

# 粟酒裂殖酵母 Atp25 蛋白定位和功能研究

张 云, 黄 鹰

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

**[摘要]** 通过荧光显微镜观察、线粒体提取、基因敲除和免疫印迹等技术, 研究粟酒裂殖酵母 Atp25 蛋白定位和 Atp25 蛋白缺失对线粒体功能的影响. Atp25 是核基因组编码蛋白质, 生物信息学预测和荧光显微镜观察结果显示 Atp25 蛋白定位在线粒体中, 免疫印迹技术进一步验证了 Atp25 蛋白的定位. 表型研究结果显示,  $\Delta atp25$  菌株存在生长及呼吸缺陷.  $\Delta atp25$  菌株中线粒体呼吸链复合体亚基蛋白(Cox1、Cox2、Cox3、Cob1、Atp6)水平显著降低. 实时荧光定量 PCR 结果表明,  $\Delta atp25$  菌株中这些复合体亚基的 mRNA 水平没有变化.

**[关键词]** 线粒体, 粟酒裂殖酵母, Atp25, 呼吸链

**[中图分类号]** Q78 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-1292(2021)04-0080-07

## Study on the Localization and Function of Atp25 Protein in *Schizosaccharomyces Pombe*

Zhang Yun, Huang Ying

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

**Abstract:** In this paper, we investigate the localization of Atp25 protein in *Schizosaccharomyces pombe* and the effect of Atp25 protein deletion on mitochondrial function by fluorescence microscopy, mitochondrial extraction, gene knockout and immunoblotting. Atp25 is a nuclear genome-encoded protein. Bioinformatics predictions and fluorescence microscopy show that Atp25 protein is localized in mitochondria. The localization of Atp25 protein is further verified by immunoblotting. Phenotypic studies reveal growth and respiratory defects in strain  $\Delta atp25$ . The levels of mitochondrial respiratory chain complex subunit proteins(Cox1, Cox2, Cox3, Cob1, Atp6) are significantly reduced in strain  $\Delta atp25$ . Real-time fluorescence quantitative PCR results show no change in the mRNA levels of these complex subunits in strain  $\Delta atp25$ .

**Key words:** mitochondria, *Schizosaccharomyces pombe*, Atp25, respiratory chain

线粒体是半自主性细胞器, 包含自身的基因组 mtDNA(线粒体 DNA), 编码少部分线粒体蛋白质. 裂殖酵母的线粒体基因组有 8 个 mRNA(表达蛋白分别为 Cox1、Cox2、Cox3、Cob1、Atp6、Atp8、Atp9、Var1)、2 个 rRNA 和一个编码 tRNA 5'末端加工酶中 RNA 的组分 mpB. 线粒体由线粒体内膜和线粒体外膜组成<sup>[1]</sup>, 是细胞功能的核心. 多年来人们对于线粒体的研究重点一直放在其主要功能方面, 即以 ATP 的形式为细胞提供大部分能量, 然而线粒体在其他各种代谢过程中也是必不可少的, 包括氧化磷酸化、氨基酸代谢和铁硫团簇的形成<sup>[2-4]</sup>等. 包括人类和酵母在内的各种生物体中, 线粒体在调节细胞凋亡和衰老方面发挥着重要作用. 人类线粒体功能障碍会导致多种疾病的产生, 如糖尿病、心脏病和癌症. 线粒体功能异常也与神经退行性疾病有关, 如帕金森氏症、阿尔茨海默氏症和亨廷顿病<sup>[5-7]</sup>.

酵母 ATP 合酶是一种旋转的分子机器, 主要负责产生 ATP, 为细胞生命活动提供能量. ATP 合酶由 17 个不同的亚基组成, 分为可溶性  $F_1$  区段和膜嵌入  $F_0$  区段<sup>[8]</sup>.  $F_1$  区段的催化头和  $F_0$  区段中的膜集成式电机模块通过两个杆相连, 即  $F_1$  中央杆和  $F_0$  外围杆<sup>[9]</sup>. ATP 合酶是真核细胞中最重要的酶之一, 负责在有氧条件下合成真核细胞中 90% 以上的 ATP. 大多数酵母 ATP 合酶亚基蛋白由细胞核基因组编码, 在胞质核糖体上翻译并被运输至线粒体<sup>[10-11]</sup>. 酵母细胞作为研究 ATP 合酶的模式生物, 便于研究者更加深入

收稿日期: 2021-04-20.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31400032).

通讯作者: 黄鹰, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 微生物学. E-mail: hy858717@163.com

地了解 ATP 合酶复合物的结构、功能和生物发生过程<sup>[12]</sup>。

芽殖酵母中 Atp25 蛋白的相关研究较为透彻,ATP25 对于 ATP 合酶中 ATP9 mRNA 稳定性和 Atp9 蛋白的表达是必需的,ATP25 缺失引起 ATP9 mRNA 及其翻译产物的缺失,从而阻止功能性  $F_0$  的装配,因而 ATP25 对 ATP 合酶功能的正常发挥至关重要<sup>[13-15]</sup>。粟酒裂殖酵母作为一种独特的酵母,其与高等真核生物有许多共同的特征。在裂殖酵母中,Atp25 蛋白的定位及其对线粒体功能的影响尚未明确。本文主要研究粟酒裂殖酵母中 Atp25 蛋白定位和参与线粒体功能的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

菌株:粟酒裂殖酵母单倍体菌株 yHL6381 ( $h^+$ , *his3-D1*, *leu1-32*, *ura4-D18*, *ade6-M210*)、大肠杆菌 *Escherichia coli* Top10。

质粒:pFA6a-KanMX6、pJK148、pYJ19。

#### 1.1.2 培养基

LB 培养基:Tryptone 1 g, Yeast Extract 0.5 g, NaCl 1 g, Agar Powder(固体)1.5 g, ddH<sub>2</sub>O 100 mL; YES 培养基:Yeast Extract 0.5 g, Glucose 3 g, Adenine、Histidine、Uracil、Leucine 各 250 mg, Agar Powder(固体)2 g, ddH<sub>2</sub>O 100 mL; EMM-Leucine 培养基:C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>KO<sub>4</sub> 0.3 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 0.555 g, NH<sub>4</sub>Cl 0.5 g, 100×Salt Stock 1 mL, 1 000×Vitamin 100 μL, 1 000×Mineral Stock 10 uL, Adenine、Histidine、Uracil 各 250 mg, Glucose 2 g(单独灭菌), Agar Powder(固体)2 g, ddH<sub>2</sub>O 100 mL; YES+3%甘油:Yeast Extract 0.5 g, Glycerinum 3 mL, Adenine、Histidine、Uracil、Leucine 各 250 mg, Agar Powder(固体)2 g, ddH<sub>2</sub>O 100 mL。

#### 1.1.3 试剂与仪器

试剂:Proofast Siper-Fidelity DNA Polymerase 购自 ATG 公司;4×Wiper Mix、5×Super Mix、SYBR qPCR Master Mix 和产物纯化试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司;PCR 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成;质粒提取试剂盒购自北京擎科新业生物技术有限公司;3.5×MES、37.5%丙烯酰胺、10% APS、TEMED 购自上海生工生物工程股份有限公司;Mitotrack 线粒体染色剂购自南京丁贝生物科技有限公司;T4 DNA 连接酶购自 Takara 公司。

仪器:Odyssey 双色红外激光成像系统;Applied Biosystems 仪器;上海知楚振荡培养箱;垂直电泳仪;恒温培养箱;高压灭菌锅;高速离心机;BIO-RAD Thermal Cycler PCR 仪等。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 生物信息学分析

采用生物软件 Vector NTI 中 AlignX 进行蛋白序列分析;采用在线网站(<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>)分析线粒体定位序列;采用在线网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析蛋白质结构。

#### 1.2.2 菌株构建

通过查阅 Pombase 网站获得 *atp25* 基因序列,在外显子上下游设计引物,扩增得到上下游同源臂,通过酶切酶连将其构建到质粒 pFA6a-KanMX6 上,获得重组质粒。以重组质粒为模板 PCR 获得上游同源臂、KanMX6、下游同源臂单一目的片段,经过醋酸锂转化将目的片段导入野生型 yHL6381 菌株中,通过同源重组的方法获得  $\Delta atp25$  菌株;PCR 扩增 *atp25* 外显子序列及其启动子、终止子序列,将其构建到质粒 pJK148 上,获得重组质粒, *Nru* I 限制性内切酶分别切割重组质粒、pJK148 空载质粒获得线性片段并导入  $\Delta atp25$  菌株中,通过同源重组整合到 Leu 位点得到全长回补菌株 Atp25、空载回补菌株 PJK148;PCR 扩增 *atp25* 外显子序列将其构建到质粒 pYJ19 上,获得重组质粒, *Nru* I 限制性内切酶切割重组质粒并导入  $\Delta atp25$  菌株中,通过同源重组整合到 Leu 位点得到 Atp25-GFP 菌株;构建 pPFA6a-上游同源臂-myc-hph-下游同源臂重组质粒,PCR 获得单一目的片段,导入菌株 yHL6381 中得到 Atp25-Myc 菌株。

1.2.3 表型实验

将菌株(yHL6381、 $\Delta$ atp25、PJK148、Atp25)分别接种至 5 mL 液体培养基 YES 中,30 ℃、200 r/min 振荡过夜培养;转接至新鲜的 YES 中调整 OD=0.2,振荡培养过夜测量 OD 值,取菌液调整初始 OD=3,进行 10 倍梯度稀释,使用漩涡仪振荡混匀,取 3  $\mu$ L 菌液点圈至 YES、YES+3% 甘油固体板,倒放置 30 ℃ 恒温培养箱培养数天,拍照培养皿。

1.2.4 荧光定位实验

将菌株 Atp25-GFP 接种至 5 mL EMM-Leucine 液体培养基中,30 ℃、200 r/min 培养过夜,再转接至新鲜的液体培养基中,调整 OD=0.2,放入振荡培养箱 30 ℃、200 r/min 培养 7 h 至 OD=0.6~0.8 之间,取约 100  $\mu$ L 菌液离心,1 $\times$ PBS 清洗细胞 3 次,最后 100  $\mu$ L 1 $\times$ PBS 重悬细胞,加入 1  $\mu$ L Mitotrack Red 染料,振荡染色 30 s,离心弃上清,10  $\mu$ L 1 $\times$ PBS 重悬菌液,取 2.5  $\mu$ L 制片,进行荧光观察。

1.2.5 存活率测定

将 yHL6381、 $\Delta$ atp25 菌株接种至 YES 液体培养基中,30 ℃、200 r/min 过夜振荡培养,转接至新鲜的 YES 液体培养基,调整 OD<sub>600</sub>=0.2,30 ℃、200 r/min 培养,每隔 12 h 取一次菌液,调整 OD=3 后进行稀释,12 h、24 h、36 h 稀释 10<sup>-4</sup>倍,48 h、60 h 稀释 10<sup>-3</sup>倍,72 h 稀释 10<sup>-2</sup>倍,取 100  $\mu$ L 涂布于 YES 平板,重复 3 组,30 ℃ 培养 3 d,计算每个时间点下培养基中的菌落数,得出不同时间点的存活率(不同时间点的存活率=不同时间点的活菌数/12 h 的活菌数 $\times$ 100%)。

1.2.6 Western-blot 检测 Atp25 蛋白线粒体定位

将 Atp25-myc 菌株接种至 5 mL 液体培养基 YES 中,30 ℃、200 r/min 培养过夜,再转接至 500 mL 新鲜的液体培养基 YES 中,调整 OD=0.2,培养一段时间待菌液 OD=1 左右,离心收集菌后,提取线粒体,通过 Western-blot 检测 Atp25 蛋白的定位,其中 Sla1 蛋白、Hsp60 蛋白分别为细胞核蛋白、线粒体基质蛋白。

1.2.7 Western-blot 检测线粒体呼吸链蛋白表达水平

取两份等量的 yHL6381、 $\Delta$ atp25 菌株的线粒体加入 5 $\times$ Protein loading buffer,第一份线粒体 45 ℃ 温浴 3 min 检测 Cox1、Cox3、Cob1 蛋白;第二份线粒体 100 ℃ 处理 10 min 检测 Hsp60、Cox2、Atp6 蛋白;将样品加至 10% SDS-PAGE 胶槽;电泳:80 V 0.5 h,120 V 1 h;转膜(NC 膜):300 mA,1.5 h;封闭液封闭 1~2 h;TBST 洗膜 3 次/5 min;一抗孵育 2 h;TBST 洗膜 3 次/5 min;二抗避光孵育 1 h;TBST 洗膜 3 次/5 min;Odyssey Infrared Imaging 仪器扫描结果。

1.2.8 qRT-PCR 检测线粒体呼吸链蛋白的 mRNA 水平

分别活化菌株 yHL6381、 $\Delta$ atp25 菌株,接种至 5 mL 液体培养基 YES 中,30 ℃、200 r/min 培养 12 h,再转接至 10 mL 新鲜的液体培养基中,调整 OD=0.2,培养一段时间待菌液 OD=1 左右,Yeast RNA Kit 试剂盒提取酵母细胞 RNA,逆转录形成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 检测线粒体呼吸链蛋白 mRNA 水平。

2 结果与讨论

2.1 Atp25 蛋白定位在线粒体

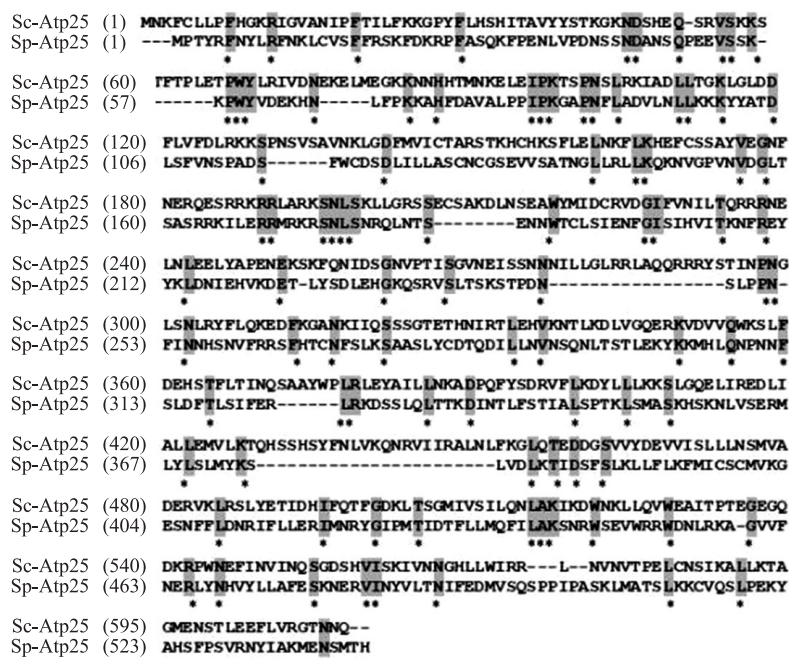
2.1.1 生物信息学分析 Atp25 蛋白大小及线粒体定位

通过在线网站 PomBase、Saccharomyces Genome Database(SGD),获得粟酒裂殖酵母 Atp25 蛋白和芽殖酵母 Atp25 蛋白的氨基酸序列。裂殖酵母 Atp25 蛋白由核基因组编码,具有 542 个氨基酸,其分子量大小为 62.62 kDa。芽殖酵母 Atp25 蛋白具有 612 个氨基酸,分子量大小为 70.43 kDa。Align X 进行蛋白序列比对,结果显示芽殖酵母 Atp25 和裂殖酵母 Atp25 的相似性为 27.6%(见图 1)。在线网站 MitoProt II 分析结果显示 Atp25 蛋白定位在线粒体的概率为 60.36%(见表 1)。

表 1 Atp25 蛋白线粒体定位序列(MTS)分析结果

Table 1 MTS analysis results of Atp25 protein

分析参数	参数值
静电荷数	+21
分析区域	23
基本残基数	5
酸性残基数	0
运输至线粒体概率	0.603 6



图中加阴影及 \* 的部分为完全相同序列

图 1 ScAtp25 和 SpAtp25 相似性比对结果

Fig. 1 The similarity comparison results of ScAtp25 and SpAtp25

2.1.2 荧光显微镜观察 Atp25 蛋白线粒体定位

生物信息学分析结果预测 Atp25 蛋白定位在线粒体,为进一步验证 Atp25 蛋白的定位,本文构建了 Atp25-GFP 菌株(Atp25 蛋白 C 端融合表达 GFP 标签),通过荧光显微镜 Green 通道观察 Atp25 蛋白在酵母细胞中的分布,然后利用 Mito Tracker Red 染料对 Atp25-GFP 菌株进行线粒体染色,线粒体在荧光显微镜 Red 通道下发出红色荧光,将两者进行 Merge 有非常高的黄色共定位,Atp25 蛋白分布与线粒体分布相重合,表明 Atp25 蛋白定位在线粒体(见图 2)。

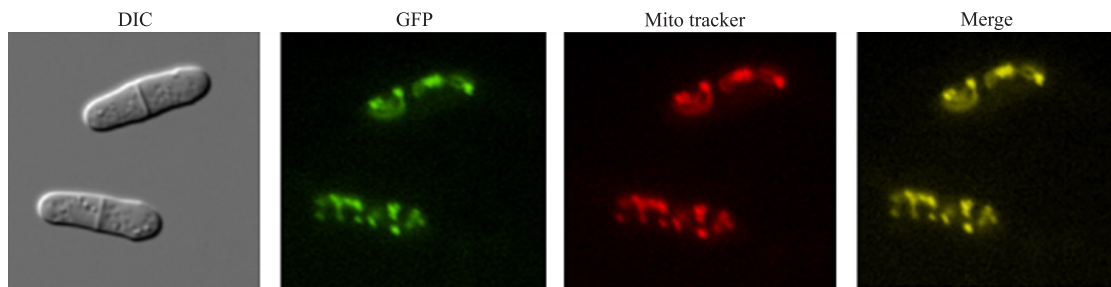


图 2 荧光显微镜观察 Atp25-GFP 与线粒体的共定位

Fig. 2 Fluorescence microscope observation for the localization of Atp25-GFP and Mito Tracker labeled mitochondria

2.1.3 Western-blot 检测 Atp25 蛋白线粒体定位

通过荧光显微镜可初步观察 Atp25 定位在线粒体.为进一步验证,本文提取了 Atp25-myc 菌株的线粒体,在提取过程中保留 T(全蛋白提取样品)、Mt(线粒体蛋白样品)和 PMS(除线粒体外其他组分蛋白),以细胞核蛋白 Sla1 和线粒体基质蛋白 Hsp60 作为对照.如图 3 所示,Western-blot 结果显示在线粒体样品中检测到 Atp25 蛋白,表明 Atp25 蛋白定位在线粒体,并在线粒体中发挥功能。

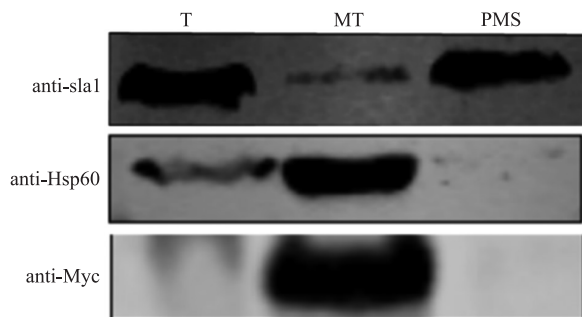


图 3 Western-blot 检测 Atp25 蛋白定位

Fig. 3 Western-blot detection of Atp25 protein localization



## 2.2 $\Delta atp25$ 菌株存在生长及呼吸缺陷

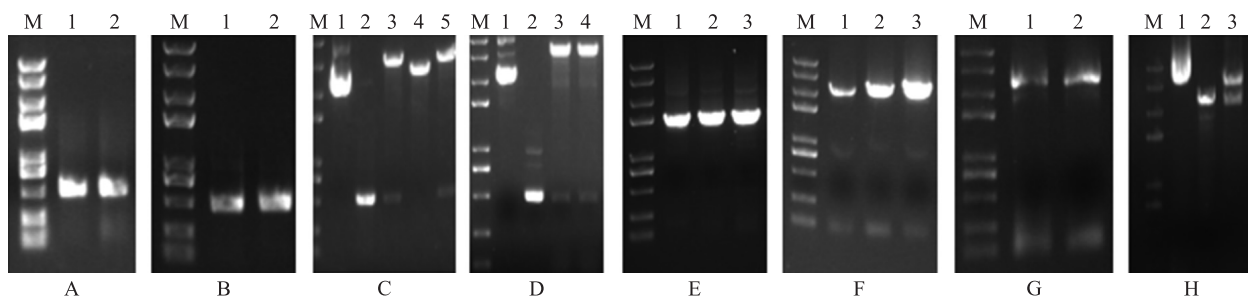
### 2.2.1 菌株的构建

#### (1) $\Delta atp25$ 菌株的构建及验证

PCR 获得 *atp25* 上下游同源臂(图 4A 和 4B),上下游重组质粒酶切验证(图 4C 和 4D),将含有同源臂以及 KanMX6 目的片段醋酸锂转化导入野生型菌株 yHL6381 中,挑取转化子进行验证,设计验证引物 F1(上游引物的 5'端)、R1(下游引物的 3'端)、R2(KanMX6 中间反向引物),使用引物 F1+R1 进行半长验证(图 4E),使用 F1+R2 进行全长验证(图 4F),结果显示菌株构建成功。

#### (2) 全长回补菌株 Atp25 的构建及验证

PCR 获得 *atp25* 回补片段(图 4G);重组质粒的酶切验证(图 4H);*Nru* I 酶切重组回补质粒获得线性片段导入到  $\Delta atp25$  菌株中,挑取转化子验证。



M: 核酸 Marker; A-F 为  $\Delta atp25$  菌株的构建: A-B 分别为上游同源臂、下游同源臂; C 为上游重组质粒酶切验证; D 为下游重组质粒酶切验证; E-F 为转化子 PCR 验证; G-H 为回补菌株 Atp25 重组质粒的构建和验证。

图 4 菌种的构建与验证

Fig. 4 Construction and verification of strains

### 2.2.2 $\Delta atp25$ 为呼吸缺陷型菌株

上述结果显示 Atp25 蛋白定位在线粒体中. 为研究 Atp25 蛋白对线粒体功能的影响,将 yHL6381、 $\Delta atp25$ 、PJK148、Atp25 菌株在 YES、甘油培养基上点圈. 其中,YES 为发酵型培养基,酵母细胞以无氧呼吸为主,不需要利用线粒体;3%甘油+0.1%葡萄糖为非发酵型培养基,酵母细胞进行有氧呼吸,完全依赖线粒体发挥功能. 通过表型实验,研究 Atp25 蛋白是否参与线粒体呼吸作用. 结果显示,YES 培养基中这 4 株菌均正常生长;甘油培养基中, $\Delta atp25$ 、PJK148(对照菌)菌株生长缓慢,而全长回补菌株 Atp25 与 yHL6381 生长情况相同(图 5),表明 Atp25 蛋白缺失影响了酵母细胞正常的呼吸作用, $\Delta atp25$  为呼吸缺陷型菌株。

### 2.2.3 $\Delta atp25$ 菌株存活率降低

研究结果表明  $\Delta atp25$  菌株为呼吸缺陷型菌株,为进一步研究  $\Delta atp25$  菌株的生长情况,将 yHL6381、 $\Delta atp25$  菌株分别在 YES 培养基中培养,每隔 12 h 进行平板菌落计数. 结果显示  $\Delta atp25$  菌株存活率显著下降(图 6),表明 Atp25 蛋白缺失影响酵母细胞的正常生长, $\Delta atp25$  菌株可能由于呼吸作用受损从而影响酵母菌的正常生长,因此 Atp25 蛋白对线粒体呼吸作用的正常发挥非常重要。

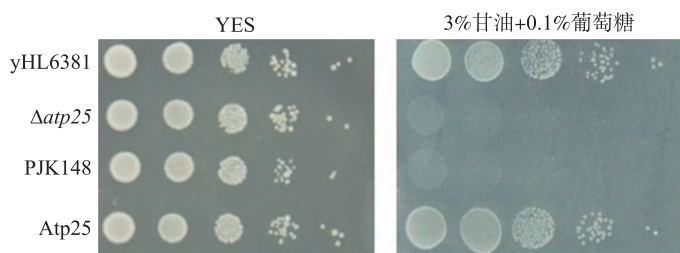


图 5  $\Delta atp25$  菌株的表型结果

Fig. 5 Phenotypic results of  $\Delta atp25$  strain

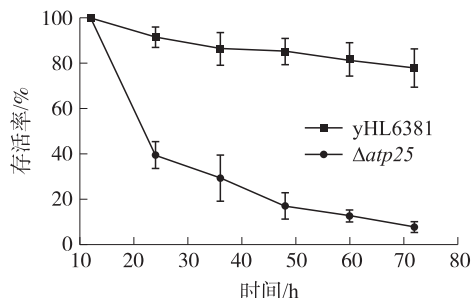


图 6 存活率测定结果

Fig. 6 Results of survival rate determination

## 2.3 Atp25 蛋白缺失影响线粒体呼吸链蛋白表达水平

### 2.3.1 $\Delta atp25$ 菌株线粒体呼吸链蛋白表达水平下调

线粒体是通过有氧呼吸产生能量的主要场所,上述研究结果显示  $\Delta atp25$  菌株不能在非发酵培养基上正常生长,表明  $\Delta atp25$  菌株为呼吸缺陷型菌株. 为进一步研究 Atp25 蛋白对线粒体呼吸作用的影响,本文利用 Western-blot 检测 yHL6381、 $\Delta atp25$  菌株线粒体呼吸链蛋白的表达水平,这些蛋白分别为电子传递链复合体 III (Cob1)、IV (Cox1, Cox2, Cox3)、V (Atp6) 蛋白. Western-blot 结果显示  $\Delta atp25$  菌株中 Cox1、Cox2、Cox3、Cob1、Atp6 蛋白表达量显著降低(见图 7),表明 Atp25 蛋白缺失影响线粒体呼吸链蛋白表达水平,从而影响裂殖酵母细胞正常的呼吸作用.

### 2.3.2 $\Delta atp25$ 菌株线粒体呼吸链蛋白 mRNA 水平无变化

上述研究结果显示  $\Delta atp25$  菌株中线粒体呼吸链蛋白水平受到严重的影响. Atp25 蛋白对线粒体呼吸作用非常重要,为进一步研究 Atp25 蛋白在转录水平对线粒体呼吸链蛋白的影响,本文通过 qRT-PCR 技术检测 yHL6381、 $\Delta atp25$  菌株线粒体呼吸链蛋白的 mRNA 水平,结果显示 Cox1、Cox2、Cox3、Cob1、Atp6 的 mRNA 水平未受影响(见图 8),说明 Atp25 蛋白在转录后水平调控线粒体呼吸链蛋白的表达, Atp25 蛋白缺失导致线粒体呼吸链不能正常组装,从而影响酵母菌正常的呼吸作用.

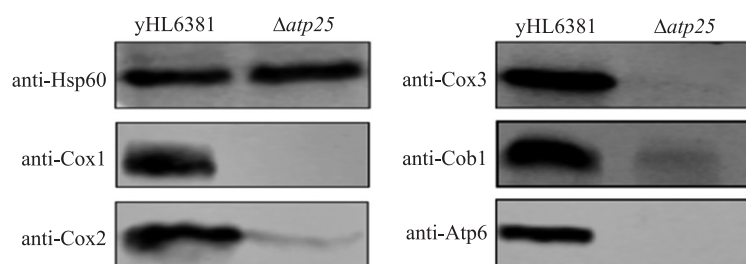


图 7 Western blotting 检测  $\Delta atp25$  菌株线粒体呼吸链蛋白表达量

Fig. 7 Western blotting for mitochondrial respiratory chain protein expression in  $\Delta atp25$  strain

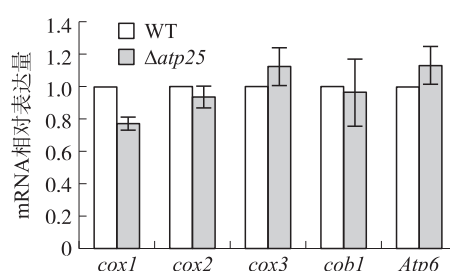


图 8 qRT-PCR 检测  $\Delta atp25$  菌株线粒体呼吸链蛋白 mRNA 水平

Fig. 8 Detection of mitochondrial respiratory chain protein mRNA levels in  $\Delta atp25$  strain by qRT-PCR

## 3 结论

裂殖酵母是一种单细胞生物,具有单倍体的优点,可以很容易地进行基因操作. 裂殖酵母在生长、应激反应、细胞形态和细胞生物化学等方面具有丰富的遗传表型多样性<sup>[16]</sup>. 与芽殖酵母相比, RNA 的剪接机制更类似于高等真核生物,裂殖酵母被认为是一种独特的酵母,具有与哺乳动物细胞相似的特征,使裂殖酵母成为一个信息丰富和准确的真核分子生物学研究模型系统<sup>[17]</sup>.

线粒体被称为“细胞的发动机”,通过氧化磷酸化合成大量 ATP,是细胞生命活动的主要能量来源. ATP 的合成由 ATP 合酶复合体催化完成. 研究表明芽殖酵母 Atp4 蛋白和 Atp10 蛋白参与编码 ATP 合酶  $F_0$  亚基相关蛋白,参与线粒体的能量代谢过程并与线粒体 ATP 的产生密切相关. 以裂殖酵母 Atp4 和 Atp10 蛋白参与线粒体功能的研究为出发点,探索其与线粒体的内在联系,为进一步研究 Atp4 和 Atp10 蛋白如何参与 ATP 合酶的组装奠定基础<sup>[18-19]</sup>. 芽殖酵母 Atp25 蛋白也是组装 ATP 合酶的关键蛋白, Atp25 蛋白由 3 个不同部分组成: N 端 MTS、与细菌 Rsf 相关的结构域和稳定 ATP9 mRNA 的结构域 (M 结构域). 研究表明 ATP25 突变体中  $F_0$  的功能性缺失与 Atp9 亚基的严重缺失有关,芽殖酵母 ATP25 对于 ATP9 的表达是必需的, Atp25 蛋白参与 ATP 合酶的膜扇区  $F_0$  的组装<sup>[20]</sup>. 通过序列比对和蛋白序列分析,粟酒裂殖酵母 Atp25 蛋白与芽殖酵母 Atp25 蛋白相似性达 27.6%,且都含有 RsfS、mRNA stabil 结构域. 芽殖酵母 Atp25 蛋白对于线粒体功能相关研究较为透彻,粟酒裂殖酵母中 Atp25 蛋白参与线粒体功能的机制尚不清楚.

本文主要研究粟酒裂殖酵母 Atp25 蛋白的定位和参与线粒体功能的机制,为进一步研究 Atp25 蛋白是否参与 ATP 合酶组装提供理论基础. 首先通过荧光显微镜观察和免疫印迹技术研究 Atp25 蛋白线粒体

定位,说明 Atp25 蛋白在线粒体中发挥功能. 通过表型实验研究 Atp25 蛋白与线粒体呼吸作用的关系,结果显示  $\Delta atp25$  菌株为呼吸缺陷型菌株,通过测定  $\Delta atp25$  菌株的存活率,表明 Atp25 蛋白缺失缩短了酵母菌的生长寿命, $\Delta atp25$  菌株可能由于呼吸作用受损从而影响酵母菌的正常生长,因此 Atp25 蛋白对线粒体呼吸作用非常重要. 进一步研究发现  $\Delta atp25$  菌株中线粒体呼吸链复合体 III (Cob1)、IV (Cox1, Cox2, Cox3)、V (Atp6) 蛋白水平显著降低,线粒体呼吸链蛋白的 mRNA 水平未受影响,说明 Atp25 蛋白在转录后水平调控线粒体呼吸链蛋白的表达,Atp25 蛋白缺失导致线粒体呼吸链不能正常组装,从而影响酵母菌正常的呼吸作用. 综上所述,裂殖酵母 Atp25 是核基因组编码蛋白质,在线粒体中发挥功能,对线粒体呼吸作用的正常发挥和酵母细胞的正常生长至关重要. 本文明确了粟酒裂殖酵母 Atp25 蛋白的定位以及对线粒体呼吸作用的重要性,为进一步研究 Atp25 蛋白提供理论基础.

### [参考文献] (References)

- [1] HEATH-ENGEL H M, Shore G C. Mitochondrial membrane dynamics, cristae remodelling and apoptosis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2006, 1763(5-6): 549-560.
- [2] BAKER B M, HAYNES C M H. Mitochondrial protein quality control during biogenesis and aging[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2011, 36(5): 254-261.
- [3] CHAN D C. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development[J]. *Cell*, 2006, 125(7): 1241-1252.
- [4] JEFFARES D C. The natural diversity and ecology of fission yeast[J]. *Yeast*, 2018, 35(3): 253-260.
- [5] BRAUN R J, WESTERMANN B. Mitochondrial dynamics in yeast cell death and aging[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2011, 39(5): 1520-1526.
- [6] RINALDI T, DALLABONA C, FERRERO I, et al. Mitochondrial diseases and the role of the yeast models[J]. *FEMS Yeast Research*, 2010, 10(8): 1006-1022.
- [7] VO T D, PALSSON B O. Building the power house: recent advances in mitochondrial studies through proteomics and systems biology[J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2007, 292(1): 164-177.
- [8] BHADURI S, SINGH S K, COHN W, et al. A novel chloroplast super-complex consisting of the ATP synthase and photosystem I reaction center[J]. *PLoS ONE*, 2020, 15(8): e0237569.
- [9] HAHN A, VONCK J, MILLS D J, et al. Structure, mechanism, and regulation of the chloroplast ATP synthase[J]. *Science*, 2018, 360(6389): eaat4318.
- [10] MEHDIPOUR A R, HUMMER G. Cardiolipin puts the seal on ATP synthase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(31): 8568-8570.
- [11] NESCI S, TROMBETTI F, VENTRELLA V, et al. Opposite rotation directions in the synthesis and hydrolysis of ATP by the ATP Synthase: hints from a Subunit Asymmetry[J]. *The Journal of Membrane Biology*, 2015, 248(2): 163-169.
- [12] ARTIKA I M. Current understanding of structure, function and biogenesis of yeast mitochondrial ATP synthase[J]. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2019, 51(5): 315-328.
- [13] ITOH Y, NASCHBERGER A, MORTEZAEI N, et al. Analysis of translating mitoribosome reveals functional characteristics of translation in mitochondria of fungi[J/OL]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1-10 [2021-04-20]. <http://www.nature.com/articles/S41467-020-18830-W>.
- [14] LERTWATTANASAKUL N, SUPRAYOGI, MURATA M, et al. Essentiality of respiratory activity for pentose utilization in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2013, 103(4): 933-945.
- [15] ZENG X M, BARROS M H, SHULMAN T, et al. ATP25, a new nuclear gene of *Saccharomyces cerevisiae* required for expression and assembly of the Atp9p subunit of mitochondrial ATPase[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2008, 19(4): 1366-1377.
- [16] MALINA C, LARSSON C, NIELSEN J. Yeast mitochondria: an overview of mitochondrial biology and the potential of mitochondrial systems biology[J]. *FEMS Yeast Research*, 2018, 18(5): 1-17.
- [17] PALERMO V, FALCONE C, MAZZONI C. Apoptosis and aging in mitochondrial morphology mutants of *S. cerevisiae*[J]. *Folia Microbiologica*, 2007, 52(5): 479-483.
- [18] 谢婉秋, 黄鹰. 粟酒裂殖酵母 Atp10 在线粒体中功能的研究[J]. *南京师大学报(自然科学版)*, 2019, 42(2): 109-114.
- [19] 李琴, 张琳琳, 黄鹰. 粟酒裂殖酵母 Atp4 定位和功能的研究[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(8): 59-63.
- [20] WOELLHAF M W, SOMMER F, SCHRODA M, et al. Proteomic profiling of the mitochondrial ribosome identifies Atp25 as a composite mitochondrial precursor protein[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2016, 27(20): 3031-3039.

[责任编辑: 严海琳]