

粟酒裂殖酵母核糖体蛋白 RPL21 表达不足引发细胞粘附

吴红燕¹ 胡南¹ 王新风² 李荣鹏^{1*}

(1. 南京工业大学 生物与制药工程学院 江苏 南京 211816)

(2. 淮阴师范学院 江苏省生物质能与酶技术重点实验室 江苏 淮安 223300)

摘要:【目的】随机选择裂殖酵母核糖体蛋白 RPL21 作为研究对象, 分析其表达不足对细胞的影响。【方法】通过同源臂交换的方法, 敲除裂殖酵母基因组中 RPL21 蛋白的编码基因 *rpl21-1* 和 *rpl21-2*, 观察突变菌株 *rpl21-1Δ* 和 *rpl21-2Δ* 细胞内的核糖体合成情况以及细胞表型变化。【结果】突变菌株 *rpl21-1Δ* 和 *rpl21-2Δ* 细胞内总的 *rpl21* (*rpl21-1+rpl21-2*) 表达水平与野生型菌株相比分别减少了 66.5% 和 58.7%, 合成的核糖体总量较野生型菌株分别下降了 62.8% 和 50.4%。突变菌株在 YEPD 液体培养基中培养时发生细胞粘附现象, 而基因回补的重组菌株 *rpl21-1Δ/RPL21-1* 和 *rpl21-2Δ/RPL21-2* 突变株细胞中粘附现象消失。【结论】核糖体蛋白损伤造成核糖体合成受阻, 进而引发细胞生长过程中的粘附在粟酒裂殖酵母中是普遍存在的现象。

关键词: 粟酒裂殖酵母, 核糖体蛋白 RPL21, 基因敲除, 核糖体合成, 细胞粘附

Disruption of ribosomal protein L21 in fission yeast leads to cell adhesion

WU Hong-Yan¹ HU Nan¹ WANG Xin-Feng² LI Rong-Peng^{1*}

(1. College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing, Jiangsu 211816, China)

(2. Jiangsu Key Laboratory for Biomass-based Energy and Enzyme Technology, Huaiyin Normal University, Huaian, Jiangsu 223300, China)

Abstract: [Objective] To determine the function of ribosome in fission yeast, while ribosomal protein L21 expression were disrupted. [Methods] We deleted *rpl21-1* or *rpl21-2* in the genome of fission yeast, by exchanging homologous regions. Determination of the ribosome synthesis and observation of the physiological properties were performed in *rpl21-1Δ* cells and *rpl21-2Δ* cells cultured in YEPD medium. [Results] Total expressed RPL21 in the *rpl21-1Δ* cells and *rpl21-2Δ* cells, including RPL21-1 and RPL21-2, was reduced by 66.5% and 58.7%, with the synthetic ribosome relevant reduced 62.8% and 50.4%, compared with wild type cells. In YEPD medium, both of the *rpl21-1Δ* cells and *rpl21-2Δ* cells were flocculated. This flocculation was suppressed by heterogeneous expression of RPL21-1 in the *rpl21-1Δ* strain or RPL21-2 in the *rpl21-2Δ* strain. [Conclusion] We suggest that it may be a common feature that reduction of ribosome level could

基金项目: 江苏省博士后基金项目(No. 1301035C); 江苏省生物质能与酶技术重点实验室开放基金项目(No. JSBEET1314)

*通讯作者: Tel: 86-25-58139369; 信箱: lirongpeng@njut.edu.cn

收稿日期: 2013-12-11; 接受日期: 2014-01-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-09

trigger flocculation by disruption of any ribosomal protein expression in fission yeast.

Keywords: Fission yeast, Ribosomal protein L21, Gene disruption, Ribosome synthesis, Cell flocculation

20 世纪 80 年代, 研究者在观察酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的有性生殖过程时首次发现, 大量细胞会聚集在一起形成可见细胞团, 出现明显的细胞粘附现象^[1-2]。粘附是酵母不同交配型的单倍体细胞彼此识别、接触并融合成为二倍体合子, 实现有性生殖的必要过程^[3]。

除了是细胞周期中的关键步骤, 粘附作用还是细胞适应和利用环境的一种重要机制。例如, 致病性的假丝酵母(*Candida albicans*)可以通过粘附到非生命材料——人工血管、导尿管上而到达患者的血液或内脏中。塑料人工血管和导尿管充当了将这些具有耐药性的致病菌输送到人体的工具^[4]。相较于表面感染, 这种内在感染具有更高的死亡率(大于 40%); 因此, 酵母粘附机制在当今的医学领域具有重要意义^[5]。此外, 酵母菌的粘附对食品加工企业具有重要的生产意义。例如, 在啤酒发酵的后期, 酿酒酵母之间可以互相粘附, 从而可以使得酵母方便地、低成本地从各种发酵产物中被分离出来^[6]。

对于酵母的细胞粘附现象和机理的研究, 主要集中于酿酒酵母和假丝酵母^[7]。在这些酵母菌株中, 细胞粘附的诱导、信号在细胞内的传递以及细胞间相互作用的机制都研究得比较清楚^[8-11]。而粟酒裂殖酵母(*Schizasaccharomyces pombe*)中报道的

细胞粘附现象还不多, 主要见于高酒精浓度下的细胞粘附或者是在半乳糖诱导下产生的突变菌株中^[12-13]。Kim 等报道当敲除一种 LAMMER 激酶同源蛋白的编码基因——*lkh1* 时, 裂殖酵母细胞也会出现絮凝现象^[14]。这是极少数发现的基因缺失会直接造成絮凝现象产生的报道。但是这个蛋白本身的功能尚不明确, 因此, 其引起细胞间作用的机制和造成絮凝的分子机理并不清楚。

我们在之前的报道中指出, 敲除粟酒裂殖酵母核糖体蛋白 RPL32 的编码基因会造成核糖体损伤并引发细胞间的粘附现象, 并推测这种机制有可能广泛存在于每个核糖体组成蛋白之中^[15]。本研究随机选取另一种核糖体蛋白——RPL21, 作为研究对象, 观察敲除其编码基因后核糖体水平和细胞水平的一系列变化, 实验结果将是对核糖体蛋白损伤可以引发细胞粘附具有普遍性这一假设的重要补充证据。

1 材料与方法

1.1 菌种

本研究使用的粟酒裂殖酵母菌株信息见表 1。除 SPQ-01 菌株购自 Stratagene 公司以外, 其他所用菌株均为本实验室构建(表 1)。

表 1 本研究使用的粟酒裂殖酵母菌株 Table 1 Fission yeast strains used in this study		
菌株 Strains	基因型 Genotype	来源 Resource
SPQ-01 (WT)	<i>h⁻, leu1-32</i>	Stratagene
SPQ-01/pESP3	<i>h⁻, leu1-32/pESP3</i>	本研究
SPQ-01 <i>rpl21-1Δ</i>	<i>h⁻, rpl21-1::kanmx6⁺, leu1-32</i>	本研究
SPQ-01 <i>rpl21-2Δ</i>	<i>h⁻, rpl21-2::kanmx6⁺, leu1-32</i>	本研究
SPQ-01 <i>rpl21-1Δ</i> /pESP3	<i>h⁻, rpl21-1::kanmx6⁺, leu1-32/pESP3</i>	本研究
SPQ-01 <i>rpl21-2Δ</i> /pESP3	<i>h⁻, rpl21-2::kanmx6⁺, leu1-32/pESP3</i>	本研究
SPQ-01 <i>rpl21-1Δ</i> /RPL21-1	<i>h⁻, rpl21-1::kanmx6⁺, leu1-32/pESP3-rpl21-1</i>	本研究
SPQ-01 <i>rpl21-2Δ</i> /RPL21-2	<i>h⁻, rpl21-2::kanmx6⁺, leu1-32/pESP3-rpl21-2</i>	本研究

1.2 培养基

YEPD (g/L): 酵母膏 10, 蛋白胨 20, 葡萄糖 20。LB (g/L): 酵母膏 5, 蛋白胨 10, 氯化钠 10。EMM2 (g/L): 邻苯二甲酸氢钾 3, 磷酸氢二钠 2.2, 氯化铵 5, 葡萄糖 20, 盐 20 mL/L, 维生素 1 mL/L, 微量元素 0.1 mL/L; 其中, 盐组成为六水合氯化镁 52.500, 二水合氯化钙 0.735, 氯化钾 50.000, 硫酸钠 2.000; 维生素组成为泛酸 1.000, 烟酸 10.000, 肌糖 10.000, 生物素 0.010; 微量元素组成为硼酸 5.0, 硫酸锰 4.0, 七水合硫酸锌 4.0, 六水合氯化亚铁 2.0, 钼酸 0.4, 碘化钾 1.0, 五水合硫酸铜 0.4, 柠檬酸 10.0。

抗生素的添加依据具体实验而定。

1.3 生长曲线

酵母细胞接种在 100 mL YEPD 液体培养基中, 30 °C、220 r/min 培养, 每隔 4 d 取 2 mL 细胞培养液, 3 000 r/min 离心 2 min 收集细胞, 然后用 2 mL 100 mmol/L EDTA 处理细胞 2 次, 最后重悬于 2 mL 0.2 mol/L 的 PBS 缓冲液中, 在血球计数板中观察并计算细胞密度, 最后用 Origin 8.0 软件绘制生长曲线。

1.4 基因敲除和回补突变株的构建

设计特异性引物(表 2), 首先以 SPQ-01 的基因组为模板扩增出 *rpl21* 上下游同源臂, 然后以回收的同源臂、带抗性标签 *kanmx6*⁺ 基因的质粒 pFA6a 混合物为模板, 扩增获得含有 RPL21 编码基因上下游同源臂和抗性标签 KanMX6 的融合 DNA 片段, 通过 LiAC 转化方法^[16], 将 DNA 片段转化到 SPQ-01 中, 涂布 YEPD (G418) 平板, 30 °C 静置培养 3–5 d。融合片段和基因组发生交换^[17], 敲除了 *rpl21* 的含 *kanmx6*⁺ 基因的阳性克隆可以在该平板上长出(图 1A)。

回补的 *rpl21* 基因通过特异性引物(表 2)以 SPQ-01 基因组为模板扩增获得, 通过 *Nde* I-*Bam* H I 酶切位点酶切连接到过表达质粒 pESP3 上, 并通过 LiAC 转化方法^[16], 将 DNA 片段转化到敲除了 *rpl21* 的菌株中, 涂布 EMM2 平板, 30 °C 静置培

表 2 本研究使用的引物 Table 2 Primers used in this study	
引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'→3')
基因敲除引物 Gene knockout primers	
<i>rpl21-1</i> knockout	
RPL21-1D1	gtatatattctgtaaatcacc
RPL21-1D2	gcaagctaacagatgggtattccctta
RPL21-1D3	catccagtttaaagctaactctaataacg
RPL21-1D4	agttttttgtcagtgtgttg
<i>rpl21-2</i> knockout	
RPL21-2D1	tagttctgaataagcgcaacataa
RPL21-2D2	gcaagctaacagatcttctgttcctg
RPL21-2D3	catccagtttaaattttaaaaagaatg
RPL21-2D4	ttttgcagccttcacgaatgt
回补实验引物 Recomplement primers	
<i>rpl21-1</i> recomplement expression	
upL21-1	atcccatatgatgcctcattcctatg (<i>Nde</i> I)
doL21-1	gcagggatccctaaatgtatcatag (<i>Bam</i> H I)
<i>rpl21-2</i> recomplement expression	
upL21-2	atcccatatgatgcctcattcttcaggatc (<i>Nde</i> I)
doL21-2	gcagggatccctagatagtagtatgat (<i>Bam</i> H I)
Real-Time PCR primers	
Identification of <i>rpl21-1</i>	
SP2101F	ctatcctattagagctcgtac
SP2101R	ccaacttgttaagttttcaag
Identification of <i>rpl21-2</i>	
SP2102F	ttacggtatcagagctcgca
SP2102R	cttataggtcttcaaataagt
<i>β-actin</i> internal control gene	
SPACTF	ggattcctacgttggtgaagctc
SPACTR	gggttcaaaggagcctcaaac

养 3–5 d。含回补表达 *rpl21* 的阳性克隆可以在该平板上长出。

1.5 基因表达定量分析(Real-Time PCR)

用 TRIzol reagent (Invitrogen)提取细胞的总 RNA, 并用 RNase-free 的 DNase I (TaKaRa)处理, 去除残留的基因组 DNA。取 10 ng 提取的 RNA 为模板, 用 SuperScript III first-strand synthesis 试剂盒(Invitrogen)逆转录合成第一链 cDNA。以合成的 cDNA 做模板, 用特异性引物(表 2)扩增待测基因。

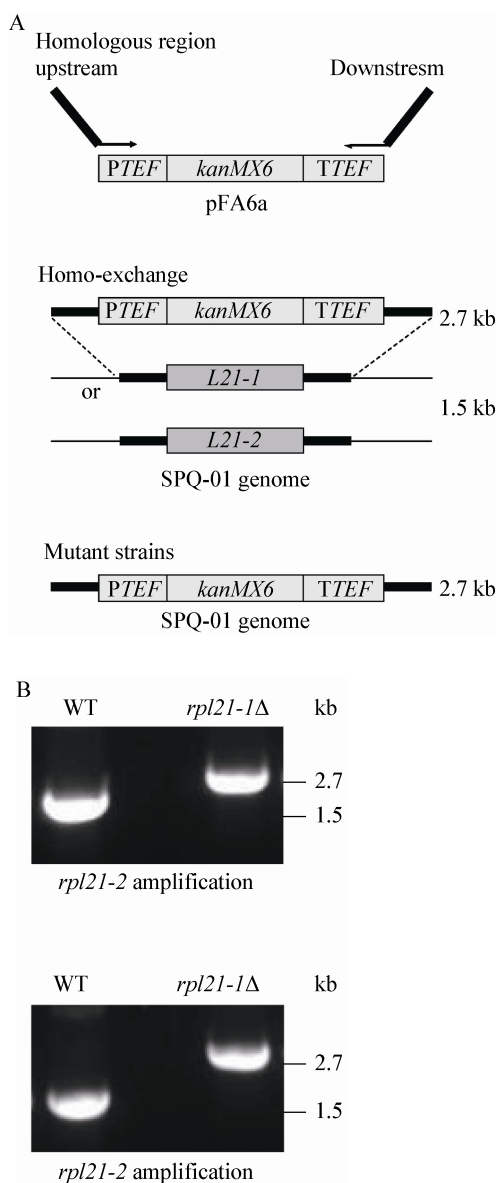


图1 裂殖酵母基因组 **RPL21** 编码基因敲除

Figure 1 Deletion of RPL21 coding gene in genome of fission yeast

注：A：同源臂交换示意图；B：PCR 扩增鉴定基因敲除菌株。
Note: A: Sketch of homologous region changes; B: Determination of gene deleted strains by PCR amplification.

表达量保守的 β -actin 基因作为内参对 *rpl21-1* 和 *rpl21-2* 基因定量。Real-Time PCR 实验在 Rotor-Gene Q5/6 plex system (QIAGEN) 上完成，数据采集后用 Microsoft Excel 软件分析计算。所有实验均至少独立重复 3 次，每次均为 3 组平行。

1.6 核糖体定量分析

酵母细胞在 YEPD 液体培养基中培养至 OD_{600} 为 1.0 时，加入放线菌酮至终浓度为 0.1 g/L，30 °C 孵育 20 min 后冰上静置 10 min，4 °C 离心收集细胞，并用 1 mL 核糖体裂解液 (20 mmol/L pH 7.5 Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT, 0.1 g/L 放线菌酮, 0.2 g/L 肝素) 处理，并加入 Protease 抑制剂 (Roche) 和 RNase 抑制剂 (Promega)；细胞转移到含 0.5 g 玻璃珠的 15 mL 离心管中，每 6 s 间隔高速振荡 10 s 破碎细胞；4 °C 下 3 500 r/min 离心，去除玻璃珠和细胞碎片，然后 14 000 r/min 高速离心上清液 15 min。取 15 个 A_{260} 单位的核糖体提取液加入到含 5% 至 50% 蔗糖密度梯度的核糖体裂解液中，在贝克曼 SW41 型超速离心机中，44 000 r/min 离心 4 h，核糖体各组分随着密度梯度分散开，并通过紫外吸收光谱检测。核糖体各组分浓度通过吸收峰的面积计算获得^[18-19]。

1.7 细胞形态观察

群落照片：取 2 mL 培养到稳定期的酵母细胞 (OD_{600} 约为 7.0) 于共聚焦培养皿中，静置 10 min 后用 Nikon D3100 相机拍照。

显微照片：取 5 μ L 培养到稳定期的酵母细胞 (OD_{600} 约为 7.0) 于载玻片上，用蔡司 Axio Image A1 型号显微镜观察，使用镜头为 63 倍微分干涉镜头 (NA=1.4)，通过 Sensicam QE 成像系统获得照片。

1.8 沉降系数测定

取 2 mL 培养到对数后期的酵母细胞 (OD_{600} 约为 5.0) 与 5 mL 离心管中。两份平行样为一组实验：两管细胞同时振荡混匀后，小心吸取其中一管表层 400 μ L 菌液测定 OD_{600} 吸收峰，记为 $A_{t=0}$ ，静置 10 min 后，取另一管表层 400 μ L 菌液测定 OD_{600} 吸收峰，记为 $A_{t=10}$ ，细胞沉降系数计算为 $V=1-A_{t=0}/A_{t=10}$ 。

2 结果与讨论

2.1 核糖体蛋白 RPL21 编码基因敲除的突变菌株构建

核糖体蛋白 RPL21 是裂殖酵母核糖体大亚基

的组成蛋白之一,由一对同源基因编码,分别是位于 2 号染色体的 *rpl21-1* (SPBC365.03c)和位于 1 号染色体的 *rpl21-2* (SPAC959.08),两个编码基因核酸序列高度同源(相似性 91.3%,图 2A)。RPL21 的两个蛋白质氨基酸序列同源性更是高达 99.38%,仅仅在第 137 位一个氨基酸不一样(*rpl21-1* K vs *rpl21-2* T,图 2B)。因为氨基酸序列几乎没有差别,两种 RPL21 蛋白在参与核糖体大亚基的组装时,承担的功能推测是一致的,不存在功能差异性。

为了研究核糖体蛋白 RPL21 的功能,我们通过酵母基因组同源臂双交换的方法^[17],将抗性基因 *kanmx6⁺* 替换到基因组上 *rpl21-1* 和 *rpl21-2* 的位置,构建 RPL21 编码基因缺失的裂殖酵母突变株。带有该抗性基因的裂殖酵母阳性突变株可以在含有抗生素 G418 的 YEPD 平板上生长。为了进一步确认突变株的正确性,我们提取了突变株的基因组,扩增包括同源臂在内的 DNA 片段。如图 1A 所示,野生型的裂殖酵母中,含同源臂的 RPL21 编码基因 DNA 片段全长约为 1.5 kb,而带有插入基因 *kanmx6⁺* 的 DNA 片段全长为 2.7 kb;从实验结果来看,从突变株 SPQ-01 *rpl21-1Δ* 和 SPQ-01 *rpl21-2Δ* 基因组模板扩增获得的 DNA 片段都为 2.7 kb (图 1B),说明成功获得了敲除 *rpl21-1* 和 *rpl21-2* 的突变菌株。

2.2 RPL21 基因敲除造成核糖体损伤

通过 Real-Time PCR 可以分析基因在细胞内

的表达水平变化。一些保守基因,如 *actin* 和 16S rRNA 被认为其在细胞的不同时期表达水平都是基本恒定不变的,因此常常被选作内参基因,根据其表达水平的比较来给目的基因表达定量。本研究中,选择 *β-actin* 作为内参基因,分析在编码基因敲除的突变株中 RPL21 的表达水平。结果显示,突变株 SPQ-01 *rpl21-1Δ* 中检测不到 RPL21-1 的 mRNA;突变株 SPQ-01 *rpl21-2Δ* 中检测不到 RPL21-2 的 mRNA (图 3A)。同时,我们注意到突变株细胞中另一个未被敲除的同源基因 mRNA 水平非但没有增加来补充敲除基因的损伤,反而还略有下降,因此我们推测在核糖体大亚基组装时,两种蛋白各司其职,不是互相补充的作用。在野生型 SPQ-01 中,总的 *rpl21* (*rpl21-1*+*rpl21-2*)表达水平为内参基因 *β-actin* 表达量的 1.85 倍,基因敲除的突变菌株中总的 mRNA 含量与之相比,分别下降 66.5%和 58.7% (图 3A)。

同时,我们分析了细胞内的核糖体水平变化。核糖体各组份在密度梯度分布的蔗糖溶液中,通过超速离心可以互相分离,从顶部到底部依次是核糖体碎片、40S 亚基、60S 亚基、80S 复合体和多聚核糖体。从图 3B 中可以看出,40S 亚基合成没有太大的变化,60S 亚基和 80S 亚基合成显著下降,在突变菌株中 60S 亚基合成分别下降了 62.8%和 50.4%,这和 RPL21 是 60S 大亚基组成蛋白的结果是一致的。因此,我们确认敲除核糖体蛋白 RPL21 基因会导致 mRNA 合成减少,进而造成细胞核糖

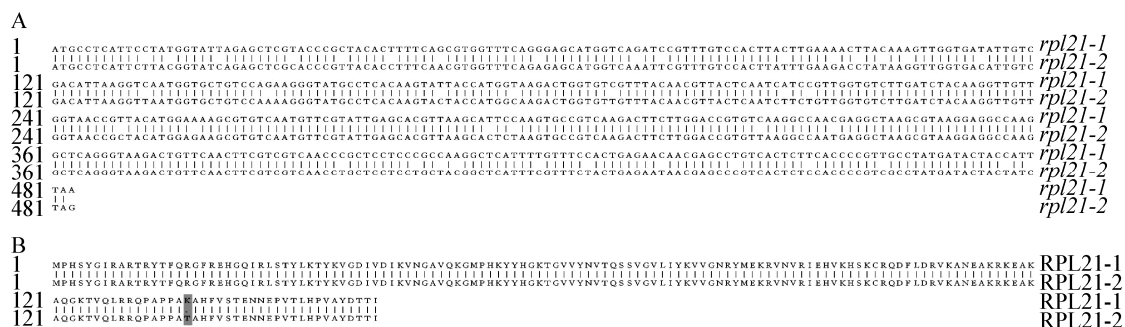


图 2 核糖体蛋白 RPL21-1、RPL21-2 的核酸序列(A)和氨基酸序列(B)比对

Figure 2 Alignment of nucleotide (A) and amino acids (B) sequences in RPL21-1 and RPL21-2

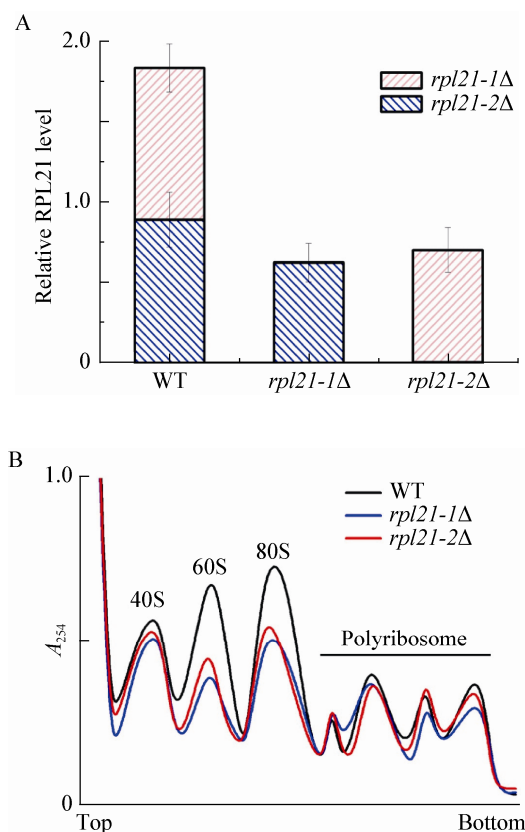


图3 裂殖酵母 RPL21 相对表达水平的 Real-Time PCR 检测(A)和细胞内核糖体合成水平检查(B)

Figure 3 Quantification of RPL21 transcript abundance by QPCR (A) and ribosome profiles in cells (B)

体合成不足。

2.3 RPL21 基因敲除影响细胞生长和细胞形态

我们将野生型 SPQ-01 和敲除了 RPL21 编码基因的突变株 SPQ-01 *rpl21-1Δ* 和 SPQ-01 *rpl21-2Δ* 接种到 YEPD 液体培养基中,连续检测细胞数量,绘制细胞生长曲线。从图 4A 中可以看出,敲除 RPL21 的突变株,其生长速度比野生型酵母显著降低,计算后显示生长速率都约只有 SPQ-01 的一半(表 3),说明敲除 RPL21 编码基因对细胞正常生长具有较大的影响。而突变株 SPQ-01 *rpl21-1Δ* 和 SPQ-01 *rpl21-2Δ* 之间的生长速率比较差异不大,说明敲除 RPL21 蛋白的任一编码基因对于细胞生长的影响几乎是等效的。

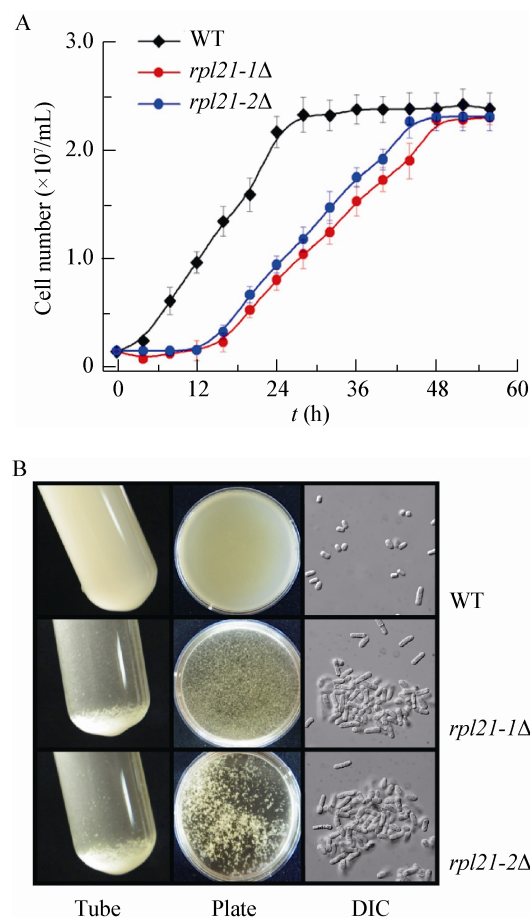


图4 RPL21 基因敲除突变株的生长速率测定(A)和细胞形态观察(B)

Figure 4 Growth curves (A) and observation (B) of *rpl21* deleted mutant cells

表3 酵母细胞在 YEPD 培养基中的生长速率数据
Table 3 Growth rate in YEPD medium

菌种 Strain	WT	<i>rpl21-1Δ</i>	<i>rpl21-2Δ</i>
代时 Time (h)	2.94±0.23	4.730±0.250	4.540±0.260
生长速率 Growth rate (10^7 cells/h)	1.01±0.12	0.591±0.110	0.538±0.130

细胞形态观察结果表明,在 YEPD 培养基中培养后,突变株 SPQ-01 *rpl21-1Δ* 和 SPQ-01 *rpl21-2Δ* 均相互粘附在一起形成肉眼可见的细胞团,并迅速沉降到试管底部,而在同样条件下野生型菌株 SPQ-01 的细胞在培养基中却是均匀分布的。

(图 4B)。计算细胞沉降率发现, SPQ-01 菌株在室温静置 10 min 后的自然沉降率平均为 9.85%, 而同样条件下, 突变株 SPQ-01 *rpl21-1Δ* 和 SPQ-01 *rpl21-2Δ* 的沉降率分别是 67.4% 和 70.2%, 约为对照组的 7–8 倍。这一结果和已知的核糖体蛋白 RPL32 基因敲除引发絮凝的结果类似^[15], 但似乎缺失 RPL21 对细胞生长和细胞形态影响更大。

2.4 细胞粘附现象可以通过外源回补表达 RPL21 抑制

为了确认核糖体蛋白 RPL21 表达不足是引发细胞粘附现象的直接原因, 我们克隆了 *rpl21-1* 和 *rpl21-2* 基因, 利用裂殖酵母的 pESP3 外源基因表达系统, 构建了表达质粒 pESP3-*rpl21-1* 和 pESP3-*rpl21-2*, 分别转化到对应敲除 *rpl21-1* 和 *rpl21-2* 基因的突变株中, 构建敲除后回补 RPL21 的突变菌株 SPQ-01 *rpl21-1Δ*/RPL21-1 和 SPQ-01 *rpl21-2Δ*/RPL21-2。同时, 为了实验结果的可比性, 在其他菌株中都转入空质粒 pESP3, 构建对照菌株 SPQ-01/pESP3、SPQ-01 *rpl21-1Δ*/pESP3 和 SPQ-01 *rpl21-2Δ*/pESP3。

实验时先将对照组、基因敲除组和基因敲除回补组酵母细胞在 EMM2 培养基中培养至稳定期, 以便维持选择压力, 防止培养过程中重组菌株表达质粒的丢失, 使 SPQ-01 *rpl21-1Δ*/RPL21-1 和 SPQ-01 *rpl21-2Δ*/RPL21-2 菌株能分别大量合成重组表达的 RPL21-1 和 RPL21-2 蛋白。然后收集细胞, 重悬于等体积 YEPD 培养基中继续培养 3 h。结果显示, 基因敲除突变株 SPQ-01 *rpl21-1Δ*/pESP3 和 SPQ-01 *rpl21-2Δ*/pESP3 在 YEPD 培养基中发生细胞粘附现象, 而外源表达回补 RPL21 蛋白的突变株 SPQ-01 *rpl21-1Δ*/RPL21-1 和 SPQ-01 *rpl21-2Δ*/RPL21-2 中细胞粘附作用完全消失(图 5)。由于 RPL21 编码基因缺失即引发细胞粘附, 而一回补外源 RPL21 蛋白则恢复正常, 说明 RPL21 蛋白的表达水平降低是引发细胞粘附的直接原因。

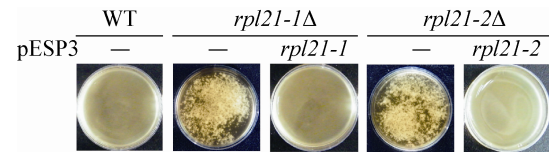


图 5 RPL21 蛋白基因敲除回补突变株的形态观察
Figure 5 Observation of RPL21 complementation cells

3 结论

结果显示, 在裂殖酵母中, 敲除单拷贝的核糖体蛋白 RPL21 编码基因后, RPL21 蛋白合成不足, 细胞内核糖体水平整体下降, 细胞生长速率变缓, 并在生长过程中出现相互粘附的现象。这些和之前报道的敲除核糖体蛋白 RPL32 编码基因后的现象是极其类似的。由于 RPL21 蛋白是随机选择的, 因此我们从实验证据中确认, 由于某个核糖体组成蛋白的缺失造成核糖体合成受阻, 进而引发细胞生长过程中的粘附现象是所有裂殖酵母核糖体组成蛋白的共性。

研究表明, 酵母细胞间的粘附一般出现在环境条件不利的情况下^[7]。环境营养不足的信号, 通过雷帕霉素受体(TOR)介导的一系列蛋白激酶和磷酸酶参与的反应途径^[20], 或者 ras-cAMP 蛋白激酶 A (PKA)途径^[21], 传递到细胞内, 最终导致核糖体和 rRNA 合成受阻^[22-23], 引起细胞粘附^[7], 这种抑制被称之为“严谨反应”^[24]。实际上, 当环境中的碳源小于细胞所需最大值的30%时, 细胞就停止核糖体的合成^[23]。因为核糖体组装需要其组装单元-核糖体蛋白和 rRNA 表达水平处于平衡状态, 如果一种或者多种组分的表达水平下降, 会大幅降低核糖体这一蛋白质转录翻译机器的组装效率。如敲除酿酒酵母 *S. cerevisiae* 核糖体蛋白 RPL16 后, 降低细胞内 60S 核糖体亚基水平, 最终细胞内的核糖体只有正常的一半^[18]。这也就解释了为什么报道中单独敲除一种核糖体蛋白 RPL32-1 或 RPL32-2^[15], 或本研究中单独敲除的核糖体蛋白 RPL21-1 或 RPL21-2, 就可引起整个核糖体合成下降, 导致细胞粘附作用发生。

在这个严谨反应信号传递途径中, 核糖体数量

的下限阈值很可能就是启动絮凝作用发生的“扳机”，作为负调节作用引发絮凝蛋白转录，从而有利于细胞之间的粘附。敲除核糖体蛋白 RPL32-1 或 RPL32-2 后，合成的核糖体蛋白总量分别下降了 31.1% 和 27.8%，因此推测核糖体总量下降 30% 为引发裂殖酵母细胞粘附的阈值^[15]。而在本研究中敲除核糖体蛋白 RPL21-1 或 RPL21-2 后的核糖体总量下降了 62.8% 和 50.4%，核糖体总量的下降显著超过阈值，因此细胞粘附现象发生；并且更严重的核糖体损伤可能也是引起更显著细胞粘附沉降的原因，敲除 RPL21 突变株的沉降率约为 70%，而在敲除 RPL32 的突变株中，沉降率仅约为 45%^[15]。

总之我们认为，通过人为的基因敲除的方法损伤个别核糖体组成蛋白，将导致整体的核糖体合成受阻，这与环境营养不足时导致的核糖体损伤一样，最终引起了同样的细胞粘附现象产生。由于每一种核糖体组成蛋白对核糖体的正确组装来说都必不可少，因此，任何一种蛋白缺失都会导致类似的细胞粘附现象，只是程度有所不同，这和本研究的结果是一致的。

参 考 文 献

- [1] Miyata M, Doi H, Miyata H, et al. Sexual co-flocculation by heterothallic cells of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* modulated by medium constituents[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1997, 71(3): 207-215.
- [2] Johnson BF, Walker T, Miyata M, et al. Sexual co-flocculation and asexual self-flocculation of heterothallic fission yeast cells (*Schizosaccharomyces pombe*)[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1987, 33(8): 684-688.
- [3] Bardwell L, Cook JG, Inouye CJ, et al. Signal propagation and regulation in the mating pheromone response pathway of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Developmental Biology*, 1994, 166(2): 363-379.
- [4] Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infection of medical devices[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004, 17(2): 255-267.
- [5] Wisolringhoff H, Bischoff T, Tallent SM, et al. Nosocomial bloodstream infections in U.S. hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2004, 39(3): 309-317.
- [6] Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Verachtert H, et al. Yeast flocculation: what brewers should know[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 61(3): 197-205.
- [7] Verstrepen KJ, Klis FM. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 60(1): 5-15.
- [8] Verstrepen KJ, Reynolds TB, Fink JR. Origins of variation in the fungal cell surface[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2: 533-540.
- [9] Maidan MM, De RL, Serneels J, et al. The G protein-coupled receptor Gpr1 and the Galpha protein Gpa2 act through the cAMP-protein kinase A pathway to induce morphogenesis in *Candida albicans*[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16(4): 1971-1986.
- [10] Gagliano M, Bauer FF, Pretorius IS. The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *FEMS Yeast Research*, 2002, 2(4): 433-470.
- [11] Sampermans S, Mortier J, Soares EV. Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of nutrients[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 98(2): 525-531.
- [12] Maraz A, Geleta A. Ethanol-induced cell aggregation (Flocculation) and its physiological background in *Schizosaccharomyces pombe* 4-2-1[J]. *Acta Biologica Hungarica*, 2001, 52(2/3): 231-239.
- [13] Tanaka N, Awai A, Shan M, et al. Cell surface galactosylation is essential for nonsexual flocculation in *Schizosaccharomyces pombe*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(4): 1356-1359.
- [14] Kim TS, Jang CY, Kim HD, et al. Interaction of Hsp90 with ribosomal proteins protects from ubiquitination and proteasome-dependent degradation[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2006, 17(2): 824-833.
- [15] Li RP, Li XS, Sun L, et al. Reduction of ribosome level triggers flocculation of fission yeast cells[J]. *Eukaryotic Cell*, 2013, 12(3): 450-459.
- [16] Keeney JB, Boeke JD. Efficient targeted integration at *leu1-32* and *ura4-294* in *Schizosaccharomyces pombe*[J]. *Genetics*, 1994, 136(3): 849-856.
- [17] Bahler J, Wu JQ, Longtine MS, et al. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*[J]. *Yeast*, 1998, 14(10): 943-951.
- [18] Rotenberg MO, Moritz M, Woolford JL. Depletion of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal protein L16 causes a decrease in 60S ribosomal subunits and formation of half-mer polyribosomes[J]. *Genes & Development*, 1988, 2(2): 160-172.
- [19] Kraig E, Haber JE. Messenger ribonucleic acid and protein metabolism during sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1980, 144(3): 1098-1112.
- [20] Thomas G, Hall MN. TOR signaling and control of cell growth[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 1997, 9(6): 782-787.
- [21] Klein C, Struhl K. Protein kinase A mediates growth-regulated expression of yeast ribosomal protein genes by modulating RAP1 transcriptional activity[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14(3): 1920-1928.
- [22] Warner-Washburne M, Braun E, Johnston GC, et al. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbiological Reviews*, 1993, 57(2): 383-401.
- [23] Ju Q, Warner JR. Ribosome synthesis during the growth cycle of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Yeast*, 1994, 10(2): 151-157.
- [24] Woolford Jr JL, Warner JR. The ribosome and its synthesis[A]//Broach JR, Pringle JR, Jones EW, eds. *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetics*[M]. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991: 587-626.