

# 酵母遗传学

陈士怡 徐洪基 著

科学出版社

## 内 容 简 介

本书分为酵母经典遗传学和分子遗传学两部分,系统地介绍了酵母的细胞学特性,生活史,酵母接合型和孢子形成的遗传,发酵与合成功能的遗传,抗性与耐受性遗传,酵母基因的克隆、表达和调控,酵母线粒体的分子遗传学基础,酵母的 DNA 质粒,以及酵母分子遗传学的基本实验技术,在生物工程的研究开发中有一定的理论与实用价值。

本书可供从事遗传学、分子生物学、细胞生物学和微生物学研究的科研人员、高等院校生物系师生和发酵工业的技术人员参考。

## 酵 母 遗 传 学

陈士怡 徐洪基 著

责任编辑 吴瑰琦

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

\*

1989 年 10 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

1989 年 10 月第一次印刷 印张:14 1/2

印数:0001—960 字数:335 000

ISBN 7-03-001100-7/Q·168

定价:14.70 元

# 目 录

绪论	(1)
第一节 酵母研究在理论和实际应用上的重要意义	(1)
第二节 酵母研究的历史和研究范围	(2)
参考文献	(5)
<b>第一编 酵母经典遗传学</b>	<b>(6)</b>
第一章 细胞学要点和生活周期	(6)
第一节 细胞学要点	(6)
第二节 生活周期	(10)
参考文献	(12)
第二章 经典的遗传分析方法	(13)
第一节 基本文献简介	(13)
第二节 培养基	(13)
第三节 孢子形成和分离	(15)
第四节 杂交	(16)
第五节 四分体分析与连锁判断	(17)
第六节 酿酒酵母遗传图	(20)
参考文献	(20)
第三章 接合型和孢子形成的遗传	(22)
第一节 细胞类型的控制	(22)
第二节 孢子形成过程的基本变化	(24)
第三节 孢子形成的遗传	(25)
参考文献	(26)
第四章 发酵和合成功能的遗传	(27)
第一节 营养需求和利用	(27)
第二节 麦芽糖发酵的遗传	(29)
第三节 蔗糖发酵的遗传	(30)
第四节 合成缺陷	(32)
第五节 酵母代谢调节与乙醇脱氢酶同工酶	(35)
参考文献	(37)
第五章 抗性和耐受性的遗传	(39)
第一节 抗性突变	(39)
第二节 耐高渗性状	(41)
第三节 耐乙醇性状	(43)
第四节 温度突变	(45)
参考文献	(48)
第六章 染色体外遗传	(50)

第一节	定义与解释	( 50 )
第二节	研究简史	( 50 )
第三节	酵母小菌落突变	( 52 )
第四节	线粒体及其细胞色素等的遗传分析	( 55 )
第五节	核质的协同作用	( 57 )
第六节	抗药性突变	( 59 )
	参考文献	( 61 )
<b>第二编</b>	<b>酵母的分子遗传学</b>	( 62 )
<b>第七章</b>	<b>酵母基因克隆系统</b>	( 64 )
第一节	酵母原生质体的制备、融合和回复	( 64 )
第二节	酵母基因的克隆载体	( 65 )
第三节	酵母细胞的转化	( 70 )
第四节	酵母结构基因的分离和鉴定	( 76 )
第五节	基因替换: 把体外致突的基因再引入酵母基因组	( 85 )
第六节	小结	( 87 )
	参考文献	( 88 )
<b>第八章</b>	<b>酵母染色体: 结构和功能</b>	( 89 )
第一节	酵母染色体的一般结构	( 89 )
第二节	和染色体行为控制有关的遗传成分	( 91 )
第三节	染色体的复制	( 99 )
第四节	小结	( 107 )
	参考文献	( 108 )
<b>第九章</b>	<b>酵母基因表达的调控</b>	( 109 )
第一节	研究酵母基因表达调控的方法	( 109 )
第二节	酵母基因表达调控的典型事例	( 111 )
第三节	酵母基因表达的转录调控	( 118 )
第四节	酵母 mRNA 的拼接	( 122 )
第五节	利用酵母 ADC1 启动子表达外源基因	( 124 )
第六节	小结	( 129 )
	参考文献	( 130 )
<b>第十章</b>	<b>酵母放毒菌株 (killer strains) 的类病毒颗粒</b>	( 131 )
第一节	概述	( 131 )
第二节	类病毒颗粒	( 132 )
第三节	类病毒基因组	( 135 )
第四节	类病毒在细胞内的维持	( 140 )
第五节	小结	( 144 )
	参考文献	( 145 )
<b>第十一章</b>	<b>酵母线粒体的分子遗传学</b>	( 147 )
第一节	酵母线粒体基因组	( 147 )
第二节	酵母线粒体的转录	( 170 )
第三节	酵母线粒体的蛋白质合成	( 173 )
第四节	酵母线粒体 DNA 的复制	( 175 )

第五节 核和线粒体在遗传上的相互作用·····	(177)
第六节 小结·····	(180)
参考文献·····	(182)
第十二章 酵母的 DNA 质粒·····	(184)
第一节 $2\mu$ 环质粒的结构和功能·····	(184)
第二节 $2\mu$ 环杂合质粒载体·····	(190)
第三节 其他 DNA 质粒·····	(200)
第四节 小结·····	(202)
参考文献·····	(203)
第十三章 酵母遗传学展望·····	(204)
第一节 酵母: 真核生物蛋白质的细胞工厂·····	(204)
第二节 基因治疗和酵母遗传学·····	(207)
第三节 酵母有助于癌症研究·····	(208)
第四节 工业酵母的遗传改良·····	(210)
第五节 小结·····	(211)
参考文献·····	(211)
附录 酵母分子遗传学实验基础·····	(212)
一、酵母的培养基·····	(212)
二、酵母核 DNA 的制备·····	(215)
三、酵母质粒 DNA 的纯化·····	(217)
四、酵母质粒的检测·····	(219)
五、酵母原生质体的转化·····	(220)
六、用醋酸锂方法转化完整的酵母细胞·····	(222)
七、细胞质转导·····	(223)
参考文献·····	(226)

## 绪 论

据《辞源》1924年第15版：“酵母为诱起物体发酵之物。”又见该书1983年修订本：“酵母，真菌的一种。酵母所引起的变化为发酵。”前后版本虽陈述略异，却都道出了酵母这种生物的主要特征，即能发酵。所谓发酵是指酵母能使糖类转变为乙醇和二氧化碳的作用或现象。二氧化碳是气体，要外逸，所以，它能使湿面团起泡泡而体积膨大；在发酵醪中外逸的二氧化碳使发酵液出现如“鱼眼汤沸”（跑出如鱼眼大小的气泡，好像汤煮沸了）的样子。在外文中酵母一词含义与此类似。英语 yeast 来源于希腊文 *zestos*，意为煮沸，即酵母使发酵醪起泡如煮沸的样子，法语酵母叫 *levure*，来自拉丁语 *levcre*（举起），即酵母使湿面膨起。在荷兰语中酵母叫 *gist*，意为起泡沫。现代德语酵母叫 *Hefe*，意亦为举起（*heben*）。

生物学家，特别是遗传学家把酿造工业家感兴趣的与酵母相类似的真菌，通称酵母，它们大多属子囊菌纲，都以单细胞为主要的存在形态，营养繁殖一般都是出芽生殖。根据 N. T. W. Kreger-Ven Rij 统计，类似酵母的真菌有 39 属，约 350 种，但其中遗传学研究最多的是酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。

### 第一节 酵母研究在理论和实际应用上的重要意义

酵母虽然很像原核生物，既具有单细胞、易培养和繁殖快等一般优点，又具有可以作为分子克隆载体的宿主的特殊优点。可是酵母是典型的真核生物，它具有真核生物所特有的下述生物学特征：

1) 酵母的遗传物质主要位于核内的染色体上，具染色质形态，每一染色体有一着丝粒(中心粒 CEN)和两个端粒(TEL)，以及若干个复制原点(自主复制顺序 ARS)。

2) 酵母细胞具有典型的有丝分裂和减数分裂行为，有真核生物所特有的转录和转译过程，有三种 RNA 多聚酶，mRNA 的 5'-端有甲基化核苷酸的“帽子”，有多聚(A)的 3'-端尾巴，成熟的 mRNA 要从初级转录物经拼接后形成。没有操纵子体系，转录总是从 AUG 密码子开始。

3) 酵母确实含有真核生物的蛋白质，如组蛋白、肌动蛋白、微管蛋白及多肽激素等。还有由大分子装配起来的只有真核生物才有的细胞器，如核膜、线粒体、80S 核糖体、粗糙内质网、高尔基体和溶酶体。

4) 酵母细胞在适当的培养条件下，其中的二倍体细胞进行减数分裂，产生 4 个单倍体的子囊孢子，其有相互对立的交配型，即 2(+)和 2(-)。这样不同交配型的单倍体孢子，通过融合形成二倍体的合子，犹如高等的有性生殖。单倍体和二倍体细胞，在适当的培养条件下都能进行营养繁殖——出芽生殖，形成细胞培养株，它们的核型和其他特性可以世代保持不变。

因此,酵母细胞很适合作实验材料,用于研究真核生物分子生物学中的一些根本问题,如:

- 1) 基因表达和 DNA 复制、突变、重组、转座、转录后加工。
- 2) 有丝分裂和减数分裂中染色体的分离及染色质的结构。
- 3) 细胞的分泌、细胞周期、细胞类型的控制。

这些就是酵母研究具有十分重要的理论意义之所在。

联系实际来说,酵母对人类的生活和社会经济建设更为重要。只要回顾一下现代文明的历史和展望新技术革命的来临,就可以看出酵母的应用研究与基础研究的重要意义了。

第一,酵母自古以来就是酿造行业利用的重要微生物,饮料酒类的生产,就是广泛利用含糖植物,把种子或果实的抽提物通过酵母的发酵作用酿成美味可口的各种酒类:如绍兴酒、啤酒和各种果酒;又如蒸馏酒类,如茅台、大曲、西凤等。还有工业和医用的乙醇,也是酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 进行厌氧发酵的产物。虽然过去曾经通过合成方法,代替酵母发酵法来生产乙醇;可是不久又回到利用植物这样的再生资源通过酵母发酵获得乙醇,因为这样更合算。但是如何提高发酵率,提高乙醇的产量和质量,在生产过程中如何能节约能源等,这就牵连到酵母细胞的一系列的性质和功能问题。

第二,烘烤面包或发酵食物的生产,是现代工业微生物应用的一个重要方面,而面包是许多国家居民的一种主要食物。我国当前很多人虽以米饭为主食,可是面包所占比重将不断增大。虽然可以用发酵粉(如小苏打)去发面团,但由此所制成的面包味道和营养价值远远不及酵母发酵的好。酿酒酵母发面比其他酵母更具特色,因为它是兼性厌氧微生物,除在无氧条件下能将糖转变为等分子的乙醇和二氧化碳外,也能够在有氧条件下将糖转变为等分子的二氧化碳和水,这就是早在 1879 年巴斯德所发现的酿酒酵母在乙醇发酵中的“巴斯德效应”。在生产发酵食物方面也存在着如何提高发酵率、菌株稳定性和压榨酵母的活力,提高柜窗寿命即提高菌株的存活力等问题。如何提高发酵食物的香味(目前尚一无所知),这也牵涉到酵母细胞的一系列问题。

第三,为增加和改善蛋白质食物的来源,生产大量的单细胞蛋白质 (single cell protein, SCP),既可作为畜、禽、鱼的饲料,也可供人类直接食用。酿酒酵母是实现这一目的的最理想、最合适的材料,因为它无毒,易培养,繁殖快,营养价值高。为此需要筛选生长最快的酵母,以便在同样时间内获得更大的产量。要筛选和培育这样的菌株和不断改善培养技术,就牵连到酵母细胞的生长发育问题。单细胞蛋白质的生产在即将到来的新技术革命中是十分重要的,不仅要搞新的单细胞蛋白质,还要研究如何综合利用传统发酵工业的废料废水,一方面减少环境污染,另一方面创造更多的财富。

## 第二节 酵母研究的历史和研究范围

作曲制酒可能是我国祖先在应用微生物方面的最早的例证。而我们认识酵母的过程,与酿酒的发展有着密切的关系。据古籍记载,我国酿酒的起源,归纳起来有三种不同的说法:

- 1) 黄帝与岐伯讨论过醪醴(《黄帝内经》)。

2) 夏禹时仪狄作酒(《战国策》“魏策·世本”)。

3) 杜康作酒(《世本注》;《说文》;《博物志》)。

三者虽有不同,但结合出土文物的研究,如出土陶器有龙山文化时期(即夏禹时期,公元前 2033—前 1562 年)盛酒的樽,冲酒的盃,煮酒的甗等酒器,故可推知我国制酒始盛于新石器时代的后期。就是说,黄帝时代正如《淮南子》所说的“清醑之美,始于耒耜”,有了农业,有了谷物,酿酒就逐渐兴起了,而且涌现出制酒能人。到夏禹时代农业进一步发展,谷物更多了,酿酒也就开始兴盛了。仪狄很可能是酿酒能人中的佼佼者,故帝女叫他作酒醴。夏之后是商代(公元前 1562—前 1066 年),谷物酿酒更趋兴盛了,从殷墟发掘出许多铜制的、陶制的酒器,在郑州二里岗发现了商代的酿酒工场遗址,都可以说明这一点。酒字于甲骨文里累见不鲜,这也是明证。

杜康大概也是一个酿酒能人,古籍多处说他会作酒。他究竟是哪个时代的人还不清楚,有的说他是汉代人,也有的说他是黄帝时代的人,但这无妨于酿酒始于黄帝时代,而始盛于夏禹时代的观点。

从 Thebes 古城遗址的一庄园中发掘出来的很精致的面包房和啤酒厂的模型,据考证为公元前 2000 年的东西,可见西方造酒的历史也是渊远流长。

在长期的酿酒实践中,人们逐渐认识了两件事。一是蘖与曲是制酒所必需的,所以《术经》里说:“若作酒醴,尔维曲蘖。”蘖,芽米也,用以制醴(甜酒)。曲的发明,可能始于周代。曲亦称酒母,是制酒用的发酵物。二是发酵,即前面所述的能使湿面起泡而膨起,或能使发酵液出现如“鱼眼汤沸”的现象。对这两件事的认识,是人类认识酵母的开端,是形成酵母概念的第一阶段,这个阶段至少延续了 3 500 多年。在这漫长的时间里,人类能制酒,爱饮酒,可是不知道是什么东西能使谷物变成酒,更不知是怎样变的。故在东汉时的《说文》中没有“酵”字,而只有“醪”字,训为酒母。这清楚地说明东汉以前还没有酵母这个词。

1680 年荷兰人列文虎克 (Antonie van Leeuwenhoek) 向伦敦皇家学会提出的报告中,对他在自制的显微镜下从一滴正在发酵的啤酒中所看见的东西,进行了描述和绘图,这是人类第一次看见酵母。可惜列文虎克对这个发现的意义缺乏认识,其他人也没有重视这个报告,因此对酵母的进一步认识差不多后延了约 150 年。虽然如此,他的发现还不失为人类认识酵母的第二阶段,即真正的感性认识阶段的良好开端。

到 1835 年法国的 Cagniard-Latour, 1837 德国的 Th. Schwann 和 F. Kützing 先后对发酵提出生机论 (vitalistic theory of fermentation)。1837 年 Cagniard-Latour 揭示酿酒酵母呈圆球形,能繁殖,属植物界,并认为乙醇发酵是酵母细胞的生理功能。这种观点得到 Th. Schwann 的支持,并且还把酵母叫做“糖菌”(Zuckerpilz),因此,后来把 *Saccharomyces* 作为酵母属的属名。生机论者认为如把酵母引进含糖溶液,它们就利用糖作为食料,而把未被利用的糖转变为乙醇和二氧化碳。此观点遭到当时的著名化学家 J. Liebig, F. Wohler 和 J. Berzelius 的强烈反对;他们认为乙醇发酵可用化学反应去解释,没有必要引入活细胞的概念。

巴斯德 (L. Pasteur) 对葡萄酒和啤酒进行了十多年的深入研究,使发酵的生机论取得了胜利。1866 年他发表了《葡萄酒研究》(Études sur le Vin), 1876 年发表了《啤酒研究》(Études sur la Bière)。他证明发酵过程是微生物活动的结果,是不需要空气的生命



现象,所以发酵也是生命过程。

酿造业的发展和巴斯德的工作,推动了酵母的形态、分类和生理生化的研究,人类对酵母的认识发展到了第三阶段,即全面深入认识阶段。

A. Jørgensen 对酵母的发酵做了很有意义的工作,1886年发表了《发酵工业的微生物》(Die Mikroorganismen der Gärungsindustrie, 1948年英译本问世,书名为 *Microorganisms and Fermentation*)。

E. C. Hansen 完善了巴斯德的分离纯种技术,深入研究了酵母的形态、分类,于1896年提出了第一个全面的酵母分类体系。

1897年 E. Buchner 偶然发现酵母发酵的另一性质,即破碎了的酵母细胞的悬浮液,或者从酵母制备的无细胞酶制备液也能把糖发酵为乙醇和二氧化碳。这一事实为深入研究酵母发酵对糖的中间代谢过程提供了新的事实,吸引着许多生物化学家,包括 Embden, Meyerhof, Parnas, Harden 和 Young 等参加了这些研究。

在 Hansen 工作的基础上,法国 A. Guilliermond 进一步研究酵母细胞的生理、生殖和系统演化关系,1912年发表了《酵母》(其英译本1920年出版),1928年发表了《酵母鉴定检索》。

此后在荷兰微生物学家 A. J. Kluyver 的直接指导和影响下,荷兰 Delft 的技术大学从1931年到1970年,出版了五部有关酵母形态、分类方面的专著,即《产孢酵母》(Stelling-Dekker, 1931),《非产孢酵母》(上下册)(J. Lodder 1934; H. A. Diddens 和 J. Lodder, 1942)、《全面的酵母分类》(Lodder 和 N. I. W. Kreger-van Rij, 1952)和《酵母的分类研究》(Lodder 主编,1970)。在此期间,1951年美国农业部出版了 L. J. Wick-erham 的《酵母分类学》。在上面提到的 Lodder 和 Keger-van Rij 1952年的专著中,评定了1317个酵母菌株,归属于165个种17个变种,到1970年 Lodder 主编的专著中已增到341个种。四年后据 Barnett 和 Pankhurst (1974)的《酵母鉴定检索表》中的统计,基于生化性质酵母又增添了93个种。目前据估计可能已增到500个种,归属于50个属了。

至于在酵母的生物学、化学、遗传学等方面,也出了几本好书,如《酵母生物学引论》(M. Ingram, 1955)、《酵母的化学和生物学》(A. H. Cook 主编,1958)、《酵母细胞的细胞学和遗传学》(C. C. Lindegran, 1949)、《酵母的生物学和活动》(F. A. Skimer等,1980),以及全面论述酵母的巨著《酵母》(1—3卷)(A.H. Rose 和 J.I. Harrison,1969)等,都是这个阶段对酵母深入认识的结果。

自70年代中期开始,把原核细胞中的克隆和转化技术应用于酵母细胞,使人们能从分子水平深入探索真核生物的生物学上的许多根本问题,这是人类认识酵母的第四阶段或分子生物学阶段。这个阶段已发表的著作有《酿酒酵母的分子生物学——生活史和遗传》(J. N. Strathern 等,1981)、《酿酒酵母的分子生物学——代谢和基因表达》(J. N. Strathern 等,1982)、《酵母的分子遗传学》(D. Von Wettstein, 1981)和《基础和应用的酵母遗传学》(J. F. Spencer, 1983)。近年来从事酵母研究的工作人员迅速增加,几乎每三年增一倍,工作越做越深,发展前途末可限量。

本书包括酵母经典遗传学和分子遗传学。第一编为经典遗传学部分,比较系统地论述酵母的细胞学要点和生活周期,经典的遗传分析方法,接合型和孢子形成的遗传,发酵

和合成功能的遗传,抗性和耐受性遗传,以及染色体外遗传。第二编为酵母分子遗传学,以 DNA 转化和酵母基因克隆技术的应用为基础,论述酵母分子遗传学的基本理论,包括这个学科的最新研究成果和研究方向。书末附录着重介绍酵母分子遗传学的基本实验技术。全书论述尽可能作到理论与应用相结合。

### 参 考 文 献

许 慎(东汉),《说文解字》。

贾思勰(北魏),《齐民要术》。

张 华(晋),《博物志》。

罗明典,1979,制曲酿酒由来和发展,《生物史》第五分册,科学出版社。

陈驹声,1979,《中国微生物工业发展史》,轻工出版社。

Cook, A. H., ed., 1958, *The Chemistry and Biology of Yeast*. Academic Press, New York.

Rose, A. H. and Harrison, J. S. ed., 1969, *The Yeast* vol, 1. Academic Press, London and New York.

Rose, A. H., 1979, Recent Research on Industrially Important Strains of *S. cerevisiae*. In "Biology and Activities of Yeast", edited by Skinner, F. A *et al.*, Academic Press, New York and London.

# 第一编 酵母经典遗传学

## 第一章 细胞学要点和生活周期

### 第一节 细胞学要点

如绪论中已经提到的,酵母早在 100 多年前就已开始被认识,而且从事酵母细胞研究的人很多。可是直到 50 年代早中期,对酵母细胞,特别是细胞核和染色体的认识和理解,在细胞学家之间看法分歧很大。其所以如此,主要原因是酵母细胞核很小,经过染色的静止核的直径只有  $0.5-1.5\mu\text{m}$ , 因此不容易阐明核的结构。至于酵母细胞的其他亚细胞结构,大多是近代进行研究的,在认识上比较深入和一致。现在把 60 年代以后到最近对酵母细胞的研究所得,择其比较一致的看法,按细胞形态概貌、细胞壁、细胞膜、细胞核、线粒体以及其他细胞质的结构的先后顺序,予以扼要的论述。

#### 1. 细胞形态概貌

酿酒酵母细胞呈球形、卵形或椭圆形,约  $2.5-10\mu\text{m}$  宽,  $4.5-21\mu\text{m}$  长。在光学显微镜下,未染过色的细胞即使细胞质中有可见的内含物也看不清详细结构,液泡、颗粒与细胞核难以区别。虽然用特殊的染色方法可以看到一些结构,但是只有在电镜下,一个清晰的酵母细胞才能呈现出来[图 1-1(a)和(b)]。图 1-1(a)是酿酒酵母的静止细胞的图解;图 1-1(b)是典型酵母细胞的切片。典型的酵母细胞外面围着一层厚的细胞壁,其内为细胞质膜、细胞核、线粒体、内质网、液泡、空泡和颗粒,下面将分别简要论述它们的结构和功能。

在生长着的酵母细胞群体中,很明显的一个特点是要分裂的细胞长出芽。芽是一个子细胞的开端,在细胞周期中,芽逐渐长大,直到与母细胞同样大小。在细胞分裂后,子、母细胞立即分开;然而,当细胞分开以前,新一轮细胞分裂已经开始,结果形成连在一起的一群细胞。细胞分开时在母细胞上留下一芽痕(budding scar),在子细胞上也留下一疤痕,称为生痕(birth scar)。芽痕和生痕在光学显微镜下不易看到;如用荧光染料(如 Calcafluor 或 Primulin)染色,在荧光显微镜下可以看到。芽痕和生痕也可在扫描电镜下看到。在酿酒酵母中,细胞壁的同一位点上不会同时长着两个疤痕,所以在母细胞的细胞壁上每长一芽就留下一芽痕。故可借芽痕的数目来决定一特定细胞曾长过几个芽,从而推知这细胞的年龄。在一酵母群体中,50%的细胞是由最后一次细胞分裂所产生的,所以这些细胞各具有一个生痕,却都没有芽痕。在其余的 50%细胞中,25%有一个芽痕,12.5%有两个芽痕,其余 12.5%有两个以上芽痕。

有些酵母菌株,在液体培养基中生长时,常凝聚成团,沉到容器的底部,这种现象称絮凝或凝聚(flocculation),在啤酒工业中是酵母的一个相当重要的性状。

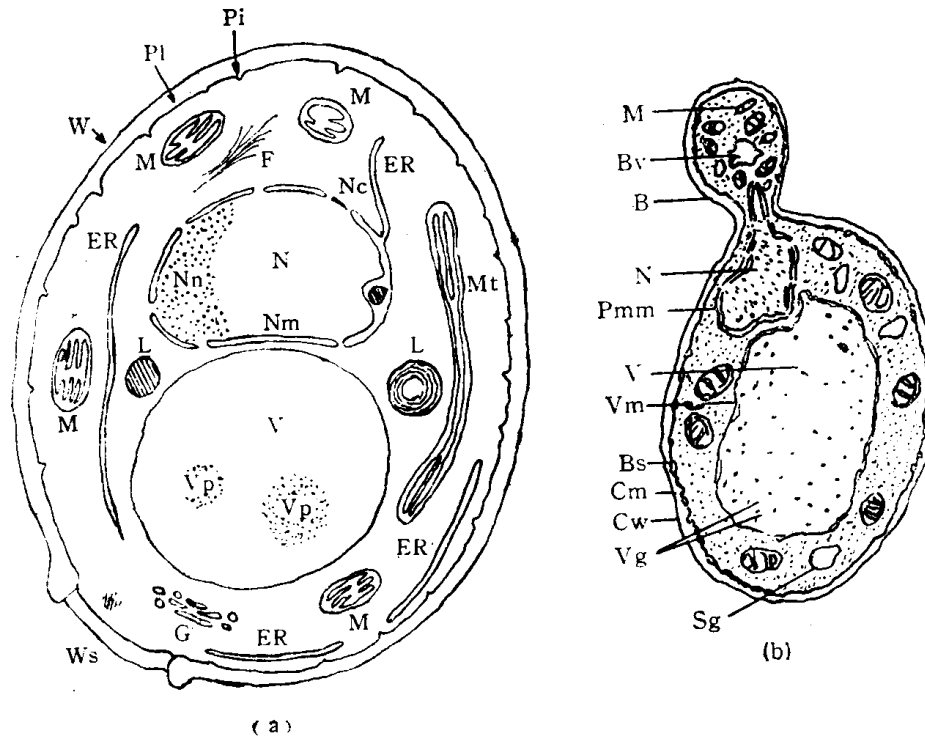


图 1-1

(a) 酿酒酵母静止细胞图解。ER, 内质网; F, 纤丝; G, 高尔基体; L, 脂质颗粒或圆球体; M, 线粒体; Mt, 线状线粒体; N, 核; Nc, 中心斑或纺锤斑; Nm, 核膜; Nn, 核仁; Pi, 内陷; Pl, 质膜; V, 液泡; Vp, 多偏磷酸颗粒; W, 细胞壁; Ws, 芽痕。(b) 典型酵母细胞的切片示细胞的主要结构及其分布, M, 线粒体; Bv, 芽液泡; B, 芽; N, 核; Pmm, 核膜孔; V, 液泡; Vm, 液泡膜; Bs, 芽痕; Cm, 细胞膜; Cw, 细胞壁; Vg, 液泡颗粒; Sg, 储存颗粒 (Rose 等, 1969; Berry, 1982)。

## 2. 细胞壁

细胞壁是一坚实的结构, 25nm 厚, 约为细胞干重的 25%。化学分析表明, 细胞壁的主要组分是葡聚糖和甘露聚糖, 并含几丁质和蛋白质。葡聚糖是复杂的有分枝的葡萄糖多聚体。它位于酵母细胞壁的最内层, 与细胞质膜紧相邻接。它是细胞壁的主要成分, 因为如果去掉葡聚糖, 细胞壁就会崩溃。甘露聚糖是甘露糖的复杂的多聚体, 主要构成细胞壁的最外层。因为去掉甘露聚糖之后, 并不影响细胞壁的构造与形状, 所以它不是细胞壁的主要组分。细胞壁的第三个碳水化合物的组分是几丁质, 它是 N-乙酰葡糖胺多聚物。在酿酒酵母中几丁质的存在和芽痕有关。以适当的水解酶处理细胞壁, 分离芽痕, 表明几丁质排成一环围绕芽痕。细胞壁干重的 10% 是蛋白质。这些蛋白质中至少部分是附着在细胞壁上的各种酶。在酵母中附在细胞壁上的酶有: 葡聚糖酶、甘露聚糖酶、蔗糖酶、碱性磷酸酶和脂酶等。葡聚糖酶和甘露聚糖酶可能在出芽时用来软化细胞壁。其中有些酶, 如蔗糖酶是甘露糖蛋白, 其中甘露聚糖占整个酶分子的 5%。至于细胞壁上许多其他蛋白质, 也和甘露聚糖结合在一起, 所以蛋白质在细胞壁中可能起结构的作用比酶的作用更主要。目前对细胞壁的结构虽然还不完全明白, 但当前时兴的学说倾向于三层结构的概念, 即内层为葡聚糖, 外层是甘露聚糖, 中间为一层富含蛋白质的结构所隔开。

### 3. 细胞膜

酵母细胞的细胞膜或质膜 (plasmalemma), 通过电镜观察发现它由三层结构组成, 与细胞壁的内层紧密联系着。一般表面平滑, 但在细胞的某些生长期常可看到内陷 (invagination)。要研究质膜的化学组成, 首先需要分离纯净的质膜。一种制备方法是用蜗牛酶处理酵母细胞, 去掉细胞壁, 取得原生质体。在等渗蔗糖溶液中原生质体保持完好; 如移至低渗溶液中, 原生质体破裂。各种不同的细胞器包括质膜在内, 可用离心技术分别从这样的溶胞产物中分离取得。或者以机械手段破碎细胞, 洗去细胞的内含物, 质膜和细胞壁仍结合在一起, 然后以蜗牛酶处理去掉细胞壁, 即得纯净质膜。

质膜由差不多等量的脂质和蛋白质结合少量的碳水化合物组成。主要的脂质是甘油单酯、甘油二酯、甘油三酯、甘油磷酸和固醇, 如麦角固醇和酵母固醇 (zymosterol)。质膜中的蛋白质的性质还不清楚, 大概包括与细胞吸收糖和氨基酸有关的酶。质膜的结构模式是由脂双层和嵌入其中的蛋白质组成的单位膜。脂质是两性 (amphipathic) 分子, 即每分子包括两个区: 一区疏水, 而另一区亲水。亲水区位于膜的外表, 疏水区位于膜的内壁。蛋白质可以位于膜的表面或嵌入膜中。

质膜是细胞中的主要细胞器, 围绕着细胞的内含物起着渗透性屏障的作用, 控制着溶质进出细胞的运输。在酵母里, 确凿的事实证明质膜和细胞壁的生物合成有关。在酿酒酵母中很奇怪, 生长在严格的厌氧条件下的细胞不能合成不饱和脂肪酸和固醇类, 所以要使细胞继续生长, 就必须补加这些物质到培养基中去。因为供给的脂肪酸和固醇被摄入到细胞里去, 如果喂饲不同的脂肪酸和固醇, 就有可能影响质膜的化学组成。应用这个技术, 曾证明膜的脂质组成改变, 可影响细胞的渗透压性质、温度敏感性和溶质渗入的性质。

### 4. 细胞核

用相差显微镜可观察到核位于液泡和芽之间。用特殊染料如酸性复红或姬姆萨染色后可以看到染色质物质。然而, 由于酵母的个别染色体非常小, 与大肠杆菌的大小差不多, 不论在光学显微镜下或在电子显微镜下都是不可识别的微小结构, 因而关于酵母核的知识是有限的。在整个细胞周期中, 核膜保持完整, 在电镜下可见是双层膜, 按一定间隔分布着许多小孔。有一种与核膜结合在一起的结构叫做中心斑 (centriolar plaque) 或纺锤斑 (spindle plaque), 其功能和动物的中心粒相似。它是一多层盘状结构, 微管从此伸向核和细胞质。中心斑被认为是酵母细胞核的纺锤丝体系, 在不同的阶段控制着核分裂。静止核只有单一中心斑; 当细胞开始出芽, 出现二个中心斑, 随着核分裂的进展形成纺锤丝体系 (图1-2) (B. L. A. Carter, 1978)。

### 5. 线粒体

在好氧条件下生长的酵母的线粒体在电镜下很容易看到, 呈球形或棒状, 由双层膜围绕。它们具有由内膜折叠而成的嵴。对酵母线粒体的结构, 线粒体酶在线粒体膜和基质上的分布, 研究工作开展得很广泛。大多数三羧酸循环中的酶存在于线粒体的基质中, 至于参与电子传递和氧化磷酸化过程的酶则结合在包括嵴在内的内膜上。

过去一度认为厌氧生长或代谢抑制的酵母中, 线粒体是不存在的; 因为检测不出来,

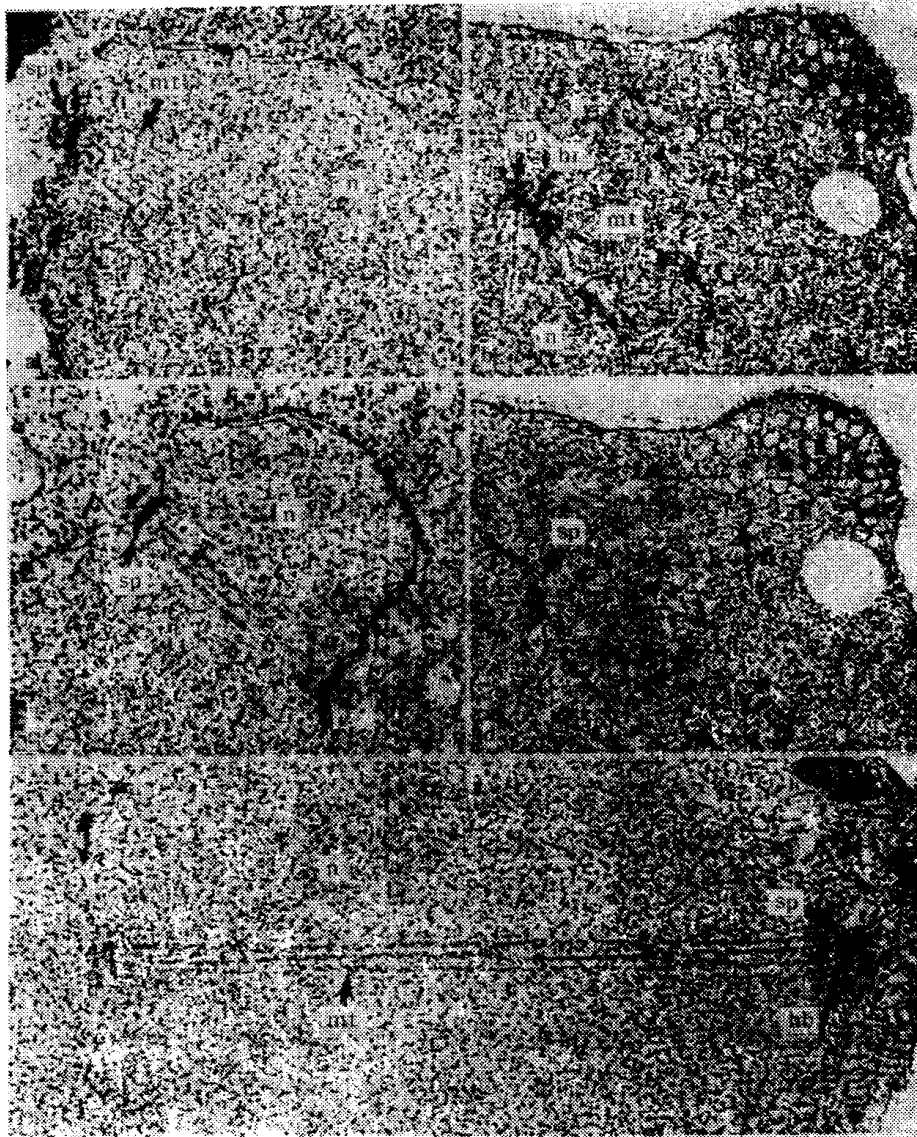


图 1-2 酿酒酵母单倍体细胞纺锤斑及有关结构的电镜图  
 在营养生长期固定。(a)纺锤斑在未出芽的细胞中( $\times 45\ 000$ )。(b)早期芽中的双斑,核外微管伸向多液泡的早期芽。(d)前图的三个连续切片后,示微管伸向芽(均 $\times 30\ 000$ )。(c)在二纺锤斑分开后,一芽细胞中的短而完整的纺锤丝( $\times 45\ 000$ )。(e)在一长着大芽的细胞中的长而完整的纺锤丝( $\times 36\ 000$ ) (引自 Carter, 1978)。

同时也因为这样的细胞缺乏通常与线粒体结合的许多酶。但是最近,利用冰冻蚀刻技术证明,过去认为线粒体不存在的结论是由于固定技术不当所造成的。厌氧生长的细胞在无外源脂质供应的条件下,只有很简单的线粒体,仅由外双层膜所组成,而缺乏嵴。培养基中加入脂质,例如油酸或麦角固醇,嵴就会长出来。线粒体的发育受培养基中缺氧、脂质的存在和葡萄糖水平的影响。所以与过去的概念相反,从厌氧到好氧培养的转变,使线粒体结构起了变化,而不是重新生长出线粒体 (Berry, 1982)。

## 6. 其他细胞质结构

主要是内质网和高尔基体、脂肪粒、液泡和空泡等。

酵母的细胞质中有一双层膜系统称为内质网。和其他细胞的一样,这些膜有的和核糖体相连,内质网还牵连到许多其他细胞活动。虽然内质网和其他细胞器的关系不清楚,

但是内质网、线粒体和细胞质膜的外膜是连续的。内质网也和细胞中存在的空泡的形成有关系,并表现出与其他生物体的高尔基体相似的特点。酵母是否有真正的高尔基体?虽然膜层的盘状结构曾经在酵母细胞中被观察到,但不能肯定其为高尔基体。

在细胞质中存在的脂质颗粒可能来自内质网。成熟的酵母细胞有一大的液泡;在细胞周期中芽刚形成的时候,液泡破裂为几个小一些的液泡,分布在母细胞和芽之间。在细胞周期稍后的时候,这些小的液泡又融合成单一的液泡,母细胞和子细胞各一。液泡的功能还不很清楚,一些事实表明它具有水解酶、多聚磷酸、脂质和低分子量的细胞中间产物以及金属离子。它可能作为营养物质和水解酶的储存库而存在。

酵母各种膜的组分的分离与鉴定的技术问题是值得重视的。空泡、液泡和其他细胞器都是很脆弱而易破碎的。从不同细胞器来的膜的碎片由于很难正确无误地把它们分离开来,所以对这些不同结构的功能关系的理解,自然是有一定的局限性的。

## 第二节 生活周期

对酵母所经历的发育和繁殖的全过程——它的生活史或生活周期的认识,主要围绕下列问题,即在酵母中是否存在性别和交配现象,是否有单倍期和双倍期交替世代,是一致的还是有差异,是同宗配合还是异宗配合而展开的。

在自然界,酵母常在甜而多汁的水果上出现,然后被带到土壤中去。大多数在土壤里生活的酵母一般不产生子囊孢子;而面包酵母、酿酒酵母、产酒酵母、乙醇发酵酵母等却都能产生子囊孢子。前面已经提到, E. C. Hansen 首先完善了分离单细胞的技术。他在 1891 年曾经观察到路德类酵母 (*Saccharomyces ludwigii*) 的子囊孢子在萌发时能够融合的现象,但是他仍然认为酵母是没有性别的,因为当时一般认为酵母完全是无性繁殖的。到 1895 年 Hansen 的助手 H. Schiönning 揭示了八孢裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces Octosporus*) 在形成子囊前须先经细胞交配 (copulation), 他认为这是酵母细胞的性别的表现。1900 年 C. Hoffmeister 证实了在酵母中 Schiönning 所揭示的细胞接合,并指出在核配以前需要质配。1901 年 B. T. P. Barker 和 A. Guilliermond 各自分别报道了酵母中核配的存在,接着其他学者也证实了这事实。对酵母单倍期和二倍期的交替世代的事实的认识和观点的建立,则拖延了相当长一段时间。其所以如此的主要原因是当时还不知道,有些酵母大量而显著的营养繁殖是在单倍期 (haplophase), 因而就叫做单倍体酵母;而另一些酵母则在二倍期 (diplophase), 因而叫做二倍体酵母。例如裂殖酵母属是单倍体酵母,而其二倍体只限于子囊时期。至于类酵母属 (*Saccharomyces*) 以及酵母属的一些种是二倍体酵母,而其单倍期只限于子囊孢子时期或由此萌发而形成的单倍体细胞。在这些二倍体酵母中,接合可在子囊孢子之间出现,也可在单倍体细胞及其衍生物之间或者在孢子与细胞间出现。在每种场合,由于细胞间接合伴随着细胞内核融合,营养二倍体世代从而开始。这些事实说明酵母中存在单倍期和二倍期的交替,惟其存在形式在不同的酵母中有所不同;而且有接合现象,因而性别分化可能存在。可是当时的酵母权威学者 A. Guilliermond 起初(1910)认为酵母细胞的核是无丝分裂的,后来(1928)他又相信大多数酵母细胞早已失去了性别的一切特性。虽然他对孢子形成涉及减数分裂(1928)的解释是对的,但他不理解有机体的生活周期中无丝分裂和有丝分裂可以并存,所

以未能得出明确的结论,这种对酵母生活周期不肯定的观点,也存在于 Stelling-Dekker 的巨著《产孢酵母》一书中。

直到 1935 年,Ö. Winge 才于椭圆酿酒酵母 (*S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*) 中证明单倍体细胞的融合以及单倍期和二倍期的存在。在子囊孢子(单倍体)的萌发过程中有的单倍体细胞融合成二倍体细胞。他把这样的单倍体细胞和二倍体细胞分离出来,并证明它们能分别成为进行营养繁殖的单孢的单倍期细胞株和单孢的二倍期细胞株 (Winge 和 Laustsen, 1937, 1939)。前者呈圆球形、较小,而后者呈卵圆形、较大。这些形态的差异在其他的种或变种中并不明显。接着他们又在 *S. ludwigii* 中证明了孟德尔式的 2:2 的分离 (Winge 和 Laustsen, 1939)。

1936 年 A. Guilliermond 讨论了类酵母属可能是异宗配合的。1939 年 Winge 和 Laustsen 证实了这个属里有一决定接合型的基因。而在酵母属中,四年后 Lindegren 和 Lindegren (1943) 利用单孢株细胞杂交证明接合型由一对基因  $a$  和  $\alpha$  所决定,二者在杂种的子囊孢子间作  $2a$  和  $2\alpha$  的分离。

以后不久就发现,经常用于遗传研究的酵母按其接合行为可分为两类。一类是异宗配合的酵母,具有不同接合型  $a$  和  $\alpha$  的单倍体的孢子和细胞。相对接合型的孢子或细胞的融合,产生二倍体细胞。另一类是同宗配合的酵母,其特点是从一单孢子来的单倍体细胞能够融合成为二倍体细胞,实际上是群体中的一部分细胞自发转化成相对接合型细胞,结果就能与原接合型细胞融合成为二倍体细胞。这个过程早期称为二倍化 (diplodization)。这两类酵母的孢子对孢子所成的二倍体细胞经减数分裂产生四分体,同宗对异宗呈 2:2 分离,即一对等位基因  $D/d$  决定二倍化 (Winge 和 Roberts, 1949),二倍化  $D$  基因以后被称为同宗或  $HO$  基因(详见第四章)。现将异宗配合与同宗配合的原则区别图解如下(图 1-3)(H. Roman, 1981)。

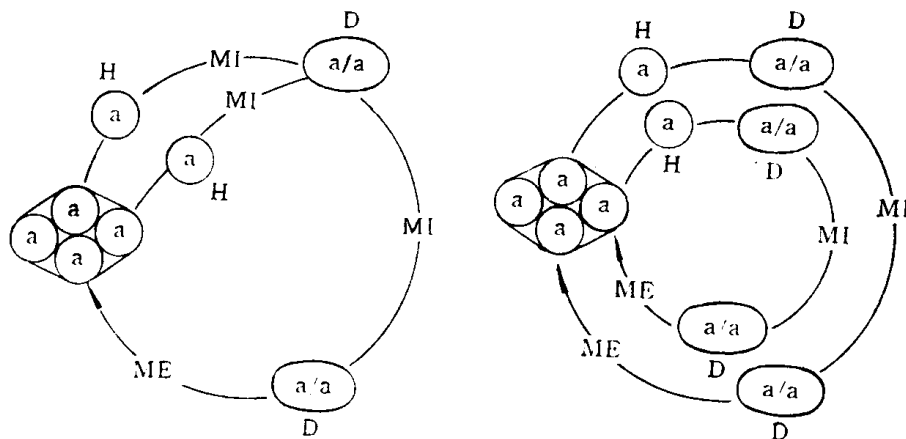


图 1-3 异宗配合和同宗配合的原则区别的图解

个体孢子从子囊解剖出来,在异宗配合中,单倍期(H)可通过有丝分裂(MI)而无限期地繁殖下去。当它们遇到相反的结合型细胞,就与之融合形成二倍期(D)细胞,后者也可通过有丝分裂无限期地存活下去,直等到条件适宜于进入减数分裂(ME)形成子囊,再产生单倍体的子囊孢子。在同宗配合中,单倍期细胞不稳定,在孢子萌发的早期细胞分裂时,有的细胞向相反接合型方向打开遗传开关,然后出现接合而成为二倍体细胞。二倍期是稳定的,以有丝分裂繁殖,如异宗配合。该二倍期可在任何时候引向减数分裂形成子囊。

最后以酿酒酵母为例,图解其生活周期如图 1-4 (Berry, 1982)。



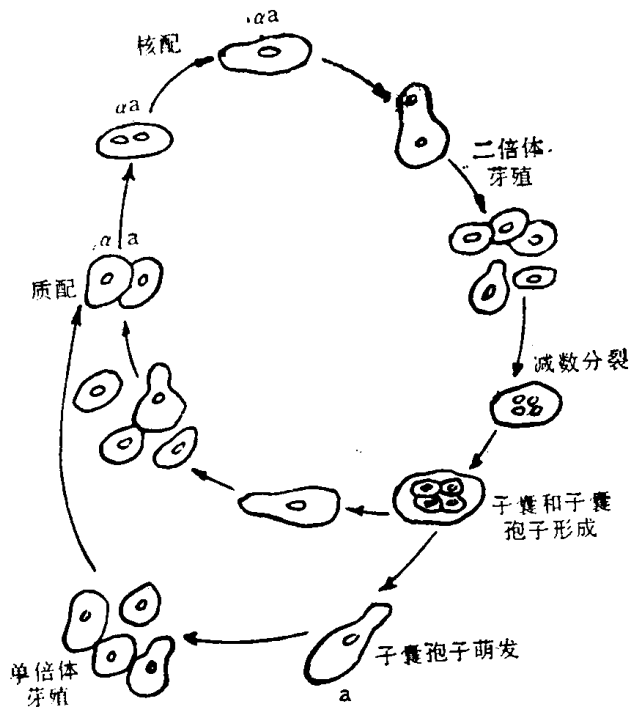


图 1-4 酵母的生活周期

### 参 考 文 献

- Berry, D. R., 1982, *Biology of Yeast*. Edward Arnold, London.
- Carter, B. L. A., 1978, *The Yeast Nucleus*, *Adv. Microb. Physiol.* 17, 243—302.
- Cook, A. H., 1958, *The Chemistry and Biology of Yeast*. Academic Press, New York.
- Roman, H., 1981, *Development of Yeast as an Experimental Organism*. In "The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*-Life Cycle and Inheritance" Strathern J. N. *et al.* (editors). Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Rose, A. H. and Harrison, J. S., 1969, *The Yeast* vol. 1. Academic Press, London and New York.