

利用绿色荧光蛋白筛选酵母突变株的新方法

胡莲美^{1,2}, 朴英杰¹, 何才姑¹, 马文丽³, 崔东², 郑文岭² (南方医科大学¹组织胚胎学教研室,³分子生物学研究所, 广东广州 510515; ²广州军区广州总医院医学实验科, 广东广州 510010)

摘要: 目的 建立快速简便筛选酵母突变株的方法。方法 利用同源重组技术, 通过转座子上的 GFP 基因, 从酵母基因组文库中, 检测发生突变的菌株, 从而筛选出酵母突变株。结果 应用荧光显微镜观察 SC-ura 选择平板筛选出的酵母, 有绿色荧光发出的即为阳性菌落。结论 利用同源重组技术, 初步筛选出了所需的酵母突变株。

关键词: 同源重组; 转座子; 绿色荧光蛋白; 酵母; 突变株

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2004)10-1150-03

A new method for screening mutant yeast strains with green fluorescent protein

HU Lian-mei^{1,2}, PIAO Ying-jie¹, HE Cai-gu¹, MA Wen-li³, CUI Dong², ZHENG Weng-ling²

¹Department of Histology and Embryology, ³Institute of Molecular Biology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Department of Experimental Medicine, General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China

Abstract: **Objective** To establish a fast and simple method for screening mutant yeast strains. **Materials and Methods** Homologous recombination technique was used to detect mutant yeast strains in yeast genomic library, with the green fluorescent protein gene as the reporter gene in the transposon. **Results** The strains that emitted green fluorescence were isolated, indicating that the *gfp* gene was inserted into the yeast genome by homologous recombination. **Conclusion** This study established a useful method for functional genome study by homologous recombination technique, and provide an alternative for gene therapeutic drug development.

Key words: homologous recombination; transposon; green fluorescent protein; yeast; mutant strains

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^[3-5]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 酵母一大肠杆菌穿梭质粒 (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 D_{260/280} 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

收稿日期: 2004-03-12

基金项目: 国家自然科学基金(39880044)

Supported by National Natural Science Foundation of China (39880044)

作者简介: 胡莲美(1976-), 女, 在读博士研究生, 电话: 020-88511086,

E-mail: hulianmei@yahoo.com.cn

通讯作者: 郑文岭, E-mail: wenling@fimmu.edu.cn

$\mu\text{mol/L}$ -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 μg ,彻底混匀后,于 45 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。细胞经离心收集,悬浮于 400 μl 的 SC-ura,用 200 μl 铺板,30 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 $D_{600}=1$,最后室温下培养 4 h,以利于 GFP 基因发光基因的表达。

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。

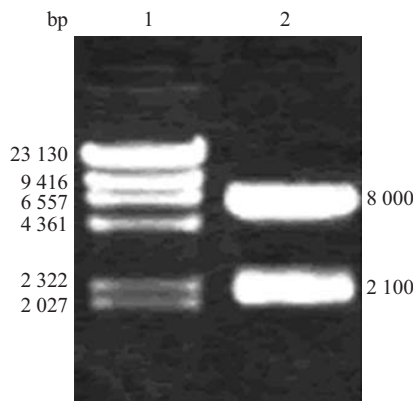


图 1 pHSS6-Mtn-3HA/GFP 文库质粒的 *Not* I 酶切电泳图

Fig.1 Restriction analysis of pHSS6-Mtn-3HA/GFP

Lane 1: λ -*Hind* III 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。

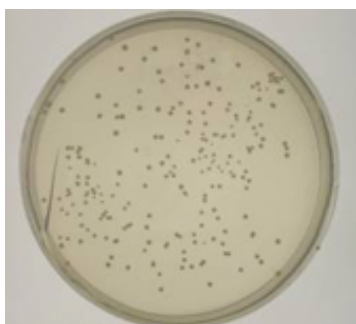


图 2 酵母转化株在 SC-ura 培养基上的生长情况

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。

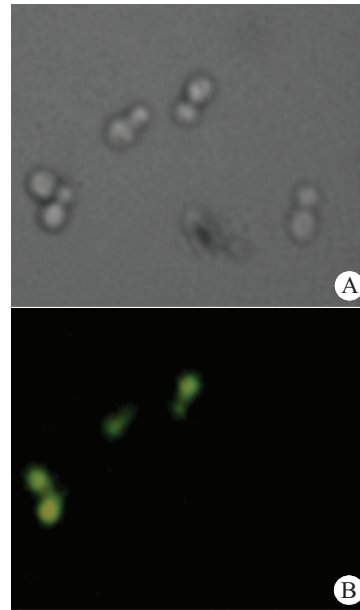


图 3 筛选出的 GFP 表达的酵母菌株 (原放大倍数: $\times 400$)

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 INVSc1 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、免疫电泳定位等,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]。

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.

(责任编辑:段咏慧)

(上接 1149 页)

参考文献:

- [1] Green KY, Ando T, Balayan MS, *et al.* Taxonomy of the caliciviruses [J]. *J Infect Dis*, 2000, 181(s2): s322-30.
- [2] Chiba S, Nakata S, Numata-Kinoshita K, *et al.* Sapporo virus: history and recent findings[J]. *J Infect Dis*, 2000, 181(s2): s303-8.
- [3] 陈东梅, 张又, 钱渊, 等. 北京地区婴幼儿人类杯状病毒感染状况及型别分析 [J]. *中华儿科杂志*, 2002, 40(7): 398-401.
Chen DM, Zhang Y, Qian Y, *et al.* Human caliciviruses of different genotypes identified from infants and young children with acute diarrhea in Beijing area [J]. *Chin J Pediatr*, 2002, 40(7): 398-401.
- [4] Hansman GS, Katayama K, Maneekarn N, *et al.* Genetic diversity of norovirus and sapovirus in hospitalized infants with sporadic cases of acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(3): 1305-7.
- [5] Schuffenecker I, Ando T, Thouvenot D, *et al.* Genetic classification of "Sapporo-like viruses" [J]. *Arch Virol*, 2001, 146(11): 2115-32.
- [6] Pang XL, Honma S, Nakata S, *et al.* Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community [J]. *J Infect Dis*, 2000, 181(s2): S288-94.
- [7] Phan TG, Okame M, Nguyen TA, *et al.* Human astrovirus, norovirus (GI, GII), and sapovirus infections in Pakistani children with diarrhea [J]. *J Med Virol*, 2004, 73(2): 256-61.
- [8] Rockx B, de Wit M, Vennema H, *et al.* Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study [J]. *Clin Infect Dis*, 2002, 35(3):246-53.