

酵母过氧化物体生物合成缺陷突变株的诱变、筛选和鉴定

罗玉萍, 李思光*

(南昌大学生命科学学院 南昌 330047)

摘 要 过氧化物体对生物的生长和发育非常重要, 人类很多疾病就是由于过氧化物体生物合成缺陷引起。以解脂耶氏酵母 E122 为出发菌, 采用硫酸二乙酯诱变, 获得了两株过氧化物体生物合成缺陷突变株, 其中一株为温度敏感的突变株。在正常生长条件下, 突变株的免疫荧光分析显示弥散的染色模式, 且在电镜下观察不到过氧化物体的形态结构。将克隆于表达载体 pINA445 上的目前所发现的与过氧化物体生物合成有关的基因转化这两株突变株, 发现它们均不能恢复其在含油酸的培养基上的生长, 表明这两个突变株是由与过氧化物体生物合成相关的新基因的突变引起。这两个突变株的获得为参与过氧化物体生物合成的新基因的发现奠定了基础。

关键词 解脂耶氏酵母; 过氧化物体; 生物合成缺陷; 诱变; 筛选

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)03-0470-04

过氧化物体(Peroxisome)是进行氧化反应的球型细胞器, 属于微体家族(Microbody family)。从酵母到人类等绝大多数生物都具有过氧化物体^[1,2]。虽然过氧化物体的功能随生物种类和细胞类型的不同而存在着差异, 但不同生物的过氧化物体都具有 3 个保守的功能, 即脂肪酸的 β -氧化、分解过氧化氢等毒性物质和抗氧胁迫作用^[2-5]。过氧化物体对人的生长和发育十分重要, 人类很多疾病, 例如脑肝肾综合症、肢根软骨发育异常和新生儿脑白质营养不良等, 就是由于过氧化物体生物合成缺陷(PBDS)引起的^[6-11]。近年来, 欧美等国的科学家们对过氧化物体进行了大量的研究, 试图揭示人类过氧化物体生物合成缺陷的分子基础, 尤其是揭示控制过氧化物体组装的基因^[12]。

酵母具有适于大规模分离高纯度过氧化物体, 易于进行遗传操作等优点, 是研究过氧化物体生物合成的理想的模式生物^[1,2,13-15]。迄今, 人们利用不同的酵母作为模式菌株, 分离鉴定了 32 个与过氧化物体生物合成相关的基因(PEX genes)。这些基因表达的产物参与了过氧化物体基质蛋白的输入、膜的合成及过氧化物体的增殖^[2,16,17]。然而, 目前人们仍缺乏对过氧化物体生物合成过程中的许多重要问题的认识, 因此, 有必要继续从不同的模式生物中分离和鉴定新的与过氧化物体生物合成相关的基因, 深入研究它们在过氧化物体生物合成中所起的作用。

解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)的过氧化物体生物合成和功能特征与酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)不尽相同, 在某些方面却与高等生物相似^[2]。目前在解脂耶氏酵母中分离和鉴定的 15 个与过氧化物体生物合成相关的基因中,

13 个是人体细胞中的同源基因。人体中的这些同源基因的突变均导致过氧化物体生物合成缺陷, 从而产生疾病^[6-11]。因此, 以解脂耶氏酵母为研究材料可望发现与人类重要疾病相关的参与过氧化物体生物合成的新基因。由于在解脂耶氏酵母中分离和鉴定的与过氧化物体生物合成相关的基因中有 9 个(PEX3、PEX5、PEX6、PEX10、PEX11、PEX16、PEX19、PEX20 和 PEX24)是利用 E122 发现的, 本研究以解脂耶氏酵母 E122 为出发菌, 采用化学诱变剂诱变, 获得了过氧化物体生物合成缺陷突变株, 这一研究工作为参与过氧化物体生物合成的新基因的分离鉴定奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基 解脂耶氏酵母单倍体菌株 E122 (MATA, *ura3-302*, *leu2-270*, *lys8-11*) 由 Gaillardin 教授赠送)用于诱变研究。穿梭质粒 pINA445 LEU2 (Ap^r, Tc^r) 上分别插入了目前在解脂耶氏酵母中所发现的 PEX 基因(PEX1、PEX2、PEX3、PEX5、PEX6、PEX7、PEX10、PEX11、PEX12、PEX13、PEX14、PEX16、PEX19、PEX20 和 PEX24, 由 Rachubinski 教授赠送), 用于转化突变菌株。菌株用完全培养基(YEPD^[13]和 YPBO^[13])或补充基本培养基 YND^[13]培养。本研究在 YND 培养基中补充赖氨酸和尿嘧啶各 50mg/mL。酵母菌株在 30℃ 或 20℃ 培养。

1.1.2 抗体: 过氧化物体的基质蛋白 PTS1 三肽 SKL (tripeptide SKL) 抗体、乙酰辅酶 A 氧化酶(acyl-CoA oxidase AOX)抗体、异柠檬酸酶(isocitrate lyase ICL)抗体和硫解酶

基金项目: 国家自然科学基金(39860037); 江西省自然科学基金(0630012)

* 通讯作者。Tel: 86-791-8304099; E-mail: siguangli@163.com

作者简介: 罗玉萍(1955-), 女, 江西南昌人, 教授, 博士, 从事微生物遗传学研究。E-mail: luoyuping@163.com

收稿日期: 2005-08-04; 接受日期: 2005-10-09; 修回日期: 2005-11-12

(thiolase THI) 抗体及偶联荧光素的抗兔 IgG 二抗由 Rachubinski (University of Alberta, Canada) 赠送。

1.2 诱变与筛选

取 5 mL 酵母细胞培养液, 以 5000 r/min 离心 5 min, 用无菌生理盐水洗涤沉淀, 离心后向沉淀中加入 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 20 mL、硫酸二乙酯 (DES) 0.2 mL, 混匀后于 30°C 震荡 30 min, 然后加入终止剂 25% 硫代硫酸钠 0.2 mL, 终止诱变。5000 r/min 离心 5 min, 再用磷酸缓冲液洗涤沉淀 2 次, 用生理盐水将菌体稀释, 涂于 YEPD 培养基平板上, 30°C 培养 2 d, 然后影印于 YPBO 培养基平板。挑取在 YEPD 平板上生长而在 YPBO 平板不生长的单菌落分离纯化, 斜面保藏。

1.3 引起过氧化物体生物合成缺陷的新突变型的确定

将突变型酵母细胞在 YEPD 培养基中培养 12 h, 在醋酸锂的作用下制备感受态细胞。通过电转化将含有已报道的 PEX 基因的质粒 pINA445 分别导入感受态细胞, 转化后立即将细胞用 200 μ L 1 mol/L 山梨醇稀释, 涂布于含山梨醇的 YND-Ura-Lys 平板, 30°C 培养。长出菌落后影印于 YPBO 培养基平板, 以确定突变株是否由未知基因的突变引起。

1.4 免疫荧光分析

将待测细胞在含葡萄糖的培养基中培养 16 h 后转至含油酸的培养基中诱导 9 h, 收集细胞, 用 37% 的多聚甲醛处理半小时, 然后用去壁酶制备原生质体。将原生质体点样于载玻片上, 分别与过氧化物体的基质蛋白 PTS1 三肽 SKL 抗体、过氧化物体基质蛋白乙酰辅酶 A 氧化酶抗体、异柠檬酸酶抗体和硫解酶的抗体杂交, 再与荧光素标记的二抗反应。用荧光显微镜观察过氧化物体的染色特征, 以判断过氧化物体基质蛋白在细胞中的定位。

1.5 过氧化物体的电镜观察

将野生型菌株和突变型菌株在含葡萄糖的培养基 (YEPD) 中培养 16 h, 转至含油酸的 YPBO 培养基诱导 9 h, 收集细胞, 用 3% 锰酸钾震荡培养 20 min。高速离心收集细胞, 用 1% 高碘酸钠震荡培养 10 min, 离心收集细胞, 水洗后用 1% 的氯化胺震荡培养 10 min, 然后分别用 60%、80%、95% 和 100% 的乙醇处理细胞 5 min, 再用 propylene oxide 处理细胞 5 min 后制片, 用电镜进行细胞超微结构分析, 观察过氧化物体的形态和大小, 内质网结构等。

2 结果

2.1 过氧化物体生物合成缺陷株的诱变和筛选

用硫酸二乙酯诱变解脂耶氏酵母菌株 E122 ($ura^- leu^- lys^-$) 然后将它们涂布于 YEPD 平板, 30°C 培养 2 d, 获得近 4000 个菌落。将这些菌落影印于油酸作为唯一碳源的培养基 YPBO 平板, 结果发现, 在 30°C 培养时, 有两个菌株不能在 YPBO 上生长 (图 1)。由于过氧化物体的功能之一是参与脂肪酸的 β -氧化, 因此过氧化物体生物合成缺陷突变株不能在油酸作为唯一碳源的培养基上生长。说明我们获得了两株可能的过氧化物体生物合成缺陷突变株, 将其称为突变株 I 和突变株 II (mutant I 和 mutant II)。进一步分析表明突变株 I

具有温度敏感特性, 如图 1 所示, 当培养温度为 30°C 时, 在油酸作为唯一碳源的 YPBO 培养基中突变株 I 不能生长, 而在 20°C 培养时, 在该培养基中突变株 I 能够很好地生长。

在 YEPD 平板上, 突变株的菌落形态与野生型有差异, 虽然它们的菌落都呈乳白色, 但野生株菌落的表面皱缩, 而突变株的菌落表面光滑 (图 1)。此外, 突变株与野生型菌株 E122 具有相同的营养缺陷标记, 只能在添加了亮氨酸、赖氨酸和尿嘧啶的 YNA 培养基上才能生长。对获得的两株过氧化物体生物合成缺陷突变株的遗传稳定性进行了检测。在 YEPD 液体培养基中连续传代 40 代后, 所有挑选的单菌落在 YPBO 上都不生长, 因此这两突变株是遗传稳定的, 没有回复突变发生。

我们将目前在解脂耶氏酵母中发现的 15 个与过氧化物体生物合成有关的基因克隆于表达载体 pINA445 上, 然后分别转化这两株突变株, 发现它们均不能恢复其在含油酸的培养基上的生长, 说明目前已发现的基因不可以功能互补突变株的缺陷, 表明上述两突变株是由与过氧化物体生物合成相关的新基因的突变引起的。

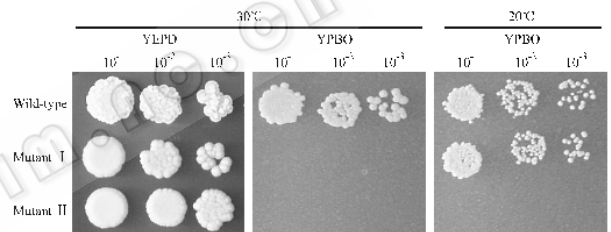


图 1 酵母野生株和突变株在不同培养基上的生长

Fig. 1 Growth of the wild-type strains and mutants of *Y. lipolytica* on different culture medium. The strains were grown to midlog phase in liquid YEPD or YPBO medium, spotted at dilutions of 10^{-1} to 10^{-3} on YEPD or YPBO agar and grown for three days at 30°C and 20°C, respectively.

2.2 过氧化物体基质蛋白的免疫荧光分析

过氧化物体本身不带有遗传物质, 也不合成蛋白质, 但过氧化物体体内含有许多可溶性的基质蛋白质, 其膜上具有许多膜蛋白。这些蛋白质几乎都是由核基因所编码, 在细胞质中的多聚核糖体上合成。大多数可溶性的基质蛋白质的羧基端具有 SKL 三肽, 它是蛋白质定位于过氧化物体的信号。用过氧化物体的基质蛋白 PTS1 三肽 SKL 抗体和过氧化物体基质蛋白的抗体与野生型和突变型细胞进行免疫荧光分析, 结果显示, 在 30°C 诱导时, 野生型细胞显示点状的染色模式, 而两突变株显示弥散的染色模式 (图 2), 表明野生型细胞含有正常的过氧化物体, 过氧化物体基质中的可溶性蛋白与其抗体和荧光素标记的二抗反应, 所以显示点状的荧光染色模式。两突变株的过氧化物体生物合成受到抑制, 其基质蛋白均匀地分布于细胞浆中, 因而显示弥散的染色模式。值得注意的是, 在 20°C 诱导时, 突变株 I 也呈现点状的荧光染色模式, 进一步证实了该突变株是温度敏感的突变株。

2.3 过氧化物体的电镜观察

为了进一步证实已获得的突变株是过氧化物体生物合成缺陷突变株, 将野生株和两突变株用 YPBO 液体培养基诱

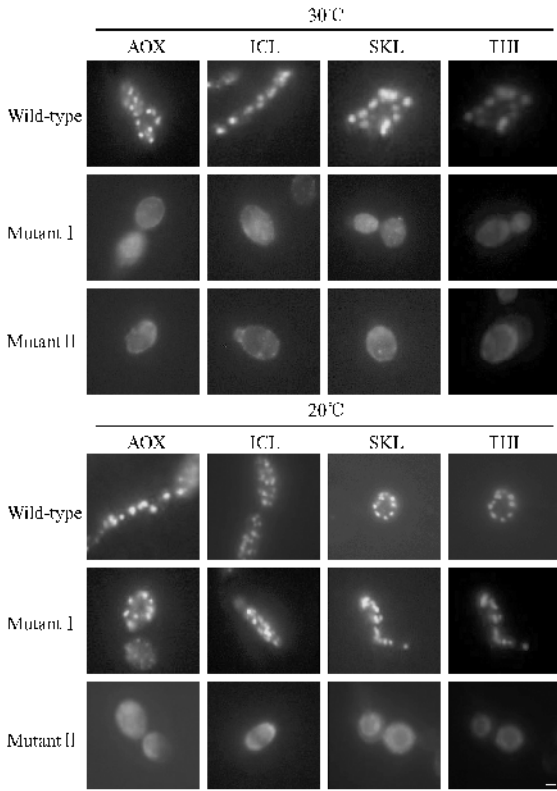


图2 过氧化物体基质蛋白在野生株和突变株中的定位

Fig.2 Localization of peroxisomal matrix protein in wild type and mutant strains. AOX, acyl-CoA oxidase; ICL, isocitrate lyase; SKL, tripeptide; THI, thiolase. Bar, $1\mu\text{m}$.

导后,收集细胞,用1.5% KMnO_4 固定制片,然后进行电镜观察。结果表明,野生型细胞含有正常的过氧化物体,而突变型细胞缺乏明显的过氧化物体,且细胞内累积了许多膜系结构(图3)。与生长和免疫荧光分析的结果一致,突变株 I 在 30°C 培养时不能够合成过氧化物体,而在 20°C 培养时能够合成过氧化物体。

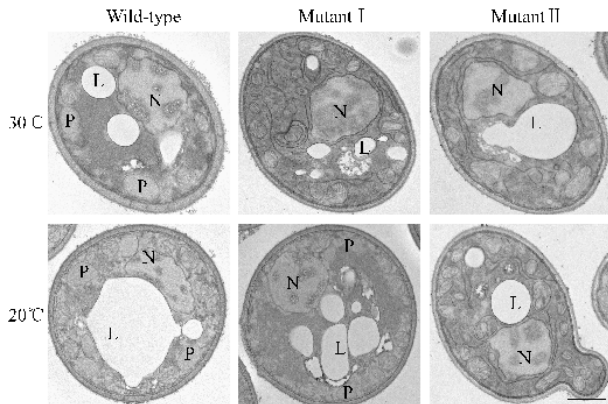


图3 解脂耶氏酵母野生株和突变株的超微结构

Fig.3 Ultrastructure of wild-type and mutants strains of *Y. lipolytica*. L, lipid droplet; N, nucleus; P, peroxisome. Bar, $1\mu\text{m}$.

3 讨论

人类目前已经发现的单基因遗传疾病有 6000 多种,但迄今只找到了 200 多个与遗传病有关的基因。虽然人类基因组序列图已完成,然而基因的确切数目尚不能最后肯定,更没有全部得到克隆。对已克隆的基因也有一半左右了解它们的功能。因此弄清楚每个基因的功能,是一个庞大、复杂的过程,需做的工作很多。寻找新基因,特别是与遗传性疾病相关的致病基因,是当前的研究热点。

人类很多遗传疾病例如脑肝肾综合症、肢根软骨发育异常和新生儿脑白质营养不良等是由于过氧化物体生物合成缺陷引起的^[6-11]。过氧化物体基质内含有多种酶类,其中过氧化氢酶和过氧化物酶可消除细胞内的过氧化氢和过氧化物,防止其含量过高而起保护作用;硫解酶是参与脂肪酸 β 氧化的主要酶类,能够分解长链脂肪酸^[2]。过氧化物体生物合成缺陷会导致组织细胞内过氧化氢含量过高和长链脂肪酸大量累积,如对脑肝肾综合症病人的组织进行生化研究,发现其中长链脂肪酸和某些中间的胆汁酸过量积累^[18]。脑肝肾综合症病人的病因是由于基因突变导致其细胞内缺少正常的过氧化物体^[9]。因此,在模式生物中寻找和发现与过氧化物体生物合成相关的新基因,然后通过 GenBank 数据库搜索可望找到人类中的同源基因。对这些基因的生物学功能的研究可阐明相关疾病的致病机理,为进一步探索过氧化物体生物合成紊乱性疾病的分子机制提供新的思路。

本研究以解脂耶氏酵母为出发菌株,通过化学诱变和大量筛选获得了两株不能在油酸作为唯一碳源的培养基上生长的突变株,且免疫荧光分析和电镜观察均显示突变表型,证实这两个突变株是过氧化物体生物合成缺陷突变株。将目前所发现的与过氧化物体生物合成有关的基因克隆于表达载体 pINA445 上,然后转化这两株突变株,发现它们均不能恢复其在含油酸的培养基上的生长,表明这两个菌株的过氧化物体生物合成缺陷是由于目前尚未发现的基因突变引起的,以它们为研究材料可望发现与过氧化物体形成相关的新基因。

参 考 文 献

- [1] Eckert JH, Erdmann R. Peroxisome biogenesis. *Rev Physio Biochem Pharmacol*, 2003, **147**: 75-121.
- [2] Titorenko VI, Rachubinski RA. The life cycle of the 'peroxisome'. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, **2**: 357-368.
- [3] Smith MD, Schnell DJ. Peroxisomal protein import: The paradigm shifts. *Cell*, 2001, **105**: 293-296.
- [4] Rachubinski RA, Subramani S. How proteins penetrate peroxisomes. *Cell*, 1995, **83**: 525-528.
- [5] Freedman BD, Lee EJ, Park YK, et al. A dominant negative peroxisome proliferator-activated receptor-gamma knock-in mouse exhibits features of the metabolic syndrome. *J Biol Chem*, 2005, **280**: 17118-17125.

- [6] Barth PG , Majoie CB , Gootjes J , *et al.* Neuroimaging of peroxisome biogenesis disorders (Zellweger spectrum) with prolonged survival. *Neurology* , 2004 , **62** :439 – 444.
- [7] Kersten S , Desvergne B , Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* , 2000 **405** :421 – 424.
- [8] Maxwell MA , Allen T , Solly PB , *et al.* Novel PEX1 mutations and genotype-phenotype correlations in Australasian peroxisome biogenesis disorder patients. *Hum Mutat* , 2002 , **20** :342 – 351.
- [9] Shimozawa N , Tsukamoto T , Suzuki Y , *et al.* A human gene responsible for Zellweger syndrome that affects peroxisome assembly. *Science* , 1992 , **255** :1132 – 1134.
- [10] Wanders R , Waterham H. Peroxisomal disorders I : biochemistry and genetics of peroxisome biogenesis disorders. *Clin Genet* , 2005 , **67** :107 – 133.
- [11] Gootjes J , Mooijer PA , Dekker C , *et al.* Biochemical markers predicting survival in peroxisome biogenesis disorders. *Neurology* , 2002 , **59** :1746 – 1749.
- [12] Matsuzono Y , Kinoshita N , Tamura S , *et al.* Human PEX19 : cDNA cloning by functional complementation , mutation analysis in a patient with Zellweger syndrome and potential role in peroxisomal membrane assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1999 , **96** :2116 – 2121.
- [13] Tam YYC , Rachubinski RA. *Yarrowia lipolytica* cells mutant for the PEX24 gene encoding a peroxisomal membrane peroxin mislocalize peroxisomal proteins and accumulate membrane structures containing both peroxisomal matrix and membrane proteins. *Mol Biol Cell* , 2002 , **13** :2681 – 2691.
- [14] Tam YYC , Torres-Guzman JC , Vizeacoumar FJ , *et al.* Pex11-related proteins in peroxisome dynamics : A role for the novel peroxin Pex27p in controlling peroxisome size and number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* , 2003 , **14** :4089 – 4102.
- [15] Einwächter H , Sowinski S , Kunau WH , *et al.* *Yarrowia lipolytica* Pex20p , *Saccharomyces cerevisiae* Pex18p/Pex21p and mammalian Pex5pL fulfill a common function in the early steps of the peroxisomal PTS2 import pathway. *EMBO Rep* 2001 , **2** :1035 – 1039.
- [16] Dammai V , Subramani S. The human peroxisomal targeting signal receptor , Pex5p , is translocated into the peroxisomal matrix and recycled to the cytosol. *Cell* 2001 , **105** :187 – 196.
- [17] Hu J , Aguirre M , Peto C , *et al.* A role for peroxisomes in photomorphogenesis and development of Arabidopsis. *Science* , 2002 , **297** :405 – 409.
- [18] Goldfischer S , Moore CL , Johnson AB , *et al.* Peroxisomal and mitochondrial defects in the cerebro-hepato-renal syndrome. *Science* , 1973 , **182** :62 – 64.

Mutagenesis , screening and characterization of mutants known as peroxisome biogenesis disorders in yeast

LUO Yu-ping , LI Si-guang*

(College of Life Science , Nanchang University , Nanchang 330047 , China)

Abstract : Peroxisomes are essential for organisms' development and physiology. This fact is underscored by the lethality of a group of genetic disorders collectively known as the peroxisome biogenesis disorders (PBDs), such as Zellweger syndrome , in which peroxisomes fail to assemble properly. Defining the molecular bases of the PBDs has been the impetus behind the identification of the genes controlling peroxisome assembly , the PEX genes , from various modern organisms. Here as a original strain , *Yarrowia lipolytica* E122 was mutated by diethyl sulfate (DES) treatment and two mutants including temperature sensitive one were obtained. Compared to the initial strain , the two mutants showed more diffuse pattern of fluorescence characteristic of a cytosolic localization in immunofluorescence analysis , and showed no morphologically recognizable peroxisomes in electron micrographs. The two mutants arose from new gene mutation characterized by transformation and will be very useful in identification of new gene controlling peroxisome assembly from yeast.

Keywords : *Yarrowia lipolytica* ; Peroxisome biogenesis disorder ; Mutagenesis ; Screening