

# 酿酒酵母 NAD(H)激酶 Pos5p 在细胞抵抗 氧化胁迫中的作用

孙明娣 史锋\* 王小元

(江南大学食品科学与技术国家重点实验室 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 酿酒酵母线粒体 NAD(H)激酶 Pos5p 显示出重要功能, 其缺失将导致细胞抗氧化性能出现障碍。为了了解 Pos5p 的抗氧化作用机制及其与调节辅酶 NAD(H)和 NADP(H)之间的关系, 比较了在不同类型的氧化胁迫试剂作用下, 野生型 BY4742、POS5 基因缺失体 *pos5Δ* 及其回补体 *pos5Δ/POS5-YEp* 的生长表型, 同时采用高效液相色谱测定细胞内辅酶含量。结果表明, 在超氧生成试剂甲萘醌(VK<sub>3</sub>)、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)和 GSH 消耗试剂马来酸二乙酯(DEM)存在时, *pos5Δ* 都表现出明显的生长缺陷, 而各抗氧化基因缺失体只在其相应胁迫下表现出生长缺陷。在正常生长条件下, *pos5Δ* 的 NADPH 含量降低, *pos5Δ/POS5-YEp* 则提高, 表明 Pos5p 对胞内 NADPH 的供应有重要作用。在 VK<sub>3</sub>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 DEM 胁迫下, BY4742、*pos5Δ* 及 *pos5Δ/POS5-YEp* 的 NADP(H)含量均有不同程度的下降, 其中 *pos5Δ* 的 NADP(H)/NAD(H)比率下降最为严重, 而 *pos5Δ/POS5-YEp* 较 *pos5Δ* 有明显提高, 这与其氧化胁迫表型相一致。因此, 在细胞面临不同类型的氧化胁迫时, Pos5p 都能有效行使其 NAD(H)激酶活性, 补充 NADP(H)的损耗, 从而对细胞起到抗氧化保护作用。

**关键词:** 酿酒酵母, NAD(H)激酶, 氧化胁迫, 生长表型, 辅酶含量

## The Role of *Saccharomyces cerevisiae* NAD(H) Kinase Pos5p on the Defense of Oxidative Stress

SUN Ming-Di SHI Feng\* WANG Xiao-Yuan

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** In *Saccharomyces cerevisiae*, mitochondria NAD(H) kinase Pos5p has significant function. Absence of POS5 gene leads to antioxidative dysfunction. In order to realize the mechanism of anti-oxidative function of Pos5p and its relation to the conversion of coenzyme NAD(H) to NADP(H), we compared the growth phenotypes of wild-type BY4742, POS5 gene deletion mutant *pos5Δ* and *pos5Δ* containing POS5-YEp195 plasmid (*pos5Δ/POS5-YEp*) under exposure to different kinds of oxidative reagents, and assayed their intracellular coenzyme concentration by the high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that only the *pos5Δ* had obvious growth defect under all of the three oxidative reagents, that is, superoxide anion generation reagent menadione (VK<sub>3</sub>),

hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and GSH consumption reagent diethyl maleate (DEM), while the tested anti-oxidative gene deletion mutants only had growth defect under their corresponding oxidative stress. In the normal growth condition, NADPH content of *pos5Δ* reduced, while that of *pos5Δ/POS5-YEp* increased, indicating that Pos5p play an important role on the supply of NADPH. Under the exposure to  $VK_3$ ,  $H_2O_2$  and DEM, the NADP(H) concentration of BY4742, *pos5Δ* and *pos5Δ/POS5-YEp* all reduced, with the ratio of NADP(H) to NAD(H) in *pos5Δ* decreased most obviously. The research indicated that under different kinds of oxidative stress, Pos5p could exert NAD(H) kinase activity effectively to supply NADP(H) and thus had an important antioxidative defense function.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, NAD(H) kinase, Oxidative stress, Growth phenotypes, Coenzyme content

好氧生物在有氧代谢的过程中不断产生活性氧分子(Reactive oxygen species, ROS), 致使机体持续处于 ROS 攻击的环境中。ROS 主要包括超氧阴离子( $O_2^-$ ), 过氧化氢( $H_2O_2$ )和羟自由基( $\cdot OH$ )。细胞内 ROS 的增多会引起蛋白质、脂类及 DNA 等生物大分子发生氧化损伤, 其中以 $\cdot OH$  对机体的损伤最为严重<sup>[1-2]</sup>。ROS 过多会使机体产生氧化胁迫(Oxidative stress), 对于好氧生物, 绝大多数 ROS 都是电子传递和氧化磷酸化作用的副产物, 由泄漏的电子直接攻击  $O_2$  而产生<sup>[3-5]</sup>, 因此线粒体是真核生物 ROS 产生的主要场所。

细胞拥有多种抗氧化防御体系, 包括酶促防御体系和非酶防御体系。前者主要包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶、过氧化氢酶(CAT)等。SOD 可以使 $O_2^-$ 歧化为  $H_2O_2$  和  $O_2$ , 过氧化物酶和 CAT 则可以使  $H_2O_2$  进一步还原为  $H_2O$ <sup>[1]</sup>。非酶防御体系包括谷胱甘肽(GSH)、硫氧还蛋白(TRX)、维生素 C、维生素 E 等还原剂<sup>[4,6]</sup>, 其中 GSH 和 TRX 还可以作为抗氧化酶如 GSH 过氧化物酶、TRX 过氧化物酶以及谷氧还蛋白等的辅因子, 在酶促防御体系中起作用<sup>[1,6]</sup>。而 GSH、TRX 的抗氧化保护作用有赖于其还原态, 当它们转变成氧化态后, 需要通过依赖 NADPH 的 GSH 还原酶或 TRX 还原酶进行再生:  $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$ , 才能恢复活性<sup>[7]</sup>, 因此 NADPH 为抗氧化系统提供了还原力。

在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)线粒体内, NADPH 的供应渠道主要有两种: 一种是由 NADH 在 NADH 激酶作用下经磷酸化形成 NADPH; 另一种是  $NAD^+$  由  $NAD^+$  激酶先经磷酸化生成  $NADP^+$ , 再经  $NADP^+$ -依赖性脱氢酶(如乙醛脱氢酶 Ald4p/Ald5p, 苹果酸酶 Mae1p, 异柠檬酸脱氢酶

Ild1p)还原形成 NADPH<sup>[8]</sup>。而线粒体内只有一种  $NAD^+$  激酶和 NADH 激酶, 即 NAD(H)激酶 Pos5p, 它对于 NADPH 的供应有重要作用。POS5 基因的敲除使得细胞对氧化胁迫及高氧表现出强烈的敏感性<sup>[9]</sup>。而线粒体内直接行使抗氧化作用的酶主要有超氧化物歧化酶 Sod2p、GSH 过氧化物酶 Gpx1p、GSH 还原酶 Glr1p、TRX 还原酶 Trr2p 等以及硫氧还蛋白、谷氧还蛋白等蛋白质<sup>[1,9]</sup>。

为了了解 NAD(H)激酶与抗氧化系统之间的关系, 我们拟研究在不同类型的氧化胁迫试剂作用下, 野生型 BY4742、突变株 *pos5Δ* 及其回补体 *pos5Δ/POS5-YEp* 和几种抗氧化基因缺失体的生长表型, 并通过高效液相色谱(HPLC)对 BY4742、*pos5Δ* 及 *pos5Δ/POS5-YEp* 的胞内辅酶含量进行测定, 探究 Pos5p 对细胞抗氧化系统的作用。氧化胁迫试剂主要有超氧生成试剂(如甲萘醌、百草枯)、过氧化氢、GSH 消耗试剂(如马来酸二乙酯、二酰胺)等<sup>[1]</sup>。甲萘醌即 2-甲基-1,4-萘醌, 又称维生素  $K_3$  ( $VK_3$ ), 它是一种含有醌的物质, 进入细胞后, 经单电子还原成半醌自由基, 从而与  $O_2$  作用产生 $O_2^-$ <sup>[10]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基

YPD 培养基: 1%酵母抽提物, 2%胰蛋白胨, 2%葡萄糖, pH 5.0, 需要时添加 0.2 g/L G418。固体培养基加入 2%琼脂。

SD 培养基: 0.67%无氨基酸酵母氮基础(YNB), 2%葡萄糖, 加入相应的氨基酸, pH 5.0。固体培养基加入 2%琼脂。

氧化胁迫培养基: SD 加入  $VK_3$  (SD + 0.6 mmol/L  $VK_3$ 、SD + 1 mmol/L  $VK_3$ ), SD 加入  $H_2O_2$  (SD +

1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、SD + 2 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), SD 加入 DEM (SD + 2 mmol/L DEM、SD + 3 mmol/L DEM)。固体培养基加入 2%琼脂。

## 1.2 酿酒酵母菌株

本研究所用酿酒酵母菌株列于表 1。

## 1.3 抗氧化基因双缺失体的构建

抗氧化基因双缺失体 *sod2glr1Δ* 与 *trr2glr1Δ* 采用同源置换法构建<sup>[12]</sup>。以质粒 pFA6a-HIS3MX6(酿酒酵母基因敲除载体, *HIS3*, 氨基青霉素抗性)为模板, *Glr1hisf* (5'-GTATATATATCTATTTACATATTAGTTTACAGAACTTTATGCAGCTGAAGCTTCGTACG-3') 和 *Glr1hisrf* (5'-GTATAGCAACAGCAGATTGGACGTCTAGTTTCGTTGCTTCAATCGATGAATTCGAGCTC-3')为嵌合引物, 通过 PCR 扩增出两端分别带有 *GLR1* 基因上游和下游各约 40 bp 的嵌合 *HIS3* 基因(*glr1-HIS3*), 经纯化后分别转化 *sod2Δ* 和

*trr2Δ* 细胞, 以使 *HIS3* 基因置换 *sod2Δ* 和 *trr2Δ* 细胞染色体上的 *GLR1* 基因, 通过 SD (-His)平板筛选阳性转化体 *sod2glr1::HIS3* 或 *trr2glr1::HIS3*, 并经基因组 PCR 验证后得到双基因缺失体 *sod2glr1Δ* 和 *trr2glr1Δ*。

## 1.4 生长表型分析

野生型 BY4742、突变株 *pos5Δ*、回补体 *pos5Δ/POS5-YEp* 及几种抗氧化基因缺失体于 YPD 中 30°C 预培养, 以终浓度  $OD_{600} = 0.05$  转移至新鲜 YPD 中, 分别培养至对数期, 收集细胞并用无菌水洗涤 3 次后, 分别稀释至  $OD_{600}$  为 2.0、0.2、0.02。取稀释的细胞悬液 5 μL 分别滴于 SD、SD + 0.6 mmol/L VK<sub>3</sub>、SD + 1 mmol/L VK<sub>3</sub>、SD + 1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、SD + 2 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、SD + 2 mmol/L DEM、SD + 3 mmol/L DEM 平板, 置于 30°C 培养 3-5 d 后拍照记录<sup>[9]</sup>。

表 1 本研究中所用的酿酒酵母菌株  
Table 1 *S. cerevisiae* strains used in this study

菌株 Strains	基因型 Genotypes	来源 Sources
BY4742	<i>MATa leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1</i>	EUROSCARF
<i>pos5Δ</i>	<i>MATa leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 pos5::kanMX4</i>	EUROSCARF
<i>sod2Δ</i>	<i>MATa leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 sod2::kanMX4</i>	EUROSCARF
<i>glr1Δ</i>	<i>MATa leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 glr1::kanMX4</i>	EUROSCARF
<i>trr2Δ</i>	<i>MATa leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 trr2::kanMX4</i>	EUROSCARF
<i>sod2glr1Δ</i>	<i>MATa leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 sod2::kanMX4 glr1::HIS3</i>	This study
<i>trr2glr1Δ</i>	<i>MATa leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 trr2::kanMX4 glr1::HIS3</i>	This study
<i>pos5Δ/POS5-YEp</i>	<i>MATa leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 pos5::kanMX4; POS5-YEplac195</i>	Feng Shi <sup>[11]</sup>

## 1.5 细胞内辅酶含量分析

野生型 BY4742、突变株 *pos5Δ* 及回补体 *pos5Δ/POS5-YEp* 分别在 SD 培养基中培养至  $OD_{600} \approx 2.0-2.5$ , 各加入氧化胁迫因子(1 mmol/L VK<sub>3</sub> 或 2 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 或 2 mmol/L DEM)作用 2 h 后收集菌体, 冷冻干燥后置于 -70°C 冰箱中保存备用。

采用高效液相色谱(HPLC)测定 BY4742、*pos5Δ* 及 *pos5Δ/POS5-YEp* 的胞内辅酶(NAD<sup>+</sup>/NADH/NADP<sup>+</sup>/NADPH)含量<sup>[13-14]</sup>, 并以每毫升菌液每  $OD$  单位所含有的辅酶的 nmol 数表示。样品经超声处理, 所得滤液采用 Agilent 1200 高效液相色谱仪进样 10 μL 检测。色谱分析条件为: column stable-C18 反相柱(250 mm × 4.6 mm); 流动相: Buffer A 为 100% 100 mmol/L PBS pH 7.0, Buffer B 为 50% 100 mmol/L

PBS pH 7.0, 50%甲醇。梯度洗脱条件: 100% Buffer A 0 min, 70% Buffer A 11 min, 100% Buffer A 12 min, 100% Buffer A 15 min, 流速为 1 mL/min; 柱温为 35°C; 检测波长为 254 nm 和 340 nm。

## 2 结果与讨论

为了了解 NAD(H)激酶 Pos5p 在细胞抗氧化自我保护中的作用, 我们在外源添加氧化胁迫因子如 VK<sub>3</sub>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 DEM 时, 观察 BY4742、*pos5Δ* 及 *pos5Δ/POS5-YEp* 的生长表型并通过 HPLC 测定其胞内辅酶(NAD<sup>+</sup>/NADH/NADP<sup>+</sup>/NADPH)含量的变化。

### 2.1 NAD(H)激酶缺失体 *pos5Δ* 的氧化胁迫表型

各菌株在 SD 及 SD + 0.6 mmol/L VK<sub>3</sub>、SD +

1 mmol/L VK<sub>3</sub>、SD + 1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、SD + 2 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、SD + 2 mmol/L DEM 和 SD + 3 mmol/L DEM 平板中生长, 相比于野生型 BY4742, 线粒体 NAD(H) 激酶缺失体 *pos5Δ* 及回补体 *pos5Δ/POS5-YEp* 和几种抗氧化基因缺失体显示出不同的生长能力。

**2.1.1 甲萘醌(VK<sub>3</sub>)对 *pos5Δ* 的胁迫:** VK<sub>3</sub> 能够产生超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)诱导氧化胁迫。在添加 1 mmol/L VK<sub>3</sub> 时, 相对于 BY4742, *pos5Δ* 表现出明显的生长缺陷, 且 *pos5Δ/POS5-YEp* 有明显的补偿效果(图 1), 说明 Pos5p 对抵抗超氧生成试剂的胁迫具有一定的作用。*sod2Δ* 和 *sod2glr1Δ* 也表现出较严重的生长缺陷, 说明线粒体 SOD 的缺乏确实会导致细胞不能有效地清除·O<sub>2</sub><sup>-</sup>的胁迫。而 *glr1Δ* 和 *trr2glr1Δ* 仅有轻微的生长缺陷, *trr2Δ* 没有生长缺陷, 因此 Glr1p 和 Trr2p 对清除·O<sub>2</sub><sup>-</sup>的胁迫没有作用。

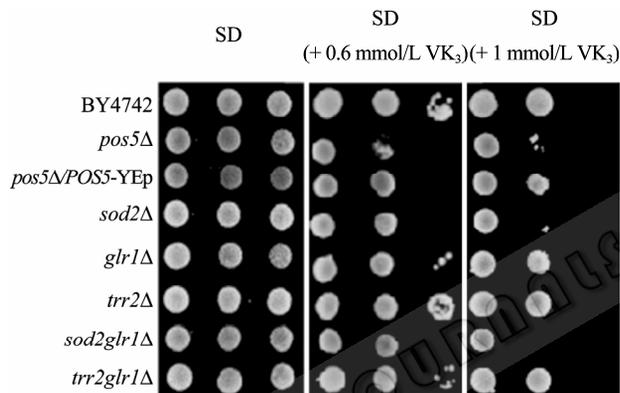


图 1 *pos5Δ* 与部分抗氧化基因缺失体对甲萘醌的敏感性比较

Fig. 1 The sensitivity of *pos5Δ* and some anti-oxidative gene mutants to menadione (VK<sub>3</sub>)

Note: BY4742, *pos5Δ* and other mutant cells that were cultivated in YPD medium to saturation were washed three times in sterilized water and diluted to OD<sub>600</sub> of 2.0, 0.2 and 0.02, then 5 μL of each cell suspension was spotted on SD, SD + 0.6 mmol/L VK<sub>3</sub> and SD + 1 mmol/L VK<sub>3</sub> solid media and were grown at 30°C for 3–5 days.

**2.1.2 过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)对 *pos5Δ* 的胁迫:** 在添加 1 mmol/L 或 2 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 时 BY4742 能够正常生长, 表明机体自身的抗氧化防御体系能够有效应对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的胁迫; *pos5Δ* 表现出严重的生长缺陷; *pos5Δ/POS5-YEp* 虽然在 2 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在时也表现出同样严重的生长缺陷, 但对 1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的耐受能力明显增强(图 2), 表明 Pos5p 对清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的胁迫有一定的作用。而抗氧化基因单缺失体 *glr1Δ* 只有轻微的生长缺陷, 双缺失体 *sod2glr1Δ* 和 *trr2glr1Δ* 才表现出与 *pos5Δ* 接近的生长缺陷, 表明

细胞自我防御体系的 2 种抗氧化酶同时缺失后细胞才会产生明显的损伤, 而 *POS5* 单个基因的缺失就会对细胞造成严重的氧化损伤。

**2.1.3 马来酸二乙酯(DEM)对 *pos5Δ* 的胁迫:** DEM 是一种 GSH 消耗试剂, 可与 GSH 结合并使其浓度降低, 削弱 GSH 的抗氧化功能而引起氧化胁迫<sup>[15–16]</sup>。在添加 3 mmol/L DEM 时, 相对于 BY4742, *pos5Δ* 表现出一定程度的生长缺陷, 而 *pos5Δ/POS5-YEp* 的生长缺陷没有减弱(图 3), 表明 *POS5* 虽然为细胞抵抗 DEM 胁迫所需, 但利用质粒表达 *POS5* 基因并未起到明显的回补作用。而抗氧化基因缺失体 *sod2Δ* 及 *sod2glr1Δ* 表现出严重的生长缺陷, 甚至在

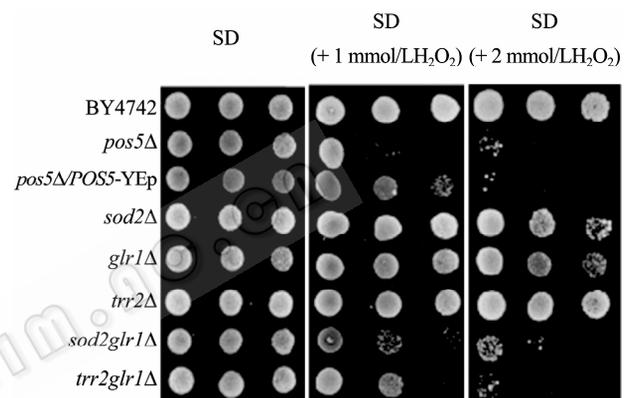


图 2 *pos5Δ* 与部分抗氧化基因缺失体对过氧化氢的敏感性比较

Fig. 2 the sensitivity of *pos5Δ* and some anti-oxidative gene mutants to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Note: BY4742, *pos5Δ* and other mutants were treated as described in Fig.1 and spotted on SD, SD + 1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and SD + 2 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solid media.

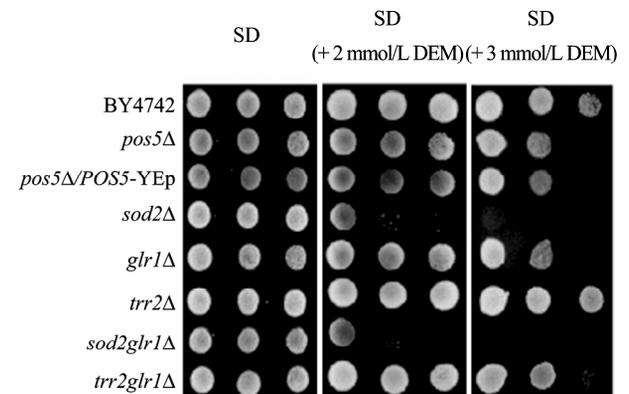


图 3 *pos5Δ* 与部分抗氧化基因缺失体对马来酸二乙酯的敏感性比较

Fig. 3 the sensitivity of *pos5Δ* and some anti-oxidative gene mutants to diethyl maleate (DEM)

Note: BY4742, *pos5Δ* and other mutants were treated as described in Fig. 1 and spotted on SD, SD + 2 mmol/L DEM and SD + 3 mmol/L DEM solid media.

添加 2 mmol/L DEM 时也出现明显的生长缺陷; *glr1Δ*、*trr2glr1Δ* 只有在 3 mmol/L DEM 存在时才表现出与 *pos5Δ* 相似的生长缺陷, *trr2Δ* 没有生长缺陷, 因此抗氧化基因 *SOD2*、其次是 *GLR1* 为细胞抵抗 DEM 胁迫所需。

总之, 与野生型 BY4742 相比, 只有 *pos5Δ* 在 3 种不同类型的氧化胁迫因子(VK<sub>3</sub>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 DEM)存在时均表现出生长缺陷, 其回补体 *pos5Δ/POS5-YEp* 在 VK<sub>3</sub> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在时生长缺陷有一定程度的减弱, 而在 DEM 存在时没有减弱, 表明质粒携带的 *POS5* 基因对 *pos5Δ* 的抗氧化缺陷有一定的回补功效。然而, 几种抗氧化基因缺失体只在其相应的胁迫因子作用下才表现出一定的生长缺陷, 双基因缺失体的生长缺陷相对更为严重。这表明 Pos5p 虽然不是酶促抗氧化体系和非酶抗氧化体系的成员, 它却在细胞抗氧化系统中起到重要作用。为了了解 Pos5p 的广泛抗氧化胁迫作用是否与它对辅酶 NAD(H)和 NADP(H)的转换及 NADPH 的供应有关, 我们对 BY4742、*pos5Δ* 及 *pos5Δ/POS5-YEp* 的胞内辅酶含量进行了测定。

## 2.2 氧化胁迫下 NAD(H)激酶缺失体 *pos5Δ* 的胞内辅酶含量变化

我们采用 HPLC 测定了野生型 BY4742、突变株 *pos5Δ* 及回补体 *pos5Δ/POS5-YEp* 在 SD 及加入各种氧化胁迫(1 mmol/L VK<sub>3</sub> 或 2 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 或 2 mmol/L DEM)的 SD 培养基中生长时胞内辅酶含量, 以了解 *POS5* 基因及不同类型氧化胁迫因子对酿酒酵母胞内辅酶含量的影响。

### 2.2.1 *pos5Δ* 与抗氧化基因双缺失体在正常生长条件下的胞内辅酶含量:

在正常生长条件下, BY4742、*pos5Δ*、*pos5Δ/POS5-YEp* 以及 2 种抗氧化基因双缺失体 *sod2glr1Δ*、*trr2glr1Δ* 的胞内辅酶含量见表 2。

表 2 野生型与不同突变菌株的胞内辅酶含量  
Table 2 Coenzyme content of wild-type and mutant cells

菌株 Strains	NAD <sup>+</sup>	NADH	NADP <sup>+</sup>	NADPH	NADP <sup>+</sup> + NADPH	
					NAD <sup>+</sup> + NADH	
BY4742	2.216	0.035	0.937	0.007	0.42	
<i>pos5Δ</i>	2.057	0.038	1.125	-	0.54	
<i>pos5Δ/POS5-YEp</i>	2.223	0.020	1.023	0.075	0.49	
<i>sod2glr1Δ</i>	1.911	0.015	0.931	0.015	0.49	
<i>trr2glr1Δ</i>	1.591	0.177	0.961	0.018	0.55	

注: 结果取 3 次试验的平均值; -: 检测不出。

Note: Averages of three independent experiments are provided; -: Can not determined.

与 BY4742 相比, *pos5Δ* 的 NADPH 含量降低至检测不出, *pos5Δ/POS5-YEp* 则有显著的提升, 说明在正常生长条件下, Pos5p 的存在能够提高胞内 NADPH 供应水平, Pos5p 在胞内表现出 NADH 激酶活性。相对于 BY4742, *pos5Δ* 的 NADP<sup>+</sup>含量明显升高, 导致辅酶 II/I[(NADP<sup>+</sup> + NADPH)/(NAD<sup>+</sup> + NADH)]比率随之升高, 而 *pos5Δ/POS5-YEp* 的 NADP<sup>+</sup>和 NADPH 含量都明显升高, 辅酶 II/I 比率也提高。说明在正常生长条件下, *POS5* 基因的缺失并没有降低细胞内的 NAD<sup>+</sup>激酶活性, 推测细胞内另两种 NAD(H)激酶 Utr1p 和 Yef1p<sup>[9]</sup>在 Pos5p 缺乏时表现出更强的 NAD<sup>+</sup>激酶活性, 以补充辅酶 II 的供应; 而 *POS5* 基因的过量表达提高了胞内 NAD(H)激酶活性。

抗氧化基因双缺失体 *sod2glr1Δ* 与 *trr2glr1Δ* 的 NADP<sup>+</sup>和 NADPH 含量虽然均与 BY4742 相当, 但 NAD<sup>+</sup>和 NADH 含量降低, 导致辅酶 II/I 比率明显提高, 说明胞内 NAD(H)转变为 NADP(H)的作用加强, 推测抗氧化双基因的缺失导致的氧化压力可能诱导 Pos5p 的 NAD(H)激酶活性增强, 使胞内更多的辅酶 I 转变成辅酶 II, 以弥补机体抗氧化系统出现功能障碍时对 NADPH 的更高需求。

### 2.2.2 甲萘醌(VK<sub>3</sub>)胁迫下 *pos5Δ* 的胞内辅酶含量:

经 1 mmol/L VK<sub>3</sub> 胁迫后, BY4742 和 *pos5Δ* 的 NADPH 含量均低至检测不出, *pos5Δ/POS5-YEp* 的 NADPH 含量明显高于前两者(表 3), 表明此时 *POS5* 基因的过量表达有助于提高胞内 NADPH 供应水平, 这与 *pos5Δ/POS5-YEp* 对 VK<sub>3</sub> 的耐受能力强于 *pos5Δ* 相一致(图 1)。与 BY4742 相比, *pos5Δ* 的辅酶 II/I 比率明显降低, 而 *pos5Δ/POS5-YEp* 则有明显升高(表 3), 说明在 VK<sub>3</sub> 存在时 Pos5p 依然能有效地将辅酶 NAD(H)转换成 NADP(H)。

表 3 甲萘醌胁迫下 *pos5Δ* 的胞内辅酶含量  
Table 3 Coenzyme content of *pos5Δ* under exposure to menadione

菌株 Strains	NAD <sup>+</sup>	NADH	NADP <sup>+</sup>	NADPH	NADP <sup>+</sup> + NADPH	
					NAD <sup>+</sup> + NADH	
BY4742	1.982	0.019	0.775	-	0.39	
<i>pos5Δ</i>	1.801	0.715	0.834	-	0.33	
<i>pos5Δ/POS5-YEp</i>	1.928	0.034	0.777	0.061	0.43	

注: 结果取 3 次试验的平均值; -: 检测不出。

Note: Averages of three independent experiments are provided; -: Can not determined.

与正常生长环境相比(表 2), 在 VK<sub>3</sub> 胁迫下, BY4742、*pos5Δ* 及 *pos5Δ/POS5-YEp* 的 NADP<sup>+</sup>、NADPH 和辅酶 II/I 均有不同程度的下降, 其中以 *pos5Δ* 的辅酶 II/I 比率下降最为显著(表 3), 这与细胞在抵抗 VK<sub>3</sub> 胁迫时对辅酶 II 的消耗增加相吻合。

**2.2.3 过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)胁迫下 *pos5Δ* 的胞内辅酶含量:** 经 2 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 胁迫后, BY4742 和 *pos5Δ* 的 NADPH 含量均低至检测不出, *pos5Δ/POS5-YEp* 则略高于前两者(表 4), 表明在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在时过量的 Pos5p 有助于维持胞内 NADPH 供应水平, 缓解 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 胁迫损伤(图 2)。与 BY4742 相比, *pos5Δ* 的辅酶 II/I 比率略低, *pos5Δ/POS5-YEp* 则有一定的提升, 说明在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 胁迫下 Pos5p 仍能有效地行使 NAD(H) 激酶活性。

表 4 过氧化氢胁迫下 *pos5Δ* 的胞内辅酶含量  
Table 4 Coenzyme content of *pos5Δ* under exposure to hydrogen peroxide

菌株 Strains	NAD <sup>+</sup>	NADH	NADP <sup>+</sup>	NADPH	$\frac{\text{NADP}^+ + \text{NADPH}}{\text{NAD}^+ + \text{NADH}}$
BY4742	2.529	0.009	0.525	-	0.21
<i>pos5Δ</i>	3.024	0.073	0.587	-	0.19
<i>pos5Δ/POS5-YEp</i>	1.558	0.411	0.469	0.013	0.25

注: 结果取 3 次试验的平均值; -: 检测不出。

Note: Averages of three independent experiments are provided; -: Can not determined.

与正常生长环境相比(表 2), 在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 胁迫下, BY4742、*pos5Δ* 及 *pos5Δ/POS5-YEp* 的 NADP<sup>+</sup>、NADPH 和辅酶 II/I 均有下降, 且下降幅度较大, 其中也以 *pos5Δ* 的辅酶 II/I 比率下降最为明显, 说明细胞在抵抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 胁迫时辅酶 II 的消耗非常严重, 即便在含有 NAD(H) 激酶的 BY4742 和 *pos5Δ/POS5-YEp* 中也是如此, 而缺乏 NAD(H) 激酶的 *pos5Δ* 尤为严重。

**2.2.4 马来酸二乙酯(DEM)胁迫下 *pos5Δ* 的胞内辅酶含量:** 经 2 mmol/L DEM 胁迫后, BY4742、*pos5Δ* 及 *pos5Δ/POS5-YEp* 的 NADPH 含量均低至检测不出(表 5), 这与 *pos5Δ/POS5-YEp* 在 DEM 胁迫下并未显示出生长缺陷缓解相一致(图 3)。与 BY4742 相比, *pos5Δ* 和 *pos5Δ/POS5-YEp* 的辅酶 II/I 比率均上升, 说明在 DEM 胁迫下 *POS5* 基因的缺失并没有降低细胞内的总 NAD<sup>+</sup> 激酶活性, 而其过量表达提高了细胞内的总 NAD<sup>+</sup> 激酶活性。

表 5 马来酸二乙酯胁迫下 *pos5Δ* 的胞内辅酶含量  
Table 5 Coenzyme content of *pos5Δ* under exposure to diethyl maleate

菌株 Strains	NAD <sup>+</sup>	NADH	NADP <sup>+</sup>	NADPH	$\frac{\text{NADP}^+ + \text{NADPH}}{\text{NAD}^+ + \text{NADH}}$
BY4742	2.053	-	0.778	-	0.38
<i>pos5Δ</i>	1.852	-	0.766	-	0.41
<i>pos5Δ/POS5-YEp</i>	1.763	-	0.864	-	0.49

注: 结果取 3 次试验的平均值; -: 检测不出。

Note: Averages of three independent experiments are provided; -: Can not determined.

与正常生长环境相比(表 2), 在 DEM 胁迫下, BY4742、*pos5Δ* 及 *pos5Δ/POS5-YEp* 的 NADP<sup>+</sup> 含量均有下降, NADPH 含量均低至检测不出(表 5), 这与 DEM 胁迫下由 GSH 的大量消耗而导致的 NADPH 严重损耗相一致。BY4742 和 *pos5Δ* 的辅酶 II/I 比率下降, *pos5Δ/POS5-YEp* 则保持不变, 说明在 DEM 胁迫下, 细胞对辅酶 II 的消耗虽然也增加, 但回补体能有效地维持辅酶 I 和辅酶 II 的平衡。

总之, 在正常生长条件下, 与 BY4742 相比, *POS5* 基因的敲除致使细胞内 NADPH 含量降低, *pos5Δ/POS5-YEp* 则提高, 表明线粒体 NAD(H) 激酶 Pos5p 对细胞内 NADPH 的供应有重要作用。在氧化胁迫因子 VK<sub>3</sub>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 DEM 作用下, BY4742、*pos5Δ* 及 *pos5Δ/POS5-YEp* 的 NADP<sup>+</sup> 和 NADPH 含量均有不同程度下降, 辅酶 II/I (除 DEM 胁迫下 *pos5Δ/POS5-YEp* 外)也都呈现出不同程度的下降, 说明氧化胁迫下细胞对辅酶 II 的消耗增加; 而在 3 种菌株中, *pos5Δ* 的辅酶 II/I 比率下降最为严重, *pos5Δ/POS5-YEp* 较 *pos5Δ* 有明显提高, 这表明在不同类型的氧化胁迫下 Pos5p 均能发挥其 NAD(H) 激酶活性, 从而对抵抗氧化胁迫起重要作用。

### 3 结论

酿酒酵母既是一种重要的工业应用微生物, 也是一种典型的模式微生物。本文中我们通过研究野生型和突变型酿酒酵母的氧化胁迫生长表型, 证实线粒体 NAD(H) 激酶对抵抗 3 种不同类型的氧化胁迫因子(VK<sub>3</sub>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 DEM)均有明显的作用; 而几种抗氧化基因缺失体只在其相应的胁迫因子作用下才表现出一定的生长缺陷, 因此 Pos5p 对细胞抗氧化系统具有重要的作用。同时通过辅酶含量的测定证实, Pos5p 确实对胞内 NADPH 的供应有着重要作

用,而在VK<sub>3</sub>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和DEM胁迫下,Pos5p通过发挥其NAD(H)激酶活性,有效地完成NAD(H)向NADP(H)的转换,补充细胞在氧化胁迫下所消耗的NADP(H)。因此,Pos5p对细胞抵抗不同类型的氧化胁迫都能起到保护作用。这将有助于我们全面了解酿酒酵母的抗氧化机制,以便更好地改进其抗氧化性能。

## 参考文献

- [1] Hohmann S, Mager WH, eds. Yeast Stress Responses. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2003: 241–256.
- [2] Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 2003, **552**(2): 335–344.
- [3] Poyton RO, Ball KA, Castello PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2009, **20**(7): 332–340.
- [4] Kreiner M, Harvey LM, McNeil B. Oxidative stress response of a recombinant *Aspergillus niger* to exogenous menadione and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, **30**(3): 346–353.
- [5] Waldbaum S, Patel M. Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research*, 2010, **88**(1): 23–45.
- [6] Jamieson DJ. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1998, **14**(16): 1511–1527.
- [7] Chiou TJ, Tzeng WF. The roles of glutathione and antioxidant enzymes in menadione-induced oxidative stress. *Toxicology*, 2000, **154**(1/3): 75–84.
- [8] Miyagi H, Kawai S, Murata K. Two sources of mitochondrial NADPH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2009, **284**(12): 7553–7560.
- [9] Outten CE, Culotta VC. A novel NADH kinase is the mitochondrial source of NADPH in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 2003, **22**(9): 2015–2024.
- [10] 王明星, 李寅, 方芳, 等. 添加甲萘醌促进嗜热子囊菌合成过氧化氢酶. *过程工程学报*, 2005, **5**(3): 337–340.
- [11] Shi F, Kawai S, Mori S, et al. Identification of ATP-NADH kinase isozymes and their contribution to supply of NADP(H) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS*, 2005, **272**(13): 3337–3349.
- [12] Wach A, Brachat A, Alberti-Segui C, et al. Heterologous *HIS3* marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1997, **13**(11): 1065–1075.
- [13] Liu L, Li Y, Du G, et al. Redirection of the NADH oxidation pathway in *Torulopsis glabrata* leads to an enhanced pyruvate production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **72**(2): 377–385.
- [14] 洪平, 刘虎威, 靳光华, 等. 高效液相色谱法测定骨骼肌 ATP, ADP, AMP, NAD<sup>+</sup>, NADH 含量. *中国运动医学杂志*, 2002, **21**(1): 57–60.
- [15] 程时, 丁海勤. 谷胱甘肽及其抗氧化作用今日谈. *生理科学进展*, 2002, **33**(1): 85–90.
- [16] Nguyen-nhu NT, Knoops B. Alkyl hydroperoxide reductase 1 protects *Saccharomyces cerevisiae* against metal ion toxicity and glutathione depletion. *Toxicology Letters*, 2002, **135**(3): 219–228.

## 稿件书写规范

### 论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定,计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体),不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下,希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N(当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD(斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如:  $t(h)$  (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 跟数字之间加一空格(%除外), 例如: 20 cm × 0.3 cm, 不能写成 20 × 0.3 cm; 3°C–5 °C 不可写成 3–5 °C; 3%–6%不可写成 3–6%等。