

在不同碳源培养条件下酿酒酵母的蛋白质组解析

张慧敏 姚善泾* 彭立凤 清水和幸

(浙江大学化学工程与生物工程学系 杭州 310027)

摘 要 为了分析酿酒酵母在不同培养条件下的代谢调控过程的差异,采用固相 pH 梯度-SDS 聚丙烯酰胺双向凝胶电泳对其利用不同碳源时细胞的总蛋白进行了分离,银染显色,使用 2D 蛋白质图像分析系统 Image Master 2D Elite 对双向电泳图谱进行分析,查询 SWISS-2D PAGE 蛋白质组数据库,识别了约 500 个蛋白质点。对与糖酵解途径、磷酸戊糖途径、三羧酸循环和几种回补反应相关的大部分关键的蛋白质进行了差异分析。探讨了酿酒酵母利用不同碳源时及生长的不同阶段代谢机理的变化和在蛋白质水平的调控。

关键词 双向凝胶电泳,蛋白质组,代谢调控,酵母

中图分类号 Q51 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)03-0398-05

酿酒酵母作为一种重要的工业微生物,在生产实践和基础研究中有着广泛的应用。国外学者对研究酵母在不同的培养条件下代谢机理的变化取得了很大的进展。随着蛋白质双向电泳技术(2DE)不断发展,2D 凝胶的分辨率越来越高,多种生物的蛋白质组图都已建立数据库并上互联网^[1,2],2D 图像分析系统也越来越完备^[3,4],使研究人员能够对肉眼很难辨别的蛋白质差异点进行分析,成为研究微生物代谢机理的强有力的工具。继基因组计划之后,作为生命活动的执行体蛋白质组学的研究正成为国际上新的热点^[5,6]。我国学者也逐渐展开对这一领域的研究工作,但尚缺乏基于蛋白质组差异分析的机理性的研究^[7,8,9]。本文采用固相 pH 梯度-SDS 聚丙烯酰胺双向凝胶电泳对酿酒酵母利用不同碳源时及培养的不同阶段的细胞的总蛋白进行了分离,使用 2D 蛋白质图像分析系统 Image Master 2D Elite 对双向电泳图谱进行定量分析,探讨了其中间代谢途径为了适应不同的条件下所作的系统而精细的调控。

1 材料与方 法

1.1 菌种与培养条件

菌株为一种重要的工业微生物 *Saccharomyces cerevisiae* IFO 2374 ;

培养方法:种子接入 2L 发酵罐中,装液量为

1L 培养基为 20g/L Polypepton,10g/L Yeast extract,碳源分别为 20g/L 葡萄糖或 5g/L 乳酸,pH 5.0,培养温度为 30℃,搅拌转速 300r/min,通气量为 1.0L/min。

1.2 检测方法

通过分光光度计(Ubet-30, Jasco, Tokyo)测量发酵液在 600nm 处的光密度(OD)来测定菌浓度。再根据光密度与细胞干重的关系将其转换成细胞干重/发酵液(g/L)。用葡萄糖 Kit 来测定葡萄糖浓度(Wako Co., Osaka)。乙酸和乳酸浓度在高效液相色谱 HPLC(LC-10AC, Shimadzu Co., Tokyo, Japan. Column: Shim PACK SCR-10ZH)上测定。乙醇浓度通过气相色谱(GC-8APF/C-R6A, Shimadzu Co., Kyoto)测量。

1.3 双向电泳(2DE)

1mL 发酵液在 12 000 r/min 4℃下离心 10min,收集菌体,并在盐溶液(3mmol/L KCl, 5mmol/L KH₂PO₄, 68mmol/L NaCl, 9mmol/L NaH₂PO₄)中洗涤 2 次后,悬浮在 0.1mL 的裂解溶液(8mol/L 脲, 4%(W/V) CHAPS, 40mmol/L Tris base, 使用前用去离子水现配,保存在 -20℃冰箱中,也可用 Triton X-100 或 NP-40 代替 CHAPS)中,在室温下保存 1h。将样品置于冰中超声波破碎 1min。再次离心后取上清液作 2DE 分析。第一维在 18cm 固定化的 pH3~10 的线性 IPG 凝胶条(Amersham Pharmacia Biotech Co., Sweden)上

收稿日期 2003-10-17, 修回日期 2004-02-02。

基金项目 国家自然科学基金资助(No. 20276065)。

* 通讯作者。Tel 86-571-87951982; Fax 86-571-87951015; E-mail yaosj@che.zju.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

进行,IPG 凝胶在水合溶液(8 mol/L 脲,2% CHAPS,10 mmol/L DTT,和几粒溴酚蓝)中重新水合,并放置过夜,载样量 1mL。经过重新水合的凝胶条在 Multiphor II™ 电泳仪上,在 500V/2mA/5W 下先维持 1min,然后在 1.5h 内电压从 500V 连续升到 3500V,最后在 3500V 维持 6.3h。等电聚焦以后,凝胶条在 SDS 平衡液(1% DTT,2.5% 碘化乙酰胺,50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液,6mol/L 脲,0.25% DTT,30% glycerol 和 1% SDS)中平衡 2 次。平衡后的凝胶条置于预制的 SDS 梯度凝胶(ExcelGel SDS XL 12-14,Amersham Pharmacia Biotech Co., Sweden)上进行二维电泳,首先在 1000 V/20mA 下维持 45min,然后在 1000 V/40 mA 下维持 160min。蛋白质 marker(2D 标样,购自 Bio-Rad, CA)与样品同时进行电泳。电泳结束后,在 Hoefer 凝胶自动染色仪(Amersham Pharmacia Biotech Co., Sweden)上进行银染。

1.4 图像采集与分析

银染色后的凝胶在 Digital Image Stocker DS-30, FAS III(Tokyo Co., Osaka)扫描仪上扫描。使用二

维蛋白质电泳图像分析系统 Image Master 2D Elite(Amersham Pharmacia Biotech Co., Sweden)对肉眼很难辨别的蛋白质差异点进行 Sensitivity 值为 9728, Split level 值为 7。对图像进行背景消减,斑点检测,匹配, pI 校正,分子量校正,并调用 SWISS-2D PAGE 蛋白质组数据库(<http://www.expasy.org/ch2d/>)进行分析^[3,4,10,11]。蛋白质匹配先从其中选取一块凝胶图像作为参考胶(reference gel),并建立一些匹配点(user seeds),然后自动匹配其他蛋白质点,与参考胶不相匹配的点被加入参考胶中,与参考胶中同一蛋白质点相匹配的点为同一蛋白质。将每个蛋白质点的量对总量进行归一化,结果乘以 100 来代表该种蛋白质的相对含量。

2 结果与讨论

2.1 菌体生长、底物消耗及部分胞外代谢产物的积累与消耗情况

菌体生长、底物消耗、及部分胞外代谢产物的积累与消耗情况如图 1(a,b)所示。

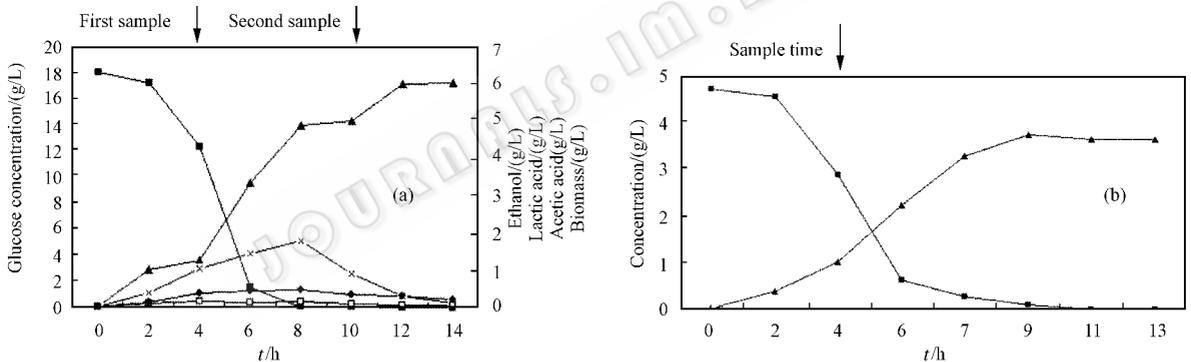


图 1 菌体生长、底物消耗及部分胞外代谢产物的积累与消耗曲线

Fig.1 Cell growth profile

The arrows indicate the sampling time. (a) fermentation with glucose as the initial carbon source. —■— glucose, —▲— biomass, —×— ethanol, —◆— acetic acid, —□— lactic acid. (b) fermentation with lactic acid as carbon source. —■— lactic acid, —▲— biomass

从图 1 中可以看出,图 1(a)中的第一个样品取在葡萄糖作碳源的对数生长期,此时葡萄糖正在迅速被消耗,主要积累了乙醇等代谢产物。在发酵的后期,葡萄糖被消耗光,菌体调整了体内的酶系,转而利用乙醇产生了二次生长的现象。取在第 10 个小时的样品就代表了酵母开始利用发酵前期积累的乙醇为碳源的情况。Lange H. C. 曾利用代谢网络通量等技术研究过酿酒酵母对这种两碳原子的分子作为碳源的吸收利用的情况^[12],Ken Umemura 等人也曾发现在乙醇为碳源的基本培养基中利用酿酒酵母表达外源基因时所表现出来的优良的性能^[13]。图 1(b)中的样品则取在以乳酸为碳源的发酵的对数期。

乳酸正在迅速的被消耗,细胞生长旺盛,此时胞内的酶系应为酵母利用乳酸为底物所需。

2.2 不同碳源培养条件下部分酵母蛋白质的 2DE 分析

不同样品的蛋白质 2DE 图谱如图 2(a,b,c)所示。采集后的图像经过相对于标样的分子量和等电点的校正后,用二维蛋白质电泳图像分析系统 Image Master 2D Elite 根据等电点和分子量与 SWISS-2D PAGE 蛋白质组双向电泳数据库进行匹配,对蛋白质点定性分析。再由该系统根据蛋白质点的面积和强度对蛋白质点进行定量。部分蛋白质表达量的相对变化情况如图 3 所示。

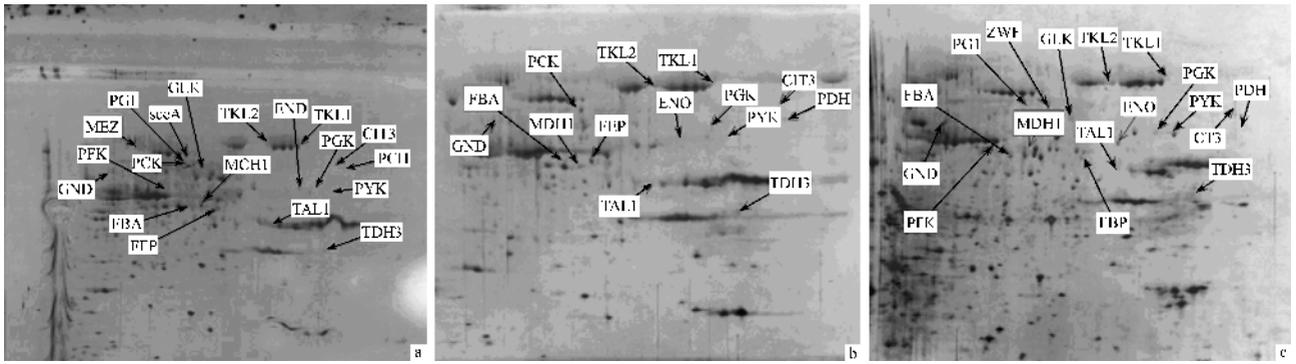


图 2 蛋白质表达 2DE 图谱

Fig.2 Protein expression profiles resolved by 2DE

(a) The first sample with glucose as carbon source in the exponential phase ;(b) The second sample taken after glucose is consumed up (c) Cultivation with lactic acid as carbon source

2.3 糖酵解途径和磷酸戊糖途径中部分关键蛋白质

从图 3(a) 中可以看到,由于葡萄糖激酶(*glk*),磷酸葡萄糖异构酶(*pgi*),磷酸甘油酸激酶(*pgk*),烯醇酶(*eno*)和丙酮酸激酶(*pyk*)是催化糖酵解反应的,在葡萄糖作碳源的对数期时,为了有效地利用葡萄糖,表现了较高的表达量,相应地在葡萄糖消耗光的后期和乳酸作碳源时表达量较低或未被检测到。这种趋势在磷酸戊糖途径的氧化阶段尤为明显,在葡萄糖作为碳源的对数期,6-磷酸葡萄糖脱氢酶(*zwf*)和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(*gnd*)的表达量远远高于另外两个样品。同时在三个条件下磷酸戊糖途径的非氧化阶段却无如此明显的差别,相关的蛋白质包括转醛酶(*tal1*),转酮酶(*tkl1*, *tkl2*)。

以上结果表明,在利用乙醇和乳酸为碳源时糖酵解途径并不活跃(*glk*, *pgi*, *pgk*, *eno*, *pyk*),磷酸戊糖途径的氧化阶段也被大大的削弱或被阻断了(*zwf*, *gnd*)。而作为 DNA、RNA、色氨酸、苯基丙氨酸、酪氨酸等生物合成前体的 4-磷酸赤藓糖和 5-磷酸核糖主要由磷酸戊糖途径的非氧化阶段来提供(*tal1*, *tkl1*, *tkl2*)。

而对于 1,6-二磷酸果糖缩酶(*fba*)和 3-磷酸甘油醛脱氢酶(*tdh3*)由于其催化可逆的反应,既属于糖酵解途径,又对糖异生有贡献,同时提供了磷酸戊糖途径的非氧化阶段的反应物,所以在利用乙醇和乳酸时,也表现出了较高的表达量(图 3a)。

2.4 三羧酸循环和乙醛酸支路等中部分蛋白质

由 *pfk* 和 *fbp* 所表达的酶分别催化从 6-磷酸果糖到 1,6-二磷酸果糖的反应和其逆反应。从图 3(b)所示的变化中可以看出在利用乙醇和乳酸为碳源时,糖酵解途径的 *pfk* 基因的表达被大大的抑制了,而糖异生途径中起重要作用的 *fbp* 基因的表达

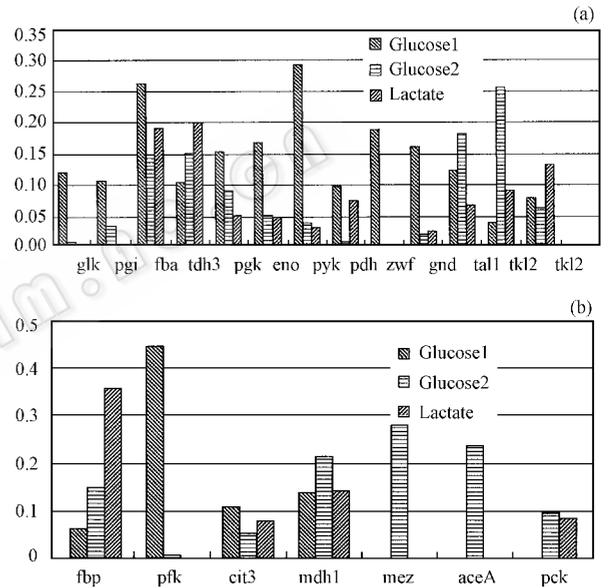


图 3 中间代谢途径中表达的部分蛋白质的相对含量

Fig.3 The abundances of the central metabolic pathway proteins Protein spots were separated by 2DE, and spots abundance were quantified over the spot area and intensity by using the Image 2D Elite software. (a) Glycolytic and Pentose phosphate pathway (b) TCA cycle, anaplerotic pathway, glyoxylate shunt and gluconeogenic pathway

较高。三羧酸循环(TCA)中的柠檬酸合成酶(*cit3*)和苹果酸脱氢酶(*mdh1*)在三种情况下区别不大(图 3b)。表明三羧酸循环为利用三种底物所必需,因为在酿酒酵母中提供生命活动中所需的 NADPH 主要来源于磷酸戊糖途径的氧化阶段的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶和三羧酸循环中的部分酶所催化的 NADP 依赖的反应,这就可能构成了一种补偿机制,在利用乙醇和乳酸为碳源时,三羧酸循环弥补了由于削弱的磷酸戊糖途径的氧化阶段所带来的 NADPH 的损失(*zwf*, 图 3a)。而苹果酸酶(*mez*)和异柠檬酸裂解酶(*aceA*)在吸收利用乙醇时异常活跃(图 3b),因为

这后者为乙醛酸支路的关键酶,表明了对乙醇的利用主要通过乙醛酸支路,生成的苹果酸进而在苹果酸酶(*mez*)的作用下回补到丙酮酸,弥补了由于糖酵解途径的削弱(*glk*, *pgi*, *pgk*, *eno*, *pyk*)而带来的作为赖氨酸、异亮氨酸等前体的丙酮酸的损失。该结果与 Cortassa 等人的发现一致^[14]。而由于苹果酸酶也包含 NADP 依赖的异构体,所以也构成了对削弱的磷酸戊糖途径的氧化阶段(*zwf*)所带来的 NADPH 损失的一种补偿机制。

磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶(*pck*)在吸收利用乙醇和乳酸时表达量较高(图 3b)。说明乙醇和乳酸在分别被转化成乙酰辅酶 A 进入 TCA 循环以后^[14],该酶所催化的从草酰乙酸到磷酸烯醇式丙酮酸的回补反应在这种条件下是主要的糖异生的途径,与 Lange H. C. 的研究结果相符^[12]。

以上的分析使我们更深入地了解酿酒酵母细胞在利用不同的碳源以及生长的不同的阶段所作的系统而精细的调控,在利用乙醇和乳酸为碳源时相对于葡萄糖作为碳源时,糖酵解途径并不活跃,磷酸戊糖途径的氧化阶段也被大大的削弱或被阻断了,作为碳骨架和能量的补偿机制,磷酸戊糖途径的非氧化阶段,乙醛酸支路和糖异生的途径比较活跃,从而维持了细胞在不同环境下生长的需要以及能量的平衡。很多蛋白质点含量较低,尚无法确定,更深入的研究还需要质谱等手段。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Arthur JM. Proteomics. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2003, **12** (4) 423 - 430
- [2] Zheng GY(郑广勇), Yan M(严明), Zhou IC(周利) *et al.* Construction of a proteomic map database. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*(生物化学与生物物理学报), 2002, **34**(2) 209 - 214
- [3] Appel RD, Palagi PM, Walther D *et al.* Melanie II : a third generation software package for analysis of two-dimensional electrophoresis images : I . Features and user interface. *Electrophoresis*, 1997, **18**(15) 2724 - 2734

- [4] Appel RD, Vargas JR, Palagi PM *et al.* Melanie II : a third generation software package for analysis of two-dimensional electrophoresis images : II . Algorithms. *Electrophoresis*, 1997, **18**(15) :2735 - 2748
- [5] Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature* 2003 **422** (6928) :193 - 197
- [6] Gavin AC, Bosche M, Krause R *et al.* Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, 2002, **415**(6868) :141 - 147
- [7] Xie JY(谢锦云), Li XI(李小兰), Chen F(陈平) *et al.* Preliminary proteomic analysis of the proteins of thermo-sensitive genetic sterile rice anther. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology* (中国生物化学与分子生物学报), 2003, **19**(2) 215 - 221
- [8] Zhan XQ(詹显全), Guan YJ(关勇军), Li C(李萃) *et al.* Differential proteomic analysis of human lung adenocarcinoma cell line A-549 and of normal cell line HBE. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* (生物化学与生物物理学报), 2002, **34**(1) 50 - 56
- [9] Wu MS(吴谋胜), Peng XX(彭宣宪). Progress in microbial proteomics. *Acta Microbiologica Sinica*(微生物学报), 2002, **42**(2) : 251 - 254
- [10] Raman B, Cheung A, Marten MR. Quantitative comparison and evaluation of two commercially available, two-dimensional electrophoresis image analysis software packages, Z3 and Melanie. *Electrophoresis*, 2002, **23**(14) 2194 - 2202
- [11] Jia YF(贾宇峰), Lin QX(林秋霞), Guo YJ(郭尧君) *et al.* The image analysis of two-dimensional gel electrophoresis. *Progress in Biochemistry and Biophysics*(生物化学与生物物理进展), 2001, **28**(2) 246 - 250
- [12] Lange HC. Quantitative physiology of *S. cerevisiae* using metabolic network analysis. ISSN : 90-9015552-X, 2002
- [13] Ken U, Haryuyuki A, Tamotsu K *et al.* Effects of carbon source on the application of a novel foreign gene expression system in *Saccharomyces cerevisiae* using the upstream region of the *Candida tropicalis* isocitrate lyase gene. *J Ferment Bioeng*, 1995, **80**(6) : 529 - 533
- [14] Cortassa S, Juan CA, Miguel AA. Fluxes of carbon, phosphorylation, and redox intermediates during growth of *Saccharomyces cerevisiae* on different carbon sources. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995, **47** :193 - 208

Preliminary Proteome Analysis for *Saccharomyces cerevisiae* under Different Culturing Conditions

ZHANG Hui-Min YAO Shan-Jing* PENG Li-Feng Kazuyuki Shimizu

(Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract For the investigation of the metabolic regulation of *Saccharomyces cerevisiae* under different culture conditions, the

Received : 10-17-2003

This work was supported by Grant from China National Science Fund(No. 2027605).

* Corresponding author. Tel 86-571-87951982; Fax 86-571-87951015; E-mail: Yaosj@che.zju.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

proteins of cell utilizing various carbon sources were separated by two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients as the first dimension and SDS-PAGE as the second. Samples were taken in the log phase of batch culture using glucose or lactic acid as carbon source, while another sample was taken from the broth when glucose was consumed up and ethanol accumulated in the previous phase was further metabolized. After electrophoresis, the protein spots were detected by silver-stain in a Hoefer Automated Gel Stainer with a protein silver staining kit. Silver-stained gels were scanned and digitized to create computer images. About 500 protein spots were detected by employing the 2D proteome image analysis system Image Master 2D Elite and SWISS-2DPAGE proteome database. Most of the protein expressed and involved in the glycolysis, pentose phosphate (PP) pathway, anaplerotic pathway, as well as TCA cycle were analyzed. The metabolism regulation of protein level for *Saccharomyces cerevisiae* under various carbon sources, as well as during different phase of growth, was studied. The expression of several glycolytic enzymes (*glk*, *pgi*, *pgk*, *eno*, *pyk*) was up-regulated while the expression of enzymes in oxidative pentose phosphate pathway (*zuf*, *gnd*) was down-regulated when ethanol and lactic acid were taken as carbon source. Simultaneously, fructose-1,6-bisphosphatase was found to be up-regulated due to the gluconeogenic requirement. Citrate synthase and Malate dehydrogenase do not exhibit significant difference, indicating TCA cycle is necessary when utilizing glucose, ethanol or lactic acid as carbon source. Thus, the NADPH loss due to the repressed pentose phosphate pathway could be compensated by TCA cycle in cases of ethanol and lactic acid. The expression of malic enzyme and isocitrate lyase are activated to a large extent when metabolizing ethanol, indicating glyoxylate shunt is essential in transferring ethanol to generate four carbon precursors for the biosynthesis and the NADP-dependent malic enzyme could also serve as compensation mechanism for NADPH loss in this case.

Key words two-dimensional electrophoresis, proteome, metabolic regulation, *Saccharomyces cerevisiae*

源于植物的新型抗癌药物

曾报道紫杉(红豆杉)产生的紫杉醇抗癌药,用于癌症治疗具有广谱性和特效性(本刊 2002, 18(1):5, 18(2):177)。优质的紫杉醇每千克 18 美元。探究细胞工程、基因工程、微生物工程生产紫杉醇仍然是今后的目标,关键是提高紫杉醇的产率。别的植物同样蕴藏着潜在的抗癌物质资源,有待积极开发。法国一组研究者发现红酒中含有一种潜在的抗癌物质叫 acutissimin A,也是一种抗氧化剂,它的抗癌效力比临床试验的抗癌药物 VP-16 要强 250 倍,有一定的开发价值。有几点值得注意:<1> 在山毛榉科的麻栎(*Quercus acutissima*)树皮中含有 acutissimin A 抗癌物质,从中提取这种物质是可能的,不过要牺牲众多林木;<2> 是否通过细胞工程技术开发 acutissimin A 呢?这是未知数,有待积极探究;<3> 已知有菌根真菌与栎树建立亲密的共生关系,其茎部、叶部是否有真菌与其建立互生关系?如果有这类真菌存在的话,它们能否产生抗癌物质呢?还需做实验探索。

在我国,研究人员对源于植物的抗癌、防癌药物研究取得了重要进展。<1> 中国科学院武汉植物研究所研究者从唇形科植物中研发一种 RAC 抗癌新药,用于治疗食管癌、贲门癌、肝癌、乳腺癌等,有明显缓解症状、稳定和缩小瘤体以及延长癌症患者生命的作用。该药物是呈现自我特色、自主知识产权的一类防癌、抗癌新药,有开发前景。<2> 厦门大学生命科学学院研究者从几种红树植物的树皮及叶片中分离到一些内生真菌,发现其中有些真菌不仅对某些指示菌有抑制作用,而且对口腔上皮癌细胞有明显抑制作用,显然,对防止癌细胞生长与扩散起重要作用。这样,有可能不仅从其树皮中找到抗癌物质,而且更重要的是从这些内生真菌代谢产物中索取有效或高效抗致病菌、抗肿瘤药物以研发新型抗癌药,应该说,是有潜力的。<3> 江苏肿瘤防治研究所和南京农业大学合作研究,发现无花果具有防癌、抗癌的特殊功能,从无花果果实和植物中提取汁液均含有抗癌素,它能防治早期癌症形成,研究结果表明,无花果具有明显抗癌、防癌和增强抗体免疫功能的作用。据调研,常食用无花果地区的人群中几乎无癌症患者,其原因在于无花果含有抗癌活性元素所致,无疑对于防治癌症起着一定作用。

总之,源于植物的抗癌、防癌药物有巨大的开发潜力,这类药物有其重要特点,无毒副作用,显现防癌、抗癌效果,甚至有的有特效。在我国有极丰富的药用植物资源,只要研究者遵循科学的思想,努力积极探索,一定能从众多植物宝库和独特的优势中创造性地研发新型抗癌、防癌药物服务社会,为民造福。

(柯为供稿)