

应用流式细胞术对啤酒酵母在含油酸培养基中生长的定量研究

张波^{1,2} 陈君¹ 卢启威¹ 岳慧琴³ 张丰德³

(1. 广州海拓生物材料科技有限公司 广州 510070)

(2. 美国明尼苏达大学生物技术研究所 美国 55108)

(3. 南开大学生命科学学院 天津 300071)

摘要 本研究采用流式细胞术测定啤酒酵母中的绿色荧光蛋白的表达量和细胞的存活度, 提出一种可以用于监测啤酒酵母生长的快捷方法, 筛选出较佳细胞培养方案, 测定酵母细胞在不同含油酸培养基中的死亡速度常数。

关键词 流式细胞术 啤酒酵母 油酸 存活度 绿色荧光蛋白 死亡速度常数

流式细胞术 (FCM) 是一种利用流式细胞仪对处于高速流动细胞或生物颗粒进行快速测量的定量分析和分选技术, 它综合激光技术、计算机技术、流体力学、细胞化学、图像技术等领域的知识和成果, 具有多参数性、准确性、快速性及分选的高纯度性等特点, 目前已广泛地应用于医学、细胞生物学、分子生物学等研究领域以及相关工业生产部门。该仪器主要由流动室及液流系统、激光源、光学系统、检测系统和计算机分析系统等五部分组成, 每秒可测定数万个细胞, 分选纯度高达 99% 以上。其工作原理是将悬浮液中带有荧光或其它鞘液的细胞或颗粒, 经过喷嘴高速喷出, 逐个通过激光聚焦的测量区, 进而由各种光敏元件测量每个细胞或颗粒产生的散射光、荧光等电信号强度, 从而获得各种信号参数。本研究应用带有绿色荧光蛋白 (GFP) 标记的啤酒酵母细胞和染色技术, 在不同条件下培养生长, 通过 FCM 测定其荧光强度, 确定蛋白的表达量和细胞存活度。

啤酒酵母作为真核生物的模式, 由于生物化学背景基本清楚, 基因组序列已全部测定, 不仅成功地用于生产多种代谢产物和药用蛋白^[1], 而且也被应用于生产以脂肪酸为原料的油脂衍生物^[2]和生物高分子聚合物, 如: 聚羟基烷酸酯 (PHA)^[3, 4]。脂肪酸在进入酵母细胞之后, 通过 β -氧化系统在过氧化物酶体中被降解, 形成最终产物的前体。但是, 当啤酒酵母以脂肪酸作为唯一碳源时, 则生长缓慢, 诱导生成的微体少, 加之 β 氧化酶的表达对于碳源的抑制非常敏感, 这都阻碍对于啤酒酵母的进一步研究^[5]。基于上述原因, 应用流式细胞术技术来寻求优化的培养条件, 使在含油酸培养基中生长的啤酒酵母同时具有高活性和高蛋白表达水平。

1 材料和方法

1.1 酵母菌株

啤酒酵母菌株 D603(MATa/MAT α ura3-52 lys2-801 met his3 ade2-101 reg1-501) 作为宿主菌株。

1.2 培养基和培养条件

野生型啤酒酵母培养物生长在 YPD 培养基中。基本培养基含有 0.67% 无氨基酸的酵母氮基 (YNB) (Difco Laboratories, Detroit, MI) 以及按需的氨基酸 (20 μ g/mL), 并加有 2% 葡萄糖 (SD 培养基) 或其他碳源。在表 1 中列出所有的培养基。酵母细胞于 30 $^{\circ}$ C 下在培养皿或锥形瓶中培养。

表 1 在本研究中所用到的培养基

培养基名称	组成
YPD	1% 酵母浸液、2% 蛋白胨和 2% 葡萄糖
YP	1% 酵母浸液和 2% 蛋白胨
SD*	0.67% YNB ¹ 、氨基酸和 2% 葡萄糖
SG*	0.67% YNB、氨基酸、0.1% 酵母浸液和 2% 甘油
SO*	0.67% YNB、氨基酸、0.2% 油酸和 0.2% 吐温 80
SOD*	SO + 0.1% 葡萄糖
SOY*	SO + 0.1% 酵母浸液
SOM*	SO + 0.1% 酵母浸液和 0.5% 麦芽糖
SOG1*	SO + 0.1% 酵母浸液和 1% 甘油
SOG2*	SO + 0.1% 甘油
SOG3*	SO + 0.1% 酵母浸液和 0.1% 甘油

*: 培养基含有 0.5% 磷酸钾缓冲液, pH 值 6.8。

1: YNB: 酵母氮基

1.3 质粒和表达

质粒 p2TEF-GFP 含有 TEF1 启动子、2 μ m 起点、URA3 标记物和 URA3 终止序列, 该质粒在啤酒酵母中表达绿色荧光蛋白 (GFP) (见图 1)。质粒通过醋酸锂法被转入啤酒酵母中。

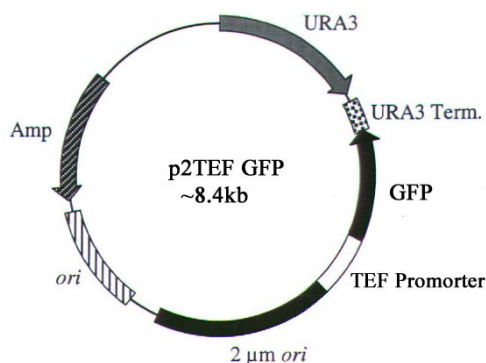


图1 将绿色荧光蛋白(GFP)表达在啤酒酵母内的质粒
质粒 p2TEF-GFP 带有 TEF1 启动子、2 μ m 起点、URA3 标记和 URA3 表达中止序列。

1. 4 荧光染色

碘化乙啶 (PI) 是一种排斥性染料可以对 DNA 染色, 它只染色缺少膜完整性的死细胞, 因为这些细胞允许染料进入胞浆。通过细胞计数, 将每个样本稀释到每 1mL PBS 缓冲液 (含碘化乙啶浓度为 10 μ g/mL) 中含有 5 \times 10⁶ 个细胞, 可优化检测速度 (1000 个细胞/秒) 在低设置的流式细胞仪上运行^[6]。

1. 5 流式细胞仪分析

本研究应用 Becton-Dickinson FACSCalibur 流式细胞仪 (Becton-Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA) 测定细胞的荧光强度, 它具有 15mW Ar 激光源, 激发波长为 488nm。使用 530 \pm 30nm 带通滤波器测定 GFP 荧光, 使用 585 \pm 42nm 带通滤波器测定碘化乙啶荧光, 并使用对数扩增法收集数据。使用 8.1 μ m 聚苯乙烯珠 (目录号 880, Bangs Laboratories, Fishers, IN) 来标定光散射频道, 使用带有荧光的 Quantum 26 FITC 微型珠 (目录号 826p, Bangs Laboratories, Fishers, IN) 来校正绿色荧光频道。流式细胞仪的控制和数据采集由 Cell Quest 软件 (Becton Dickinson, San Jose, CA) 来完成。

1. 6 动力学

啤酒酵母在脂肪酸中生长很差, 大部分培养时间细胞处于静止期和死亡期, 因此, 以下面的公式计算细胞的浓度和数目。

对于静止期:

$$\frac{dC_x}{dt} = (\mu - k_d)C_x = 0 \quad (1)$$

$$\frac{dN_x}{dt} = (\mu - k_d)N_x = 0 \quad (2)$$

对于死亡期:

$$\frac{dC_x}{dt} = -k_d C_x \quad (3)$$

$$C_x = C_0 \exp(-k_d t) \quad (4)$$

$$N_x = N_0 \exp(-k_d t) \quad (5)$$

其中 C 表示细胞浓度, N 表示细胞数目, μ 表示特异的生长速度, 以及 k_d 表示死亡速度常数。

2 结果和讨论

啤酒酵母细胞在含油酸培养基中生长缓慢, 双倍体时间约为 20h^[2]。生成油脂衍生化合物或 PHA 需要通过一系列的酶反应^[7]。因此本研究中酵母的总培养时间在 120~144h (约 5~6 天)。

2. 1 在仅有油酸的培养基中的生长

啤酒酵母细胞在 SD 培养基中生长 24h, 然后转到 SO 培养基中培养 144h。每 24h 手工取样 1 次, 将样本离心收集再稀释到 1mL 含碘化乙啶的 PBS 缓冲液中, 然后注入流式细胞仪进行分析。流式细胞仪于 585nm 波长测定细胞存活度 (即碘化乙啶荧光), 于 530nm 波长测定 GFP 荧光, 最后通过 Cell Quest 软件分析综合数据。每次分析测定 3 万细胞, 检测速度约为 1000 个细胞/秒。

最初, 98.6% 酵母细胞存活, 以及有 89.6% 细胞存活并显示出绿色荧光。约 10% 细胞没有显示出绿色荧光, 其原因可能是质粒的丢失。在 72h 后, 半数细胞死亡 (见图 2)。在 6 天培养结束时, 只有 22.6% 细胞仍然存活, 21.1% 细胞存活并显示出荧光, 死亡速度常数 k_d 为 0.0108/h, 结果 (见图 2)。本研究成功地应用流式细胞术对啤酒酵母在油酸培养基中的不良生长进行定量分析。

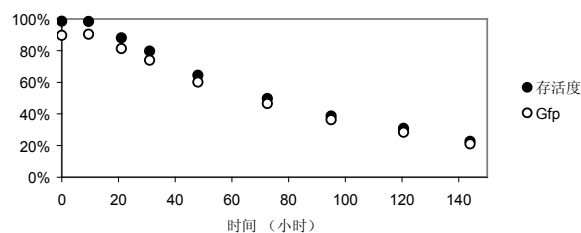


图2 酵母细胞在SO培养基中的活性分析和绿色荧光蛋白 (GFP) 的表达

酵母细胞在 SD 培养基中培养 24h, 后转入 SO 培养基中培养 144h。

2. 2 加入不同的组分促进啤酒酵母在油酸中生长

目前, 广泛地使用葡萄糖和酵母浸液帮助啤酒酵母细胞生长于脂肪酸培养基中。也有报道甘油^[8]和麦芽糖^[9]能在酵母浸液存在的条件下起到帮助啤酒酵母细胞生长于油酸, 并且不抑制啤酒酵母的 β -氧化体系。因此, 检测啤酒酵母包括上述 4 种组分的培养基生长情况: 1) SOD、2) SOY、3) SOG1 和 4) SOM。

通过流式细胞术分析, 0.1% 葡萄糖 (SOD 培养基) 和 0.1% 酵母浸液 (SOY 培养基) 有助于啤酒酵母在油酸培养基中的生长。啤酒酵母在 SOD

培养基中培养 6 天后, 有 47.0% 细胞存活, 43.3% 细胞是活的并保持有绿色荧光, k_d 为 0.0059 /hr。当使用 SOY 培养基, 6 天培养结束时, 50.0% 细胞存活, 有 41.1% 细胞是活的并含有 GFP, k_d 为 0.0053 /h。两组的死亡速度常数皆低于对照组在 SO 培养基中培养的酵母。

酵母在含 1% 甘油的 SOG1 培养基中, 初始生长速度极快, 24h 即出现大量显示绿色荧光的酵母细胞 (见图 3), 在 30h 内, OD_{600} 从 1.0 增加到 2.3。当甘油被耗竭后, 细胞迅速死亡。死亡速度常数为 0.0041 /h。6 天培养结束时, 57.8% 细胞存活, 以及 51.6% 细胞是活的并含有 GFP。

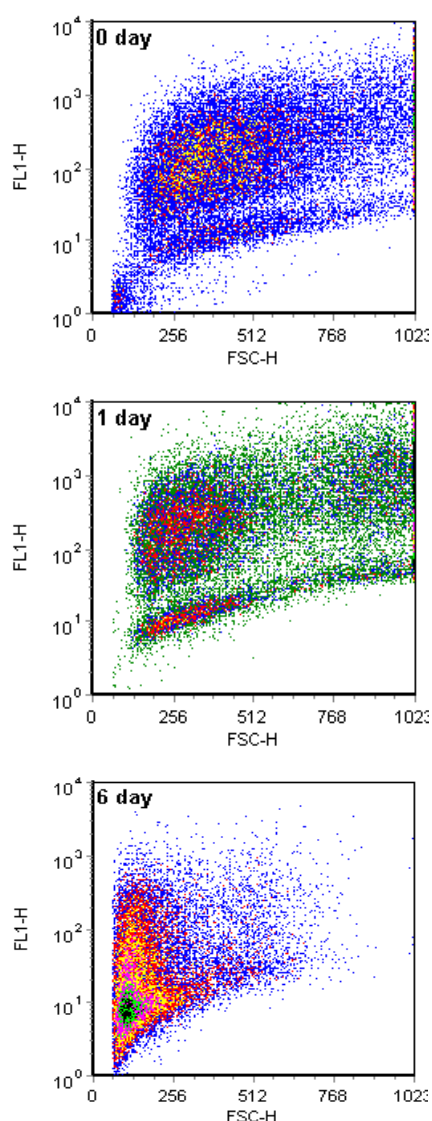


图3 应用流式细胞术测定酵母细胞在SOG1培养基中绿色荧光蛋白的表达

酵母细胞在 SOG1 培养基中培养 0~6 天, 共计 144h。使用流式细胞仪对细胞的绿色荧光强度 (FL1-H) 进行测定, 荧光强度高于设定黑线的细胞被认为具有绿色荧光蛋白表达。前散射 (FSC-H) 代表所测定细胞的大小。

麦芽糖也有助于酵母在油酸培养基 (SOM) 中的生长。在 6 天的培养后, 有 54.1% 细胞存活, 49.3% 细胞是活的并含有 GFP, 死亡速度常数为 0.0046 /h, 大大低于仅含油酸的培养基。但是当使用麦芽糖培养基时, 因为酵母对麦芽糖的消耗慢, 这就抑制对其他碳源例如半乳糖的消耗。当应用诱导型 GAL1-10 启动子表达基因时, 麦芽糖强烈地抑制 GAL 启动子的活性 (未发表数据)。如果使用组成型启动子, 麦芽糖是一个好的选择。

2. 3 无葡萄糖培养

在啤酒酵母中, 油酸诱导合成的 β 氧化酶系统对于葡萄糖抑制具有高敏感性。而甘油对 β 氧化途径和过氧化酶体的形成都没有抑制作用, 因此笔者首先研究 0.1% 甘油能否代替 0.1% 葡萄糖在油酸培养基中起到促进酵母生长的作用。啤酒酵母在 SG 培养基中培养 24h, 然后被转入含 0.1% 甘油不加酵母浸液的 SOG2 油酸培养基中。生长初始细胞存活率尚高, 随后酵母细胞很快死亡, 培养结束时, 只有 11.8% 的细胞存活, 死亡速度常数为 0.018 /h, 高于 SOD 培养基, 从而证明, 0.1% 甘油不能起到 0.1% 葡萄糖促进酵母在油酸中成长的作用。

在强化培养方案中, 啤酒酵母在 SG 中预培养后, 于 YP 培养基中强化 4h, 然后收集细胞, 分别转移到 SOY、SOG3 和 SOM 培养基中, 继续培养 144h。存活度分别是 44.0%、56.9% 和 58.9%, 以及相应地有 40.7%、50.1% 和 53.1% 细胞存活并显示出绿色荧光 (见图 4), 死亡速度常数相应地为 0.0055、0.0030 和 0.0029 (1/h)。使用强化培养方案所得到的死亡速度常数小于其它培养方案 (见表 2), 因此强化培养方案被认为是最适合的方案, 能够保持啤酒酵母的高活性和蛋白的高水平表达。

表 2 死亡速度常数

培养条件	死亡速度常数 (k_d) (单位: 1/h)
SO	0.0108
SOD	0.0059
SOY	0.0053
SOM	0.0041
SOG1	0.0046
SG 到 SOD	0.0120
SG 到 SOG2	0.0180
SG 到 YP 到 SOY	0.0055
SG 到 YP 到 SOG3	0.0030
SG 到 YP 到 SOM	0.0029

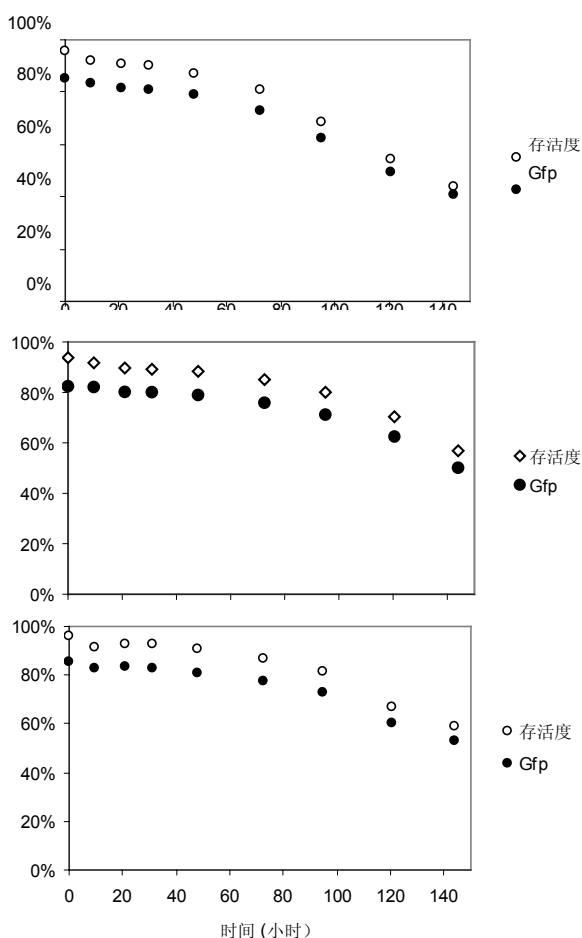


图4 酵母细胞“强化”后的活性分析和绿色荧光蛋白的表达
酵母细胞首先在 SG 培养基中预培养后, 在 YP 培养基中强化, 然后在 SOY (A)、SOG3 (B) 和 SOM (C) 培养基中培养 144h。

3 结论

啤酒酵母在油酸或其他脂肪酸中的不良生长限制其生产 β -氧化相关产物例如聚羟基烷酸酯 (PHA) 的能力。在本研究中, 用流式细胞术技术评选出一种培养策略 (SG 到 YP 到 SOG3)。用开发的培养策略, 啤酒酵母可生产更高数量的 β -氧化相关的产物。流式细胞术技术和绿色荧光蛋白的表达的组合可对啤酒酵母的生理学进行定量的而且快速的分析。为保证 FCM 测定的准确性, 细胞浓度要适当、分散度要良好、以便优化检测速度, 提高分辨率和精密度。

Kal 等^[10]对在油酸培养基中进行培养的酵母细胞, 进行基因组表达变化的分析。他们发现酵母在油酸中的培养导致涉及脂肪酸降解和运输方面的基因表达。基因芯片和蛋白芯片技术是研究生理学变化的好方法。相比于哺乳动物, 酵母中脂肪酸降解完全在过氧化酶体中进行。只需要对表达脂肪酸代谢的基因的变化做进一步检验, 我们就可以了解

啤酒酵母在不同的脂肪酸培养基中生长的生理学变化。

参考文献

- 1 Ostergaard S, Olsson L, Nielsen J Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, 64:34~50
- 2 Dyer JM, Chapital DC, Kuan JW, Mullen RT, Pepperman AB. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of novel lipid compounds, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 59(2-3): 224~30
- 3 Carlson, R., Srien F. Effects of recombinant precursor pathway variations on poly[(R)-3-hydroxybutyrate] synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Biotechnology*, 2006, 124 (3): 561~573
- 4 Zhang, B., Carlson, R., Srien, F. Engineering the Monomer Composition of Polyhydroxyalkanoates Synthesized in *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(1): 536~543
- 5 Evers ME, Hohfeld J, Kunau WH, Harder W, Veenhuis M. Physiological studies on the utilization of oleic acid by *Saccharomyces cerevisiae* in relation to microbody development, *FEMS Microbiol Lett*, 1991, 69(1): 73~78
- 6 Kacmar J, Zamamiri A, Carlson R, Abu-Absi NR, Srien F. Single-cell variability in growing *Saccharomyces cerevisiae* cell populations measured with automated flow cytometry, *J Biotechnol*, 2004, 109(3): 253~268
- 7 Carlson R, Fell D, Srien F. Metabolic pathway analysis of a recombinant yeast for rational strain development, *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, 79(2):121~34
- 8 Van der Leij I, Franse MM, Elgersma Y, Distel B, Tabak HF. PAS10 is a tetratricopeptide-repeat protein that is essential for the import of most matrix proteins into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(24): 11782~6
- 9 Van der Leij I, Van den Berg M, Boot R, Franse M, Distel B, Tabak HF. Isolation of peroxisome assembly mutants from *Saccharomyces cerevisiae* with different morphologies using a novel positive selection procedure, *J Cell Biol*, 1992, 119 (1): 153~62
- 10 Kal AJ, van Zonneveld AJ, Benes V, van den Berg M, Koerkamp MG, Albermann K, Strack N, Ruijter JM, Richter A, Dujon B, Ansoerge W, Tabak HF. Dynamics of gene expression revealed by comparison of serial analysis of gene expression transcript profiles from yeast grown on two different carbon sources, *Mol Biol Cell*, 1999, 10(6): 1859~72

(上转第 16 页)

刷葡萄糖生物传感器。该传感器对葡萄糖具有高的检测灵敏度和响应时间, 并具有良好的稳定性和重复性。这些优良的性能主要得益于两点, 其一是普鲁士蓝对过氧化氢具有高灵敏度的催化响应; 其二是二氧化硅溶胶-凝胶和聚乙二醇的混合物是很好的酶固定材料, 不仅能在电极表面形成稳定的固定酶层, 还能有效保持酶的活性。该生物传感器的电极采用丝网印刷技术制作, 酶的固定过程简单易行, 经过进一步研究可实现批量制备, 因为具有显著的应用前景。

参考文献

- 1 Albareda-Sirvent M, Merkoci A, Alegret S, Sensors and Actuators B: Chemical, 2001, 79(1): 48~57
- 2 Hart J P, Wring S A, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 1997, 16(2): 89~103
- 3 Hart J P, Crew A, Crouch E, Honeychurch K C, Pemberton R M, Analytical letters, 2004, 37(5): 789~830
- 4 Karyakin A A, Electroanalysis, 2001, 13(10): 813~819
- 5 Ricci F, Pallechi G, Biosensors and Bioelectronics, 2005, 21(3): 389~407
- 6 Pierre A C, Biocatalysis and Biotransformation, 2004, 22(3): 145~170
- 7 Wang J, Analytica Chimica Acta, 1999, 399(1): 21~27
- 8 Tripathi V S, Kandimalla V B, Ju H, Sensors and Actuators B, 2006, 114(2): 1071~1082
- 9 Karyakin A A, Karyakina E E, Gorton L, Anal. Chem, 2000, 72(7): 1720~1723

Development and application of a glucose biosensor based on Prussian Blue modified screen-printed electrode

Zuo Shaohua¹ Zhang Lingfan¹ Teng Yuanjie¹ Yuan Huihui² Lan Minbo^{1,2*}

- (1. Research center of analysis and testing, East China University of Science and Technology, Shanghai, 200237)
(2. Key Laboratory for Ultrafine Materials of Chinese Education Ministry, East China University of Science and Technology, Shanghai, 200237)

Abstract A glucose electrochemical biosensor was fabricated by entrapment of glucose oxidase in a layer of silica sol-gel matrix on the surface of a Prussian Blue (PB) modified screen-printed electrode (SPE). This biosensor is based on the detection of hydrogen peroxide produced by glucose oxidase-catalyzed oxidation of glucose. At applied potential of -0.05V, the biosensor exhibited a relatively fast response (15s), low detection limit (1.43×10^{-6} mol/L), good reproducibility and high sensitivity ($3.289 \mu\text{A}/(\text{mol/L})$) with a wide linear range of 5.00×10^{-6} to 2.44×10^{-3} mol/L. In addition, real rat serum samples were analyzed by this biosensor with satisfactory results.

Key words Electrochemical biosensor Screen-printed electrode Prussian Blue Sol-gel method Glucose oxidase

(下接第 20 页)

Quantitative studies on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in oleic acid medium with flow cytometry

Zhang Bo^{1,2} Chen Jun¹ Lu Qiwei¹ Yue Huiqin³ Zhang Fengde³

- (1 Guangzhou Haito Biomaterials Technology Ltd., Guangzhou 510070 2 BioTechnology Institute, University of Minnesota, USA 55108 3 College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract *Saccharomyces cerevisiae* has been utilized to produce lipid-derived compounds and biopolymers, such as polyhydroxyalkanoates (PHA). But these researches in *S. cerevisiae* are hampered by the fact that growth on fatty acid and microbody induction are often poor. The single-cell variability and the green fluorescent protein (GFP) expression of *S. cerevisiae* were measured by using flow cytometry technology. A fast way to examine *S. cerevisiae* growth was established and a better cultivation strategy was screened. The death rate constants of yeast cells in different oleic acid media were calculated.

Key words Flow cytometry *Saccharomyces cerevisiae* Oleic acid Viability GFP death rate constant