

研究报告

灰葡萄孢菌及其抗短梗霉毒素突变体 *AURI* 基因序列及其酶活性的分析

赵莉 苟萍* 林慧珍 赵红霞

(新疆大学生命科学与技术学院 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘要:【目的】探讨灰葡萄孢菌及其抗 AbA 突变体 *AURI* 基因序列与 IPC 合成酶活性的关系。

【方法】通过分子生物学方法测定野生型及突变体的 *AURI* 的基因序列, 高效液相荧光色谱法测定 IPC 合成酶活力, 苯甲酰化法测定神经酰胺含量。【结果】*AURI* 基因序列和 IPC 合成酶活性测定表明 4 株不同的突变体均产生了对 IPC 合成酶抑制剂 AbA 的抗性, 它们的突变类型为: (1) *AURI* 序列中缺失内含子; (2) *AURI* 序列中缺失内含子和 P155S 氨基酸突变; (3) *AURI* 序列中缺失内含子和 V33A 的氨基酸突变; (4) *AURI* 序列中缺失内含子和 P155S、S177P、F237L 的氨基酸突变。*AURI* 缺失内含子和既缺失内含子又伴随 P155S 氨基酸突变的突变体的 AbA 抗性较强。神经酰胺含量测定表明野生型 IPC 合成酶被抑制, 导致神经酰胺积累, 而突变体则能抵抗 AbA 对 IPC 合成酶的抑制作用。【结论】*AURI* 基因中的内含子对 IPC 合成酶的调控起重要的作用。AbA 通过抑制 IPC 合成酶引起神经酰胺积累, IPC 合成酶是鞘脂代谢的关键酶。

关键词: 灰葡萄孢菌, *AURI* 基因, 肌醇磷脂神经酰胺(IPC)合成酶

Analysis of *AURI* gene sequence and enzymatic activity in *Botrytis cinerea* and its mutants with aureobasidin A-resistance

ZHAO Li GOU Ping* LIN Hui-Zhen ZHAO Hong-Xia

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

Abstract: [Objective] To explore the relationship between *AURI* gene sequences in *Botrytis cinerea* and its mutants with aureobasidium A-resistance and the activity of Inositol phosphorylceramide (IPC) synthase. [Methods] Molecular-biology methods were adopted to determine the *AURI* gene sequences of the wild type and the mutants. The activity of IPC synthase was analysed by HPLC-FLD. The content of ceramide was used the method of benzene formylation. [Results] The results showed that 4 different mutant strains resisted to inhibitor AbA of IPC synthase. Their mutant types were: (1) *AURI* gene lost an intron; (2) *AURI* gene lost an intron and one amino acid mutated (P155S); (3) *AURI* gene lost an intron and one amino acid mutated (V33A); (4) *AURI* gene lost an

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31160031)

*Corresponding author: E-mail: gou_ping@sina.com

Received: December 01, 2015; **Accepted:** February 25, 2016; **Published online** (www.cnki.net): March 07, 2016
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31160031)

*通讯作者: E-mail: gou_ping@sina.com

收稿日期: 2015-12-01; 接受日期: 2016-02-25; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-03-07

intron and three amino acids mutated (F237L, S177P, and P155S). Both the mutant with the *AURI* gene lack of an intron and the mutant with the *AURI* gene lack of an intron and the mutant of P155S had stronger resistance to AbA. The determination of ceramide content showed that IPC synthase of wild type was inhibited to cause ceramide accumulation, and the mutants could resist to AbA inhibition on IPC synthase. **[Conclusion]** The intron of *AURI* gene plays an important role in the regulation of IPC synthase. AbA inhibits IPC synthase from inducing ceramide accumulation, IPC synthase is a key enzyme in sphingolipid metabolism.

Keywords: *Botrytis cinerea*, *AURI* gene, Inositol phosphorylceramide (IPC) synthase

脂类代谢组学是在基因组学、转录组学和蛋白质组学之后兴起的一个重要研究领域,随着脂类分析技术的不断发展,对脂类的研究已经深入到生物膜的组成、结构及功能等方面。目前,生物膜脂的研究主要包括鞘脂类代谢组学和磷脂代谢组学^[1-2]。各种类型的鞘磷脂和鞘糖脂在生物体内大量存在,它们不仅是细胞膜结构的重要组成部分,还是一些信号分子的前体,参与神经递质的释放、膜蛋白的定位和运输、代谢物的转运、调节细胞的生长、分化、凋亡、衰老等生命活动^[3-4]。

AURI 基因(Aureobasidin A resistant gene)编码 IPC 合成酶,又称为短梗霉素 A (AbA)抗性基因,是通过抗 AbA 的酵母突变体发现了 *AURI* 基因。IPC 合成酶在真菌的鞘脂合成途径中发挥重要的作

用,它催化神经酰胺和磷脂酰肌醇生成肌醇磷脂酰神经酰胺(IPC)和甘油二酯,是鞘脂合成代谢的关键酶^[5](图 1)。已有大量的实验表明短梗霉素 A 通过抑制 IPC 合成酶抑制真菌和原生动物的生长,IPC 合成酶受到抑制不仅导致神经酰胺积累,引起细胞周期进程阻滞,促使细胞凋亡,而且引起微管蛋白降解,细胞膜和内膜系统完整性破坏等一系列的细胞生长抑制情况,最终因不能合成复杂鞘脂类而导致细胞死亡^[6-7],因此 *AURI* 的表达和调控对真菌生长和发育具有至关重要的作用。本文通过研究灰葡萄孢菌及其抗 AbA 突变体 *BcAURI* 基因序列与酶活性的关系,探讨 IPC 合成酶的结构与功能,为明确 *AURI* 的调控和 AbA 的抗性机制提供理论依据。

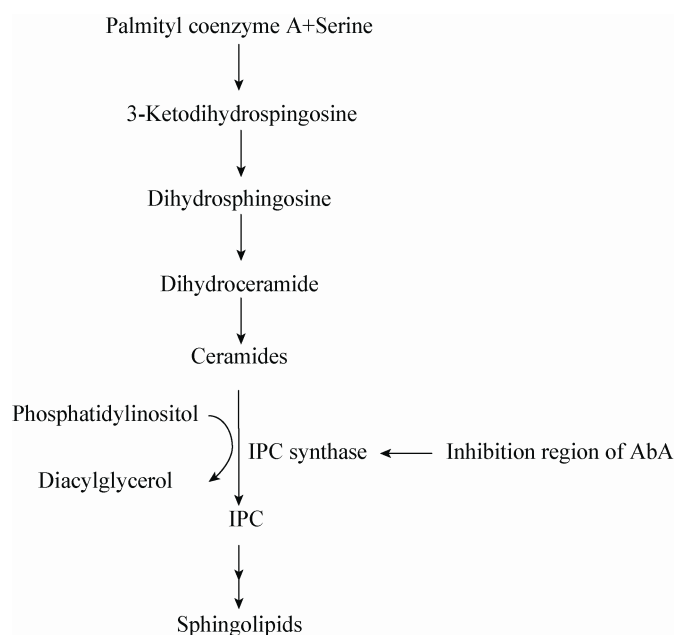


图 1 鞘脂代谢途径中 IPC 合成酶催化的反应

Figure 1 IPC synthase catalyzed reaction in sphingolipid metabolic pathways

1 材料与方法

1.1 菌株和试剂

灰葡萄孢菌(*B. cinerea*)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(*Escherichia coli*) DH5 α :本实验室保存;灰葡萄孢菌突变体(*BcAURI*)由本实验室通过化学诱变剂 EMS 诱变, AbA 筛选获得^[8]。

主要试剂:pMD18-T Vector、内切酶 *Bam*H I、*Sal* I、Prime STAR HS DNA Polymerase、*Taq* DNA Polymerase、10 mmol/L dNTPs Mix 均购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司;DNA 提取试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司;DNA 胶回收试剂盒购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;快速质粒小提试剂盒购于北京康为世纪生物科技有限公司;C₆-NBD-Cer (荧光的底物)和 PI (磷脂酰肌醇)购自 Matreya 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 灰葡萄孢菌 *AURI* 基因的克隆:分别接种化学诱变得到的 6 株抗 AbA 的灰葡萄孢菌突变体, 28 °C、150 r/min 培养 4 d 至瓶中出现大量菌丝球。参照 DNA 提取试剂盒说明提取灰葡萄孢菌的总 DNA。根据 *AURI* 基因序列设计特异性引物 F (5'-AGACGGGAGCGGCTACCCTTTTA-3') 和 R (5'-CACCTAACAATGACCTCACTAAGC-3'), PCR 扩增体系: Buffer (Mg²⁺) 5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μ L, 正向引物(10 μ mol/L) 1 μ L, 反向引物(10 μ mol/L) 1 μ L, DNA polymerase 0.6 μ L, 模板 5 μ L, 补足 ddH₂O 至 50 μ L。反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 50 s, 64 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。取 5 μ L 扩增产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分析、检测。回收 PCR 扩增产物(参照北京鼎国 DNA 胶回收试剂盒说明操作)。

1.2.2 目的基因的亚克隆及鉴定:使用 pMD18-T vector 试剂盒, 同时参照文献[9]进行感受态细胞的制备和连接产物的转化。在转化的平板培养基上随机选取 3 个边缘清晰的白色菌落, 同上 PCR 体系条

件进行菌落 PCR 电泳检测。参照快速质粒小提试剂盒说明提取质粒, 电泳检测。提取的质粒用 *Bam*H I 和 *Sal* I 进行双酶切, 反应体系(总体积 20 μ L): 10 \times *Taq* Buffer 2 μ L, *Bam*H I 0.5 μ L, *Sal* I 0.5 μ L, 重组质粒 5 μ L, 双蒸水 12 μ L。轻轻混匀, 37 °C 酶切过夜, 并进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 序列测定及分析:将筛选出来的菌斑放大培养, 提取质粒进行序列测定。比较抗 AbA 的灰葡萄孢菌突变体与野生型菌株之间的 *BcAURI* 基因序列的差异。DNA 测序由北京华大基因有限公司进行。测序结果在 GenBank 上进行 BLAST 搜索比对, 并用 DNAMAN 软件分析同源性。

1.2.4 IPC 合成酶活力测定:微粒体的制备 IPC 合成酶位于真菌的高尔基体膜上, 采用超速离心可得到含 IPC 合成酶的微粒体蛋白。参照 Burke 等方法^[10], 取培养好的菌体抽滤, 称重, 加液氮迅速研磨至白色粉末, 加入 25 mL 含 0.1 mol/L NaCl, 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L Benzamidine, 1 mmol/L PMSF, 1.5 mg/L Leupeptin, 3 mg/L Pepstatin A 的缓冲液中, 4 °C 下 2 000 \times g 离心 15 min。取上清, 20 000 \times g 离心 15 min。取上清, 100 000 \times g 离心 1 h, 沉淀即为微粒体。将沉淀溶于 400 μ L 含 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、10%甘油、0.25 mol/L 蔗糖、1 mol/L DTT 的缓冲液中, 轻轻混匀, Bradford 法测定微粒体蛋白浓度。

IPC 合成酶活性的测定 IPC 合成酶活性的测定参照 Zhong 等^[11]的方法进行, 以 pH 7.0 50 mmol/L 的 Tris-HCl、10 mmol/L EDTA、150 mmol/L NaCl、10%甘油和 2 mmol/L CHAPS 配制反应缓冲液; 向反应缓冲液中加入底物 C₆-NBD-Cer (6-(N-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino)-hexanoyl)ceramide, 带荧光标记的神经酰胺)和 PI (磷脂酰肌醇), 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/L。反应混合液 50 μ L 置于 30 °C 水浴中 20 min, 加入 10%的乙酸终止反应。12 000 r/min 离心 5 min, 取

10 μ L 进行 HPLC。色谱条件: C_{18} 的反向色谱柱 (15 cm \times 4.6 mm), 荧光波长: λ_{ex} =465 nm, λ_{em} =530 nm, 流速 1 mL/min, 柱温: 25 $^{\circ}$ C, 洗脱梯度 50% CH_3CN -50% H_2O (0.1% CH_3COOH) 到 90% CH_3CN -10% H_2O (0.1% CH_3COOH), 然后用 100% CH_3CN 洗柱 10 min。以荧光底物 C_6 -NBD-Cer 的减少量来计算 IPC 合成酶活力。IPC 合成酶活力单位定义为: 每分钟转化 1 微摩尔底物的酶量为 1 个活力单位。

1.2.5 神经酰胺的含量测定: 神经酰胺的提取参照周全等的方法^[12]进行, 将灰葡萄孢菌菌丝用液氮研磨成粉末状, 悬浮在 4 mol/L NaOH 中, 52 $^{\circ}$ C 自溶 24 h。粉末用无菌水洗, 醋酸中和至 pH 7.0, 8 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 沉淀加 5 mL 乙醇, 室温振荡 10 min, 8 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀。沉淀加氯仿:甲醇:水(1:2:0.8, 体积比), 50 $^{\circ}$ C 保温 4 h, 离心收集沉淀, 重复提取一次, 合并 2 次提取液。提取液中再加入氯仿:甲醇:水的体积比例达到 2:2:1.8, 充分振荡, 静置分层。收集氯仿相, 即为含有神经酰胺的粗提液, 粗提液真空干燥得到神经酰胺粗制品。神经酰胺含量测定采用苯甲酰化法^[13], 以 C_2 -Cer 为标准品, 在 280 nm 用酶标仪测定 OD 值。

2 结果与分析

2.1 灰葡萄孢菌突变体 *AURI* 基因的克隆及鉴定
分别从 6 株通过化学诱变获得的灰葡萄孢菌突变体中提取基因组 DNA, 利用 *AURI* 基因序列的特异引物, 扩增得到约 1 000 bp 的电泳条带, 与已知 IPC 合成酶基因序列大小一致, 见图 2。6 株突变体进行菌落 PCR 鉴定结果正确。

2.2 序列测定结果及分析

野生型灰葡萄孢菌的 *AURI* 基因含 1 135 个核苷酸, 其中第 117 位到 231 位是 115 bp 的内含子。6 株灰葡萄孢菌突变体 IPC 合成酶基因与野生型序列比对, 发现所有突变体均缺失了 115 bp 的内含子序列; 突变体 TA 和突变体 TF 只缺失内含子, 未发

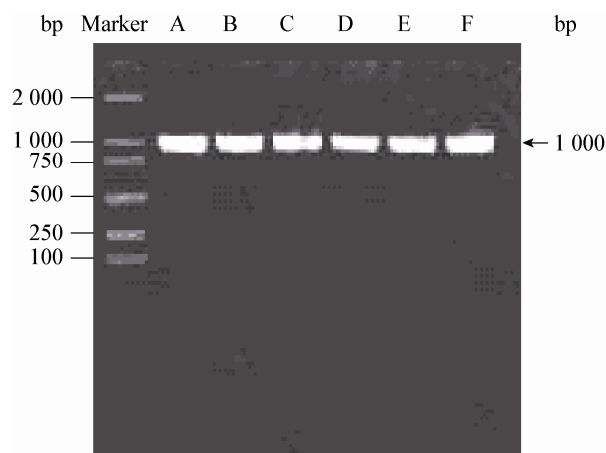


图 2 *AURI* 基因扩增

Figure 2 *AURI* cDNA amplified

注: A-F: 突变体 A-F.

Note: A-F: The mutants A-F.

生氨基酸突变。突变体 TB 在 IPC 合成酶的中间区域有两个氨基酸突变即 P155S 和 S177P, C 端区域有一个氨基酸突变即 F237L。突变体 TC 仅在 IPC 合成酶的中间区域一个氨基酸发生突变, 即 P155S。突变体 TD 和突变体 TE 都是 N 端区域有一个氨基酸突变 V33A, 见表 1。灰葡萄孢菌突变体 IPC 合成酶的氨基酸序列与酵母、烟曲霉和构巢曲霉比较发现, 33 位的氨基酸残基在它们之间各不相同; 而 155 位的 Pro 和 177 位的 Ser 具有保守性; 237 位的氨基酸残基在烟曲霉和构巢曲霉是 Leu, 而酵母和灰葡萄孢菌分别是 Val 和 Phe, 由此得出 IPC 合成酶中间区域 155 位的 Pro 和 177 位的 Ser 是最保守的。

2.3 AbA 对灰葡萄孢菌 IPC 合成酶的影响

以 C_6 -NBD-Cer 和 PI 为底物, 分别在不加 AbA 和加 AbA 的条件下, 进行酶促反应, 通过高效液相层析荧光光谱检测底物的减少量, 计算得出 IPC 合成酶比活力, 见表 2。野生型菌株在含有 AbA 和缺乏 AbA 时 IPC 合成酶比活力下降 42.4%, 说明 AbA 能抑制 IPC 合成酶活力。突变体在含有 AbA 和缺乏 AbA 时, 酶的比活力下降幅度远小于野生型, 在 8.80%-0.35% 之间, 说明突变体对 AbA

表 1 灰葡萄孢菌突变体的 IPC 合成酶突变区域及突变氨基酸
Table 1 Mutation region of IPC synthase and mutant amino acids in Botrytis cinerea's mutants

突变体 Mutants	内含子 Intron	N 端区域 N-terminal domain	中间区域 Middle	C 端区域 C-terminal domain
Mutant TA	无			
Mutant TF	无			
Mutant TC	无		P155S	
Mutant TB	无		P155S、S177P	F237L
Mutant TD	无	V33A		
Mutant TE	无	V33A		

注：将 IPC 合成酶(339 个氨基酸)平均划分为 3 个区域，N 端区域是 1–113 位的氨基酸，中间区域是 114–226 位的氨基酸，C 端区域是 227–339 位的氨基酸。

Note: The IPC synthase (339 amino acids) was divided into three regions on average, N terminal region is 1–113 amino acid, the middle area is 114–226 amino acids, C terminal region is 227–339 amino acid.

表 2 AbA 对野生型和突变体 IPC 合成酶活力的影响
Table 2 The IPC synthase of wild-type and mutants were determined in the absence (–) and presence (+) of AbA

IPC 合成酶活力 IPC synthase activity [μmol/(min·mg)]	AbA (–)	AbA (+)	酶比活力下降 Enzyme activity decreased (%)
Wild-type	6.150×10^{-2}	3.540×10^{-2}	42.40
Mutant TB	5.860×10^{-2}	5.570×10^{-2}	4.90
Mutant TC	5.770×10^{-2}	5.750×10^{-2}	0.35
Mutant TE	5.690×10^{-2}	5.190×10^{-2}	8.80
Mutant TF	6.060×10^{-2}	5.985×10^{-2}	1.80

注：酶比活力下降%为在含有 AbA 和缺乏 AbA 时 IPC 酶比活力下降百分数。

Note: Enzyme activity decreased% is in AbA and the lack of AbA activity decreased percentage of IPC enzyme.

产生了抗性。突变体中 TC 的 AbA 抗性最强，说明 *AURI* 基因中缺失内含子和 P155S 的突变是产生 AbA 抗性的原因。TF 的 AbA 抗性次之，可能 *AURI* 基因中缺失内含子也是产生 AbA 抗性的一个因素。

2.4 AbA 对神经酰胺的影响

神经酰胺是 IPC 合成酶的底物，IPC 合成酶抑制会导致神经酰胺积累。野生型的神经酰胺的量在含有 AbA 时比不含 AbA 时增加了 51%，如图 3 所示，证实 IPC 合成酶抑制导致神经酰胺的积累。突变体细胞中神经酰胺的量在 AbA 存在时比 AbA 缺乏时略有增加，但差异不显著。表明突变体能抵抗 AbA 对 IPC 合成酶的抑制作用。

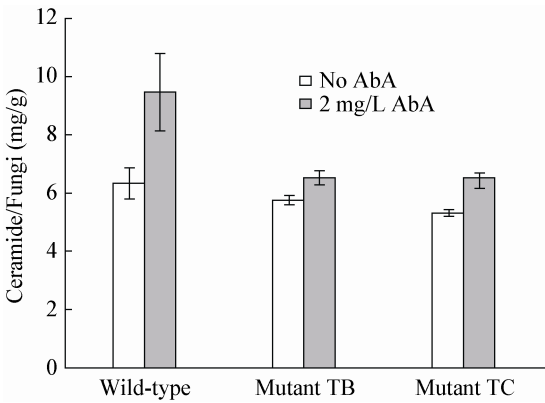


图 3 神经酰胺的测定

Figure 3 Determination of ceramide

注：纵坐标单位为每克菌体所含神经酰胺的毫克数。

Note: Y-axis: Fungi per gram contains the number of milligrams of ceramide.

3 讨论

神经酰胺含量测定表明野生型 IPC 合成酶抑制, 导致神经酰胺的积累, 突变体能抵抗 AbA 对 IPC 合成酶的抑制作用。*AURI* 基因序列中内含子对 IPC 合成酶的调控起重要的作用, AbA 通过抑制 IPC 合成酶引起神经酰胺积累, IPC 合成酶是鞘脂代谢的关键酶。

先前的研究表明 IPC 合成酶中间区域的氨基酸序列是保守的, N 端和 C 端保守性不高, 保守区域中单个的氨基酸突变与 AbA 抗性相关^[14-15]。真菌 AbA 抗性的获得与 IPC 合成酶的少数氨基酸突变有关, 酵母 IPC 合成酶 158 位苯丙氨酸被酪氨酸取代^[16]和构巢曲霉 275 位的甘氨酸被缬氨酸取代^[15]是获得 AbA 抗性的原因。我们的实验结果证实 4 种不同的抗 AbA 灰葡萄孢菌突变株 *AURI* 基因中均缺失内含子, 因此 IPC 合成酶基因序列不仅与保守区域氨基酸突变相关, 而且与 *AURI* 序列中缺失内含子相关; 除了 *AURI* 基因序列缺失内含子外, P155S 的氨基酸突变与 AbA 抗性也有关系, 这些结果不同于酵母和构巢曲霉。我们前期通过紫外诱变也获得了灰葡萄孢菌 *AURI* 基因缺失内含子突变株^[5,11], 证实了该突变株 *AURI* 基因的内含子在抗 AbA 机制中发挥着重要的作用, 是调控 *AURI* 基因表达的重要元件。已有众多的研究表明一些内含子具有调控基因转录的功能, 在其序列中发现了转录调控元件, 起着启动、增强和抑制基因表达的作用^[17-19]。我们的实验也表明 *BcAURI* 基因中内含子缺失突变株产生了 AbA 抗性, 推测该内含子对 *BcAURI* 基因表达起着抑制作用。

AbA 能够抑制野生型 IPC 酶活力, 而对突变体的酶活力影响较小, 证实了 AbA 抑制 IPC 合成酶活力, 突变体产生了 AbA 抗性。突变体 TC 在含有 AbA 和缺乏 AbA 时 IPC 酶活力受抑制的程度最小, AbA 抗性强, 也表明除了内含子缺失外, IPC 合成酶的中间区域 155 位的保守氨基酸 Pro 对 AbA 抗性起一定作用。而 TE 对 AbA 的抗性相对较弱, 可能与 IPC 合成酶 N 端区域的 33 位的 Val 不具保守性

相关。综上所述以及我们先前的实验结果, 均表明灰葡萄孢菌的 IPC 合成酶的表达与其基因内含子序列的调控相关, 而与其氨基酸突变的位点和突变的氨基酸种类相关性较小。

灰葡萄孢菌在加入 AbA 比不加 AbA 时, 神经酰胺的含量显著增加, 表明了 AbA 能通过抑制 IPC 合成酶的活力而导致神经酰胺积累, 而突变体在有 AbA 与无 AbA 时, 神经酰胺的含量没有显著差异, 证明了突变体能抵抗 AbA 对 IPC 合成酶的抑制作用。进一步证实了 IPC 合成酶表达对真菌生长、发育具有至关重要的作用, 是鞘脂代谢途径的关键酶。

参考文献

- [1] Xu HB, Zhou H. Development and application of lipids metabolomics[J]. Journal of Medical Molecular Biology, 2008, 5(5): 423-427 (in Chinese)
许会彬, 周虹. 脂类代谢组学的发展和应[J]. 医学分子生物学杂志, 2008, 5(5): 423-427
- [2] Ma XQ, Liu GY, Yang J. Progress in lipidomics and neurolipidomics[J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2008, 22(2): 156-160 (in Chinese)
马小琼, 刘广义, 杨军. 脂类组学及神经脂类组学进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2008, 22(2): 156-160
- [3] Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2008, 9(2): 139-150
- [4] Colombaioni L, Garcia-Gil M. Sphingolipid metabolites in neural signalling and function[J]. Brain Research Reviews, 2004, 46(3): 328-355
- [5] Wang XH, Sun JL, Gou P. Effect of *AURI* gene intron on the expression of inositol phosphorylceramide synthase and pathogenicity in *Botrytis cinerea*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(11): 1304-1310 (in Chinese)
王新绘, 孙九丽, 苟萍. 灰葡萄孢菌 *AURI* 基因内含子对肌醇磷脂酰神经酰胺合成酶表达的影响及致病性[J]. 微生物学报, 2014, 54(11): 1304-1310
- [6] Venable ME, Webb-Froehlich LM, Sloan EF, et al. Shift in sphingolipid metabolism leads to an accumulation of ceramide in senescence[J]. Mechanisms of Ageing and Development, 2006, 127(5): 473-480
- [7] 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[J]. Cancer Letters, 2008, 260(1/2): 88-95
- [8] Lin HZ. Preliminary study on molecular mechanism of *Botrytis cinerea* for AbA resistance[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang University, 2011 (in Chinese)
林慧珍. AbA 对灰葡萄孢菌肌糖脂酰神经酰胺合成酶的影响[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学硕士学位论文, 2011
- [9] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning a Laboratory Manual[M]. 3rd Edition. Translated by Huang PT. Beijing: Science Press, 2008: 27-30 (in Chinese)
萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版.

- 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2008: 27-30
- [10] Burke D, Dawson D, Stearns T. Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual[M]. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000
- [11] Zhong WY, Murphy DJ, Georgopapadakou NH. Inhibition of yeast inositol phosphorylceramide synthase by aureobasidin A measured by a fluorometric assay[J]. FEBS Letters, 1999, 463(3): 241-244
- [12] Zhou Q, Chen GQ. Identification and quantitation of ceramides in Yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(5): 692-694 (in Chinese)
周全, 陈国强. 解脂假丝酵母中神经酰胺的鉴别和定量分析[J]. 微生物学报, 2004, 44(5): 692-694
- [13] Iwamori M, Coetello C, Moser H. Analysis and quantitation of free ceramide containing nonhydroxy and 2-hydroxy fatty acids, and phytosphingosine by high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Lipid Research, 1979, 20(1): 86-96
- [14] Nagiec MM, Nagiec EE, Baltisberger JA, et al. Sphingolipid synthesis as a target for antifungal drugs. Complementation of the inositol phosphorylceramide synthase defect in a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by the *AUR1* gene[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(15): 9809-9817
- [15] 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[J]. Molecular and General Genetics, 1999, 261(2): 290-296
- [16] Jeong YM, Jung EJ, Hwang HJ, et al. Roles of the first intron on the expression of Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) genes for actin and actin-binding proteins[J]. Plant Science, 2009, 176(1): 58-65
- [17] Wang YB, Lang ZH, Huang DF. Effects of Pre-mRNA introns on regulation of eukaryotic gene expression[J]. Biotechnology Bulletin, 2008(4): 1-4,8 (in Chinese)
王悦冰, 郎志宏, 黄大昉. 内含子对真核基因表达调控的影响[J]. 生物技术通报, 2008(4): 1-4,8
- [18] Furger A, O'Sullivan JM, Binule A, et al. Promoter proximal splice sites enhance transcription [J]. Genes Development, 2002, 16(21): 2792-2799
- [19] Hormuzdi SG, Penttinen R, Jaenisch R, et al. A gene-targeting approach identifies a function for the first intron in expression of the $\alpha 1(I)$ collagen gene [J]. Molecular and Cellular Biology, 1998, 18(6): 3368-3375

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: (1) 本刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者的简介, 并指出自己的工作(已发表的文章)在综述中的体现, 同时请在稿件中用不同颜色标出来。(2) 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。