

文章编号:1673-1689(2008)05-0050-07

产甘油假丝酵母甘油合成关键酶基因 *CgGPD1* 多拷贝表达载体的构建及 其在大肠杆菌中的表达

王震^{1,2}, 饶志明^{*1,2}, 诸葛斌^{1,2}, 沈微^{1,2}, 方慧英^{1,2}, 诸葛健^{1,2}

(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. 江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214122)

摘要: 采用 PCR 的方法从产甘油假丝酵母(*Candida glycerinogenes*)中扩增出 3-磷酸甘油脱氢酶的编码基因及侧翼序列 *CgGPD1*, 分别构建了含不同 *CgGPD1* 拷贝数的根癌农杆菌二元载体 pCAM3300 - zeocin - *CgGPD1* (I)、pCAM3300-zeocin-*CgGPD1*-*CgGPD1* (II) 和 pCAM3300-zeocin-*CgGPD1*-*CgGPD1*-*CgGPD1* (III)。在大肠杆菌 JM109 中, 研究了其在不同质量浓度 NaCl、葡萄糖胁迫下表达情况。结果表明, 在大肠杆菌中 GPDH 的活性随着 NaCl、葡萄糖质量浓度的升高而增加。当 NaCl 质量浓度达到 2.5 g/dL 时, GPDH 的酶活比在 0.5 g/dL NaCl 下平均提高 31.2%; 当葡萄糖质量浓度提高至 10 g/dL 时, GPDH 的酶活比 2 g/dL 葡萄糖下平均提高 31.8%; 在相同的 NaCl、葡萄糖质量浓度下, GPDH 的活性随着 *CgGPD1* 拷贝数的增加而升高, JM109(II)比 JM109(I)的 GPDH 酶活平均提高 8.2%, JM109(III)比 JM109(II)的 GPDH 酶活平均提高 9.9%。以上结果表明, 在大肠杆菌中 *CgGPD1* 基因的表达同样受渗透压胁迫调节。

关键词: 胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶; 产甘油假丝酵母; 渗透压胁迫

中图分类号: Q 939.97

文献标识码: A

Construction of Multicopies Vectors of Key Enzymes Gene *GPD1* in Glycerol Synthesis of *Candida glycerolgenesis* and Its Expression in *Escherichia coli*

WANG Zhen^{1,2}, RAO Zhi-ming^{*1,2}, ZHUGE Bin^{1,2}, SHEN Wei^{1,2}, FANG Hui-ying^{1,2}, ZHUGE Jian^{1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: *Candida glycerinogenes*, a novel osmotolerant yeast, used for industrial-scale fermentation and glycerol-3-phosphate dehydrogenase, the key enzyme of glycerol synthesis, was induced by osmotic stress. In this manuscript, we the gene of glycerol-3-phosphate dehydrogenase *GPD1* from *C. glycerinogenes* was cloned and a binary vectors with different

收稿日期: 2007-07-25.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30570142, 20676053); 国家 863 计划项目(2006AA020103); 江苏省青年科技创新人才基金项目(BK2006504).

作者简介: 王震(1984-), 男, 河南信阳人, 微生物学硕士研究生.

* 通讯作者: 饶志明(1975-), 男, 江西临川人, 农学博士, 教授, 硕士生导师. 主要从事工业微生物育种及分子生物学改造的研究. Email: raozm@yahoo.com.cn

copies of *CgGPD1*: pCAM3330-*zeocin-CgGPD1* (I), pCAM3330-*zeocin-CgGPD1-CgGPD1* (II) and pCAM3330-*zeocin-CgGPD1-CgGPD1-CgGPD1* (III) were constructed. The vectors were transformed into *Escherichia coli* JM109. The expression of GPDH from the transformants harboring different copies of *CgGPD1* under different concentration of NaCl and glucose were determined. The results showed that the activity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase was increased about 31.5% when the concentration of NaCl or glucose was 2.5% or 10%, respectively. The activities of glycerol-3-phosphate dehydrogenase of JM109(II) and JM109(III) were 8.2% and 9.9% higher than that of JM109(I) and JM109(II), respectively. The results indicated that the expression of *CgGPD1* was also induced by osmotic stress in *E. coli* JM109.

Key words: glycerol-3-phosphate dehydrogenase; *Candida glycerinogenes*; osmotic stress induction

酵母细胞具有适应环境不同渗透压的能力,当环境中的渗透压上升时,细胞内部会积累一些特殊溶质,使细胞内外的渗透压保持平衡。当酵母细胞处于高渗透压条件下,就会诱导合成甘油以提高其胞内渗透压,来平衡外界的胁迫环境。研究发现,在酿酒酵母中,3-磷酸甘油脱氢酶(GPDH)是甘油合成途径的限速酶,GPDH由两个同工酶分别是Gpd1和Gpd2,其中Gpd1是渗透压诱导型,Gpd2是缺氧诱导型^[1-3]。Remize^[4]等人研究结果表明,过量表达Gpd1编码基因GPD1可以有效地提高甘油的合成速率和甘油产量。

耐高渗产甘油假丝酵母(*Candida glycerinogenes*)是江南大学工业微生物研究中心科研人员筛选得到一株生产性状优良的工业化甘油生产菌株,该菌株最大的特点是耐高渗透压,能够在550 g/L葡萄糖的高渗条件下生长,在250 g/L葡萄糖时胞外积累甘油总量高达120 g/L,转化率超过50%^[5-8]。由于胞浆3-磷酸甘油脱氢酶是甘油合成途径中的关键酶,本课题组根据已报道的3-磷酸甘油脱氢酶的氨基酸序列设计简并引物,通过简并PCR技术结合染色体步移技术首次从*C. glycerinogenes*中克隆到编码产甘油假丝酵母胞浆3-磷酸甘油脱氢酶基因的读码框及其侧翼序列(*CgGPD1*),该基因的克隆及其相关研究报道已被FEMS yeast research期刊接收,同时基因序列已递交GenBank,登录号为EU186536)。在此基础上,作者采用PCR的方法扩增了产甘油假丝酵母胞浆3-磷酸甘油脱氢酶编码基因及侧翼序列*CgGPD1*,并构建了含*CgGPD1*基因不同拷贝数的根癌农杆菌二元载体。将其分别转入大肠杆菌中,并初步研究了重组大肠杆菌在不同质量浓度的NaCl和葡萄糖胁迫下表达GPDH的情况,为进一步利用根癌农

杆菌介导将*CgGPD1*转入产甘油假丝酵母表达以增强甘油合成水平奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与载体 大肠杆菌JM109、产甘油假丝酵母、根癌农杆菌LBA4404(含利福霉素及链霉素抗性)由作者所在实验室保存;质粒pCAM-BIA3300-*zeocin*由作者所在实验室张君胜硕士构建;克隆载体pMD-18T购自大连宝生物工程公司。

1.1.2 工具酶与试剂 限制性内切酶HindⅢ、BamHⅠ、BglⅡ、T₄ DNA ligase,去磷酸化酶(Calf Intestine Alkaline Phosphatase,CIAP)均为精美公司产品;抗生素、Tris、SDS、磷酸二羟丙酮(DHAP)购自Sigma公司;质粒提取、纯化及胶回收试剂盒均购自博大泰克;其他化学试剂均为国产分析纯。

1.1.3 PCR引物 根据已知的*CgGPD1*的读码框及其侧翼序列设计含有不同酶切位点的一系列上下游引物,引物由上海赛百盛公司合成,引物序列如下:

Primer1(HindⅢ): 5'-CCC AAG CTT CAG TTC CCG TTT TCC ATT TC-3'

Primer2(HindⅢ): 5'-CCC AAG CTT AAG TGG AAA TGC AGC TAA AGG-3'

Primer3(BglⅡ): 5'-CGC AGA TCT CAG TTC CCG TTT TCC ATT TC-3'

Primer4(BamHⅠ): 5'-CGC GGA TCC AAG TGG AAA TGC AGC TAA AGG-3'

Primer5(BamHⅠ): 5'-CGC GGA TCC CAG TTC CCG TTT TCC ATT TC-3'

1.2 方法

1.2.1 产甘油假丝酵母染色体DNA的制备 产

甘油假丝酵母染色体 DNA 的制备按文献[9]进行,略有改进。

1.2.2 PCR 反应体系及反应条件 以制备的产甘油酵母染色体 DNA 为模板,分别用上述引物扩增产甘油假丝酵母胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶基因 *CgGPD1*,PCR 反应体系为 $10 \times \text{ExTaq}$ buffer $5 \mu\text{L}$, 2.5 mmol/L dNTP $4 \mu\text{L}$,上下游引物各 $1 \mu\text{L}$,模板 DNA $2 \mu\text{L}$, ExTaq 酶 $1 \mu\text{L}$, ddH_2O $36 \mu\text{L}$,总体积 $50 \mu\text{L}$ 。反应条件: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min , $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 90 s , $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 90 s , $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 120 s ,循环 35 次。 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min , $15 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min 。

1.2.3 PCR 产物胶回收 参照博大泰克胶回收试剂盒说明书。

1.2.4 *CgGPD1* 与 pMD-18T vector 的连接 以产甘油假丝酵母染色体 DNA 为模板,利用含不同酶切位点的引物分别 PCR 扩增 *CgGPD1* 基因,胶回收产物与 pMD-18T vector 的连接与转化参照试

剂盒说明书。

1.2.5 含基因 *CgGPD1* 不同拷贝数载体的构建 首先提取质粒 pMD-18T-*CgGPD1*(含 *Hind* III 酶切位点)和质粒 p3300-*zeocin*,用 *Hind* III 酶切质粒 pMD-18T-*CgGPD1*,胶回收 *CgGPD1* 片段,将其在 *Hind* III 位点插入 pCAM3300-*zeocin*。其次,提取质粒 pMD-18T-*CgGPD1*(含 *Bgl* II 和 *Bam* H I 酶切位点)和质粒 pCAM3300-*zeocin-CgGPD1*(I),用 *Bgl* II 和 *Bam* H I 酶切质粒 pMD-18T-*CgGPD1*,将其在 *Bam* H I 位点插入 pCAM3300-*zeocin-CgGPD1*(I)。最后,提取质粒 pMD-18T-*CgGPD1*(上下游均含 *Bam* H I 酶切位点)和质粒 pCAM3300-*zeocin-CgGPD1-CgGPD1*(II),用 *Bam* H I 酶切质粒 pMD-18T-*CgGPD1*,将其在 *Bam* H I 位点插入 pCAM3300-*zeocin-CgGPD1-CgGPD1*(II),质粒构建见图 1。

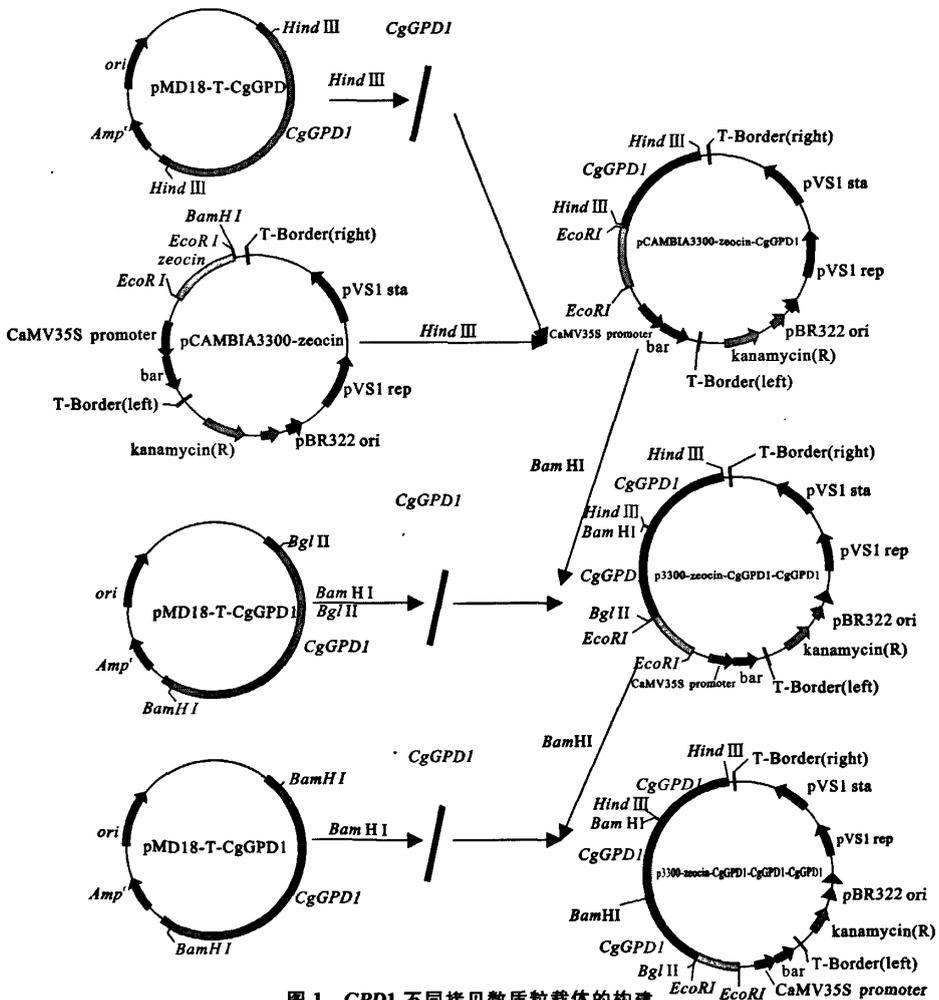


图 1 *GPD1* 不同拷贝数质粒载体的构建

Fig. 1 Construction of plasmid of difference copies of *GPD1*

将含不同 *CgGPD1* 基因拷贝数根癌农杆菌双元载体分别转化大肠杆菌 JM109, 在卡那霉素平板上挑选转化子, 分别命名为 JM109(I)、JM109(II)、JM109(III)。

1.2.6 JM109(I)、JM109(II)、JM109(III)在不同渗透压条件下培养 分别挑取含有不同拷贝的 *GPD1* 基因的大肠杆菌的单菌落, 接种于含有卡那霉素的 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养过夜, 作为种子, 然后按体积分数 1% 的接种量接种于胁迫培养基中 (NaCl 和葡萄糖的质量分数分别为 0.5、1、1.5、2、2.5 g/dL 和 2、4、6、8、10 g/dL), 于 37 °C、200 r/min 摇瓶培养 8 h 左右, OD 值在 0.8 ~ 1.0 之间。

1.2.7 粗酶液的制备 将培养好的发酵液于 8 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞, 用洗涤缓冲液 (KH₂PO₄ 10 mmol/L; K₂HPO₄ 10 mmol/L; EDTA 2 mmol/L, pH 7.5), 浓缩 4 倍保存于 -20 °C, 在制备前溶解、冲洗重悬于破壁缓冲液中: KH₂PO₄ 100 mmol/L; K₂HPO₄ 100 mmol/L; DTT 1 mmol/L; MgCl₂ 和 EDTA 为 2 mmol/L, pH 7.5, 菌体始终与缓冲液的体积比为 1:(8~10), 采用超声波法于低温 (<4 °C) 破碎细胞 4 min (工作时间); 功率为 300 W, 工作 1 s 间隔 4 s。于 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min, 上清液即为粗酶液。

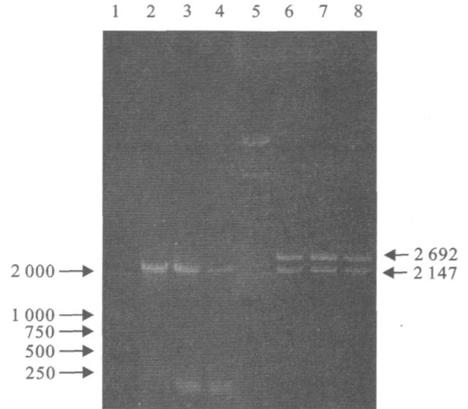
1.2.8 3-磷酸甘油脱氢酶酶活测定 胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶活性的检测在检测缓冲液 (20 mmol/L 咪唑-HCl, pH 7.0, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L MgCl₂, 0.67 mmol/L DHAP, 0.09 mmol/L NADH) 中进行, 反应加入 DHAP 为 0 时, 线性范围为 2 min。酶促反应温度为 30 °C。无 NADH 氧化酶本底, 比色皿中蛋白质的质量浓度为 0.05 ~ 0.5 mg/mL^[10]。在 340 nm 处测定 30 s 和 90 s 时的吸光度。NADH 的吸光系数为 $6.22 \times 10^3 / (\text{mol} \cdot \text{cm})$ 。一个单位酶活定义为一分钟消耗 1 μmol NADH 所需的酶量。

1.2.9 蛋白质质量分数测定 粗酶液蛋白质质量分数的测定采用 Bradford 法^[11], 以牛血清白蛋白为标准蛋白质。

2 实验结果

2.1 *CgGPD1* 基因的 PCR 扩增

利用含有不同酶切位点的上下游引物成功扩增出大小为 2.1 kb 的特异性条带, 与预期的 *CgGPD1* 基因大小一致, 见图 2 的 2-4 泳道所示。



1. DL2000 markers; 2. *GPD1/Hind* III; 3. *GPD1/Bgl* II and *Bam* HI; 4. *GPD1/Bam* HI; 5. λDNA/*Hind* III makers; 6. pMD-18T-*CgGPD1/Hind* III; 7. pMD-18T-*CgGPD1/Bgl* II, *Bam* HI; 8. pMD-18T-*CgGPD1/Bam* HI;

图 2 *GPD1* 的 PCR 扩增和质粒 pMD-18T-*CgGPD1* 的酶切验证图

Fig. 2 PCR amplification of *GPD1* and analysis of pMD-18T-*CgGPD1* restriction enzyme digestion

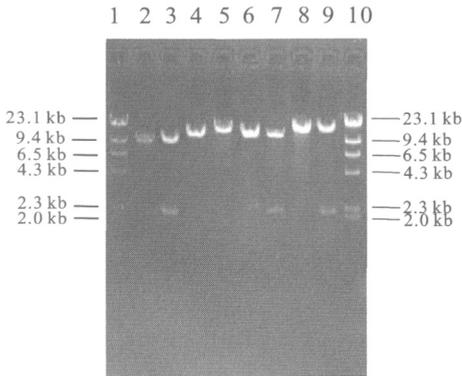
2.2 pMD-18T-*CgGPD1* 的构建

转化后分别挑取转化子, 过夜培养提取质粒。根据引物上设计的相应酶切位点分别用 *Hind* III、*Bgl* II 和 *Bam* HI; *Bam* HI 酶切转化子质粒, 酶切结果显示: 它们均能释放出大小 2.1 kb 的片段, 说明含有不同酶切位点的 pMD-18T-*CgGPD1* 均已构建成功, 见图 2 的 6-8 泳道所示。

2.3 含不同 *CgGPD1* 基因拷贝数根癌农杆菌双元载体的构建和验证

首先, *CgGPD1* 基因在 pCAM3300-*zeocin Hind* III 位点插入, 重组质粒经 *Hind* III 酶切后释放 9.6 kb 和 2.1 kb 片段, 分别对应 pCAM3300-*zeocin* 和基因 *CgGPD1* 的大小, 见图 3 的 2-3 泳道所示。重组质粒命名为 pCAM3300-*zeocin-CgGPD1*(I)。

将用 *Bgl* II 和 *Bam* HI 双酶切的 *CgGPD1* 基因与经 *Bam* HI 酶切且去磷酸化的 pCAM3300-*zeocin-CgGPD1*(I) 连接, 由于 *Bgl* II 和 *Bam* HI 是同尾酶, 所以分别用 *Bam* HI 和 *Xba* I; *Sac* I 和 *Bam* HI 双酶切, 酶切结果显示: 用 *Bam* HI 和 *Xba* I 得到大小为 13.8 kb 的单一一条带, 对应重组质粒的大小; 用 *Sac* I 和 *Bam* HI 双酶切释放出 11.7 kb 和 2.1 kb 片段, 分别对应 pCAM3300-*zeocin-CgGPD1*(I) 和 *CgGPD1* 的大小, 见图 3 的 4-7 泳道所示, 证明重组质粒构建成功。重组质粒命名为 pCAM3300-*zeocin-CgGPD1-CgGPD1*(II)。



1. λ DNA/*Hind* III makers; 2. pCAM3300-zeocin/*Hind* III; 3. pCAM3300-zeocin-CgGPD1/*Hind* III; 4. p3300-zeocin-CgGPD1/*Bam*H I, *Xba* I; 5. p3300-zeocin-CgGPD1-CgGPD1/*Bam*H I, *Xba* I; 6. p3300-zeocin-CgGPD1/*Bam*H I, *Sac* I; 7. p3300-zeocin-CgGPD1-CgGPD1/*Bam*H I, *Sac* I; 8. pCAM3300-zeocin-CgGPD1-CgGPD1/*Bam*H I; 9. pCAM3300-zeocin-CgGPD1-CgGPD1-CgGPD1/*Bam*H I; 10. λ DNA/*Hind* III Markers;

图 3 含不同 CgGPD1 基因拷贝数载体的酶切验证
Fig. 3 Analysis of the plasmid with difference copies of CgGPD1 restriction enzyme digestion

用 *Bam*H I 单酶切的 CgGPD1 基因在 *Bam*H I 位点插入 pCAM3300-zeocin-CgGPD1-CgGPD1 (II), 用 *Bam*H I 酶切后释放 13.8 kb 和 2.1 kb 片段, 分别对应 pCAM3300-zeocin-CgGPD1-CgGPD1 (II) 和基因 CgGPD1 的大小, 见图 3 的 8-9 泳道所示。重组质粒命名为 pCAM3300-zeocin-CgGPD1-CgGPD1-CgGPD1 (III)。

2.4 不同 NaCl 质量浓度对 GPD1 表达的影响

由于大肠杆菌并不能在高渗环境下应急合成如甘油等物质抵制外界的极端条件, 因此过高的渗透压对大肠杆菌的生长是不利的。前期研究发现, 在 NaCl 质量浓度大于 3 g/dL 的 LB 培养基上, 大肠杆菌生长极其缓慢。因此, 作者确定 NaCl 的质量浓度梯度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 g/dL, 分别检测 JM109 (I)、JM109 (II)、JM109 (III) 的 GPDH 酶活, 结果见表 1 和图 4。

JM109 (I)、JM109 (II)、JM109 (III) 中的 GPDH 分别随着 NaCl 质量浓度的增高而增加, 当 NaCl 的质量浓度达到 2.5 g/dL 时, GPDH 的酶活比 NaCl 的质量浓度为 0.5 g/dL 时平均提高 31.2%; 同时, 在相同的 NaCl 质量浓度下, GPDH 酶活随着 GPD1 拷贝数的增加而有所增加, JM109 (II) 比 JM109 (I) 的 GPDH 酶活平均提高 7.8%, JM109 (III) 比 JM109 (II) 的 GPDH 酶活平均提高

9.4%。

表 1 NaCl 对胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶的胁迫

Tab. 1 The induction of glycerol-3-phosphate dehydrogenase of NaCl

NaCl 质量浓度/(g/dL)	JM109 GPDH 酶活/(U/g)	JM109(I) GPDH 酶活/(U/g)	JM109(II) GPDH 酶活/(U/g)	JM109(III) GPDH 酶活/(U/g)
0.5	0	21.12	23.39	25.61
1.0	0	24.87	26.84	29.07
1.5	0	25.25	28.54	29.86
2.0	0	27.23	29.27	31.59
2.5	0	28.87	31.08	33.86

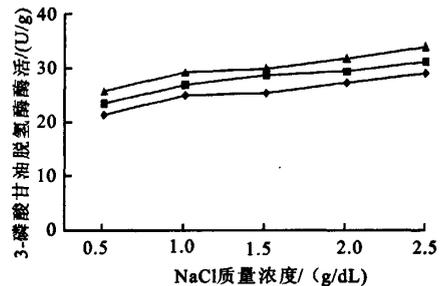


图 4 NaCl 对胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶的胁迫

Fig. 4 The induction of glycerol-3-phosphate dehydrogenase by NaCl

2.5 不同葡萄糖质量浓度对 GPD1 表达的影响

前期实验发现, 当葡萄糖的质量浓度大于 10 g/dL 时, JM109 菌株生长受到抑制, 因此确定葡萄糖的质量浓度梯度为 2, 4, 6, 8, 10 g/dL。在不同质量浓度下分别检测 JM109 (I)、JM109 (II)、JM109 (III) 的 GPDH 酶活, 结果见表 2 和图 5。

表 2 葡萄糖对胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶的胁迫

Tab. 2 The induction of glycerol-3-phosphate dehydrogenase of glucose

NaCl 质量浓度/(g/dL)	JM109 GPDH 酶活/(U/g)	JM109(I) GPDH 酶活/(U/g)	JM109(II) GPDH 酶活/(U/g)	JM109(III) GPDH 酶活/(U/g)
2	0	24.28	27.52	30.15
4	0	28.39	30.54	33.54
6	0	28.98	31.07	35.47
8	0	31.27	34.18	37.48
10	0	33.44	35.51	38.76

随着葡萄糖质量浓度的逐渐升高, JM109 (I)、JM109 (II)、JM109 (III) 的 GPDH 酶活逐渐升高, 当葡萄糖质量浓度达到 10 g/dL 时, GPDH 的酶活比葡萄糖质量浓度为 2 g/dL 时提高 31.8%; 在相同葡萄糖质量浓度下, JM109 (I)、JM109 (II)、

JM109(Ⅲ)的 GPDH 酶活依次升高,即随着 *GPD1* 拷贝数的增加,GPDH 酶活逐渐增加,JM109(Ⅱ)比 JM109(Ⅰ)的 GPDH 酶活平均提高 8.7%,JM109(Ⅲ)比 JM109(Ⅱ)的 GPDH 酶活平均提高 10.5%。

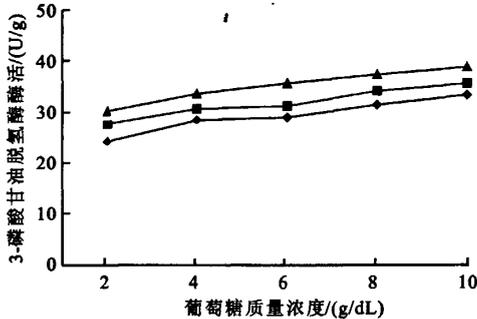


图 5 葡萄糖对胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶的胁迫

Fig. 5 The induction of glycerol-3-phosphate dehydrogenase by glucose

3 结 语

生长于高渗环境下的微生物细胞通过一种或多种特定溶质在细胞内积累来抵御胞内水分子外流,这些相溶性溶质可以以较高的浓度在细胞内积累而对细胞的酶系不出现抑制或灭活,甘油则是酵母最主要的相溶性溶质。在甘油合成途径中,GPDH 是限速酶,酵母在盐或高渗胁迫条件下,通过过量表达编码 GPDH、提高甘油合成来抵御环境胁迫^[12-14]。蔡敬民^[15]在 YEPD 培养基中添加 NaCl,可以诱导酿酒酵母 3-磷酸甘油脱氢酶的形成。当培养基中 NaCl 质量浓度达 5 g/dL 时,酶比活可达 0.5 U/mg,酶活提高 10 倍左右。张凡等^[16]的研究表明,GPD1 基因的 mRNA 表达量随 NaCl 质量浓度的上升有上升趋势。

产甘油假丝酵母是甘油工业化生产菌种,由于 GPDH 是甘油合成的关键酶,本课题组前期成功扩增了编码 GPDH 同工酶 *Gpd1* 基因及其侧翼序列 (*CgGPD1*)。在此基础上,作者用 PCR 扩增出两端含有不同酶切位点的 *CgGPD1*,并构建了含有不同 *CgGPD1* 拷贝数的根癌农杆菌二元载体 pCAM3300-*zeocin-CgGPD1*(Ⅰ)、pCAM3300-*zeocin-*

CgGPD1-CgGPD1(Ⅱ)和 pCAM3300-*zeocin-CgGPD1-CgGPD1-CgGPD1*(Ⅲ)。在大肠杆菌中初步研究了胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶在不同的渗透压胁迫下的表达情况。由于大肠杆菌中缺乏像酵母菌等一样的渗透压调节机制,不能在胞内积累甘油等相溶性溶质来抵御环境中渗透压的增高。当环境中渗透压增高时,其生长受到明显的抑制,甚至死亡。因此作者选择一定质量浓度梯度的 NaCl 或葡萄糖作为胁迫条件。结果表明,在相同的 NaCl 或葡萄糖质量浓度下,随着 *CgGPD1* 拷贝数的增加,胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶酶活有所增加,当 NaCl 和葡萄糖的质量浓度分别为 2.5 g/dL 和 10 g/dL 时,GPDH 的酶活平均提高 31.5%;在相同的 NaCl、葡萄糖质量浓度下,GPDH 的活性随着 *CgGPD1* 拷贝数的增加而升高,JM109(Ⅱ)比 JM109(Ⅰ)的 GPDH 酶活平均提高 8.2%,JM109(Ⅲ)比 JM109(Ⅱ)的 GPDH 酶活平均提高 9.9%。以上结果表明,在原核生物大肠杆菌中,*CgGPD1* 也同样受渗透压诱导。但是 GPDH 酶活增加不是十分理想,只有小幅度的提高,可能是因为:*CgGPD1* 来自真核生物,由于密码子偏好性,在大肠杆菌中 GPDH 表达不高;由于酵母和大肠杆菌在转录和翻译等机制方面存在明显的差异,且大肠杆菌中并不存在高渗透调节元件,也是导致 GPDH 表达没有明显提高的主要原因。

由于产甘油假丝酵母的遗传背景不清楚,常规的转化方法并没有取得成功。利用根癌农杆菌介导转化(ATMT)真菌已经获得成功,ATMT 具有转化率高、操作方便等优点,得到了国内外学者的青睐^[17-18]。作者利用根癌农杆菌介导转化产甘油假丝酵母已取得成功^[19]。作者选择根癌农杆菌二元载体 pCAM3300-*zeocin* 为原始载体,其是大肠杆菌和根癌农杆菌的穿梭载体,将 *CgGPD1* 置于其 T-DNA 区域,便于进一步利用根癌农杆菌介导转化产甘油假丝酵母。在不同 NaCl 和葡萄糖质量浓度下分别检测 JM109(Ⅰ)(Ⅱ)(Ⅲ)的 GPDH 表达变化情况是一种基础性尝试,本研究组的最终研究目的是增加产甘油假丝酵母 *CgGPD1* 的拷贝数以提高其甘油合成速率和甘油合成水平。

参考文献(References):

- [1] Albertyn J, Hohmann S, Thevelein J M, et al. GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high osmolarity glycerol response pathway[J]. *Mol Cell Biol*, 1994, 14: 4135.
- [2] 陈珺,王正祥,诸葛健. 产甘油假丝酵母胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶在甘油形成中的作用[J]. 无锡轻工大学学报, 1999, 18(3): 1-6.

- CHEN Jun, WANG Zheng-xiang, ZHUGE Jian. The role of cytoplasmic glycerol 3-Phosphate dehydrogenase of *Candida glyceroligenes* is on its glycerol over-producing[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 1999, 18(3): 1-6. (in Chinese)
- [3] Ansell R, Granath K, Hohmanns, et al. The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation[J]. *EMBO J*, 1997, 16: 2179.
- [4] Remize F, Barnavon L, Dequin S. Glycerol export and glycerol-3-phosphate dehydrogenase, but not glycerol phosphatase, are rate limiting for glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metabolic Engineering*, 2001(3): 301-312.
- [5] 诸葛健, 方慧英. 好氧发酵法生产甘油[P]. 中国专利: CN 1110321A, 1995-07-08.
- [6] ZHUGE Jian, FANG Hui-ying, WANG Zeng-xiang, et al. Glycerol production by a novel osmotolerant yeast *Candida glyceroligenes*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 55(6): 686-692.
- [7] 刘桂香, 诸葛健. 酵母细胞对高渗环境的适应与胞内甘油累积[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(2): 25-28.
LIU Gui-xiang, ZHUGE Jian. Hyperosmoadaptation of yeast cells and intracellular accumulation of glycerol[J]. *China Biotechnology*, 2003, 23(2): 25-28. (in Chinese)
- [8] 刘桂香, 余秉琦, 诸葛健, 等. 酿酒酵母胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶的两个同工酶[J]. 微生物学通报. 2003, 30(5): 106-110.
LIU Gui-xiang, YU Bing-qi, ZHUGE Jian, et al. The two isoenzymes of *S. Cerevisiae* glycerol 3-phosphate Dehydrogenase[J]. *Microbiology*, 2003, 30(5): 106-110. (in Chinese)
- [9] A 亚当斯, D E 戈特施林, C A 凯泽. 酵母遗传学方法实验指南[M]. 刘子铎译. 北京: 科学出版社, 2000: 85-86.
- [10] Gancedo C, Gancedo J M, Sols A. Glycerol metabolism in yeasts; Pathways of utilization and production[J]. *Eur J Biochem*, 1968, 5(2): 165-172.
- [11] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 73: 248-254.
- [12] Edgley M, Brown A D. Yeast water relations: physiological changes induced by solute stress in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces rouxii*[J]. *J Gen Microbiol*, 1983, 129: 3453-3463.
- [13] Blomberg A, Adler L. Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *J Bacteriol*, 1989, 171: 1087-1092.
- [14] 邓运涛, 程华, 王小行, 等. 低水势胁迫对粉状毕赤酵母 3-磷酸甘油脱氢酶酶活力的影响[J]. 食品与发酵工业. 2005, 31(3): 5-6.
DENG Yun-tao, CHENG Hua, WANG Xiao-xing, et al. The influence of stress on activity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Pichia farinose* in low water potential[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2005, 31(3): 5-6. (in Chinese)
- [15] 蔡敬民. 酿酒酵母 3-磷酸脱氢酶的诱导、提纯和性质[J]. 真菌学报, 1996, 15(2): 121-128.
Cai Jing-min. Induced formation purification and properties of glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Acta Mycologica Sinica*, 1996, 15(2): 121-128. (in Chinese)
- [16] 张凡, 马向东, 梁运祥, 等. 酵母菌 3-磷酸甘油脱氢酶基因(*gpd1*)的克隆及其在高渗胁迫下 mRNA 转录水平的差异[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(5): 15-19.
ZHANG Fan, MA Xiang-dong, LIANG Yun-xiang, et al. Study on yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene cloning and its mRNA transcriptional level in the hyper-osmotic conditions[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2005, 31(5): 15-19. (in Chinese)
- [17] Michielse C B. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi[J]. *Curr Genet*, 2005(48): 1-17.
- [18] Bundock P. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *EMBO J*, 1995(14): 3206-3214.
- [19] 饶志明, 张君胜, 诸葛健, 等. 根瘤农杆菌介导工业化产甘油假丝酵母的遗传转化[J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(6): 868-871.
RAO Zhi-ming, ZHANG Jun-sheng, ZHUGE Jian, et al. Genetic transformation of industrialized strain *Candida glycerigenes* by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2007, 13(6): 868-871. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)