

转新疆雪莲去饱和酶基因 *sikSAD* 重组 酵母低温和酒精耐受性分析

程晨 郭新勇 王爱英 祝建波*

(石河子大学 生命科学学院 农业生物技术重点实验室 新疆 石河子 832003)

摘要: 根据 GenBank 收录的 *sikSAD* 基因序列, 采用反转录 PCR 技术从新疆雪莲(*Sasussured involucrata Kar. et Kir*)中克隆了 *sikSAD* 基因, 并构建了 pYES2-*sikSAD* 大肠杆菌/酵母穿梭表达载体, 通过电击法转化酿酒酵母 S288C 菌株, 并利用 PCR 和 SDS-PAGE 对转化酿酒酵母进行鉴定, 最后通过低温胁迫和酒精胁迫进行抗性初步分析及方差分析。结果表明: 低温胁迫实验中, 转 *sikSAD* 基因酿酒酵母在低温条件下仍能存活, 并且在温度恢复到 28 °C 时能迅速生长, 生长状态良好, 不饱和脂肪酸油酸的含量有明显的变化。酒精胁迫实验中, 其能耐受一定浓度的酒精, 并且耐受能力比非转基因酿酒酵母提高了十几个百分点。可见, 在低温胁迫和高浓度酒精条件下, 转新疆雪莲 *sikSAD* 基因酿酒酵母表现出了优良的活性和生长优势, 显示出较强的抗性特征, 用分子手段改造酿酒酵母, 为工业生产提供高质量的酿酒酵母奠定实验基础。

关键词: *SAD*, 酿酒酵母, 低温, 酒精耐受

Low temperature and alcohol tolerance traits of the recombinant yeast with *Sasussured involucrata Kar. et Kir* de-saturase *sikSAD*

CHENG Chen GUO Xin-Yong WANG Ai-Ying ZHU Jian-Bo*

(Laboratory of Agricultural Biotechnology, College of Life Science of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China)

Abstract: According to the sequence of *sikSAD* gene from GenBank, we cloned *sikSAD* gene from *Sasussured involucrata Kar. et Kir* though RT-PCR, and constructed the recombinant *E. coli*/Yeast shuttle vector pYES2-*sikSAD*. Then it was transformed into S288C yeast by electroportion method, PCR and SDS-PAGE analysis indicated that *sikSAD* had been integrated into the genome. That the recombi-

nant vector had been transformed into yeast. Finally, we made preliminary analysis on the resistance and analysis of variance under low temperature stress and ethanol tolerance. The results suggest that the recombinant yeast pYES2-*sikSAD* can not only survive in low temperature but also grow well at 28 °C in the experiment of low temperature stress, the percentage of oleic acid have obvious change. In the experiment of ethanol tolerance, the recombinant yeast pYES2-*sikSAD* can tolerant certain concentration of ethanol, also the ability of tolerance increased more than 10 percentage compared with non-transformed yeast. The above testify that the recombinant yeast pYES2-*sikSAD* have more tolerance and excellent activity and growth advantage under the low temperature and high ethanol. This experiment using molecular technology to reconstruct yeast which can provide the basement for producing *Saccharomyces cerevisiae* with higher quality in industry.

Keywords: *SAD*, *Saccharomyces cerevisiae*, Low temperature, Ethanol tolerance

据研究,世界上大多数植物都存在 Δ^9 硬脂酰-ACP去饱和酶(Stearoyl-ACP desaturase, SAD), SAD是不饱和脂肪酸合成代谢过程中的关键酶^[1],并在脂肪酸饱和度调控中起关键作用。SAD催化反应是在第9-10碳原子之间形成第一个双键,为不饱和脂肪酸生物合成过程的第一步脱饱和,直接调控膜脂与贮脂中饱和与不饱和脂肪酸的比例^[2]。随着生物技术和植物抗寒工程的发展,有关SAD硬脂酰脱饱和酶的研究越来越深入。有关研究表明SAD硬脂酰去饱和酶可以直接改变膜脂中不饱和脂肪酸的含量,并与植物的抗寒性存在明显的正相关关系^[3]。目前已经从蓖麻、大红花、黄瓜、油菜、菠菜、芜菁、马铃薯、亚麻葡萄和芝麻等多种植物中克隆得到SAD的cDNA片段。Kodama等^[4]将酵母的SAD基因编码的硬脂酰辅酶A去饱和酶导入烟草,研究人员将菠菜的SAD基因导入烟草^[5],可提高烟草的抗冻力。刘丹等^[5]将SAD基因正向或反向插入到植物转化载体pBI121中,对转基因烟草的抗寒性分析表明,正向表达SAD基因的转基因烟草抗寒性明显增强;反向表达SAD基因的转基因烟草抗寒性明显减弱。从以上研究得出,SAD基因具有提高植物抗寒性的功能。那么,SAD基因是否能对酿酒酵母起到类似的作用,也是一个值得深入研究的问题。

酿酒酵母菌作为真核模式生物和传统乙醇代谢菌备受研究者的青睐。酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)是一种革兰氏染色呈阳性的酵母样真菌,有酒酿气味^[6],单细胞生物,最适生长温度

25 °C-30 °C,兼性厌氧型^[7]具有易培养、生长代谢速度快、兼性生长、单双倍体、生命周期适中等特性^[8]。酿酒酵母与其他研究对象相比具有以下优势:遗传背景清楚^[9],具有模式生物的特性^[8],具备高效的体内重组特性^[10],酿酒酵母基因组测序已经完成^[11]。这些特性使酿酒酵母的基因工程和遗传学研究变得更为方便有利。

本实验从酿酒酵母S288C菌株入手,运用分子生物学手段将新疆雪莲*sikSAD*基因克隆至酵母/大肠杆菌穿梭表达载体pYES2中,并转化入酵母,并进行低温胁迫和酒精胁迫实验,初步分析转*sikSAD*基因酵母的低温抗性机制。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

本试验所用大肠杆菌DH5 α 、酵母/大肠杆菌穿梭载体pYES2、酿酒酵母S288C菌株均保存于本实验室。植物材料为新疆雪莲组培苗。*Xho* I、*Hind* III、*Nhe* I、T4 ligase和*Taq*酶均购于宝生生物工程技术有限公司; pGM-T载体购于北京天为时代公司; DNA琼脂糖凝胶回收试剂盒购于北京百泰克公司。培养基为酵母菌尿嘧啶合成缺陷型培养基SD-URA培养基含培养酿酒酵母最适条件为28 °C-30 °C恒温培养^[12]。

1.2 *sikSAD* 基因的获得

取无菌培养的新疆雪莲幼苗叶片0.5 g,采用

TRNzol 总 RNA 提取试剂提取雪莲总 RNA 并反转录^[13]成 cDNA。根据 GenBank 收录的 *sikSAD* 基因序列(登录号为 DQ516384), 利用 Premier 5.0 设计 PCR 特异性引物。*sikSAD* 上游: 5'-AAGCTTAACAATGGCTCTTCGGAT-3' (*Hind* III); *sikSAD* 下游: 5'-CTCGAGTTCAGAGCTTCACCTGTCTAT-3' (*Xho* I)。

通过 PCR 扩增得到 *sikSAD* 基因。反应体系: cDNA 0.5 μ L, 10 \times *Taq* buffer 2 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.2 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 0.5 μ L, 上下游引物(10 pmol/L)各 0.5 μ L, ddH₂O 补足至 20 μ L; 反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 10 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。扩增完毕, 用电泳检测后回收目的片段并纯化。将目的片段连接 PGM-T 载体, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞^[14]。在含有氨苄青霉素(Amp)的 LB 平板上挑选菌落, 碱裂解法小量提取质粒^[15], 用 *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 检测正确的重组质粒命名为 pGM-T-*sikSAD*, 送交北京华大基因测序。

1.3 *sikSAD* 酵母/大肠杆菌穿梭表达载体 pYES2-*sikSAD* 的构建

提取 pGM-T-*sikSAD* 和酵母/大肠杆菌穿梭表达载体 pYES2, 用 *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切对其进行双酶切, 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测, 回收。将从重组 T 载体上切下的经回收的目的片段和经双酶切回收的载体 pYES2 片段 4 $^{\circ}$ C 连接后转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取白色菌落, 于 37 $^{\circ}$ C 摇菌, 提取质粒, PCR 和酶切鉴定。

1.4 重组穿梭载体 pYES2-*sikSAD* 转入酿酒酵母 S288C 菌株

将鉴定正确并已经线性化的 pYES2-*sikSAD* 质粒用电击法^[16]转入酿酒酵母 S288C 菌株。挑取重组酵母单菌落, 接种至 SD-URA 培养基中, 28 $^{\circ}$ C 培养过夜。用三冻三溶法提取酵母 DNA 并以此为模板进行 PCR 鉴定, 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测结果。提取重组酵母总蛋白, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 保留上清, 取少量进行 SDS-PAGE 分析。

1.5 pYES2-*sikSAD* 重组酵母对低温胁迫的抗性分析及脂肪酸含量测定

在无菌条件下, 挑取转 pYES2-*sikSAD* 和

pYES2 酵母单菌落, 接种 SD-URA 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养 20 h 左右。然后以 1%比例 28 $^{\circ}$ C 活化 3-4 h, 使用细胞计数器计算菌液中酵母数量, 使在 1 mL 的培养基中, 菌的数量达到一致。将上述菌体 OD 值为 0.4 左右, 依次稀释至 10⁵、10⁴、10³、10²、10¹ 倍后用移液器各吸 1 μ L 于 SD-URA 固体培养基上: 于 28 $^{\circ}$ C 过夜培养后观察; 20 $^{\circ}$ C、10 $^{\circ}$ C 过夜培养后均于 28 $^{\circ}$ C 恢复 24 h 后观察; 4 $^{\circ}$ C 培养 3-4 周后 28 $^{\circ}$ C 过夜恢复培养后观察。观察比较其形态差异。

取 28 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C、10 $^{\circ}$ C、4 $^{\circ}$ C 低温过夜培养后的转 pYES2-*sikSAD* 和 pYES2 酵母, 超声处理 30 min 后, 用乙醚-石油醚法提取脂肪酸。送至新疆农垦科学院分析测试中心测定。

1.6 pYES2-*sikSAD* 重组酵母对酒精胁迫的抗性分析及方差分析

将空载酵母和重组酵母的数目调至 OD 值为 0.4。将上述菌体接种于含有 0、5%、10%、15%、20%酒精的 1 mL 液体 SD-URA 培养基中, 重组酵母设计 3 个重复。28 $^{\circ}$ C 培养 4-5 h, 后将上述菌体 100 μ L 涂布于 SD-URA 固体培养基上, 28 $^{\circ}$ C、24 h 培养, 观察重组酵母和空载酵母存活的菌数并比较形态差异。利用 SPSS16.0 统计软件, 分析 15%-20%酒精度间菌落数量有无显著差异; 分析 0-20%酒精浓度间菌落直径有无显著差异。

2 结果与分析

2.1 *sikSAD* 基因的获得

将提取雪莲总 RNA, 经 RT-PCR 后得到产物与 pGM-T 载体连接, 转化大肠杆菌, 提取质粒, 经 PCR 和酶切鉴定, 均能得到一条约 1 197 bp 的条带, 与预期片段大小一致。此外上海生工的测序结果也与前期预测的测序结果完全一致。表明目的基因已成功构建到 pGM-T 载体上, 并成功转入了大肠杆菌。

2.2 *sikSAD* 酵母/大肠杆菌穿梭表达载体 pYES2-*sikSAD* 的构建

提取 pGM-T-*sikSAD* 重组质粒及 pYES2 载体

质粒用 *Hind* III、*Xho* I 双酶切后进行连接后进行 PCR 和酶切鉴定。如图 1、2 所示, PCR 和酶切都显示 1 197 bp 产物大小条带, 说明已成功构建 pYES2-*sikSAD* 表达载体。

2.3 重组穿梭载体 pYES2-*sikSAD* 转入酿酒酵母 S288C 菌株

Nhe I 单酶切经过鉴定的 pYES2-*sikSAD* 重组质粒及 pYES2 穿梭载体, 得目的大小约 4 535 bp

的条带(pYES2-*sikSAD* 重组质粒)以及一条大小约为 6 000 bp 的条带(pYES2) (图 3), 与我们想要得到的目的条带一致, 将重组载体及空载完全线性化以便于电转化酵母 S288C。用特异性引物对转基因酵母单克隆进行筛选鉴定(图 4)。对筛选出的重组酵母提取总蛋白, 进行 SDS-PAGE 电泳(图 5), 可见在重组酵母的上清和沉淀中均有 45.02 kD 左右的蛋白条带, 可说明 *sikSAD* 已在酵母中正常表达。

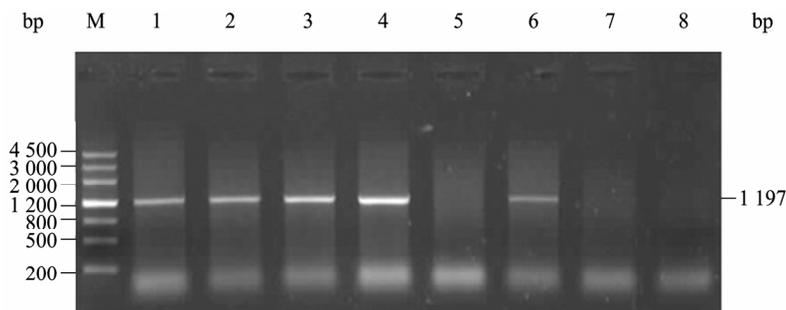


图 1 pGM-T-*sikSAD* PCR 鉴定

Fig. 1 PCR identification of pGM-T-*sikSAD*

注: M: Marker III; 1-7: pGM-T-*sikSAD*; 8: 阴性对照.

Note: M: Marker III; 1-7: pGM-T-*sikSAD*; 8: Negative control.

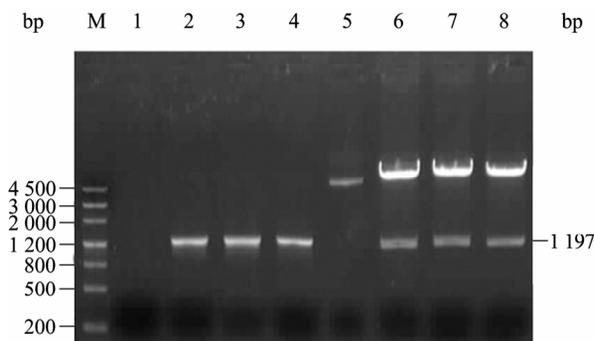


图 2 pYES2-*sikSAD* 大肠杆菌/酵母穿梭表达载体的 PCR 和酶切鉴定

Fig. 2 PCR and restriction enzyme digestion of the recombinant pYES2-*sikSAD*

注: M: Marker III; 1: 阴性对照; 2-4: PCR 产物; 5: 质粒对照; 6-8: 质粒酶切.

Note: M: Marker III; 1: negative control; 2-4: PCR product of *sikSAD*; 5: pYES2-*sikSAD* plasmid; 6-8: The digestion of pYES2-*sikSAD* plasmid.

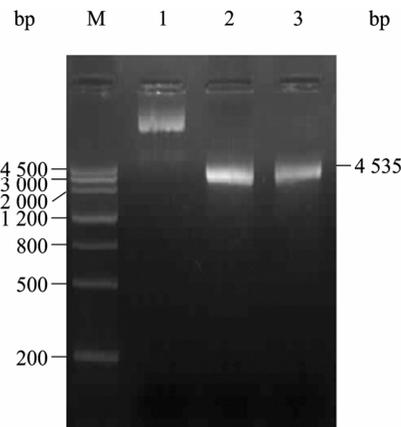


图 3 pYES2-*sikSAD* 重组质粒及空载的单酶切线性化

Fig. 3 Restriction enzyme *Nhe* I digestion of the recombinant pYES2-*sikSAD* and pYES2

注: M: Marker III; 1: pYES2 线性化酶切; 2-3: pYES2-*sikSAD* 重组质粒线性化酶切.

Note: M: Marker III; 1: pYES2 plasmid; 2-3: pYES2-*sikSAD* plasmid.

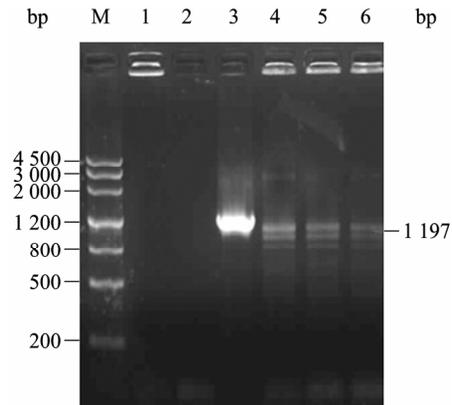


图 4 转基因酵母 PCR 鉴定

Fig. 4 PCR detection of the transgenic yeast

注: M: Marker III; 1: PCR 阴性对照; 2: pYES2 空载体对照; 3: *sikSAD* 阳性对照; 4-6: 转 pYES2-*sikSAD* 的 S288C 酵母.

Note: M: Marker III; 1: Negative control; 2: pYES2 plasmid; 3: *sikSAD* plamid control; 4-6: pYES2-*sikSAD* transgenic yeast of S288C.

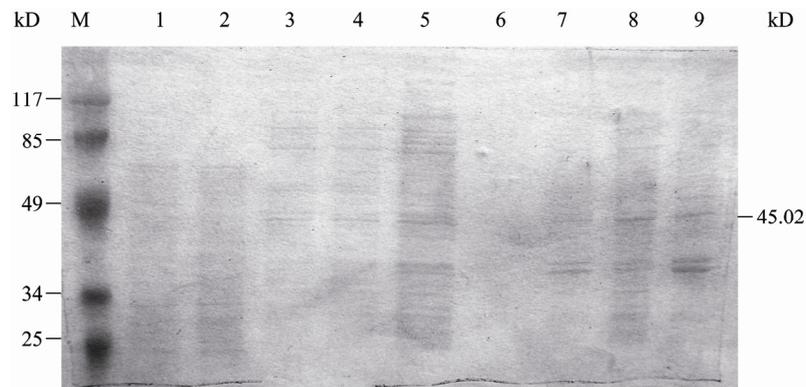
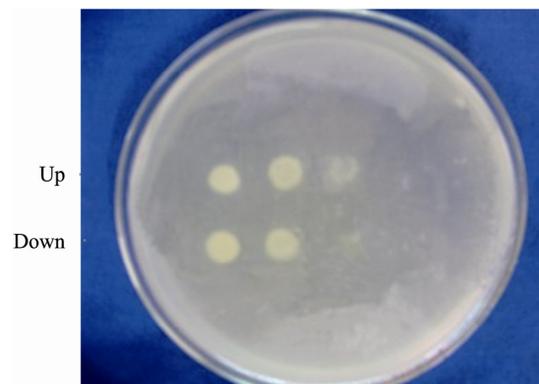
图 5 pYES2-*sikSAD* 重组酵母提取蛋白进行 SDS 电泳检测

Fig. 5 SDS-PAGE analyses of transgenic yeast

注: M: 蛋白预染 Marker II; 1,2: pYES2 空载酵母上清; 3-5: pYES2-*sikSAD* 重组酵母上清; 6: pYES2 空载酵母沉淀; 7-9: pYES2-*sikSAD* 重组酵母沉淀.

Note: M: Protein marker II; 1-2: pYES2 transgenic yeast; 3-5: pYES2-*sikSAD* transgenic yeast; 6: Sedimentation of pYES2 transgenic yeast; 7-9: Sedimentation of pYES2-*sikSAD* transgenic yeast.

图 6 转 pYES2-*sikSAD* 大肠杆菌/酵母穿梭表达载体和转 pYES2 大肠杆菌/酵母穿梭表达载体酵母的 28 °C 过夜培养Fig. 6 Growth of pYES2- *sikSAD* and pYES2 recombinant in 28 °C

注: 上: 转 pYES2-*sikSAD* 大肠杆菌/酵母穿梭表达载体的酵母; 下: 转 pYES2 大肠杆菌/酵母穿梭表达空载体的酵母.

Note: Up: pYES2-*sikSAD* transgenic yeast; Down: pYES2 transgenic yeast.

2.4 pYES2-*sikSAD* 重组酵母对低温胁迫的抗性分析

酿酒酵母的最适生长温度为 28 °C, 从图 6 中可以看出, 在 28 °C 培养时, 重组酵母和空载酵母的生长速度和菌落形态几乎没有差别。而在低于酿酒酵母最适生长温度的 20 °C 及 10 °C 生长条件下, 转 *sikSAD* 基因的酵母和转 pYES2 空载体的酵母, 在细胞生长活性上表现出明显的差异。转 *sikSAD* 基因的酵母明显比转 pYES2 空载体的酵母活性高, 生长状态好。20 °C、培养 24 h 后空载酵母较重组酵母体积小, 但两者在菌落数目上没有很大差别, 仍然处于一个数量级(图 7)。而 10 °C 过夜培养后, 转 *sikSAD* 基因的酵母和转 pYES2 空载体的酵母都没有生长, 而 28 °C 恢复培养 24 h 后, 重组酵母明显在数目和体积上都占有绝对优

势, 转空载体酵母数量减少而且生长缓慢。空载酵母低温下成活率显著降低(图 8)。在 4 °C 放置 3-4 周后, 重组酵母不但没有丧失活性, 还有所增殖。而空载酵母在这种条件下已经完全丧失活性(图 9)。

将提取的酵母油脂甲酯化后, 得到相应的脂肪酸甲酯, 气相色谱分析酵母油脂的脂肪酸组成, 由图 10 可知, 低温 28 °C、20 °C、10 °C、4 °C 处理后, 转 *sikSAD* 基因的酵母和转 pYES2 空载体的酵母的月桂酸、肉豆蔻酸、硬脂酸、亚油酸含量较标准样品含量变化不大, 而棕榈酸含量明显高于标样, 亚麻酸含量明显低于标样, 不饱和脂肪酸油酸的含量随温度的降低而下降, 重组酵母的脂肪酸中油酸含量高于对照酵母, 尤其是在 20 °C 时, 重组酵母的脂肪酸含量达到最大值。

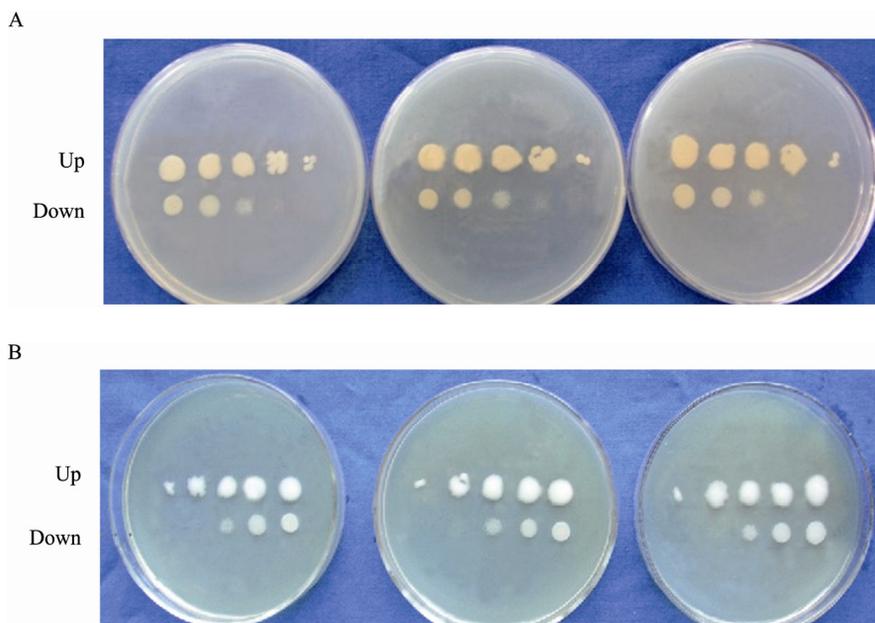


图 7 转 pYES2-*sikSAD* 大肠杆菌/酵母穿梭表达载体和转 pYES2 大肠杆菌/酵母穿梭表达载体酵母的 20 °C 低温耐受性试验

Fig. 7 Growth of pYES2-*sikSAD* and pYES2 recombinant in 20 °C

注: 上: 转 pYES2-*sikSAD* 大肠杆菌/酵母穿梭表达载体的酵母; 下: 转 pYES2 大肠杆菌/酵母穿梭表达空载体的酵母. A: 20 °C 24 h 培养; B: 酵母形态.

Note: Up: pYES2-*sikSAD* transgenic yeast; Down: pYES2 transgenic yeast. A: 20 °C 24 h; B: Configuration of transgenic yeast.

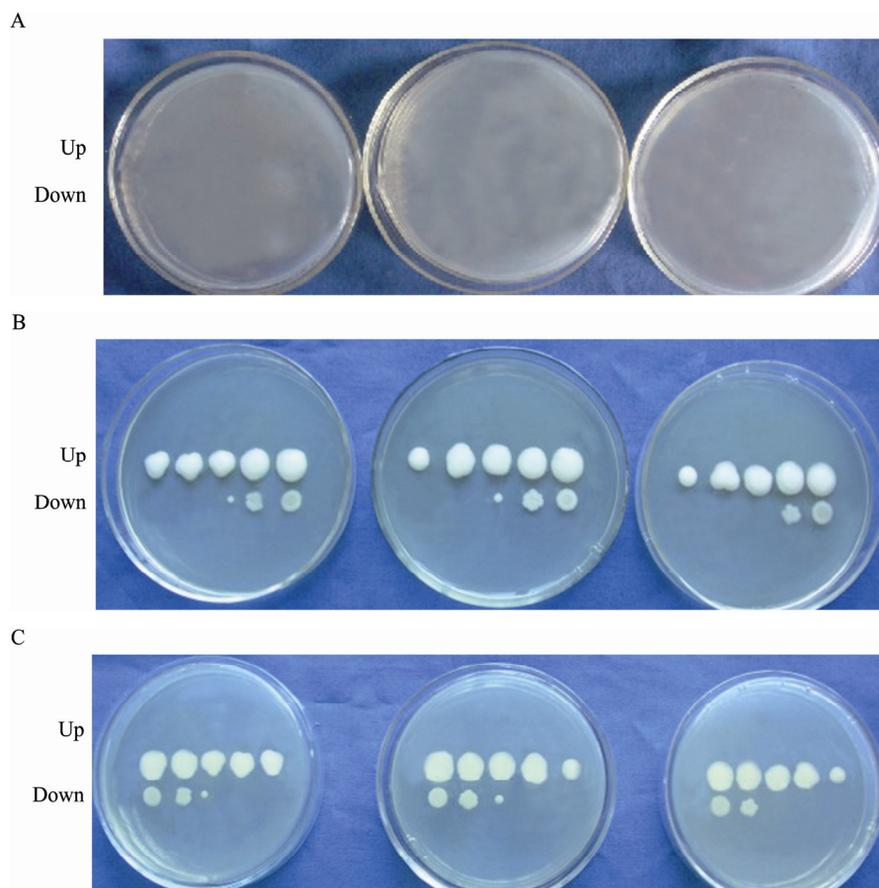


图 8 转 pYES2-*sikSAD* 大肠杆菌/酵母穿梭表达载体和转 pYES2 大肠杆菌/酵母穿梭表达载体酵母的 10 °C 低温耐受性试验

Fig. 8 Growth of pYES2-*sikSAD* and pYES2 recombinant in 10 °C

注: 上: 转 pYES2-*sikSAD* 大肠杆菌/酵母穿梭表达载体的酵母; 下: 转 pYES2 大肠杆菌/酵母穿梭表达空载体的酵母。A: 10 °C 过夜培养; B: 28 °C 恢复培养 24 h; C: 酵母形态。

Note: Up: pYES2-*sikSAD* transgenic yeast; Down: pYES2 transgenic yeast. A: 10 °C 12 h; B: 28 °C 24 h; C: Configuration of transgenic yeast.

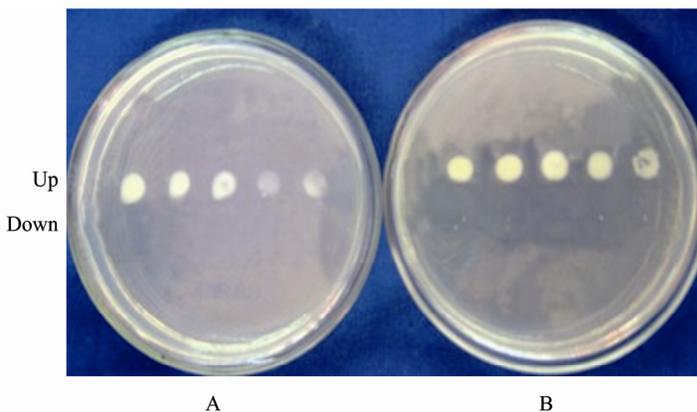


图 9 转 pYES2-*sikSAD* 大肠杆菌/酵母穿梭表达载体和转 pYES2 大肠杆菌/酵母穿梭表达载体酵母 4 °C 低温耐受性试验

Fig. 9 Growth of pYES2-*sikSAD* and pYES2 recombinant in 4 °C

注: 上: 转 pYES2-*sikSAD* 大肠杆菌/酵母穿梭表达载体的酵母; 下: 转 pYES2 大肠杆菌/酵母穿梭表达空载体的酵母; A: 4 °C 3-4 周; B: 28 °C 过夜恢复培养。

Note: Up: pYES2-*sikSAD* transgenic yeast; Down: pYES2 transgenic yeast. A: 4 °C 3-4 w; B: 28 °C 12 h.

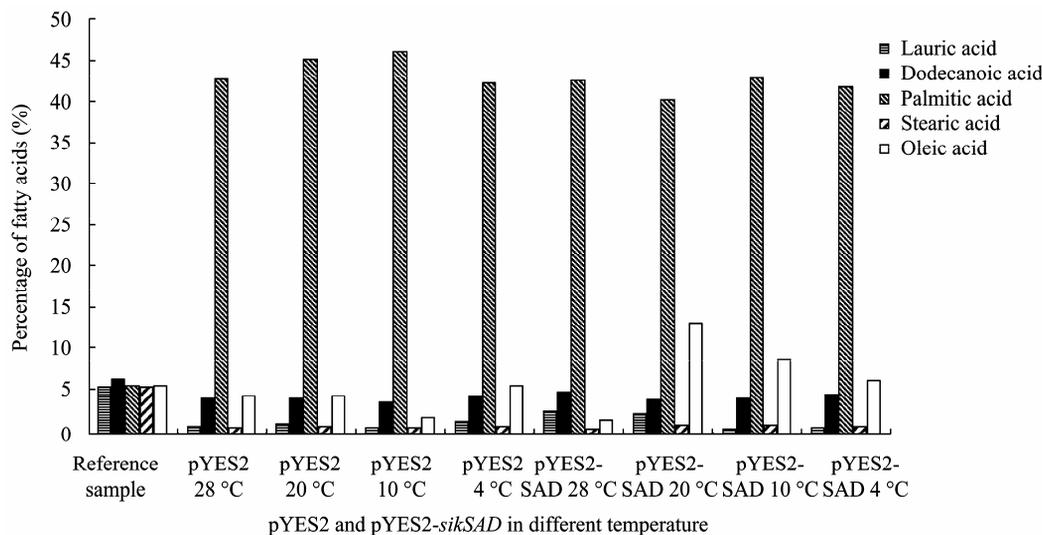


图 10 转 pYES2-*sikSAD* 大肠杆菌/酵母穿梭表达载体和转 pYES2 大肠杆菌/酵母穿梭表达载体酵母低温胁迫脂肪酸含量分析

Fig. 10 Analysis fatty acid contents of pYES2-*sikSAD* and pYES2 recombinant in different temperature

2.5 pYES2-*sikSAD* 重组酵母对酒精胁迫的抗性分析及统计分析

2.5.1 pYES2-*sikSAD* 重组酵母对酒精胁迫的抗性分析: 使用同上的方法将重组酵母和空载酵母细胞调至相同数量级, 将菌体分别接种于含有 0、5%、10%、15%、20%酒精的液体 SD-URA 培养基中, 设计 3 个重复, 28 °C 培养 4–5 h, 后涂布于 SD-URA 固体培养基上, 28 °C 过夜培养。

选出效果最明显的一组, 从图 11 中可以明显看

出, 转 *sikSAD* 基因的酵母在含有 0–20%浓度的酒精中都可以生长, 且表现出很高的活性, 直到 20%时才失去活性, 而转 pYES2 空载体的酵母只在 0–10%的酒精中还有存活。说明重组酵母对酒精的耐受性有了很大的提高。

2.5.2 pYES2-*sikSAD* 重组酵母对酒精胁迫的统计分析: 将培养皿置于细胞计数器下计数, 得出表 1 中的数据。

由表 1 和图 12 可以看出, 转 pYES2 空载体酵母



图 11 转 pYES2 大肠杆菌/酵母穿梭表达载体酵母和转 pYES2-*sikSAD* 大肠杆菌/酵母穿梭表达载体的酒精耐受性试验

Fig. 11 Transgenic yeast lines under different alcohol stresses landscape orientation

注: A: 转 pYES2 大肠杆菌/酵母穿梭表达空载体的酵母; B: 转 pYES2-*sikSAD* 大肠杆菌/酵母穿梭表达载体的酵母。酒精浓度依次为 0、5%、10%、15%和 20%。

Note: A: pYES2 transgenic yeast; B: pYES2-*sikSAD* transgenic yeast. Alcohol level: 0, 5%, 10%, 15% and 20%.

表 1 不同酒精浓度对转空载体酵母和重组酵母的直径及数目影响的数据统计
Table 1 Data processing of transgenic yeast lines under different alcohol stress landscape orientation

酒精浓度 Alcohol concentration (%)	pYES2 直径 Diameter of pYES2 (cm)	pYES2- <i>sikSAD</i> 直径 Diameter of pYES2- <i>sikSAD</i> (cm)	pYES2 数目(个) Number of pYES2	pYES2- <i>sikSAD</i> 数目(个) Number of pYES2- <i>sikSAD</i>
0	0.05	0.03	*	*
5	0.14	0.05	*	*
10	0.28	0.11	59	*
15	0	0.22	0	268
20	0	0.36	0	72

注: * 表示数量很多, 遍及整个培养基。

Note: *: The yeast extend all over the culture medium.

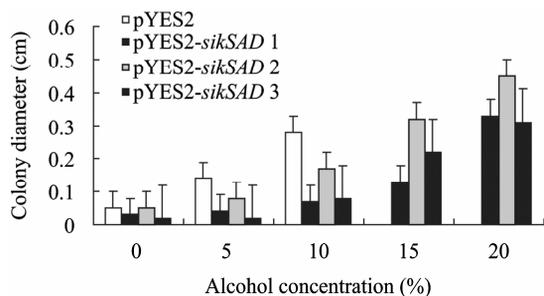


图 12 不同酒精浓度下菌落直径对比

Fig. 12 The diameter of yeast in different alcohol stress

的菌落数量随酒精浓度的加大数量逐渐减少, 菌落直径不断增大。转 pYES2-*sikSAD* 大肠杆菌/酵母的菌落数量和直径的变化与空载体酵母呈相同趋势, 但转 pYES2-*sikSAD* 大肠杆菌/酵母能耐受 15%、20% 的酒精浓度, 而转 pYES2 空载体酵母则不能耐受。从图 12 可以看出, 在 0–10% 的酒精浓度下, 对照组的菌落直径明显大于重复组的菌落直径。

2.5.3 pYES2-*sikSAD* 重组酵母对酒精胁迫的方差分析: (1) 分析 15%、20% 酒精度菌落数量有无显著差异。

由 SPSS16.0 统计分析软件显示结果, 可知 $F=0.946$, $P=0.403>0.05$, 可认为 5 种酒精浓度的转 pYES2-*sikSAD* 大肠杆菌/酵母菌落数目差异不显著。因为 0–10% 无法计数, 只有 15%、20% 计数, 计数因素过少, 无法进行方差分析。

(2) 分析 0–20% 酒精度间转 pYES2-*sikSAD* 大肠杆菌/酵母菌落直径有无显著差异。

由 SPSS16.0 统计分析软件显示结果, 可知 $F=15.214$, $P=0.000<0.01$, 可认为 5 种酒精浓度的转

pYES2-*sikSAD* 大肠杆菌/酵母菌落直径存在极显著差异, 故须进行多重比较。选用 S-N-K 法作均数间多重两两比较, 可知: 0、5%、10% 的样本均数两两之间均无显著差异。酒精浓度 0、5%、10% 分别与酒精浓度 15%、20% 的样本均数均有显著差异。

3 讨论

相关研究表明, 膜脂不饱和脂肪酸含量必须维持在较高水平, 植物才能生存。尽管植物体内存在许多种去饱和酶, 但 SAD 催化的脂肪酸 Δ^9 位的脱饱和而引入第一个双键对植物膜在生理温度下, 由凝胶态向液晶态转化是最重要的^[16]。研究人员已经证实, 植物中的 SAD 基因能直接提高植物膜脂不饱和脂肪酸的含量, 但其能否在酿酒酵母中表现出类似的特性, 还需进行深入研究。酿酒酵母是传统的模式生物^[8]并且具有遗传背景清楚^[9], 具备高效的体内重组特性^[10]等优点。但因其实际发酵温度较高, 发酵过程中较易有各种杂菌存活, 不利于葡萄酒的酿制, 更不利于身体健康的发展, 从而给科研和生产带来很大的困扰。

本实验旨在初步分析新疆雪莲 *sikSAD* 基因在酿酒酵母中的表达特性: 转基因酿酒酵母的耐低温性能不仅得到了极大的提高, 其对酒精的耐受力也得到了很大的提高。将 *sikSAD* 基因转化入酿酒酵母可以看出其明显提高了酵母在低温环境下的活性及成活率, 脂肪酸含量测定结果和很多报道中关于转 *sikSAD* 基因可以在低温下提高生物膜中不饱和脂肪酸的含量, 提高生物的低温耐受力的研究结果是一

致的,但目前尚没有用新疆雪莲中 *sikSAD* 基因进行转基因酵母研究的先例。同时重组酿酒酵母在酒精耐受实验中,仍表现出比普通酿酒酵母明显优势,能轻松耐受 15%甚至 20%的酒精浓度。酒精对生物体造成伤害的原理主要是使生物体迅速脱水致死,而重组酿酒酵母相比较空载酿酒酵母对酒精耐受高出了十几个百分点。

因此,本实验表明,通过转化新疆雪莲 *sikSAD* 基因来改良酿酒酵母的耐低温和酒精耐受性能是一条可行的途径,并且能促使酿酒酵母在工业生产上发挥巨大的作用。

参 考 文 献

- [1] Yukawa Y, Takaiwa F, Shoji K, et al. Structure and expression of two seed-specific cDNA clones encoding stearyl-acyl carrier protein desaturase from sesame, *Sesamum indicum* L.[J]. *Plant Cell Physiol*, 1996, 37(2): 201–205.
- [2] Luo T, Deng W Y, Zhang FL. Stearyl-acyl carrier protein desaturase of plants[J]. *Chemistry of Life*, 2006, 26(2): 133–136.
- [3] Lin P, Qi LW, Wang YD, et al. A review of advances in fatty acid desaturase on cold-resistance in plants[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2006, 4(3): 404–410.
- [4] Kodama H, Horiguchi G, Nishiuchi T, et al. Fatty acid desaturation during chilling acclimation is one of the factors involved in conferring low-temperature tolerance to young tobacco leaves[J]. *Plant Physiology*, 1995, 107(4): 1177–1185.
- [5] Los D, Horvath I, Vigh L, et al. The temperature-dependent expression of the desaturase gene *desA* in *Synechocystis* PCC6803[J]. *FEBS Lett*, 1993, 318(1): 57–60.
- [6] 夏晓华,朱建国. 酿酒酵母菌的生物学特性[J]. *浙江检验医学*, 2007, 5(3): 27–30.
- [7] 阳辛凤,高秋芳,李锡敏,等. 菌落PCR快速扩增工业酿酒酵母基因组DNA片段[J]. *生物技术通报*, 2010(9): 215–219.
- [8] 刘擎,余龙. 酵母:一种模式生物[J]. *生命的化学*, 2000, 20(2): 61–65.
- [9] 沈珺珺,方福德. 真核基因表达调控[M]. 北京:高等教育出版社,1997: 1–400.
- [10] Wendland J, Ayad-Durieux Y, Knechtle P, et al. PCR-based gene targeting in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*[J]. *Gene*, 2000, 242(1/2): 381–391.
- [11] Wach A. PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*[J]. *Yeast*, 1996, 12(3): 259–265.
- [12] 王娟,张玟洁,曾雅雪,等. 利用酿酒酵母转座子文库筛选MTM1基因缺失表型相关基因[J]. *微生物学报*, 2010, 50(1): 126–131.
- [13] Gao HB, Zhang SL, Chen YH. Application of semi-quantitative RT-PCR in gene expression[J]. *Live-stock and Poultry Industry*, 2008(2): 34–37.
- [14] 奥斯伯,金斯顿,布伦特,等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖,王海林译. 北京:科学出版社,1998.
- [15] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 黄培堂,等译. 北京:科学出版社,2002.
- [16] Los DA, Murata N. Structure and expression of fatty acid desaturases[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1394(1): 3–15.