

贝酵母 ADR1 基因的 克隆和生物信息学分析

张先昂¹ 贺笑² 刘小珍¹ 叶琴霞¹ 黄彩双¹ 文丽辉¹ 张汉尧^{1*}

(1.西南林业大学云南省高校林木遗传改良与繁育重点实验室,云南昆明 650224;
2.安徽师范大学生命科学院,安徽芜湖 241000)

摘要: 酿酒酵母 ADR1 基因是编码过氧化物酶蛋白质转录的正向调节基因,对乙醇代谢有正向调节作用。本文采用 PCR 技术首次在贝酵母基因组 DNA 中对 ADR1 基因序列进行全长克隆,利用在线分析工具 ProtParam、ProtScale、TMHMM、PredictProtein、Swiss-Model 等软件对其编码蛋白质的基本理化性质进行分析,同时预测了该基因所编码蛋白质的二级结构和三级结构。结果表明:该核苷酸序列含有一个长 3960 bp 的开放阅读框,可编码 1319 个氨基酸。编码的蛋白质为在细胞核中行使调控功能的亲水蛋白,含有 17 个丝氨酸(S)激酶潜在磷酸化位点、四个 coil 区和 2 个锌指结构域,与酿酒酵母 ADR1 基因所编码的蛋白质结构和性质极为相似,可初步认为贝酵母 ADR1 基因是乙醇脱氢酶的调控基因。

关键词: 贝酵母, ADR1, 乙醇代谢, 生物信息学方法

Cloning and bioinformatics analysis of the ADR1 gene from *Saccharomyces bayanus*

ZHANG Xian-ang¹ HE Xiao² LIU Xiao-zhen¹ YE Qin-xia¹,
HUANG Cai-shuang¹ WEN Li-hui¹ ZHANG Han-yao^{1*}

(1.Key Laboratory for Forest Genetic and Tree Improvement & Propagation
in Universities of Yunnan Province in Southwest Forestry University, Kunming 650224, China;
2.College of Life Sciences in Anhui Normal University, Wuhu 241000, China)

Abstract: The ADR1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is a positive regulator of transcription of genes encoding peroxisomal proteins. To regulate alcohol metabolism, it has a positive effect. The full-length sequence of ADR1 gene was cloned from the genomic DNA of *Saccharomyces bayanus* using PCR for the first time. The ADR1 gene of *S. bayanus* was cloned, and the physical and chemical properties of ADR1 protein were analyzed by online analytical tools, such as ProtParam, ProtScale, TMHMM, PredictProtein and Swiss-Model. At the same time, the protein secondary structure and tertiary structures of protein were predicted. The results indicated that the ADR1 gene contained an opening reading frame (ORF) of 3960 bp encoding 1319 predicted amino acids. The protein was a hydrophilic protein exercising their control functions in the nucleus. It contained 17 serine kinase potential phosphorylation sites, 4 coil domains, and two zinc finger domains. The protein encoded by ADR1 gene of *S. cerevisiae* was extremely similar to the predicted protein. It inferred that ADR1 gene of *S. bayanus* might play a role in regulating alcohol dehydrogenase gene.

Key words: *Saccharomyces bayanus*; ADR1; alcohol metabolism; method of bioinformatics

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)07-0090-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.07.018

引文格式: 张先昂,贺笑,刘小珍,等.贝酵母 ADR1 基因的克隆和生物信息学分析[J].食品工业科技,2018,39(7):90-96

葡萄酒是酵母、细菌和其他真菌中复杂相互作用的产物,它们始于葡萄汁并且继续发酵直至最终成为葡萄酒^[1-3]。发酵的酵母种类,主要是由葡萄表面所携带的酵母种类和葡萄酒加工过程中添加的酵母种类所决定的。酿酒酵母是公认的主要用于葡萄酒酿造的微生物^[4]。然而,其他酵母属种(*Saccharomyces non-cerevisiae* yeasts, SNC),也可以在葡萄酒的发酵中发挥

重要的作用。葡萄酒酿造中贝酵母的使用频率低于酿酒酵母,但是在一些葡萄酒产区,葡萄酒需在较低的温度条件下发酵,贝酵母的生产效率比酿酒酵母高。例如:西班牙的巴斯克地区^[5]、法国的阿尔萨斯^[6]、苏玳的卢瓦尔河谷^[7]、意大利的瓦尔波利塞拉^[8]和乌克兰的雅尔塔^[9]等地区生产的长相思白葡萄酒。在过去的几年中,由于目前的市场需求和气候变化对葡萄酒质

收稿日期:2017-08-07

作者简介:张先昂(1990-),硕士研究生,研究方向:林木生物技术研究,E-mail:718608147@qq.com。

* 通讯作者:张汉尧(1975-),男,博士,教授,研究方向:植物和微生物分子遗传学研究,E-mail:hanyaoy@163.com。

基金项目:云南省高校林木遗传改良与繁育重点实验室开放基金资助(YNGBT20106);云南省林学一流学科建设经费(51600625)。

量的影响 酿酒厂正面临着新的挑战, 贝酵母将有助于解决这些挑战。它在低温下表现出良好的发酵能力, 产出具有低级醇和更高甘油含量的葡萄酒^[10-12]。

在葡萄酒生产过程中, 乙醇是我们所需要的重要次生代谢物。但是当在发酵过程中乙醇的含量增加时, 会影响细胞体外渗透压并且抑制细胞的生长和活性, 会对酵母正常生存和代谢产生影响^[13]。酿酒酵母的 ADR1 基因编码过氧化物酶蛋白, 这种过氧化物酶利用乙醇作为底物, 氧化后使乙醇这种对酵母本身有毒性的物质变成无毒性的物质——乙醛, 同时也使 H₂O₂ 进一步变成无毒的 H₂O^[14]。同时, 发酵性糖积累过多时, 不仅使乙醇积累过多对酵母产生毒害, 而且会使酵母发生葡萄糖阻遏作用。这也会给其他有害菌生长创造条件, 生成其他物质, 降低出酒率和酒的品质。以往的研究表明, ADR1 转录的 mRNA 和 ADR1-b-galactosidase 融合蛋白在葡萄糖抑制期间被发现, 这种 ADR1 蛋白的活动被控制翻译后修饰水平去适当的 ADH2 的表达。ADR1-b-galactosidase 融合蛋白可以在葡萄糖阻遏作用期间激活 ADH2 的表达并且显著提高 ADH2 基因的脱抑制能力。当 ADR1 在多拷贝质粒上表达时也获得相似的结果^[15-21]。这就表明, ADR1 基因在含糖量高的情况下可以破除葡萄糖阻遏的作用, 并且提高酵母的乙醇代谢, 从而消耗次生代谢物, 使葡萄酒的酒精含量增加, 使葡萄酒的风味更佳。

本研究对贝酵母 ADR1 基因进行了克隆, 并利用在线分析工具 ProtParam、ProtScale、TMHMM、PredictProtein、Swiss-Model 等软件对其编码蛋白质的基本理化性质进行分析, 同时预测了该基因所编码蛋白质的二级结构和三级结构, 以分析贝酵母 ADR1 基因功能, 为进一步利用贝酵母 ADR1 基因打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

贝酵母菌株 BZL05 以产自香格里拉的葡萄皮上分离而出; 酵母膏、蛋白胨、琼脂、葡萄糖、溶细胞酶 天根生化科技有限公司; 上样缓冲液、核酸染料 百泰克公司; 100 bp DNA Marker 博迈德公司; dNTPs Mixture、Taq polymerase 纽英伦生物技术(北京)有限公司; 引物合成 均由上海生工公司完成。

DK98-1 数显恒温水浴 天津泰斯特仪器有限公司; Centrifuge 5810R 离心机 德国 Eppendorf 公司; PYX-DHG-9023-A 干燥箱 上海新诺仪器设备有限公司; TP650 PCR 仪 日本 TaKaRa 公司; Pico17 小型离心机 美国 Thermo 公司; DYY-10C 电泳仪 北京百晶生物技术有限公司; GBOXHR 凝胶成像分析系统 美国 Syngene 公司; 温控摇床 德国 Sartorius; YXQ-LS-75SII 灭菌锅 上海博讯实业有限公司; SW-CJ-2FD 超净工作台 苏州净化工程公司; 移液枪 德国 Eppendorf 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 贝酵母基因组 DNA 的获取方式 为了保障所提取的 DNA 均为高品质, 可选择试剂盒进行 DNA 提取实验操作。与此同时, 可选用琼脂糖凝胶实施电泳检测。

1.2.2 贝酵母 ADR1 基因的获取方式 根据已公布的贝酵母基因组^[22]数据, 利用 Primer Primer3 确定上

游引物

ADR1L1: 5'-TCTTCTTGGACTGCCGCTAT-3'
ADR1L2: 5'-ATCGAATGGCAACGAGAATC-3'
ADR1L3: 5'-ATCGAATGGCAACGAGAATC-3'
及下游引物

ADR1R1: 5'-GAAAGGCCAATTTTCGTTTGA-3'
ADR1R2: 5'-TGCACATGTTTCCTCAATGGT-3'
ADR1R3: 5'-GTGCACATGTTTCCTCAATGG-3'

进行 PCR 扩增。反应体系参考贺笑^[23]关于贝酵母 FZF1 基因的方法。

聚合酶链式反应的程序为: 在 95 °C 的环境下预变性为 5 min; 同样 95 °C 温度下变性时长为 30 s; 退火温度为 58 °C, 时长为 30 s; 延长时间为 60 s, 温度保持在 72 °C, 循环三十五次; 之后在 72 °C 温度节点延伸 7 min; 温度 4 °C 保存样品。将聚合酶链式反应的产物保存在 -20 °C 的冰箱中。

1.2.3 贝酵母 ADR1 基因的序列测定和所翻译蛋白的分析 聚合酶链式反应的产物通过琼脂凝胶的电泳测试之后, 交由上海生工进行 ADR1 贝酵母测序。借助 ORF Finder 工具对该测序并拼接出的核苷酸序列中存有的开放阅读框进行查找。同时利用在线检测工具分析这条核苷酸中翻译的蛋白质, 如基本的理化性质(ProtParam)、亲水性(ProtScale)、跨膜区(TMHMM)、信号肽(SignalP)、激酶磷酸化修饰位点预测(KinasePhos)、Coil 区分析(Coils Server)、亚细胞定位(TargetP 和 PSORT) 和结构域(SMART) 方面的分析。最后预测该蛋白的二级结构(PredictProtein) 以及其三级结构(Swiss-Model)。

2 结果与分析

2.1 ADR1 基因扩增结果和分析

ADR1 基因经过聚合酶链式反应(PCR) 扩增后, 通过琼脂糖凝胶电泳分离。得到图 1 的凝胶图后, 通过与 Marker 的比对得出其大小在 3000~4500 bp 之间, 与后期测序所得结果相符。

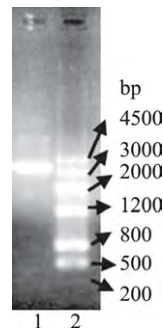


图1 ADR1 基因 PCR 检测结果

Fig.1 PCR determination of ADR1 gene

注: 1 为 ADR1 基因 PCR; 2 为 DNA ladder。

2.2 贝酵母 ADR1 基因编码蛋白质的一级结构分析

Open Reading Frame Finder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 分析结果表明, 该核苷酸序列含有一个长 3960 bp 的开放阅读框, 可编码 1319 个氨基酸。氨基酸序列, 见图 2。

2.2.1 探讨贝酵母 ADR1 蛋白的理化性质 使用 ExPASy(<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>) 软

表2 贝酵母 ADRI 编码的蛋白质亚细胞定位情况
Table 2 ADRI encoded protein subcellular localization

名字	线粒体靶向肽	分泌通路信号肽	其他部位	定位预测	可靠性
贝酵母	0.054	0.033	0.966		1
阈值	0.000	0.000	0.000		

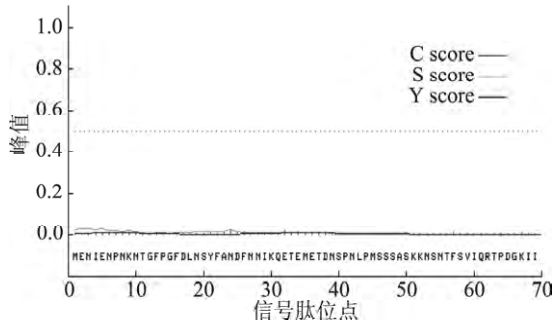


图4 贝酵母 ADRI 蛋白信号肽预测

Fig.4 Signal prediction by the ADRI protein of *S.bayanus*

form. html) 在线分析工具 进行该蛋白质的卷曲螺旋的预测操作。详情可见图 5。这组蛋白质残基共包含 Window 14、21、28 三个不同的窗口 ,每一个窗口都可

显示其卷曲螺旋的具体位置 ,但是文本数据并没有罗列。第一个卷曲螺旋序列位于 18~43 区域框内。

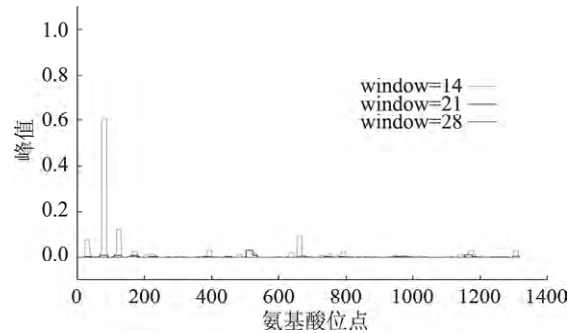


图5 ADRI 基因编码蛋白质的 coil 区分析图

Fig.5 ADRI gene encoding protein coil region analysis

表3 贝酵母 ADRI 基因编码出的蛋白质激酶磷酸化位点的预测情况
Table 3 The prediction of protein kinase phosphorylation sites of ADRI

磷酸化位置	磷酸化氨基酸	HMM Bit Score	催化激酶类型	磷酸化位置	磷酸化氨基酸	HMM Bit Score	催化激酶类型
63	VIQRTPDGK	-5.7	MAPK	471	NSSNSPISP	3.7	CDK
96	LNGRTPSGK	-5.4	MAPK	474	NSPISPHKL	-1.4	cdc2
142	NRCFTRRDL	-1.5	PKC	523	IFNQYMKGE	-2.8	INSR
164	GETISQNKK	0.4	ATM	581	QPTHSPESI	-2.9	cdc2
180	ARKNSASSV	0.9	PKG	581	QPTHSPESI	-1.1	ATM
188	VKFQTPNYG	-5.7	MAPK	612	DSSGTP LDS	-3.6	MAPK
191	QTPNYGTPD	-2.8	INSR	612	DSSGTP LDS	-0.1	CDK
206	CAVNTRRRV	-2.3	PKC	636	ELNEYLDLF	-2.5	Syk
225	LKKLTRRAS	-2.2	PKC	666	NLQQYTNEG	-3.1	INSR
225	LKKLTRRAS	-4.8	PKA	672	NEGEYTDIE	-0.2	EGFR
229	TRRASFSAQ	8.6	PKA	672	NEGEYTDIE	0.3	Src
229	TRRASFSAQ	4.5	CaM-II	672	NEGEYTDIE	0.8	INSR
229	TRRASFSAQ	1.6	PKG	673	EGEYTDIEN	-4.3	INSR
229	TRRASFSAQ	-1.5	IKK	684	FDHLSQGTD	1.5	ATM
229	TRRASFSAQ	2.3	PKB	691	TDKNYNLEH	-4.9	INSR
234	FSAQSASSY	-5.1	PKG	724	FGYKSQTIE	-4.2	ATM
259	VQFSTPELV	-5.7	MAPK	791	KRQLSALCS	2.8	PKA
321	NNYTYSSCS	1.2	Jak	791	KRQLSALCS	-5.2	PKG
350	DLLSSSYWI	-1.9	CKI	922	SSMIYYEYD	-2.4	Syk
363	DHLFSVSES	-1.6	CKI	931	LKKGTKSHV	-3.5	PKA
367	SVSEDETS	0.4	CKII	1057	DHQRTGSLE	-3.9	PKA
367	SVSEDETS	-2.5	CKI	1059	QRTGSLEEP	-1.8	CKI
367	SVSEDETS	-1.7	ATM	1059	QRTGSLEEP	-2	IKK
380	ESNDSKLV	-1.7	CKI	1097	DPEATPNFK	-6.2	MAPK
399	KDSRSSWT	0.4	CKI	1231	SNSNYENVN	0	INSR
401	SRSSWTAA	-0.5	IKK	1231	SNSNYENVN	-0.9	Syk
401	SRSSWTAA	2.8	PKB	1282	SKYVTIAKL	-1.7	PKC
471	NSSNSPISP	-0.3	cdc2	1314	TLEEYMREV	-0.1	INSR

2.3.2 蛋白质的跨膜区及二级结构预测 通过 TMPRED、TMHMM 在线软件分别分析了研究该组蛋白质跨膜螺旋区,分析结查中均出现两个可能的跨膜螺旋区,此蛋白为典型的跨膜蛋白。通常蛋白质含有跨膜区,即可能作为膜受体、锚定蛋白或离子通道蛋白,均不溶于水,所以该预测蛋白质为水溶性蛋白。这与蛋白质的亲疏水性性质一致。TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测结果见图 6。

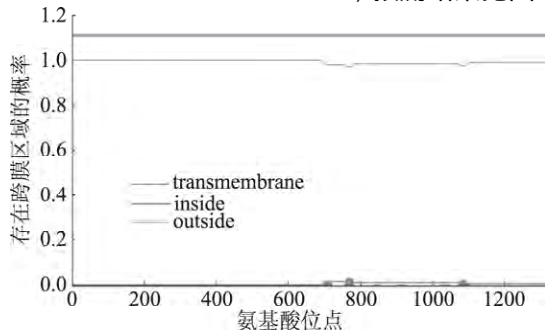


图6 ADR1 基因编码蛋白质的跨膜区分析图

Fig.6 Transmembrane region analysis of ADR1 encoding proteins

借助预测的网站 Predict Protein (<http://www.predictprotein.org/>) 进行这组蛋白质的二级结构分析,结果表明该 ADR1 的二级结构中环占比 65.72%,螺旋占比 33.07%,折叠占比 1.10%。

2.4 贝酵母 ADR1 基因编码蛋白质的结构域分析

借助 Smart (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 在线服务器对 ADR1 蛋白的结构域进行研究,详情如图 7 所示。该氨基酸序列之中,排在第 106~126 之间,第 134~155 位氨基酸位点出分别存在一个 C_2H_2 型锌指结构域。二级结构的预测表明螺旋(Helix)的比例为 33.07%,可能是锌指结构的重要组成部分。

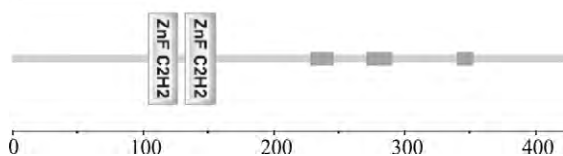


图7 分析 ADR1 编码出的蛋白质的结构域

Fig.7 The structure domain analysis of protein encoded by ADR1 gene

采取 prosite 数据库 (<http://www.expasy.org/prosite>) 对这组蛋白质作出 motif 查询。详细信息见图 8 所示。其中“标尺”显示结构域的位置。这组蛋白质中,有两个地方和指定模板匹配,具体位置在第 106~126 位以及 134~155 位。都分别存在一个锌结构域。这种描述与之前提及的 smart 在线查询出的果一致。可以推测 ADR1 基因编码的蛋白很有可能是通过这 2 个 C_2H_2 型锌指结构域结合 ADH2 基因特异性,以此提升 ADH2 基因的表达,来提高贝酵母的酒精代谢能力。

2.5 贝酵母 ADR1 基因编码蛋白质的三级结构预测

预测贝酵母 ADR1 基因编码的蛋白质的三级结构,使用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy>.)

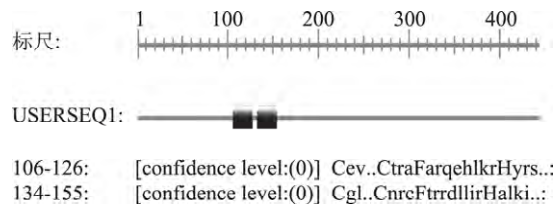


图8 ADR1 基因编码蛋白质的 motif 分析

Fig.8 Motif analysis of protein encoded by ADR1 gene

(<http://www.expasy.org/>) 在线预测软件,如图 9 所示,本文中的蛋白是基于 Aart 原子结构 2i13.2 的 C 链进行同源建模的,两者的序列一致性可以达到 30.69%,GMQE 值为 0.03,GMQEAN 值达到了 -3.81,这些评分说明建模质量较好。此图清晰地表明该蛋白拥有跨膜区,是由主要是由卷曲和折加上少量螺旋所组成的,和二级结构的预测相符。分析结果可以得出预测的三级结构也拥有 2 个锌指结构域,这和二级结构的预测相同。



图9 ADR1 基因编码蛋白质的三级结构预测结构图

Fig.9 Tertiary structure prediction of protein encoded by ADR1 gene

2.6 ADR1 序列比对分析

利用 NCBI 网站上的 Blast 工具对贝酵母 ADR1 基因进行同源检索,选取相似性大于 78% 部分菌株的 ADR1 基因进行序列全长分析,通过检索对比发现,该基因与真贝酵母(*S.eubayanus*) ADR1 基因同源性高达 92%,与黄酒酵母(*Saccharomyces arboricola*) 的 ADR1 基因为 81%,与酿酒酵母 YJM1402、YJM1273、R103、S288c、JAY291、P301 等 48 个菌株的同源性为 79%。较高的同源性说明该 ADR1 基因编码的蛋白质功能与酵母执行乙醇代谢的 ADR1 功能很相似,即有可能有调控乙醇脱氢酶的功能。

3 结论与讨论

本研究首次对贝酵母 ADR1 基因进行了克隆分析,从数据反馈可以知道,该核酸序列能够编码成一条有 1319 个氨基酸的蛋白质,分子式为 $C_{6664}H_{10376}N_{1822}O_{2072}S_{53}$,结构不稳定,属于亲水性蛋白,含两个跨膜结构域,在细胞核中亚细胞可发挥其的效用。除此之外,还包含 C_2H_2 锌指结构域,环结构比例排在首位的二级结构形态。预测它的三级结构也大致和二级结构相符。Hartshorne^[25] 和 Blumberg^[26] 证明酵母 ADR1 基因有两个锌指结构的特征,而且必须拥有两个锌指结构才能正常执行 ADR1 基因的功能,本文通过结构域分析得出贝酵母 ADR1 基因含有两个锌指结构域和前人的研究相符,提升了我们结论的可靠性和对贝酵母功能推断的准确性。

酿酒酵母 ADR1 基因编码的蛋白质和贝酵母 ADR1 的基因编码蛋白质的性质基本一致。Denis 和

Young 等^[13 27-30]的研究表明酿酒酵母中 ADR1 基因是醇脱氢酶相关的乙醇代谢正向调节基因,也是酿酒酵母生长所必需的调控基因。实际上酿酒酵母 ADR1 基因所编码的蛋白质属于典型的亲水性蛋白,内里含有 2 个跨膜结构域,对细胞核活动会起到一定的影响。该蛋白质中的氨基酸序列有 4 处的 coil 区和两处跨膜区,ADR1 基因所编码的蛋白质中含有两个 C₂H₂ 型锌指结构域,而锌指结构域与 DNA 结合及基因调控有关。本研究结果与酿酒酵母 ADR1 基因的功能基本相符。当然,本文所推测的结论还需要后续进行功能确证等进一步验证。

从近年来国内外对植物或动物基因进行生物信息学分析的研究^[31-34]不难发现在对生物基因进行生物信息学分析时,DNA 序列比对法多用于比较蛋白序列,进而判定亲缘关系的远近,使结构和功能的分析、预测使研究更精确、全面和深入。本实验研究采用序列比对分析、结构比对分析和功能比对分析三种方法综合分析,首先对贝酵母 ADR1 基因进行测序,以得到其核苷酸序列,同时还要分析这组序列中的蛋白质,然后利用在线分析工具,了解该蛋白质的基本理化性质、跨膜区、coil 区、亚细胞定位等。并且对该组蛋白质的二级和三级结构进行预测。因此,结果比较可靠。此外,本研究由蛋白质的结构和性质预测和推断其所行使的功能,以及如何影响细胞生长及代谢,为进一步研究贝酵母乙醇代谢的详细过程和途径奠定了一定的基础。

参考文献

- [1] Alonsodelreal J, Lairónperis M, Barrio E, et al. Effect of temperature on the prevalence of *Saccharomyces non cerevisiae* species against a *S. cerevisiae* wine strain in wine fermentation: Competition, physiological fitness, and influence in final wine composition [J]. *Front Microbiol* 2017 8: 150.
- [2] Albergaria H, Arneborg N. Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2016 100(5): 2035-2046.
- [3] Andorrà I, Berradre M, Mas A, et al. Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile [J]. *LWT-Food Science and Technology* 2012 49(1): 8-13.
- [4] Ciani M, Comitini F. Yeast interactions in multi-starter wine fermentation [J]. *Current Opinion in Food Science* 2015 1(1): 1-6.
- [5] Rementeria A, Rodríguez JA, Cadaval A, et al. Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the "Txakoli de Bizkaia" region (Basque Country, North Spain) [J]. *International Journal of Food Microbiology* 2003 86(1-2): 201.
- [6] Demuyter C, Lollier M, Legras J L, et al. Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in an Alsatian winery [J]. *Journal of Applied Microbiology* 2004 97(6): 1140-1148.
- [7] Naumov G I, Masneuf I, Naumova E S, et al. Association of *Saccharomyces bayanus* var *uvarum* with some French wines: genetic analysis of yeast populations [J]. *Research in Microbiology* 2000 151(8): 683-691.
- [8] Torriani S, Zapparoli G, Suzzi G. Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces sensu stricto* strains isolated from Amarone wine. Diversity of *Saccharomyces* strains from Amarone wine [J]. *Antonie van Leeuwenhoek* 1999 75(3): 207-215.
- [9] Naumov G I, and Nikonenko T A. Genomic divergence in cultivated and wild strains of the yeast, *saccharomyces sensu stricto*: four twin species [J]. *Doklady Biological Sciences* 1987, 294: 330-332.
- [10] Manzaneres-Estredes S, Espí-Bardisa J, Alarcón B, et al. Multilayered control of peroxisomal activity upon salt stress in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Molecular Microbiology* 2017, 104(5): 851.
- [11] Oliveira B M, Barrio E, Querol A, et al. Enhanced enzymatic activity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase from the cryophilic *Saccharomyces kudriavzevii* [J]. *Plos One* 2014, 9(1): e87290.
- [12] Pérez-Torrado R, Oliveira B M, Zemančíková J, et al. Alternative glycerol balance strategies among *Saccharomyces* species in response to winemaking stress [J]. *Frontiers in Microbiology* 2016 7: 435.
- [13] Denis L T B C L. Identification of functional regions in the yeast transcriptional activator ADR1 [J]. *Molecular & Cellular Biology* 1988 8(5): 2125-31.
- [14] Blumberg H, Hartshorne T A, Young E T. Regulation of expression and activity of the yeast transcription factor ADR1 [J]. *Molecular & Cellular Biology* 1988 8(5): 1868.
- [15] Paquin C E, Dorsey M, Crable S, et al. A spontaneous chromosomal amplification of the ADH2 gene in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Genetics* 1992 130(2): 263-271.
- [16] Miller J, McLachlan A D, Klug A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes* [J]. *Embo Journal* 1985 4(6): 1609.
- [17] Blumberg H, Eisen A, Sledziewski A, et al. Two zinc fingers of a yeast regulatory protein shown by genetic evidence to be essential for its function [J]. *Nature* 1987 328(6129): 443-445.
- [18] J Shuster J, Yu D, Cox J, et al. ADR1-mediated regulation of ADH2 requires an inverted repeat sequence [J]. *Molecular & Cellular Biology* 1986 6(6): 1894.
- [19] Ciriacy M. Genetics of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* II Two loci controlling synthesis of the glucose-repressible ADH II [J]. *Molecular & General Genetics* 1975 138(2): 157-64.
- [20] Bravim F, Fernandes P M B. Indicadores fisiológicos de la respuesta al estrés en cepas *Saccharomyces cerevisiae* alcoholeras [J]. *Icida Sobre Los Derivados De La Caña De Azúcar* 2015, XLIII(3): 40-45.
- [21] Turner T L, Zhang G C, Kim S R, et al. Lactic acid production from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae* without PDC or ADH deletion [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology* 2015 99(19): 8023-33.
- [22] Zhang H, Richards K D, Wilson S, et al. Genetic characterization of strains of *Saccharomyces uvarum* from New Zealand wineries [J]. *Food Microbiology* 2015 46(1): 92-99.
- [23] 贺笑, 张先昂, 刘小珍, 等. 贝酵母耐硫相关基因 FZF1 的克隆与分析 [J]. *食品工业科技* 2015 36(23): 166-172.
- [24] 阎隆飞, 孙之荣. 蛋白质分子结构 [M]. 北京: 清华大学出

出版社,1999.

[25] Hartshorne T A ,Blumberg H ,Young E T. Sequence homology of the yeast regulatory protein ADR1 with Xenopus transcription factor TFIIIA [J]. Nature ,1986 ,320 (6059) : 283-287.

[26] Blumberg H ,Eisen A ,Sledziewski A ,et al. Two zinc fingers of a yeast regulatory protein shown by genetic evidence to be essential for its function [J]. Nature ,1987 ,328(6129) : 443-445.

[27] Young C L D E T. Isolation and characterization of the positive regulatory gene ADR1 from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Molecular & Cellular Biology ,1983 ,3(3) : 360.

[28] Simon M ,Adam G ,Rapatz W ,et al. The *Saccharomyces cerevisiae* ADR1 gene is a positive regulator of transcription of genes encoding peroxisomal proteins [J]. Molecular & Cellular Biology ,1991 ,11(2) : 699-704.

[29] Laera L ,Guaragnella N ,Zdravlevic M ,et al. The transcription factors ADR1 or CAT8 are required for RTG pathway activation and evasion from yeast acetic acid - induced programmed cell

death in raffinose [J]. Microbial Cell ,2016 ,3(12) : 621.

[30] Roth S ,Schüller H J. Cat8 and Sip4 mediate regulated transcriptional activation of the yeast malate dehydrogenase gene MDH2 by three carbon source - responsive promoter elements [J]. Yeast ,2015 ,18(2) : 151-162.

[31] 张涛 ,张跟喜 ,王金玉 ,等 . 京海黄鸡 GnRHR 基因克隆、生物信息学及组织表达分析 [J]. 华北农学报 ,2014 ,29(5) : 45-53.

[32] 张雅玲 ,方智振 ,赖钟雄 . 三明野生香蕉 Ran 家族基因 DNA 序列克隆与生物信息学分析 [J]. 热带作物学报 ,2014 ,35(5) : 890-896.

[33] 李德军 ,邓治 ,刘向红 ,等 . 巴西橡胶树 HbUBC14 基因克隆、生物信息学及表达分析 [J]. 热带农业科学 ,2014 ,34(5) : 39-43.

[34] 赵慧 ,王遂 ,刘笑平 ,等 . 杂种杨树木葡聚糖内糖基转移酶基因(XET)的生物信息学分析 [J]. 安徽农业科学 ,2014 (34) : 12132-12136.

(上接第 89 页)

导培养条件 ,但由于蛋白质的种类繁多 ,理化性质各异 ,目前没有一个可以提高可溶性表达的通用方法 ,所以最佳表达可溶性 T4 DL 的方法可进一步深入研究。通过上述可知 ,高温与瓶装量对重组菌体 Transetta(DE3) (pNBEVII - T4 DL) 的可溶性表达影响较为显著 ,因此 ,我们可降低适当培养温度 ,减少瓶装量以增加蛋白产量。目的蛋白只有正确折叠能可溶性表达 ,这也与溶氧量有关 ,在后续实验中可以讨论溶氧量与目的蛋白产量的相关性 ,可以通过控制通氧速率来恒定溶氧量 ,以提高目的蛋白产量。

参考文献

[1] Murray N E ,Bruce S A ,Murray K. Molecular cloning of the DNA ligase gene from bacteriophage T4 II Amplification and preparation of the gene product [J]. Journal of Molecular Biology , 1979 ,132: 493-505.

[2] Zhao B ,Tong Z ,Zhao G ,et al. Effects of 2'-O - methyl nucleotide on ligation capability of T4 DNA ligase [J]. Acta Biochim Biophys Sin ,2014 ,46: 727-737.

[3] Onda M ,Yamaguchi J ,Hanada K ,et al. Role of DNA ligase in the illegitimate recombination that generates lambda dabbio - transducing phages in *Escherichia coli* [J]. Genetics ,2001 ,158(1) : 29-39.

[4] Lohman G ,Chen L X ,Evans T C. Kinetics characterization of single strand break ligation in duplex DNA by T4 DNA ligase [J]. Journal of Biology Chemistry ,2011 ,286: 44187-44196.

[5] 韩来闯 ,马闪闪 ,刘亚娟 ,等 . 构建重组质粒的二步 PCR 方法 [J]. 河南科学 ,2015 ,33(8) : 1321-1325.

[6] Kalim M ,Jie C ,Wang S ,et al. Construction of high level prokaryotic expression and purification system of PD - L1 extracellular domain by using *Escherichia coli* host cell machinery [J]. Immunology Letters ,2017 ,190: 34-41.

[7] Dammicco S ,Goux M ,Lemair C ,et al. Regiospecific radiolabelling of nanofitin on Ni magnetic beads with [18F]FBEM and *in vivo* PET studies [J]. Nuclear Medicine and Biology ,2017 ,

51: 33-39.

[8] Vereshchagina T A ,Fedorchak M A ,Sharonova O M ,et al. Ni (2 +) - zeolite/ferrosphere and Ni (2 +) - silica/ferrosphere beads for magnetic affinity separation of histidine-tagged proteins [J]. Dalton Transactions ,2015 ,45(4) : 1582-92.

[9] Rosenbaum A ,Bleck E ,Schneider M ,et al. Assessment of direct versus indirect magnetic bead - based T - cell isolation procedures followed by magnetic bead - based DNA isolation [J]. Lupus Science & Medicine ,2016 ,3(1) : e000167.

[10] Nie Y ,Yan W ,Xu Y ,et al. High-level expression of *Bacillus naganensis* pullulanase from recombinant *Escherichia coli* with auto - induction: effect of lac operator [J]. Plos One ,2013 ,8(10) : e78416.

[11] 马闪闪 ,韩来闯 ,刘亚娟 ,等 . CBM2 蛋白的高密度自诱导 [J]. 中国农学通报 ,2015 ,31(18) : 140-145.

[12] 顾娟 ,劳勋 ,金明飞 ,等 . 人胰高血糖素样肽 - 1 突变体融合蛋白在大肠杆菌中的自诱导表达优化 [J]. 微生物学通报 ,2010 ,37(5) : 726-731.

[13] Joshi H ,Jain V. Novel method to rapidly and efficiently lyse *Escherichia coli* for the isolation of recombinant protein [J]. Analytical Biochemistry ,2017 ,528: 1-6.

[14] Alves N J ,Turner K B ,Divito K A ,et al. Affinity purification of bacterial outer membrane vesicles (OMVs) utilizing a His - tag mutant [J]. Research in Microbiology ,2017 ,168(2) : 139-146.

[15] 周李华 ,叶德萍 ,王智 ,等 . T4 DNA 连接酶活力测定方法 [J]. 中国测试 ,2014 ,40(2) : 64-66.

[16] Zhang Q ,Yan Z ,Xu Y ,et al. Characterization of inducible ccdB gene as a counterselectable marker in *Escherichia coli* recombinering [J]. Current Microbiology ,2017 ,74(8) : 961-964.

[17] Baliga C ,Varadarajan R ,Aghera N. The homodimeric *E. coli* toxin CcdB(Controller of Cell Division or Death B protein) folds via parallel pathways [J]. Biochemistry ,2016 ,55(43) : 6019-6031.

[18] 耿晓姝 ,刘秦 ,党会杰 ,等 . 利用毒素蛋白基因 ccdB 构建高效低背景 T - 载体 [J]. 热带生物学报 ,2016 ,7(2) : 232-236.