

原生质体诱变选育高产谷胱甘肽菌株及基因表达分析

孙 姜¹, 朱益波², 王立梅², 邓大庆², 齐 斌^{2,*}

(1. 吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118;

2. 常熟理工学院发酵工程技术研究中心, 苏州食品生物技术重点实验室, 江苏 常熟 215500)

摘 要: 以*Saccharomyces cerevisiae* Y518为出发菌株, 通过原生质体诱变提高产谷胱甘肽的能力。结果表明: 用0.03mol/L HNO₂处理原生质体3min, 致死率为85.96%, 突变率为6.85%; 经过4轮连续的HNO₂诱变, 筛选得到一株胞内谷胱甘肽产量(14.85mg/g干质量)约比出发菌株高24%的突变株。进一步研究谷胱甘肽合成相关的基因表达量, 发现其合成途径编码限速酶的基因*GSH1*的表达量上调了2.26倍。因此, 突变株胞内谷胱甘肽水平的提高可能是由上调的*GSH1*的表达量导致的。

关键词: *Saccharomyces cerevisiae*; 原生质体诱变; 谷胱甘肽; 基因*GSH1*

Mutation of *Saccharomyces cerevisiae* Protoplasts for Enhanced Production of GSH and Gene Expression of GSH Over-accumulating Mutants

SUN Jiang¹, ZHU Yi-bo², WANG Li-mei², DENG Da-qing², QI Bin^{2,*}

(1. College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Soochow Key Laboratory of Food Biotechnology, Research Centre of Fermentation Engineering Technology, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China)

Abstract: In this study, *Saccharomyces cerevisiae* Y518 was improved for enhanced GSH production by protoplast mutagenesis. The mortality of *Saccharomyces cerevisiae* protoplasts after being treated with 0.03 mol/L HNO₂ for 3 min was 85.96%. After 4 repeated treatments, a mutant was obtained which produced 14.85 mg of GSH per g dry weight, a 24% increase over the original strain. The gene *GSH1* encoding the rate-limiting enzyme in the synthesis route showed a 2.26-fold increased expression, thus resulting in increased GSH production from the mutant strain.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; protoplast mutagenesis; glutathione; gene *GSH1*

中图分类号: Q815

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)23-0176-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201323037

谷胱甘肽(GSH)是一类广泛存在于微生物细胞和动植物体内的活性三肽化合物^[1-3], 是细胞自我防御机制的重要组成部分, 能够保护细胞免受紫外^[4]、重金属^[5]和许多外源有机物^[6]的伤害, 同时在抵御氧化性损伤方面也发挥着重要的作用^[7-9]。因此, 被广泛应用于医药、食品和化妆品行业^[10]。

由于发酵过程相对简便, 用酿酒酵母进行微生物发酵生产GSH已经成为一种有效的工业化生产策略^[11]。而优良发酵菌种的选育是工业化生产的基础, 所以要提高发酵水平降低生产成本就必须进行优良菌种的选育。

目前, 国内外许多研究都集中在通过物理或化学诱变的方法筛选高产GSH的突变体^[12-13]。利用HNO₂对原生质体进行诱变育种是一种有效的化学育种方法, 在诱变过程中, 诱变剂与原生质体直接接触, 可以有效地提高DNA突变率^[14-15]。本研究以一株产谷胱甘肽的酿酒酵母Y518为出发菌株, 利用原生质体诱变育种的方法, 对其进行诱变改造, 从而筛选高产谷胱甘肽的酿酒酵母突变菌株, 并对突变菌株GSH合成途径关键基因的表达量进行定量分析, 从而初步分析出突变株胞内GSH含量提高的原因。

收稿日期: 2013-07-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171758); 江苏省高校“青蓝工程”中青年学术带头人项目; 苏州市科技发展计划项目(SZS201007)

作者简介: 孙姜(1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: 1433701761@qq.com

*通信作者: 齐斌(1965—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: qibin65@126.com

1 材料与方法

1.1 菌种、试剂与培养基

1.1.1 菌种

Saccharomyces cerevisiae Y518 本实验室筛选保存。

1.1.2 试剂

谷胱甘肽标准品、蜗牛酶、 β -巯基乙醇、四氧嘧啶 美国Sigma公司; RNeasy Mini Kit和RNase-Free DNase Set 德国Qiagen公司; Experion™ RNA Stdsens Reagents and Supplies for 25 Chips 美国Bio-Rad公司; 其他化学试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基

YEPD液体培养基(g/L): 葡萄糖20、蛋白胨20、酵母膏10, 少量2-脱氧-D-葡萄糖(固体加琼脂20g/L); YEPD再生培养基(g/L): 葡萄糖20、蛋白胨20、酵母膏10、琼脂20, 山梨醇0.8mol/L; 发酵培养基(g/L)^[16]: 酵母膏5、葡萄糖20、硫酸铵5、磷酸二氢钾6、硫酸钾3、硫酸镁1.5, 蒸馏水1L, pH6.0。

1.2 仪器与设备

UV-2450分光光度计 日本Shimadzu公司; TissueLyser II高通量组织破碎仪 德国Qiagen公司; Nanodrop 2000分光光度计 美国热电公司; Experion™全自动电泳系统、C1000 Touch™PCR仪、CFX96实时荧光定量PCR仪 美国Bio-Rad公司。

1.3 方法

1.3.1 原生质体制备与再生

原生质体的制备和再生过程参照文献[17]进行。具体如下: 将YEPD液体培养基中的酵母细胞培养到对数生长期并收集, 用PBS洗涤3次。加入 β -巯基乙醇-PBS溶液, 28℃恒温10min, 弃上清液, 用PBS洗涤。预处理后的细胞沉淀加入蜗牛酶-PBS悬浮液, 在30℃条件下低速恒温振荡60~90min, 定时取样镜检, 当大部分细胞都转变成原生质体时, 5000r/min离心10min, 弃上清液, 终止酶解, 用PBS洗涤3次, 取适量菌悬液适当稀释后, 涂布YEPD固体培养基和YEPD再生培养基, 计算原生质体形成率和再生率。

1.3.2 HNO₂诱变处理

以HNO₂以作为诱变剂对制备好的原生质体进行诱变处理, 过程参见文献[18]稍加改动, 以0.1mol/L亚硝酸钠和1mol/L pH4.5醋酸缓冲液为原料, 121℃灭菌20min, 再按不同配比混合, 配制浓度为0.01~0.04mol/L的亚硝酸溶液^[19]。取稀释到一定浓度的原生质体悬液2mL于大试管I中, 取不同浓度的亚硝酸溶液于大试管II中, 在28℃水浴中保温2min, 将试管I中的溶液倒入II中, 振荡2~5min, 分别取0.5mL加入到0.07mol/L pH8.6磷酸氢二钠缓冲液中, 待pH值降到6.8左右, 以终止HNO₂反

应。终止反应后, 取0.2mL涂布于YEPD再生培养基上, 30℃恒温培养。待平皿长出菌落后, 计算原生质体致死率和突变率。

1.3.3 GSH含量的测定

GSH的抽提参见文献[20]方法, 采用40%乙醇提取; 胞内GSH含量的测定具体操作参见文献[21]方法, 采用四氧嘧啶法。

1.3.4 RNA的抽提与质量鉴定

将培养好的菌液于12000r/min、4℃离心5min, 收集菌体, 并用冷的DEPC水洗涤两遍, 然后用液氮淬灭2min。RNA的抽提用RNeasy Mini Kit参照说明书进行, 破壁在TissueLyser II高通量组织破碎仪上进行, 残留DNA的去除用RNase-Free DNase Set参照说明书进行。提取好的总RNA的浓度和纯度用Nanodrop 2000分光光度计测定, 完整性按照Experion™ RNA Stdsens Reagents and Supplies for 25 Chips说明书用Experion™全自动电泳系统鉴定。

1.3.5 反转录及实时荧光定量PCR(qPCR)分析

利用iScript™ cDNA Synthesis Kit参照说明书将抽提出来的总RNA在C1000 Touch™PCR仪上反转录为cDNA, 反应体系为: 5×iScript反应混合物 4μL、iScript反转录酶1μL、无核酸水13μL、RNA模板 2μL; 反应程序为: 25℃、5min, 42℃、30min, 85℃、5min, 4℃保温。qPCR按照iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix说明书在CFX 96™ Real-Time System荧光定量PCR仪上进行, 反应体系为: SYBR® Green预混液 10μL, 上游和下游引物各1μL(生工生物工程(上海)股份有限公司设计和合成), cDNA模板1μL, H₂O 8μL; 反应程序为: 95℃、30s, 95℃、5s, 60℃、30s, 72℃、20s(40个循环)。相对表达倍数按照2^{-ΔΔC_t}法计算^[22], 参照基因为actin。

2 结果与分析

2.1 原生质体的形成与再生

收集培养到8h的菌体, 先用0.15% β -巯基乙醇预处理, 然后用17.5g/L蜗牛酶酶解60min^[17]。原生质体的形成率和再生率分别达到94.85%和8.52%。所以原生质体的制备和再生情况良好, 可以用于后续的诱变处理。

2.2 HNO₂诱变处理

2.2.1 最佳诱变剂浓度的确定

选择浓度分别为0.01、0.02、0.03、0.04mol/L的HNO₂, 对出发菌株Y518的原生质体进行诱变处理, 各浓度条件下的致死率和突变率如图1所示, 与完整菌体细胞相比, 原生质体去除了细胞壁, 对外界环境影响更加敏感, 诱变剂对其的诱变效应也更为强烈, 因此随着HNO₂浓度的增大, 原生质体的致死率也相应地增加,

当浓度为0.03mol/L时,致死率为80.7%,当浓度为0.04mol/L时,致死率接近100%。突变率随着HNO₂浓度的增加变化不明显,在0.03mol/L的HNO₂处理下,突变率达到6.89%,但是当HNO₂浓度为0.04mol/L时突变率明显降低仅为1.58%,可能是致死率太高影响突变率。因此本实验选择0.03mol/L的HNO₂为最佳诱变浓度。

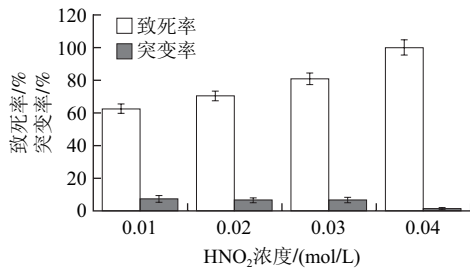


图1 HNO₂浓度对原生质体致死率和突变率的影响

Fig.1 Protoplast fatality and mutation rate at different HNO₂ concentrations

2.2.2 最佳诱变时间的确定

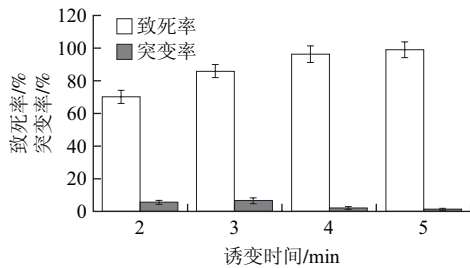


图2 HNO₂处理时间对原生质体致死率和突变率的影响

Fig.2 Protoplast fatality and mutation rate at different mutagenesis times

当用0.03mol/L的HNO₂分别诱变原生质体2、3、4、5min时,原生质体的致死率和突变率如图2所示。随着诱变时间的延长,原生质体的致死率也在增大,在3min时达到85.96%,但是超过3min就接近100%。突变率在3min时达到6.85%,而超过3min则明显降低,尽管诱变4min和5min时致死率高,但是突变率太低,会影响诱变的结果,所以选择最佳的诱变时间为3min。

2.3 胞内GSH产量的比较

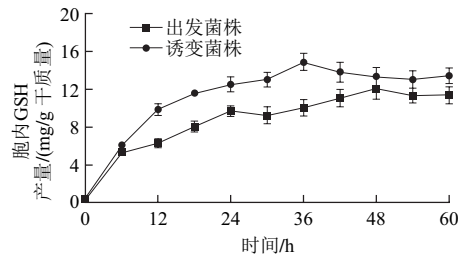


图3 出发菌株和诱变菌株胞内GSH产量

Fig.3 Intracellular GSH contents in wild type and mutant strains

将原始菌株和诱变菌株分别以10%的接种量接种到发酵培养基中,发酵60h,每隔6h取样测定胞内GSH产量,结果如图3所示。在前6h,出发菌株胞内GSH产量迅速增加,然后稳步增长,在48h达到最高(12.02mg/g干质量),随后逐渐降低;而突变株的GSH产量在前12h快速上升,之后稳步增加,在36h达到最大值(14.85mg/g干质量)。最终,突变株比出发菌株的胞内GSH产量高出约24%,所以用HNO₂诱变筛选而来的这株突变菌株比出发菌株产GSH的能力要强。

2.4 RNA质量鉴定

2.4.1 总RNA的质量浓度和纯度

表1 RNA的质量浓度和纯度

Table 1 Concentration and purity of RNA from the original strain and its mutant strain

RNA样品	质量浓度/(ng/ μ L)	OD _{260nm} /OD _{280nm}	OD _{260nm} /OD _{230nm}
出发菌株	358	2.01	2.02
诱变菌株	374	2.03	2.05

突变株在36h时胞内GSH积累量达到最高,所以选择发酵到36h的菌液提取总RNA。出发菌株和突变株总RNA的质量浓度和纯度如表1所示, RNA质量浓度 $\geq 100\text{ng}/\mu\text{L}$,说明所提RNA的质量浓度较高; $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{230\text{nm}} \geq 1.8$,说明所提的总RNA纯度较高,几乎无蛋白质和盐离子等杂质污染,能够用于后续的cDNA反转录。

2.4.2 RNA的完整性

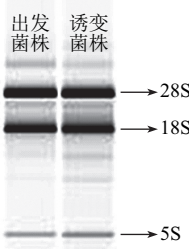


图4 出发菌株和诱变菌株的RNA电泳图

Fig.4 RNA electrophoregrams of the original and mutant strains

对提取的总RNA的完整性进行鉴定,结果如图4所示。电泳图上总共出现3条带分别为28S、18S和5S,而且条带清晰可见没有弥散,所以提取的总RNA完整性较好,几乎没有降解,符合反转录的要求。

2.5 GSH1和GSH2表达量的qPCR分析

将提取的总RNA立即反转录成cDNA并置于-80℃保存,作为qPCR分析的模板, GSH1和GSH2 qPCR分析的引物序列和相对表达量如表2所示。GSH是分别由 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -GCS)和谷胱甘肽合成酶催化经过两步合成生成的活性小肽^[23],合成过程如图5所示。 γ -GCS和谷胱甘肽合成酶分别由GSH1和GSH2编码^[24],由于 γ -GCS是GSH合成反应的限速酶^[25],所以

*GSH1*的表达量直接制约着GSH的生成。有文献报道^[26]在*Saccharomyces cerevisiae* YSF-31中过量表达*GSH1*, 其GSH产量提高了约50%, 而过量表达*GSH2*对GSH积累并没有显著影响。通过qPCR分析, 相对于出发菌株而言, 突变株*GSH1*上调了2.26倍, 所以由HNO₂诱变选育的突变株GSH水平的增加可能主要是由上调的限速酶编码基因*GSH1*导致的。尽管*GSH2*也上调了1.11倍, 但是变化不显著, 再者其不是编码限速酶的基因, 所以可能是诱变株GSH增加的次要原因。

表2 引物序列及基因表达量
Table 2 Primer sequences and gene expressions

基因	引物序列(5'→3')	相对表达量
<i>GSH1</i>	F: AATGCCGCTTCCAGGTCTCT	2.26±0.43
	R: GCCAGTTTCGCCTCTTTGTCTT	
<i>GSH2</i>	F: CATTAGGGACACAGAGCAGGAAAT	1.11±0.24
	R: CTGTGAGCCAGATAATTGAGTGAGT	
<i>actin</i>	F: ACCGCTGCTCAATCTTCTTC	
	R: ATGATGGAGTTGTAAGTAGTTGG	

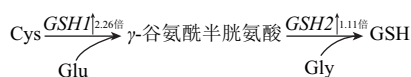


图5 GSH两步合成示意图

Fig.5 Two-step synthesis of GSH

3 结论

谷胱甘肽(GSH)是一种具有多种生理功能的生物活性化合物, 但是普通酿酒酵母菌株胞内GSH的积累量一般不超过1%^[27], 从而制约了GSH的工业化生产。本研究通过HNO₂对出发菌株的原生质体进行诱变, 选育出一株相对高产的酿酒酵母突变株, 其胞内GSH产量达到14.85mg/g干质量, 比出发菌株提高了约24%, 说明通过HNO₂诱变原生质体来选育高产GSH的突变株是可行的。尽管突变株GSH水平有所提高, 但是还远远达不到工业化生产的需求。通过对GSH合成途径相关基因表达量的分析, 发现其合成通路限速酶编码基因*GSH1*的表达量上调了2.26倍, 这可能是导致突变株胞内GSH积累量增加的主要因素, 但是导致*GSH1*上调的机制有待进一步研究, 从而为从基因工程方面改造酿酒酵母, 实现GSH的高产打下基础。

参考文献:

[1] IZAWA S, INOUE Y, KIMURA A. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Federation of European Biochemical Societies Letters, 1995, 368(1): 73-76.

[2] MEISTER A, ANDERSON M E. Glutathione[J]. Annual Review of Biochemistry, 1983, 52: 711-760.

[3] 郑丽雪, 齐斌, 梅艳珍, 等. L-Cys与葡萄糖对酵母发酵合成谷胱甘肽的影响[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(4): 157-160.

[4] SOLLOD C C, JENNS A E, DAUB M E. Cell surface redox potential as a mechanism of defense against photosensitizers in fungi[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(2): 444-449.

[5] PEREGO P, WEGHE J V, DAVID W O, et al. Role of determinants of cadmium sensitivity in the tolerance of *Schizosaccharomyces pombe* to cisplatin[J]. Molecular Pharmacology, 1997, 51(1): 12-18.

[6] GOTO S, YOSHIDA K, MORIKAWA T, et al. Augmentation of transport for cisplatin-glutathione adduct in cisplatin-resistant cancer cells[J]. Cancer Research, 1995, 55(19): 4297-4301.

[7] BERHANE K, WIDERSTEN M, ENGSTROM A, et al. Detoxication of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994, 91(4): 1480-1484.

[8] AUDREY P G, PAUL T S, CAMILLA M K, et al. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes[J]. Molecular Biology of the Cell, 2000, 11(12): 4241-4257.

[9] FRANK M, ELEONORE F, MARTIN L, et al. Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast[J]. Journal of Cell Biology, 1999, 145: 757-767.

[10] SPECTOR D, LABAN J, TOLEDANOM B. A genetic investigation of the essential role of glutathione[J]. Biological Chemistry, 2001, 276(10): 7011-7016.

[11] NISAMEDTINOV I, KEVVAI K, ORUMETS K, et al. Metabolic changes underlying the higher accumulation of glutathione in *Saccharomyces cerevisiae* mutants[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89: 1029-1037.

[12] 贾建萍, 裴娟萍. 谷胱甘肽高产菌株的选育[J]. 微生物学通报, 2003, 30(4): 24-29.

[13] 何俊勇, 裴娟萍, 黄敏, 等. 高产谷胱甘肽新菌株的选育及其发酵条件的研究[J]. 工业微生物, 2005, 35(3): 31-35.

[14] 程明, 崔承彬, 李长伟, 等. 化学诱变技术在微生物育种研究中的应用[J]. 国际药学研究杂志, 2009, 36(12): 412-417.

[15] 周丹, 曾宪鹏, 李盛钰, 等. 植物乳杆菌荚膜缺陷型菌株的诱变选育[J]. 微生物学报, 2010, 37(11): 1666-1671.

[16] 江洁, 卜红宇. 酿酒酵母菌产谷胱甘肽的发酵条件研究[J]. 中国酿造, 2009(1): 59-61.

[17] 张欢, 张燕, 王立梅. 多亲本原生质体融合构建高产谷胱甘肽菌株[J]. 食品科技, 2012, 37(11): 18-22.

[18] 齐秀兰, 张志军. 利用亚硝酸诱变原生质体筛选L-亮氨酸高产菌株的研究[J]. 沈阳药学院学报, 1993, 10(4): 279-285.

[19] 李阜棣, 喻子牛, 何绍江. 农业微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 61-64.

[20] 郑丽雪, 王立梅, 梅艳珍, 等. 酿酒酵母生产谷胱甘肽分批发酵动力学研究[J]. 食品科学, 2011, 32(1): 158-161.

[21] 上海医学化验所. 临床生化检验(上)[M]. 上海: 上海科技出版社, 1979: 86-87.

[22] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method[J]. Methods, 2001, 25: 402-408.

[23] GRANT C M, MACIVER F H, DAWES I W, et al. Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide gamma-glutamylcysteine[J]. Molecular Biology of the Cell, 1997, 8: 1699.

[24] GOMES D S, FRAGOSO L C, RIGER C J, et al. Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2002, 1573(1): 21-25.

[25] GRIFFITH O W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis[J]. Free Radical Biology and Medicine, 1999, 27: 922-935.

[26] FAN Xiuying, HE Xiuping, GUO Xuena, et al. Increasing glutathione formation by functional expression of the γ-glutamylcysteine synthetase gene in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology Letters, 2004, 26: 415-417.

[27] PENNINGCKX M, JASPERS C J, LEGRAIN M J. The glutathione-dependent glyoxalase pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1983, 258: 6030-6036.