

生物系统在受到外部环境扰动或内部参数变化等不确定因素干扰时,能够保持其结构和功能稳定的一种特性,称为生物鲁棒性^[1-2]。光滑球拟酵母(*Candida glabrata*)作为发酵生产丙酮酸^[3]、富马酸^[4]、苹果酸^[5]、 α -酮戊二酸^[6]等有机酸的重要工业微生物,其重要生理特性如目标代谢途径中的代谢通量稳定性、对底物和产物的耐受性,以及应对环境胁迫均涉及生物鲁棒性。有机酸发酵过程中,随着产物有机酸的积聚,培养液的 pH 迅速降低,导致菌体生长和产物积累减缓甚至停止^[7]。此时一般通过流加碱性物质如 NaOH 等来调控 pH,但随着碱性物质的添加,培养液中的渗透压不断增加,也会导致细胞生长和产物积累减缓和停止。目前国内外主要通过外源添加辅助底物、诱变育种与基因工程和适应性进化等策略提高菌体的胁迫耐受性,从而增加目标产物有机酸的产量。如果能在阐明 *C. glabrata* 的胁迫耐受生理机制的基础上,定向改造菌株的生产性能,则可更加有效的从根本上解决这一科学难题。

目前关于 *C. glabrata* 胁迫耐受机制的研究尚少。Bairwa 等^[8]对 GPI 锚定天冬氨酰蛋白酶的研究发现光滑球拟酵母可通过 CgYps1 调节质子泵 CgPma1 的活性以适应酸胁迫环境。此外,研究者们对光滑球拟酵母转录因子进行的功能鉴定发现, Msn2p 和 Msn4p 是抵御多种环境压力必不可少的转录因子^[9], Yap1p、Skn7p 和 Slm7p 通过抵御氧化胁迫参与酸胁迫应答反应^[10-11]。鉴于转录因子在胁迫应答反应中发挥重要作用,本论文中从转录因子 Asg1p 着手进行光滑球拟酵母胁迫耐受机制的研究。

转录因子 Asg1p 由基因 *ASG1* 编码,敲除酿酒

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的基因 *ASG1* (*ScASG1*, YIL130W) 或白色念珠菌 (*Candida albicans*) 的基因 *ASG1* (*CaASG1*, CaO19.166, CaO19.7800) 均会使细胞在非发酵性碳源中的生长能力大大降低^[12-13]。通过序列比对分析,发现 *C. glabrata* 中基因 *ASG1* (*CgASG1*, CAGL0G08844g) 的序列与 *ScASG1* 和 *CaASG1* 分别有 50% 和 39% 的相似性。那么 *CgASG1* 是否保留了其同源基因在 *S. cerevisiae* 和 *C. albicans* 中的功能或发展出其他功能呢?

鉴于转录因子 Asg1p 在 *C. glabrata* 环境耐受性中的作用尚未有研究报道,为此,本文通过构建光滑球拟酵母突变菌株 *Cgasg1Δ*,比较基因 *CgASG1* 缺失前后菌株在酸胁迫条件下的生长、转录组水平的变化及其在氧化胁迫和高渗胁迫下的生长,以期理解转录因子 CgAsg1p 在调控 *C. glabrata* 鲁棒性中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 本课题研究所涉及的菌株和质粒见表 1,所使用的引物见表 2。

1.1.2 主要试剂和仪器 TaKaRa Taq、Ex Taq、Pyrobest DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker 等,购自 TaKaRa 公司;普通 DNA 产物纯化回收试剂盒、酵母基因组提取试剂盒,购自天根生化科技(北京)有限公司;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒,购自生工生物工程(上海)股份有限公司;其它常规试剂采用进口分装或国产分析纯。C1000 型 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司产品;Gel

表 1 作者课题研究所使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株或质粒	特征	参考文献
Strains		
<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	Wild-type strain	[9]
<i>C. glabrata</i> ATCC 55	<i>his3Δtrp1Δura3Δ</i> mutant strain	[9]
<i>Cgasg1Δ</i>	<i>C. glabrata</i> ATCC 55(<i>asg1Δ::CgURA3</i>)	作者研究课题
<i>Cgasg1Δ/CgASG1</i>	<i>Cgasg1Δ</i> (pY13- <i>CgASG1</i>)	作者研究课题
Plasmids		
pY13	CEN6/ARSH4, <i>Amp</i> , <i>HIS3</i> , P _{TEF}	Turbo
pY13- <i>CgASG1</i>	CEN6/ARSH4, <i>Amp</i> , <i>HIS3</i> , P _{TEF} - <i>CgASG1</i>	作者研究课题

表 2 本课题研究所使用的引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称	引物序列 (5'→3')	目的
P1	ACATTATTGGTAACTGTTTTCCG	<i>CgASG1</i> 敲除
P2	AATATGAGGCACTGACATCGTTTTATTACAGACAGTCTGACAGT	<i>CgASG1</i> 敲除
P3	AGACTGTCTGTAATAAAACGATGTCCAGTGCCTCATAT	<i>CgASG1</i> 敲除
P4	CCATGTATTCTTCACCAGGTCAGTTTCCTATTCTTTT	<i>CgASG1</i> 敲除
P5	TGAAAAGAATAGGAACTGACCTGCTGAAGGAATACATG	<i>CgASG1</i> 敲除
P6	AGAGTATGCTTTAGGTAGGATG	<i>CgASG1</i> 敲除
P7	GTGGAGGTGGAAGTATCT	验证
P8	TCAGTTTCCTATTCTTTT	验证
P9	ACCATCGTTATCAAGACT	验证
P10	CGGGATCC ATGAACTTGACTGTGCCAC	<i>CgASG1</i> PCR
P11	CGGAATTC TTAGCGCTTATTAGTAGGTAAT	<i>CgASG1</i> PCR

注:“单下划线”表示同源序列;“双下划线”表示 *Bam*H I 或 *Eco*R I 限制性内切酶位点。

Doc EZ 型凝胶成像仪, 美国 Bio-Rad 公司产品; DYY-6D 型电泳仪, 北京六一仪器厂制造; IQ5 型荧光定量 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司产品; UV2450 型紫外可见分光光度计, 日本 Shimadzu 公司产品; RF-5310PC 型荧光分光光度计, 日本 Shimadzu 公司产品。

1.1.3 培养基 1) YPD 培养基(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, 酵母粉 10; 2) MM 培养基(g/L): 葡萄糖 20, 尿素 7, 乙酸钠 3, 磷酸二氢钠 5, 七水硫酸镁 0.8; 3) YNB 培养基(g/L): 葡萄糖 20, 无氨基酵母氮源 6.7; pH 5.2。根据不同实验需要更换碳源、加盐、H₂O₂ 或调整 pH; 4) LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, 氯化钠 10。以上培养基可加琼脂粉 20 g/L 制成相应的固体培养基。

1.2 菌株构建方法

1.2.1 基因 *CgASG1* 的敲除与验证 基因 *CgASG1* 的敲除与验证按照图 1 进行。以 *C. glabrata* ATCC 2001(wild-type strain, *wt*) 的基因组为模板, 分别以 P1 和 P2 为引物扩增 *CgASG1* 的左臂(L), 以 P3 和 P4 为引物扩增标记基因 *CgURA3*(M), 以 P5 和 P6 为引物扩增 *CgASG1* 的右臂(R)。按照图 1(a)所示原理进行融合 PCR 构建敲除框 *CgASG1-LMR*。通过连接 pMD19-T vector、转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 以及测序验证此敲除框序列的正确性, 将大量扩增的高浓度敲除框电击转化到受体菌株 *C. glabrata* ATCC 55 的感受态细胞中, 在基因组上 *CgASG1* 序列两端发生同源重组, 尿嘧啶缺陷型菌

株恢复合成尿嘧啶的能力, 经不含尿嘧啶、含有组氨酸和色氨酸的 MM 平板筛选, 提取转化子的基因组, 按照图 1(b)所示原理以 P7/P8 和 P7/P9 为引物进行转化子的验证。

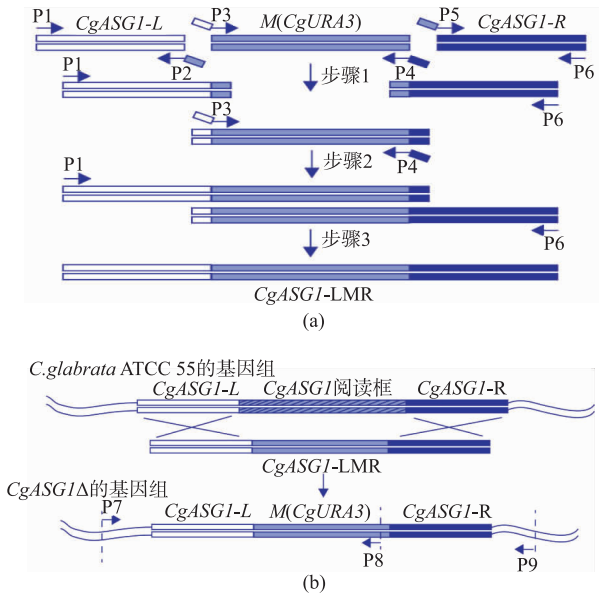


图 1 突变菌株构建及验证示意图

Fig. 1 Construction and verification of the mutant strain

1.2.2 基因 *CgASG1* 的回补与验证 以野生型菌株 *wt* 的基因组为模板, 以 P10 和 P11 为引物扩增基因 *CgASG1*。将该基因序列与表达载体 pY13 经限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 消化得到相同的粘性末端, 连接酶切产物并转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 得到如图 2 所示重组质粒 pY13-*CgASG1*, 通过

PCR 和双酶切验证其正确性。将构建好的表达质粒电击转化 *CgASG1* 缺失菌株的感受态细胞,获得质粒的细胞可自主合成组氨酸,涂布不含尿嘧啶和组氨酸、含有色氨酸的 MM 培养基进行筛选,通过质粒酶切及表型观察进行验证。

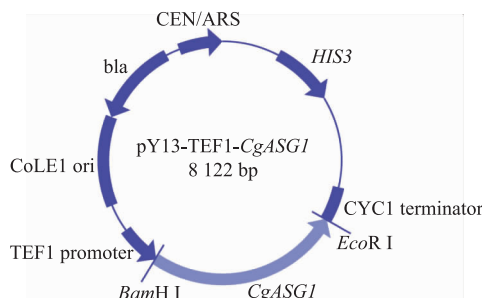


图2 重组质粒 pY13-CgASG1 的结构

Fig. 2 Structure of expression plasmid pY13-CgASG1

1.3 生长测定方法

1.3.1 平板生长实验 将待测 *C. glabrata* 单菌落接种于 20 mL 的 YNB 液体培养基中,30 ℃ 摇床培养 12 h 至对数生长期,测定菌体浓度并将菌悬液调节至 OD₆₀₀=1.0。以此为初始浓度,进行 5 次 10 倍梯度稀释,依次将 4 μL 菌液点种在待测固体培养基上,30 ℃ 培养 2 d,观察菌体的生长情况并记录。

1.3.2 生长曲线的测定 将待测 *C. glabrata* 单菌落接种于 20 mL YNB 液体培养基中,30 ℃ 摇床培养 12 h 至对数生长期,将菌液转接至装有 50 mL 不同条件的 YNB 液体培养基中,初始 OD₆₀₀=0.1,每隔一定的时间取样一次,测菌液在 600 nm 下的吸光值。以此吸光值为纵坐标,菌体生长时间为横坐标,比较不同 *C. glabrata* 菌株在不同胁迫条件下的生长情况。

1.3.3 细胞活性的测定 取不同时段(间隔 2 h)的菌液 200 μL,稀释至适当倍数(每块平板上的单菌落数控制在 30~300 个)后涂布 YPD 固体培养基,24 h 后进行单菌落计数,按照式(1)计算得出菌落数,

$$C=C_0 \times 5 \times d \quad (1)$$

上式(1)中: C 为菌落数,个/mL; C_0 为平板上单菌落数; d 为稀释倍数。

1.4 转录组测序

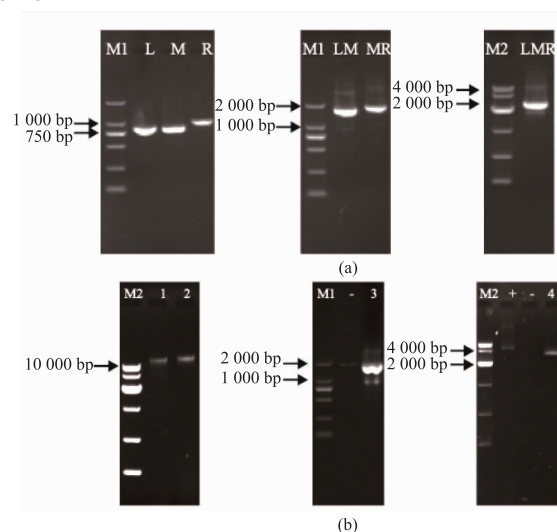
将菌株 *wt* 和 *Cgasg1Δ* 在 YNB 培养基中培养 12 h 至对数期,分别转接至 YNB 和 YNB-pH 2.0 液体培养基中培养 2 h,迅速离心菌体并用 PBS 缓冲液洗涤,于-70 ℃ 保存。将以上样品送至北京百迈客

生物科技有限公司进行 RNA 测序(RNAseq)。

2 结果与讨论

2.1 突变菌株 *Cgasg1Δ* 的构建及验证

以 *C. glabrata* 基因组为模板,经两次融合 PCR 将基因 *CgASG1-L*、*CgURA3* 和 *CgASG1-R* 连接起来,构建敲除框 *CgASG1-LMR*(见图 3(a))。对转化子进行 PCR 验证,发现以 P7/P8 为引物时,野生菌株 *wt* 无条带产生,转化子获得 1.8 kb 左右的片段(基因 *CgURA3* 及基因 *CgASG1* 的左臂);以 P7/P9 为引物时,野生菌株 *wt* 获得 4.5 kb 左右的片段(基因 *CgASG1* 及其左右臂),转化子获得 2.8 kb 左右的片段(基因 *CgURA3* 及基因 *CgASG1* 的左右臂)(图 3(b))。上述结果表明基因 *CgASG1* 成功被基因 *CgURA3* 替换,突变菌株构建成功,命名为 *Cgasg1Δ*。



M1-2 泳道分别代表 2 000 bp 和 10 000 bp 的 DNA marker; +/- 泳道代表分别以菌株 *wt* 基因组和水为模板进行 PCR 的对照;1-2 泳道分别代表菌株 *wt* 和突变菌株 *Cgasg1Δ* 的阳性转化子基因组;3-4 泳道分别代表使用引物 P7/P8 和 P7/P9 进行的 PCR 验证。

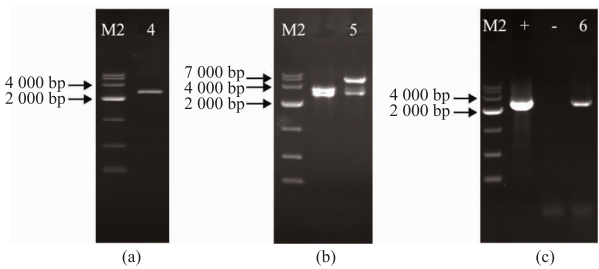
图3 突变菌株 *Cgasg1Δ* 的构建和验证

Fig. 3 Construction and verification of the mutant strain *Cgasg1Δ*

2.2 回补菌株 *Cgasg1Δ/CgASG1* 的构建及验证

将扩增得到的基因 *CgASG1*(见图 4(a))通过质粒 pY13 在突变菌株 *Cgasg1Δ* 中表达。经质粒双酶切验证,发现在 5.5 kb(pY13)和 2.5 kb(*CgASG1*)处出现条带(见图 4(b)),表达质粒 pY13-CgASG1(见

图2)构建成功。对酵母转化子进行菌落PCR验证,获得2.5 kb的基因*CgASG1*(见图4(c)),回补菌株构建成功,命名为*Cgasg1Δ/CgASG1*。



M2 泳道代表 10 000 bp 的 DNA marker; +/- 泳道代表分别以基因 *CgASG1* 和水为模板进行 PCR 的对照;4 泳道代表 *CgASG1* 基因片段;5 泳道代表 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶解 pY13-*CgASG1*;6 泳道代表 *Cgasg1Δ/CgASG1* 阳性转化子的菌落 PCR 验证

图 4 回补菌株 *Cgasg1Δ/CgASG1* 的构建和验证

Fig. 4 Construction and verification of the reconstructed strain *Cgasg1Δ/CgASG1*

2.3 缺失 *CgASG1* 基因对光滑球拟酵母酸胁迫耐受性的影响

根据文献报道,转录因子 Asg1p 在 *S. cerevisiae* 和 *C. albicans* 中的生理功能是影响非发酵性碳源中的生长能力^[12-13],那么在 *C. glabrata* 中 Asg1p 是否存在类似功能呢? 比较了菌株 *wt*、*Cgasg1Δ* 和

Cgasg1Δ/CgASG1 在 6 种不同的非发酵性碳源平板上的生长情况,结果如表 3 所示。突变菌株 *Cgasg1Δ* 在以乙酸钠、柠檬酸钠、甘油或乙醇为唯一碳源的 YNB 培养基上与野生型菌株 *wt* 表现出相同的生长情况,但在乙酸和乳酸为唯一碳源的平板上生长微弱。随后比较了以乙酸和乙酸钠为唯一碳源时细胞的生长情况,发现在乙酸为碳源时生长微弱的原因在于乙酸引起的 pH 下降。为此对比分析了野生型菌株 *wt* 和突变菌株 *Cgasg1Δ* 在 pH 2.0~8.0 时的细胞生长情况,结果列于表 3,发现突变菌株 *Cgasg1Δ* 在 pH 4.0~8.0 范围内表现出与野生型菌株相同的生长趋势,但在 pH 3.0 时生长受到抑制,而 pH 2.0 时则无法生长。而回补菌株 *Cgasg1Δ/CgASG1* 在任何培养基上均表现出与野生型菌株 *wt* 相同的生长表型(见表 3)。上述结果表明,转录因子 CgAsg1p 在 *C. glabrata* 抵御酸胁迫中发挥着重要作用。

比较了 pH 2.0 条件下野生型菌株 *wt*、突变菌株 *Cgasg1Δ* 的细胞活性变化,结果发现野生型菌株 *wt* 的细胞活性随着时间缓慢增长,12 h 时比 0 h 增加了 20 倍,而突变菌株 *Cgasg1Δ* 在 pH 2.0 时的细胞活性则随着培养时间迅速降低,12 h 时降低了 90%(见表 4)。以上结果进一步证实了缺失 *CgASG1* 基因降低了 *C. glabrata* 对酸性环境的耐受能力。

表 3 不同条件下光滑球拟酵母菌株的生长表型

Table 3 Phenotypes of *Candida glabrata* strains under various conditions

Strain	碳源							pH		
	葡萄糖	乙酸钠	乙酸	乳酸	柠檬酸钠	甘油	乙醇	4.0~8.0	3.0	2.0
<i>wt</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	X
<i>Cgasg1Δ</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	X	-
<i>Cgasg1Δ/CgASG1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	X

注: + 代表正常生长; X 代表被抑制的生长; - 代表不能生长(或生长严重受损)。

表 4 野生型菌株 *wt* 和突变菌株 *Cgasg1Δ* 在 YNB-pH 2.0 中的菌落数

Table 4 Number of colonies of *wt* and *Cgasg1Δ* strains in YNB-pH 2.0 medium

	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
<i>wt</i>	$(1.73 \pm 0.14) \times 10^7$	$(2.91 \pm 0.12) \times 10^7$	$(4.13 \pm 0.30) \times 10^7$	$(4.13 \pm 0.27) \times 10^7$	$(6.01 \pm 0.45) \times 10^7$	$(1.56 \pm 0.13) \times 10^8$	$(3.69 \pm 0.48) \times 10^8$
<i>Cgasg1Δ</i>	$(2.58 \pm 0.22) \times 10^7$	$(1.75 \pm 0.16) \times 10^7$	$(1.00 \pm 0.08) \times 10^7$	$(2.64 \pm 0.36) \times 10^6$	$(1.26 \pm 0.06) \times 10^6$	$(3.64 \pm 0.24) \times 10^5$	$(6.45 \pm 0.61) \times 10^4$

2.4 缺失 *CgASG1* 基因对光滑球拟酵母转录组水平的影响

将野生菌株 *wt* 和突变菌株 *Cgasg1Δ* 分别用 pH 5.2 和 pH 2.0 进行处理,然后进行转录组测序,结果如图 5 所示。与野生菌株 *wt* 相比,突变菌株 *Cgasg1Δ* 中转录水平发生显著差异的基因主要参与

压力调控、氧化还原过程、跨膜转运、ATP 酶活性、细胞分裂、DNA 复制、重组和修复等相关的生物过程。其中,1)作为氧化应激反应转录因子 Skn7p 的靶基因,TRR1 通过影响硫氧还蛋白还原酶的活性调节氧化还原平衡^[14-15];2)Dad2p 是复合物 Duo1p-Dam1p-Dad1p 的一个亚基,基因 *DAD2* 和 *DUO1* 转

录水平的变化直接影响复合物连接着丝粒以及定位到纺锤体,进而影响细胞分裂^[16-17];3) *Pol2* 是 DNA 损伤时用于末端修复的一种主要的 DNA 聚合酶^[18], *Csm3* 可与另两种蛋白质 *Tof1* 和 *Mrc* 形成复合物,当 DNA 合成受阻时抑制用于复制的 MCM 解旋酶活性^[19],基因 *POL2* 和 *CSM3* 转录水平的变化影响 DNA 复制及修复。上述结果表明,缺失 *CgASG1* 基因改变了上述相关基因的转录水平,降低了光滑球拟酵母对酸胁迫的抵御能力。

综上, *C. glabrata* 中的转录因子 *Asg1p* 不参与细胞对非发酵性碳源的利用过程,但是在生物鲁棒性的维持中发挥重要作用。缺失基因 *CgASG1*,光滑球拟酵母在酸性环境中的生长能力降低,原因有:

1)酸性条件下 *ATPase* 活性相关基因的转录水平变化,使得细胞泵出质子的能力降低,胞内质子积累, pH 降低引起胞内 ROS 含量升高^[20],进而导致胞内代谢紊乱^[21];2)氧化还原相关基因转录水平的变化影响胞内氧化还原电势,进而改变细胞生长^[22];3)缺少转录因子 *CgAsg1p*,酸性环境下影响 DNA 复制、重组和修复,使细胞无法维持基因组稳定而导致活性降低^[23]等。基于此研究中发现转录因子 *CgAsg1p* 参与的生物过程,为了深入解析该转录因子的作用机制,下一步将从 *CgAsg1p* 直接作用的靶基因着手,通过蛋白质免疫共沉淀后测序,分析 *CgAsg1p* 结合的每一个靶基因,描绘该转录因子参与的调控网络。

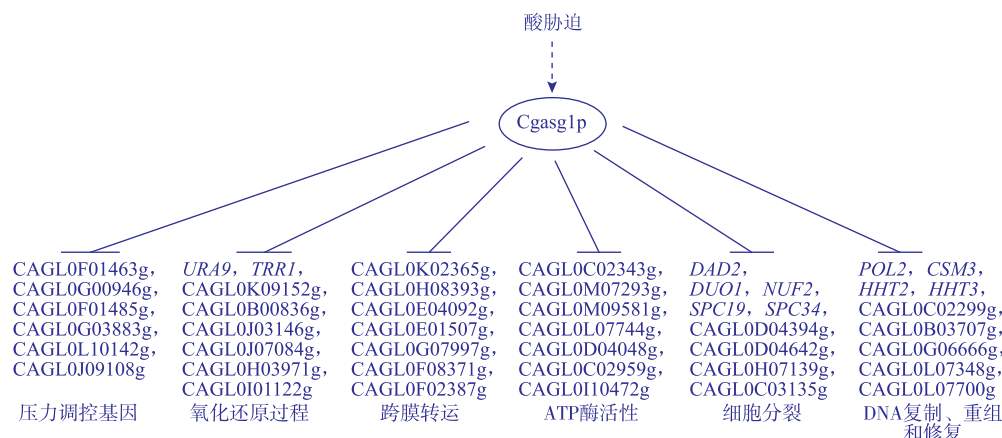


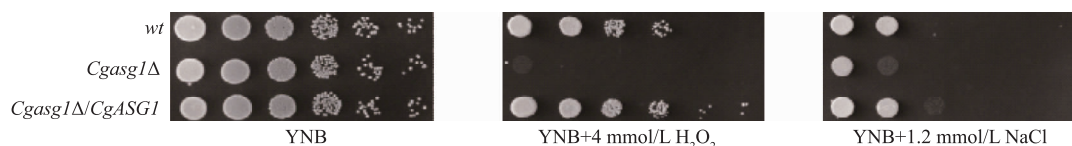
图 5 酸胁迫下转录水平发生显著变化的基因

Fig. 5 Significantly regulated genes in response to acid stress

2.5 缺失 *CgASG1* 基因对光滑球拟酵母氧化和高渗胁迫耐受性的影响

缺失 *CgASG1* 基因是否也会降低光滑球拟酵母抵御其他胁迫的能力呢? 研究菌株 *wt*、*Cgasg1Δ* 和 *Cgasg1Δ/CgASG1* 在无胁迫 (YNB)、氧化胁迫 (YNB+4 mmol/L H_2O_2) 及高渗胁迫 (YNB+1.2 mol/L NaCl) 下的生长,如图 6 所示,发现:1)突变菌株 *Cgasg1Δ* 在无胁迫时与野生型菌株 *wt* 表现出相同的生长情况,但在氧化胁迫和高渗胁迫时的生长受到明显抑

制;2)野生型菌株 *wt* 在氧化胁迫和高渗胁迫时的生长分别降低 56% 和 62%,突变菌株 *Cgasg1Δ* 分别降低 69% 和 71%;3)与野生型菌株 *wt* 相比,突变菌株 *Cgasg1Δ* 在无胁迫时的生长降低 16%,在氧化胁迫时降低 40%,在高渗胁迫时降低 35%。上述结果表明,基因 *CgASG1* 缺失不仅降低了 *C. glabrata* 对酸性环境的耐受能力,还降低了对氧化胁迫和高渗胁迫的抵御能力。



(a)不同压力条件下光滑球拟酵母的平板生长



3 结 语

