



过表达基因 *elo1* 和 *ole1* 增强光滑球拟酵母 $\Delta med15B$ 菌株的低 pH 耐受能力

齐艳利^{1,2,3}, 刘晖^{1,2,3}, 周配^{1,2,3}, 高聪^{1,2,3}, 刘立明^{1,2,3*}

¹ 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

² 江南大学教育部工业生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214122

³ 江南大学食品微生物制造工程研究室, 江苏 无锡 214122

摘要: 【目的】研究中介体亚基Med15B (ORF CAGL0H06215g)介导的脂肪酸代谢影响光滑球拟酵母 (*Candida glabrata*)耐受低pH胁迫的生理机制。【方法】在菌株 $\Delta med15B$ 中过量表达脂肪酸延伸酶基因 *elo1* (ORF CAGL0L08184g)和 $\Delta 9$ 去饱和酶基因 *ole1* (ORF CAGL0I00418g), 构建过表达菌株 $\Delta med15B/elo1-ole1$, 然后与菌株 $\Delta med15B$ 和亲本菌株ATCC55对比分析基因*elo1*和*ole1*的表达水平、脂肪酸组分比例、细胞膜完整性和耐受能力在pH 2.0和pH 6.0条件下的差异。【结果】发现, 在pH 2.0条件下过表达菌株 $\Delta med15B/elo1-ole1$: (1) 基因*elo1*和*ole1*表达水平比菌株 $\Delta med15B$ 分别上调了4.1倍和3.3倍, 与亲本菌株ATCC55相比分别上调了2.5倍和2.2倍; (2) 脂肪酸平均链长延长至17.4, 高于菌株 $\Delta med15B$ 的16.8和亲本菌株ATCC55的17.1; 不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比值比菌株 $\Delta med15B$ 和亲本菌株ATCC55分别提高了53.1%和41.5%; (3) 碘化丙啶(PI)染色细胞数占总检测细胞数的比例, 与菌株 $\Delta med15B$ 和亲本菌株ATCC55比较分别下降了60.8%和37.7%; (4) 细胞半抑制pH (胁迫) (IC_{50})值达到pH 2.3, 比菌株 $\Delta med15B$ 的pH 3.7和亲本菌株ATCC55的pH 3.1具有更强的耐受能力。【结论】在菌株 $\Delta med15B$ 中过表达基因*elo1*和*ole1*能通过提高长链脂肪酸和不饱和脂肪酸含量, 增强细胞对低pH胁迫的耐受能力。

关键词: 光滑球拟酵母, Med15B, 长链脂肪酸, 不饱和脂肪酸, 低 pH 耐受能力

基金项目: 国家自然科学基金创新研究群体科学基金(32021005); 国家自然科学基金(32070124, 22038005); 国家轻工技术与工程一流学科自主课题(LITE2018-08)

*通信作者。Tel/Fax: +86-510-85197875; E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2020-07-12; 修回日期: 2020-10-06; 网络出版日期: 2020-12-11

光滑球拟酵母是发酵法生产有机酸的重要工业菌株^[1]。在利用其发酵生产有机酸的工业过程中,发酵液 pH 会随着有机酸的不断积累而逐渐降低,成为影响光滑球拟酵母生产有机酸过程经济效益的关键因素^[1]。微生物耐受低 pH 胁迫的生理机制包括:细胞壁和细胞膜的屏障作用、胞内质子动势、DNA 遗传水平损伤修复、信号转导系统级联调控作用和特定转录因子激活或失活^[2-4]。其中,细胞膜作为隔开细胞质与外界环境的天然屏障,通过调节自身组分含量和比例,调节细胞膜完整性、流动性和通透性,从而耐受低 pH 胁迫。

微生物细胞膜脂质主要由磷脂、鞘脂和甾醇组成,在脂质双分子层上有跨膜蛋白、锚定蛋白和外周蛋白,因此细胞膜中脂质和蛋白质的物理特性和生理功能影响细胞膜的完整性、流动性和通透性。Konas 等^[5]计算模拟发现磷脂头部组成特性不同,对乙酸引起的细胞膜损伤的响应不同。在此基础上,Tan 等^[3]在大肠菌(*Escherichia coli*)中上调磷脂酰丝氨酸(PS)合成酶 PssA 的表达水平,提高磷脂酰乙醇胺(PE)的含量,使突变菌株对辛酸(C8)的耐受能力和含量分别提高了 29%和 46%。而 Yin 等^[4]在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中模块化过表达胞苷二磷酸-二酰甘油(CDP-DAG)合成酶 Cds1 和 CDP-DAG-丝氨酸 O-磷脂酰转移酶 Cho1,使突变菌株对 NaCl 胁迫的 IC_{50} 值达到 1.19 mol/L,显著高于亲本菌株的 1.01 mol/L。另一方面,Sherkhanov 等^[5]在 *E. coli* 中通过敲除酰基转移酶 *aas*,提高脂酰链平均链长,部分消除了中链脂肪酸积累对细胞的损害并使产量提高了 20%。Bergenholtm 等^[6]在 *S. cerevisiae* 通过组合过表达乙酰辅酶 A 羧化酶 Acc1、Elo1 和

Ole1,显著提高可可脂的产量,比亲本菌株提高了 5.8 倍。除了改造脂质合成路径,Tan 等^[7]在 *E. coli* 中异源表达来源于 *Pseudomonas aeruginosa* 的顺反异构酶(Cti),引入反式不饱和脂肪酸合成,增强细胞对毒性化合物(如己酸和丁醇)和多种胁迫(如高温和高渗)的耐受能力。由于脂质合成路径的复杂性,调节单个或几个脂质代谢路径基因改变细胞膜磷脂组分影响菌株胁迫耐受能力的策略具有一定的局限性。为此,需要开发通过改造全局转录因子从而广泛调节脂质代谢路径基因响应环境胁迫的方法^[8-9]。

中介体复合物(mediator complex)作为真核细胞中重要的基因表达调节蛋白^[10],通过与 RNA 聚合酶 II 以及转录因子相结合从而调节基因的转录过程,在细胞生长和耐受环境胁迫方面发挥重要作用^[11]。采用电镜技术(electron microscopy)对酵母中介体进行 3D 投射图分析发现中介体复合物可分“头部-中部-尾部”三个不同的结构区域,中部与尾部模块相互作用位于中介体上部,头部模块则与之相分离位于底部^[12]。随后,中国科学技术大学蔡刚教授课题组通过晶体衍射与单粒子电镜技术,重新定义了中介体三维结构:头部与中部模块位于中介体上部,而尾部处于中介体底部^[13]。酵母中介体复合物的头部主要包括:Med6、Med8、Med11、Med17、Med18、Med20、Med22;中部主要包括:Med1、Med4、Med7、Med9、Med10、Med14、Med19、Med21、Med31;尾部主要包括:Med2、Med3、Med5、Med15、Med16^[14]。

中介体头部模块的结构与人的颞部相似,Med17 亚基的螺旋区域与 Med11、Med22 互动,在 610-660 残基处形成 β 折叠结构,构成上颞结

构的内表面;下颚则是主要由 Med18-Med20-Med8 亚基复合物形成;Med17 与 Med18 的环状结构域互作形成多重螺旋束“Neck”域,这一区域中接合了 5 个中介体亚基^[15-16]。中介体中部模块是由异二聚体 Med4/Med9 和 Med7/Med21 通过亚基末端保守螺旋区形成的四聚体,呈现“钩子”与“旋钮”的形态。Med7/Med21 的两侧分别连接 Med10 与 Med31, Med31 构成了其中的“旋钮”的部分, Med14 的 N 端连接头部模块的螺旋束区, C 端则交联头部模块的“颞部”^[17]。然而,至今还未见中介体尾部模块结构的系统解析,只知道 Med2、Med3 和 Med15 互作形成三聚体尾部子模块^[18]。但中介体与转录因子发生相互作用主要是通过尾部亚基的构象变化来完成的,因此中介体尾部亚基在转录调控过程中发挥着重要作用^[19]。研究发现, Med15 能直接与转录激活因子(Gcn4)、油酸激活转录因子(Oaf1)、耐药转录因子(Pdr1)等^[20-23]发生相互作用,招募中介体结合到基因上游激活区域,激活相应靶基因表达,从而参与碳源利用、胁迫响应和多药耐受^[23-24]等细胞活动。在前期对中介体亚基 Med2、Med3、Med15 与 Med16 进行敲除或过量表达时,发现, Med3、Med15 和 Med16 参与了酸胁迫^[19]。更进一步发现在 pH 2.0 条件下, Med15B 能通过下调脂质代谢相关基因的表达水平,影响细胞膜脂质组分,进而影响光滑球拟酵母对低 pH 的耐受能力^[25]。但上述研究没有深入解析 Med15-基因表达-脂质组分变化-胁迫抗性之间的关联机制。为此,本研究以 $\Delta med15B$ 为出发菌株,通过表达脂肪酸延伸酶 Elo1 和去饱和酶 Ole1 改变长链脂肪酸和不饱和脂肪酸的含量,解析脂质组分变化对细胞耐受低 pH 胁迫的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒:光滑球拟酵母 *ATCC55* 由 Karl Kuchler 教授惠赠^[26],中介体亚基 Med15B 菌株 $\Delta med15B$ 在前期研究中构建并保存^[25],重组质粒克隆的大肠杆菌 JM109 和大肠杆菌-光滑球拟酵母穿梭载体 pY26 由本实验室保存。

1.1.2 培养基与培养方法:大肠杆菌的培养条件:采用 LB 培养基,培养温度为 37 °C,接种液体培养基时转速为 200 r/min。在筛选带有质粒的 JM109 时,添加终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氨苄青霉素获得抗生素筛选压力培养基。光滑球拟酵母的培养条件:培养温度为 30 °C,接种液体培养基时转速为 200 r/min。在 YNB (yeast nitrogen base without amino acids)培养基中培养时,需要添加终浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的必需氨基酸。根据实验需要用盐酸调节 pH 模拟低 pH 胁迫条件。

1.1.3 主要试剂和工具酶:主要工具酶有 *rTaq*、Primstar、限制酶、RNA 抽提试剂盒、反转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒等购自宝日医生物技术(北京)有限公司(TaKaRa 中国);酵母基因组 DNA 提取、PCR 产物回收纯化、质粒提取等试剂盒购自北京天根生物技术公司;同源重组试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司;蛋白胨、酵母粉购自英国 Oxoid 公司;YNB、氨苄青霉素、碘化丙啶(PI, propidium iodide)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;化学试剂为分析纯或色谱纯购自上海国药集团。

1.2 光滑球拟酵母过表达菌株 $\Delta med15B/elo1-ole1$ 的构建

以光滑球拟酵母 CBS138 基因组序列为模

板, 设计表 1 引物用于基因 *elo1* 和 *ole1* 过表达菌株的构建及鉴定。引物合成和测序工作由天霖生物科技(无锡)有限公司完成。

根据酵母基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取光滑球拟酵母 *ATCC55* 基因组 DNA, 并用作模板, 使用表 1 中引物 *Elo1-kz-F/R* 和 *Ole1-kz-F/R* 扩增带有同源臂的 *elo1* 和 *ole1* 基因片段并纯化回收。将酵母表达载体 pY26 用限制酶 *Not I* 和 *Bgl II* 酶切, 利用同源重组试剂盒将 *elo1* 基因片段插入质粒 pY26, 转化到 *E. coli* JM109 感受态细胞中, 在含氨苄青霉素抗性的平板上筛选阳性转化子, 使用引物 *Elo1-yz-F/R* 进行菌落 PCR 和测序验证, 将正确的重组质粒命名为 pY26-*elo1*。然后, 将质粒 pY26-*elo1* 用限制性内切酶 *BamH I* 和 *Xho I* 酶切, 利用同源重组试剂盒将 *ole1* 基因片段插入质粒 pY26-*elo1*, 转化到 *E. coli* JM109 感受态细胞中, 在含氨苄青霉素抗性的平板上筛

选阳性转化子, 使用引物 *Ole1-yz-F/R* 进行菌落 PCR 和测序验证, 将正确的重组质粒命名为 pY26-*elo1-ole1*。

将重组质粒 pY26-*elo1-ole1* 转化至光滑球拟酵母 *med15Δ* 的感受态细胞中, 在不含有尿嘧啶的 YNB 平板上筛选阳性转化子, 将阳性转化子接种至新鲜的液体培养基并提取重组质粒。以提取的重组质粒和空白质粒为模板, 使用引物 *Elo1-yz-F/R* 和 *Ole1-yz-F/R* 进行 PCR 验证, 得到正确的过表达菌株 $\Delta med15B/elo1-ole1$ 。

1.3 基因 *elo1* 和 *ole1* 转录水平分析

总 RNA 提取: 将酵母细胞培养至指数生长期, 分别转接至 pH 6.0 和 pH 2.0 的新鲜 YNB 培养基中, 培养 6 h, 然后收集菌体(4 °C, 5000 r/min, 5 min)。将收集后的酵母菌体经过液氮快速冷冻后研磨, 破除细胞壁, 使用 RNA 提取试剂盒提取样品总 RNA, 并对 RNA 的浓度和质量进行检测。

表 1. 本研究所用引物

Table 1. Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')
<i>Elo1-kz-F</i>	TCTAAGTTTTCTAGAACTAGCGCGGCCGCATGACTACCATTATCCACTACTAAAG
<i>Elo1-kz-R</i>	GGCGAAGAATTGTTAATTAAGATCTTTATCTCTTTCTTCTTCTATCTTTGGC
<i>Ole1-kz-F</i>	CGACGGATTCTAGAACTAGTGGATCCATGTCTAGGGTTGAAACCAGAA
<i>Ole1-kz-R</i>	TGACATAACTAATTACATGACTCGAGTCAGTTCATGTGTGCTCTCTC
<i>Elo1-yz-F</i>	GATGACCTCCCATTGATATTTAAGT
<i>Elo1-yz-R</i>	AATTGGAGCGACCTCATG
<i>Ole1-yz-F</i>	TGCAACCTGCCTGGAGTA
<i>Ole1-yz-R</i>	GACCTAGACTTCAGGTTGTCT
<i>Elo1-dl-F</i>	GTAACGAAGGTGCCTGGAC
<i>Elo1-dl-R</i>	TGTGGCAGAGTTGGGAAGTA
<i>Ole1-dl-F</i>	GCTTTGTTTCGCTACTTTCTATT
<i>Ole1-dl-R</i>	GCCATTGAGTTGATACAGAAGG
β -Actin-F	ACCGCTGCTCAATCTTCC
β -Actin-R	GGTTTGCTCCTTTGGTCTATT

F: forward primer; R: reverse primer.

cDNA 合成: 利用反转录试剂盒 Prime Script II 1st-strand cDNA synthesis kit 对总 RNA 进行反转录合成 cDNA。

qRT-PCR: 将合成的 cDNA 浓度稀释至 100 ng/μL, 将其用于荧光定量 PCR (qRT-PCR) 的模板, 利用表 1 中的引物 *Elo1*-dl-F/R、*Ole1*-dl-F/R 和 β -Actin-F/R, 使用 SYBR *Premix Extaq*TM 试剂盒进行 qRT-PCR 定量分析基因 *elo1* 和 *ole1* 的表达水平。基因 *act1* 作为本实验的对照组。

1.4 细胞膜脂肪酸组分分析

酵母细胞收集: 酵母细胞的培养和收集如 1.3.1 所述, 将收集后的酵母菌体, 真空冷冻干燥备用。

脂肪酸提取液的配置: 皂化溶液: 称取 9 g 氢氧化钠溶于 30 mL 超纯水, 再加入 30 mL 甲醇混匀; 甲基化溶液: 取 65 mL 6.0 mol/L 的盐酸, 与 55 mL 甲醇混匀; 提取溶液: 将 50 mL 己烷和 50 mL 甲基三丁基乙醚混匀; 碱洗液: 将 1.01 g 氢氧化钠溶于 100 mL 超纯水。

脂质提取及处理: 称取冷冻干燥后的菌体 50 mg, 置于耐热试管中, 加入 2 mL 皂化液, 沸水浴 30 min, 置于冰上快速冷却。加入 4 mL 甲基化溶液, 混匀, 80 °C 水浴 10 min, 置于冰上快速冷却。加入 2.5 mL 提取溶液, 摇匀振荡 10 min, 静置至溶液分层。将上层溶液转移至新的试管中, 加入 3 mL 碱洗液和几滴饱和氯化钠溶液, 用旋涡振荡器涡旋 5 min, 静置至溶液分层。吸取上层液体于气相样品管中, 进行检测。色谱分析条件参考 Yang 等^[27]并作了一定调整, 具体如下: 使用气相色谱仪(GC-2010AF, 日本岛津公司, 日本), 配备 PEG 毛细管填充柱; 使用氦气作为载气; 将 1.0 μL 样品注入

250 °C 的进样器中, 初始柱温为 100 °C 保持 1 min, 随后以 4 °C/min 的速率升至 250 °C 并保持 5 min, 检测器温度保持在 280 °C; 通过比较脂肪酸甲酯的保留时间与已知标准的保留时间, 对脂肪酸甲酯进行鉴定。

1.5 细胞膜完整性分析

流式细胞仪染色法: 酵母细胞的培养和收集如 1.3.1 所述, 将待测菌液的 OD_{600} 稀释至 0.5, 取 500 μL, 加入 5 μL 的核酸染料 PI, 立即混匀并避光孵育 5 min, 用 PBS 缓冲液(pH 7.4)洗涤菌体 2 次, 并用 500 μL 的 PBS 缓冲液复悬。将复溶后的菌液用流式细胞仪检测, 在低流速下分析样品中的 20000 个细胞, 所得数据用 FlowJo 软件进行分析。核酸染料 PI 不能进入具有完整细胞膜的细胞, 所以, PI 染色细胞数占总检测细胞数比例越高, 细胞膜完整性越差。

1.6 细胞半抑制 pH (胁迫)分析

酵母培养、转接的方法如 1.3.1 所述, 使用浓盐酸调节培养基 pH 为 1.5–6.0, 间隔 0.5 个 pH 值。测定不同 pH 条件下酵母细胞存活率, 并对酵母细胞存活率进行非线性拟合, 得到细胞存活率的曲线图。定义: 细胞半抑制 pH (胁迫) (IC_{50}) 值为酵母细胞存活率为 50% 时, 培养基的 pH 值。

2 结果和分析

2.1 脂肪酸延伸酶 *Elo1* 和去饱和酶 *Ole1* 过表达菌株的构建

首先以亲本菌株 *ATCC55* 基因组为模板, 分别利用表 1 中的扩增引物 *Elo1*-kz-F/R 和 *Ole1*-kz-F/R 获得带有同源臂的基因 *elo1* 和 *ole1*。随后通过一步同源重组试剂盒将这 2 个基因片段

依次连接到用限制性酶线性化的表达载体 pY26 (pY26 属于高拷贝质粒, 携带的启动子 *TEF* 和 *GPD* 属于强启动子, 能够高强度地表达其启动的目标基因^[28]), 成功构建出过表达质粒 pY26-*elo1-ole1*, 其中, 基因 *elo1* 和 *ole1* 分别受启动子 *TEF* 和 *GPD* 调控。再将重组质粒导入菌株 $\Delta med15B$ 中, 在尿嘧啶缺陷的 YNB 平板上筛选过表达菌株 $\Delta med15B/elo1-ole1$ 。分别以空载质粒和过表达阳性转化子中提取的重组质粒为模板, 通过验证引物 *Elo1-yz-F/R* 和 *Ole1-yz-F/R* 进行的 PCR 扩增验证, 过表达基因 *elo1* 和 *ole1* 重组正确的条带大小分别为 1525 bp (图 1: 泳道 2) 和 1880 bp (图 1: 泳道 4), 对照条带大小分别为 414 bp (图 1: 泳道 1) 和 355 bp (图 1: 泳道 3), 上述 PCR 检测结果表明, 基因 *elo1* 和 *ole1* 的过表达菌株 $\Delta med15B/elo1-ole1$ 构建成功。

2.2 过表达菌株脂肪酸延伸酶基因 *elo1* 和去饱和酶基因 *ole1* 表达水平检测

将亲本菌株 *ATCC55*、菌株 $\Delta med15B$ 和过表

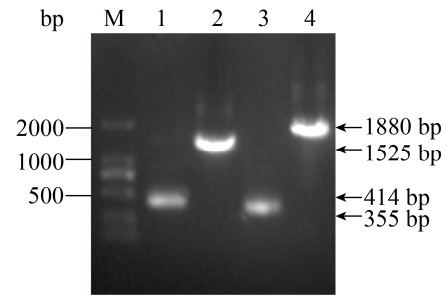


图 1. PCR 鉴定基因 *elo1* 和 *ole1* 过表达菌株 $\Delta med15B/elo1-ole1$

Figure 1. Identification of genes *elo1* and *ole1* overexpressed strain $\Delta med15B/elo1-ole1$ by PCR. M: DL 2000 marker; lane 1: control of *elo1*; lane 2: *elo1*; lane 3: control of *ole1*; lane 4: *ole1*.

达菌株 $\Delta med15B/elo1-ole1$ 分别在 pH 6.0 和 pH 2.0 的 YNB 液体培养基中培养 6 h。然后利用 qRT-PCR 检测 3 株菌基因 *elo1* 和 *ole1* 的表达水平, 结果如图 2 所示。在 pH 6.0 条件下, 过表达菌株 $\Delta med15B/elo1-ole1$ 中基因 *elo1* 和 *ole1* 表达水平分别比亲本菌株 *ATCC55* 提高了 1.4 倍和 1.7 倍, 同时比菌株 $\Delta med15B$ 提高了 2.6 倍和 1.9 倍 (图 2-A)。另外, 随着培养基 pH 下降, 这 3 株

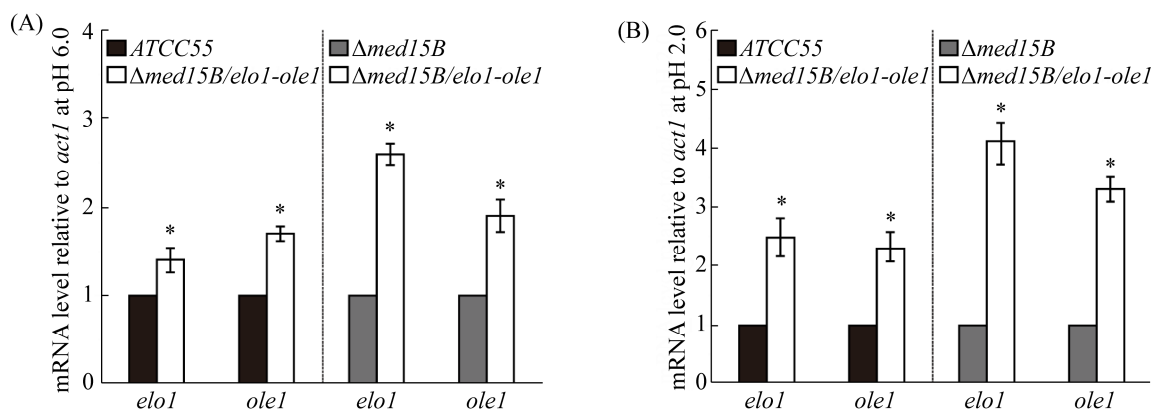


图 2. 不同菌株内基因 *elo1* 和 *ole1* 的表达水平

Figure 2. The expression level of genes *elo1* and *ole1* in different strains. Quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) tested the mRNA levels of *elo1* and *ole1* in parent strain *ATCC55*, strain $\Delta med15B$ and overexpression strain $\Delta med15B/elo1-ole1$, calculated relative to the *act1* level at pH 6.0 (A) and at pH 2.0 (B). Data represent the means of three biological replicates, and error bars represent the standard deviation. *: $P \leq 0.05$.

菌中基因 *elo1* 和 *ole1* 的表达水平都发生显著上调。过表达菌株 $\Delta med15B/elo1-ole1$ 中基因 *elo1* 和 *ole1* 的表达水平分别比在亲本菌株 *ATCC55* 中提高了 2.5 倍和 2.2 倍, 同时比菌株 $\Delta med15B$ 提高了 4.1 倍和 3.3 倍(图 2-B)。上述结果表明在菌株 $\Delta med15B$ 中过表达基因 *elo1* 和 *ole1* 能弥补 *Med15B* 基因缺失所导致的基因表达下调, 并进一步提高了基因的表达水平。

2.3 过表达菌株脂肪酸组分检测

已有研究证明过表达基因 *elo1* 和 *ole1* 有助于

长链脂肪酸和不饱和脂肪酸的合成^[6-29], 为了检测基因 *elo1* 和 *ole1* 过表达对细胞膜脂肪酸组分的影响, 将亲本菌株 *ATCC55*、菌株 $\Delta med15B$ 和过表达菌株 $\Delta med15B/elo1-ole1$ 分别在 pH 6.0 和 pH 2.0 的 YNB 液体培养基中培养 6 h, 提取细胞膜脂肪酸进行气质联用检测, 结果如图 3 所示。在 pH 6.0 条件下, 过表达菌株 $\Delta med15B/elo1-ole1$ 中 C16:1 和 C18:0 百分含量与菌株 $\Delta med15B$ 和亲本菌株 *ATCC55* 相差不大; C16:0 百分含量与菌株 $\Delta med15B$ 和亲本菌株 *ATCC55* 对比, 分别下降

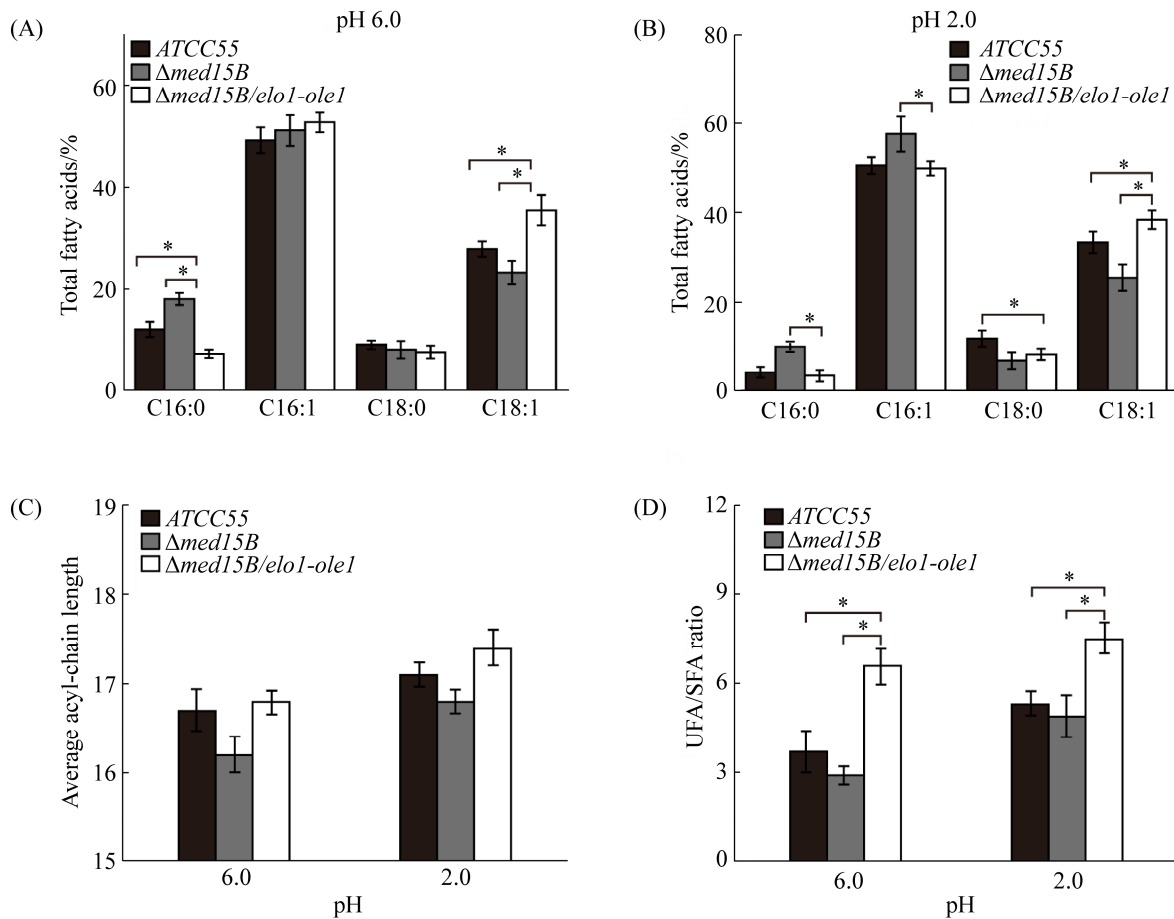


图 3. 基因 *elo1* 和 *ole1* 过表达影响细胞膜脂肪酸组分

Figure 3. Effect of genes *elo1* and *ole1* overexpression on the membrane fatty acids. Percentage of fatty acids in different strains at pH 6.0 (A) and pH 2.0 (B). Changes in average acyl-chain length (C) and UFA/SFA ratio (D) at pH 6.0 and pH 2.0. Data represent the means of three biological replicates, and error bars represent the standard deviation. *: $P \leq 0.05$.

了 64.6%和 47.1%; 而 C18:1 百分含量则分别提高了 51.1%和 26.2% (图 3-A)。在 pH 2.0 条件下, 过表达菌株中 C18:0 百分含量与菌株 $\Delta med15B$ 中相比, 没有显著差异; C16:0 和 C16:1 的百分含量与菌株 $\Delta med15B$ 相比, 分别下降了 66.1%和 13.4%; 而 C18:1 百分含量则提高了 50.6% (图 3-B)。另外与亲本菌株 ATCC55 相比, 过表达菌株中 C16:0 和 C16:1 的百分含量无显著差异, C18:0 百分含量下降了 29.6%, 而 C18:1 的比例提高 16.7% (图 3-B)。进一步对脂肪酸平均链长进行分析, 发现过表达菌株 $\Delta med15B/elo1-ole1$ 的脂肪酸平均链长在 pH 6.0 时为 16.9, 而在 pH 2.0 时则增长至 17.4; 菌株 $\Delta med15B$ 的脂肪酸平均链长在 pH 6.0 时为 16.3, 在 pH 2.0 时增长至 16.8; 亲本菌株 ATCC55 脂肪酸平均链长在 pH 6.0 时为 16.8, 在 pH 2.0 时增长至 17.1 (图 3-C)。另一方面, 在 pH 6.0 时不饱和脂肪酸(C16:1 和 C18:1)与饱和脂肪酸(C16:0 和 C18:0)的比值(UFA/SFA ratio)在过表达菌株 $\Delta med15B/elo1-ole1$ 中为 6.6, 比菌株 $\Delta med15B$ 的

2.9 和亲本菌株 ATCC55 的 3.7 分别提高了 127.6%和 78.4%; 在 pH 2.0 条件下, UFA/SFA 比值在过表达菌株 $\Delta med15B/elo1-ole1$ 中为 7.5, 分别比菌株 $\Delta med15B$ 的 5.3 和亲本菌株 ATCC55 的 4.9 提高了 53.1%和 41.5%。上述结果表明, 在菌株 $\Delta med15B$ 中过表达基因 *elo1* 和 *ole1* 能补偿基因 Med15B 缺失导致的细胞膜长链脂肪酸和不饱和脂肪酸合成受阻, 提高低 pH 胁迫下细胞膜脂肪酸的平均链长为 17.4 和 UFA/SFA 比值为 7.5。

2.4 过表达菌株细胞膜完整性和 IC_{50} 值检测

为了检测基因 *elo1* 和 *ole1* 的过表达对细胞膜完整性的影响, 将亲本菌株 ATCC55、菌株 $\Delta med15B$ 和过表达菌株 $\Delta med15B/elo1-ole1$ 分别在 pH 6.0 和 pH 2.0 的 YNB 液体培养基中培养 6 h 后, 用核酸染料 PI 对细胞膜破损细胞进行染色, 采用流式细胞仪对细胞膜完整性进行定量分析, 结果如图 4-A 所示。在 pH 6.0 条件下, PI 染色细胞数与总检测细胞数的比值在亲本菌株 ATCC55、菌株 $\Delta med15B$ 和过表达菌株 $\Delta med15B/elo1-ole1$ 均

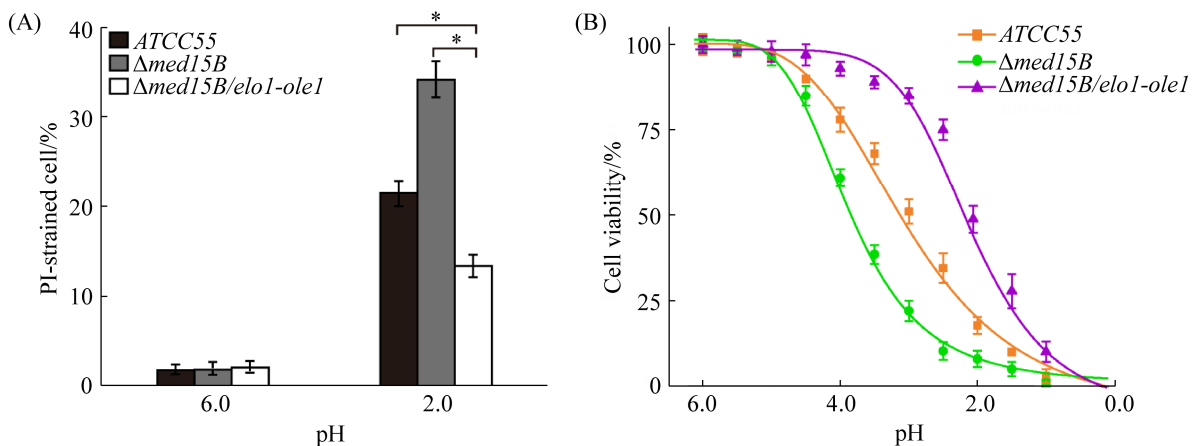


图 4. 基因 *elo1* 和 *ole1* 过表达影响细胞膜完整性和 IC_{50} 值

Figure 4. Overexpression of genes *elo1* and *ole1* affects membrane integrity and IC_{50} value. A: flow cytometry analyses of membrane integrity in different strains at pH 6.0 and pH 2.0, cells were stained with PI; B: analyses of IC_{50} value in different strains by testing cell viability for each pH value. Data represent the means of three biological replicates, and error bars represent the standard deviation. *: $P \leq 0.05$.

低于 5%, 且 3 种菌株之间无显著差异。而在 pH 2.0 条件下, PI 染色细胞数与总检测细胞数的比值在 3 株菌分别升高到 21.5%、34.2%、13.4%, 过表达菌株 $\Delta med15B/elo1-ole1$ 中 PI 染色细胞比菌株 $\Delta med15B$ 和亲本菌株 ATCC55 分别下降了 60.8% 和 37.7%。上述结果表明, 在菌株 $\Delta med15B$ 中过表达基因 *elo1* 和 *ole1* 能有效地弥补 Med15B 基因缺失导致的细胞膜损伤, 增强低 pH 胁迫下细胞膜完整性。

进一步通过细胞半抑制 pH (胁迫) (IC_{50}) 值的计算, 检测基因 *elo1* 和 *ole1* 过表达对细胞低 pH 胁迫耐受能力的影响, 结果如图 4-B 所示。亲本菌株 ATCC55、菌株 $\Delta med15B$ 和过表达菌株 $\Delta med15B/elo1-ole1$ 对 pH 胁迫的 IC_{50} 值分别为 pH 3.1、pH 3.7 和 pH 2.3。根据 IC_{50} 值的定义, 可以发现过表达菌株 $\Delta med15B/elo1-ole1$ 对低 pH 的耐受能力更强。上述结果表明, 过表达基因 *elo1* 和 *ole1* 能有效地增强低 pH 条件下细胞膜的完整性, 进而改善细胞对低 pH 的耐受能力。

3 讨论

本研究通过在光滑球拟酵母中介体尾部亚基 Med15B 缺失菌株(菌株 $\Delta med15B$)中过表达脂肪酸延伸酶基因 *elo1* 和去饱和酶基因 *ole1*, 有效地弥补了低 pH 条件下 Med15B 基因缺失引起的基因 *elo1* 和 *ole1* 表达水平下调^[25]。通过进一步对细胞膜脂肪酸组分分析发现, 过表达基因 *elo1* 和 *ole1* 能够提高菌株长链脂肪酸(C18:0 和 C18:1)和不饱和脂肪酸(C16:1 和 C18:1)的合成能力^[30-31]。在 pH 2.0 条件下, 过表达菌株 $\Delta med15B/elo1-ole1$ 的平均脂肪酸烷基链长达到 17.4, UFA/SFA 比值达到 7.5 倍。已有研究发现提高细胞膜长链脂肪酸和不饱和脂肪酸的比例有助于增强胁迫条件下细胞膜

的完整性^[32-33]。基于过表达菌株中脂肪酸组分的变化, 对细胞膜特性进一步分析, 发现 pH 2.0 条件下过表达菌株 $\Delta med15B/elo1-ole1$ 中细胞膜损伤的细胞比例与菌株 $\Delta med15B$ 和亲本菌株 ATCC55 相比分别下降了 60.8% 和 37.7%。过表达菌株 $\Delta med15B/elo1-ole1$ 的细胞膜完整性增强并使其对 pH 的 IC_{50} 值达到 pH 2.3, 表明其对低 pH 胁迫耐受能力增强。这些结果与本实验室前期的研究发现相结合, 进一步证实了 Med15 对脂肪酸合成基因的表达和脂肪酸合成起正调控作用, 为下一步改造全局转录因子(比如中介体复合物亚基 Med3 和 Med15^[8-25]或转录因子 Crz1^[9])靶向调节代谢路径或信号路径上系列基因的表达, 增强菌株的生产能力和耐受能力的策略提供了理论基础和实验依据。

参考文献

- [1] Liu LM, Xu QL, Li Y, Shi ZP, Zhu Y, Du GC, Chen J. Enhancement of pyruvate production by osmotic-tolerant mutant of *Torulopsis glabrata*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 97(4): 825-832.
- [2] Tan ZG, Khakbaz P, Chen YX, Lombardo J, Yoon JM, Shanks JV, Klauda JB, Jarboe LR. Engineering *Escherichia coli* membrane phospholipid head distribution improves tolerance and production of biorenewables. *Metabolic Engineering*, 2017, 44: 1-12.
- [3] Yin NN, Zhu GX, Luo QL, Liu J, Chen XL, Liu LM. Engineering of membrane phospholipid component enhances salt stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(3): 710-720.
- [4] Sherkanov S, Korman TP, Bowie JU. Improving the tolerance of *Escherichia coli* to medium-chain fatty acid production. *Metabolic Engineering*, 2014, 25: 1-7.
- [5] Konas RM, Daristotle JL, Harbor NB, Klauda JB. Biophysical changes of lipid membranes in the presence of ethanol at varying concentrations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2015, 119(41): 13134-13141.
- [6] Bergenholm D, Gossing M, Wei YJ, Siewers V, Nielsen J. Modulation of saturation and chain length of fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae* for production of cocoa butter-like lipids. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(4): 932-942.

- [7] Tan ZG, Yoon JM, Nielsen DR, Shanks JV, Jarboe LR. Membrane engineering via trans unsaturated fatty acids production improves *Escherichia coli* robustness and production of biorenewables. *Metabolic Engineering*, 2016, 35: 105–113.
- [8] Lin XB, Qi YL, Yan DN, Liu H, Chen XL, Liu LM. CgMED3 changes membrane sterol composition to help *Candida glabrata* tolerate low-pH stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(17): e00972-17.
- [9] Yan DN, Lin XB, Qi YL, Liu H, Chen XL, Liu LM, Chen J. Crz1p regulates pH homeostasis in *Candida glabrata* by altering membrane lipid composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(23): 6920–6929.
- [10] Poss ZC, Ebmeier CC, Taatjes DJ. The mediator complex and transcription regulation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 48(6): 575–608.
- [11] Allen BL, Taatjes DJ. The mediator complex: a central integrator of transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2015, 16(3): 155–166.
- [12] Chadick JZ, Asturias FJ. Structure of eukaryotic mediator complexes. *Trends in Biochemical Sciences*, 2005, 30(5): 264–271.
- [13] Wang XJ, Sun QQ, Ding ZR, Ji JH, Wang JY, Kong X, Yang JH, Cai G. Redefining the modular organization of the core mediator complex. *Cell Research*, 2014, 24(7): 796–808.
- [14] Soutourina J. Transcription regulation by the mediator complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2018, 19(4): 262–274.
- [15] Cai G, Imasaki T, Yamada K, Cardelli F, Takagi Y, Asturias FJ. Mediator head module structure and functional interactions. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2010, 17(3): 273–279.
- [16] Takagi Y, Calero G, Komori H, Brown JA, Ehrensberger AH, Hudmon A, Asturias F, Kornberg RD. Head module control of mediator interactions. *Molecular Cell*, 2006, 23(3): 355–364.
- [17] Lariviere L, Plaschka C, Seizl M, Petrotchenko EV, Wenzek L, Borchers CH, Cramer P. Model of the mediator middle module based on protein cross-linking. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(20): 9266–9273.
- [18] Ansari SA, Morse RH. Selective role of mediator tail module in the transcription of highly regulated genes in yeast. *Transcription*, 2012, 3(3): 110–114.
- [19] Harper TM, Taatjes DJ. The complex structure and function of mediator. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(36): 13778–13785.
- [20] Ansari SA, Ganapathi M, Benschop JJ, Holstege FCP, Wade JT, Morse RH. Distinct role of mediator tail module in regulation of SAGA-dependent, TATA-containing genes in yeast. *The EMBO Journal*, 2012, 31(1): 44–57.
- [21] Brzovic PS, Heikaus CC, Kisselev L, Vernon R, Herbig E, Pacheco D, Warfield L, Littlefield P, Baker D, Klevit RE, Hahn S. The acidic transcription activator Gcn4 binds the mediator subunit Gal11/Med15 using a simple protein interface forming a fuzzy complex. *Molecular Cell*, 2011, 44(6): 942–953.
- [22] Thakur JK, Arthanari H, Yang FJ, Chau KH, Wagner G, Näär AM. Mediator subunit Gal11p/MED15 is required for fatty acid-dependent gene activation by yeast transcription factor Oaf1p. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(7): 4422–4428.
- [23] Thakur JK, Arthanari H, Yang FJ, Pan SJ, Fan XC, Breger J, Frueh DP, Gulshan K, Li DK, Mylonakis E, Struhl K, Moye-Rowley WS, Cormack BP, Wagner G, Näär AM. A nuclear receptor-like pathway regulating multidrug resistance in fungi. *Nature*, 2008, 452(7187): 604–609.
- [24] Kumar V, Waseem M, Dwivedi N, Maji S, Kumar A, Thakur JK. KIX domain of AtMed15a, a mediator subunit of *Arabidopsis*, is required for its interaction with different proteins. *Plant Signaling & Behavior*, 2018, 13(2): e1428514.
- [25] Qi YL, Liu H, Yu JY, Chen XL, Liu LM. Med15B regulates acid stress response and tolerance in *Candida glabrata* by altering membrane lipid composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(18): e01128-17.
- [26] Roetzer A, Gregori C, Jennings AM, Quintin J, Ferrandon D, Butler G, Kuchler K, Ammerer G, Schuller C. *Candida glabrata* environmental stress response involves *Saccharomyces cerevisiae* Msn2/4 orthologous transcription factors. *Molecular Microbiology*, 2008, 69(3): 603–620.
- [27] Yang X, Hang XM, Zhang M, Liu XL, Yang H. Relationship between acid tolerance and cell membrane in *Bifidobacterium*, revealed by comparative analysis of acid-resistant derivatives and their parental strains grown in medium with and without Tween 80. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(12): 5227–5236.
- [28] Chen XL, Wu J, Song W, Zhang LM, Wang HJ, Liu LM. Fumaric acid production by *Torulopsis glabrata*: engineering the urea cycle and the purine nucleotide cycle. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(1): 156–167.
- [29] Nasution O, Lee YM, Kim E, Lee Y, Kim W, Choi W. Overexpression of *OLE1* enhances stress tolerance and constitutively activates the MAPK HOG pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(3): 620–631.
- [30] Fang ZJ, Chen ZX, Wang S, Shi P, Shen YH, Zhang YS, Xiao JH, Huang ZW. Overexpression of *OLE1* enhances

- cytoplasmic membrane stability and confers resistance to cadmium in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 83(1): e02319-16.
- [31] Yu T, Zhou YJJ, Wenning L, Liu QL, Krivoruchko A, Siewers V, Nielsen J, David F. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of very long chain fatty acid-derived chemicals. *Nature Communications*, 2017, 8: 15587.
- [32] Qi YL, Liu H, Chen XL, Liu LM. Engineering microbial membranes to increase stress tolerance of industrial strains. *Metabolic Engineering*, 2019, 53: 24–34.
- [33] Tan ZG, Black W, Yoon JM, Shanks JV, Jarboe LR. Improving *Escherichia coli* membrane integrity and fatty acid production by expression tuning of FadL and OmpF. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 38.

Enhancing low pH tolerance of *Candida glabrata* $\Delta med15B$ by overexpressing genes *elo1* and *ole1*

Yanli Qi^{1,2,3}, Hui Liu^{1,2,3}, Pei Zhou^{1,2,3}, Cong Gao^{1,2,3}, Liming Liu^{1,2,3*}

¹ State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

² Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

³ Laboratory of Food Microbial-Manufacturing Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] To investigate the effect of mediator subunit Med15B mediated fatty acid metabolism on *Candida glabrata* low pH tolerance. [Methods] Overexpression of genes *elo1* and *ole1*, encoding fatty acid elongase and $\Delta 9$ desaturase, in strain $\Delta med15B$ we obtained an overexpressed strain $\Delta med15B/elo1-ole1$. The expression level of genes *elo1* and *ole1*, the membrane fatty acid composition, the membrane integrity and stress tolerance of parent strain ATCC55, strain $\Delta med15B$ and overexpression strain $\Delta med15B/elo1-ole1$ were determined and compared at pH 2.0 and pH 6.0. [Results] At pH 2.0, the expression level of genes *elo1* and *ole1* in overexpression strain $\Delta med15B/elo1-ole1$ was increased by 4.1-fold and 3.3-fold compared to those of strain $\Delta med15B$, and increased by 2.5-fold and 2.2-fold compared to those of parent strain ATCC55, respectively. The average acyl-chain length of overexpression strain $\Delta med15B/elo1-ole1$ reached 17.4 longer than that of the deletion strain (16.8) and parent strain (17.1), and the ratio of unsaturated fatty acid to saturated fatty acid (UFA/SFA ratio) increased by 53.1% and 41.5%, respectively. Furthermore, the percentage of propidium iodide (PI)-stained cell in overexpression strain $\Delta med15B/elo1-ole1$ was decreased by 60.8% and 37.7%, respectively, compared to that of strain $\Delta med15B$ and parent strain ATCC55. Similarly, overexpression strain $\Delta med15B/elo1-ole1$ exhibited more tolerance to low pH and the half-maximal inhibition (IC_{50}) values for pH stress was reached pH 2.3, which was pH 3.7 of strain $\Delta med15B$ and pH 3.1 of parent strain ATCC55. [Conclusion] These results indicated that overexpression genes *elo1* and *ole1* in strain $\Delta med15B$ can enhance cell tolerance to low pH by increasing the content of long chain and unsaturated fatty acids.

Keywords: *Candida glabrata*, Med15B, long chain fatty acids, unsaturated fatty acids, low pH tolerance

(本文责编: 李磊)

Supported by the Science Fund for Creative Research Groups of the National Natural Science Foundation of China (32021005), by the National Natural Science Foundation of China (32070124, 22038005) and by the National First-Class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering (LITE2018-08)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85197875; E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn

Received: 12 July 2020; Revised: 6 October 2020; Published online: 11 December 2020