出明显的絮凝特性^[8,15]。本研究同时缺失了 *FLO1* 基因内重复 DNA 序列 B、C 和 D,获得衍生基因 *FLO1bcd*。对分别表达完整絮凝基因 *FLO1* 和其衍生基因 *FLO1bcd* 的酵母菌 YSF1 和 YSF1bcd 在不同条件下的絮凝特性进行比较,结果发现重复 DNA 序列 B、C 和 D 完全缺失对酵母菌絮凝能力和特性的影响与单独缺失 *FLO1* 基因内重复 DNA 序列 C 或 D 非常相似,对酵母细胞絮凝能力影响不大,与菌株 YSF1 相比,菌株 YSF1bcd 的絮凝能力仅降低了 4%;絮凝的钙离子依赖性、不同糖抑制的特异性、其他金属离子和乙醇等对细胞絮凝的影响均没有明显变化;但细胞絮凝特性对环境酸碱度、甘露糖浓度及温度变化表现出更好的适应性。说明与单独缺失重复单元 B、C 或 D 类似,絮凝蛋白中上述重复单元全部缺失提高了蛋白构象稳定性,从而

使絮凝蛋白功能在环境酸碱、温度和甘露糖浓度变化过程中可以保持较高的稳定性。

絮凝的发生是遗传因素和环境因素共同作用的结果,絮凝基因内高度重复序列与絮凝蛋白结构和功能、以及酵母菌絮凝特性及其遗传稳定性有非常密切的关系^[8-9,10,15]。本研究结果为通过对 *FLO1* 内重复 DNA 序列进行删减构建遗传稳定的最小絮凝功能基因,满足发酵工业或环境修复过程对酵母菌絮凝特性的多样化需求奠定了重要理论基础。未来通过结构生物学等方法解析重复序列对絮凝蛋白结构及功能影响的具体机制,将为基于序列调控策略改造酵母菌絮凝特性提供更加准确的遗传修饰靶点。

参考文献

- [1] Bauer FF, Govender P, Bester MC. Yeast flocculation and its biotechnological relevance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 88 (1) : 31-39.
- [2] Bony M, Thines-Sempoux D, Barre P, Blondin B. Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* protein Flo1p. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179 (15) : 4929-4936.
- [3] Machado MD, Santos MS, Gouveia C, Soares HM, Soares EV. Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: the flocculation as a separation process. *Bioresource Technology*, 2008, 99 (7) : 2107-2115.
- [4] Dranginis AM, Rauceo JM, Coronado JE, Lipke PN. A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and anti-social occasions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2007, 71 (2) : 282-294.
- [5] Goossens K, Willaert R. Flocculation protein structure and cell-cell adhesion mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 2010, 32 (11) : 1571-1585.
- [6] Pittet M, Conzelmann A. Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2007, 1771 (3) : 405-420.
- [7] Veelders M, Brückner S, Ott D, Unverzagt C, Möschen HU, Essen LO. Structural basis of flocculin mediated social behavior in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,

- 2010, 107 (52): 22511-22516.
- [8] Li EE, Chang Q, Guo XN, He XP, Zhang BR. Regulation of tandem repeats on the function of flocculation protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52 (1): 69-76 (in Chinese).
- 李娥娥, 常琦, 郭雪娜, 何秀萍, 张博润. 衔接重复序列对酵母菌絮凝蛋白功能的调控作用. *微生物学报*, 2012, 52 (1): 69-76.
- [9] Verstrepen KJ, Jansen A, Lewitter F, Fink GR. Intragenic tandem repeats generate functional variability. *Nature Genetics*, 2005, 37 (9): 986-990.
- [10] Chang Q, Yue F, Guo XN, He X, Zhang B. Regulatory effect of *FLO1* tandem repeats on the flocculation characteristics and genetic stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52 (11): 1360-1368 (in Chinese).
- 常琦, 岳峰, 郭雪娜, 何秀萍, 张博润. 酿酒酵母 *FLO1* 基因内重复序列引发的絮凝能力稳定性研究. *微生物学报*, 2012, 52 (11): 1360-1368.
- [11] Liu N, Wang DL, Wang ZY, He XP, Zhang BR. Genetic basis of flocculation phenotype conversion in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 2007, 7 (8): 1362-1370.
- [12] Liu N, Wang DL, Wang ZY, He XP, Zhang BR. Deletion of tandem repeats causes flocculation phenotype conversion from Flo- to NewFlo-type in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2009, 16 (3-4): 137-145.
- [13] Verstrepen KJ, Klis FM. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular Microbiology*, 2006, 60 (1): 5-15.
- [14] Smukalla S, Caldara M, Pochet N, Beauvais A, Guadagnini S, Yan C, VincensMD, Jansen A, Prevost MC, Latgé JP, Fink GR, Foster KR, Verstrepen KJ. *FLO1* is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. *Cell*, 2008, 135 (4): 726-737.
- [15] Li EE, Yue F, Chang Q, He XP, Zhang BR. Deletion of intragenic tandem repeats in unit C of *FLO1* of *Saccharomyces cerevisiae* increases the conformational stability of flocculin under acidic and alkaline conditions. *PLoS One*, 2013, 8 (1): e53428.
- [16] Rando OJ, Verstrepen K. Timescales of genetic and epigenetic inheritance. *Cell*, 2007, 128 (4): 655-668.
- [17] Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [18] Adams A, Gottschling DE, Kaiser CA, Stearns T. *Methods in Yeast Genetics, A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
- [19] Stratford M, Assinder S. Yeast flocculation: Flo1 and NewFlo phenotypes and receptor structure. *Yeast*, 1991, 7 (6): 559-574.
- [20] Jin YL, Speers A. Effect of environmental conditions on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 2000, 58 (3): 108-116.
- [21] Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Verachtert H, Delvaux FR. Yeast flocculation: what brewers should know. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 61 (3): 197-205.

Effect of tandem repeats adjacent to 3'-terminal of *FLO1* on the flocculation function of *Saccharomyces cerevisiae*

Feng Yue^{1,2}, Zhaoli Du^{1,2}, Xuena Guo¹, Xiuping He^{1*}, Borun Zhang¹

¹Laboratory of Yeast Molecular Genetics and Breeding, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Objective] Many tandem repeats exist in *FLO1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which might have great regulatory effect on the conformation and function of flocculation protein (flocculin). In this study, we analyzed the effect of 3'-terminal tandem repeats B, C and D complete deletion on the function of flocculin. [Methods] We constructed the derived gene *FLO1bcd* with complete deletion of tandem repeats B, C and D of *FLO1* by fusion PCR. We then constructed plasmid pYCF1bcd by insertion of *FLO1bcd* into YCp50, and transformed such plasmid, pYCF1 and YCp50 into *S. cerevisiae* YS58 separately to generate recombinant strains YSF1bcd, YSF1 and YSP50. We compared the flocculation ability and characteristics of these strains. [Result] Compared to YSF1, YSF1bcd displayed only a slight reduction (4%) in flocculation ability in optimal flocculation buffer (50 mmol/L NaAC, pH 4.5). Moreover, the dependence of flocculation on Ca²⁺, sensitivity to metal ions and ethanol, and the specificity to different sugars showed no obvious difference between strains YSF1 and YSF1bcd. However, strain YSF1bcd displayed much higher flocculation levels than strain YSF1 under conditions with extreme pH, high temperature, or high concentration of mannose. [Conclusion] Combined deletion of tandem repeats B, C and D adjacent to the 3'-terminal of *FLO1* increases the conformation stability of flocculin in response to changes of pH, temperature or concentration of mannose in environment, but does not influence the other characteristics of flocculation.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, *FLO1* gene, tandem repeats, flocculin function, flocculation characteristics

(本文责编:张晓丽)