

筛选特异性抑制酿酒酵母产孢的人类基因

殷政^{1,2}, 中西秀树^{1,2}, 李子杰^{1,2}, 张慧杰^{1,2}, 藤田盛久^{*1,2}, 高晓冬^{1,2}

(1.江南大学 生物工程学院,江苏 无锡 214122; 2.江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214122)

摘要: 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)二倍体细胞在缺乏氮源且存在非发酵型碳源时,营养细胞停止生长,进入产孢过程并通过减数分裂形成单倍体孢子。产孢过程并不存在于哺乳动物细胞中,但该过程中发生的很多细胞活动在真核细胞中存在保守性。作者建立了一个筛选特异性抑制酿酒酵母产孢的人类基因的方法。在酿酒酵母中表达单独的人类基因,筛选得到抑制产孢过程但对酿酒酵母营养细胞生长不产生影响的候选人类基因。获得的候选基因很大可能涉及营养敏感性、减数分裂以及膜运输重组这些产孢过程中发生的细胞活动。本研究对新功能人类基因的发现以及将酿酒酵母作为遗传研究工具有着重要的意义。

关键词: 酿酒酵母;筛选;人类基因;抑制产孢;减数分裂

中图分类号:Q 781 文章编号:1673-1689(2019)11-0085-08 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.11.012

Screening of Human Genes Specifically Inhibits Sporulation in Yeast Cells

YIN Zheng^{1,2}, NAKANISHI Hideki^{1,2}, LI Zijie^{1,2}, ZHANG Huijie^{1,2}, FUJITA Morihisa^{*1,2},
GAO Xiaodong^{1,2}

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

Abstract: In response to nutrient limitation, diploid cells of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* undergo meiosis and form spores. Sporulation is a developmental process that do not happen in mammals. However, the process includes several biological events which are conserved in eukaryotic cells. This study developed a method to screen human genes which specifically inhibits yeast sporulation. In this screening, human genes are individually expressed in yeast cells and monitored their effects on sporulation. In the present study, 49 genes has been examined. Among them, three genes strongly inhibited sporulation. Expression of these genes in yeast cells did not affect on the vegetative growth. Interestingly, one of them did not interfere with the meiotic progression very well, suggesting that it prevents the post-meiotic events in sporulation. These results demonstrate that our method can identify human genes which can antagonize yeast sporulation without compromising the vegetative growth. Such genes are possibly involved in sporulation specific events such as nutrient sensing, meiosis, and re-organization of membrane trafficking. Thus, this screening would be useful to find novel functions of human genes.

Keywords: yeast, screening, human genes, sporulation, meiosis

收稿日期: 2017-01-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31400693);江苏省自然科学基金项目(BK20140141)。

* 通信作者: 藤田盛久(1979—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事细胞糖生物学相关研究。E-mail: fujita@jiangnan.edu.cn

引用本文: 殷政,中西秀树,李子杰,等. 筛选特异性抑制酿酒酵母产孢的人类基因[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(11): 85-92.

酵母与哺乳动物细胞同为真核生物,二者具有很多相似的结构,将酵母作为研究人类基因的工具具有巨大的优势。酵母细胞遗传背景清晰、培养简单、基因操作技术成熟完备,极大降低了哺乳动物细胞各种复杂的生理过程对蛋白质研究的干扰。1987年, Lee 和 Nurse^[1]在裂殖酵母中表达了人类 cDNA, 筛选得到能回补裂殖酵母 *cdc2Δ* 缺陷的直系同源蛋白质,证明人类细胞中具有与真菌细胞周期基因 *CDC2* 相同功能的基因。该实验表明,利用酵母作为筛选人类基因的工具并对基因功能进行研究具有广泛的应用前景及巨大的研究价值。此外,实验室之前的研究^[2]将酵母 SSO1 的 SNARE 区域替换为人源 syntaxin1A,通过突变分析得到回补产孢的突变体,发现 218 位谷氨酸残基为 SSO1 产孢功能所必须,并且为筛选与 syntaxin1A 作用的蛋白质或药物提供了更为简便的方法,同时表明人类的某些基因确实可以参与产孢过程中的某些环节并对其产生影响,并且可以对该基因功能研究和对酵母产孢过程的彻底研究带来新的进展和突破。

酿酒酵母二倍体细胞在缺乏氮源且存在非发酵型碳源的环境下,为了应对营养匮乏的不利环境,营养细胞停止生长^[3],进入减数分裂过程并产生 4 个单倍体细胞核^[4-5]。随后细胞质膜通过高尔基体分泌囊泡(post-Golgi secretory vesicles)重新定位在纺锤体极体(spindle pole bodies),形成前孢子膜(prospore membrane)且不断延伸,最后前孢子膜闭合形成未成熟的孢子^[6-8]。接着在前孢子膜的表面进行孢子壁的组装,孢子壁组装完成标志着成熟孢子的形成。孢子壁具有四层结构,从里到外分别是甘露糖层、 β -葡聚糖层^[9]、壳聚糖层和二酪氨酸层^[10],其中二酪氨酸层作为孢子形成过程的最后一环,同时赋予孢子抵御外界环境压力的能力^[11-13]。由于二酪氨酸层的存在,孢子在 10% 的氨水缓冲液下使用 UV 照射具有自荧光特性^[12]。

酿酒酵母的产孢过程虽然并不存在于哺乳动物细胞中,但该过程中发生的很多细胞活动在真核细胞中都存在保守性。基因组测序表明,酵母有大量的基因与人类同源^[14],尤其是基本细胞代谢及分裂有关的基因存在着高度的基因保守性^[15-17]。人体中重要的蛋白质很多都是在酵母中先被发现其同源物,其中包括有关细胞周期的蛋白质、信号蛋白质和蛋白质加工酶等^[18]。

本研究建立了一个筛选特异性抑制酿酒酵母产孢过程的人类基因的方法,使用实验室构建的带有人类基因的酵母表达质粒 pRS426-*TEFpr-geneX*,在二倍体酿酒酵母中表达单独的人类基因。利用二酪氨酸层具有自荧光特性,通过实验证明孢子的相对荧光强弱可以直接反映产孢率的高低,将相对野生型孢子的荧光强弱作为酿酒酵母产孢过程是否发生抑制的判断标准,筛选出不影响酵母营养细胞生长的同时能特异性抑制产孢过程的人类基因,并进行初步的研究。筛选获得的候选基因极大可能涉及细胞营养敏感性、减数分裂以及膜运输重组这些产孢过程中发生的细胞活动,同时哺乳动物细胞中这些相关的功能和调节机制尚未完全清楚,具有极大的研究价值。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒 酿酒酵母 AN120 野生型菌株、*dit1Δ* 缺陷型菌株、AN117-4B 野生型菌株、大肠杆菌 T1 噬菌体抗性菌株、大肠杆菌 DH5 α 以及质粒相关信息见表 1。

1.1.2 培养基 LB 培养基:酵母提取物 10 g,胰蛋白胨 10 g,氯化钠 10 g,纯化琼脂粉 20 g(固体培养基),用去离子水定容至 1 L,121 °C 高压灭菌 20 min 后使用。

SD-Ura 培养基:无氨基酵母氮源(YNB) 6.7 g,纯化琼脂粉 20 g(固体培养基),用去离子水定容至 900 mL,121 °C 高压灭菌 20 min,使用前分别加入 2 g 缺少尿嘧啶(Uracil)的氨基酸混合物与 100 mL 已灭菌的 20% 的葡萄糖溶液。

YPAD 培养基:酵母提取物 10 g,蛋白胨 A 20 g,腺嘌呤硫酸盐 30 mg,用去离子水定容至 900 mL,121 °C 高压灭菌 20 min,使用前加入 100 mL 已灭菌的 20% 的葡萄糖溶液。

YPACe 培养基:酵母提取物 10 g,蛋白胨 A 20 g,醋酸钾 20 g,腺嘌呤硫酸盐 30 mg,用去离子水定容至 1 L,121 °C 高压灭菌 20 min。

产孢培养基:醋酸钾 20 g,纯化琼脂粉 20 g(固体培养基),用去离子水定容至 1 L,121 °C 高压灭菌 20 min 后使用。

1.2 实验方法

1.2.1 pENT221 entry vector 提取 在提前灭菌过

表 1 本研究使用的菌株与质粒
Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株/质粒	基因型/说明	来源
AN120(野生型,二倍体)	<i>MATα /MATa ARG4 /arg4-NspI his3ΔSK /his3ΔSK ho: : LYS2 /ho: : LYS2 leu2 /leu2 lys2 /lys2 RME1 /rme1: : LEU2 trp1: : hisG /trp1: : hisGura3 /ura3</i>	[4]
HW3(<i>dit1Δ</i> 缺陷型)	AN120 <i>dit1Δ: : his5 + /dit1Δ: : his5 +</i>	[19]
AN117-4B(野生型,单倍体)	<i>MATα ura3 leu2 trp1 his3\$sk arg4-NspI lys2 ho::LYS2 rme1::LEU2</i>	作者所在实验室保藏
T1-Phage Resistant <i>E. coli</i>	F- <i>mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galUgalKrrpsL (StrR) endA1 nupG λ-tonA</i>	购于 Life 公司
DH5α	F- <i>Φ80lacZΔM15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK -, mK+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	实验室保藏
pENT221 entry vector	Kan ^r 多拷贝含有 attR1/2 交换位点含有人类 cDNA	购于 Life 公司
pRS426-TEFpr	Amp ^r , URA3 标记,多拷贝,含有 TEF 启动子	作者所在实验室保藏
pRS426-TEFpr destination vector	Amp ^r , URA3 标记,多拷贝,含有 TEF 启动子,含有 attL1/2 交换位点	本研究构建
pRS426-TEFpr-geneX	Amp ^r , URA3 标记,多拷贝,含有 TEF 启动子,含有人类 cDNA	本研究构建

的 10 mL 离心管中加入 2 mL 含有 Kan 抗性的 LB 液体培养基,将保存有人 cDNA 文库的 96 孔板从-80 ℃冰箱中取出,冰上静置 10 min,每孔吸取 10 μL 菌液接入含有 Kan 抗性的 LB 液体培养基中,37 ℃、220 r/min 过夜培养。离心收集所有菌体,使用生工购买的 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒提取质粒,并于-20 ℃下保存。

1.2.2 酵母表达质粒的构建 由于作者所在实验室购买的人 cDNA 文库原始克隆载体无法在酿酒酵母中表达,所以为了能在酿酒酵母中表达人类基因用于筛选,本研究构建了含有 attL1/2 交换序列的 pRS426-TEFpr destination vector,与含有人类 cDNA 和 attR1/2 交换序列的原始克隆载体 pENT221 entry vector 进行 LR 重组反应,在室温下将 1~7 μL pENT221 entry vector (50~150 ng/μL) 与 1 μL pRS426-TEFpr destination vector(150 ng/μL)在离心管里混合,用 pH 8.0 的 TE Buffer 补齐至 8 μL。将 LR Clonase II enzyme mix 从-20 ℃取出,冰上静置 2 min,短暂振荡 LR Clonase II enzyme mix 两次。每个样品(除了阴性对照)加入 2 μL LR Clonase II enzyme mix,两次短暂振荡混匀,25 ℃反应 1 h。反应结束后对每个反应加入 1 μL 蛋白酶 K 溶液,37 ℃反应 10 min,转化 1~2 μL 反应产物进入 DH5α 大肠杆菌宿主,涂布在 kan 抗性的 LB 平板上,37 ℃过夜培养。

1.2.3 重组质粒的验证 挑取转化得到的单个转

化子,接入 2 mL Kan 抗性的 LB 液体培养基中,37 ℃、220 r/min 过夜培养。离心收集所有菌体,使用生工购买的 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒提取质粒,根据购买 cDNA 文库所附带的对应人类基因序列,找出每个重组质粒内具有的 *Bam*H I 和 *Eco*R I 限制性酶切位点的位置和数量。用 10 μL 酶切体系(1 μL 重组质粒,1 μL 10×K Buffer,0.1 μL *Bam*H I,0.1 μL *Eco*R I,7.8 μL ddH₂O)在 37 ℃反应 2 h,核酸电泳(120 V,20 min,1 000 maker)验证重组质粒是否正确。

1.2.4 检测不同产孢率的酿酒酵母在 UV 下的荧光强度 为了检测产孢率与 UV 照射下荧光强度的关系,利用单倍体酵母无法产孢的特性,将双倍体酿酒酵母 AN120 与单倍体酿酒酵母 AN117-4B 按照不同比例混合,经过产孢培养从而形成高低不同的产孢率。将双倍体和单倍体野生型酿酒酵母分别接种到 5 mL YPAD 液体培养基中,过夜培养,通过测定 OD₆₆₀ 调整 AN120 与 AN117-4B 的菌液至相同浓度,按照 2:8,5:5,8:2 的比例混合两种菌液,分别取 20 μL 点在 YPAD 固体培养基上,置于 30 ℃恒温培养箱中培养 16 h。将已灭菌的中速定性滤纸贴合在新的 YPAD 固体培养基上,影印之前点板培养得到的菌落,使得酵母菌株影印到滤纸上,置于 30 ℃恒温培养箱中培养 8 h。将滤纸以及滤纸上的酿酒酵母菌落一并转移到产孢固体培养基上,置于 30 ℃

恒温培养箱中培养 24 h。取出滤纸浸润在 10% 的氨水缓冲液中并置于干净透明的塑料器皿中,使用凝胶成像仪拍摄 UV 下的荧光照片,使用 Image J 软件处理图片并测定荧光强度。同时挑取菌落重悬在无菌水中,显微镜下统计酿酒酵母营养细胞和孢子球的数量,计算产孢率。

1.2.5 重组质粒转化到酿酒酵母 接种酿酒酵母 AN120 到 5 mL YPAD 培养基(试管)中,30 °C、220 r/min 培养 10 h,转接 1 mL 菌液到 80 mL 液体 YPAD 培养基(250 mL 三角瓶)中,30 °C、220 r/min 过夜培养至 OD₆₀₀ 在 1.2~1.6 之间,使用 50 mL 离心管离心收集菌体,无菌水洗一遍,重悬于 20 mL 酵母一步转化液(2 mL、2 mol/L LiAc, 2 mL、1 mol/L 二硫苏糖醇,16 mL 50% PEG)中,振荡混匀,于 96 孔板每孔加入 100 μ L 菌液和 1 μ L 重组质粒(0.1 ng/ μ L),45 °C 孵育 30 min。每孔取两次 10 μ L 菌液点在 SD-Ura 固体培养基上,30 °C 培养 3 d。

1.2.6 筛选导致产孢缺陷的人类基因 挑取转化得到的表达了人类 cDNA 的酿酒酵母单菌落,重悬于 10 μ L 无菌水,点在 SD-Ura 固体培养基上,置于 30 °C 恒温培养箱中培养 16 h。将已灭菌的中速定性滤纸贴合在新的 SD-Ura 固体培养基上,影印之前点板培养得到的菌落,使得表达了人类基因的酵母影印到滤纸上,置于 30 °C 恒温培养箱中培养 12 h。将滤纸以及滤纸上的酿酒酵母菌落一并转移到产孢固体培养基上,置于 30 °C 恒温培养箱中培养 24 h。分析方法同 1.2.4,通过与表达了空质粒 pRS426-TEFpr 的野生型酿酒酵母 AN120 对比荧光强度,筛

选出在酿酒酵母中表达导致荧光强度明显降低的候选人类基因,筛选过程见图 1。

1.2.7 复筛得到的候选基因 将筛选到的人类基因重新转化酿酒酵母 AN120,转化过程同 1.2.5。为了检测初筛得到的候选人类基因在酿酒酵母中表达是否会影响营养细胞的生长,挑取转化得到的表达了人类基因的酿酒酵母单菌落在 SD-Ura 固体平板划线培养,将表达了空质粒 pRS426-TEFpr 的野生型酿酒酵母 AN120 作为对照,30 °C 恒温培养箱中培养 36 h 后进行对比。同时为了检测在酿酒酵母表达候选人类基因是否稳定抑制产孢过程,将转化得到的单菌落接入 5 mL SD-Ura 液体培养基中,30 °C、220 r/min 培养 16 h,将 100 μ L 菌液转接到 5 mL YPACe 培养基种,30 °C、220 r/min 培养 20 h,离心收集菌体,用无菌水洗涤两次,测量 OD₆₀₀ 并以此调整接入产孢液体培养基中的菌液浓度约为 3×10^7 个/mL,30 °C、220 r/min 培养 24 h 进行产孢过程。取 10 μ L 菌液点在血球计数板上,光学显微镜下观察统计酿酒酵母营养细胞和孢子球的数量,分别统计三次取平均值计算产孢率。

1.2.8 DPAI 染色 酿酒酵母表达了候选基因导致的产孢过程缺陷,可能是因为减数分裂过程受到抑制或发生了孢子壁形成缺陷。为了判断产孢过程缺陷的酿酒酵母是否进入减数分裂过程,将筛选得到的候选人类基因转入酿酒酵母中进行产孢培养,产孢方法同 1.2.7。离心收集孢子,用无菌水洗涤 2 次,重悬于 70% 乙醇,30 °C、30 min 对孢子进行固定。用无菌水洗涤两次,重悬在 500 μ L 无菌水中并加入

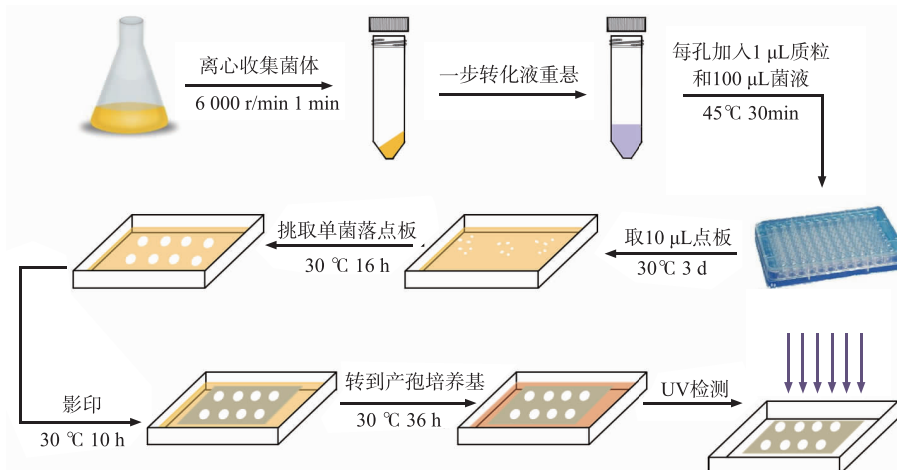


图 1 抑制酿酒酵母产孢的人类基因筛选过程

Fig. 1 Screening of human genes specifically inhibits sporulation

0.5 μ L、1 mg/mL DAPI 母液,室温下避光放置 20 min 进行染色。用无菌水洗涤两次,重悬于适量无菌水中,使用荧光显微镜观察 DAPI 染色结果并统计进入减数分裂过程的酿酒酵母比例。

2 结果与讨论

2.1 筛选方法的确立

2.1.1 酵母表达质粒的构建 作者所在实验室前期购买的人类 cDNA 文库的克隆载体无法在酵母中表达,因此作者在实验室保藏的酵母表达质粒 pRS426-TEFpr 中加入 attR1/2 位点和 ccdB 筛选标记,构建得到 pRS426-TEFpr destination vector,利用 cDNA 文库中原质粒载体 pENTR221 中含有的 attL1/2 交换位点,通过 LR 重组反应,将原质粒载体 pENTR221 中的人类基因重组至酵母表达质粒 pRS426-TEFpr 中。转化 DH5 α 大肠杆菌菌株,涂布在 LB-Amp 固体培养基上,通过 Amp 抗性筛选去除原 pENTR221 质粒载体,通过 ccdB 基因筛选去除未能完成重组的 pRS426-TEFpr destination vector,最后通过酶切验证,得到可以在酿酒酵母内表达人类基因的质粒载体 pRS426-TEFpr-geneX,并用于之后的筛选。

2.1.2 酿酒酵母产孢率与荧光强度的关系 为了验证酿酒酵母产孢率与二酪氨酸层荧光强度之间的关系,将相同浓度的双倍体酿酒酵母 AN120 和单倍体酿酒酵母 AN117-4B 菌液按照 2:8,5:5,8:2 的比例混合并点板,随后进行产孢培养,以得到不同的产孢率,同时单独使用酿酒酵母菌株 AN120、AN117-4B、dit1 Δ 作为对照,产孢培养结束后测定荧光强度并且统计产孢率。如图 2 所示,双倍体酿酒酵母 AN120 有着最高的产孢率和荧光强度,无法产孢的单倍体酿酒酵母 AN117-4B 与二酪氨酸缺陷型酿酒酵母 dit1 Δ 有着最低的荧光强度,混合菌液点板得到的不同产孢率的酿酒酵母荧光强度随着产孢率的提高荧光强度也随之增强。

实验结果证明,酿酒酵母在产孢培养后荧光强度的强弱可以作为判断酿酒酵母产孢过程中是否发生缺陷的判断标准。作者分析产孢培养后酿酒酵母的荧光强度,通过与野生型酿酒酵母孢子的荧光强度进行对比,筛选导致产孢过程发生缺陷的人类基因作为候选基因,该基因有极大可能抑制酿酒酵母的减数分裂过程或导致孢子壁缺陷。

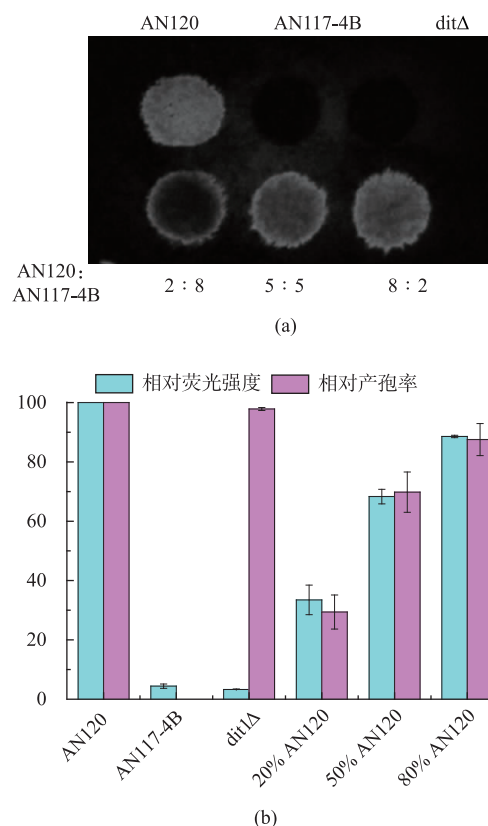


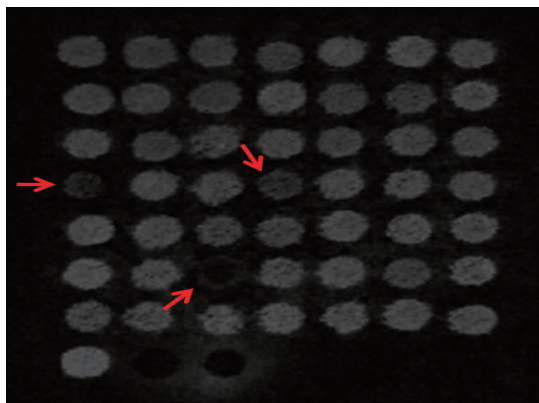
图 2 酿酒酵母产孢率与荧光强度关系

Fig. 2 Relate of sporulation rate and fluorescence intensity

2.2 筛选抑制产孢过程的人类基因

本研究将含有人类基因的酵母表达质粒 pRS426-TEFpr-geneX 转入酿酒酵母中,挑选表达了人类基因的单个转化子重悬在无菌水中,在 SD-Ura 固体平板上点板培养,以转入 pRS426-TEFpr 空质粒的酿酒酵母 AN120、AN117-4B、dit1 Δ 作为对照。用带有滤纸的新的 SD-Ura 固体平板进行影印,等滤纸上长出菌落后将滤纸转到产孢培养基上培养,取出带有菌落的滤纸,浸润在 10% 氨水缓冲液中,使用凝胶成像仪拍摄 UV 照射下的荧光照片。

使用 Image J 软件分析荧光强度,筛选出荧光强度显著低于 AN120 野生型菌株的转化子,将其表达的人类基因作为筛选得到的候选基因。如图 3 所示,表达了 CXCL10、CDC14A、ACP6 这 3 个基因的酿酒酵母荧光强度明显低于野生型酿酒酵母 AN120。如图 4(a)所示,同时挑取表达了这 3 个基因的菌落用无菌水重悬,显微镜下统计产孢率。如图 4(b)所示,统计得到的产孢率高低顺序与荧光强弱顺序结果一致,其中表达了 ACP6 基因的酿酒酵



AK3L1	CAMK4	DGUOK	FGGY	TSSK6	TPD52L3	PIP4K2C
CDK9	RBKS	BRSK2	FYN	PIK3C3	MAPK12	TYK2
RIOK3	PKMYT1	STYXL1	NKIRAS2	TRIB2	CAMKV	NUAK2
CDC14A	PTPRR	PTPRE	CXCL10	DUSP26	PTPN6	SLC37A4
DUSP3	DUSP12	PPP6C	ACPP	PPAP2B	PPP2R5C	ACPI
TPTE	ACP5	ACP6	ALPL	RABL4	SAR1B	RABL5
RAC1	ARL4D	RAB33A	RRAGD	FNIP1	RAB8A	ARF6
AN120	dit Δ	AN117-4B				

图3 UV照射下的荧光筛选照片

Fig. 3 Fluorescence intensity detect by UV

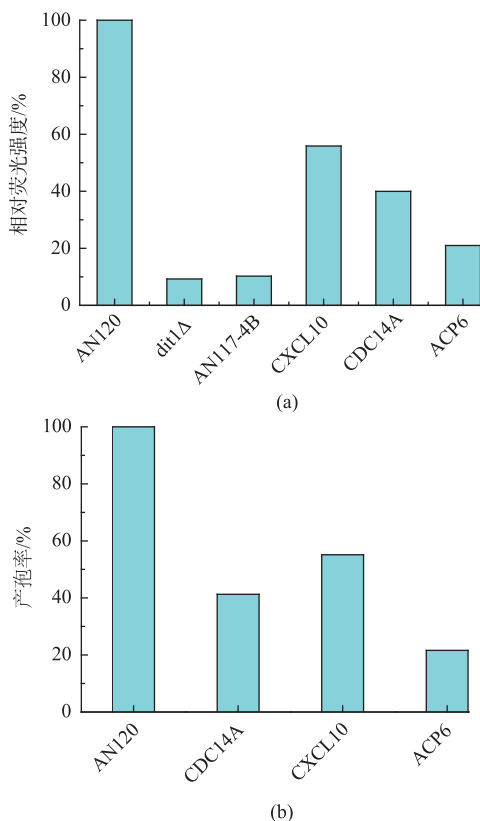


图4 酿酒酵母表达候选基因后的相对荧光强度与产孢率

Fig. 4 Relative fluorescence intensity and sporulation rate of the candidate gene expressed yeast

母同时具有最低的荧光强度和产孢率,因此这3个基因可以作为候选基因。

2.3 验证候选基因并初步分析

2.3.1 表达候选基因对酿酒酵母营养生长的影响

研究希望筛选得到的候选基因在酿酒酵母中表达只会特异性的抑制酿酒酵母的产孢过程,对酿酒酵母的营养生长不会造成抑制,为此将带有候选基因的质粒的重新转化酿酒酵母,挑取转化子在SD-Ura固体平板上划线培养36 h。如图5所示,表达了候选基因CXCL10、ACP6的酿酒酵母与野生型生长状况相同,对酿酒酵母细胞的生长没有抑制作用。表达了候选基因CDC14A的酿酒酵母生长情况相对于野生型受到较弱的抑制,可能是因为CDC14A (cell division cycle gene14 homolog A) 作为细胞分裂周期蛋白质基因,在酿酒酵母中表达影响了出芽生殖,从而抑制了酿酒酵母细胞的生长。

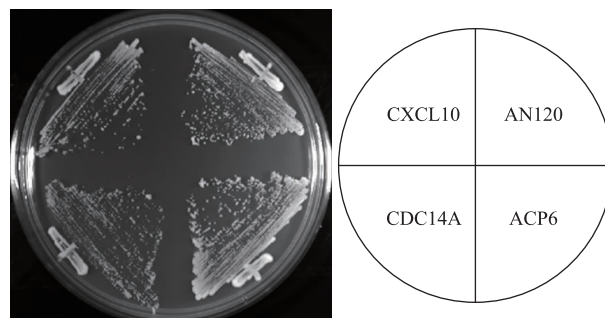


图5 表达候选基因对酿酒酵母细胞生长的影响

Fig. 5 Express the candidate gene in yeast cells and detect the effect on yeast growth

2.3.2 检测酿酒酵母产孢率 为了确认筛选得到的候选基因对酿酒酵母的产孢过程具有抑制作用,挑选表达了候选基因的转化子并使用液体培养基进行产孢,产孢结束后吸取菌液,显微镜下统计产孢率。如图6所示,表达得到的三个候选基因对酿酒酵母产孢过程具有抑制作用,产孢率由高到低分别是表达了CXCL10、CDC14A、ACP6的酿酒酵母菌株,与之前筛选结果一致,同时也证明该方法筛选得到的结果较为可靠。

2.3.3 DAPI染色对减数分裂进行检测 二倍体酿酒酵母在缺乏氮源且存在非发酵型碳源条件下,营养细胞会停止生长并进入产孢过程,通过减数分裂产生孢子。为了研究表达了候选基因导致产孢缺陷的酿酒酵母在产孢过程中是否进入减数分裂过

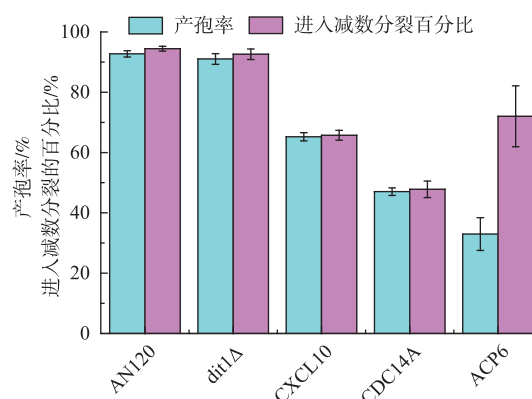


图6 酿酒酵母表达候选基因后的产孢率及产孢过程中进入减数分裂的比例

Fig. 6 Sporulation rate and meiosis rate of yeast expressed candidate gene

程,我们将表达了候选基因的酿酒酵母进行产孢培养后使用核酸染料 DAPI 染色,统计进入减数分裂过程的酿酒酵母比率,并与产孢率进行对比。如图6所示,表达了 CXCL10、CDC14A 基因的酿酒酵母进入减数分裂的比率与产孢率大致相同,说明表达 CXCL10、CDC14A 基因可能导致酿酒酵母无法进入减数分裂过程。CXCL10(CXC chemokine ligand 10)干扰素诱导蛋白质 10 作为趋化因子配体定位于细胞膜上,其在酿酒酵母中表达会抑制产孢过程的原因尚无合理解释。表达了 ACP6(Lysophosphatidic acid phosphatase type6)溶血磷脂酸磷酸酶基因的酿

酒酵母进入减数分裂比率明显高于产孢率,证明减数分裂过程已经开始,之前的研究结果证明,ACP6 定位于线粒体上,通过调节线粒体脂类代谢功能从而影响线粒体的功能,表达该基因可能导致减数分裂过程中受到抑制或孢子壁形成过程发生缺陷。

3 结 语

酵母与同为真核生物的哺乳动物细胞细胞具有很多相似的结构同时具有大量的同源基因,酵母产孢过程中发生的营养敏感性、减数分裂、囊泡重组等细胞活动同样会发生在哺乳动物细胞中。将酵母作为人类基因的筛选工具,以及研究同源基因功能的模式生物具有巨大的研究价值。本研究建立的筛选方法利用酿酒酵母对人类 cDNA 文库进行筛选,获得在不影响酿酒酵母营养细胞生长的同时特异性抑制酵母产孢过程的人类基因,并通过实验证明了筛选方法的可靠性。本研究初次筛选的 49 个人类基因中发现了 3 个对产孢过程造成抑制的人类基因,并且抑制发生在不同的产孢阶段,据此推测应该有相当数量的人类基因会对产孢过程造成影响,因此筛选特异性抑制产孢过程的人类基因具有广阔的研究前景。本研究对人类新功能基因的发现以及将酿酒酵母作为模式生物研究人类基因提供了新的方法和思路,同时为之后的筛选与研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] LEE M G, NURSE P. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene cdc2[J]. *Nature*, 1987, 327(6117): 31-35.
- [2] WANG Liping, SHAO Kankai, GAO Xiaodong, et al. Functional analysis of the SNARE domain of syntaxin family proteins using yeast sporulation[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2015, 34(5): 530-535. (in Chinese)
- [3] MITCHELL A P. Control of meiotic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbiological Reviews*, 1994, 58(1): 56.
- [4] NEIMAN A M. Ascospore formation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Microbiology & Molecular Biology Reviews* Mmbr, 2005, 69(4): 565-584.
- [5] NEIMAN A M. Sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Genetics*, 2011, 189(3): 737-765.
- [6] MOENS P B. Fine structure of ascospore development in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1971, 17(4): 507-510.
- [7] BYERS B. Cytology of the yeast life cycle[J]. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 1981, 11A: 59-96.
- [8] NEIMAN A M. Prospore membrane formation defines a developmentally regulated branch of the secretory pathway in yeast[J]. *Journal of Cell Biology*, 1998, 140(1): 29-37.
- [9] KLIS F M, MOL P, HELLINGWERF K, et al. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Fems Microbiology Reviews*, 2002, 26(3): 239-256.

- [10] KREGER-VAN RIJN J. Electron microscopy of germinating ascospores of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Archives of Microbiology**, 1978,117(1):73-77.
- [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] 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.
- [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] REMM M, STORM C E, SONNHAMMER E L. Automatic clustering of orthologs and in-paralogs from pairwise species comparisons 1[J]. **Journal of Molecular Biology**, 2001,314(5):1041-1052.
- [15] GERN J. The sequence of the human genome[J]. **Science**, 2001,291(5507):428-436.
- [16] GOFFEAU A, BARRELL B G, BUSSEY H, et al. Life with 6000 genes[J]. **Science**, 1996,274(5287):546-567.
- [17] LANDER E S, LINTON L M, BIRREN B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome[J]. **Nature**, 2001,409(6822):860-921.
- [18] BOTSTEIN D, CHERVITZ S A, CHERRY J M. Yeast as a model organism[J]. **Science**, 1997,277(5330):1259-1260.
- [19] ZHANG H, TACHIKAWA H, GAO X D, et al. Applied usage of yeast spores as chitosan beads[J]. **Applied & Environmental Microbiology**, 2014,80(16):5098-5105.

会 议 消 息

会议名称:第六届国际食品与环境科学会议(ICFES 2020)

会议地点:越南河内

主办单位:ICFES 2020

联系人:Hedy

电 话:+86-28-86528465

Email: icfes@cbees.net

会议简介:第六届国际食品与环境科学会议(ICFES 2020)将于2020年2月23日至25日在越南河内举行。会议所有论文都会进行出版,环境主题的文章将出版到国际会议论文集,并被EI Compendex, Scopus, Thomson Reuters (WoS), Inspec, et al.检索。食品主题的文章将收录在工程与技术数字图书馆,并被WorldCat, Google Scholar, Cross ref, ProQuest, CABI.检索。将会有三个顶级教授受邀参加会议并将为会议呈现学术前沿的大会报告和研究成果,他们是来自台湾国立交通大学的Tseung-Yuen Tseng教授,越南胡志明市生物技术与食品技术研究所的副教授DAM SAO MAI,以及胡志明市工业大学的著名副教授LE VAN TAN。

会议网站:<http://www.icfes.org/>

投稿方法:<http://confsys.iconf.org/submission/icfes2020>

电子邮件:icfes@cbees.net

联系电话:+852-35:00-0137(香港)/+1-206-456-6022(美国)/+86-28-86528465(中国)

会议专员:Hedy