

LCB1 基因表达对酵母神经酰胺合成的影响^{*}

林会兰 周 全 陈国强^{**}

(清华大学生物科学与技术系 北京 100084)

摘 要 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)*LCB1*(Long chain base)基因被克隆到酵母诱导表达载体 pYES2 中,并转入到 FY2 中,用半乳糖诱导表达。与对照相比,质粒所含 *LCB1* 基因的表达,使酵母细胞干重略有下降,而神经酰胺的含量提高为对照的 1.9 倍。

关键词: 酿酒酵母, *LCB1* 基因, 神经酰胺, 表达

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2003)02-0189-05

神经酰胺是一种脂类物质,广泛存在于酵母^[1,2]、植物^[3,4]、哺乳动物^[1,5]等真核生物中。其结构可以分为两部分,一部分为长链基(Long chain base, LCB),一部分为脂肪酸(Fatty acid, FA),二者通过酰胺键连接。但细胞中游离态的神经酰胺比较少,主要作为细胞膜中鞘脂(Sphingolipid)的结构单元而存在。由于长链基和脂肪酸碳原子数目、不饱和键的数目及羟基化程度有差异,所以神经酰胺不是一种物质,而是结构和性质相似的一类物质。Robson 等曾对皮肤角质层的神经酰胺做过详细的研究,根据结构的不同而将它们分为 7 种^[6]。而酵母中的神经酰胺主要为含有 α 羟基 26 酸的植物神经酰胺(Cer V)^[2]。

越来越多的研究结果暗示,神经酰胺是一种脂类二级信使,在细胞应对各种外界刺激的过程中发挥重要作用^[7]。一些外界刺激如肿瘤坏死因子 α 、化疗试剂、热刺激等都能引起神经酰胺的积累。神经酰胺浓度的变化将导致细胞凋亡、细胞周期抑制和细胞衰老等一系列细胞反应^[8]。在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中,神经酰胺被认为参与了热休克响应、钙离子稳态平衡的调节、细胞周期的调控,以及某些膜蛋白的小泡运输^[1,2]。

酿酒酵母是基因组序列已知的简单真核生物,大部分与酵母神经酰胺代谢有关的基因已被克隆^[2]。其中 *LCB1* 编码丝氨酸棕榈酰转移酶(SPT)的一个亚基,该酶催化神经酰胺从头合成途径的第一步反应,被认为是调控神经酰胺合成的限速酶^[9]。本文将 *LCB1* 基因克隆到酿酒酵母表达载体中,并诱导表达,发现该基因的表达能提高酵母神经酰胺的产量。

1 材料和方法

1.1 菌种、质粒和培养基

大肠杆菌 JM109,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)FYX(MAT α , ura3-52)为本实验室

^{*} 该项目由宝洁公司提供资助。

^{**} 通讯作者。E-mail: chengq@mail.tsinghua.edu.cn

作者简介: 林会兰(1976-),男,山东莱州市人,清华大学硕士研究生,从事微生物及分子生物学研究。

收稿日期: 2002-07-22,修回日期: 2002-11-04

保存。大肠杆菌——酿酒酵母穿梭质粒 pYES2 为 Invitrogen (美国) 公司产品。大肠杆菌培养基为 LB, 含质粒的大肠杆菌保存于含氨苄青霉素 (100 $\mu\text{g/mL}$) 的 LB 平板。在酵母中进行质粒筛选的培养基为尿嘧啶缺失培养基 SC-ura^[10]; 含有 0.67% YNB, 2% 葡萄糖, 0.2% 氨基酸混和物, pH 5.0。当进行 LCB1 基因诱导表达时, 用半乳糖代替葡萄糖作碳源。

1.2 试剂

正己烷, 乙醇, 购自迪马公司 (北京), 均为色谱纯。其他试剂为分析纯。神经酰胺标样 N- α -羟基棕榈酰-植物神经酰胺 (CerV) 由广州 Cosmoferm 公司赠送, 其结构与酵母神经酰胺类似, 只是脂肪酸的碳链长度有差异。Taq DNA 聚合酶 (Ex Taq) 来自大连 TaKaRa 公司, 限制性内切酶为 New England Biolabs (美国) 公司的产品, T4 DNA 连接酶购自 Promega (美国)。引物由上海生工生物工程技术服务公司合成。

1.3 LCB1 基因的获得

根据 LCB1 的 ORF 设计 PCR 引物: N 端引物 5'-GAAGGATCC (BamHI) ACAATGGCA-CACATCCCAGAG-3'; C 端引物 5'-GGGCTCGAG (XhoI) TTTATTAGATTCTTGGCA。

从酿酒酵母 FY2 中提取基因组 DNA 作为模板, 进行 PCR 扩增: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 接着 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 循环 30 次, 最后于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。得到 LCB1 基因片段。

1.4 重组质粒的构建

PCR 产物用 BamHI 和 XhoI 双酶切, 质粒 pYES2 用 BamHI 和 XhoI 酶切, 回收所需片段后, 经 T4 DNA 连接酶连接, 转化大肠杆菌 JM109, 提取质粒, 酶切验证。

1.5 酵母的转化和筛选

转化采用 LiAC 转化法^[10]。取 200 μL 转化液涂布于 SC-ura 平板上, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 2 ~ 4d, 得到 Ura⁺ 型转化子。

1.6 摇瓶培养

经过夜活化的酵母菌液, 按 3% ~ 5% 的接种量接种于含半乳糖的 SC-ura 培养基 (200mL/500mL 三角瓶) 中, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 200r/min 培养 24 ~ 48h。

1.7 脂类提取

取 200mL 摇瓶培养液, 离心收集细胞, 加入 10 mL 4mol/L 的 NaOH。50 $^{\circ}\text{C}$ 碱解 2 h, 使酵母充分破壁。细胞残渣水洗后用醋酸中和至 pH 7.0, 离心。每克湿细胞加入 1 mL 乙醇, 室温充分振荡 10min, 离心。沉淀用 10mL 的氯仿: 甲醇: 水 (1:2:0.8), 50 $^{\circ}\text{C}$ 提取 1 h, 离心收集提取液。沉淀经再次重复提取后, 合并 2 次提取的提取液。在提取液中先后加入氯仿和水, 使氯仿: 甲醇: 水的比例为 2:2:1.8, 剧烈振荡后静置分层。收集下层氯仿相, 即为含有神经酰胺的脂类粗提液^[11]。粗提液经真空干燥后, 定容于氯仿中, 进行 HPLC 检测。

1.8 高效液相色谱分析 (HPLC)

实验用液相色谱仪为 TSP (Thermo Separation Products) 的 SpectraSystem P2000 双泵溶剂混合系统, 并带有 TSP 真空脱气装置。检测器为 Sedex75 型 (Sedere), 蒸发光散射检测器 (evaporative light scattering detector, ELSD)。检测器温度 40 $^{\circ}\text{C}$, 空气压力 3.6 bar, 检测灵敏

度为 8。色谱柱为 Alltima CN 柱(5μ , $4.6\text{mm} \times 150\text{ mm}$, Alltech)。洗脱剂为正己烷:乙醇(99 :1) ,流速 0.8mL/min 。标样和提取液的进样量 $5 \sim 20\mu\text{L}$ 。以样品浓度 C 和样品峰面积 A 为参数作双对数曲线 ,对神经酰胺进行定量。

2 结果

2.1 质粒 pYLCB1 的构建

经 PCR 扩增得到的片段长度为 1.7kb ,与预计的大小相符。经双酶切 ,与载体连接 ,得到质粒 pYLCB1(图 1)。对该质粒的酶切验证如图 2 所示 ,证明质粒构建成功。

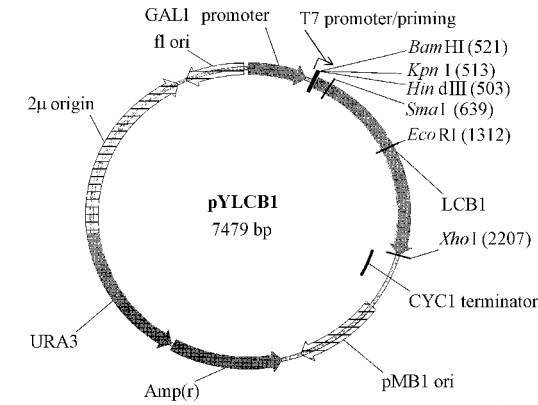


图 1 重组表达质粒 pYLCB1 的结构图

Fig.1 Schematic representation of the recombinant plasmid pYLCB1

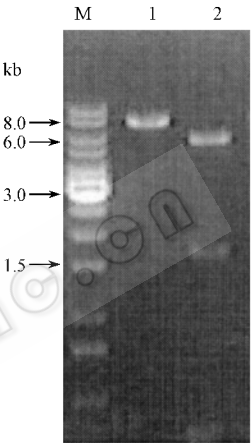


图 2 重组质粒 pYLCB1 的酶切图谱

Fig.2 Restriction map of recombinant plasmid pYLCB1
M. 1kb DNA ladder ; 1. pYLCB1 digested with *Bam*HI (7479bp); 2. pYLCB1 digested with *Bam*HI and *Xho*I (5793bp + 1686bp).

2.2 神经酰胺的 HPLC 分析

配制不同浓度 c (mg/L)的神经酰胺标样 ,用 HPLC 进行分析。以峰面积 A 和神经酰胺浓度 c 为参数 ,作双对数曲线 ,得到神经酰胺的定量标准曲线(图 3)。

2.3 重组质粒 pYLCB1 对酿酒酵母神经酰胺的影响

培养含有空载体 pYES2 和含有重组质粒 pYLCB1 的酿酒酵母 FY2 ,提取酵母中的神经酰胺并通过 HPLC 检测。与对照相比 ,质粒所含 *LCB1* 基因在酿酒酵母中的表达 ,使得细胞干重略有下降 ,而神经酰胺 V 的含量(占细胞干重的比例)有显著提高。神经酰胺 V 含量约为对照的 1.9 倍(图 4)。

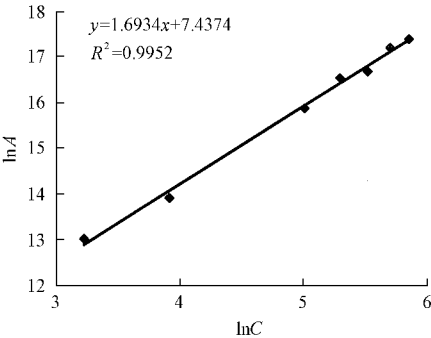


图 3 神经酰胺 V 的标准曲线

Fig.3 Standard curve of Cer V

3 讨论

Nagiec 等曾用含 *LCB1* 基因的多拷贝质粒转化酵母,发现丝氨酸棕榈酰转移酶(SPT)的活性并没有明显的变化。用一种抑制 SPT 酶活性的物质 Sphingofungin B (鞘脂真菌素 B),进行酿酒酵母的生长抑制实验,结果显示,含有 *LCB1* 质粒的酵母, Sphingofungin B 对生长的最低抑制浓度是对照菌的 2 倍。从而间接证明了神经酰胺在酵母抗 Sphingofungin B 中发挥作用^[12]。本论文则通过简单易行的 HPLC-ELSD 的方法,直接检测到含 *LCB1* 质粒的酵母,其神经酰胺的含量有明显增加,从而证明了的 *LCB1* 基因对神经酰胺产量调节的重要作用。酵母神经酰胺的积累能

导致细胞周期的抑制,使细胞停滞于 G0/G1 期,参与该过程的是一种神经酰胺激活的蛋白磷酸酯酶^[13]。在热休克过程中,酵母也表现出暂时的 G0/G1 停滞。停滞现象与鞘脂的重头合成有关,鞘脂碱基在此过程中扮演了重要的角色^[14]。本论文中, *LCB1* 基因在酿酒酵母中的表达,推动了神经酰胺的从头合成途径,导致长链碱基和神经酰胺的积累,而它们的积累反过来又引起酵母生长的抑制。因此,与含有空载体的酵母相比较,含 pYLCB1 质粒的酿酒酵母 FY2,其细胞干重略有下降。本论文的工作表明, *LCB1* 基因在酵母神经酰胺的合成调节中发挥重要作用,利用基因工程法,将其转入酵母中,可提高酵母神经酰胺的产量约两倍。国外对神经酰胺的研究主要集中于其信号传导和细胞学功能方面,而对如何提高它的表达量研究较少。Rupcic 等研究了不同生长阶段的 *Candida lipolytica* 中神经酰胺的含量的差异,发现对数生长期是静止期的两倍多^[15]。

神经酰胺是人表皮角质层含量较高的脂类之一,是重要的化妆品原料,具有保湿、抗皱、及防止过敏性皮炎的作用,能保护皮肤免于物理、化学和生物的伤害。利用微生物发酵法生产神经酰胺,可替代传统的从牛脑中提取的方法,可降低成本,提高产量,具有广阔的应用前景。

致谢 感谢 Boeke J D 教授(Johns Hopkins University School of Medicine)提供酵母菌株 FY2。感谢 Cosmoform 公司提供神经酰胺样标。

参 考 文 献

- [1] Dickson R C. Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison to mammals. *Annu Rev Biochem*, 1998, **67**: 27 ~ 48.
- [2] Dickson R C, Lester R L. Yeast sphingolipids. *Biochimica Biophysica Acta*, 1999, **1426**: 347 ~ 357.
- [3] Nakayama M, Kojima M, Ohnishi M, et al. Enzymatic formation of plant cerebroside: properties of UDP-glucose: ceramide glucosyltransferase in radish seedlings. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995, **59**(10): 1882 ~ 1886.
- [4] Bohn M, Heinz E, Luthje S. Lipid composition and fluidity of plasma membranes isolated from corn (*Zeamays* L.) roots. *Arch Biochem Biophys*, 2001, **387**(1): 35 ~ 40.
- [5] Hannun Y A, Bell R M. Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science*.

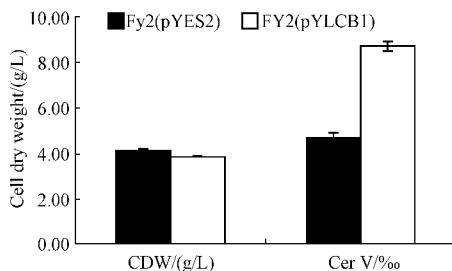


图4 *LCB1* 基因表达对酿酒酵母 FY2 细胞干重和神经酰胺含量的影响

Fig.4 Effect of *LCB1* gene expression on CDW and ceramide content by *S. cerevisiae* FY2

CDW: Cell dry weight. Data were obtained from mean values of two parallel experiments.

1989 , **243** : 500 ~ 507.

[6] Robson K J , Stewark M E , Michelsen S , *et al.* 6-Hydroxy-4-sphingenine in human epidermal ceramides. *Journal of Lipid Research* , 1994 , **35** : 2060 ~ 2068.

[7] Perry D K , Hannun Y A. The role of ceramide in cell signaling. *Biochemica Biophysica Acta* , 1998 , **1436** : 233 ~ 243.

[8] Hannun Y A , Chiara L. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends in Cell Biology* , 2000 , **10** : 73 ~ 80.

[9] Buede R , Schaffer C R , Pinto W J , *et al.* Cloning and characterization of *LCB1* , a *Saccharomyces* gene required for biosynthesis of the long-chain base component of sphingolipids. *Journal of Bacteriology* , 1991 , **173** (14) : 4325 ~ 4332.

[10] Adams A , Gottschling D E , Kaiser C A , *et al.* Methods in Yeast Genetics. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1997.

[11] Bligh E G , Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* , 1959 , **37** (8) : 911 ~ 917.

[12] Nagiec M M , Baltisberger J A , Wells G B , *et al.* The *LCB2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* and the related *LCB1* gene encode subunits of serine palmitoyltransferase , the initial enzyme in sphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1994 , **91** : 7899 ~ 7902.

[13] Nickels J T , Broach J R. A ceramide-activated protein phosphatase mediates ceramide-induced G (1) arrest of *Saccharomyces cerevisiae* . *Genes and Development* , 1996 , **10** (4) : 382 ~ 394.

[14] Jenkins G M , Hannun Y A. Role for de novo sphingoid base biosynthesis in the heat-induced transient cell cycle arrest of *Saccharomyces cerevisiae* . *Journal of Biological Chemistry* , 2001 , **276** (11) : 8574 ~ 8581.

[15] Rupcic J , Milin C , Maric V. Effect of growth phase on the content and composition of ceramides of the hydrocarbon-assimilating yeast *Candida lipolytica* . *Systematic and Applied Microbiology* , 1999 , **22** : 486 ~ 491.

Effect of the Expression of *LCB1* Gene on Yeast Ceramides Synthesis

Lin Huilan Zhou Quan Chen Guoqiang^{*}

(Department of Biological Sciences and Biotechnology , Tsinghua University , Beijing 100084 , China)

Abstract : *LCB1* gene was cloned into inducible expression vector pYES2 and transformed into *Saccharomyces cerevisiae* FY2. The plasmid was induced to express with galactose. The cell dry weight of FY2 with plasmid *LCB1* gene decreased a little , while ceramide contents increased to 1.9 times comparing to FY2 containing only pYES2.

Key words : *Saccharomyces cerevisiae* , *LCB1* gene , Ceramide , Expression

^{*} Corresponding author. E-mail : chengq@mail. tsinghua. edu. cn

《微生物学报》入选“ 中国科技期刊方阵 ”

近期 ,中国科学技术部公布了我国期刊进入“ 中国期刊方阵 ”的名单。全国共有 716 种期刊进入了“ 中国期刊方阵 ” ,其中“ 双高 ”期刊 40 种 ;“ 双奖 ”期刊 58 种 ;“ 双百 ”期刊 122 种 ;“ 双效 ”期刊 496 种。《微生物学报》入选“ 双百 ”期刊方阵。

“ 中国期刊方阵 ”的建设是现阶段我国期刊出版事业发展的需要 ,是推进新世纪我国期刊发展的战略性举措 ,它将促进我国期刊“ 精品战略 ”的实施。

《微生物学报》编委会感谢各级领导的关心 ,感谢广大作者、读者对本刊办刊工作的大力支持。我们将更好地贯彻国家有关办刊工作的各项政策、法规和法令 ,进一步提高刊物质量 ,为我国的经济建设服务 ,为使期刊尽快走向世界做出积极贡献。