

AHSA1基因缺失酿酒酵母株的构建及其对生长的影响

王悦^{1,2,3}, 钟国升^{1,2,3}, 袁源^{1,2,4}, 赵炜^{1,2,4}, 崔红晶^{1,2,4}, 蒋智文^{1,2,4*} (1. 广东医科大学衰老研究所, 广东东莞 523808; 2. 东莞市衰老与抗衰老重点实验室, 广东东莞 523808; 3. 广东医科大学医学技术学院, 广东东莞 523808; 4. 广东省医学分子诊断重点实验室, 广东东莞 523808)

摘要:目的 构建酿酒酵母AHSA1基因缺失菌株, 并观察其对生长的影响。方法 运用基因同源重组技术构建单基因缺失的酿酒酵母株, 采用生长曲线测定法和克隆形成实验检测AHSA1缺失对生长的影响。结果 成功构建AHSA1基因缺失酵母菌株。与野生型酵母相比, AHSA1缺失菌株的克隆形成能力及短期增殖活性明显降低。结论 AHSA1基因缺失可抑制酿酒酵母生长。

关键词: 酿酒酵母; AHSA1; 生长

中图分类号: Q 291

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2020)06-0656-04

Construction of AHSA1 gene deletion strain of *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on yeast growth

WANG Yue^{1,2,3}, ZHONG Guo-sheng^{1,2,3}, YUAN Yuan^{1,2,4}, ZHAO Wei^{1,2,4}, CUI Hong-jing^{1,2,4}, JIANG Zhi-wen^{1,2,4*} (1. Institute of Aging Research, Guangdong Medical University; 2. Dongguan Key Laboratory of Aging and Antiaging; 3. School of Medical Technology, Guangdong Medical University; 4. Guangdong Province Key Laboratory of Medical Molecular Diagnostics; Dongguan 523808, China)

Abstract: Objective To construct AHSA1 gene deletion strain of *Saccharomyces cerevisiae* and detect its effect on yeast growth. Methods AHSA1 gene deletion strain of *S. cerevisiae* was constructed using homologous recombination technique. Yeast growth was detected by growth curve and clone formation assay. Results AHSA1 gene deletion strain was successfully constructed. The clone formation and short-term proliferative activity were lower in AHSA1 gene deletion strain than in wild type yeast. Conclusion AHSA1 gene deletion inhibits the growth of *Saccharomyces cerevisiae*.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; AHSA1; growth

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)由于具有遗传背景清晰、易培养、生活周期短, 以及独特的单、双倍体等生活特性, 是研究真核生物基因功能的经典模式生物^[1]。AHSA1 (activator of Hsp90 ATPase activity 1)基因在酵母中的主要作用为促进ATP水解并激活Hsp90-蛋白复合物发生构象变化^[2]。AHSA1基因缺失导致酵母在应对唑类抗真菌药时的能力大幅下降^[2]。在不同酵母菌株中缺失AHSA1基因对酵母生长的影响可能不同。如在表达Hsp90 α 的酵母菌

株中缺失AHSA1基因, 酵母的生长受到抑制; 而在表达Hsp90 β 的酵母菌株中缺失AHSA1基因, 酵母的生长则不受抑制^[3]; 在生长缺陷酵母菌株Hsp82^{G313S}或Hsp82^{A587T}中再敲除AHSA1基因则对酵母的生长影响不大^[4]。上述研究虽然阐明了在过表达或突变其他基因的基础上同时敲除AHSA1基因对酵母生长的影响, 但是AHSA1基因对酵母生长的影响却尚未明确。本研究利用酵母作为模式生物, 通过PCR介导的一步基因破坏法构建AHSA1基因缺失酵母菌株^[5], 测定AHSA1基因缺失对酿酒酵母生长的影响, 为进一步研究AHSA1基因的功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌株载体

野生型酵母菌株BY4742和载体pRS306由美国华盛顿大学Matt Kaeberlein博士赠送并在本实验室保

基金项目: 国家自然科学基金(No.81671399), 广东医科大学大学生创新创业训练计划项目(No.GDMU2018014, No. GDMU2018045)

收稿日期: 2020-05-22; **修订日期:** 2020-08-24

作者简介: 王悦(1999-), 女, 在读本科生

通信作者: 蒋智文(1982-), 男, 博士, 助理研究员,

E-mail: J_zhiwen@163.com

存; pRS306为低拷贝穿梭载体, 在大肠杆菌中具有氨苄青霉素抗性, 带有Ura3营养筛选标签。感受态大肠杆菌由本实验室制备并保存备用。

1.2 主要试剂和引物

HiFi Taq酶和Easy Taq DNA聚合酶购自北京全式金生物技术有限公司; 聚乙二醇(PEG3350)、醋酸锂和TE缓冲液为实验室常规试剂; 酵母提取物和胰蛋白胨购自广州威佳科技有限公司; SD培养基和限制性氨基酸均购自Clontech公司。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成, 见表1。

1.3 方法

1.3.1 AHSA1基因缺失酵母菌株的构建和验证 构建和验证菌株方法参照相关文献^[6-7]。依据基因同源重组原理, 采用PCR介导的一步基因置换法构建基因缺失酵母菌株。以pRS306为模板, AHSA1-F和AHSA1-R为引物, 采用Easy Taq DNA聚合酶, 反应体系按照试剂的说明书进行, PCR反应条件为94 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 33个循环; 72 ℃ 5 min, 扩增产物为破坏元件(含URA3基因编码序列)。PCR产物回收纯化后, 用醋酸锂方法转化野生型酵母BY4742, 利用Ura3缺陷型培养平板筛选阳性克隆。以筛选到的阳性克隆基因组DNA为模版, 分别以URA-int-F、AHSA1-Int-R和AHSA1-OX-R组成引物对, DNA聚合酶和反应体系同上, 利用PCR方法验证AHSA1基因缺失酵母菌株。

1.3.2 克隆形成能力的检测 参照本实验室已经建立的方法进行^[8]。复苏野生型BY4742和AHSA1缺失(AHSA1Δ)酵母菌种, 划线培养于YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium) 板中, 30 ℃培养2~3 d后。分别挑取菌落至200 μL灭菌水中, 混匀, 制成原菌液。然后取40 μL原菌液至1 mL灭菌水中并混

匀, 制成稀释菌液。取500 μL稀释菌液, 利用紫外分光光度计测量其OD600值。然后用无菌水将待测稀释菌液的OD600值调至一致(OD600≈0.4), 该步配置的菌液作为实验的第1个浓度。每个菌液进行10×倍比稀释, 制成5个梯度的稀释菌液。每个菌株的每个梯度均取10 μL稀释菌液滴于YPD培养板中, 置30 ℃培养箱中培养, 第2天起每日观察菌株的克隆形态并拍照。

1.3.3 AHSA1基因缺失酵母菌株生长曲线的检测 参照本实验室已经建立的方法进行^[9]。在检测酵母菌株的克隆形成能力时, 同时进行酵母菌株生长曲线的检测。分别取上述1.3.2中100 μL菌液至900 μL灭菌水中, 制备OD600≈0.04的菌液。然后取300 μL稀释菌液至96孔板中, 每个菌株设置3个复孔, 置于Bioscreen全自动生长曲线分析仪中, 震荡培养, 设置成每间隔1.5 h检测1次菌液的OD600值, 持续检测24 h。采用GraphPad Prism 6.0 绘制酵母菌株的生长曲线。

1.4 统计学处理

应用SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析, 野生型酵母和AHSA1基因酵母菌株生长曲线的比较采用配对 *t* 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AHSA1破坏元件的扩增结果

AHSA1破坏元件全长为1 232 bp, PCR扩增产物大小经过1%琼脂糖凝胶电泳确认正确, 见图1。

2.2 AHSA1缺失酵母菌株的鉴定

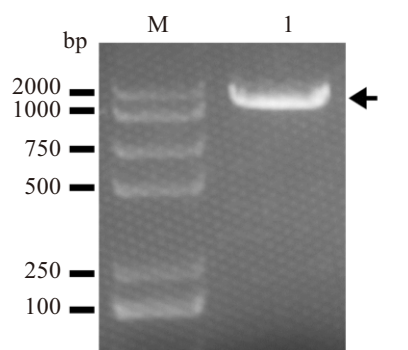
以野生型酵母基因组为模板, AHSA1编码序列的外侧引物AHSA1-OX-F和AHSA1-OX-R组成引物对进行PCR, 条带大小为1 498 bp(图2泳道2)。而以

表1 设计合成的引物

SGD ID	引物名称	DNA序列(5' - 3')	产物长度/bp
SGD:S000002622	AHSA1-F	TCTTATTCTTAATCGTTTATAGTAGCAACAATATATCAATCTGTGCGG	1 133
	AHSA1-R	TATTTACACACCG	
SGD:S000002622	AHSA1-Int-F	ATTTACGCATACTTTTATTGAAACATGAGAACAAATATATCAGATTGTA	245
	AHSA1-Int-R	CTGAGAGTGCAC	
SGD:S000002622	AHSA1-OX-F	ATTGAGTGAAGCCAAGCCAC	1 498
	AHSA1-OX-R	TGGAGACTGGTGCTGAAGTT	
SGD:S000002622	AHSA1-OX-F	GCCTCGCAACAAACCAAGAT	1 498
	AHSA1-OX-R	TCGTTGGTAAATTCCGGGGA	
SGD:S000000747	URA-int-F	GGAACCTAGAGGCCTTTTGATGT	-

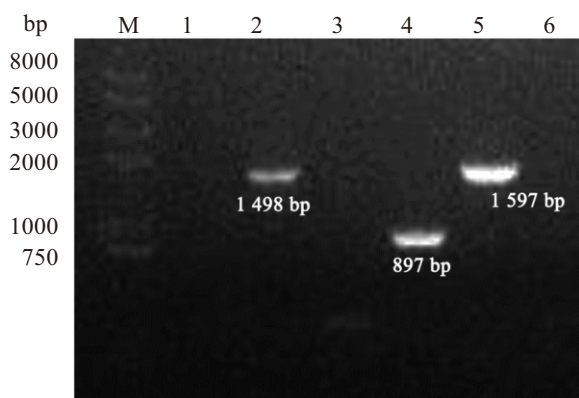
SGD: 酿酒酵母基因组数据库

阳性克隆基因组为模板, URA-int-F和AHSA1-OX-R组成引物对的PCR产物为897 bp(图2泳道4), AHSA1-OX-F和AHSA1-OX-R组成引物对的PCR产物为1 597 bp(图2泳道5), 与预期的PCR产物片段一致(质粒pRS306的营养筛选基因URA3的序列长为1 152 bp, AHSA1基因的编码序列为1 053 bp, 即AHSA1缺失菌株的PCR产物比野生型酵母菌株长99 bp)。以阳性克隆基因组为模板, AHSA1-Int-F和AHSA1-Int-R组成引物对, 其PCR结果无条带。上述结果均与预期的一致, 表明AHSA1缺失酵母菌株构建成功。



M: DNA Marker; 1: AHSA1破坏元件

图1 AHSA1破坏元件的扩增结果

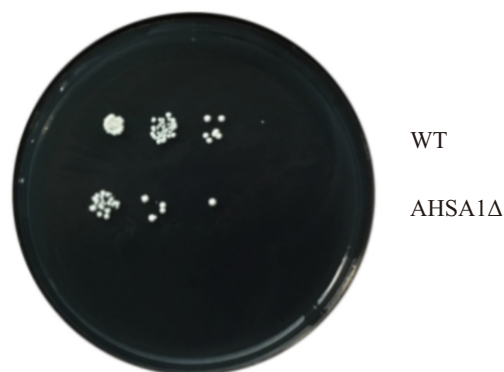


M: DNA Marker; 1: 未添加基因组为模板的阴性对照; 2: 模板为野生型酵母基因组, 引物为AHSA1-OX-F和AHSA1-OX-R; 3: 模板为野生型酵母基因组, 引物为URA-int-F和AHSA1-OX-R; 4、5和6: 阳性克隆的基因组, 其中4的引物为URA-int-F和AHSA1-OX-R, 5的引物为AHSA1-OX-F和AHSA1-OX-R, 6的引物为AHSA1-Int-F和AHSA1-Int-R

图2 AHSA1缺失酵母菌株的鉴定

2.3 AHSA1缺失酵母菌株的克隆形成能力

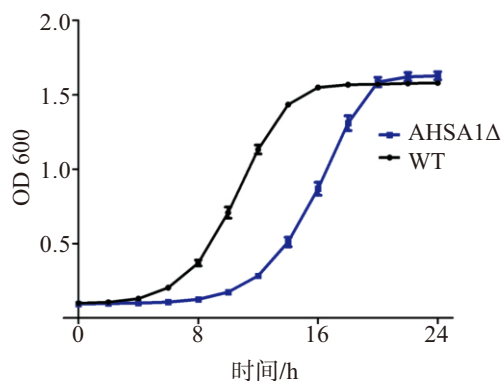
与野生型酵母相比, AHSA1缺失酵母菌株的克隆形成能力明显降低(图3为选取的其中1次实验的结果, 其他结果与之类似)。



AHSA1Δ: AHSA1缺失酵母菌株; WT: 野生型酵母菌株
图3 AHSA1缺失酵母菌株和野生型酵母克隆形成能力的对比

2.4 AHSA1缺失酵母菌株的生长曲线

绘制的野生型和AHSA1基因缺失两种酵母菌株的生长曲线如图4所示, 两种酵母菌株的生长曲线间隔明显, 3 h后AHSA1缺失酵母菌株的增殖明显落后于野生型酵母菌株, 21 h后两种酵母菌株的浓度基本一致, 表明相关营养基本消耗, 酵母的增殖停滞。



AHSA1Δ: AHSA1缺失酵母菌株; WT: 野生型酵母菌株
图4 AHSA1缺失酵母菌株和野生型酵母菌株的生长曲线

3 讨论

酿酒酵母AHSA1基因是细胞的非必需基因, 所以本研究以单倍体酵母菌株BY4742为背景菌株, 构建AHSA1缺失酵母菌株。通过观察AHSA1基因缺失前后菌株生长特性的改变, 研究AHSA1基因的功能。基因敲除是指将细胞基因组中的某个特定的基因去除或者使其失活。广义的基因敲除包括某个或某些基因的完全敲除、部分敲除、基因调控序列的敲除和成段基因组序列的敲除^[7]。本研究利用同源重组的方法, 将AHSA1基因完全敲除。具体操作是采用一步PCR法扩增AHSA1基因的外源性同源片段, 并将其转化到野生型BY4742菌株中, 替换

AHSA1基因,最终得到AHSA1缺失酵母菌株。本研究成功构建了AHSA1缺失酵母菌株,表明AHSA1基因确实为酵母的非必需基因。

为进一步研究AHSA1基因的功能,我们通过克隆形成实验比较了AHSA1缺失酵母与野生型酵母菌株的克隆形成能力。在30℃培养条件下,观察等梯度滴于YPD培养板上的两种酵母菌株形成的克隆,结果显示,与野生型酵母菌株相比,AHSA1缺失酵母菌株的克隆形成能力明显减弱。作为Hsp90的协同作用因子,AHSA1在细胞中能够促进ATP的水解,据此我们推测AHSA1基因的缺失将大幅降低Hsp90-客户蛋白构象变化所需能量的供应,影响酵母的新陈代谢功能,导致其生长能力下降,表现为酵母菌的克隆形成能力下降。

在检测酵母菌株克隆形成能力的同时,我们也比较了AHSA1缺失酵母与野生型酵母两种菌株的生长曲线。生长曲线反映的是单细胞微生物(如细菌和真菌)在一定环境条件下在液体培养基中所表现出来的群体生长规律。生长曲线一般分为延迟期、对数期、稳定期和衰亡期。根据单细胞生长曲线对数生长期和达到稳定期的时间即可推断单细胞生物在限定营养条件下的增殖速率。本研究结果显示,与野生型酵母菌株相比,由于AHSA1基因的缺失,相应的酵母菌株达到稳定期所用的时间更长,表明AHSA1基因缺失导致酵母菌株的增殖受限。然而AHSA1基因缺失如何降低酵母的生长或增殖速率还有待进一步的研究。

综上所述,AHSA1缺失导致酿酒酵母菌株的克隆形成能力减弱、生长能力下降。AHSA1基因虽然不是酵母的必需基因,但是却能显著影响酵母的生长与增殖。

参考文献:

- [1] PILLAI V B, SUNDARESAN N R, GUPTA M P. Regulation of Akt signaling by sirtuins: its implication in cardiac hypertrophy and aging[J]. *Circul Res*, 2014, 114(2): 368-378.
- [2] GU X K, XUE W, YIN Y J, et al. The Hsp90 Co-chaperones Stil, Aha1, and P23 regulate adaptive responses to anti-fungal azoles [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 1571.
- [3] SYNORADZKI K, BIEGANOWSKI P. Middle domain of human Hsp90 isoforms differentially binds Aha1 in human cells and alters Hsp90 activity in yeast [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1853(2): 445-452.
- [4] ARMSTRONG H, WOLMARANS A, MERCIER R, et al. The Co-Chaperone Hch1 regulates Hsp90 function differently than its homologue aha1 and confers sensitivity to yeast to the Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49322.
- [5] FONTANA L, PARTRIDGE L, LONGO V D. Extending healthy life span-from yeast to humans[J]. *Science*, 2010, 328(5976): 321-326.
- [6] 袁源, 赵炜, 崔红晶, 等. 酵母CFD1基因缺失菌株构建及其对复制寿命的影响[J]. *广东医学院学报*, 2014, 32(3): 280-281, 286.
- [7] ZHAO W, FANG B X, NIU Y J, et al. Nar1 deficiency results in shortened lifespan and sensitivity to paraquat that is rescued by increased expression of mitochondrial superoxide dismutase [J]. *Mech Ageing Dev*, 2014, 138: 53-58.
- [8] 林嘉颖, 刘新光, 袁源. 酵母CFD1过表达对细胞寿命的影响[J]. *生物技术*, 2019, 29(6): 539-543.
- [9] 崔红晶, 周涛, 赵炜, 等. 酿酒酵母PMT6基因缺失对细胞寿命的影响[J]. *生物技术*, 2017, 27(6): 576-579, 544.