

## *SRO9* 基因参与调控酿酒酵母内质网应激反应

赵炜<sup>1,2</sup> 牛宇杰<sup>1,2</sup> 郑华珍<sup>1,2</sup> 周涛<sup>1,2</sup> 崔红晶<sup>1,2</sup> 刘新光<sup>1,2\*</sup>

(1. 广东医科大学衰老研究所 广东 东莞 523808)

(2. 广东省医学分子诊断重点实验室 广东 东莞 523808)

**摘要:** 【目的】研究酵母 *SRO9* 基因在内质网应激(Endoplasmic reticulum stress, ERS)中的作用。【方法】利用 PCR 介导的同源重组方法构建 *SRO9* 基因缺失菌株,检测其在内质网应激诱导剂衣霉素处理条件下的克隆形成能力;通过比色法检测细胞内的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量,超氧化物歧化酶 SOD 活性和细胞增殖能力;通过实时荧光定量 PCR 检测内质网应激靶基因和超氧化物歧化酶编码基因 *SOD1* 及 *SOD2* 的转录水平。【结果】相对于野生型酵母菌株, *SRO9* 基因缺失酵母菌株对内质网应激诱导剂衣霉素的抗性增强,参与内质网应激反应的靶基因转录上调;细胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量下降, *SOD1*、*SOD2* 转录水平降低,总 SOD 活性降低;对氧化剂 CHP 和 VK3 的抵抗性减弱,复制寿命明显缩短。【结论】*SRO9* 基因缺失酵母细胞对内质网应激诱导剂衣霉素的抗性增强,原因可能是由于 *SRO9* 基因缺失激活了细胞的内质网应激反应。

**关键词:** *SRO9*, 酿酒酵母, 内质网应激件

## *SRO9* is involved in the endoplasmic reticulum stress response in *Saccharomyces cerevisiae*

ZHAO Wei<sup>1,2</sup> NIU Yu-Jie<sup>1,2</sup> ZHENG Hua-Zhen<sup>1,2</sup> ZHOU Tao<sup>1,2</sup> CUI Hong-Jing<sup>1,2</sup>  
LIU Xin-Guang<sup>1,2\*</sup>

(1. Institute of Aging Research, Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong 523808, China)

(2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Medical Molecular Diagnostics, Dongguan, Guangdong 523808, China)

**Abstract:** [Objective] To explore the role of *SRO9* in the endoplasmic reticulum stress (ERS) in *Saccharomyces cerevisiae*. [Methods] The *SRO9*-deletion yeast strain was made by PCR-mediated homologous recombination in wild-type yeast. Colony-forming ability of *SRO9*-deletion and wild-type strains was analyzed under the tunicamycin-treated ERS condition. The cell proliferation assay was performed using the Microbial viability assay kit. The intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels and total SOD activity

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31101051, 81170327); Guangdong Medical Research Foundation (No. B2014299); Social Development Funding of Dongguan City (No. 2012108102022); Science & Technology Innovation Fund of Guangdong Medical College (No. STIF201102)

\*Corresponding author: Tel: 86-769-22896371; E-mail: xgliu64@126.com

Received: January 10, 2016; Accepted: March 15, 2016; Published online (www.cnki.net): March 16, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31101051, 81170327); 广东省医学研究基金项目(No. B2014299); 东莞市科技计划项目(No. 2012108102022); 广东医学院建博科技创新团队项目(No. STIF201102)

\*通讯作者: Tel: 86-769-22896371; E-mail: xgliu64@126.com

收稿日期: 2016-01-10; 接受日期: 2016-03-15; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-03-16

were detected using the colorimetric method according to the assay kit. The expression levels of endoplasmic reticulum stress target genes, *SOD1* and *SOD2* were determined by quantitative RT-PCR (qRT-PCR). **[Results]** We observed significantly higher resistance to ER stress in the *SRO9*-deletion cells than in wild-type cells. The mRNA expression levels of endoplasmic reticulum stress target genes were up-regulated in the *SRO9*-deletion strain. The intracellular  $H_2O_2$  levels, total SOD activity, *SOD1* and *SOD2* mRNA expression levels were down-regulated in the *SRO9*-deletion strain. Further more, the *SRO9*-deletion cells show increased sensitivity to oxidant CHP and VK3, the replicative lifespan also reduced in *SRO9*-deletion cells. **[Conclusion]** *SRO9* deficiency enhances the resistance ability of the strain to ERS, and these might due to the ER stress responses that triggered by *SRO9*-deficiency.

**Keywords:** *SRO9*, *Saccharomyces cerevisiae*, Endoplasmic reticulum stress

机体细胞在受到外界因素刺激后会发一系列应激反应,例如氧化应激反应(Oxidative stress, OS)和内质网应激反应(Endoplasmic reticulum stress, ERS)。应激反应的进行涉及到许多基因。因此,研究人员可以通过构建基因缺失或突变细胞(或者个体),研究这些细胞对不同环境因素的应激反应,进而研究这些基因的功能<sup>[1]</sup>。这种方法已经被广泛应用于基因克隆、遗传育种和药物筛选等多个领域。

*SRO9* 最初是在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)中发现的一个非必需基因,它编码的蛋白属于保守的 RNA 结合蛋白超家族,可以与 mRNA 和核糖体结合,调控蛋白质的翻译<sup>[2-3]</sup>。高通量芯片筛查显示,酵母 *SRO9* 基因缺失后,细胞内许多参与氧化应激、电子传递和蛋白质合成基因的 mRNA 水平都发生改变,但未见详细的机制报道<sup>[4]</sup>。

本课题组的前期研究表明酵母 *SRO9* 基因很可能参与调控酵母的内质网应激,本研究在构建 *SRO9* 基因缺失菌株的基础上,深入探索 *SRO9* 在酵母细胞内质网应激中可能的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 本研究所用的野生型酿酒酵母株 BY4742 (*MAT $\alpha$  his3- $\Delta$ 1 leu2- $\Delta$ 0 met15- $\Delta$ 0 ura3- $\Delta$ 0*)及含有 *URR3* 筛选标记的穿梭质粒 pRS306 均由美国华盛顿大学的 Matt Kaeberlein 博士赠送。

**1.1.2 培养基、试剂和仪器:** YPD (Yeast extract peptone dextrose)培养基的成分为 1%酵母提取物、2%胰蛋白胨、2%葡萄糖,固体 YPD 培养基则添加 2%琼脂糖。含药物培养基均在 YPD 培养基的基础

上添加一定浓度的药物。液体营养缺陷型筛选培养基由 Minimal SD Base 和 DO Supplement-Ura 按照说明书配制而成,营养缺陷型固体平板由 Minimal SD Agar Base 和 DO Supplement-Ura 按照说明书配制而成,培养基有关试剂均购自 Clontech 公司。过氧化氢异丙苯(Cumene hydroperoxide, CHP)、维生素 K3 (Menadione, VK3)、衣霉素(Tunicamycin, TM)购自 Sigma 公司;总 SOD 活性检测试剂盒购自东仁化学科技有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒、过氧化氢检测试剂盒、过氧化氢酶检测试剂盒购自碧云天生物技术研究;HiFiTaq 酶、EasyTaq 酶、酵母总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒均购自 TaKaRa 公司;引物合成测序由生工生物工程上海股份有限公司完成,本文使用的引物序列见表 1。酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司;FACS Canto II 流式细胞仪购自美国 BD 公司;7500 实时定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 *SRO9* 基因缺失菌株的构建和鉴定:** 通过 PCR 介导的一步基因破坏法构建 *SRO9* 缺失株<sup>[5]</sup>。以质粒 pRS306 为模板,*SRO9*-Box-F 和 *SRO9*-Box-R 为引物,使用 HiFiTaq 酶扩增含有 *URA3* 开放阅读框的 *SRO9* 基因破坏元件。PCR 产物回收纯化后转化至野生型酵母株 BY4742 中,利用 SD/-Ura 固体培养基筛选阳性克隆。阳性克隆用 SD/-Ura 液体培养基培养过夜后,提基因组。以基因组为模板,*SRO9*-F 和 *SRO9*-R 为引物,采用 EasyTaq 酶进行 PCR 鉴定。PCR 产物大小进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。

表 1 引物序列  
Table 1 Primers sequence

引物 Primers (Forward)	Sequence (5' 3')	引物 Primers (Reverse)	Sequence (5' 3')
SRO9-F	TGCTAACGTGTTTCATCTTCTTTT	SRO9-R	TGAACGAATCCAATTTTTATT
Box-F	CACTTCTCTGCCACGAGATTGT ACTGAGAGTGAC	Box-R	TGCAAGTGTGAGAGGCCTCTG TGCGGTATTTACACCG
SRO9-F	ATTGCCACATCTTCCCA	SRO9-R	AGTCTTCTATTGAGATAGTA
SOD1-F	AATCCGAGCCAACCACTGTC	SOD1-R	CGACGCTTCTGCCTACAACG
SOD2-F	GCATTACACCAAGCACCAT	SOD2-R	CTCGTCCAGACTGCCAAAC
EUG1-F	TATCAATCCACTTGCCAAACACTA	EUG1-R	ACCACTGAGTTAGACCAACGGAA
ERO1-F	ATGGTGGTAAGCAAGCTGGTC	ERO1-R	ACCGATAGAGGCATGGAAACC
PDI1-F	CATTCCAGGGTTCCCAAGC	PDI1-R	CGGATTGGACGATAACTGGAG
INO1-F	TGTTCTGTTGTCGGGTTCCCTAAT	INO1-R	CCTGTACGTGCACTTGTCCGGT
LHS1-F	CCAGGTGAACAGCAGCATTATAT	LHS1-R	CTATTGTAACGGGCTGAGTAGTGTC
KAR2-F	ATACGAGGGTGAAAGAGCCATG	KAR2-R	TCGGATTACCAGTTCCTTATCT
FKB2-F	AATCGGGAAGTGTATTTGACTCAA	FKB2-R	TTGGAATTTGCAGCTTTCTTTT
PRP8-F	TCATGGCTGCGTCTGAAGTA	PRP8-R	TTGGAATTTGCAGCTTTCTTTT

**1.2.2 酵母克隆形成能力检测:** 取等量( $OD_{600}$  约为 0.2)的 BY4742 和 *sro9Δ* 菌株,用无菌水进行 5 倍比稀释之后,分别取 5  $\mu$ L 滴在 YPD 培养板和添加了药物的 YPD 培养板上,本实验用到的药物 YPD 培养板有:YPD+0.2 mmol/L CHP、YPD+0.1 mmol/L VK3 和 YPD+2  $\mu$ mol/L TM。然后置于 30  $^{\circ}$ C 恒温培养至克隆形成。

**1.2.3 酵母增殖活性检测:** 取等量( $OD_{600}$  约为 0.1)的 BY4742 和 *sro9Δ* 菌株,置于 YPD 液体培养基(在其中加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 CHP 或者终浓度为 2  $\mu$ mol/L 的 TM,对照组不添加药物),各 3 个复孔。30  $^{\circ}$ C 恒温振荡培养(转速为 150 r/min) 4 h 后加入 WST 染色液,继续恒温培养,每间隔 2 h 用酶标仪测定标本在 450 nm 处的吸光度(操作方法按照微生物活性检测试剂盒-WST 说明书进行),绘制生长曲线。

**1.2.4 抗氧化酶类活性及  $H_2O_2$  含量检测:** 取处于对数生长期的 BY4742 和 *sro9Δ* 菌株的新鲜酵母培养物 5 mL,离心收集菌体后,加入适量的裂解液和酸洗玻璃珠,在涡旋仪上进行反复涡旋破碎酵母。破碎过程中涡旋 10 s,冰浴 20 s,约重复 30 次。4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 20 min,收集上清液。取上清液检测总超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)活性和  $H_2O_2$  含量。检测方法均严格按照相应试剂盒说明书进行。

**1.2.5 荧光定量 PCR 检测基因转录水平:** 取处于对数生长期的新鲜酵母培养物 5 mL,离心收集菌体后,严格按照各试剂盒说明书进行总 RNA 提取、反转录成 cDNA、荧光定量 PCR。本研究检测了内质网应激靶基因(*EUG1*、*ERO1*、*PDI1*、*INO1*、*LSH1*、*KAR2* 和 *FKB2*)以及 SOD 的两个编码基因(*SOD1* 和 *SOD2*)的转录水平,内参基因均为 *PRP8*。扩增引物序列见表 1。

**1.2.6 复制寿命的检测:** 酵母复制寿命的检测方法按照参考文献[6]的方法进行。在显微镜下分离、统计酵母母细胞产生子细胞的个数。

**1.2.7 统计学处理:** 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析。酵母复制寿命结果以平均数表示,采用 Wilcoxon 秩和检验方法进行统计学分析,检验水准 0.05,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 *SRO9* 基因缺失菌株的构建及鉴定

以 pRS306 为模板,扩增含有 *URA3* 基因开放阅读框的 *SRO9* 基因破坏元件,其片段大小为 1 232 bp,PCR 扩增产物大小经琼脂糖凝胶电泳鉴定正确(图 1A)。以野生型菌株和挑取的 *sro9Δ* 阳性克隆菌株基因组为模板,采用位于 *SRO9* 基因内部的鉴定引物进行 PCR。野生型菌株含 *SRO9* 基因,

扩增片段为 175 bp; *sro9Δ* 菌株因不含 *SRO9* 基因, 所以无扩增片段, 与预期相符(图 1B), 表明 *SRO9* 基因缺失酵母菌株构建成功。

## 2.2 *sro9Δ* 菌株对衣霉素的耐受性增强

衣霉素是一种经典的内质网应激诱导剂, 它可以阻碍内质网蛋白质糖基化修饰, 造成内质网中未折叠蛋白质增加, 导致内质网应激。本研究发现: 野生型菌株和 *sro9Δ* 菌株在 YPD 培养板上的克隆形成能力大致相同, 但在 YPD+2 μmol/L TM 培养基上, *sro9Δ* 菌株克隆形成能力较野生型菌株显著升高(图 2A)。另外, 它们在 YPD 培养液中的增殖活性也是基本一致的, 而在 YPD+2 μmol/L TM 培养液中, *sro9Δ* 菌株的增殖活性较野生型菌株快(图 2B)。这说明 *SRO9* 基因缺失后, 菌株对衣霉素的耐受性增强。

## 2.3 内质网应激相关靶基因转录水平的改变

*sro9Δ* 菌株对衣霉素的抗性较野生型菌株增强, 克隆形成较野生型菌株明显。因此猜测 *SRO9* 基因缺失可能会激活保护性的 ERS 靶基因表达上调, 以应对未折叠蛋白对细胞造成的胁迫。为此我们检测了几个常见的酵母 ERS 靶基因转录水平, 结果显示, 在无药物处理的情况下 *sro9Δ* 菌株的 *PDII* 和 *INO1* 基因较野生型菌株表达上调了 48% 和 75% (图 3A); 而在 YPD+2 μmol/L TM 培养 12 h 后, *sro9Δ* 菌株的 *EUG1*、*ERO1*、*PDII*、*INO1* 和 *LSH1* 基因较野生型菌株表达显著上调(图 3B)。

## 2.4 *sro9Δ* 菌株中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水平下降

细胞内质网中过低水平的活性氧(例如 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)不利于内质网中蛋白质二硫键的形成<sup>[7]</sup>, 如果内质网中的蛋白质不能正确折叠则会触发内质网应激反应。由于 *sro9Δ* 菌株中保护性的 ERS 靶基因表达上调(表明存在内质网应激反应), 因此检测了细胞内活性氧 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的含量。结果显示, *sro9Δ* 菌株中的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量比野生型菌株显著降低(图 4A), 同时, 细胞内催化超氧阴离子发生歧化作用而产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 SOD 酶活性(图 4B), 以及其编码基因 *SOD1* 和 *SOD2* 的转录水平都发生了下调(图 4C), 过氧化氢酶的活性无明显改变(图 4D)。

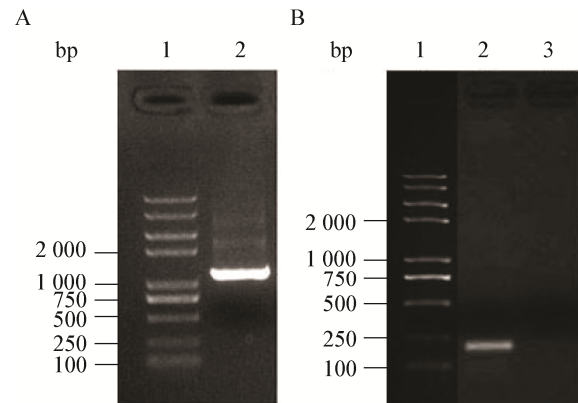


图 1 *SRO9* 基因破坏元件 PCR 扩增产物电泳图(A)及 *sro9Δ* 菌株鉴定图(B)

Figure 1 PCR products of the *SRO9* gene-disruption cassette (A) and the identification of the deletion of *SRO9* (B)  
注: A: 1: DNA marker; 2: *SRO9* 基因破坏元件 PCR 产物; B: 1: DNA marker; 2: 野生型酵母基因组 PCR 产物; 3: *SRO9* 基因缺失菌株的 PCR 产物。

Note: A: 1: Molecular weight marker; 2: PCR products of the *SRO9* gene disruption cassette. B: 1: Molecular weight marker; 2: PCR products of wild type genome; 3: PCR products of *sro9Δ* genome.

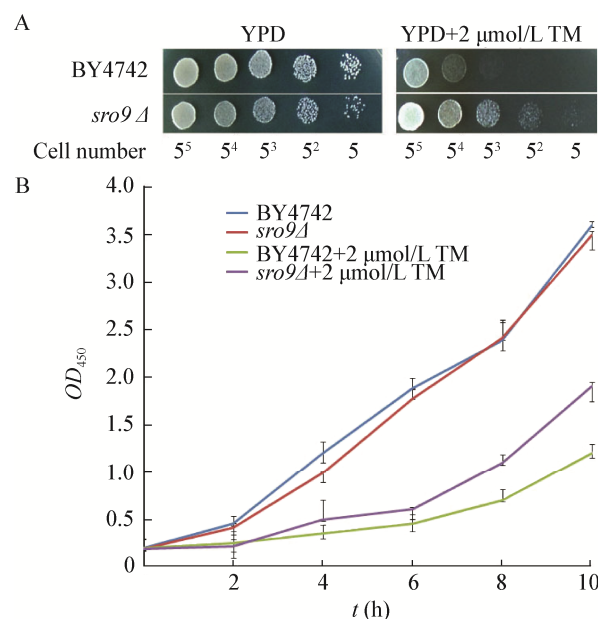


图 2 *sro9Δ* 菌株对内质网应激诱导剂衣霉素的耐受性增加  
Figure 2 *sro9Δ* cells show increased resistance to TM-induced ER stress

注: A: 酵母菌株在含衣霉素培养平板上的克隆形成能力检测; B: 酵母菌株在含衣霉素培养基中的增殖活性检测。

Note: A: Colony-forming ability of yeast was assayed on YPD plates added with TM; B: Proliferation activity of yeast was analyzed in the medium supplied with TM.

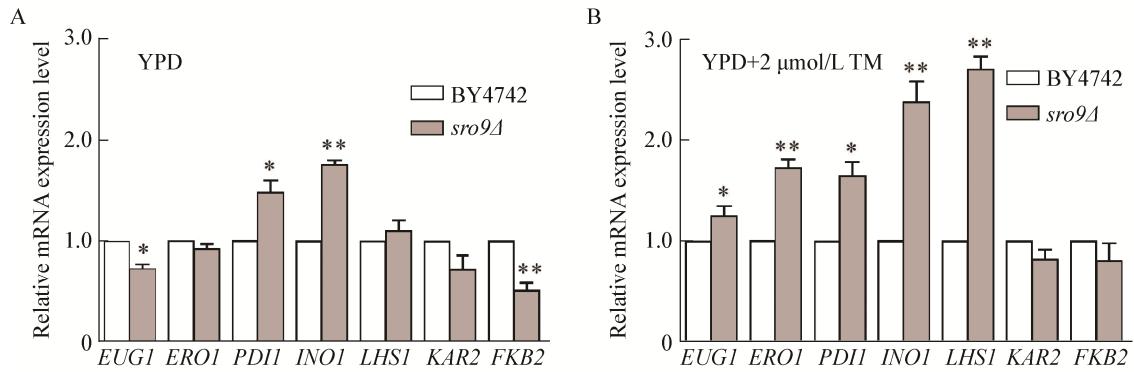


图3 酵母菌株 ERS 靶基因转录水平

Figure 3 The transcription levels of ERS target genes

注：A：不添加衣霉素的培养条件下 ERS 靶基因的转录水平；B：添加衣霉素的培养条件下 ERS 靶基因的转录水平。数据表示为均值±标准差(n=3)。\*：P<0.05；\*\*：P<0.01 vs BY4742。

Note: A: The transcription levels of ERS target genes in the absence of TM; B: The transcription levels of ERS target genes in the presence of TM. The data were expressed as mean ± standard deviation (n=3). P-values represent the statistical significance relative to BY4742 strain: \*: P<0.05; \*\*: P<0.01.

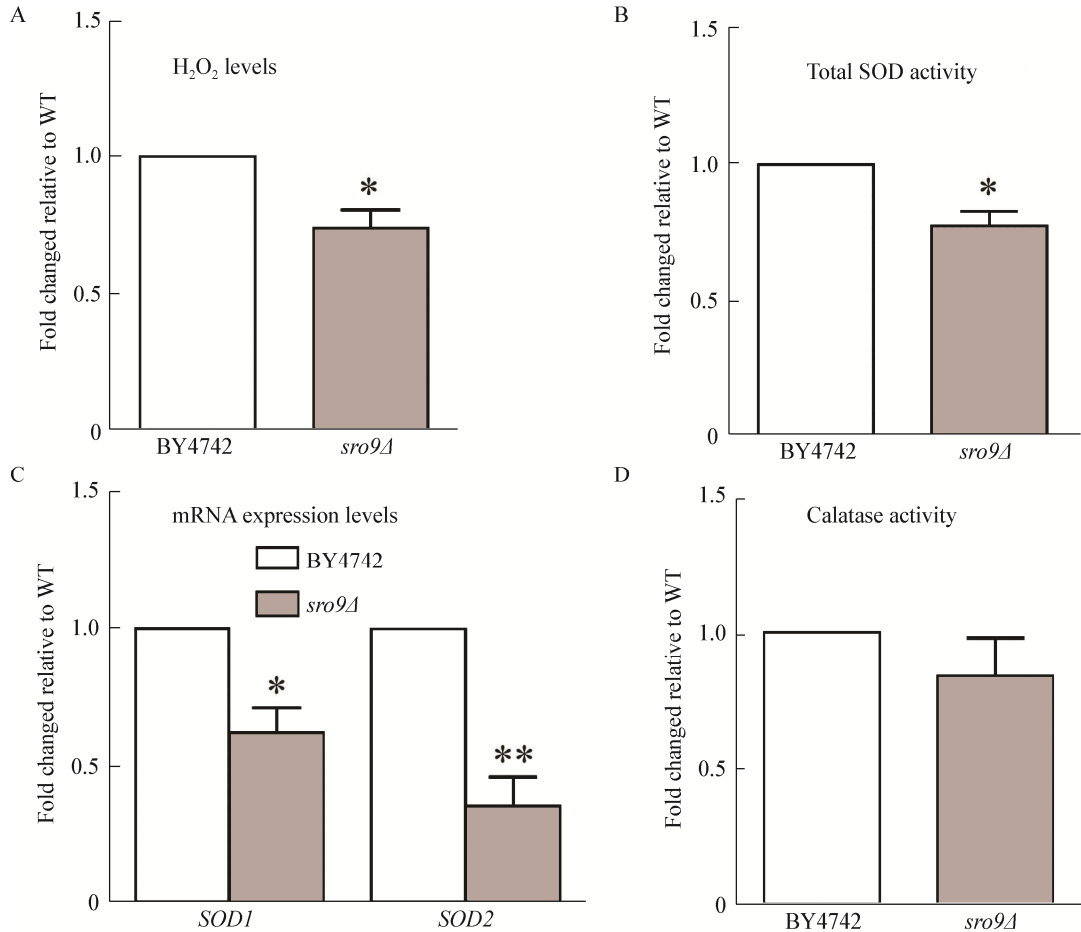


图4 酵母菌株内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量(A)、总 SOD 酶活性(B)、SOD1 和 SOD2 转录水平(C)、过氧化氢酶活性(D)检测  
Figure 4 Intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels(A), total SOD activity(B), expression of SOD1, SOD2 mRNA levels (C) and activity of catalase assay(D) under the unstressed condition.

注：数据表示为均值±标准差(n=3)。\*：P<0.05；\*\*：P<0.01 vs BY4742。

Note: The data were expressed as mean ± standard deviation (n=3). P-values represent the statistical significance relative to BY4742 strain: \*: P<0.05; \*\*: P<0.01.

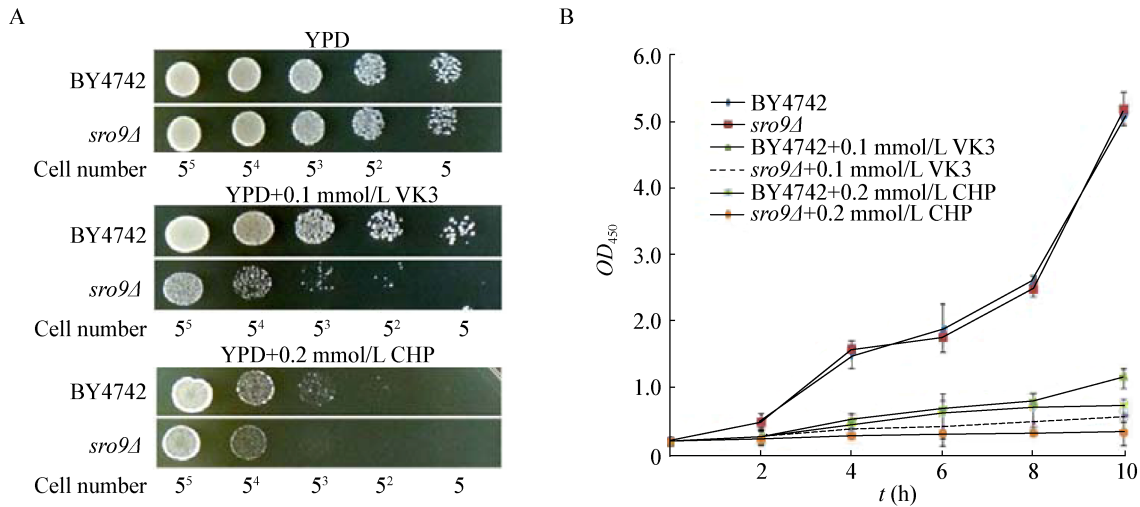


图5 *sro9Δ* 菌株对氧化剂 VK3 和 CHP 敏感

Figure 5 *sro9Δ* cells are sensitive to oxidant VK3 and CHP

注:A:酵母菌株在含氧化剂 VK3 和 CHP 培养平板上的克隆形成能力;B:酵母菌株在含氧化剂 VK3 和 CHP 培养基中的增殖活性。  
Note: A: Colony-forming ability of yeast were assayed on YPD plates added with oxidant VK3 or CHP; B: Proliferation activity of yeast were analyzed in the medium added with oxidant VK3 or CHP.

## 2.5 *sro9Δ* 菌株对氧化剂的耐受性减弱

SOD 是细胞内重要的抗氧化酶, *SOD* 基因的缺失或者下调通常会破坏细胞内的氧化还原平衡, 导致细胞对氧化剂的敏感性增加, 细胞增殖活性降低。进一步的研究发现, 在添加了强氧化剂 CHP 和 VK3 的培养条件下, *sro9Δ* 菌株克隆形成能力较野生型菌株明显减弱(图 5A), 增殖活性也低于野生型菌株(图 5B)。

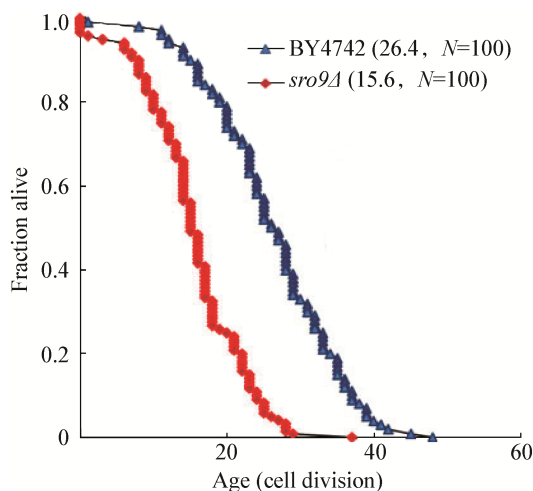


图6 *sro9Δ* 基因缺失菌株的复制型寿命检测

Figure 6 Replicative lifespan assay of *sro9Δ*

## 2.6 *sro9Δ* 菌株复制型寿命缩短

细胞内氧化还原平衡状态与细胞的寿命密切相关。对酵母的复制寿命进行检测结果显示, 野生型菌株的平均寿命为 26.4 代, *sro9Δ* 菌株的平均寿命为 15.6 代(图 6)。*sro9Δ* 菌株较野生型菌株平均寿命缩短了 40.9% ( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

内质网应激是指细胞内质网中未折叠或错误折叠蛋白过度堆积时, 将内质网中的信号传递到细胞核, 继而引起一系列特定的靶基因转录上调和蛋白质翻译水平下调, 以缓解细胞压力的一种反应, 也叫作未折叠蛋白反应(Unfolded protein response, UPR)<sup>[8]</sup>。适度的内质网应激因能激活细胞的保护机制, 对细胞起保护作用; 过强或者持续的内质网应激则会引起细胞死亡或凋亡<sup>[9-10]</sup>。

本研究发现, 相对于野生型菌株, *SRO9* 基因缺失酵母菌株对内质网应激诱导剂衣霉素的耐受能力明显增加, 具体表现在克隆形成能力和细胞增殖活力都比野生型菌株强。衣霉素可以抑制蛋白质糖基化修饰, 使大量异常蛋白在内质网内聚集, 产生 ERS。UPR 靶基因上调是细胞缓解 ERS 的途径

之一,它可以加速未折叠蛋白的折叠,或者使错误折叠的蛋白发生降解<sup>[11-12]</sup>。

进一步的研究显示,在正常培养条件下,相对于野生型菌株,*sro9Δ* 菌株的 UPR 靶基因 *PDII* (调控蛋白质折叠)和 *INO1* (调控基因转录)的转录水平增加,表明细胞内的 UPR 活性上调;在用衣霉素处理后,*sro9Δ* 菌株中 *INO1* 和 *PDII* 的转录水平上调幅度更加明显,参与蛋白质折叠加工的 UPR 靶基因 *EUG1*、*ERO1* 和分子伴侣 *LHS1* 也显著高表达。在酵母中内质网应激感受因子 *IRE1* 可以诱导 UPR 靶基因 *INO1* 的转录,从而调控磷脂生物合成的过程来增加内质网的容积<sup>[13]</sup>;在酵母和哺乳动物中,内质网中分子伴侣和蛋白折叠酶的上调可以提高蛋白的折叠效率,增加内质网对蛋白质的容纳能力<sup>[12,14]</sup>。这些结果暗示 *SRO9* 可能作为负调控因子参与调控内质网应激反应,酵母缺失 *SRO9* 可以诱导激活细胞的 UPR 活性,因此可以在一定程度上提高细胞对内质网应激诱导剂衣霉素的耐受性。

在内质网中,适度的活性氧水平有利于蛋白质中二硫键的形成,如果活性氧不足,会影响蛋白质的正确折叠<sup>[7]</sup>,从而导致内质网应激。我们发现,在不含衣霉素的培养条件下,*sro9Δ* 菌株中的总  $H_2O_2$  (活性氧的一种)水平比野生型菌株显著降低,这种改变可能会影响到细胞内质网中蛋白质的正确折叠,从而激发内质网应激。

细胞内的  $H_2O_2$  主要来源是由 SOD 催化超氧阴离子发生歧化作用产生的, $H_2O_2$  进而在过氧化氢酶的作用下分解为水和氧气<sup>[15]</sup>。酵母细胞只存在 *SOD1* 和 *SOD2* 两个编码基因,进一步研究发现,相对于野生型菌株,*sro9Δ* 菌株中 *SOD1* 和 *SOD2* 的转录水平以及总的超氧化物歧化酶活性都显著降低,过氧化氢酶的活性无明显改变,这可能是 *sro9Δ* 菌株中  $H_2O_2$  含量降低的原因之一。

超氧化物歧化酶是细胞内重要的抗氧化酶,在真核生物中缺失 *SOD1* 和 *SOD2* 会导致细胞对氧化剂的敏感性<sup>[16-18]</sup>,我们的结果也显示 *sro9Δ* 对强氧化剂 CHP 和 VK3 的敏感性增加,暗示 *SRO9* 基因

的缺失可能打破了细胞内氧化还原状态的平衡,这或许也是 *sro9Δ* 菌株复制寿命缩短的原因之一。

内质网应激反应和氧化应激反应是真核细胞中两种重要的应激反应,这两种应激反应既有各自独立的一面,又彼此互相调节,但具体的机制还不甚明了<sup>[19]</sup>。有研究报道,在人视网膜色素上皮细胞中,细胞内氧化还原平衡态的改变可以诱导 UPR 发生<sup>[20]</sup>;另一方面,在内质网应激条件下,内质网中蛋白质二硫键的形成过程中也会产生氧化应激<sup>[21-22]</sup>。本研究也表明 *SRO9* 可能同时参与酵母细胞的内质网应激和氧化应激这两种应激反应。

综上所述,本研究发现酵母 *SRO9* 可能是内质网应激的一个负调控因子,*SRO9* 基因缺失能激活酵母的内质网应激反应,使其可以耐受内质网应激诱导剂对细胞的破坏作用;超氧化物歧化酶 SOD 活性和  $H_2O_2$  水平的下调可能参与 *sro9Δ* 菌株内质网应激反应的激活过程,具体的机制还有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Zhao W, Zheng HZ, Niu YJ, et al. *CIA2* deficiency results in impaired oxidative stress response and enhanced intracellular basal UPR activity in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2015, 362(6): fmv013
- [2] Bousquet-Antonelli C, Deragon JM. A comprehensive analysis of the La-motif protein superfamily[J]. RNA, 2009, 15(5): 750-764
- [3] Sobel SG, Wolin SL. Two yeast La motif-containing proteins are RNA-binding proteins that associate with polyribosomes[J]. Molecular Biology of the Cell, 1999, 10(11): 3849-3862
- [4] Kershaw CJ, Costello JL, Castelli LM, et al. The yeast La related protein Slf1p is a key activator of translation during the oxidative stress response[J]. PLoS Genetics, 2015, 11(1): e1004903
- [5] Baudin A, Ozier-Kalogeropoulos O, Denouel A, et al. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21(14): 3329-3330
- [6] Steffen KK, Kennedy BK, Kaerberlein M. Measuring replicative life span in the budding yeast[J]. Journal of Visualized Experiments: JoVE, 2009(28): 1209
- [7] Watson JD. Type 2 diabetes as a redox disease[J]. The Lancet, 2014, 383(9919): 841-843
- [8] Shamu CE, Walter P. Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus[J]. The EMBO Journal, 1996, 15(12): 3028-3039
- [9] Schröder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response[J]. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2005, 569(1/2): 29-63
- [10] Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress[J]. Trends in Cell Biology, 2004, 14(1): 20-28
- [11] Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, et al. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded

- protein response and ER-associated degradation[J]. *Cell*, 2000, 101(3): 249-258
- [12] Patil C, Walter P. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2001, 13(3): 349-355
- [13] Liu CY, Kaufman RJ. The unfolded protein response[J]. *Journal of Cell Science*, 2003, 116(Pt10): 1861-1862
- [14] W Haoxi, BSH Ng, T Guillaume. Endoplasmic reticulum stress response in yeast and humans[J]. *Bioscience Reports*, 2014, 34(4): 321-330
- [15] Jamieson DJ. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Yeast*, 1998, 14(16): 1511-1527
- [16] Liu XY, Zhang XH, Zhang ZJ. Cu, Zn-superoxide dismutase is required for cell wall structure and for tolerance to cell wall-perturbing agents in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *FEBS Letters*, 2010, 584(6): 1245-1250
- [17] Li YB, Huang TT, Carlson EJ, et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase[J]. *Nature Genetics*, 1995, 11(4): 376-381
- [18] Elchuri S, Oberley TD, Qi WB, et al. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life[J]. *Oncogene*, 2005, 24(3): 367-380
- [19] Kimata Y, Ishiwata-Kimata Y, Yamada S, et al. Yeast unfolded protein response pathway regulates expression of genes for anti-oxidative stress and for cell surface proteins[J]. *Genes to Cells*, 2006, 11(1): 59-69
- [20] Cano M, Wang L, Wan J, et al. Oxidative stress induces mitochondrial dysfunction and a protective unfolded protein response in RPE cells[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2014, 69: 1-14
- [21] Haynes CM, Titus EA, Cooper AA. Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death[J]. *Molecular Cell*, 2004, 15(5): 767-776
- [22] Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease[J]. *Cell*, 2010, 140(6): 900-917

## 征 稿 简 则

### 1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的，以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括：工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果，产业化新技术和新进展，以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有：研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、显微世界、专栏、书讯、会讯等。

### 2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>，点击作者投稿区，第一次投稿请先注册，获得用户名和密码，然后依照提示提交稿件，详见主页“投稿须知”。

### 3 写作要求

来稿要求论点明确，数据可靠，简明通顺，重点突出。

#### 3.1 参考文献

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码，未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过3人时全部列出，多于3人时列出前3人，后加“等”或“et al.”，作者姓前、名后，名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整，不用缩写，不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例：

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. *Electrophoresis*, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)  
王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. *Biochemistry*[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)  
沈同, 王镜岩. *生物化学*[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)  
刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

#### 3.2 脚注(正文首页下方)

Foundation item:

\*Corresponding author: Tel: ; Fax: ; E-mail:

Received: January 01, 20xx; Accepted: March 01, 20xx; Published online (www.cnki.net): March 31, 20xx

基金项目: 基金项目(No. )

\*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-00-00; 接受日期: 20xx-00-00; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 20xx-00-00

(下转 p.2656)