

灰葡萄孢菌 *AUR1* 基因真核表达载体的构建、表达及酶活性分析

邱永春, 刘小平, 苟萍

新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046

邱永春, 刘小平, 苟萍. 灰葡萄孢菌 *AUR1* 基因真核表达载体的构建、表达及酶活性分析. 生物工程学报, 2013, 29(1): 78-86.

Qiu YC, Liu XP, Gou P. Construction, expression and enzymatic activity analysis of *AUR1* eukaryotic expression vector of *Botrytis cinerea*. Chin J Biotech, 2013, 29(1): 78-86.

摘要: 为了研究灰葡萄孢菌肌糖磷脂酰神经酰胺合成酶 (*BcAUR1* 基因) 的表达及酶活性, 采用 RT-PCR 方法, 利用含有 FLAG 标签以及 *Bam*H I、*Xho* I 酶切位点的 *AUR1* 特异引物从灰葡萄孢菌中扩增得到 *BcAUR1* 基因。将 *BcAUR1* 基因与穿梭质粒 pYES2 重组, 得到 pYES2-*BcAUR1* 质粒采用醋酸锂转化法导入酿酒酵母尿嘧啶突变菌株 Δ yor1 中, Western blotting 检测肌糖磷脂酰神经酰胺 (IPC) 合成酶表达, HPLC 检测 IPC 合成酶活力。结果显示 pYES2-*BcAUR1* 在酿酒酵母尿嘧啶突变菌株 Δ yor1 中获得表达, pYES2-*BcAUR1* 转化子 IPC 合成酶活性显著增高, 比空载转化子约提高 1 倍。低浓度的 AbA 能够抑制空载 pYES2 酵母转化子生长, 但 pYES2-*BcAUR1* 酵母转化子能抵抗 AbA 对菌体生长的抑制。

关键词: pYES2 穿梭载体, 灰葡萄孢菌, 肌糖磷脂酰神经酰胺合成酶, 短梗霉素 A, 酶活力

Construction, expression and enzymatic activity analysis of *AUR1* eukaryotic expression vector of *Botrytis cinerea*

Yongchun Qiu, Xiaoping Liu, and Ping Gou

College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, Xinjiang, China

Abstract: In order to study the expression and the activity of inositol phosphorylceramide synthase (*BcAUR1* gene) in *Botrytis cinerea*, we amplified *BcAUR1* by RT-PCR from *Botrytis cinerea*, using the special primers with FLAG and *Bam*H I/*Xho* I restriction sites. Recombinant pYES2-*BcAUR1* was constructed to transform into *Saccharomyces cerevisiae*

Received: July 31, 2012; **Accepted:** September 17, 2012

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30760131).

Corresponding author: Ping Gou. Tel: +86-991-8879585; E-mail: gou_ping@sina.com

国家自然科学基金 (No. 30760131) 资助。

$\Delta yor1$ by LiAC. The expression of inositol phosphorylceramide (IPC) synthase and its activity were detected by Western blotting and HPLC, respectively. The results show that pYES2-*BcAURI* could express in uracil mutant $\Delta yor1$ of *Saccharomyces cerevisiae*. IPC synthase enzyme activity of pYES2-*BcAURI* transformants significantly increased and was approximately double than no-load *BcAURI* transformants. The low concentration of Aureobasidin A could inhibit growth of no-load *BcAURI* transformants, but pYES2-*BcAURI* transformants could resist fungal growth inhibition which was induced by Aureobasidin A.

Keywords: pYES2 shuttle plasmid, *Botrytis cinerea*, inositol phosphorylceramide (IPC) synthase, Aureobasidin A, enzyme activity

鞘脂是真核细胞膜的主要组成成分,是构成脂质双分子层的重要亚结构,它在调节脂质双分子层膜的流动性中起十分重要的作用。在过去二十年对鞘脂的研究中,发现鞘脂及其代谢产物在调节细胞的生长、分化、衰老和细胞的粘附和识别、膜运输和脂筏的形成等许多重要的信号转导过程有重要作用,进而使细胞产生各种不同的生物学功能^[1-5]。

近年相继在酵母等真菌、原生动物和拟南芥中发现肌糖磷脂酰神经酰胺 (IPC) 合成酶,该酶是鞘脂合成代谢的关键酶^[6]。酵母的 IPC 合成酶由 *AURI* 基因编码,从人类病原真菌白假丝酵母 *Candida albicans*、光滑假丝酵母 *Candida glabrata*、克柔假丝酵母 *Candida krusei*、近平滑假丝酵母 *Candida parapsilosis*、热带假丝酵母 *Candida tropicalis* 和新型隐球菌,一些曲霉属丝状真菌烟曲霉 *Aspergillus fumigatus*、构巢曲霉 *Aspergillus nidulans*、黑曲霉 *Aspergillus niger* 和米曲霉 *Aspergillus oryzae*, 以及粟酒裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 中分离得到 *AURI* 类似基因,这些基因的序列很保守,具有 IPC1p 活性所需的共同结构域,说明该基因的进化是保守的^[7-9]。*AURI* 表达和调控对真菌生长和发育具有关键的作用,缺乏 IPC 合成酶的酵母因不能合成复杂鞘脂类而死亡,而且导致神经酰胺的积

累^[10]。神经酰胺积累抑制细胞的生长,并通过阻止细胞周期引起细胞凋亡^[11-12],这都表明 IPC 合成酶是真菌细胞生长和存活所必需的。短梗霉素 A (Aureobasidin A, AbA) 是 IPC 合成酶的强烈抑制剂,真菌用 AbA 处理或真菌 IPC 合成酶基因表达抑制均导致细胞多重形态学细胞组织结构生理生化特性的改变,包括微管消失,微管蛋白降解,细胞出芽方式的改变,细胞循环的阻滞,几丁质的异常积累,细胞膜完整性的破坏,导致细胞质的渗漏,最终细胞死亡^[7,13-14]。本研究通过构建灰葡萄孢菌肌糖磷脂酰神经酰胺合成酶基因 (*BcAURI*) 的重组穿梭质粒 pYES2-*BcAURI*, 转化酿酒酵母尿嘧啶突变菌株 $\Delta yor1$, 为研究灰葡萄孢菌肌糖磷脂酰神经酰胺合成酶的表达及其功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

灰葡萄孢菌由浙江大学农业与生物技术学院李红叶教授实验室提供,大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存,酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 尿嘧啶突变菌株 $\Delta yor1$ 及 pYES2 穿梭载体购自 Invitrogen 公司。

1.2 主要试剂及培养基

氨苄青素 (Amp) 购自上海生工生物工程有

限公司, RT-PCR 试剂盒、限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I 购于 TaKaRa 公司, ECL 化发光试剂盒 (RPN2132) 购于 Amersham Biosciences 公司, AbA、Tris、CHAPS、C₆-NBD-Cer (6-[N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) amino]-hexanoyl ceramide, 带荧光标记的底物)、PI (磷脂酰肌醇)、甲酸 (CH₃COOH) 和胶回收试剂盒均购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司, FLAG 标签一抗、二抗为碧云天公司产品。

营养缺陷培养基 SC-U: 无氨基酸酵母氮源 (含硫酸铵) 6.7 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂粉 20 g, 营

养缺陷混合物 2 g, 加水至 1 000 mL, 0.1 MPa, 121 °C, 湿热灭菌 20 min。

诱导培养基: 无氨基酸酵母氮源 6.7 g, 半乳糖 20 g, 琼脂粉 20 g, 营养缺陷混合物 2 g, 加水至 1 000 mL, 0.1 MPa, 121 °C, 湿热灭菌 20 min。

1.3 引物设计

根据灰葡萄孢菌 *AURI* 的 cDNA 序列设计合成含有 FLAG 标签的引物, 并在 F 端加入 *Bam*H I 酶切位点, 在 R 端加入 *Xho* I 酶切位点。引物由华大基因合成 (表 1)。

表 1 文中所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Sequences (5'-3')	Restriction enzyme
Forward	GCGGATCCATGAAGACGGGAGCGGCTACCC <u>T</u>	<i>Bam</i> H I
Reverse	CGCTCGAGTCACTTGTATCGTCATCTTTGTAGTCCCTAACAAATGACCTC	<i>Xho</i> I

The single underlined sequences indicate restriction enzyme site; the double underlined sequences indicate flag-tag.

1.4 RT-PCR

按试剂盒提取灰葡萄孢菌总 RNA (RNA 提取试剂盒, 鼎国昌盛生物技术有限责任公司), 经紫外分光光度法和凝胶电泳鉴定纯度及浓度后, 置 -80 °C 备用。取 1 μL 纯化 mRNA 为模板, 按反转录试剂盒 (TaKaRa 公司的 RT-PCR 试剂盒) 说明书的方法合成 cDNA。利用以上引物和高保真 DNA 聚合酶对灰葡萄孢菌 *AURI* 的 cDNA 序列进行 PCR 扩增, 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 64 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物 (*AURI* 基因) 用胶回收试剂盒进行纯化、回收, 目的条带连接到 pMD18-T 载体上, 进行测序。

1.5 重组穿梭质粒 pYES2-*BcAURI* 的构建

BcAURI 和 pYES2 载体分别在 37 °C 条件下用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切 4 h, 回收目的片段。*BcAURI* 和 pYES2 用 T4 DNA 连接酶在 16 °C 连接过夜, 载体构建流程见图 1。pYES2-*BcAURI* 转化大肠杆菌 DH5α, 挑取单菌落 (单克隆) 扩繁, 用碱裂解法提取质粒, 并通过 PCR 的方法验证, 将阳性克隆菌株的 pYES2-*BcAURI* 质粒进行测序, 经验证 *BcAURI* 没有突变。

1.6 醋酸锂转化酵母及诱导表达

构建好的 pYES2-*BcAURI* 载体用醋酸锂法^[15]转化酿酒酵母 *Δyol1*, 在营养缺陷 SC-U 培养基上进行筛选, 通过 PCR 和酶切的方法验证。

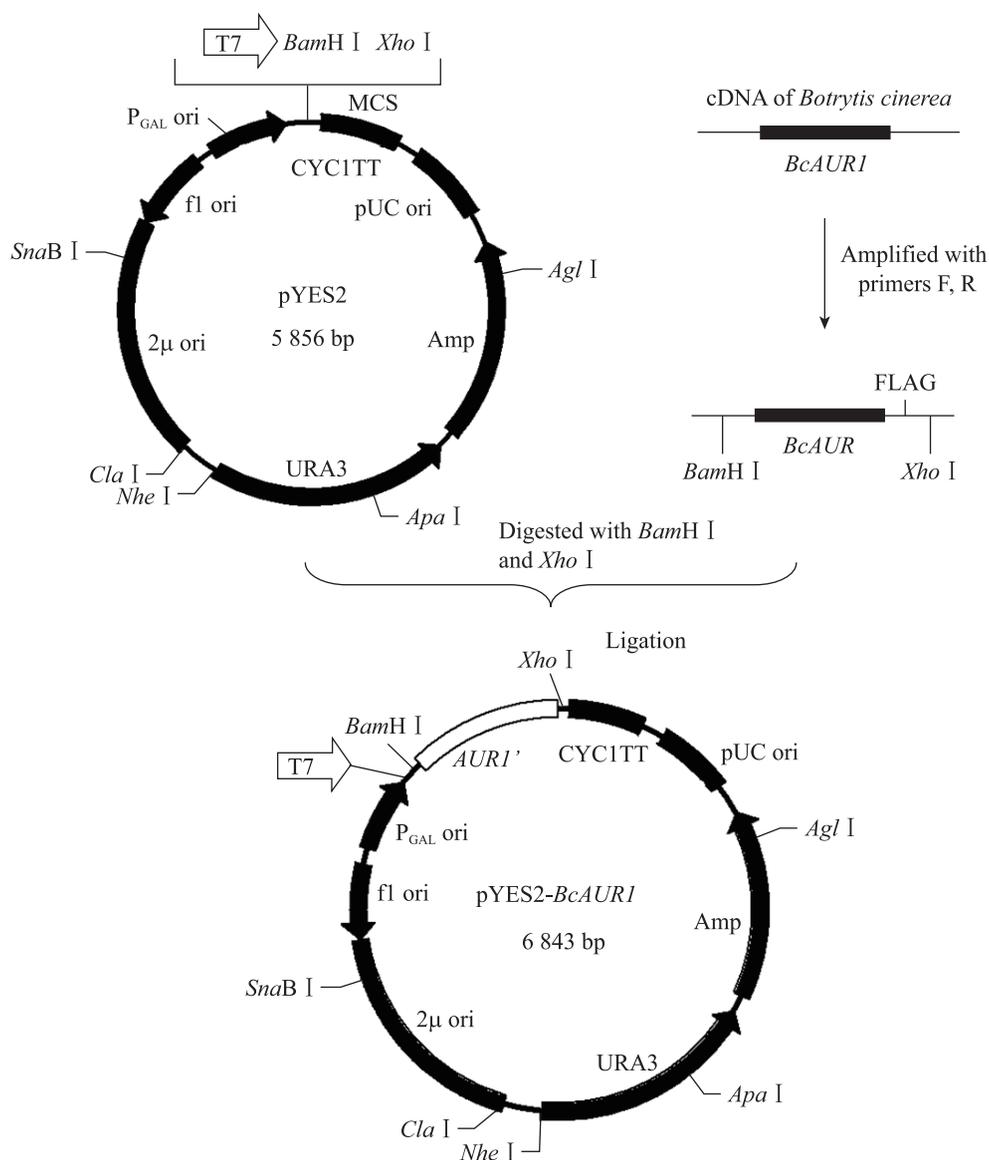


图1 pYES2-*BcAUR1* 载体构建图谱

Fig. 1 Map of construction of pYES2-*BcAUR1* vector. *BcAUR1'* indicates *BcAUR1* with FLAG-tag.

挑单克隆至 20 mL SC-U 培养基中, 30 °C 振荡孵育 30 h, 取 5 mL 提取 mRNA, 使用 RT-PCR 试剂盒 (TaKaRa 公司) 和正向引物 F、反向引物 R 进行 PCR 检测, 证明转化后的酵母可以正常转录。将剩余菌液离心除去上清液, 用诱导培养

基将 OD_{600} 调整到 0.4, 然后 30 °C 振荡孵育 12 h, 离心, 将酵母转化子转到诱导培养基下诱导 12 h, 表达目的基因。

1.7 微粒体的提取

参照 Burke 等方法^[16]进行, 取 5 mL 培养液

在 4 °C 下 1 500×g 离心 5 min, 弃上清。用 500 μL 无菌水重悬细胞, 离心, 弃上清。用玻璃珠裂解法提取酵母的总蛋白, 然后 100 000×g 超速离心 1 h, 弃上清, 沉淀即为微粒体蛋白。

1.8 Western blotting 分析

参照 Mersich 和 Jungbauer 的方法^[17]进行, 将微粒体重新溶解在分析缓冲液中, 并进行 SDS-PAGE 电泳, 将蛋白质电转移到硝酸纤维素膜上, 置于 1% 脱脂奶粉封闭缓冲液中, 室温封闭 2 h。将封闭后的膜浸入 1% 脱脂奶粉缓冲液稀释的一抗缓冲液中, 室温下缓慢摇动 1 h; 洗膜 4 次后, 将膜浸入用 1% 脱脂奶粉缓冲液稀释的二抗中, 室温下缓慢摇动 1 h; 洗膜 4 次后, 用滤纸吸干膜表面。使用 ECL 试剂盒进行显色。

1.9 IPC 合成酶活性的测定

IPC 合成酶活性的测定参照 Zhong 等^[18]的方法进行, 以 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0)、10 mmol/L EDTA、150 mmol/L NaCl、10% 甘油和 2 mmol/L CHAPS 配制成反应缓冲液; 向反应缓冲液中加入两种底物 C₆-NBD-Cer 和 PI, C₆-NBD-Cer 的终浓度为 0.1 mmol/L、PI 终浓度为 2 mmol/L, 最后加入微粒体终浓度为 0.1 mg/mL。反应混合液 50 μL 置于 30 °C 水浴中 30 min, 加入 10% 的乙酸终止反应。1 000×g 离心 3 min, 取 10 μL 进行 HPLC。色谱条件: C₁₈ 的反向色谱柱 (25 cm×4.6 mm), 荧光波长: λ_{ex}=465 nm, λ_{em}=530 nm, 流速 1 mL/min, 洗脱梯度 50% CH₃CN-50% H₂O (0.1% CH₃COOH) 到 90% CH₃CN-10% H₂O (0.1% CH₃COOH), 然后用 100% CH₃CN 洗柱 10 min。以荧光底物 C₆-NBD-Cer 的高效液相保留时间 (26 min) 为

对照, 确定产物 IPC 的保留时间为 17 min, 根据生成 IPC 的产物峰面积计算 IPC 合成酶活力。

1.10 AbA 抗性的检测

空载 pYES2 酵母转化子和 pYES2-*BcAURI* 酵母转化子, 在 AbA 浓度分别是 0.002、0.005、0.02、0.05、0.2 和 0.5 μg/mL 的诱导培养基上 30 °C 培养 4 d, 观察菌落生长情况并照相。

2 结果与分析

2.1 *AURI* 基因的克隆和穿梭表达载体构建

从灰葡萄孢菌中提取总 RNA, 反转录 cDNA 后, 利用含有 FLAG 标签以及 *Bam*H I、*Xho* I 酶切位点的 *AURI* 特异引物扩增 *BcAURI* 基因, 得到 1 000 bp 左右的电泳条带, 该条带与 *AURI* 基因大小一致 (图 2), 目的条带连接到 pMD18-T 载体上, 进行测序。测序结果表明, 灰葡萄孢菌 *AURI* (*BcAURI*) 的 cDNA 序列与 GenBank 的序列比较有 3 个碱基发生变化, 但它们未导致氨基酸改变。灰葡萄孢菌 IPC 合成酶基因由 1 135 个核苷酸构成, 其中 117~231 位核苷酸序列为 115 bp

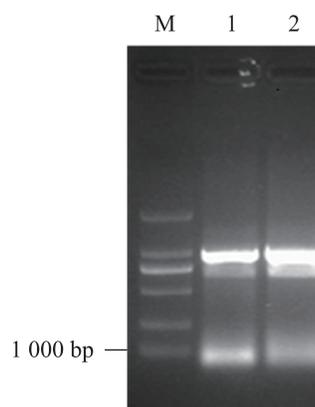


图 2 *AURI* 基因的扩增结果

Fig. 2 Amplification of the gene *AURI*. M: DNA marker. 1-2: *BcAURI*.

的内含子, IPC 合成酶基因编码 339 个氨基酸。将 *BcAUR1* 基因与穿梭质粒 pYES2 重组, 得到 pYES2-*BcAUR1* 转化 DH5 α , 挑取阳性克隆菌株, 提取 pYES2-*BcAUR1* 质粒进行测序。经验证 *BcAUR1* 没有突变后, 利用醋酸锂转化法将重组质粒导入酿酒酵母 Δ yor1 中, 经营养缺陷培养基筛选, 挑取单克隆进行菌落 PCR 和酶切鉴定, 得到 3 个 pYES2-*BcAUR1* 酵母转化子。

2.2 pYES2-*BcAUR1* 诱导表达和 Western blotting 鉴定

空载 pYES2 酵母转化子和 3 个 pYES2-*BcAUR1* 酵母转化子在半乳糖培养基上进行诱导表达, RT-PCR 结果表明空载 pYES2 酵母转化子不表达, 3 个 pYES2-*BcAUR1* 酵母转化子均有 *BcAUR1* 基因表达, 说明 *BcAUR1* 基因在转录水平表达。Western blotting 检测结果也显示空载

pYES2 酵母转化子不表达 *BcAUR1* 蛋白 (AUR1p), 而 3 个 pYES2-*BcAUR1* 酵母转化子有 *BcAUR1* 蛋白表达, 并且 *BcAUR1* 蛋白均呈现两条带, 推测可能分子量小的是未修饰的 AUR1p, 分子量大的的是修饰后的 AUR1p (图 3)。

2.3 AbA 对菌体生长的影响

空载 pYES2 酵母转化子和 3 个 pYES2-*BcAUR1* 酵母转化子, 在不同 AbA 浓度的诱导培养基上培养 (图 4), 当 AbA 浓度达到 0.05 μ g/mL,

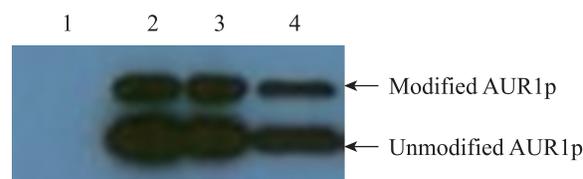


图 3 转化子的 Western blotting 分析

Fig.3 Western blotting analysis of the transformants. 1: the yeast transformant without *BcAUR1*. 2-4: the yeast transformants 1, 2, 3 with pYES2-*BcAUR1*.

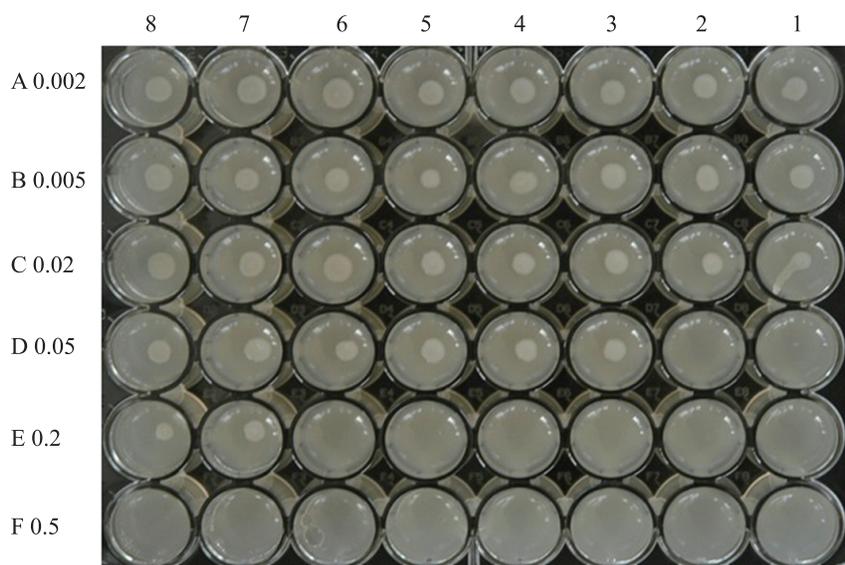


图 4 在不同 ABA 浓度下酵母转化子的生长情况

Fig. 4 The growing state of the yeast transformants under different concentrations of AbA. A-F: the different concentration of AbA 0.002, 0.005, 0.02, 0.05, 0.2, 0.5 μ g/mL respectively. 1-2: the yeast transformants without *BcAUR1*. 3-4: the yeast transformants 1 with pYES2-*BcAUR1*. 5-6: the yeast transformants 2 with pYES2-*BcAUR1*. 7-8: the yeast transformants 3 with pYES2-*BcAUR1*.

空载 pYES2 酵母转化子不能生长, 而 3 个 pYES2-*BcAURI* 酵母转化子均能生长。当 AbA 浓度为 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 时, 只有 pYES2-*BcAURI* 酵母转化子 3 能够生长, pYES2-*BcAURI* 酵母转化子 1 和 2 不能生长。该结果说明 AbA 浓度为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 可抑制酵母生长。3 个 pYES2-*BcAURI* 酵母转化子的 AbA 抗性高于空载 pYES2 酵母转化子, 并且 pYES2-*BcAURI* 酵母转化子 3 抗性较强, 这是由于灰葡萄孢菌的 *AUR1* 基因在酵母中表达导致了对 AbA 抵抗。

2.4 IPC 合成酶活性测定

以 $\text{C}_6\text{-NBD-Cer}$ (荧光的底物) 和 PI (磷脂酰

肌醇) 为底物, 加入微粒体 (含 IPC 合成酶), 用高效液相层析荧光光谱检测荧光产物 IPC 的量, 根据生成 IPC 的产物峰面积计算 IPC 合成酶活力。通过测定空载 pYES2 酵母转化子和 3 个 pYES2-*BcAURI* 酵母转化子的 IPC 合成酶活性, 表明 3 个 pYES2-*BcAURI* 酵母转化子 IPC 合成酶活性高于空载 pYES2 酵母转化子 (表 2), 证实了灰葡萄孢菌的 *AUR1* 基因在酵母中表达, pYES2-*BcAURI* 酵母转化子 3 酶活性最高, 它的 AbA 抗性较强, 这与上述 pYES2-*BcAURI* 酵母转化子 3 在较高 AbA 浓度下仍能生长结果一致。

表 2 IPC 合成酶活性测定

Table 2 Determination of IPC synthase activity

	The yeast transformants without <i>BcAURI</i>	The yeast transformants 1 with pYES2- <i>BcAURI</i>	The yeast transformants 2 with pYES2- <i>BcAURI</i>	The yeast transformants 3 with pYES2- <i>BcAURI</i>
Activity of IPC synthase (nmol/(min·mg))	0.892	1.500	1.880	2.444

3 讨论

肌糖磷脂酰神经酰胺 (IPC) 合成酶催化鞘脂合成代谢的一个重要反应, 即催化神经酰胺和磷脂酰肌醇生成肌糖磷脂酰神经酰胺, 在此基础上肌糖磷脂酰神经酰胺进一步形成鞘脂类物质, 这些物质广泛参与多种生理过程如细胞的生长、凋亡、分化、衰老等过程。酵母的 IPC 合成酶是由 401 个氨基酸组成的疏水蛋白 (AUR1p 或 IPC1p), 包含几个跨膜域和至少一个糖基化位点^[9]。其他真菌如构巢曲霉的 IPC 合成酶具有与酵母相似的特点和性质^[9,13], 目前对灰葡萄孢菌 IPC 合成酶的研究较少, 本研究首次在酿酒酵母

中表达了灰葡萄孢菌 *AUR1* 基因 (*BcAURI*) 和 IPC1p。Western blotting 分析结果显示灰葡萄孢菌的 IPC1p 有两条带, 这可能是由于 IPC 合成酶糖基化修饰所致^[13], 因为细胞中翻译和修饰不同步, 先合成的 AUR1p 经加工过程被糖基化, 而刚合成出来的 AUR1p 还未经糖基化修饰。

AbA 是一种环九肽抗生素^[19], 对白假丝酵母 *Candida albicans*、新型隐球菌 *Cryptococcus neoformans*、曲霉 *Aspergillus* 等病原真菌都有很强的杀菌作用^[20]。AbA 的杀菌作用很可能是先被细胞吸收, 抑制 IPC 合成酶的活性, 使神经酰胺到肌糖磷脂酰神经酰胺的合成受阻, 导致鞘脂类物质的合成量不足, 细胞膜产生断裂, 造成

细胞内的糖原泄露^[21]。已有研究表明 AbA 是真菌 IPC 合成酶的非竞争性抑制剂, AbA 可通过抑制 IPC 合成酶抑制真菌生长^[18]。我们的实验也证实了 AbA 能抑制真菌生长, 低浓度的 AbA 能抑制空载 pYES2 酵母转化子, 但不影响 pYES2-*BcAUR1* 酵母转化子的生长, 并且酵母转化子的平均酶活力高于空载 pYES2 酵母转化子, 也说明 IPC 合成酶的高表达能够抵消抑制剂 AbA 的作用。这是由于抑制剂的浓度不变时, 增加酶活力, 减轻了抑制剂对酶抑制, 因此真菌生长不受影响。pYES2-*BcAUR1* 酵母转化子 3 在 AbA 浓度高于空载 pYES2 酵母转化子 4 倍时仍能生长, 而且酶活力在 3 个转化子中最高, 进一步证实了 IPC 合成酶活力增加能抵抗 AbA 对真菌生长的抑制。

本研究在酵母中成功表达了灰葡萄孢菌肌糖磷脂酰神经酰胺合成酶, 并且对 AbA 影响菌体生长和酶活性进行了初步分析, 这对于进一步研究灰葡萄孢菌肌糖磷脂酰神经酰胺合成酶结构与功能具有十分重要的意义。

REFERENCES

- [1] Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(2): 139–150.
- [2] Colombaioni L, Garcia-Gil M. Sphingolipid metabolites in neural signalling and function. *Brain Res Rev*, 2004, 46(3): 328–355.
- [3] Dickson RC, Lester RL. Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1583(1): 13–25.
- [4] Dickson RC, Sumanasekera C, Lester RL. Functions and metabolism of sphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Lipid Res*, 2006, 45(6): 447–465.
- [5] Obeid LM, Okamoto Y, Mao C. Yeast sphingolipids: metabolism and biology. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1585(2/3): 163–171.
- [6] Mina JG, Pan SY, Wansadhipathi NK, et al. The *Trypanosoma brucei* sphingolipid synthase, an essential enzyme and drug target. *Mol Biochem Parasitol*, 2009, 168(1): 16–23.
- [7] Amselem J, Cuomo CA, van Kan JA, et al. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genet*, 2011, 7(8): e1002230.
- [8] Heidler SA, Radding JA. Inositol phosphoryl transferases from human pathogenic fungi. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1500(1): 147–152.
- [9] Kuroda M, Hashida-Okado T, Yasumoto R, et al. An aureobasidin A resistance gene isolated from *Aspergillus* is a homolog of yeast *AUR1*, a gene responsible for inositol phosphorylceramide (IPC) synthase activity. *Mol Gen Genet*, 1999, 261(2): 290–296.
- [10] Cerantola V, Guillas I, Roubaty C, et al. Aureobasidin A arrests growth of yeast cells through both ceramide intoxication and deprivation of essential inositol phosphoryl ceramides. *Mol Microbiol*, 2009, 71(6): 1523–1537.
- [11] Venable ME, Webb-Froehlich LM, Sloan EF, et al. Shift in sphingolipid metabolism leads to an accumulation of ceramide in senescence. *Mech Ageing Dev*, 2006, 127(5): 473–480.
- [12] Kim HJ, Oh JE, Kim SW, et al. Ceramide induces p38 MAPK-dependent apoptosis and Bax translocation via inhibition of Akt in HL-60 cells. *Cancer Lett*, 2008, 260(1/2): 88–95.
- [13] Hashida-Okado T, Ogawa A, Endo M, et al. *AUR1*, a novel gene conferring aureobasidin resistance on *Saccharomyces cerevisiae*: a study of defective morphologies in *Aur1p*-depleted cells. *Mol Gen Genet*, 1996, 251(2): 236–244.
- [14] Endo M, Takesako K, Kato I, et al. Fungicidal action of aureobasidin A, a cyclic depsipeptide antifungal antibiotic, against *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 41(3): 672–676.
- [15] Gietz RD, Woods RA. Transformation of yeast by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Methods Mol Biol*, 2006, 313: 107–120.

- [16] Burke D, Dawson D, Stearns T. *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.
- [17] Mersich C, Jungbauer A. Generic method for quantification of FLAG-tagged fusion proteins by a real time biosensor. *J Biochem Bioph Methods*, 2007, 70(4): 555–563.
- [18] Zhong WY, Murphy DJ, Georgopapadaku NH. Inhibition of yeast inositol phosphorylceramide synthase by aureobasidin A measured by a fluorometric assay. *FEBS Lett*, 1999, 463(3): 241–244.
- [19] Shimizu T, Kinoshita H, Nihira T. Development of transformation system in *Monascus purpureus* using an autonomous replication vector with aureobasidin A resistance gene. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(2): 115–120.
- [20] Denny PW, Shams-Eldin H, Price HP, et al. The protozoan inositol phosphorylceramide synthase: a novel drug target that defines a new class of sphingolipid synthase. *J Biol Chem*, 2006, 281(1): 28200–28209.
- [21] Liu XP. Inhibition effect of postharvest pathogens fungi of fruit by aureobasidin A [D]. Xinjiang: Xinjiang University, 2010.
刘小平. 短梗霉素 A 对水果产后病原真菌的抑制作用[D]. 新疆: 新疆大学, 2010.

(本文责编 陈宏宇)



《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要: 基本要素包括研究目的、方法、结果和结论 (不用单列标题书写)。目的 (Purpose): 主要说明作者写此文章的目的, 或说明本文主要要解决的问题; 方法 (Methods): 重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要, 可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果 (Results): 本文最后得出的结果 (实验数据部分)。结论 (Conclusions): 如系基础研究, 应写明本文的创新之处, 及文章在讨论部分表述的观点; 如系应用性研究, 应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要: 包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望, 尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点: 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后, 务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的, 即使学术上可以达到刊出的水平, 本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称, 尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊尽量不用, 这样可以免好多长句, 以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句, 避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态, 语法正确, 句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语, 除非是那些人人皆知的 (如 DNA、ATP 等), 或者确实是非常长, 而且出现多次的短语才允许用缩写语, 并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中, 不要使用任何汉字字符, 包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。