

一株德国酿酒酵母无抗性电转化条件的研究

徐民俊¹, 周世宁^{1,*}, 付京花², 田小群³

(1. 中山大学生命科学学院有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东广州 510275;

2. 华南农业大学动科院, 广东广州 510642;

3. 广州珠江啤酒股份有限公司, 广东广州 510308)

摘要: 无抗性基因转化是实现转基因食品安全性的重要途径之一, 转化子筛选是该技术面对的最大瓶颈。本研究以一株德国酿酒酵母 NSLA112 为材料, 探讨了电激转化过程中各参数对该细胞存活率的影响。结果表明: ①该酵母与国内常见酿酒酵母有较大差别, 电激转化参数需要随不同酵母种类进行调整; ②无筛选标记的转化方法要求细胞具有较高的转化效率, 同时降低转化操作后细胞的存活数量, 以提高筛选工作的效率, 较好地平衡了细胞死亡率与转化效率的关系。

关键词: 酿酒酵母, 电激转化, 无抗性转化

Study on optimal electroporation conditions of Germanic *Saccharomyces cerevisiae*

XU Min-jun¹, ZHOU Shi-ning^{1,*}, FU Jing-hua², TIAN Xiao-qun²

(1. State Key Lab for Biology Control, College of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China;

2. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

3. The Technique Center of Zhujiang Beer Group Corporation, Guangzhou 510308, China)

Abstract: Non-antibiotic resistance marker transformation is an important approach for the genetically modified foods (GMFs), although the selection of transform is a choke point. The transformation efficiency was important for this procedure. The *Saccharomyces cerevisiae* NSLA112 was used to optimize parameters mentioned above. The result showed that the death rate and the transformation conditions were optimized.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; electric transformation; marker-free transformation

中图分类号: TS261.1⁺1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2008)08-0087-04

纯生啤酒泡沫稳定性问题日益受到重视, 主要影响因素是泡沫中残留的蛋白酶 A 导致泡沫蛋白的降解^[1]。由于转基因食品安全性一直是人们关注的焦点, 酵母菌种改良中通常采用的抗生素或营养缺陷型标记显然不符合食品生产应用的需求; 通过非抗生素抗性的方法进行基因转化是实现食品安全性的重要途径之一。将外源基因导入酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 主要有 3 种方法。原生质体转化法因操作复杂限制了其进一步发展^[2]。随后建立起完整细胞转化方法^[3], 后来延伸为对酵母菌菌落进行处理^[4], 这类方法虽然操作简单但转化率偏低。第三类方法即电转化方法^[5], 目前已经成为酵母外源基因导入的首选方法^[6]。但是, 该方法虽然简

单方便, 影响电激基因导入的因素却相当复杂^[7], 受电转化参数的影响非常明显。本实验以工业生产用德国酿酒酵母 NSLA112 为材料, 探讨了电激和电激后细胞复壮参数对细胞存活率的影响, 平衡转化效率与检测效率的关系, 成功地实现了野生型酿酒酵母无标记转化子筛选。

1 材料与方法

1.1 实验材料

质粒 pRS403 购自美国标准生物品收藏中心 (ATCC); ECM399 电激仪 购自美国 BTX 公司; Taq、pfu 酶 购自 TaKaRa 公司; 无效等位基因合成引物及检测引物 由 Invitrogen 公司合成; 德国酿酒酵母 NSLA112 为本实验室保存; 细菌培养用酵母提取物、蛋白胨、细菌培养用琼脂 购自 OXOID 公司; D-葡萄糖 购自 MBCHEN 公司; 其他试剂 均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 试剂配制方法

1.2.1.1 YPD 培养基 1% 酵母提取物、2% 蛋白胨、2% 葡萄糖, 用于培养酵母菌。

收稿日期: 2007-11-12 * 通讯联系人

作者简介: 徐民俊 (1974-), 男, 助理研究员, 博士, 主要从事食品微生物学研究。

基金项目: 广东省科技计划项目 (2007B011000007); 中国博士后基金 (20070410854)、广东省自然科学基金面上项目 (7301731) 资助; 东莞科技发展项目。

1.2.1.2 0.1% 吕氏碱性美蓝染色液试剂的配制 A 液包括美蓝 (methylene blue, 0.6g), 95% 乙醇 (30mL); B 液包括 KOH (0.01g), ddH₂O (100mL)。使用前混合^[8]。

1.2.2 酿酒酵母生长曲线测定^[9] 通过 OD 值测定生长曲线,与通过血球计数板计数的方法结合使用,彼此校正。

1.2.3 构建含 *His* 片段的无效等位基因 本研究拟通过基因工程手段,利用酿酒酵母自身的 *His* 基因破坏其蛋白酶 A 基因。根据酵母数据库公布的蛋白酶 A 基因序列,结合 pRS403 质粒序列设计 1 对 PCR 引物,分别包含与蛋白酶 A 序列具有末端同源的 40bp 核苷酸及 *His* 基因的一段 20 个核苷酸序列。经过 PCR 扩增以后,形成 *pep4::HIS3* 的无效等位基因片段用于转化后的酵母染色体重组。利用酵母自身基因破坏目的基因避免了外源基因导入,并且整个基因敲除过程不涉及抗性基因。

1.2.4 野生型酿酒酵母电激转化 从 4℃ 保存的酿酒酵母 YPD 平板上挑取一个丰满菌落,接种 5mL YPD 培养液,30℃ 过夜培养。用血球计数板测定过夜培养物浓度,调节加入量,控制 50mL YPD 培养液中初始细胞浓度约 5×10^6 cell/mL,30℃ 继续培养 5h,至细胞数目达 2×10^7 cell/mL。取 1.5mL 培养液经 $3000 \times g$ 离心 5min,收获细胞。用 1mL 冰冷的 ddH₂O 洗涤 2 次后,将菌体重悬于 100μL ddH₂O。取 25μL 菌悬液,加入 3μL (1μg) 预先制备的无效等位基因片段充分混匀,转移至冰预冷的电激槽中,静置 5min 后电激。对电激后细胞悬液进行复壮后,梯度稀释涂布 YPD 平板,30℃ 培养 3d,进行菌落计数计算存活率。同时通过美蓝染色进行存活率校正。实验重复 2 次。

2 结果与分析

2.1 酿酒酵母对数生长期的确定

酵母细胞的生理状态对转化效率的影响非常明显,处于对数生长中期的细胞转化效率很高,而对数生长前期转化效率较低,进入平台期的细胞转化效率最低。因此,不同细胞和不同培养环境下其进入对数生长期的时间不同。因此,确定其对数生长期,并将转化用细胞控制在对数生长中期将有利于提高转化效率。在 30℃,150r/min 条件下,该酿酒酵母生长曲线如图 1。结果表明,在 30℃,150r/min 条件下,该酿酒酵母增长一代约需 2.5h。其对数生长期为接种后 4~8h,与国内常见的酿酒酵母生长参数有所不同。

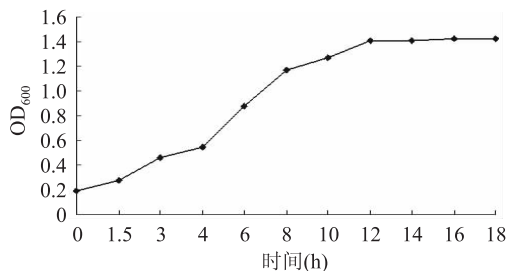


图 1 酿酒酵母生长曲线

2.2 电转化电压与细胞死亡率的关系

与原生质体转化相比,由于细胞壁的存在,酿酒酵母质膜对电场的耐受性有极大提高。汪和睦等 (1986) 的研究表明,在脉冲幅度高达 20kV/cm,脉冲时间常数长达 400μs,脉冲数目多至 7 个的情况下,电激后完整酵母细胞的再生率与未经电场处理的完整细胞对照组之间无明显差异。因此,选择上述电场条件的上限将会提高酵母细胞的基因转化率^[10]。有资料表明,当细胞死亡率达到 50%~75% 时,转化效率能高达 $10^9 \sim 10^{10}$ 转化子/μg 闭环 DNA,远高于氯化钙法的转化效率 ($10^5 \sim 10^8$ 转化子/μg 闭环 DNA)^[11]。

本实验采用 ECM399 电激仪 (美国 BTX 公司),电压选择范围为 0.1~2.5kV;电激杯间隙 0.1cm。在该实验条件下,对该酿酒酵母细胞进行了一系列电压梯度实验,结果见图 2。当电压为 1.2kV 时,细胞死亡率为 78.2%;1.5kV 时,死亡率为 81.9%;当电压为 1.8kV 时,细胞死亡率达 95%。进行无抗性基因转化要求较高转化效率,同时还需要适度降低存活细胞的数目以提高后续筛选工作的效率。综合考虑和平衡各影响因素,确定在 0.1cm 间隙电转杯条件下的电转化电压为 1.8kV,脉冲时间为 5ms。而国内常用的酵母细胞在电压达到 1.8kV 时的存活率通常为 75% 左右。由此可见,该酿酒酵母电压承受能力是比较弱的。

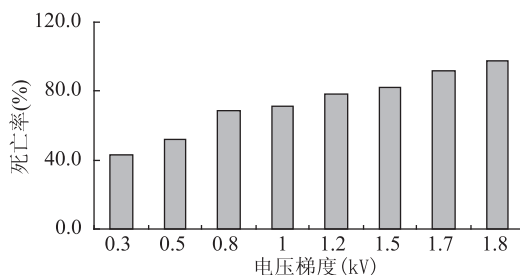


图 2 电激电压与死亡率的关系

2.3 电激后加 YPD 的时间对酵母存活能力的影响

在施加电脉冲时,酵母细胞膜上会形成孔洞,这种孔洞成为基因转移的通道。孔洞从产生到复原大致经历 3 个过程:在加电脉冲后的最初几毫秒内,其直径增大到 20~40nm;随后几秒内扩大到 20~100nm,并在数秒内保持稳定;数秒之后孔洞开始复原,直径也随之缩小^[12]。因此,缓冲液补加时间对电激后细胞的存活具有重要影响。

本文对酿酒酵母电激后补加培养基时间的研究表明,电激后于低温静置一段时间可以明显提高细胞的存活能力,而电激后立即加入培养基则导致细胞大量死亡,结果见图 3。从图 3 可以看出,补加培养基的最佳时间为电激后 2min,超过 10min 细胞存活数急剧下降。

2.4 DTT 浓度梯度对酵母存活能力的影响

通过还原剂的还原作用打开细胞壁蛋白质的部分二硫键,从而使细胞壁变得松弛,有利于电激形成穿孔,从而提高转化效率。常用的还原剂有二硫苏糖醇 (DTT) 和巯基乙醇,本实验采用 DTT。DTT 是一

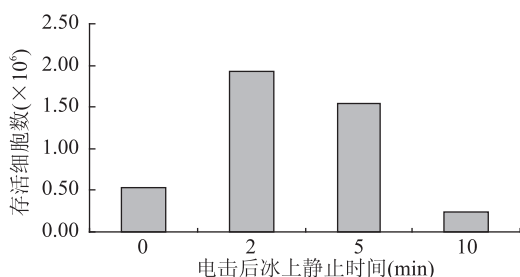


图3 电激后加 YPD 的时间对酵母存活能力的影响

种强还原剂,浓度越高还原作用越强,但过高的浓度会对细胞造成伤害。

从上述实验结果可以看出,在电激电压等其他条件相同的情况下,随着 DTT 浓度增高,细胞存活率呈现逐渐降低趋势。15 $\mu\text{mol/L}$ 情况下,细胞具有最高的生存数量;25、35 $\mu\text{mol/L}$ 情况下,细胞存活数目接近;超过 45 $\mu\text{mol/L}$ 情况下,细胞存活率开始大幅度降低;而 55 $\mu\text{mol/L}$ 时最低。确定 DTT 使用浓度为 35 $\mu\text{mol/L}$ 。

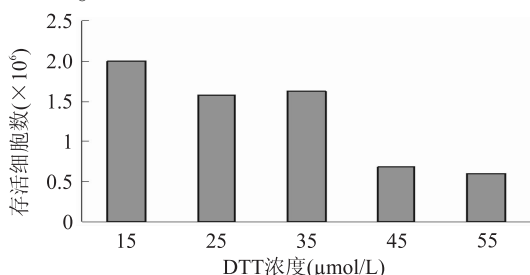


图4 DTT 浓度梯度对酵母存活能力的影响

2.5 温育时间对酵母存活能力的影响

温育时间对电激后酿酒酵母细胞的存活能力有很大影响,结果见图 5。结果表明,电激后如果不进行温育,则细胞存活率相当低。随着温育时间的增加,存活率大体呈现递增趋势。其中保温 30min 与 45min 细胞存活率比未保温直接涂板的细胞存活数有较大幅度提高,提高比例接近;保温 90min 时细胞数目有显著提高,大致达到未保温时的 2 倍;保温 120min 时细胞数虽略高于 90min 时,但超过 120min 时理论上细胞将开始准备分裂,不利于后续检测。

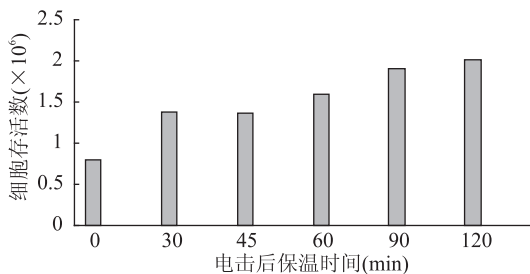


图5 温育时间对酵母存活能力的影响

根据上述实验结果,可以确定细胞回收之后温育复壮是必要的,理想的复壮参数为电激后 30℃ 保温 90min,此时有利于恢复和维持细胞活性。

2.6 葡萄糖焦化现象对电激后生长能力的影响

酵母完全培养基 YPD 中含 2% 葡萄糖,在灭菌的过程中会产生焦化现象,导致培养基颜色加深。因此,YPD 培养基配制可采取加葡萄糖后灭菌(焦化葡萄糖培养基)和将葡萄糖和琼脂等分别灭菌后再

混合(未焦化葡萄糖培养基)的策略。有研究表明,葡萄糖焦化不利于酵母最佳生长。因此,建议降低灭菌压力,延长灭菌时间(延长至 30min),以减轻葡萄糖焦化现象^[10]。本实验采用正常灭菌压力,灭菌条件均为 121℃,15min。对先加葡萄糖后灭菌和分别灭菌再混合的方法进行比较,实验结果参见图 6。

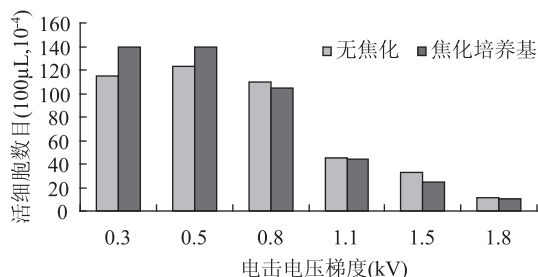


图6 葡萄糖焦化现象对电激后酿酒酵母生长能力的影响

图 6 反映了培养基配制方法对电激后酵母细胞存活能力的影响。结果表明,在该灭菌条件下可以达到预期灭菌效果。2 种方法制作的平板上细胞生长数目略有差别:在低电激情况下,焦化葡萄糖生长的细胞数目偏高;当电压达到 0.8kV 以上时,未焦化培养基生存的细胞数目相对较高,但差别不是很大。而普通酿酒酵母细胞对焦化培养基的反应还是比较大的^[11]。因此,可以通过加葡萄糖后灭菌的方式制作培养平板,减少操作步骤的同时也减少了污染的可能性。

3 讨论

通过上述转化参数可以了解该德国酿酒酵母与国内常见的酿酒酵母在生长参数和耐受性方面是有区别的。其对数生长期比常见酵母略长;耐受电激冲击能力较弱;但耐受培养基褐化能力稍强。

无筛选标记的转化方法要求细胞具有较高的转化效率。但由于转化子的筛选是对每个存活的细胞进行 PCR 验证,如果仅追求高转化效率,则电激转化完成后需要对约 10^6 数量级的细胞进行筛选(假设转化电压为 1.5kV),这几乎是不可能实现的。因此需要平衡二者的关系,在保持较高转化率的同时降低转化操作后细胞的存活数量,以提高筛选工作的效率。另一方面,电转化的原理是通过短暂电脉冲在细胞膜上形成孔洞促成外源基因进入,因此电压越高形成孔洞的几率越高,但细胞也越加脆弱。因此前期采用较高电压电激后,后期必须有良好的复壮措施维护转化后细胞的存活。

参考文献:

- [1] 何国庆,王肇悦,刘中山. 啤酒泡沫阳性蛋白的电泳分离及其与酵母蛋白酶 A 的关系[J]. 农业生物技术学报,2005, 13 (5): 686~687.
- [2] Hinnen A, Hicks JB, Fink JR. Transformation of Yeast [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1978, 75(4): 1929~1933.
- [3] Iot H, Fukuda Y, Murata K, et al. Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations [J]. J Bacteriol, 1983, 153(3): 163~168.

(下转第 92 页)

基本不变,而精氨酸(ARG)含量略有升高。谷氨酸和天门冬氨酸是海米的主要鲜味成分,甘氨酸和丙氨酸对海米的甜味有贡献,精氨酸呈苦味,随原料鲜度的下降,对鲜甜味有贡献的游离氨基酸会随液汁一起部分流失,而精氨酸含量略有增加,致使制得的海米鲜味明显减弱,出现咸苦味^[4]。在海米氨基酸组成中,谷氨酸的含量比甘氨酸含量高,可能是加热过程中多肽分解所引起的^[5]。

2.6 海米中生物胺组成

从图1可知,海米七种生物胺中,腐胺和尸胺变化较明显,从7.35mg/kg和6.8mg/kg分别增加到28.69mg/kg和34.97mg/kg,随原料虾的鲜度降低其含量增加到原来的4倍和5倍。海米中的精胺和亚精胺含量较高,其含量随原料虾鲜度的降低而降低,但呈现波动,而在赵庆喜等^[6]研究的南美白对虾中精胺和亚精胺的含量较腐胺和尸胺少,后实验得出是因原料差异引起的,立虾中精胺和亚精胺比尸胺和腐胺多。酪胺和胍丁胺含量都有不同程度的减少,组胺未被检测到。由此可见,原料立虾的鲜度主要影响海米中腐胺和尸胺的含量,这与赵庆喜等^[6]研究南美白对虾中的生物胺结果一致。有不少研究都表明,生物胺含量和生物胺指标可作为水产品质量评定指标^[7~12]。因而,可以以海米中的尸胺和腐胺含量作为海米品质指标。

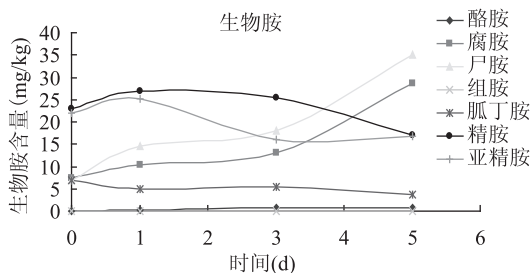


图1 海米中生物胺含量

3 结论

原料鲜度对海米品质有较大的影响,鲜度差导致海米品质显著降低,通过对不同鲜度立虾加工海米,对其蛋白、盐分、弹性、硬度、氨基酸以及生物胺进行测定分析,表明蛋白、盐分、弹性、氨基酸及生物胺与海米品质差异有较好的相关性,都可作为海米品质评定的可靠指标。当然,对海米品质评定体系

的建立还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 段青源,钟惠英. 出口虾米的加工技术[J]. 浙江水产学院学报,1998,17(2):149~152.
- [2] 于广利,吕志华. 食品检验分析[M]. 青岛:中国海洋大学出版社,2005.
- [3] C Niamnuy, S Devahastin, S Soponronnarit. Quality changes of shrimp during boiling in salt solution[J]. Journal of food science,2007,75(5), s289~s297.
- [4] 李兆杰,薛勇. 水产品化学[M]. 北京:化学工业出版社,2007,9.
- [5] 薛长湖,汪贻生,楼伟凤. 虾蟹海产品香味的前体物质的加热变化[J]. 青岛海洋大学学报,1994(4):491~496.
- [6] QING-XI ZHAO, et al. Determination of Biogenic Amines in Squid and White Prawn by High - Performance Liquid Chromatography with Post column derivation[J]. J Agric Food Chem,2007, 55:3083~3088.
- [7] Claudia R C, Antonio M. Sensory and biochemical aspects of quality of whole big eye tuna (*Thunnus obesus*) during bulk storage in controlled atmospheres[J]. Food Chem,2005,89:347~354.
- [8] Fatih Ozogul, Yesim Ozogul. Biogenic amine content and biogenic amine quality indices of sardines (*Sardina pilchardus*) stored in modified atmosphere packaging and vacuum packaging[J]. Food Chem, 2006,99(3): 574~578.
- [9] Martin Krizek, Tomas Pavlicek, Frantisek Va'cha. Formation of selected biogenic amines in carp meat[J]. J Science Food Agric,2002,82:1088~1093.
- [10] H Yamanak, K Shiomi, T Kikuchi. Agmatine as a Potential Index for Freshness of Common Squid (*Todarodes pacificus*) [J]. J Food Sci,1987, 52 (4):936~938.
- [11] Mah J H, Han H K, Oh Y J, et al. Biogenic amines in Jeotkals, Korean salted and fermented fish products[J]. Food Chem,2002,79:239~243.
- [12] Veciana-Nogues M T, Marine-Font A, Vidal-Carou M C. Biogenic Amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationships with microbial count, ATP - related compounds, volatile amines, and organoleptic changes[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry,1997, 45:2036~2041.

(上接第89页)

- [4] Elble R. A simple and efficient procedure for transformation of yeasts[J]. Bio Techniques, 1992, 13(1): 18~20.
- [5] Karube I, Tamiya E, Matsuoka H. Transformation of *Saccharomyce cerevisiae* Spheroplasts by High Electric Pulse[J]. FEBS Letts, 1985, 182: 90~94.
- [6] Hashimoto H, Morijawa H, Yamata Y, et al. A novel method for transformation of intact yeast cells by electroinjection of plasmid DNA[J]. Applied Microbiol Biotechnol,1985,2(1): 336~339.
- [7] Faber KN, Haima P, Harder W, et al. Highly - efficient electro transformation of the yeast *Hansenula polymorpha* [J]. Curr Genet, 1994, 25(4):305~310.
- [8] 沈萍,范秀容,李广

武. 微生物学实验(第三版)[M]. 北京:高等教育出版社,2002. 42.

[9] 杨革. 微生物学实验教程[M]. 北京:科学出版社,2005. 25.

[10] 汪和睦,鲁玉瓦,武廷宽,等. 酵母完整细胞及原生质体的最佳电穿孔条件[J]. 生物物理学报,1986, 7(3):391~397.

[11] 奥斯伯 FM,金斯頓 RE,赛德曼 JG 等著,马学军,舒跃龙译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京:科学出版社,2005. 175.

[12] 汪和睦,谢廷栋. 细胞电穿孔电融合电刺激:原理技术及应用[M]. 天津:天津科学技术出版社,2000. 144~154.