

## 酿酒酵母 *ARD1* 对低温胁迫的响应及其互作蛋白的筛选

房楠楠, 杜青, 宋瑶瑶, 张雪, 李莹, 秦义, 宋育阳, 刘延琳\*

(西北农林科技大学葡萄酒学院 陕西杨凌 712100)

**摘要** 目的:低温发酵(10~15℃)可以提高葡萄酒的感官品质,有利于保留葡萄酒的品种香气和发酵香气,对改善葡萄酒品质具有积极的影响。为提高酿酒酵母的低温耐受性,本研究鉴定并分析了与酿酒酵母低温耐受相关的基因。方法:本实验室研究人员前期筛选得到 1 株低温耐受的本土酵母(ZX11),通过基因敲除、基因回补等技术,构建 ZX11 $\Delta$ ard1 和 ARD1-ZX11 $\Delta$ ard1 突变体菌株,分析菌株在低温和正常温度下的生长状况。利用 GST-Pull down 联合质谱分析,酵母双杂交筛选并验证 ARD1 的靶标蛋白。结果:研究结果表明 ARD1 基因对 ZX11 的低温耐受性具有十分关键的作用。CBK1 编码的 Cbk1p 蛋白是 Ard1p 的互作蛋白,并在体内和体外进一步验证 Ard1p 与 Cbk1p 存在互作。结论:本研究确定 ARD1 基因与 ZX11 酵母低温耐受的相关性,并证明 Ard1p 与 Cbk1p 蛋白之间存在互作,为深入研究 ARD1 基因的生物学功能及其对酿酒酵母低温耐受的分子调控机制奠定基础。

**关键词** 低温耐受; GST-Pull Down; 酵母双杂交; 互作蛋白

**文章编号** 1009-7848(2023)09-0023-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.09.003

葡萄酒酿造过程中,发酵温度对葡萄酒品质有重要的影响<sup>[1-2]</sup>。低温发酵常用于白葡萄酒和桃红葡萄酒的酿造,近几年研究者们引入低温发酵技术以增强红葡萄酒的芳香特征<sup>[3]</sup>。研究表明,较低的发醇温度(10~15℃)能更好地保留葡萄酒的香气,增加酯和脂肪酸的含量,提高葡萄酒的花果香;降低葡萄酒中高级醇和挥发酸的含量,减少败坏性气味物质的生成;同时也降低发酵过程中细菌污染的风险<sup>[4-6]</sup>。然而,酿酒酵母最适生长温度范围为 25~32℃<sup>[7]</sup>。当发醇在低温下进行,酵母的生长速率减缓,多种细胞的代谢过程发生变化<sup>[8]</sup>,造成葡萄酒发醇缓慢,甚至发醇停止<sup>[9-12]</sup>,因此酿酒酵母的低温耐受能力决定着低温发醇能否顺利进行<sup>[13-14]</sup>。近年来,研究者通过多种方式提高酵母的低温耐受能力,如 Garcia 等<sup>[15]</sup>和 Ortiz 等<sup>[16]</sup>通过酵母属种间杂交提高酿酒酵母的低温耐受能力。Chiva 等<sup>[17]</sup>通过适应性进化、诱变筛选低温耐受的酵母菌,然而得到的菌株低温耐受能力并不理想。酿酒酵母的低温耐受性是由多基因控制的数量性

状,其分子机制至今不清楚<sup>[18]</sup>。Gautschi 等<sup>[19]</sup>研究发现,与对照相比,ARD1 基因缺失的菌株在 20℃和 38℃中的生长受到抑制,说明 ARD1 基因可能参与酵母的温度胁迫适应性。本研究室人员前期报道了 1 株低温耐受的本土酵母菌株(ZX11)<sup>[20]</sup>。基于此菌株,找到并证明 ARD1 基因是与 ZX11 菌株低温耐受相关的基因。

ARD1 基因首次在酿酒酵母中被报道<sup>[21]</sup>,它作为  $N^{\alpha}$ -末端乙酰基转移酶 NatA 的催化亚基,是 NatA 酶行使乙酰化功能必不可少的基因<sup>[22]</sup>。Ard1p 可与核糖体稳定结合,介导 NatA 复合物对蛋白质进行  $N$ -末端乙酰化修饰。由于 NatA 具有较多的细胞底物<sup>[23]</sup>,ARD1 还具有广泛的兼职功能,比如 ARD1 具有 KAT 活性,介导催化  $\epsilon$ -氨基的乙酰化,并刺激细胞增殖<sup>[24-25]</sup>;介导 HSP70 乙酰化来调节平衡蛋白质的复性、降解反应<sup>[26]</sup>;与 PIX(一种鸟嘌呤核苷酸交换因子 GEF)相互作用,发挥其抗转移功能,抑制细胞的迁移能力<sup>[23]</sup>。酵母中 ARD1 基因的研究较少。Whiteway 等<sup>[27]</sup>提出 ARD1 介导酵母孢子的形成,进而影响细胞的有丝分裂周期。

本研究通过基因敲除、基因回补等方法证明 ARD1 基因与酿酒酵母 ZX11 的低温耐受的相关性。利用 GST-Pull down 联合质谱检测,酵母双杂交验证由 CBK1 编码的 Cbk1p 蛋白和 ARD1 编码的 Ard1p 蛋白互作,为阐明 ZX11 响应低温胁迫

收稿日期:2022-09-20

基金项目:国家自然科学基金联合基金重点项目(U21A20269);国家现代农业(葡萄)产业技术体系建设专项(CARS-29-jg-03)

第一作者:房楠楠,女,硕士生

通信作者:刘延琳 E-mail: yanlinliu@nwsuaf.edu.cn

的分子机制奠定基础,为选育优良的低温耐受酿酒酵母提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及试剂

本试验所用菌株:野生型酵母菌株 ZX11 为本实验室保存。大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、大肠杆菌 BL21 (DE3)、酵母菌 Y2HGold 购自普因特生物技术有限公司。

本试验所用质粒:pUG6SH (带有潮霉素抗性基因)、pGEX-4T-1、PGADT7、PGBKT7、PGADT7-T、PGBKT7 -p53、PGBKT7 -Lam、pCDF -MCS1 -AtUBA1 质粒由本实验室保存;GST-ARD1、GST-CBK1、His-ARD1 为本研究构建。

试剂及试剂盒:葡萄糖、蛋白胨、酵母浸粉、琼脂、胰蛋白胨、YNB、-Ura DO Supplement、Amp、潮霉素等试剂购自宝生物生物科技有限公司;限制性内切酶(*EcoR* I、*BamH* I、*Spe* I)、蛋白 Marker、Primestar Max Premix (2 $\times$ )、1 $\times$ SDS loading buffer、X- $\alpha$ -Gal、还原型谷胱甘肽等分子生物学试剂、缺陷培养基购自宝生物生物科技有限公司;大肠质粒提取试剂盒,购自 OMGA 公司;MagneGST<sup>TM</sup> particles 和 MagneGST<sup>TM</sup> Binding/Wash Buffer, 购自 Promega 公司;酵母总蛋白提取试剂盒,购自贝博生物试剂有限公司;Anti-His 多克隆抗体、Anti-FLAG 多克隆抗体、Anti-GFP 多克隆抗体、二抗 Anti-IgG, 购自 Affinity Biosciences;Proteinso GST Resin、GST 平衡缓冲液、Ni-NTA 预装重力柱,购自 Sangon 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 基因敲除及基因回补载体构建 通过 NCBI 查阅目的基因 *ARD1* 的参考序列(Gene ID: 856404), 酿酒酵母的参考菌株为 *Saccharomyces cerevisiae* S288c (strain: S288c), 利用软件 CE Design V1.04 设计含有 45 bp 左右的同源臂的引物 KO-Hph-ARD1-F (ACCTAAATACATACGATCAAGCTCCAAAATAAACTTCGTCAACCCATATGACATATTGTCTGTTAGA) 和 KO-Hph-ARD1-R (AGAAGCCTGGATGAAAATATACTACGTTTATATAGGTTGATTTAAAATACGACTCACTATAGGGAGAC), 以 pUG6SH 为模板 PCR 扩增敲除框(潮霉素

抗性基因),参考冯莉<sup>[20]</sup>的方法转化至 ZX11 菌株中。取 100  $\mu$ L 菌液涂布在含有潮霉素的 YPD 平板上,30  $^{\circ}$ C 过夜培养,挑取阳性克隆接种于 50 mL 的 YPD 培养基中,30  $^{\circ}$ C,150 r/min 培养 12~16 h,参考冯莉<sup>[20]</sup>的方法提 ZX11 基因组,以 ard1-F (CAGCAACGAGTAATTGCCAAGTG) 和 ard1-R (CTGCAGTGTTTAGAACCGTGCTC) 为验证引物,通过 PCR 扩增敲除框片段,并送到擎科生物有限公司进行测序。

利用限制性内切酶 *Spe* I 和 *EcoR* I 对 pY26 载体线性化处理,插入片段获得以 SpeI-ARD1-pY26T-F (TCGACGGATTCTAGA ACTAGT CGAAGTATGCCTATTAATATTTCGCAGAGC) 和 ARD1-EcoRI-pY26T-R (CGACGGTATCGATAAGCTTGA TATCGAATTCTTATACAATGATATCATTTACGCC) 为引物,以 ZX11 基因组为模板 PCR 扩增。利用一步克隆试剂盒将片段和载体连接,构建 pY26-ARD1 重组质粒转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,提取阳性菌株质粒以 pY26C-F (GGACAGGTATCCGGTAAGCG) 和 pY26C-R (CGTACACGCGTCTGTACAGA) 为验证引物,通过 PCR 扩增后,送到擎科生物有限公司进行测序。

1.2.2 菌株的低温胁迫处理 取待测菌株 50  $\mu$ L 接种于 50 mL 的 YPD 液体培养基中,30  $^{\circ}$ C,150 r/min 过夜培养,取适量菌液转接于新的 50 mL 的 YPD 培养基中,使其初始 OD<sub>600nm</sub> 值为 0.1,于 4  $^{\circ}$ C,150 r/min 培养,每 48 h 测 1 次 OD<sub>600nm</sub> 值,以在 30  $^{\circ}$ C 生长的菌株做对照,观测其生长曲线。

将 pY26-ARD1 质粒转化至 ZX11  $\Delta$ ard1 菌中,回补 *ARD1* 基因,构建 ARD1-ZX11 $\Delta$ ard1 菌株,在 SD-Ura 培养基中培养 1~2 d 后,用无菌水将菌液稀释到 OD<sub>600nm</sub> 值为 1,再进行梯度稀释 10<sup>-1</sup>~10<sup>-4</sup>,从每个梯度稀释液中取 2  $\mu$ L 点样于 YPD 固体培养基上,4  $^{\circ}$ C 下培养 16 d,以 30  $^{\circ}$ C 生长的菌株做对照,进一步验证 ARD1 与低温胁迫的相关性。

1.2.3 GST-Pull down 联合质谱分析筛选互作蛋白 GST-Pull down 试验方法按照 Promega 公司的 MagneGST<sup>TM</sup> Pull Down System 进行。

1) 表达载体构建及融合蛋白的表达纯化 参照 1.2.1 节的方法构建重组质粒 GST-ARD1,将质

粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中,以 GST 质粒为对照。取 50  $\mu\text{L}$  菌液加入 30 mL 的 LB(+Amp)培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$ ,200 r/min 培养活化;将培养物按 1:100 比例接入 200 mL LB(+Amp)液体培养基中,200 r/min,37  $^{\circ}\text{C}$  培养至  $\text{OD}_{600}=0.4\sim 0.6$ ;以预试验确定的最佳 IPTG 浓度、时间和温度诱导表达融合蛋白。4  $^{\circ}\text{C}$ ,5 000 r/min 离心 5 min 后弃培养液,用 30 mL GST 缓冲液重悬菌体;用低温超高压连续流细胞破碎机破碎 2~3 次,4  $^{\circ}\text{C}$ ,12 000 r/min 离心 30 min 留上清,过 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜。取 80  $\mu\text{L}$  MagneGST™ 磁珠于 2 mL 的 PE 管中,用 MagneGST™ Binding 平衡柱子。取 400  $\mu\text{L}$  上一步诱导表达的融合蛋白上清液于磁珠中,4  $^{\circ}\text{C}$  旋转孵育,用 500  $\mu\text{L}$  Wash Buffer 洗脱杂蛋白。取出 GST-ARD1 诱饵蛋白和 GST-磁珠的混合物,GST 标签蛋白与 GST-磁珠的混合物。

2) 酵母总蛋白的提取 参考贝博公司的酵母总蛋白提取试剂盒说明书提供的步骤,提取 ZX11 酵母总蛋白。

3) *ARD1* 互作蛋白的筛选 将 ZX11 酵母总蛋白过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜,取 400  $\mu\text{L}$  分别与上一步得到两组蛋白-磁珠混合物混合,4  $^{\circ}\text{C}$  旋转孵育,用 500  $\mu\text{L}$  的 Wash Buffer 洗脱杂蛋白。洗涤完成后加入 40  $\mu\text{L}$  1 $\times$ SDS loading buffer,95  $^{\circ}\text{C}$  煮沸 5 min,将蛋白混合样品分离。所得溶液是通过 GST-Pull down 初步筛选到的互作蛋白混合液,取 20  $\mu\text{L}$  混合液进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.4 LC-MS/MS 筛选互作蛋白 将上一步得到的蛋白胶用手术刀片切下整个泳道,并将目的条带切成 1  $\text{mm}^2$  大小的胶块置于 5 mL 的 EP 管中,加入无菌水在室温下进行脱色处理,至胶块无色透明,送到陕西致研生物科技有限公司进行质谱检测。

1.2.5 酵母双杂交(Yeast Two-Hybrid Assays)检验互作蛋白 参照 1.2.1 节的方法构建重组质粒 pGBKT7-ARD1 和 pGADT7-Prey 质粒,转化至酵母菌株 Y2H Gold,30  $^{\circ}\text{C}$ ,150 r/min 培养 1~2 d,用无菌水将菌液稀释到  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  值为 1,取 2  $\mu\text{L}$  菌液点样于相应的 SD 固体培养基上,30  $^{\circ}\text{C}$  培养 3~5 d,观察酵母菌生长状况和菌落颜色变化。

1) 自激活验证 按照上述步骤,将 2~5  $\mu\text{g}$

pGBKT7-ARD1 转化至酵母 Y2HGold 中,再将 pGADT7 转化至酵母 pGBKT7-ARD1 (Y2HGold) 中,涂布在 DDO(-Leu/-Trp/SD)培养基上,生长 3~5 d,挑取单菌落接种于 DDO 液体培养基,在 30  $^{\circ}\text{C}$  下培养 2~3 d,吸取 2  $\mu\text{L}$  酵母菌液点样于 TDO(-Leu/-Trp/-His/SD/X- $\alpha$ -Gal)固体培养基上,30  $^{\circ}\text{C}$  培养 3~5 d,观察酵母菌生长状况和菌落颜色变化。

2) 蛋白互作验证 将 pGBKT7-ARD1 和 pGADT7-Prey 共同转化至酵母 Y2HGold 中,同时将阳性对照(pGBKT7-53 和 pGADT7-T)和阴性对照(pGBKT7-Lam 和 pGADT7-T)共同转化至 Y2HGold 中,分别涂布在 DDO 培养基上,生长 3~5 d,挑取单菌落接种于 DDO 液体培养基,在 30  $^{\circ}\text{C}$  下培养 2~3 d,吸取 2  $\mu\text{L}$  酵母菌液点样于 QDO(-Leu/-Trp/-His/-Ade/SD/X- $\alpha$ -Gal)固体培养基上,30  $^{\circ}\text{C}$  培养 3~5 d,观察酵母菌生长状况和菌落颜色变化。

1.2.6 GST-Pull down 验证互作蛋白 参照 1.2.1 节的方法构建重组质粒 His-ARD1 和 GST-Prey 质粒。本试验设置 2 组对照组和 1 组试验组。对照组 1 为 His 质粒与 GST-Prey 质粒共同转化至 BL21 (DE3) 中,对照组 2 为 His-ARD1 质粒与 GST 质粒共转至 BL21 (DE3) 中,试验组为 His-ARD1 和 GST-Prey 质粒共同转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中。

试验组和对照组 1 用 Proleinsol GST Resin 对融合蛋白进行分离纯化。取 1 mL 50% 的谷胱甘肽-琼脂糖树脂匀浆,用 5~10 倍柱体积的 GST 平衡缓冲液平衡层析柱,至流出液电导和 pH 值不变(与平衡液一致);取 35 mL 的融合蛋白与 Proleinsol GST Resin 混合,在 4  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 5~10 h;用 10 倍柱体积的平衡缓冲液洗涤层析柱,收集流出液;用洗脱缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 10 mmol/L 还原型谷胱甘肽)洗脱并收集蛋白混合样品;取 80  $\mu\text{L}$  蛋白混合样品加入 20  $\mu\text{L}$  5 $\times$  loading buffer,95  $^{\circ}\text{C}$  煮沸 5 min,所得溶液即猎物蛋白和诱饵蛋白的混合液。

对照组 2 用 Ni-NTA 对融合蛋白进行分离纯化。取 1 mL 50% 的 Ni-NTA 匀浆,用 5~10 倍柱体积的平衡缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5、

0.5 mol/L NaCl、10%甘油、5 mmol/L 的咪唑)平衡层析柱;取 35 mL 的融合蛋白与 Ni-NTA 混合,在 4 °C 下孵育 5~10 h;用 10 倍柱体积的平衡缓冲液(20 mmol/L Tris-HCL pH 7.5、0.5 mol/L NaCl、10%甘油、20 mmol/L 的咪唑)洗涤层析柱,收集流出液;用洗脱缓冲液(20 mmol/L Tris-HCL pH 7.5、0.5 mol/L NaCl、10%甘油、150 mmol/L 咪唑)洗脱并收集蛋白混合样品;取 80  $\mu$ L 蛋白混合样品加入 20  $\mu$ L 5 $\times$ loading buffer,95 °C 煮沸 5 min。分别取 20  $\mu$ L 上述样品进行 SDS-PAGE 电泳检测,并进行 Western Blot 检测。

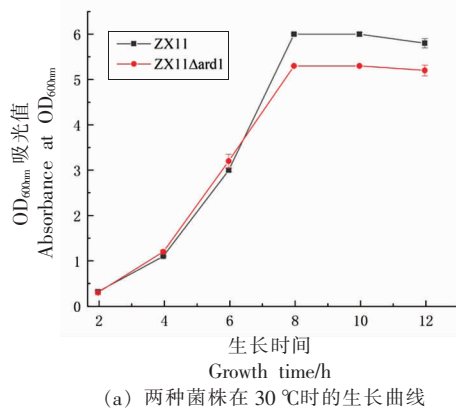
## 2 结果

### 2.1 基因敲除与基因回补载体构建

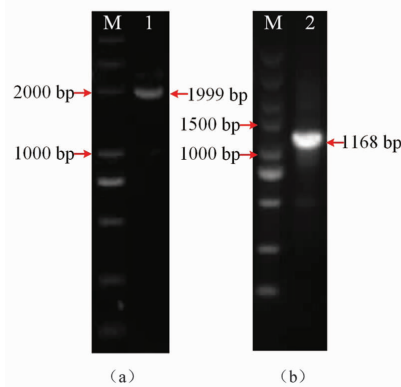
用验证引物 PCR 扩增同源重组在 ZX11 基因组上的潮霉素抗性基因,核酸电泳检测片段长度应为 1 999 bp(如图 1a)与预期相符,经测序进一步确认 *ARD1* 基因敲除成功;用验证引物 PCR 扩增重组质粒 GST-*ARD1*,核酸电泳检测插入片段长度应为 1 168 bp(如图 1b),经测序表明目的片段插入无误,重组表达载体构建成功。

### 2.2 菌株的低温胁迫响应

为了验证 *ARD1* 与野生型酿酒酵母 ZX11 耐受低温的关系,本研究测试了 30 °C 和 4 °C 下 ZX11 与 ZX11 $\Delta$ *ard1* 突变菌株在 YPD 液体培养基中的生长状况。绘制的两组菌株生长曲线,如图



2 所示,在 30 °C 下,两组菌株的生长趋势差异不大。生长 8 h 后两组菌几乎同时进入稳定生长期。在 4 °C 下,ZX11 在整个生长周期中有明显的生长优势,其在对数生长期生长较快,仅用 200 h 进入稳定生长期,OD<sub>600</sub> 值稳定在 5.2 左右。与在 30 °C 下生长的趋势相似。ZX11 $\Delta$ *ard1* 没有明显的生长拐点,生长缓慢,生长 400 h 后 OD<sub>600nm</sub> 值趋于稳定,OD<sub>600</sub> 值稳定在 3 左右,与该条件下 ZX11 菌株差异较大,也与在 30 °C 下的生长有显著差异。该结果说明 *ARD1* 基因敲除影响 ZX11 菌株在低温条件下的生长。



注:(a)M:DL5 kb plus DNA Ladder;1: 敲除框基因序列扩增 PCR 产物;(b)M:DL5 kb plus DNA Ladder;2: 插入基因 *ARD1* 序列扩增 PCR 产物。

图 1 *ARD1* 基因敲除与基因回补载体构建

Fig.1 Construction of *ARD1* gene knockout and gene complementation vector

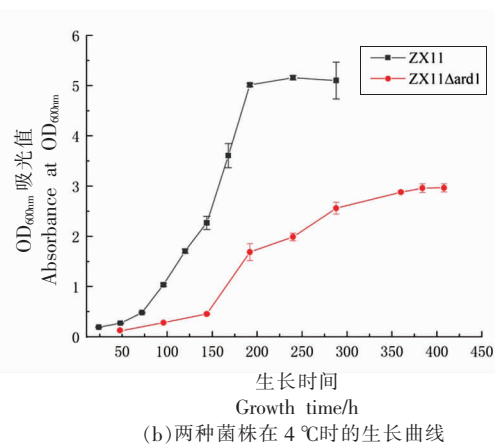


图 2 不同温度条件下 ZX11 和突变菌株(ZX11 $\Delta$ *ard1*)的生长曲线

Fig.2 Growth curves of ZX11 and mutant strain (ZX11 $\Delta$ *ard1*) at different temperatures

将 *ARD1* 基因回补到 *ARD1* 敲除菌株 ZX11  $\Delta$ *ard1* 中,在 30 °C 和 4 °C 环境下的生长情况如图

3 所示。在 30 °C 中,3 组菌斑在每个浓度梯度下差异较小。4 °C 环境中,ZX11 $\Delta$ *ard1* 菌斑在 OD<sub>600nm</sub> 为

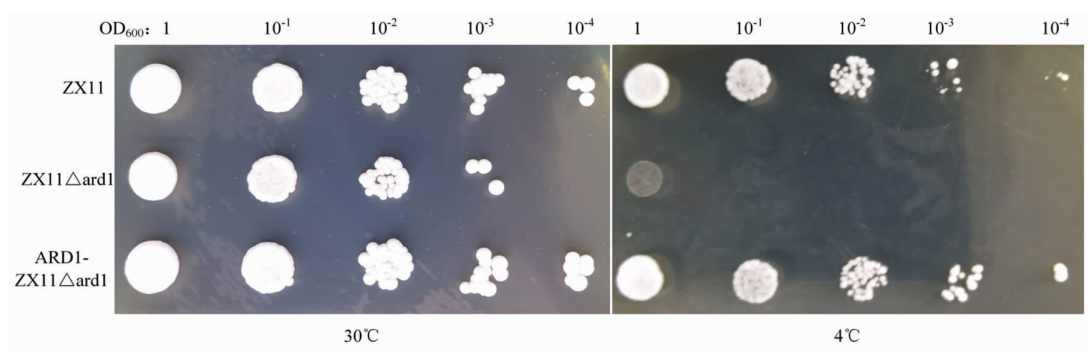


图 3 不同温度环境下 ZX11、突变菌株 ( $ZX11\Delta ard1$ ) 和突变菌株回补 *ARD1* 基因的生长状况

Fig.3 Growth status of ZX11, mutant strain ( $ZX11\Delta ard1$ ) and mutant strain complementing *ARD1* gene at different temperatures

1 的时候就有差异,从  $10^{-1}$  到  $10^{-4}$  浓度下几乎没有生长,说明敲除 *ARD1* 基因后,菌株在低温环境下生长受到抑制。 $ZX11\Delta ard1$  回补 *ARD1* 基因后,菌斑大小又恢复到原来的状态,说明 *ARD1* 基因对 ZX11 菌株在低温环境下的生长起着关键的作用。

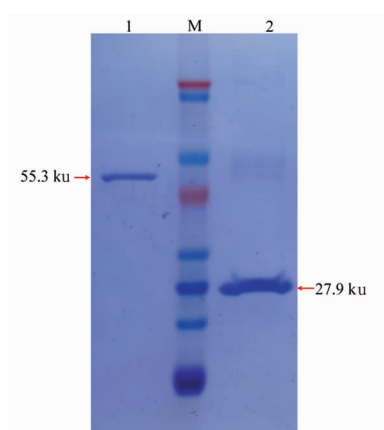
### 2.3 表达载体构建及融合蛋白的表达纯化

GST-*ARD1* 和 GST 表达载体转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株,培养并提取质粒后转化 BL21(DE3) 表达菌株,IPTG 诱导表达 GST-*ARD1* 诱饵蛋白和 GST 标签蛋白,预试验中最佳诱导表达条件是添加 0.2 mmol/L IPTG,于 16 °C 下诱导培养 18 h,该条件下,上清液中的蛋白表达比较均一旦表达量稳定,融合蛋白 GST-*ARD1* 分子质量 55.3 ku,

标签蛋白 GST 分子质量 27.9 ku。通过 GST-磁珠纯化,结果如图 4 所示,大部分杂蛋白消失,得到纯度较高的带有 GST 标签的融合蛋白。

### 2.4 GST-Pull down 联合质谱分析筛选互作蛋白

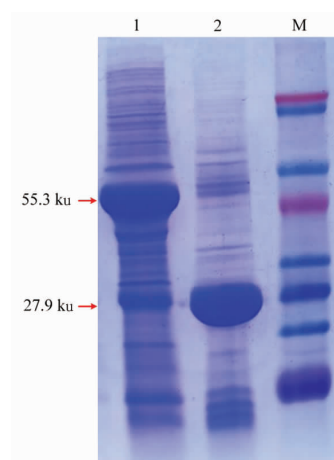
2.4.1 GST-Pull down 筛选互作蛋白 成功提取 ZX11 的总蛋白,然后将总蛋白分别与结合在 GST-磁珠上的 GST-*ARD1* 诱饵蛋白和 GST 标签蛋白进行孵育,煮脱的混合蛋白样品经 SDS-PAGE 进行检测,结果如图 5 所示,纯化后的诱饵蛋白可以与 GST 磁珠亲和,融合蛋白 GST-*ARD1* 分子质量 55.3 ku,标签蛋白 GST 分子质量 27.9 ku。除去对照组条带,试验组仍有差异条带,说明目的蛋白在 ZX11 总蛋白中钓取了部分互作蛋白。



注:1:融合蛋白 GST-*ARD1* 纯化条带;2:标签蛋白 GST 纯化条带;M:Protein Marker(14~120 ku)。

图 4 融合蛋白 GST-*ARD1* 和标签蛋白 GST 的表达纯化

Fig.4 Expression and purification of GST-*ARD1* fusion protein and GST-tagged protein



注:1:融合蛋白 GST-*ARD1* 和 ZX11 蛋白孵育的混合蛋白条带;2:标签蛋白 GST 和 ZX11 蛋白孵育的混合蛋白条带;M:Protein Marker(14~120 ku)。

图 5 混合蛋白样品的 SDS-PAGE 检测

Fig.5 SDS-PAGE detection of mixed protein samples

2.4.2 质谱分析互作蛋白 通过质谱鉴定,首先选择只在 GST-ARD1 试验组中被鉴定到的蛋白,并剔除存在于 GST 对照组中的蛋白。根据蛋白亚

细胞定位信息以及已经报道的蛋白质功能,筛选到 12 种可能与 ARD1 相互作用的蛋白质,如表 1 所示。

表 1 LC-MS/MS 鉴定的 ARD1 相互作用蛋白

Table 1 ARD1 interacting proteins identified by LC-MS/MS

基因名称	覆盖度/%	保守肽段数量	描述
SSA4	23	2	热休克蛋白;Hsp70 家族伴侣蛋白
BZZ1	14	8	启用酶激活剂活性和磷脂结合活性
CBK1	3	2	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶
PPT1	3	1	丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶
MAK31	10	1	N- $\alpha$ -乙酰转移酶 38 NatC 辅助亚基
NAT1	18	35	N-末端乙酰转移酶 A 复合物亚基 NAT1
SSB1	61	3	核糖体相关分子伴侣
PGK1	61	30	磷酸甘油酸激酶
SSE1	67	66	热休克蛋白同源物
SSA2	71	15	热休克蛋白
SSA1	59	12	热休克蛋白
CNS1	5	1	Hsp70/Hsp90 共伴侣

## 2.5 酵母双杂交 (Yeast Two-Hybrid Assays) 检测互作蛋白

2.5.1 pGBKT7-ARD1 自激活检测 用一步克隆试剂盒构建 pGBKT7-ARD1 和 pGADT7-CBK1 重组载体,经电泳检测和测序,鉴定重组载体构建成功。分别将 pGBKT7-53 和 pGADT7-T(阳性对照)、pGBKT7-Lam 和 pGADT7-T(阴性对照)以及 pGBKT7-ARD1 和 pGADT7(试验组)共同转化至 Y2HGOLD 酵母中。

取 3 组菌液点样在相应的平板上,菌株生长情况如图 6a 所示。均在 TDO 的平板生长,说明质

粒转化成功,阳性对照在 QDO/X- $\alpha$ -Gal 的固体培养基上生长,阴性对照和试验组没有在 QDO/X- $\alpha$ -Gal 的固体培养基上生长,说明 ARD1 基因没有自激活作用。

2.5.2 蛋白互作关系验证 取 3 组菌液点样在相应的平板上,均在 TDO 固体培养基上生长,说明质粒转化成功,阴性对照没有在 DDO/X- $\alpha$ -Gal 的固体培养基上生长,阳性对照和 pGADT7-CBK1 在 DDO/X- $\alpha$ -Gal 固体培养基上生长并变色(如图 6b),说明 ARD1 基与 CBK1 在酵母中存在互作。

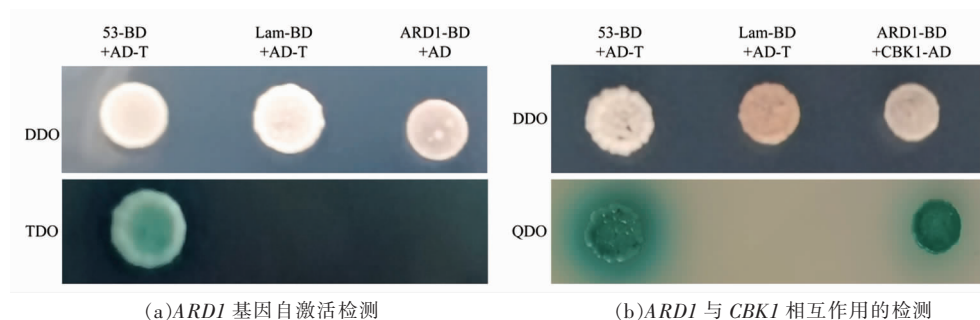


图 6 酵母双杂自激活检测及互作验证

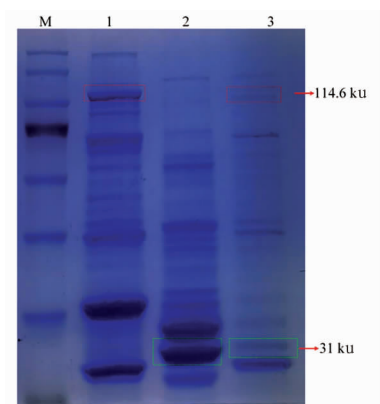
Fig.6 Yeast two-hybrid self-activation detection and interaction verification

## 2.6 GST-Pull down 验证互作蛋白

将对照组和试验组的混合蛋白样品进行

SDS-PAGE 电泳结果如图 7a 所示。对照组 1 中有融合蛋白 GST-CBK1,分子质量为 114.6 ku。对照

组 2 中有 His-ARD1 融合蛋白, 分子质量为 31 ku, 试验组中分别检测到 GST-CBK1 和 His-ARD1 蛋白。结合免疫共沉淀结果, 如图 7b 所示,



(a) 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳结果图

注: 1 和 5: 标签蛋白 His 和融合蛋白 GST-CBK1 孵育的混合蛋白条带; 2 和 6: 标签蛋白 GST 和融合蛋白 His-ARD1 孵育的混合蛋白条带; 3 和 4: 融合蛋白 GST-CBK1 和 His-ARD1 孵育的混合蛋白条带; M: Protein Marker(25~180 ku)。

图 7 GST-Pull down 点对点验证 *ARD1* 与 *CBK1* 的相互作用

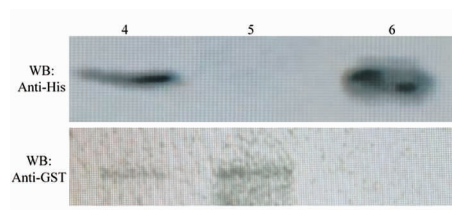
Fig.7 GST-Pull down peer-to-peer verification of the interaction between *ARD1* and *CBK1*

### 3 讨论与结论

本研究通过基因敲除和基因回补, 构建了 ZX11  $\Delta$ ard1 和 *ARD1*-ZX11  $\Delta$ ard1 突变体菌株, 研究它们在 30 °C 和 4 °C 下的生长表型, 确定了 *ARD1* 基因是与酿酒酵母 ZX11 低温耐受相关的基因; 通过 GST-Pull down 联合质谱分析获得了与 Ard1p 互作的蛋白 Cbk1p, 用酵母双杂交技术和 GST pull-down 验证了两个在体外和酵母体内均存在互作。CBK1 是 AGC 激酶家族的成员之一, 与 NDR 蛋白激酶关系密切<sup>[28]</sup>。在酿酒酵母中, Cbk1p 通过多位点磷酸化, 负责几丁质酶转录的转录因子 Ace2p 的激活, 调控细胞周期<sup>[29]</sup>, 这种调控对 ACE2 细胞的定位和酵母生长过程中的细胞分离十分重要<sup>[4]</sup>。Wakade 等<sup>[30]</sup>研究发现, 在酵母生长阶段, CBK1 可以磷酸化调节多个基因来影响酵母的生长分裂, 例如, CBK1 通过磷酸化 SSD1, 影响酵母细胞壁的合成, 进而影响细胞的有丝分裂。

因此 *CBK1* 基因和酵母的生长繁殖与细胞壁功能有着密切的联系, 而细胞壁对于酵母响应低温胁迫有关键作用<sup>[31]</sup>, *ARD1* 在低温条件下可能通过与 *CBK1* 相互作用来参与酵母细胞的分裂过程, 影响细胞壁完整性, 从而调控酵母低温耐受能

力。本研究结果对深入研究 *ARD1* 基因调控酿酒酵母低温耐受的分子机制具有重要意义。



(b) 蛋白样品免疫共沉淀试验结果图

### 参 考 文 献

- [1] 刘文玉. 酿酒酵母低温耐受机制的研究进展[J]. 酿酒, 2017, 44(5): 11-12.  
LIU W Y. Advances in research on the mechanism of low temperature tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Liquor Making, 2017, 44(5): 11-12.
- [2] I CÓRCOLESSÁEZ, BALLESTERTOMAS L, TORRERUIZ M, et al. Low temperature highlights the functional role of the cell wall integrity pathway in the regulation of growth in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biochemical Journal, 2012, 446(3): 477-488.
- [3] 房楠楠, 崔旋旋, 张乐宏, 等. 控温氧化作用对加强型葡萄酒理化指标的影响[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2019(6): 34-38.  
FANG N N, CUI X X, ZHANG L H, et al. Effects of temperature-controlled oxidation on the quality of fortified wine[J]. Sino-Overseas Grapevine & Wine, 2019(6): 34-38.
- [4] MOLINA A M, SWIEGERS J H, VARELA C, et al. Influence of wine fermentation temperature on the

- synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 77(3): 675–687.
- [5] TORIJA M J, BELTRAN G, NOVO M, et al. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 85(1/2): 127–136.
- [6] ESTÉFANI G R, LUCÍA R A, GUILLAMÓN J M. Correlation between low temperature adaptation and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1199.
- [7] SALVADÓ Z, ARROYO-LÓPEZ F N, GUILLAMÓN J M, et al. Temperature adaptation markedly determines evolution within the genus *Saccharomyces*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(7): 2292–2302.
- [8] MATURANO Y P, MESTRE M V, ESTEVE-ZARZOSO B, et al. Yeast population dynamics during prefermentative cold soak of Cabernet Sauvignon and Malbec wines[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 199: 23–32.
- [9] MASSERA A, ASSOFF M, STURM M E, et al. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains to ferment red musts at low temperature[J]. Annals of Microbiology, 2012, 62(1): 367–380.
- [10] LUO L, KING N P, YEO J C, et al. Single-step protease cleavage elution for identification of protein-protein interactions from GST-Pull down and mass spectrometry[J]. Proteomics, 2014, 14(1): 19–23.
- [11] 俞然, 张春娅, 王树生, 等. 耐低温耐酒精白葡萄酒酵母的选育[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2003(4): 51–53.  
YU R, ZHANG C Y, WANG S S, et al. Breeding of low temperature and alcohol resistant white wine yeast[J]. Sino-Overseas Grapevine & Wine, 2003(4): 51–53.
- [12] MASSERA A, ASSOFF M, SARI S, et al. Effect of low temperature fermentation on the yeast-derived volatile aroma composition and sensory profile in Merlot wines[J]. LWT - Food Science and Technology, 2021, 142(14): 111069.
- [13] KANELLAKI M, BEKATOROU A, KOUTINAS A A. Low-temperature production of wine, beer, and distillates using cold-adapted yeasts[M]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013: 417–439.
- [14] VAN WYK N, GROSSMANN M, WENDLAND J, et al. The whiff of wine yeast innovation: strategies for enhancing aroma production by yeast during wine fermentation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(49): 13496–13505.
- [15] GARCÍA-RÍOS E, GUILLÉN A, DE LA CERDA R, et al. Improving the cryotolerance of wine yeast by interspecific hybridization in the genus *Saccharomyces*[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 9: 3232.
- [16] ORTIZ-TOVAR G, MINEBOIS R, BARRIO E, et al. Aroma production and fermentation performance of *S. cerevisiae* × *S. kudriawzevii* natural hybrids under cold oenological conditions[J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 297: 51–59.
- [17] CHIVA R, LOPEZ-MALO M, SALVADO Z, et al. Analysis of low temperature-induced genes (*LTIG*) in wine yeast during alcoholic fermentation[J]. FEMS Yeast Research, 2012, 12(7): 831–843.
- [18] DEED R C, FEDRIZZI B, GARDNER R C. *Saccharomyces cerevisiae* FLO1 gene demonstrates genetic linkage to increased fermentation rate at low temperatures[J]. G3-Genes Genomes Genetics, 2017, 7(3): 1039–1048.
- [19] GAUTSCHI M, JUST S, MUN A, et al. The yeast N $\alpha$ -Acetyltransferase NatA is quantitatively anchored to the ribosome and interacts with nascent polypeptides[J]. Molecular & Cellular Biology, 2003, 23(20): 7403–7414.
- [20] 冯莉. 本土酿酒酵母低温耐受性主效 QTL 的定位及克隆鉴定[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.  
FENG L. Mapping and validating of major QTLs associated with low-temperature tolerance in native strains of *Saccharomyces cerevisiae* [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2019.
- [21] LEE F J, LIN L W, SMITH J A. N alpha acetylation is required for normal growth and mating of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Bacteriology, 1989, 171(11): 5795–5802.
- [22] PARK E C, SZOSTAK J W. ARD1 and NAT1 proteins form a complex that has n-terminal acetyltransferase activity[J]. The EMBO journal, 1992, 11(6): 2087–2093.
- [23] AKSNES H, REE R, ARNESEN T. Co-translation-



- al, post-translational, and non-catalytic roles of N-terminal acetyltransferases[J]. *Molecular Cell*, 2019, 73(6): 1097-1114.
- [24] SEO J H, CHA J H, PARK J H, et al. Arrest defective 1 autoacetylation is a critical step in its ability to stimulate cancer cell proliferation[J]. *Cancer Research*, 2010, 70(11): 4422.
- [25] LIM J H, CHUN Y S, PARK J W. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  obstructs a wnt signaling pathway by inhibiting the *hARD1*-mediated activation of  $\beta$ -catenin[J]. *Cancer Research*, 2008, 68(13): 5177-5184.
- [26] SEO J H, PARK J, LEE E J, et al. *ARD1*-mediated Hsp70 acetylation balances stress-induced protein refolding and degradation[J]. *Nature Communications*, 2016, 7(1): 12882.
- [27] WHITEWAY M, SZOSTAK J W. The *ARD1* gene of yeast functions in the switch between the mitotic cell cycle and alternative developmental pathways[J]. *Cell*, 1985, 43(2): 483-492.
- [28] BRACE J, HSU J, WEISS E L. Mitotic exit control of the *Saccharomyces cerevisiae* Ndr/LATS kinase Cbk1 regulates daughter cell separation after cytokinesis[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2011, 31(4): 721-735.
- [29] 孟芙蓉, 侯占铭. *FolCbk1* 基因控制尖孢镰刀菌亚麻专化型营养生长和分生孢子发生[J]. *分子植物育种*, 2021: 1-14.
- MENG F R, HOU Z M. *FolCbk1* gene controls conidiogenesis and vegetative growth in *Fusarium oxysporum* f. sp. lini[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021: 1-14.
- [30] WAKADE R S, KRYSAN D J. The Cbk1-Ace2 axis guides *Candida albicans* from yeast to hyphae and back again [J]. *Current Genetics*, 2021, 67(3): 461-469.
- [31] LÓPEZ-MALO M, GARCÍA-RÍOS E, CHIVA R, et al. Functional analysis of lipid metabolism genes in wine yeasts during alcoholic fermentation at low temperature[J]. *Microbial Cell*, 2014, 1(11): 365-375.

### Response of *Saccharomyces cerevisiae* *ARD1* to Low Temperature Stress and Its Screening of Interacting Proteins

Fang Nannan, Du Qing, Song Yaoyao, Zhang Xue, Li Ying, Qin Yi, Song Yuyang, Liu Yanlin\*  
(College of Enology, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi)

**Abstract** Objective: Low-temperature fermentation (10-15 °C) has been recognized as a valuable tool to improve the varietal aroma and fermentation aroma of wine, which has a positive impact on improving wine quality. In order to improve the low-temperature tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* and identification analysis genes related to low-temperature tolerance. Methods: A low-temperature-tolerant native yeast (ZX11) was screened in our laboratory in previous study. In this study, ZX11  $\Delta$ ard1 and ARD1-ZX11  $\Delta$ ard1 mutant strains were constructed through gene knockout and overexpression techniques. By using techniques such as gene knockout and gene replenishment, mutant strains of ZX11  $\Delta$ ard1 and ARD1-ZX11  $\Delta$ ard1 were constructed to analyze their growth status at low and normal temperatures. To screen and validate the target protein of Ard1p, GST-Pull down, LC-MS/MS and yeast two hybrid was used. Result: The research results indicate that the *ARD1* gene plays a crucial role in the low temperature tolerance of ZX11. The Cbk1p protein encoded by *CBKI* is an interaction protein of Ard1p, and the interaction between Ard1p and Cbk1p was further verified *in vivo* and *in vitro*. Conclusion: This study laid a foundation of further research on the biological function of *ARD1* gene and the molecular regulation mechanism of low temperature tolerance of *S. cerevisiae*.

**Keywords** low temperature tolerance; GST-Pull down; yeast two-hybrid; interacting proteins