



利用绿色荧光蛋白筛选酵母突变株的新方法

目前, 酵母这一最简单的真核生物, 由于与人类基因有较高的同源性、易操作且背景清楚, 成为科学家们首选的真核模式生物之一。同源重组是生物体生长发育过程中普遍存在的自然现象, 而体外同源重组, 又称基因打靶, 指外源DNA与细胞染色体DNA上的同源序列间发生重组, 并整合在预定位点上, 从而改变细胞遗传特性的一种方法, 能达到基因突变的目的[1][2]。我们通过转座子和同源重组技术[3][4][5]对酵母基因组文库进行筛选, 初步筛选出所需的酵母突变株, 旨在为新基因的发现、新的功能性基因组的研究和发展奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌DH5 α 为本室保存; 酵母菌株INVSc1购自Invitrogen公司, 其遗传型与表型Genotype为: MET/MET α his3 Δ 1/his3 Δ 1 leu2/leu2 trp1-289/trp1-289ura3-52/ura3-52; Phenotype:His, Leu, Trp, Ura。pHSS6酵母-大肠杆菌穿梭质粒(在pHSS6的插入片段中含有mTn-3xHA/GFP同源重组子, ura3以及卡那霉素或/和四环素抗性基因)由美国Yale大学Snyder M教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 感受态细胞的制备 大肠杆菌DH5 α 感受态细胞的制备参见分子克隆实验指南[6]。

1.2.2 大肠杆菌转化 从质粒文库中取1 μ l菌液(50 ng/ μ l)以常规方式转化大肠杆菌DH5 α [6]。铺板, 用50 μ g/ml卡那霉素或/和3 μ g/ml四环素筛选抗性克隆, 37 $^{\circ}$ C培养12~20 h。以LB洗下克隆, 适当稀释, 部分以甘油冻存, 适当稀释后, 接种于50 ml LB-50 μ g/ml卡那霉素和/或3 μ g/ml四环素, 37 $^{\circ}$ C培养至指数生长期。

1.2.3 质粒的提取、纯化及检测 常规方法提取质粒[6], 纯化质粒, 电泳分析, 紫外分光光度计D₂₆₀/₂₈₀检测。部分经酒精沉淀保存。

1.2.4 酵母转化 取3 μ g纯化的质粒, 经Not I内切酶酶切(根据内切酶附说明书), 电泳, 培养10 ml NVSc1酵母菌至指数生长期(30 $^{\circ}$ C, 36~48 h), D₆₀₀=1, 离心收集细胞, 以5 ml转化缓冲液清洗一次[转化缓冲液: 0.2 mol/L LiAC, 40%PEG 4 000, 100 μ mol/L -ME(巯基乙醇)]。将细胞重新悬浮于1 ml转化缓冲液中, 含1 mg变性鲑鱼精DNA 0.5 μ g, 彻底混匀后, 于45 $^{\circ}$ C孵育30 min。细胞经离心收集, 悬浮于400 μ l的SC-ura, 用200 μ l铺板, 30 $^{\circ}$ C培养3 d。

1.2.5 GFP基因的表达 为检测GFP基因的表达, 挑出单克隆, 接种于5 ml SC-ura培养液中, 30 $^{\circ}$ C培养至D₆₀₀=1, 最后室温下培养4 h, 以利于GFP基因发光基团的表达。

2 结果

2.1 酶切后的电泳图

纯化的质粒，经Not I 酶解，可见一条明显的2.1 kb左右的较均一的条带(载体pHSS6)和较不均一的DNA插入片段条带(约8 kb，含有mTn-3xHA/GFP)，见图1。

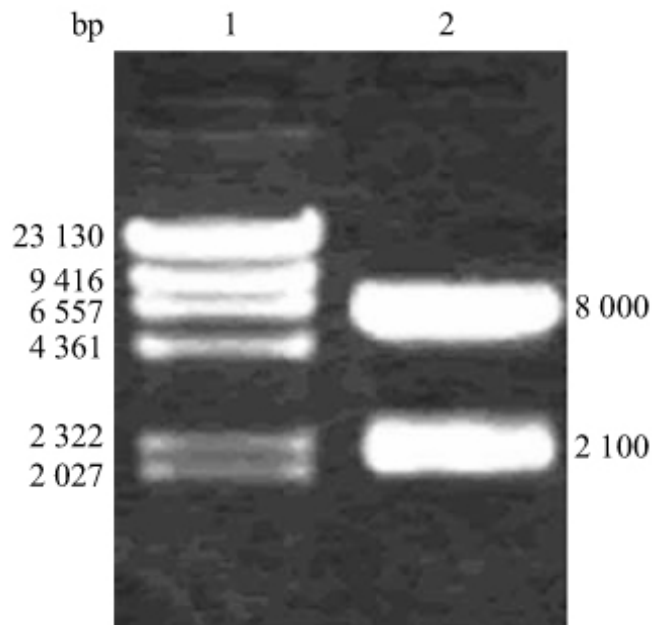


图1 pHSS6-Mtn-3HA/GFP文库质粒的Not I 酶切电泳图
Fig.1 Restriction analysis of pHSS6-Mtn-3HA/GFP
Lane 1: λ -HindIII DNA ladder; Lane 2: pHSS6-Mtn-3HA-GFP/Not I

2.2 转化株的SC-ura培养基上的生长情况

由于发生同源重组后的转化子含有抗性基因及酵母营养缺陷型选择标记Ura3, 因此可以通过SC-ura或 tetr, 选出我们所需的转化株，见图2。

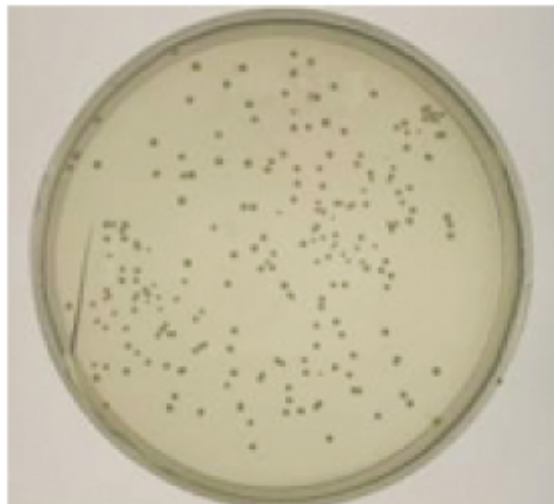


图2 酵母转化株在SC-ura培养基上的生长情况
Fig.2 Yeast mutants growing on the SC-ura plate

2.3 GFP基因的表达

若同源重组插入片段与酵母原位基因组读码框相匹配，且插入位点附近有强的启动子，则可产生有活性的GFP。在488 nm蓝色激光的激发下，通过荧光显微镜就观察到绿色荧光。图3可见本实验筛选出的GFP表达的

酵母菌株。

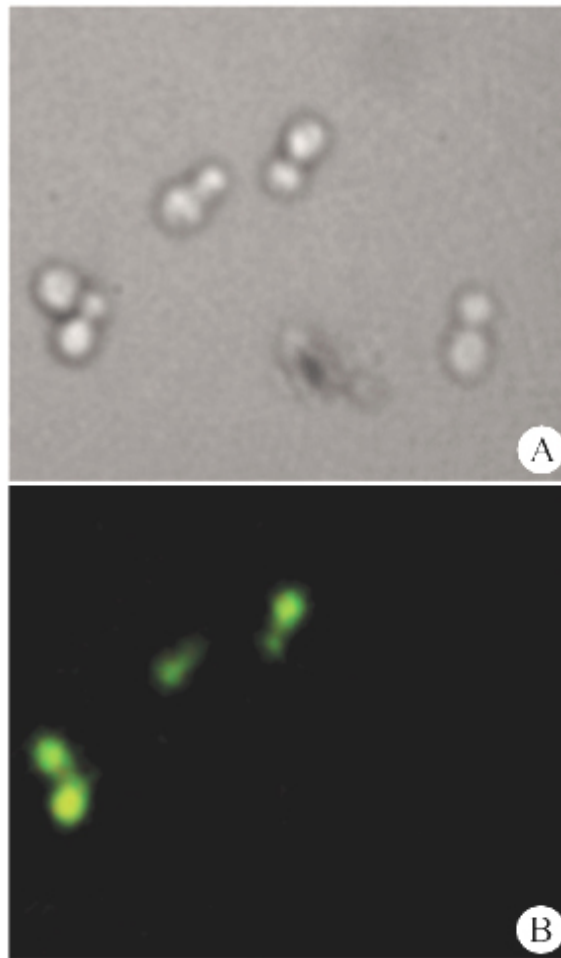


图3 筛选出的GFP表达的酵母菌株(原放大倍数: $\times 400$)

Fig. 3 GFP expressions in mutant yeast cells in the same visual field(Original magnification: $\times 400$)

A: Visible light; B: Fluorescent light

3 讨论

本实验通过将转座子mTn与3xHA/GFP进行连接,构成mTn-3xHA/GFP转座子,其中含有mTn, GFP, ura3, tetr。将酵母DNA经Not I内切酶处理后,插入一特殊的载体系统,转化大肠杆菌构成一酵母DNA文库,由于组成该酵母文库的质粒中有转座子识别位点,因此,再以构成的mTn-3xHA/GFP进行转化, mTn转座子可以随机地插入酵母DNA中。该文库制备后转染大肠杆菌,提取文库质粒,经Not I内切酶酶切线性化,进一步转化INVScl酵母细胞。转化后的酵母细胞可以利用SC-ura(尿嘧啶缺陷SC培养基)进行筛选。转化时文库质粒上的酵母基因组DNA,可与被转化酵母染色体上的同源序列进行同源重组,若插入的酵母DNA片段与酵母基因组的阅读框相匹配,且其插入位置附近有强的启动子,则此酵母DNA片段与GFP形成的融合蛋白就会表达。不仅可在SC-ura平板会长出,同时在荧光显微镜下观察GFP会发出荧光。这一方法相对于传统的方法来说非常简单、快捷、实用。突变株的筛选只是酵母功能研究的一部分,对酵母突变株做进一步的分析研究,可通过质粒拯救、基因序列分析、基因的鉴定、免疫电镜定位等,此部分工作正在进行中。

GFP相对分子质量很小,而且其发色基团性质稳定,在与其他蛋白质连接后可发射荧光,同时不影响它所连接的蛋白质的结构和功能,是一种理想的报告基因[7]。GFP荧光强度大、检测灵敏、方便易行且可活体跟

踪观察。本实验利用GFP与酵母基因片段相结合，整合到酵母基因组中，通过荧光显微镜检测GFP的荧光来测定蛋白的表达同时，也可通过激光共聚焦显微镜对表达的蛋白示踪、定位，且筛选出的酵母突变株荧光发光稳定，放置72 h也不减弱。

酵母基因全基因序列测序工作于1996年已全部完成，在测序结果提示的6 000多个开放读框中，只有不到一半是功能已知的[8]。所以如何确定那些新基因的功能将是这一领域的研究者们面临的主要问题。本实验采用的该系统不仅可以预知未知基因，而且可以通过其表达产物的定位来预知其结构和功能[9]。由于基因表达产物的功能与其亚细胞定位是密切相关的，因此这一系统是基因及其表达产物功能研究中的一个强有力的工具[10][11]。

(责任编辑：段咏慧)

参考文献：

- [1] Koller BH, Smithies O. Altering genes in animals by gene targeting[J]. *Ann Rev Immunol*, 1992, 10: 705-30.
- [2] Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination[J]. *Science*, 1998, 244 (4910): 1288-92.
- [3] Ross-Macdonald P, Coelho PS, Roemer T, et al. Large-scale analysis of the yeast genome by transposon tagging and gene disruption[J]. *Nature*, 1999, 402(6760): 413-8.
- [4] Ross-macdonald AMY, Sheehan G. A multipurpose transposon system for analyzing protein production, localization, and function in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 190-5.
- [5] Anuj K, Seema A, John A, et al. Subcellular localization of the yeast proteome [J]. *Genes Dev*, 2002, 16: 707-19.
- [6] 萨姆布鲁克J, 弗里奇EF, 曼尼阿蒂斯著T著. 金冬雁, 黎孟枫. 分子克隆实验指南[M]. 第2版, 北京: 科学出版社, 1992. 24-55.
- [7] 廖成, 赵慕钧, 李载平. 小鼠一个新基因mLPTS的克隆、表达及亚细胞定位[J]. *遗传学报*, 2002, 29(10): 865-70.
- Liao C, Zhao MJ, Li ZP. The clone and expression of a novel mouse gene mLPTS and its subcellular location[J]. *Acta Genet Sin*, 2002, 29(10):865-70.
- [8] Wood V, Gwilliam R, Rajandream M, et al. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*[J]. *Nature*, 2002, 415: 871-80.
- [9] Giaever G, Chu AM, Ni L, et al. Functional profiling of the *Sac charomyces cerevisiae* genome[J]. *Nature*, 2002, 418(6896): 387-91.
- [10] Novak JE, Ross-Macdonald PB, Roeder GS. The budding yeast Msh4 protein functions in chromosome synapsis and the regulation of crossover distribution[J]. *Genetics*, 2001, 158(3): 1013-25.
- [11] Carroll PM, Dougherty B, Ross-Macdonald P, et al. Model systems in drug discovery: chemical genetics meets genomics[J]. *Pharmacol Ther*, 2003, 99(2): 183-220.

参考文献：

- [1] Koller BH, Smithies O. Altering genes in animals by gene targeting[J]. *Ann Rev Immunol*, 1992, 10: 705-30.
- [2] Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination[J]. *Science*, 1998, 244 (4910): 1288-92.
- [3] Ross-Macdonald P, Coelho PS, Roemer T, et al. Large-scale analysis of the yeast genome by transposon tagging and gene disruption[J]. *Nature*, 1999, 402(6760): 413-8.

- [4] Ross-macdonald AMY, Sheehan G. A multipurpose transposon system for analyzing protein production, localization, and function in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 190-5.
- [5] Anuj K, Seema A, John A, et al. Subcellular localization of the yeast proteome [J]. *Genes Dev*, 2002, 16: 707-19.
- [6] 萨姆布鲁克J, 弗里奇EF, 曼尼阿蒂斯著T著. 金冬雁, 黎孟枫. 分子克隆实验指南[M]. 第2版, 北京: 科学出版社, 1992. 24-55.
- [7] 廖成, 赵慕钧, 李载平. 小鼠一个新基因mLPTS的克隆、表达及亚细胞定位[J]. *遗传学报*, 2002, 29(10): 865-70.
- Liao C, Zhao MJ, Li ZP. The clone and expression of a novel mouse gene mLPTS and its subcellular location[J]. *Acta Genet Sin*, 2002, 29(10):865-70.
- [8] Wood V, Gwilliam R, Rajandream M, et al. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*[J]. *Nature*, 2002, 415: 871-80.
- [9] Giaever G, Chu AM, Ni L, et al. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome[J]. *Nature*, 2002, 418(6896): 387-91.
- [10] Novak JE, Ross-Macdonald PB, Roeder GS. The budding yeast Msh4 protein functions in chromosome synapsis and the regulation of crossover distribution[J]. *Genetics*, 2001, 158(3): 1013-25.
- [11] Carroll PM, Dougherty B, Ross-Macdonald P, et al. Model systems in drug discovery: chemical genetics meets genomics[J]. *Pharmacol Ther*, 2003, 99(2): 183-220.