研究论文

DOI:10.3969/j.issn. 1673–1689.2018.08.010

osw2 对酿酒酵母孢子固定化酶影响的分析

赵 强， 李子杰， 中西秀树， 高晓冬*

（江南大学 生物工程学院，江苏 无锡，214122）

摘要： 构建了 α–半乳糖苷酶（Mel1p）的多拷贝质粒 pRS426–*TEF*$_{pr}$–*MEL1*，转入酿酒酵母野生型 AN120 及 *osw2*Δ 突变株并进行固定化酶活性测定。实验分别选取蜜二糖、棉子糖（三糖）与水苏糖（四糖）3 种低聚寡糖作为 Mel1p 的底物，检测两种菌株孢子固定化酶对这 3 种底物的催化活性，结果表明野生型 AN120 酵母孢子壁的孔径最大只允许介于三糖和四糖之间的底物通过，四糖不能通过；而 *osw2*Δ 突变株酵母孢子壁的孔径可以允许四糖通过。通过孢子固定化酶保护性实验，发现孢子固定化酶可以完全抵抗 2% SDS 的处理，也可部分抵抗 10% SDS 的处理。通过 8 mol/L 尿素处理后，酶活检测发现野生型 AN120 酵母孢子可阻挡尿素对孢子固定化酶的影响，而 osw2Δ 孢子不能；蛋白免疫印迹分析进一步表明，尿素处理后野生型 AN120 酵母孢子固定化酶的含量几乎不变，而 *osw2*Δ 突变株孢子固定化酶的含量明显降低，说明尿素可进入 *osw2*Δ 突变株孢子内部溶解并降低固定化酶的含量，但对 AN120 酵母孢子无影响。本研究也在多种突变株孢子中表达 Mel1p，并进行活性比较，发现 *osw2*Δ，*osw2*Δ*ydl186w*Δ 及 *osw2*Δ*ydr326c*Δ 突变株固定化酶均有很高的催化活性。

关键词： 酿酒酵母孢子；α–半乳糖苷酶；固定化酶

中图分类号：Q 786　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1673—1689(2018)08—0845—08

Analysis of *osw2* Effect on *Saccharomyces cerevisiae* Spore Immobilized Enzyme

ZHAO Qiang， *LI Zijie*， *NAKANISHI Hideki*， *GAO Xiaodong**

（School of Biotechnology，Jiangnan University，214122 Wuxi，China）

Abstract： In this study，the multicopy plasmid pRS426-*TEFpr–MEL1* expressing α- galactosidase enzyme （Mel1p） was transformed into the *Saccharomyces cerevisiae* AN120 wild type and *osw2*Δ mutant strains. Three different oligosaccharides （melibiose，raffinose and stachyose） were used as substrates to detect the catalytic activity of immobilized enzyme on yeast spores. The results indicated that the pore size of AN120 wild-type spore wall was larger than trisaccharide but smaller than tetrasaccharide；however，the pore size of *osw2*Δ mutant yeast spore wall was larger than

收稿日期： 2016–01–05

基金项目： 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目（JUSRP311A02）；教育部科学技术研究重大项目（313027）；中国博士后科学基金项目（2014M551500）。

* **通信作者：** 高晓冬（1965—），男，浙江乌镇人，农学博士，教授，博士研究生导师，主要从事细胞分子生物学，生物化学，糖生物学等方面的研究。E–mail：xdgao@jiangnan.edu.cn

引用本文： 赵强，李子杰，中西秀树，等. *osw2* 对酿酒酵母孢子固定化酶影响的分析[J]. 食品与生物技术学报，2018，37(08)：845–852.

tetrasaccharide. The protective assay of immobilized enzyme suggested that enzyme immobilized on wild type and *osw2*Δ mutant spores can completely resist 2% SDS treatment and partially resist 10% SDS treatment. Wild type spore can resist the treatment by 8 mol/L urea,whereas *osw2*Δ mutant spore was sensitive to urea.Furthermore,western blot analysis showed that the amounts of enzyme in the wild type spores were stable after urea treatment,but the amounts of enzyme on *osw2*Δ mutant spores decreased significantly. These results demonstrated that urea could enter into o*sw2*Δ mutant spores and dissolve the enzyme,leading to the decrease of the amount of enzyme. Moreover,the immobilized enzymes on *osw2*Δ,*osw2*Δ*ydl186w*Δ and *osw2*Δ*ydr326c*Δ spores all have high catalytic activity.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae* spores,α-galactosidase,enzyme immobilization

酿酒酵母细胞当生长条件比较恶劣,缺乏氮源并在非发酵型的碳源存在下,进行减数分裂,进而产生单倍体孢子[1-2]。酿酒酵母营养细胞壁由两部分组成[3-4],从内到外依次是β-葡聚糖(β-glucan)和甘露糖蛋白(mannoprotein),然而成熟的孢子壁是一个具有四层的层状结构,由内到外依次是甘露糖蛋白、β-葡聚糖、壳聚糖(chitosan),以及二酪氨酸(dityrosine)层[5-6]。孢子壁的组装过程是有序一次组装的,只有前一层组装完成,后一层才能开始组装[7-8]。壳聚糖层和二酪氨酸层的主要作用是增强孢子对外界环境的抵抗能力[9-10]。*DIT1* 基因参与二酪氨酸在胞质中的合成反应即催化 L-酪氨酸形成二酪氨酸[11-12],敲除 *DIT1* 基因会导致二酪氨酸层不能形成,因而 *dit1*Δ 突变株孢子壁不含二酪氨酸层且最外层为壳聚糖层[13-14],但是壳聚糖层完整存在[15]。*osw2*Δ 突变株孢子壁虽然具有二酪氨酸层[16-17],但是却具有乙醚敏感性,可能是由于 *OSW2* 基因的缺失会导致二酪氨酸层的网状结构大小发生改变[18-19],具体作用机理目前还未知。

酵母孢子作为固定化酶的载体已经成功被应用,本实验室之前的研究已经证明 *osw2*Δ 突变株孢子是比较优良的固定化酶载体,而 *OSW2* 基因的具体功能以及 *osw2*Δ 突变株孢子与野生型孢子壁有哪些不同之处目前还不清楚[18],本研究以 α-半乳糖苷酶[20]作为目标蛋白,基于孢子固定化酶催化不同分子量大小底物的活性[21],找到 *osw2*Δ 突变株和野生型 AN120 孢子壁孔径大小的不同,并研究孢子壁对不同外界条件处理后的保护性作用。此外研究表明,在不同酵母孢子壁突变体中表达分泌型绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)时,不同突变体会表现出不同的 GFP 渗漏率,其中 *ydr326c*Δ 与 *osw2*Δ 相似均具有较低的渗透率,而 *ydl186w*Δ 的渗透率稍高一些[22]。本研究选取 *ydl186w*Δ、*ydr326c*Δ 两种基因缺陷型,并构建 *osw2*Δ*ydl186w*Δ 和 *osw2*Δ*ydr326c*Δ 双缺陷型菌株,研究不同突变株孢子固定化酶的催化活性。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

酿酒酵母菌株 AN120,缺陷型菌株 *dit1*Δ,*osw2*Δ,*ydl186w*Δ,*ydr326c*Δ,*osw2*Δ*ydl186w*Δ,*osw2*Δ*ydr326c*Δ,*MEL1* 和 *MEL1-3HA* 表达所用质粒 pRS426-*TEFpr* 相关信息见表 1,引物相关信息见表 2。

1.2 培养基

酵母营养生长与产孢培养基[23]

YPAD 培养基:酵母浸出粉 10 g,蛋白胨 20 g,腺嘌呤 30 mg,加水至 900 mL,121 ℃高压灭菌 15 min,培养基冷却至 55 ℃,加入 100 mL 单独灭菌的质量浓度为 200 g/L 的葡萄糖。

缺陷培养基(SD):无氨基酵母氮源(YNB)6.7 g,琼脂粉 20 g(固体培养基),加水至 900 mL,

121 ℃高压灭菌 15 min,培养基冷却至 55 ℃,加入 100 mL 单独灭菌的质量浓度为 200 g/L 的葡萄糖和 2 g 缺少相应氨基酸的氨基酸混合物。

预产孢培养基(YPAce):酵母浸出粉 10 g,蛋白胨 20 g,醋酸钾 20 g,加水定容至 1 L,121 ℃高压灭菌 15 min。

产孢培养基(2% KOAC):醋酸钾 20 g,加水定容至 1 L,121 ℃高压灭菌 15 min。

大肠杆菌生长培养基

LB 培养基：酵母浸出粉 5 g，胰蛋白胨 10 g，NaCl 10 g，加水至 1 L，121 ℃高压灭菌 15 min。

1.3 试剂与溶液配制

PCR 产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶电泳胶回收试剂盒、质粒小量抽提试剂盒，蜜二糖以及脱脂奶粉购于生工生物工程（上海）有限公司；DNA 连接酶、限制性内切酶购于 TaKaRa 公司（大连）；棉籽糖购置于 J&K 百灵威科技；水苏糖购于阿拉丁；β-葡聚糖酶、Percoll 梯度离心液、Glucose assay 试剂盒购于美国 Sigma-Aldrich 公司（上海）；Anti-HA Mouse mAb 一抗、Anti-βActin Mouse mAb 一抗、Goat-Anti-Mouse IgG，HRP 二抗购于 TRANS；SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒，ClarityTM Western ECL Substrate 显色剂购置于碧云天生物技术研究所。

表 1 本研究中所用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株/质粒	基因型	来源
AN120 (野生型，二倍体)	*MATα/MATa ARG4/arg4-NspI his3ΔSK/his3ΔSK ho::LYS2/ho::LYS2 leu2/leu2 lys2/lys2 RME1/rme1::LEU2 trp1::hisG/trp1::hisG ura3/ura3*	文献[3]
HW3 (*dit1Δ*，二倍体)	AN120 *dit1Δ::his5+/ dit1Δ::his5+*	文献[11]
HW83 (*osw2Δ*，二倍体)	AN120 *osw2Δ::his5+/osw2Δ::his5+*	文献[10]
HS2 (*ydl186wΔ*，二倍体)	AN120 *ydl186wΔ::his5+/ydl186wΔ::his5+*	文献[10]
HS3 (*ydr326cΔ*，二倍体)	AN120 *ydr326cΔ::his5+/ydr326cΔ::his5+*	文献[10]
HS9 (*osw2Δydl186wΔ*，二倍体)	*osw2Δ::his5+/osw2Δ::his5+ ydl186wΔ::TRP1/ydl186wΔ::TRP1*	本研究
HS10 (*osw2Δydr326cΔ*，二倍体)	*osw2Δ::his5+/osw2Δ::his5+ ydr326cΔ::TRP1/ydr326cΔ::TRP1*	本研究
pRS426-*TEF$_{pr}$-MEL1*	*URA3* 标记，多拷贝，含有 *TEF2* 启动子的 α-半乳糖苷酶表达基因 *MEL1*	本研究
pRS426-*TEF$_{pr}$-MEL1-3HA*	*URA3* 标记，多拷贝，含有 *TEF2* 启动子的 C 端 *3HA* 标记的 α-半乳糖苷酶表达基因 *MEL1*	本研究

DNS 试剂：首先溶解 6.9 g 结晶酚于 15.2 mL 10% NaOH 溶液中。并用水稀释至 69 mL，在此溶液中加入 6.9 g 亚硫酸氢钠；然后称取 255 g 酒石酸钾钠加到 300 mL 10% NaOH 溶液中，再加入 800 mL 1% 3,5-二硝基水杨酸溶液；将上述两种溶液混合即可[24-25]。

1.4 主要仪器

PCR 仪器购于日本 takara 公司；SDS-PAGE 凝胶电泳仪、凝胶成像仪购于美国伯乐公司；紫外分光光度计购于美国 GE；冷冻干燥机购于日本 EYELA；移液枪、台式高速冷冻离心机购于德国 Eppendorf；nano drop 2000 spectrophotometer 购于赛默飞；ImageQuantTMLAS 4000 mini 购于美国 GE。

表 2 本研究中的引物

Table 2 Primers used in this study

引物	序列
HXO294	ATTCCTGAATGTAGATTTGCTTACAGATAGCCAAGAAATATTAGAA AAATCGGATCCCCGGGTTAATTAA
HXO295	TGCTAGGAATAAAAAGAACAATAGATAGGACTATAGAAGCAAAGT GGAGTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
HXO296	GTGGACTCTATTCCTGAATG
HXO297	GCAACCTTATCGAAAGAGCC
HXO298	AATCACATATAAATATATAGAAGCAGCAGCTGTACAGATATCCCTAA CCACGGATCCCCGGGTTAATTAA
HXO299	CGAGTAGAATTTTCCTACTTGACTATATTAGAACGAAAAATGTTATT TTAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
HXO300	CTGTACAGATATCCCTAACC
HXO301	TATGTCCAGTAATGCACCAG

1.5 质粒和菌株构建

本实验室已有质粒 pRS424–TEF_{pr}–*MEL1* 和 pRS424 –TEF_{pr} –*MEL1* –*3HA*，在此基础上构建 pRS426 –TEF_{pr} –*MEL1* 和 pRS426 – TEF_{pr} –*MEL1* –*3HA*。构建方法如下：用 *Spe* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切处理质粒，并将它们连接到经过相同酶双酶切处理的质粒 pRS426–*TEFpr* 上。

osw2Δydl186wΔ 和 *osw2Δydr326cΔ* 双重缺陷菌株的构建均是在 *osw2Δ* 单倍体的基础上分别敲除 *ydl186wΔ* 和 *ydr326cΔ* 获得相应的双重缺陷型单倍体菌株，再将对应的单倍体菌株进行融合获得双重缺陷型双倍体菌株。双重缺陷菌株的具体构建方法如下：以 pFA6a–*TRP1* 位模板，分别以 HXO294 和 HXO295，HXO298 和 HXO299 为引物，通过 PCR 扩增获得相应的敲除片段，然后将获得的相应片段通过线性 DNA 醋酸锂法转化 *osw2Δ*4B 和 *osw2Δ*16D 单倍体酿酒酵母，涂布到选择性 SD–TRP 固体培养基进行选择性培养，挑取转化子，然后分别以 HXO296 和 HXO297，HXO300 和 HXO301 为验证引物，PCR 验证后获得 *osw2Δydl186wΔ* 和 *osw2Δydr326cΔ* 单倍体菌株，最后将成功敲除的相应单倍体菌株融合为双倍体菌株 *osw2Δydl186wΔ*（HS9）和 *osw2Δydr326cΔ*（HS10）。

1.6 α–半乳糖苷酶在酿酒酵母孢子上的表达、固定和纯化

将重组质粒 pRS426–TEF_{pr}–*MEL1* 分别转化到酿酒酵母野生型 AN120 菌株和 *osw2Δ*，*dit1Δ*，*osw2Δydl186wΔ*，*osw2Δydr326cΔ* 四种缺陷型菌株中，挑取阳性转化子在 SD–Ura 平板上扩培，接种适当酵母阳性转化子扩培菌株于 5 mL SD–Ura 液体培养基中，30 ℃过夜培养，取 1 mL 过夜培养液转接至 30 mL YPAce 中，30 ℃摇床培养约 24 h（至 OD_{600}=1.0），然后 6 000 r/min，离心 1 min 收集酵母细胞，并将菌体转接至 30 mL 2% 乙酸钾产孢培养基中，30 ℃摇床培养 1 d，通过显微镜观察测定产孢率，本实验所用孢子产孢率均在 90% 以上。为了获得单个游离孢子，需进行孢子的子囊破碎与纯化，具体操作方法如下：8 000 r/min，1 min 收集子囊孢子，并用无菌水洗 2 次，将收集的子囊孢子重悬于 1 mL 原生质体缓冲液中（50 mmol/L pH 7.5 磷酸缓冲液，1.4 mmol/L 山梨醇，40 mmol/L β–巯基乙醇），之后加入 20 μL Lyticase（1 mg β–葡聚糖酶溶于 500 μL 50% 的甘油中）。37 ℃处理 1 h，8 000 r/min，1 min 收集所有处理后的孢子，去除上清，沉淀用原生质体缓冲液洗 2 次，重悬于原生质体缓冲液中，充分混匀，超声破碎获得单个游离孢子。将获得的单个游离孢子用 Percoll 密度梯度离心的方法进行孢子纯化[26]，具体方法如下：首先，孢子经 0.5% Triton–X 洗涤数次，然后重悬于 1 mL 0.5% Triton–X 中，将其全部加至 Percoll 梯度离心液（从上到下依次为 50%，60%，70%，80% Percoll+10% 2.5 M 蔗糖和 0.5% Triton–X）最上层，15 000 g，4 ℃离心 1 h，离心后，去除上面三层，纯化的孢子位于最下层，加适量无菌水稀释后，9 000 r/min 离心 5 min，弃上清，细胞沉淀经 0.5% Triton–X 洗涤数次，离心收集细胞。将上述获得的湿孢子溶于适量无菌水，然后进行冷冻干燥：首先–20 ℃冷冻预处理约 2 h，然后在–50 ℃，25 Pa 下，置于冷冻干燥机 EYELA FD–1000 处理 72 h。经过处理后可获得干燥的孢子粉末。

1.7 检测野生型 AN120 菌株和 *osw2Δ* 菌株固定化酶对不同底物的催化效率

α–半乳糖苷酶（Mel1p）催化 α–1，6–半乳糖苷健的水解，本实验选取 3 种含有 α–1，6–半乳糖苷健且分子大小不同的糖作为底物，蜜二糖（melibiose）、棉子糖（raffinose）、水苏糖（stachyose），分别属于二糖、三糖、四糖。这 3 种糖均能被 α–半乳糖苷酶降解，蜜二糖被分解为半乳糖和葡萄糖；棉子糖被分解为半乳糖和蔗糖；水苏糖被分解为半乳糖和蔗糖。α–半乳糖苷酶酶活测定在 2 mL 反应体系中进行，反应体系为 1 mL 0.2 mol/L HAc–NaAc 缓冲液（pH 4.6），1 mL 5% 底物，10 mg 孢子。37 ℃下反应 2 h 后，沸水浴 10 min 终止反应。α–半乳糖苷酶酶活分析检测用高效液相色谱（HPLC）进行分析，检测条件为：Bio–Rad Aminex HPX–87C 色谱柱（250×4 mm），流动相为超纯水，流速为 0.3 mL/min，柱温为 80 ℃，使用 5450 示差检测器。一个酶活单位 U 定义为：37 ℃下，1 mg 孢子反应 10 min 所产生的半乳糖的量（mg）。

1.8 游离酶的制备和孢子固定化酶保护性实验检测

游离酶制备：转化有 *MEL1* 质粒的野生型酵母菌首先在 5 mL SD 缺陷型培养基中 30 ℃过夜预培养，然后经 30 mL SD 缺陷型培养基放大培养，离心收集上清，用 Amicon–Ultra 超滤管（截留分子量为

10 kDa)浓缩至 200 μL，每次实验取 10 μL。

SDS 处理方法介绍如下：称取 10 mg 的干孢子粉末，10 μL 浓缩蛋白，分别将它们悬浮溶解在 1 mL 2% 或 10% SDS 溶液中，然后加入 1 mL 5%的底物，37 ℃下反应 2 h，反应完成后沸水浴 10 min 终止反应。对照组为未经 SDS 处理，只将其溶解在缓冲液中。

8 mol/L Urea 处理方法：收集超声破碎纯化后的单个游离孢子，将其悬浮在 1 mL 8 mol/L 尿素中处理 1 h，对照组在缓冲液中静止 1 h，水洗 3 次，然后分开进行孢子冻干（用于固定化酶酶活测定）或 8 mol/L 尿素提取孢子蛋白（用于 western blot 分析蛋白表达量）。

当以蜜二糖为底物时，检测试剂盒为 Glucose assay 购买于美国 Sigma-Aldrich 公司；当以棉子糖为底物时，检测试剂为 DNS 试剂(除特殊说明外，本实验结果均由试剂盒检测得到)。

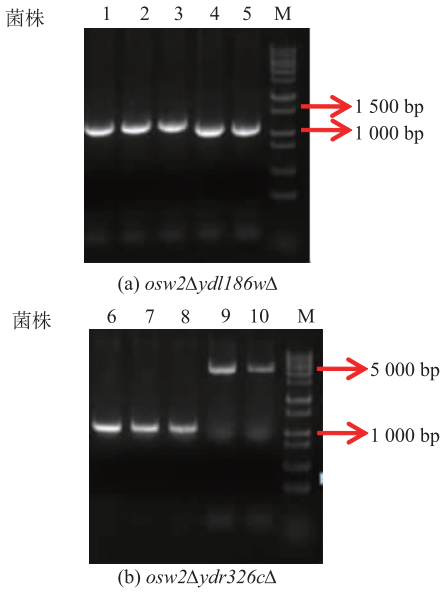
1.9　蛋白免疫印迹分析 8 M 尿素处理对孢子固定化酶的影响

将重组质粒 pRS426-*TEF*$_{pr}$-*MEL1*-*3HA* 转化酿酒酵母 AN120 野生型与 *osw2Δ* 突变株，产孢，收集超声破碎纯化后的单个游离孢子，用 8 mol/L 尿素处理 1 h，收集处理后的孢子，将其悬浮在 8 mol/L 尿素中，并加入一定量的蛋白酶抑制剂，置于冰上，玻璃珠破碎 1 h 使孢子完全破碎，孢子内蛋白全部溶解于尿素中，15 000 r/min 4 ℃，离心 30 min，收集上清，nanodrop 测定蛋白浓度。上样量为 50 μg 蛋白，保证总蛋白量一致，实验组 Anti-HA 为一抗，对照组 Anti-Actin 为一抗，二抗均为 Goat-Anti-Mouse IgG，HRP。

2　结果与讨论

2.1　双缺陷型突变菌株的 PCR 验证

由于基因敲除片段会有一定的概率插入到染色体的其他位置上，这样会导致选择性培养基生长的转化子有可能是假阳性转化子，为了避免这种情况的发生，要将转化子酵母基因组提取出来进行 PCR 验证。为了验证转化子 *osw2Δydl186wΔ* 和 *osw2Δydr326cΔ*，分别以 HXO296 和 HXO297，HXO300 和 HXO301 为引物，转化子酵母基因组作为模板，同时以 *osw2Δ* 突变株酵母基因组作为对照组模板，通过 PCR 扩增获得不同大小的产物，琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 所示，*osw2Δydl186wΔ* 目的条带大小为 1 156 bp，对照组为 1 089 bp，*osw2Δydr326cΔ* 目的条带大小为 1 106 bp，对照组为 4 528 bp。



M-DNA Marker；1-4B；2-16D；3-diploid；4-*osw2Δ*16D；5-*osw2Δ*diploid；6-4B；7-16D；8-diploid；9-*osw2Δ*16D；10-*osw2Δ*diploid

图 1　PCR 验证基因敲除

Fig. 1　PCR identify of gene knockout

2.2　野生型 AN120 与 osw2Δ 突变株酵母孢子壁孔径大小对比

为了比较野生型 AN120 和 *osw2Δ* 突变株酵母孢子壁的结构差异，分别选取 3 种分子量大小不同的糖作为底物，HPLC 检测对比两种孢子对不同底物的催化活性，结果如图 2 所示。3 种不同底物的孢子固定化酶活检测均说明 *osw2Δ* 突变株酵母孢子固定化酶的活性要高于野生型 AN120 酵母孢子，但随着底物分子量的增大，酵母孢子固定化酶的活性随之降低，野生型 AN120 与 *osw2Δ* 突变株之间孢子固定化酶的活性差异也逐步增大。图 2(b)显示，当以棉子糖(三糖)为底物时，野生型 AN120 酵母孢子固定化酶有一定活性，然而，图 2(c)显示，当以水苏糖(四糖)为底物时，野生型 AN120 酵母孢子固定化酶没有活性，由此可以猜测，野生型 AN120 酵母孢子壁的结构不能允许四糖大小的底物通过，如果把酵母孢子壁看作是具有一定孔径的结构，那么野生型 AN120 酵母孢子壁的的孔径大小介于三糖和四糖之间。图 2(c)显示，当以水苏糖(四糖)为底物时，*osw2Δ* 突变株酵母孢子固定化酶仍然有活性，因此，

osw2Δ 突变株酵母孢子壁的孔径大小应大于四糖。

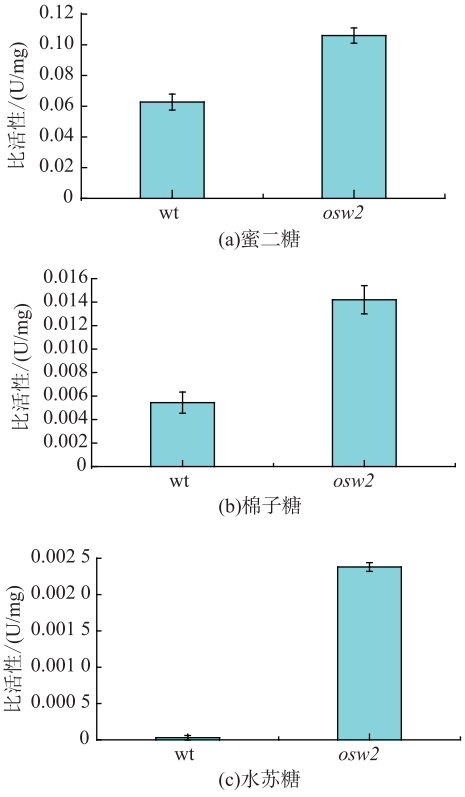


图 2　孢子固定化酶催化不同底物的活性

Fig. 2　Activity of encapsulated enzyme with different substrates

2.3　孢子固定化酶可抵抗一定浓度 SDS 的处理

为了研究野生型 AN120 与 *osw2Δ* 突变株酵母孢子对固定化酶的保护性作用，本实验分别用 2% 和 10% SDS 处理孢子固定化酶和游离酶，分别选取蜜二糖和棉子糖为底物来检测酶的相对活性，将各自未进行处理的酶活作为对照组，活性设为 1。以蜜二糖为底物，用 2% SDS 分别处理游离酶和孢子固定化酶，检测酶的相对活性，结果如图 3 所示。实验说明，孢子固定化酶几乎可以完全抵抗 2% SDS 的处理。以棉子糖为底物，用 10% SDS 分别处理游离酶和孢子固定化酶，检测酶的相对活性，结果如图 4 所示。实验说明，孢子固定化酶仍可部分抵抗 10% SDS 的处理。

2.4　酶活测定与蛋白免疫印迹分析尿素对孢子固定化酶的影响

尿素作为一种小分子物质，更容易进入孢子内，蛋白质中含有肽键，尿素中含有酰胺键，根据相似相容原理，尿素可以溶解蛋白质。实验用 8 mol/L 尿素处理野生型与 *osw2Δ* 突变株孢子固定化酶，以蜜二糖为底物，通过葡萄糖测定试剂盒测定固定化酶的活性，结果如图 5 所示。实验说明，*osw2Δ* 突变株孢子固定化酶经 8 mol/L 尿素处理后，酶活降低 80%，而野生型 AN120 孢子固定化酶经 8 mol/L 尿素处理后仅降低不足 30%，因此猜测 8 mol/L 尿素更容易进入 *osw2Δ* 突变株孢子中，溶解孢子固定化酶。为了验证这一猜测，进行 western blot 蛋白免疫印迹实验，直观分析孢子固定化酶的含量，结果如图 6 所示。经过 8 mol/L 尿素处理后，*osw2Δ* 突变株孢子固定化酶的含量降低很多，而野生型 AN120 却变化不大，结果更进一步说明了 8 mol/L 尿素可进入 *osw2Δ* 孢子内部，溶解固定化酶，降低固定化酶含量，降低酶活。

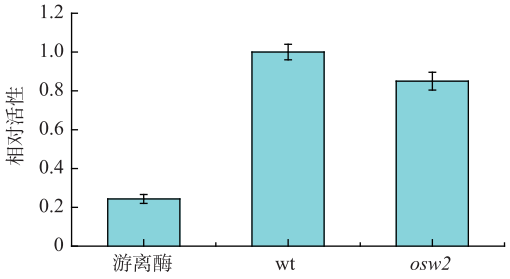


图 3　2% SDS 处理后游离酶和孢子固定化酶的相对活性

Fig. 3　Relative activity of enzyme after 2% SDS treatment

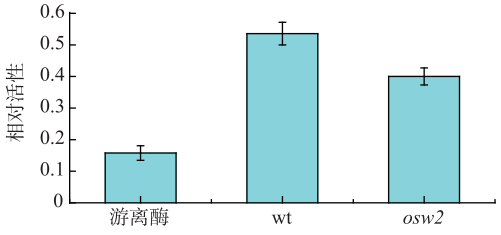


图 4　10% SDS 处理后游离酶和孢子固定化酶的相对活性

Fig. 4　Relative activity of enzyme after 10% SDS treatment

2.5　多种突变株孢子固定化酶活性测定

为了对比多种突变菌株孢子固定化酶的活性，分别选取蜜二糖和棉子糖为底物进行研究对比，结果如图 7 所示。当以蜜二糖为底物时，*osw2Δ*，*ydr326cΔ*，*osw2Δydl186wΔ*，*osw2Δydr326cΔ* 突变株固定化酶的活性均比较高，差异不大；而当以棉子糖为底物时，*osw2Δ*，*osw2Δydl186wΔ*，*osw2Δydr326cΔ* 三个突变株固定化酶的活性明显高于其他突变株与野生型。综合考虑，对于催化分子量较大的底物，*osw2Δ*，*osw2Δydl186wΔ*，*osw2Δydr326cΔ* 三个突变株固定化酶催化活性更有优势。说明这些突变株均能

成功固定化酶并具有活性，实验结果是由试剂盒测定并分析得到，由于测定方法的不同，所以比 HPLC 测定结果整体偏高，但趋势均为一致。

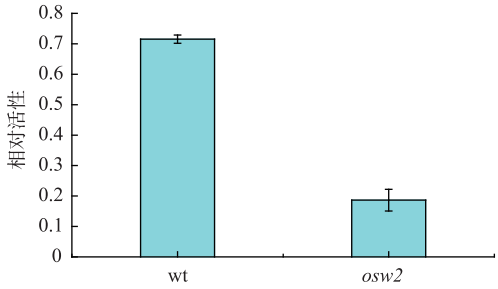


图 5　8 mol/L Urea 处理后孢子固定化酶的相对活性

Fig. 5　Relative activity of encapsulated enzyme after 8 mol/L Urea treatment

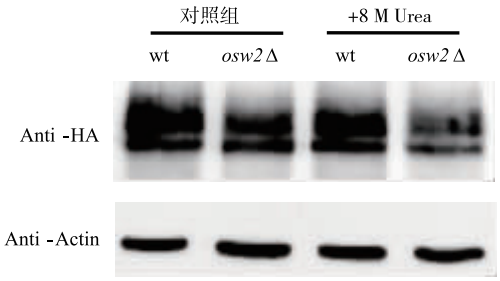
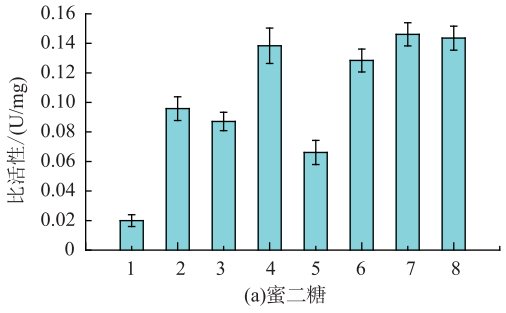
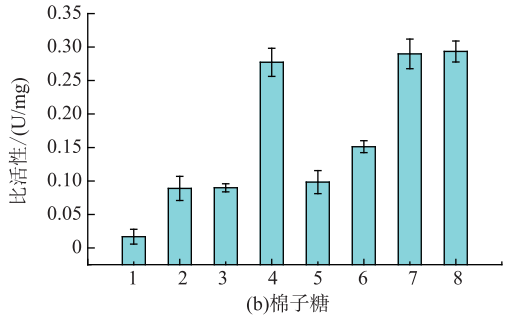


图 6　8 mol/L Urea 处理后 *osw2Δ* 孢子固定酶量明显降低

Fig. 6　*osw2Δ* spore encapsulate enzyme decrease significantly





1－wt（－）；2－wt（＋）；3－*dit1Δ*（＋）；4－*osw2Δ*（＋）；5－*ydl186wΔ*（＋）；6－*ydr326cΔ*（＋）；7－*osw2Δydl186wΔ*（＋）；8－*osw2Δydr326cΔ*（＋）；（－为不表达 Mel1p，＋为表达 Mel1p）

图 5　不同突变株固定化酶的活性

Fig. 5　Specific activity of different mutant strains encapsulate enzyme

3 结　语

本研究将 α－半乳糖苷酶成功固定在多种孢子突变菌株上，并着重研究了野生型与 *osw2Δ* 突变株固定化酶在对不同底物的催化效率，对外界不良因素的抵抗能力之间的差异等多方面因素，发现了野生型孢子壁最大只允许处于三糖与四糖之间分子量大小的物质通过，而对于 *osw2Δ* 突变株孢子壁可以允许四糖或者可能大于四糖的物质通过，在接下来的工作中希望通过尝试五糖、六糖等更大分子的糖作为底物进行研究，找到 *osw2Δ* 突变株以及其他突变株孢子壁结构的最大通过物质。通过 8 M 尿素处理实验的结果发现 *osw2Δ* 突变株孢子固定化酶的含量下降尤为明显，目前对于 *OSW2* 基因具体影响孢子壁结构的哪一部分还不清楚，后期将会深入研究 *OSW2* 基因的具体作用。

参考文献：

[1] KUPIEC M，BYERS B，ESPOSITO R E，et al. 11 Meiosis and Sporulation in Saccharomyces cerevisiae[J]. **Cold Spring Harbor Monograph Archive**，1997，21：889-1036.

[2] PIEKARSKA I，RYTKA J，REMPOLA B. Regulation of sporulation in the yeast Saccharomyces cerevisiae [J]. **Acta Biochimica Polonica**，2010，57(3)：241-250.

[3] LYNN R R，MAGEE P T. Development of the spore wall during ascospore formation in Saccharomyces cerevisiae [J]. **The Journal of Cell Biology**，1970，44(3)：688-692.

[4] WAGNER M，BRIZA P，PIERCE M，et al. Distinct steps in yeast spore morphogenesis require distinct SMK1 MAP kinase thresholds[J]. **Genetics**，1999，151(4)：1327-1340.

[5] NEIMAN A M. Ascospore formation in the yeast Saccharomyces cerevisiae[J]. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**，2005，69(4)：565-584.

[6] NEIMAN A M. Sporulation in the budding yeast Saccharomyces cerevisiae[J]. **Genetics**,2011,189(3):737-765.

[7] COLUCCIO A,BOGENGRUBER E,CONRAD M N,et al. Morphogenetic pathway of spore wall assembly in Saccharomyces cerevisiae[J]. **Eukaryotic Cell**,2004,3(6):1464-1475.

[8] SARKAR P,FLORCZYK M,MCDONOUGH K,et al. SSP2,a sporulation-specific gene necessary for outer spore wall assembly in the yeast Saccharomyces cerevisiae[J]. **Molecular Genetics and Genomics**,2002,267(3):348-358.

[9] NEIMAN A M. Prospore membrane formation defines a developmentally regulated branch of the secretory pathway in yeast[J]. **The Journal of Cell Biology**,1998,140(1):29-37.

[10] BRIZA P,ELLINGER A,WINKLER G,et al. Chemical composition of the yeast ascospore wall. The second outer layer consists of chitosan[J]. **Journal of Biological Chemistry**,1988,263(23):11569-11574.

[11] BRIZA P,BREITENBACH M,ELLINGER A,et al. Isolation of two developmentally regulated genes involved in spore wall maturation in Saccharomyces cerevisiae[J]. **Genes & Development**,1990,4(10):1775-1789.

[12] FELDER T,BOGENGRUBER E,TENREIRO S,et al. Dtr1p,a multidrug resistance transporter of the major facilitator superfamily,plays an essential role in spore wall maturation in Saccharomyces cerevisiae [J]. **Eukaryotic Cell**,2002,1(5):799-810.

[13] PAMMER M,BRIZA P,ELLINGER A,et al. DIT101 (CSD2,CAL1),a cell cycle-regulated yeast gene required for synthesis of chitin in cell walls and chitosan in spore walls[J]. **Yeast**,1992,8(12):1089-1099.

[14] BRIZA P,WINKLER G,KALCHHAUSER H,et al. Dityrosine is a prominent component of the yeast ascospore wall. A proof of its structure[J]. **Journal of Biological Chemistry**,1986,261(9):4288-4294.

[15] GOMEZ-ESQUER F,RODRIGUEZ-PE N A J M,DIAZ G,et al. CRR1,a gene encoding a putative transglycosidase,is required for proper spore wall assembly in Saccharomyces cerevisiae[J]. **Microbiology**,2004,150(10):3269-3280.

[16] RINAUDO M. Chitin and chitosan:properties and applications[J]. **Progress in Polymer Science**,2006,31(7):603-632.

[17] LIN C P C,KIM C,SMITH S O,et al. A highly redundant gene network controls assembly of the outer spore wall in S. cerevisiae [J]. **PLoS Genet**,2013,9(8):e1003700.

[18] SHI L,LI Z,TACHIKAWA H,et al. Microencapsulation of enzymes using yeast spores [J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2014:00153-14.

[19] ZHANG H,TACHIKAWA H,GAO X D,et al. Applied usage of yeast spores as chitosan beads[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2014,80(16):5098-5105.

[20] LI He,YOU Juan,GU Quliang,et al. Clonging and sequence analysis of a thermostable α-galactosidase gene of Absidia ramose WL511[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2011,30(1):124-130.(in Chinese)

[21] FERNNDEZ-LEIRO R,PEREIRA-RODRGUEZ Á,CERD N M E,et al. Structural analysis of Saccharomyces cerevisiae α-galactosidase and its complexes with natural substrates reveals new insights into substrate specificity of GH27 glycosidases[J]. **Journal of Biological Chemistry**,2010,285(36):28020-28033.

[22] SUDA Y,RODRIGUEZ R K,COLUCCIO A E,et al. A screen for spore wall permeability mutants identifies a secreted protease required for proper spore wall assembly[J]. **PLoS One**,2009,4(9):e7184.

[23] MA Guizhen,GE Pinghua,LIU Zhaopu,et al. Optimization of medium components and cultural conditions of marine Bacillus amyloliquefaciens Strain GM-1[J]. **Crops**,2013,3:36-41.(in Chinese)

[24] GUAN Bin. The modification of the DNS method for the determination of reducing sugar [J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry:Food Science and Biotechnology**,1999,18(3):74-79.(in Chinese)

[25] ZHAO Xiangying,LIU Jianjun,LIU Liping,et al. Effects of ammonium sulfate on the DNS assay of chitinase activity[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009,28(4):555-558.(in Chinese)

[26] KLOIMWIEDER A,WINSTON F. A screen for germination mutants in Saccharomyces cerevisiae [J]. **G3:Genes,Genomes,Genetics**,2011,1(2):143-149.