研究论文

# 高渗胁迫对光滑球拟酵母转录组的影响

徐 沙[1,2]， 刘立明[1,3]

（1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 糖生物学与生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122；3. 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**：采用表达谱芯片技术，研究了光滑球拟酵母细胞在不同渗透压条件下（860、1 765、2 603 mOs mol/kg 和 3 324 mOs mol/kg）的转录水平变化情况。结果表明，在高渗透压条件下，表达量大幅度提高的基因主要包括一些与细胞壁、细胞膜合成相关的基因，以及细胞膜上的信息素蛋白质基因。中心代谢途径（即糖酵解途径、三羧酸循环和氧化磷酸化途径）整体表现为显著上调，特别是参与 ATP 和 NADH 合成的相关基因。此外，对可能作为相容性溶质的氨基酸，如谷氨酸、脯氨酸、精氨酸的合成代谢途径的分析表明，脯氨酸和谷氨酸合成途径中的酶转录水平均有一定程度的提高，但是幅度不大；而精氨酸分解途径中的尿素羧化酶转录水平发生显著下调，其转录水平下降至 1/100 以下。

**关键词**：光滑球拟酵母；渗透压胁迫；转录组；中心代谢途径；氨基酸代谢途径

**中图分类号**：Q 936　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2014)12—1284—10

# Transcriptome Analysis of *Torulopsis glabrata* Under Hyperosmotic Stress

*XU Sha*[1,2]， *LIU Liming*[1,3]

（1. School of Biotechnology and Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology and Key Laboratory of Glycobiology and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China）

**Abstract**: Gene expression profiles of *Torulopsis glabrata* at different osmolarity (860, 1 765, 2 603 mOs mol/kg and 3 324 mOs mol/kg) were investigated by microarray. Significantly upregulated genes were mainly involved in regulation of cell wall, cell membrane and pheromone-regulated membrane proteins. The genes in central metabolic pathway, such as glycolysis, Krebs cycle and oxidative phosphorylation pathway, were mainly upregulated, especially the genes associated with ATP or NADH formation. Futhermore, the genes associated with potential key compatible solutes, such as proline, arginine and glutamate synthesis pathway were upregulated, and urea carboxylase which involved in arginine catabolism was drasticly downregulated to only about 1/100.

**收稿日期**：2014-03-21

**基金项目**：国家自然科学基金项目（31270079）；江苏省杰出青年基金项目（BK2012002）。

**作者简介**：徐 沙（1984—），女，江苏无锡人，工学博士，副教授，主要从事糖生物学和分子生物学的研究。

E-mail：xusha1984@jiangnan.edu.cn

**Keywords**: *Torulopsis glabrata*, osmotic stress, transcriptome, central metabolic pathways, amino acid metabolic pathways

转录组(Transcriptome)指一个活细胞在特定状态下所能转录出来的所有 mRNA 的总和,包括编码 RNA 和非编码 RNA[1]。研究转录组的一个重要方法是利用 DNA 芯片技术检测有机体基因组中基因的表达。从基因组 DNA 转录的 mRNA 的总和即转录组,也称为表达谱,是研究细胞表型和功能的一个重要手段。微生物在遭受某种刺激时,往往会伴随着某些基因表达水平的变化。在一个有生命的生物系统中,基因组是遗传信息的储存体,mRNA 是基因表达的中间体,功能性蛋白质是基因功能的执行体。因此,基因组和转录组两者的关系不是一一对应的[2-3]。

作者前期研究发现,光滑球拟酵母(*Torulopsis glabrata*)在生产丙酮酸的过程中,随着 NaOH 的不断流加,发酵液渗透压逐渐提高,成为丙酮酸进一步积累的关键限制性因素[4]。作者所在研究室通过选育一株能在含有 70 g/L NaCl 的培养基中正常生长的突变株,使丙酮酸产量提高了 41.1%[5]。目前,国内外针对酵母应对渗透压胁迫的机制已有一些研究。Rep 等在研究高渗胁迫对酿酒酵母转录水平的影响时发现,多数上调基因的功能是编码渗透保护蛋白质或者是甘油、海藻糖和糖原代谢途径中的酶[6]。随后,Yale 等研究 NaCl 胁迫不同时间后(10、30 min 和 90 min)酿酒酵母转录水平的变化。结果表明,随着胁迫时间的延长,上调基因的数量逐渐增加,且与能量相关的基因表达随着胁迫时间的延长而升高,在 30 min 时出现峰值[7]。国内 Han Yanping 等对鼠疫耶尔森氏杆菌(*Yersinia pestis*)在高渗和高盐胁迫下的差异表达基因进行分析,结果发现那些合成渗透保护剂转运蛋白质和一系列致病因子的基因以及一些全局性转录因子都发生了上调[8]。

虽然已有文献报道了高渗胁迫对酵母转录组的影响,但在 *T. glabrata* 中尚未见文献报道。*T. glabrata* 发酵过程的主要产物丙酮酸,是糖酵解途径的最终产物,在后续的代谢中,将进入线粒体氧化生成乙酰 CoA,进入三羧酸循环,最终被氧化成 $CO_2$ 和水。其代谢过程中产生的 NADH 会进入氧化磷酸化途径,为细胞提供大量 ATP。因此中心代谢途径和能量代谢途径对丙酮酸生产来说非常重要。此外,已有研究表明,氨基酸是重要的微生物相容性溶质,可以保护细胞抵御渗透压胁迫的影响[9]。基于上述分析,本文着重讨论了糖酵解途径、三羧酸循环、氧化磷酸化和氨基酸代谢途径中关键酶转录水平的变化,以期能够从整体水平揭示特定生物学过程以及胁迫过程的分子机理,研究不同渗透压条件下基因转录水平的变化,为后续研究如何提高 *T. glabrata* 抵御高渗胁迫的能力提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

*T. glabrata* CCTCC M202019,为烟酸(NA)、硫胺素(B1)、吡哆醇(B6)和生物素(Bio)的营养缺陷型,由作者所在研究室自行筛选并保藏[9]。

### 1.2 培养基

**1.2.1 斜面和种子培养基** 葡萄糖 20 g/L,蛋白胨 10 g/L,$KH_2PO_4$ 1 g/L,$MgSO_4·7H_2O$ 0.5 g/L,琼脂 20 g/L(斜面培养基用)。

**1.2.2 发酵培养基** 葡萄糖 100 g/L,$NH_4Cl$ 7 g/L,$KH_2PO_4$ 5 g/L,$MgSO_4·7H_2O$ 0.8 g/L,乙酸钠 6 g/L,烟酸 4 mg/L,盐酸硫胺素 30 μg/L,烟酸吡哆醇 100 μg/L,生物素 10 μg/L,核黄素 50 μg/L,$CaCO_3$ 40 g/L(仅限摇瓶培养时调节 pH 用)。添加 NaCl 改变发酵培养基渗透压,0、30、50、80 g/L NaCl 对应的溶液渗透压分别为 860,1 765,2 603 mOs mol/kg 和 3 324 mOs mol/kg。培养基初始 pH 5.5。维生素液过滤除菌后加入。

**1.2.3 摇瓶培养** 从新鲜斜面上接一环菌入种子培养基(50 mL 置于 500 mL 的锥形瓶),于 30 ℃、200 r/min 下摇瓶培养 24 h 后,以体积分数 10%接种量接入发酵培养基。摇瓶发酵:500 mL 的锥形瓶中发酵培养基为 50 mL,温度 30 ℃,转速 200 r/min,发酵时间为 48 h。

### 1.3 渗透压测定

发酵液渗透压采用 OSMOMAT 030 冰点渗透压仪测定。

### 1.4 RNA 的提取与表达谱芯片分析

**1.4.1 总 RNA 抽提(Trizol 法)**

1)取对数生长中期的细胞,每 $2\times10^7$ 个细胞加

入 1 mL Trizol,在震荡混匀后,液氮研磨充分破碎细胞。

2) 按体积比 1:5 加入氯仿,充分混匀后室温静置 5 min。

3) 4 ℃,12 000 r/min 离心 15 min,取出上清液并转入新 1.5 mL 的离心管中,加入等体积异丙醇混匀,室温静置 5 min。

4) 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min, 去上清液后, 按体积比 2:5 向沉淀中加入体积分数 70%的乙醇,4 ℃、12 000 r/min 离心洗涤沉淀 15 min。

5) 沉淀室温晾干后, 加入适量无 RNA 酶水充分溶解,测定 $OD_{260}$ 和 $OD_{280}$ 值。

6) 按操作说明采用无 RNA 酶的 DNA 酶 I (Takara)处理。

**1.4.2** *基因芯片合成* 表达谱芯片由上海康成生物工程有限公司委托 Agilent 依据 *Torulopsis glabrata* CBS 138 基因组全序列设计合成。基于 Sanger 的测序结果表明,*T. glabrata* CCTCC M202019 的 18s rRNA 与该菌株 100%一致。

**1.4.3** *芯片杂交与洗涤* 委托上海康成生物工程有限公司完成。

**1.4.4** *芯片扫描与数据分析*

1) 通过 Agilent Scanner 获取图像并在 10 μm 条件下扫描像素值;

2) 图像使用 Feature Extraction 进行定量分析,得到图像定量和标准化处理数据。

## 2 结果与分析

### 2.1 转录组概况

*T. glabrata* 细胞在不同的渗透压条件下(860、1 765、2 603 mOs mol/kg 和 3 324 mOs mol/kg)培养到对数生长中期,收集细胞,采用全基因组芯片检测进行全基因组基因表达水平分析。根据 NCBI 数据库(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)中的 *T. glabrata* CBS138 基因信息,在芯片上设计了 5 280 个寡核苷酸探针,其中有 5 009 个基因的表达被检测出来。利用 GenBank、KEGG、UniProt 等公共数据库对未知基因进行高精度注释, 结果有 3 500 个以上的基因可以通过基因注释初步确定其功能。

一般认为基因表达水平发生 2 倍及以上变化的基因发生了差异表达。在渗透压为 1 765、2 603 mOs mol/kg 和 3 324 mOs mol/kg 的条件下, 相对于对照条件(860 mOs mol/kg),分别有 1 335、1 155 和 1 630 个基因转录水平上调,818、789 和 770 个基因转录水平下调。

### 2.2 GO 功能富集

对上述差异基因进行 GO 功能富集分析, 结果见图 1。高渗胁迫条件(1 765、3 324 mOs mol/kg)与正常条件(860 mOsmol/kg)相比,发生转录水平上调变化的基因主要集中于以下功能类群(图 1(a)):结合(binding)、DNA 结合(DNA binding)、核酸结合(nucleic acid binding)、蛋白激酶活性(protein kinase activity)、镁离子结合(magnesium ion binding)、激酶活性(kinase activity)、催化活性(catalytic activity)、核苷酸结合(nucleotide binding)、水解酶(hydrolase activity)、蛋白质结合 (protein binding)、肽活性(peptidase activity)、氧化还原酶活性(oxidoreductase activity)、ATP 结合 (ATP binding)、GTP 结合(GTP binding)、锌离子结合(zinc ion binding)、金属离子结合 (metal ion binding)、转运活性(transporter activity)、转移酶活性(transferase activity)、蛋白激酶活性(protein kinase activity)。

这些功能类群主要参与蛋白质翻译及修饰、能量代谢、核酸复制和物质转运等过程。转录发生下调的基因主要功能类群(图 1(b)),除与上调基因相同的部分之外, 还包括序列特异的 DNA 结合转录因子的活性 (sequence –specific DNA binding transcription factor activity)、解旋酶的活性(helicase activity)、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性(protein serine/threonine kinase activity) 和 RNA 结合(RNA binding)等。

进一步分析在较低高渗条件 (1 765 mOs mol/kg)和极端高渗条件下(3 324 mOs mol/kg)转录水平提高 10 倍以上的基因。其中已知功能的分别有 90 和 96 个(图 2,只选取提高倍数前 50 的基因作图)。其中细胞壁甘露糖蛋白质(CAGL0I06204g)、脂肪酸延伸蛋白质(CAGL0L08184g)的转录水平在较低的高渗条件下提高了 60 倍以上;另外,产孢调节蛋白质(CAGL0E04840g)、磷脂酶(CAGL0J11748g)、信息素调节膜蛋白质 4 (CAGL0M02167g) 和 10 (CAGL0G04433g)等的转录水平也都有不同程度的大幅提高。在极端高渗条件下(3324 mOs mol/kg),信息素调节膜蛋白质 10 甚至提高了 88.6 倍, 而脂肪酸延伸蛋白质和细胞壁甘露糖蛋白质的上调水

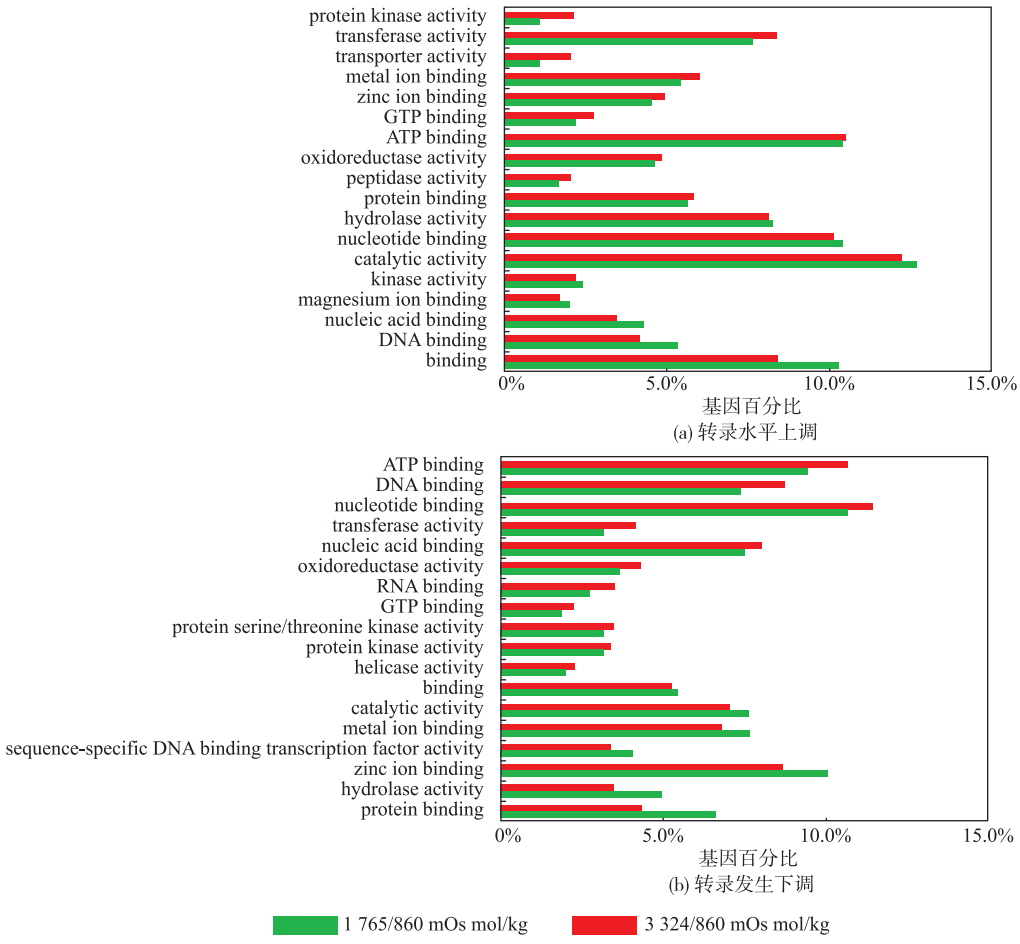
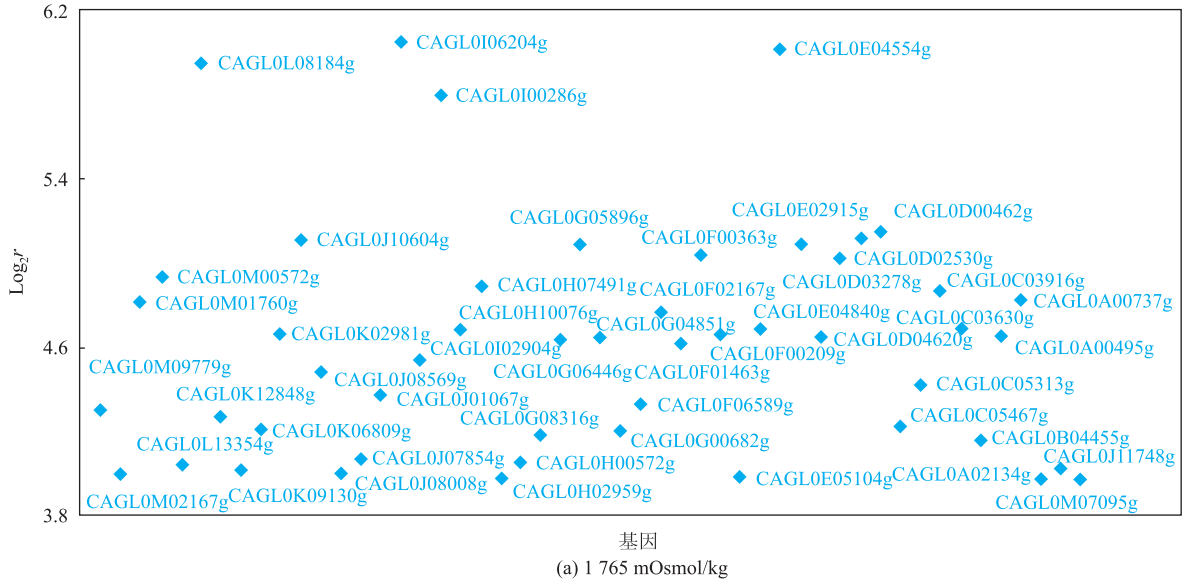
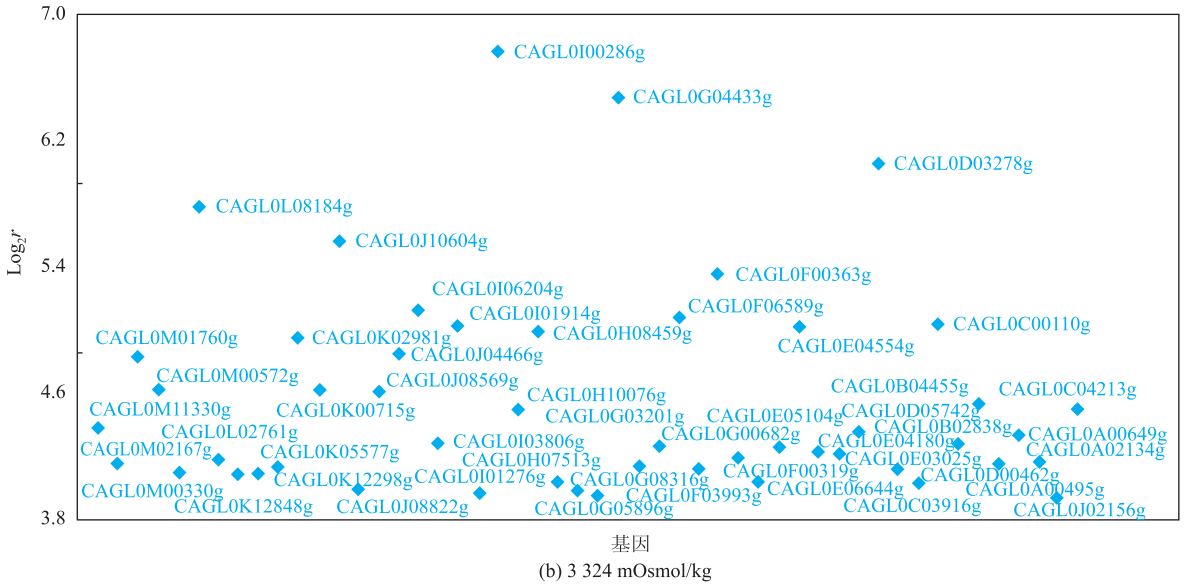



**图 1　高渗培养条件下差异表达基因的 GO 功能富集分析**

**Fig. 1　GO functional enrichment analysis of differentially expressed genes**






(b) 3 324 mOsmol/kg

**图 2　在高渗条件下表达水平上调 10 倍以上的基因**

**Fig. 2　Genes upregulated more than 10 times by hyperosmotic stress**

平相比较低的高渗条件略有下降,分别提高了 54.9 倍和 34.8 倍。除此之外,液泡碱性氨基酸转运蛋白质(CAGL0J01375g)的转录在极端高渗条件下(3 324 mOs mol/kg)增加了 11.70 倍,高于渗透压较低情况下(1 765 mOs mol/kg)的 2.70 倍。

在两种高渗条件下(各为 1 765 mOs mol/kg 和 3 324 mOs mol/kg)转录水平都提高 10 倍以上的基因共 58 个。这表明在这两种情况下,*T. glabrata* 细胞调控表达的机制可能有所不同。但是仍然可以发现,这些表达量大幅度提高的基因主要是细胞壁、细胞膜相关的和一些膜上的信息素蛋白质基因。因为细胞外环境的改变直接作用于微生物的细胞壁和细胞膜,胞外渗透压提高,胞内水分外流,随后胞内溶液浓度升高,从而导致细胞体积减小,肽聚糖层被破坏,并最终质壁分离。细胞壁和细胞膜最先感应到外界环境的改变,其受影响的程度可能是最为剧烈的。

## 2.3　糖酵解途径中的基因表达谱

糖酵解是将葡萄糖降解为丙酮酸并伴随着 ATP 生成的一系列反应。如表 1 所示,在高渗环境下,EMP 途径中有 7 个基因的转录水平发生了上调,这 7 个基因分别涉及到 6 种酶,即己糖激酶(CAGL0H07579g)、6-磷酸葡萄糖变构酶(CAGL0K03289g)、6-磷酸葡萄糖异构酶(CAGL0H05445g)、6-磷酸果糖激酶(CAGL0F08041g 和 CAGL0L10758g)、3-磷酸甘油酸脱氢酶(CAGL0J00451g)和丙酮酸激酶(CAGL0E05610g)。另外,在高渗条件下,有 1 个基因转录水平略微下调,即 1,6-二磷酸果糖酶(CAGL0H04939g)。但是,1,6-二磷酸果糖酶催化 1,6-二磷酸果糖为 6-磷酸果糖,是 EMP 途径的逆反应,其转录水平的下调对 EMP 途径的代谢有促进作用。

EMP 途径中有 3 个酶参与不可逆反应,分别是磷酸果糖激酶,己糖激酶和丙酮酸激酶,这 3 种酶调节着糖酵解的速度。研究结果发现,非极端高渗环境对己糖激酶、磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶的基因转录有一定的诱导作用,但在极端高渗条件下诱导作用不明显。总体而言,相比正常条件高渗环境下的酵母细胞 EMP 途径略有上调,但幅度不大,而且多数基因的表达水平只在渗透压相对较低的条件下(1 765 mOs mol/kg)有所提高,极端高渗条件下没有基因发生明显上调,说明 EMP 途径的转录水平和渗透压的影响关系不大。

## 2.4　三羧酸途径中的基因表达谱

三羧酸循环(Tricarboxylic acid cycle,TCA)在动植物、微生物细胞中普遍存在,不仅是糖代谢的核心途径,也是脂肪、蛋白质分解代谢的最终途径。如表 2 所示,*T. glabrata* 在高渗条件下,TCA 循环途径相关基因转录水平整体上调。α-酮戊二酸脱氢

表 1 糖酵解途径中的差异表达基因

Table 1 Differential expression genes in EMP pathway

| 基因名 | *A/CK | *B/CK | *C/CK | 注释 |
|---|---|---|---|---|
| CAGL0H07579g | 1.21 | 1.31 | 4.45 ↑ | 己糖激酶 |
| CAGL0K03289g | 1.70 | 2.10 ↑ | −1.04 | 6−磷酸葡萄糖变构酶 |
| CAGL0H05445g | 2.82 ↑ | 1.03 | 1.07 | 6−磷酸葡萄糖异构酶 |
| CAGL0H04939g | −2.05 ↓ | 1.72 | −1.63 | 1,6−二磷酸果糖酶 |
| CAGL0F08041g | 2.35 ↑ | 1.10 | −1.21 | 6−磷酸果糖激酶 |
| CAGL0L10758g | 2.08 ↑ | 1.16 | 1.43 | 6−磷酸果糖激酶 |
| CAGL0J00451g | 2.00 ↑ | 1.21 | −1.12 | 3−磷酸甘油酸脱氢酶 |
| CAGL0E05610g | 2.91 ↑ | 2.61 ↑ | 1.73 | 丙酮酸激酶 |

注:*A 1 765 mOs mol/kg;B 2 603 mOs mol/kg;C 3 324 mOs mol/kg;CK 860 mOs mol/kg;↑上调;↓下调

酶 E1 组分 (CAGL0G08712g)、柠檬酸合酶(CAGL0B03663g 和 CAGL0L09086g)、异柠檬酸脱氢酶(CAGL0I07227g 和 CAGL0B04917g)、苹果酸脱氢酶(CAGL0L05236g)、丙酮酸脱氢酶 E1 组分 β 亚基 (CAGL0K06831g) 和丙酮酸脱氢酶 E2 组分(CAGL0J10186g) 等 TCA 循环中的关键酶基因,均在高渗条件下表达被诱导。只有延胡索酸酶(CAGL0A01045g)、丙酮酸羧化酶(CAGL0F06941g)和琥珀酸脱氢酶(CAGL0C03223g)在极端高渗条件下基因表达水平受到抑制。

表 2 三羧酸循环途径中的差异表达基因

Table 2 Differential expression genes of TCA cycle

| 基因名 | *A/CK | *B/CK | *C/CK | 注释 |
|---|---|---|---|---|
| CAGL0G08712g | 3.38 ↑ | 2.87 ↑ | 1.64 | α−酮戊二酸脱氢酶 E1 组分 |
| CAGL0B03663g | 2.74 ↑ | 3.64 ↑ | 5.12 ↑ | 柠檬酸合酶 |
| CAGL0L09086g | 1.07 | 2.09 ↑ | 1.07 | 柠檬酸合酶 |
| CAGL0A01045g | −1.37 | −2.39 ↓ | −2.16 ↓ | 延胡索酸酶 |
| CAGL0I07227g | 1.53 | −1.17 | 2.09 ↑ | 异柠檬酸脱氢酶 |
| CAGL0B04917g | 2.57 ↑ | 4.23 ↑ | 2.07 ↑ | 异柠檬酸脱氢酶 |
| CAGL0L05236g | 3.91 ↑ | 3.13 ↑ | 5.02 ↑ | 苹果酸脱氢酶 |
| CAGL0F06941g | −1.20 | −1.27 | −2.61 ↓ | 丙酮酸羧化酶 |
| CAGL0K06831g | 4.80 ↑ | 4.81 ↑ | 2.17 ↑ | 丙酮酸脱氢酶 E1 β 亚基 |
| CAGL0J10186g | 3.65 ↑ | 3.31 ↑ | 1.87 | 丙酮酸脱氢酶 E2 组分 |
| CAGL0C03223g | −1.56 | −1.73 | −3.83 ↑ | 琥珀酸脱氢酶铁硫亚基 |

注:*A 1 765 mOs mol/kg;B 2 603 mOs mol/kg;C 3 324 mOs mol/kg;CK 860 mOs mol/kg;↑上调;↓下调

TCA 循环的多个反应都是可逆的,但是柠檬酸的合成及 α−酮戊二酸的氧化脱羧二步反应是不可逆的。因此三羧酸循环的调节部位有 3 个,即柠檬酸合酶、异柠檬酸脱氢酶和 α−酮戊二酸脱氢酶催化的反应。这 3 个酶催化反应都伴随着 ATP 的形成或 NADH 的产生 (进入氧化磷酸化途径最终形成 ATP)。在高渗条件下,这 3 个酶有部分基因的转录发生了上调。可能的原因是:环境渗透压过高,导致胞内 $Na^+$含量增加,并且对细胞具有毒害作用,触发 $Na^+/H^+$反向输送,逐出 $Na^+$,引入质子,需要消耗一定的能量。另外,细胞需要合成一些特定的相容性溶质来抵御渗透压胁迫,这些物质的合成也需要消耗能量。因此,细胞需要加快产能途径的代谢来满足微生物抵御胁迫的需要。

### 2.5 磷酸戊糖途径的基因表达谱

磷酸戊糖途径的主要作用是:产生 NADPH

(NADPH 不参与呼吸链,不产生 ATP),为细胞的各种合成反应提供还原力;生成磷酸核糖,为核酸代谢做物质准备;分解戊糖,其中间产物为许多化合物的合成提供原料。

如表 3 所示,磷酸戊糖途径在高渗条件下有 13 个基因 8 种酶转录水平上调,分别是:

葡萄糖激酶(CAGL0K11297g),葡萄糖-6 磷酸异构酶 (CAGL0H05445g), 磷酸葡糖酸内酯酶 (CAGL0I02200g), 核酮糖磷酸-3-异构酶 (CAGL0L05478g), 6-磷酸果糖激酶 (CAGL0F08041g 和 CAGL0L10758g), 5-磷酸核糖异构酶 (CAGL0L03740g), 核糖激酶 (CAGL0L08228g), 磷酸核糖焦磷酸激酶 (CAGL0C05181g、CAGL0D00550g、CAGL0I05500g、CAGL0K02541g) 和葡萄糖磷酸变位酶 (CAGL0M02981g)。其中核糖激酶上调幅度较大。

另外,有 5 个基因 4 个酶发生下调,分别是:6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (CAGL0J07612g), 1,6-二磷酸果糖酶 (CAGL0H04939g), 转醛醇酶 (CAGL0B03069g、CAGL0K04235g)和葡萄糖磷酸变位酶(CAGL0K07480g)。

表 3 磷酸戊糖途径差异表达基因

Table 3 Differential expression genes in pentose phosphate pathway

| 基因名 | *A/CK | *B/CK | *C/CK | 注释 |
|---|---|---|---|---|
| CAGL0K11297g | 2.36 ↑ | 2.73 ↑ | 1.48 | 葡萄糖激酶 |
| CAGL0H05445g | 2.82 ↑ | 1.03 | 1.07 | 葡萄糖-6 磷酸异构酶 |
| CAGL0J07612g | -1.78 | -1.31 | -2.92 ↓ | 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 |
| CAGL0I02200g | 2.61 ↑ | 2.51 ↑ | 1.51 | 磷酸葡糖酸内酯酶 |
| CAGL0L05478g | 1.07 | 2.20 ↑ | -1.16 | 核酮糖磷酸-3-异构酶 |
| CAGL0H04939g | -2.05 ↓ | 1.72 | -1.63 | 1,6-二磷酸果糖酶 |
| CAGL0F08041g | 2.35 ↑ | 1.10 | -1.21 | 6-磷酸果糖激酶 |
| CAGL0L10758g | 2.08 ↑ | 1.16 | 1.43 | 6-磷酸果糖激酶 |
| CAGL0L03740g | 4.72 ↑ | 1.89 | 1.70 | 5-磷酸核糖异构酶 |
| CAGL0B03069g | -1.07 | -1.24 | -2.22 ↓ | 转醛醇酶 |
| CAGL0K04235g | -1.86 | -1.25 | -3.37 ↓ | 转醛醇酶 |
| CAGL0L08228g | 6.33 ↑ | 3.78 ↑ | 3.20 ↑ | 核糖激酶 |
| CAGL0C05181g | 3.77 ↑ | 1.89 | 1.42 | 磷酸核糖焦磷酸激酶 |
| CAGL0D00550g | 2.53 ↑ | 1.20 | -1.23 | 磷酸核糖焦磷酸激酶 |
| CAGL0I05500g | 3.98 ↑ | 1.71 | 1.16 | 磷酸核糖焦磷酸激酶 |
| CAGL0K02541g | 2.46 ↑ | 2.55 ↑ | -1.01 | 磷酸核糖焦磷酸激酶 |
| CAGL0K07480g | -1.65 | -4.20 ↓ | -3.20 ↓ | 葡萄糖磷酸变位酶 |
| CAGL0M02981g | 2.32 ↑ | 1.37 | 3.48 ↑ | 葡萄糖磷酸变位酶 |

注:*A 1 765 mOs mol/kg;B 2 603 mOs mol/kg;C 3 324 mOs mol/kg;CK 860 mOs mol/kg; ↑上调; ↓下调

在磷酸戊糖途径的氧化脱羧阶段,6-磷酸葡萄糖脱氢酶的活性最低,是整个途径的限速酶。该酶的基因表达在高渗条件下没有明显变化,在极端高渗条件下转录水平甚至受到了抑制。而其他一些基因转录水平的提高,可能与合成特定相容性溶质需要某些中间产物有关。

### 2.6 氧化磷酸化途径的基因表达谱

氧化磷酸化途径是将营养物质最终氧化分解,生成 $CO_2$ 和水并释放出能量的过程, 称为生物氧化,是好氧条件下细胞能量的主要来源。如表 4 所示,氧化磷酸化途径转录水平整体呈现上调,有 26 个基因在高渗条件下转录水平提高。其中,$H^+$转运 ATP 酶的转录水平增加 10 倍以上,变化极为显著。此外,值得注意的是,多数差异表达的蛋白质,较低渗透压条件(1 765 mOs mol/kg)相比极端高渗条件(3 324 mOs mol/kg)转录上调幅度更大;而转录水平下调的 8 个基因 NADH 脱氢酶 (NADH dehydrogenase)、琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白质

(succinate dehydrogenase iron-sulfur protein)、琥珀酸脱氢酶黄素蛋白质亚基(succinate dehydrogenase flavoprotein subunit)、辅酶 Q-细胞色素 C 还原酶细胞色素 C1(ubiquinol-cytochrome c reductase cytochrome c1 subunit)、V-型 $H^+$-ATP 酶亚基 I(V-type $H^+$-transporting ATPase subunit I)、F-型 $H^+$-ATP 酶亚基 Δ(F-type $H^+$-ATPase subunit delta)、F-型 $H^+$-ATP 酶寡霉素敏感相关蛋白质(F-type $H^+$-ATPase oligomycin sensitivity conferral protein)和 F-型 $H^+$-ATP 酶亚基 h(F-type $H^+$-ATPase subunit h),在极端高渗条件下,转录水平下降幅度更大。可能的原因是,极端高渗条件使某些 RNA 转录酶的活性受到抑制,从而影响了部分基因的转录。总之,上述结果表明,高渗胁迫总体上促进了氧化磷酸化途径基因转录水平的提高,但部分基因在极端高渗条件下,转录水平反而呈现下降。

**表 4 氧化磷酸化途径的差异表达基因**

**Table 4 Differential expression genes of oxidative phosphorylation**

| 复合体 | 注释 | *A/CK | *B/CK | *C/CK |
|---|---|---|---|---|
| I | NADH 脱氢酶 α/β 亚复合体 1 | 1.06 | 2.42 ↑ | -1.08 |
| | NADH 脱氢酶 | 1.57 | -2.28 ↓ | -3.77 ↓ |
| II | 琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白 | -1.56 | -1.73 | -3.83 ↓ |
| | 琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白 | 2.03 ↑ | 1.56 | 1.18 |
| | 琥珀酸脱氢酶黄素蛋白亚基 | -1.89 | -2.81 ↓ | -2.91 ↓ |
| III | 辅酶 Q-细胞色素 C 还原酶核心亚基 1 | 1.98 | 2.21 ↑ | 1.16 |
| | 辅酶 Q-细胞色素 C 还原酶核心亚基 2 | 2.25 ↑ | 3.31 ↑ | 1.48 |
| | 辅酶 Q-细胞色素 C 还原酶亚基 7 | 3.66 ↑ | 4.56 ↑ | 2.58 ↑ |
| | 辅酶 Q-细胞色素 C 还原酶亚基 9 | 2.45 ↑ | 1.66 | 1.69 |
| | 辅酶 Q-细胞色素 C 还原酶铁硫亚基 | 2.23 ↑ | 1.56 | -1.05 |
| | 辅酶 Q-细胞色素 C 还原酶亚基 8 | 2.41 ↑ | 1.37 | 1.35 |
| | 辅酶 Q-细胞色素 C 还原酶亚基 10 | 2.36 ↑ | 2.56 ↑ | 3.28 ↑ |
| | 辅酶 Q-细胞色素 C 还原酶细胞色素 C1 | -1.12 | -1.3 ↑ | -2.82 ↓ |
| | 细胞色素氧化酶亚基 Vib | 2.08 ↑ | 2.00 ↑ | 1.61 |
| VI | 细胞色素 C 氧化酶亚基 VII | 2.09 ↑ | 2.41 ↑ | 1.86 |
| | 细胞色素 C 氧化酶亚基 IV | 3.94 ↑ | 5.74 ↑ | 2.57 ↑ |
| | F-型 $H^+$-ATP 酶亚基 ε | 2.13 ↑ | 2.22 ↑ | 2.63 ↑ |
| | F-型 $H^+$-ATP 酶亚基 f | 2.11 ↑ | 1.79 | 1.34 |
| | V-型 $H^+$-ATP 酶亚基 B | 2.36 ↑ | 1.65 | -1.22 |
| | V-型 $H^+$-ATP 酶亚基 I | -2.75 ↓ | -2.28 ↓ | -4.46 ↓ |
| V | F-型 $H^+$-ATP 酶亚基 Δ | -1.11 | -1.02 | -2.02 ↓ |
| | V-型 $H^+$-ATP 酶亚基 F | 1.75 | 2.33 ↑ | 3.96 ↑ |
| | V-型 $H^+$-ATP 酶 16kDa 亚基 | 2.04 ↑ | 2.54 ↑ | -1.02 |
| | V-型 $H^+$-ATP 酶亚基 I | 2.00 ↑ | 2.91 ↑ | 1.99 |
| | F-型 $H^+$-ATP 酶寡霉素敏感相关蛋白 | -1.10 | -1.29 | -2.78 ↓ |
| | F-型 $H^+$-ATP 酶亚基 b | 1.72 | 2.03 ↑ | -1.06 |
| | F-型 $H^+$-ATP 酶亚基 h | -1.16 | -1.52 | -2.17 ↓ |
| | F-型 $H^+$-ATP 酶亚基 γ | 1.90 | 2.07 ↑ | 1.05 |
| | V-型 $H^+$-ATP 酶 21kDa 蛋白脂质亚基 | 1.18 | 2.25 ↑ | -1.20 |
| | V-型 $H^+$-ATP 酶亚基 D | 1.41 | 2.18 ↑ | 1.11 |
| | F-型 $H^+$-ATP 酶亚基 g | 3.78 ↑ | 3.52 ↑ | 2.16 ↑ |
| | F-型 $H^+$-ATP 酶亚基 d | 2.63 ↑ | 1.94 | 1.27 |
| | F-型 $H^+$-ATP 酶亚基 α | 2.23 ↑ | 1.53 | -1.10 |
| | $H^+$转运 ATP 酶 | 25.25 ↑ | 30.19 ↑ | 17.80 ↑ |

注:*A 1 765 mOs mol/kg;B 2 603 mOs mol/kg;C 3 324 mOs mol/kg;CK 860 mOs mol/kg;↑上调;↓下调

### 2.7 信号转导途径基因表达谱

HOG-MAPK 途径(图 3)是绝大多数酵母抵御高渗胁迫的主要信号转导机制。

转录组分析结果表明,HOG-MAPK 途径中的关键基因 *Sho*1*p*、*Ste*20*p*、*Ste*11*p* 和 *Hog*1*p* 转录水平略有上调,但幅度不是很大;*Sln*1*p*、*Ssk*1*p*、*Pbs*2*p* 和 *Glo*1*p* 转录水平有所下调,其中 *Pbs*2*p* 在极端高渗条件下(3 324 mOs mol/kg)受到比较明显的抑制,转录水平下降至正常条件下(860 mOs mol/kg)的 12.6%。

总体来说,相对于酿酒酵母和其他大部分酵母而言,高渗胁迫对 *T. glabrata* 的 HOG-MAPK 信号转导途径影响不大,即高渗没有明显诱导 *T. glabrata* 信号转导途径的基因转录。这与研究室前期在研究 *T. glabrata* 发酵过程较少检测到甘油生成的结果是一致的。这也表明,*T. glabrata* 可能存在其他应对高渗胁迫的机制。

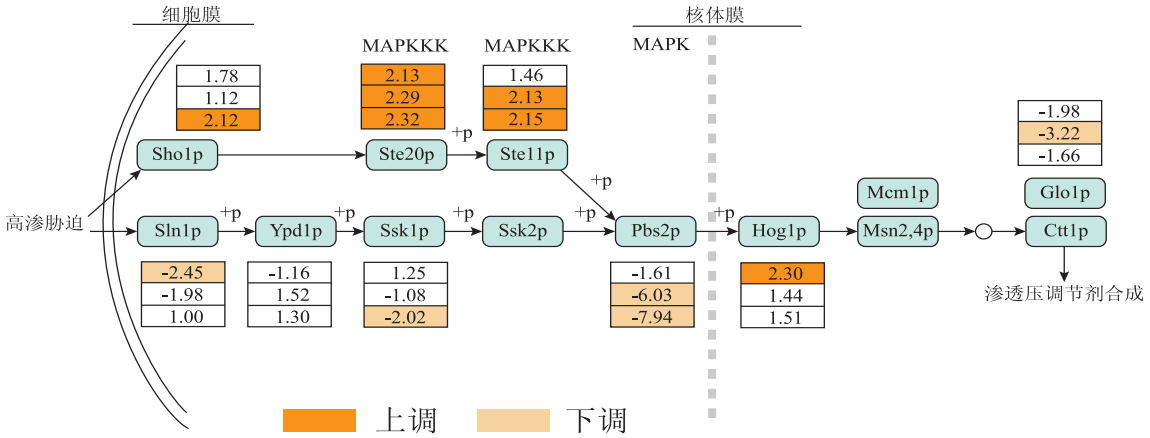



**图 3 HOG-MAPK 信号通路**

**Fig. 3 HOG-MAPK signaling pathway. Dark gray: upregulated; Light gray: downregulated**

### 2.8 氨基酸合成与代谢途径的基因表达谱

作者分析了谷氨酸、脯氨酸和精氨酸的合成与分解代谢途径中相关基因的表达。除精氨酸外,谷氨酸和脯氨酸都被证实可以在特定的微生物中积累,作为相容性溶质,抵御环境胁迫的影响。分析结果如表 5 所示。处于精氨酸分解途径中尿素羧化酶(CAGL0M05533g)转录水平明显下调,下降了 99%以上,表明在高渗胁迫的条件下精氨酸分解能力下降。由于精氨酸的代谢与含氮有机化合物的代谢有关,在后续的研究中可以考虑表达精氨酸合成途径中的关键酶,而不是敲除精氨酸分解途径中的酶来提高精氨酸在胞内的积累。

**表 5 氨基酸合成与代谢途径的基因表达**

**Table 5 Changes in genes expression of amino acids metabolic pathway**

| 基因名 | *A/CK | *B/CK | *C/CK | 注释 |
|---|---|---|---|---|
| CAGL0J07062g | −1.27 | 1.10 | 1.26 | 精氨酸酶 |
| CAGL0M05533g | −406.98 ↓ | −112.66 ↓ | −344.26 ↓ | 尿素羧化酶 |
| CAGL0M04499g | 5.54 ↑ | 6.45 ↑ | 1.66 | 脯氨酸脱氢酶 |
| CAGL0K05357g | −2.25 ↓ | −2.66 ↓ | −1.68 | 谷氨酰胺合成酶 |
| CAGL0I10791g | 3.24 ↑ | −1.72 | −1.25 | 鸟氨酸氨甲酰基 |
| CAGL0J03124g | 2.41 ↑ | 3.78 ↑ | 1.62 | N-乙酰基-γ-谷氨酰磷酸还原酶 |
| CAGL0B01507g | 2.07 ↑ | −1.06 | 1.84 | 乙酰鸟氨酸转氨酶 |
| CAGL0D03982g | −1.51 | 1.48 | −1.14 | 1-吡咯啉-5-羧酸脱氢酶 |
| CAGL0L01089g | 1.01 | −1.36 | −1.43 | 谷氨酸合酶 |
| CAGL0G05698g | 2.59 ↑ | 2.52 ↑ | 1.20 | 谷氨酸脱氢酶 |
| CAGL0D00176g | −1.95 | −1.12 | −1.26 | 谷氨酸脱氢酶 |
| CAGL0I08283g | 1.10 | −1.66 | 1.54 | 吡咯啉-5-羧酸酯还原酶 |

注:*A 1 765 mOs mol/kg;B 2 603 mOs mol/kg;C 3 324 mOs mol/kg;CK 860 mOs mol/kg;↑上调;↓下调

另外,脯氨酸和谷氨酸合成途径中的酶转录水平都有一定程度的提高,但是幅度不大。因此在后续的实验中可以考虑过量表达这些合成酶,或者通过在胞外补加脯氨酸或谷氨酸来促进胞内这两种氨基酸的积累,达到提高细胞抗胁迫能力的目的。

## 3 讨 论

中心代谢途径是最重要的葡萄糖代谢途径,也是重要的产能途径,有部分酶的基因在高渗条件下差异表达。在糖酵解途径中,6-磷酸葡萄糖变构酶(CAGL0K03289g)在渗透压为 2 603 mOs mol/kg 的条件下,转录水平发生上调。该酶催化 α-6-磷酸葡萄糖到 β-6-磷酸葡萄糖的反应,可能会在一定程度上影响糖酵解途径的碳通量。总体而言,发酵液渗透压的提高诱导糖酵解途径的转录发生上调,特别是丙酮酸激酶(CAGL0E05610g)在渗透压为 1 765 mOs mol/kg 和 2 603 mOs mol/kg 两个条件下,转录水平分别上调 2.91 倍和 2.61 倍。已有研究表明,与能量相关的基因表达会随着高渗胁迫时间的延长而提高,特别是呼吸和能量代谢相关的基因。在酿酒酵母中,盐胁迫 30 min 后,被诱导表达的 ORFs(open reading frames,开放阅读框)中有 9.1% 是电子传递链的组分,例如细胞色素和 ATP 合成酶复合体等[7]。本研究中发现,在高渗条件下与能量相关代谢途径(如三羧酸循环、氧化磷酸化途径等)的基因多数表达水平提高,尤其是那些参与产生 ATP 或形成 NADH 的基因。在有氧条件下,胞内 NADH 通过氧化磷酸化途径合成 ATP。在氧化磷酸化过程中有 5 个酶复合体,其成分非常复杂。总体而言,复合体 III、IV、V 的转录水平都有明显上调,而复合体 I 和 II 可能略有下调。氨基酸是一类重要的相容性溶质,糖酵解途径和三羧酸循环为其合成提供重要的前体物质。谷氨酸合成酶(CAGL0L01089g)催化 α-酮戊二酸合成谷氨酸,但研究发现该酶的转录水平并没有发生明显上调。而催化谷氨酸代谢形成脯氨酸或精氨酸的吡咯啉-5-羧酸脱氢酶(CAGL0D03982g)和 N-乙酰谷氨酸转移酶(CAGL0F06501g)转录水平都发生了明显的上调。该结果说明 *T. glabrata* 可能与某些植物细胞类似,具有积累精氨酸或脯氨酸抵御渗透压胁迫的生理机制。

## 4 结 语

综上所述,中心代谢途径、能量代谢途径和氨基酸代谢途径对 *T. glabrata* 抵御渗透压胁迫具有重要影响。作者在后面的研究中将对上述 3 个途径进行调控和改造,如通过增强 *T. glabrata* 产生 ATP,在 *T. glabrata* 胞内过量积累精氨酸、脯氨酸等手段,达到提高 *T. glabrata* 抵御渗透压胁迫能力的目的。

## 参考文献:

[1] Yonekura-Sakakibara K,Fukushima A,Saito K. Transcriptome data modeling for targeted plant metabolic engineering [J]. **Curr Opin Biotechnol**,2013,24(2):285-290.
[2] Rossouw D,van den Dool A H,Jacobson D,et al. Comparative transcriptomic and proteomic profiling of industrial wine yeast strains[J]. **Appl Environ Microbiol**,2010,76(12):3911-3923.
[3] Sun N,Pan C,Mann M,et al. Quantitative proteome and transcriptome analysis of the archaeon *Thermoplasma acidophilum* cultured under aerobic and anaerobic conditions[J]. **J Proteome Res**,2010,9(9):4839-4850.
[4] Xu S,Zhou J W,Liu L M,et al. Proline enhances *Torulopsis glabrata* growth during hyperosmotic stress [J]. **Biotechnol Bioproc E**,2010,15(2):285-292.
[5] Liu L M,Xu Q L,Li Y,et al. Enhancement of pyruvate production by osmotic-tolerant mutant of *Torulopsis glabrata* [J]. **Biotechnol Bioeng**,2007,97(4):825-832.
[6] Rep M,Krantz M,Thevelein J M,et al. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock-Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes [J]. **J Biol Chem**,2000,275(12):8290-8300.
[7] Yale J,Bohnert H J. Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity[J]. **J Biol Chem**,2001,276(19):15996-16007.
[8] Han Y P,Zhou D S,Pang X,et al. Comparative transcriptome analysis of *Yersinia pestis* in response to hyperosmotic and high-salinity stress[J]. **Res Microbiol**,2005,156(3):403-415.
[9] Xu S,Zhou J W,Liu L M,et al. Arginine:A novel compatible solute to protect *Candida glabrata* against hyperosmotic stress[J]. **Process Biochem**,2011,46(6):1230-1235.