

酵母基因中断技术*

徐志刚 霍克克** 李育阳

(复旦大学生命科学学院, 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433)

摘要 酵母基因中断技术是研究酵母基因功能的重要手段, 自 80 年代初诞生以来经历了不断的改进和发展. PCR 介导的酵母基因中断技术, 大大简化了操作, 实现了酵母基因的精确缺失; 酵母基因的多重中断技术, 可在酵母内实现多个基因的中断; 可进行大规模基因中断和功能分析的酵母基因中断技术, 适应了酵母全基因组测序完成的情况下进行功能基因组学研究的要求. 酵母基因中断技术对人类基因功能研究也有很大启示作用.

关键词 酵母, 基因中断, 功能基因组学

学科分类号 Q753

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 全基因组测序工作已于 1996 年全部完成, 在测序结果揭示的 6 000 多个开放读框中只有不到一半是功能已知的^[1]. 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. 80 年代初发展起来的酵母基因中断 (gene disruption) 技术为我们提供了有力的工具. 把待研究的基因缺失后, 观察酵母在不同条件下表型的变化, 就可以得到关于该基因生物功能的重要信息. 而且, 作为模式生物之一, 酵母基因中断技术对人类基因功能的研究也有帮助. 将一个与已知功能的酵母基因有序列同源性的未知基因转入这个酵母基因的缺失株, 若能补偿缺失造成的表型, 则可认为这二者之间的功能有相似之处. 因此, 酵母基因中断技术已成为功能基因组学 (functional genomics) 研究的重要工具之一.

1 酵母基因中断技术的创立

70 年代末以来的一系列实验表明, 携带酵母同源序列的质粒转化酵母以后, 可通过同源重组整合到染色体相应位置上, 造成酵母内同源基因的替换或缺失^[2~5]. 基于这些研究, Rothstein^[6] 于 1983 年提出了一步基因中断法 (one step gene disruption). 通过限制性内切酶的作用将克隆在质粒上的目标基因编码部分用报告基因 (marker gene) 代替, 只保留目标基因的 5' 和 3' 同源区. 从质粒上切下来即得到中断盒 (disruption cassette), 用以转化酵母细胞, 通过体内同源重组把染色体上的目标基因替换掉. 这样就得到了一个目标基因完全或部分缺失, 相应位置被一个报告基因取代的缺

失菌株. 在此之前也曾有人提出过其他的中断方法^[3,5], 但一步中断法操作简便, 结果稳定, 所以以后的研究者多采用这种方法.

2 PCR 介导的酵母基因中断技术

一步法虽然较其他方法简便, 但仍需先把目标基因克隆到质粒载体上, 而且寻找合适的酶切位点也不是一件容易的事. PCR 技术的诞生为我们提供了更为简便的方法. 1993 年 Baudin 等^[7] 提出了一种后人称之为短侧翼同源区 PCR (short flanking homology region-PCR, SFH-PCR) 介导基因中断的方法. 这种方法既不需要克隆目标基因, 也不需要寻找酶切位点, 整个中断盒的构建只需一次 PCR 即可完成. PCR 的引物由两部分构成, 外侧部分与目标基因 5' 或 3' 非编码区同源, 用于与酵母内的目标基因重组, 内侧部分与报告基因互补, 用于 PCR 扩增报告基因, 构建中断盒.

SFH-PCR 中断法虽然更加简便, 但受引物长度的限制, 用于体内重组的酵母同源序列不可能很长, 中断的效率往往较低. 1996 年 Wach^[8] 提出了长侧翼同源区 PCR (long flanking homology region-PCR, LFH-PCR) 介导的基因中断法. 该方法通过两轮 PCR 完成中断盒的构建. 第一轮 PCR 扩增目标基因的 5' 和 3' 不翻译区, 第二轮 PCR 以第一轮 PCR 产物作为引物扩增报告基因. 这样构建的中断盒内酵母同源部分可达数百 bp, 大大提高了

* 国家 863 计划资助项目 (863-102-11-02-02).

** 通讯联系人.

Tel: 021-65643023, E-mail: kkhua@fudan.edu

收稿日期: 2000-04-25, 接受日期: 2000-06-07

中断效率 (图 1)。

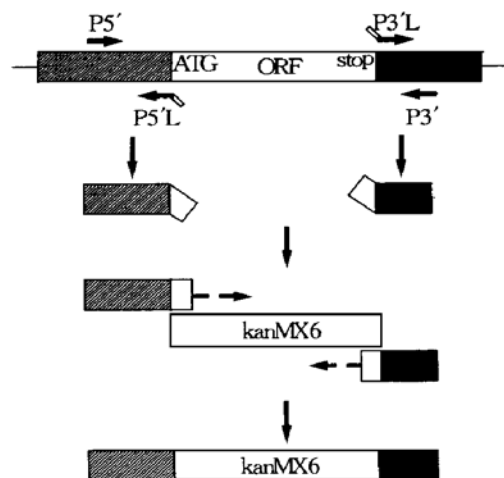


Fig. 1 LFH-PCR for gene disruption^[8]

图 1 LFH-PCR 法构建中断盒

与传统的中断方法相比, PCR 介导的中断最大的优点是不需克隆目标基因, 只要知道该基因的序列信息, 即可以实现精确的缺失。

3 酵母基因的多重中断技术

酿酒酵母基因组测序结果表明, 在酵母基因组中大量存在基因冗余的现象^[1], 即有许多基因从属于某些基因家族, 与家族中的其他基因在功能上有相似之处。在研究这些基因的功能时, 倘若只缺失其中某一基因, 很可能得不到预期的表型变化, 所以有必要对该酵母基因家族进行多重缺失。这就要求有多个报告基因可供利用。常用的报告基因多为营养合成型基因, 如 *URA3*、*LEU2*、*HIS3*、*TRP1* 等, 使用时要求宿主菌为该基因缺失的菌株。倘若用几个报告基因对酵母进行多重缺失, 显然对酵母菌株的要求就很高。所以人们不断寻找外源的报告基因, 如 *KanMX*、*LacZMT* 等, 这一类报告基因的好处是不需要在酵母中缺失相应报告基因, 而且可以避免目标基因以外的同源重组。但由于报告基因种类的限制, 仍然不能满足酵母基因多重中断的要求。为此, 人们从另一个角度出发, 寻找可以重复利用报告基因的方法。

3.1 利用位点非特异性同源重组剔除报告基因

1987 年 Alani 等^[9] 构建了一个长 3.8 kb 的中断盒。他们在报告基因 *URA3* 和两端的酵母同源序列之间各加入了一个 1.1 kb 的重复序列 *hisG*。当中断盒转化酵母细胞, 造成目标基因缺失以后, 报告基因两端的 *hisG* 会以 10^{-4} 的频率发生同源重

组, 把报告基因 *URA3* 剔除, *URA3* 就可以在以后中断该酵母中其他基因时再次使用。用含 5FOA 的培养基进行反选择即可以很方便地得到丢失 *URA3* 的克隆。这种方法的缺点是每次中断后会在染色体上留下一个拷贝的 *hisG*。多次中断后, 残留 *hisG* 之间的同源重组则可能造成染色体的重排。

1995 年 Langle-Rouault 等^[10] 在报告基因 *URA3* 两侧都连上目标基因的 5' 和 3' 不译区, 缺失目标基因后用含 5FOA 的培养基反选择, 得到剔除 *URA3* 的克隆。用这种方法得到的缺失菌株在目标基因处只留下该基因的 5' 和 3' 不翻译区, 避免了残留序列之间的重组 (图 2)。

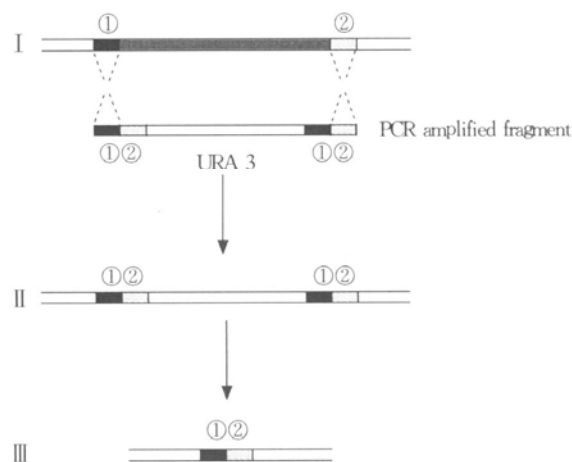


Fig. 2 Gene disruption using a recyclable selectable marker^[10]

图 2 利用同源重组剔除报告基因

①和②为 5' 和 3' 不译区和目标基因

1996 年 Wach^[8] 提出, 在用 LFH-PCR 法中断目标基因时把第一轮 PCR 产生的目标基因 5' 和 3' 不翻译区直接相连, 转化该目标基因缺失后的酵母细胞, 也可以实现报告基因的剔除。这种方法同样不存在残留序列重组的问题。

3.2 利用位点特异重组酶介导剔除报告基因

上述方法除尽管能实现酵母基因的多重中断, 但由于报告基因的剔除效率很低, 需要报告基因能够被反选择, 这就限制了报告基因使用的种类。而利用位点特异重组酶介导的报告基因剔除法则对大多数报告基因都适用。

1989 年 Cregg 等^[11] 在报告基因和酵母同源序列之间加入了 2μ 质粒中的位点特异重组酶识别序列 FRT。缺失目标基因后, 再转入 2μ 质粒编码的位点特异重组酶基因 *FLP*, *FLP* 基因的表达造成 FRT 序列之间的重组并剔除报告基因。1994 年 Sauer^[12] 在报告基因和酵母同源序列之间加入了

*E. coli*噬菌体 P1 的位点特异重组序列 loxP, 利用其位点特异重组酶 Cre 剔除报告基因. 但这两种方法只是提高了剔除报告基因的效率, 不能解决残留序列之间重组造成的染色体重排.

1999 年 Storici 等^[13]成功解决了这一问题. 以往的研究表明, 由 8 bp 核心序列加上两端各 13 bp 的反向重复构成的最小 FRT 序列就可以在 FLP 酶的作用下完成定点重组, 而两个 FRT 的 8 bp 核心序列中一个碱基的差异即可导致重组不能发生. Storici 等用不同的突变 FRT 构建中断盒以中断不同的基因. 由于各突变 FRT 核心序列不一样, 避免了残留 FRT 之间的重组. 而且, 他们把 FLP 基因直接克隆在中断盒里, 而不是由另外的质粒携带, 大大简化了操作, 减少了对报告基因种类的需求.

3.3 利用限制性内切酶介导剔除报告基因

1996 年, Fairhead 等^[14]在报告基因和两侧的酵母同源序列之间插入了 I-Sce I 识别位点. I-Sce I 是酿酒酵母线粒体基因内含子编码的一种限制性内切酶, 识别并切割 18 个碱基的非对称序列, 留下两个不能完全配对的粘端. 中断目标基因后, 转入含 I-Sce I 基因的质粒, 即可切除报告基因. 体内修复产生改变了的 I-Sce I 位点, 不会在以后的中断中被 I-Sce I 识别, 避免了因此产生的染色体重排.

3.4 报告基因的替换

前面介绍的几种方法都是通过剔除已用过的报告基因以达到重复利用报告基因的目的. 1994 年

Vidal 等^[15]提出了另一种思路, 通过替换报告基因实现报告基因的重复利用. 这种方法是建立在一种被称为 γ 缺失的中断方法基础之上的. γ 缺失法构建的中断盒在报告基因和酵母同源序列之间插有质粒序列, 利用这段质粒序列之间的同源重组就可以实现报告基因的替换 (图 3). 这种方法的缺点是无法避免多次中断后各残留同源序列之间重组引起的染色体重排.

4 用于高通量功能分析的基因中断技术

酵母基因组测序工作完成以后, 世界各地的研究者相继展开了系统研究 3 000 多个酵母新基因功能的工作. 其中很重要的一个方面就是对各基因缺失菌株进行系统分析. 1996 年 Shoemaker 等^[16]提出了一种称为“标签编码”的策略 (bar coding strategy). 他们采用 SFH-PCR 的方法, 3' 端引物与一般的 SFH-PCR 中的 3' 端引物类似, 由 50 bp 酵母同源序列和 18 bp 报告基因互补序列构成. 而 5' 端引物则由四部分构成, 最外侧是 30 bp 的酵母同源序列, 然后是 18 bp 通用序列, 再往下是 20 bp 标签序列, 最后是 18 bp 与报告基因互补以扩增报告基因的序列. 用于中断不同基因的中断盒中 20 bp 标签序列都不一样, 为每个缺失基因在分子水平“贴”上了一个标签. 用这种方法得到的缺失菌株可以进行系统的功能分析, 把各种缺失菌株混杂在一起, 通过不同条件的筛选后, 用标签序列两端的 18 bp 序列作引物扩增标签序列, 再通过诸如基因芯片和微点阵技术等检测手段, 就可以定量检测哪些基因缺失后在哪种特定的条件下对酵母的生长造成影响. 这种方法的不足之处是没有很好地解决如何在同一菌株中进行多个基因缺失的问题.

5 利用转座子实现的大规模基因中断

利用转座子插入先对大肠杆菌中的酵母基因组质粒文库进行大规模基因中断, 再把含中断基因的质粒转入酵母中, 通过同源重组, 实现酵母染色体上的基因的中断. 这种方法的优点是可以实现大规模基因中断, 缺点是中断过程是完全随机的, 不能事先决定中断哪一个基因. 2000 年耶鲁大学的 Michael 等^[17]采用这种策略, 得到了 7 800 多个酵母基因中断菌株. 他们所用的转座子中除了转座必需的元件和报告基因 *lacZ* 之外, 还加入了三个串联排列的编码流感病毒血细胞凝集素表位的序列, 可以通过免疫荧光检测对目标基因的蛋白质产物进

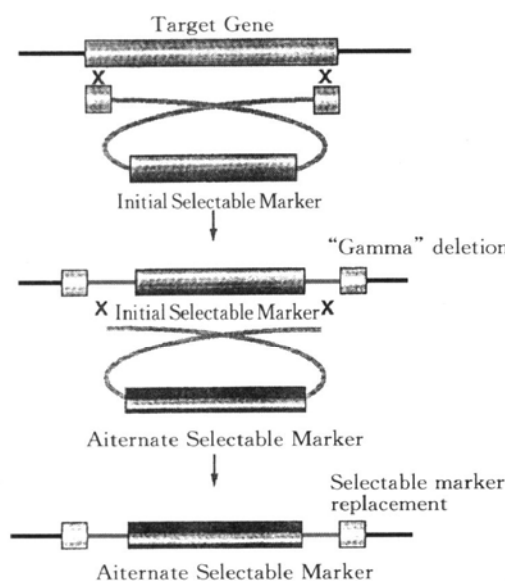


Fig.3 Selectable marker replacement^[15]

图 3 报告基因的替换

行亚细胞定位。这样,人们就可以同时得到关于被中断基因的表达、中断表型和蛋白质定位的信息。Michael等建立了一个名为TRIPLES (Transposon-Insertion Phenotypes, Location and Expression in *Saccharomyces*)的数据库,包含通过对这7 800个中断菌株分析得到的有关酵母基因功能的一些信息。TRIPLES的网址为<http://ycmi.med.yale.edu/ygac/triples.htm>。

6 酵母基因中断技术的展望

除以上几个方面外,酵母基因中断技术在其他方面也有诸多改进。如1993年Verhasselt等^[18]采用一个固定引物,一个半随机引物扩增报告基因,构建中断盒,实现了目标基因的系列缺失。1999年Davis等^[19]采用了一个温度敏感的 *Ura4^{ts}* 作报告基因,该基因在30℃正常表达,但当只有一个拷贝整合到染色体上时,37℃下在没有尿嘧啶的培养基中不能生长。这样就区分了由染色体外报告基因存在造成的假阳性,避免了稳定性试验的麻烦。总之,酵母基因中断技术自诞生以来,经过近20年的发展,已经日趋成熟。但直到目前为止,还没有一种方法可以满足所有的要求,用以高效中断酵母中的多个基因,并且对缺失后的菌株进行系统的分析。笔者认为前面提到过的Storici等^[13]的方法比较有望达到这一目标。改用LFH-PCR法构建中断盒,即可提高中断效率;FRT核心序列可以有 $4^8 = 6.5 \times 10^4$ 种组合,足以覆盖酵母基因组中6 000个基因,用8 bp核心序列作为标签序列,即可实现定量、系统的功能分析;把中断盒内的FLP基因改为诱导型表达,就可以对报告基因的剔除做更严密的调控;利用温度敏感的报告基因,就可以避免稳定性试验的麻烦;加上这种方法本身所具有的可中断多个基因的特性,就可以基本满足我们的要求。

参 考 文 献

- 1 Oliver S G. From DNA sequence to biological function. *Nature*, 1996, **379** (6566): 597~ 600
- 2 Hinnen A, Hicks J B, Fink G R. Transformation of yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, **75** (4): 1929~ 1933
- 3 Scherer S, Davis R W. Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76** (10): 4951~ 4955
- 4 Orr-Weaver T L, Szostak J W, Rothstein R J. Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78** (10): 6354~ 6358
- 5 Shortle D, Haber J E, Botstein D. Lethal disruption of the yeast actin gene by integrative DNA transformation. *Science*, 1982, **217** (4557): 371~ 373
- 6 Rothstein R J. One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol*, 1983, **101**: 202~ 211
- 7 Baudin A, Ozier-Kalogeropoulos O, Denouel A, *et al.* A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 1993, **21** (14): 3329~ 3330
- 8 Wach A. PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast*, 1996, **12** (3): 259~ 265
- 9 Alani E, Cao L, Kleckner N. A method for gene disruption that allows repeated use of URA3 selection in the construction of multiply disrupted yeast strains. *Genetics*, 1987, **116** (4): 541~ 545
- 10 Langle-Rouault F, Jacobs E. A method for performing precise alterations in the yeast genome using a recyclable selectable marker. *Nucleic Acids Res*, 1995, **23** (15): 3079~ 3081
- 11 Cregg J M, Madden K R. Use of site-specific recombination to regenerate selectable markers. *Mol Gen Genet*, 1989, **219** (1~ 2): 320~ 323
- 12 Sauer B. Recycling selectable markers in yeast. *Biotechniques*, 1994, **16** (6): 1086~ 1088
- 13 Storici F, Coglievina M, Bruschi C V. A 2- μ m DNA-based marker recycling system for multiple gene disruption in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1999, **15** (4): 271~ 283
- 14 Fairhead C, Llorente B, Denis F, *et al.* New vectors for combinatorial deletions in yeast chromosomes and for gap repair cloning using 'split-marker' recombination. *Yeast*, 1996, **12** (14): 1439~ 1457
- 15 Vidal M, Gaber R F. Selectable marker replacement in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1994, **10** (2): 141~ 149
- 16 Shoemaker D D, Lashkari D A, Morris D, *et al.* Quantitative phenotypic analysis of yeast deletion mutants using a highly parallel molecular bar coding strategy. *Nat Genet*, 1996, **14** (4): 450~ 456
- 17 Anuj K, Kei-Hoi C, Michael S, *et al.* TRIPLES: a database of gene function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28** (1): 81~ 84
- 18 Verhasselt P, Reekmans M J, Volckaert C. Open reading frame analysis by selective PCR-mediated deletion mutagenesis. *Genet Anal Tech Appl*, 1993, **10** (1): 16~ 23
- 19 Davis K, Pateman C, Davey J. Gene disruption in *Schizosaccharomyces pombe* using a temperature-sensitive Ura4p. *Yeast*, 1999, **15** (12): 1231~ 1236

Gene Disruption in Yeast^{*}

XU Zhi-Gang, HUO Ke-Ke^{**}, LI Yu-Yang

(State Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract Gene disruption by homologous recombination is a powerful tool for investigating gene function in yeast. Since 1980's, it has been developed a lot. PCR-mediated gene disruption technique makes the manipulation easier and it can be used to precisely delete genes in yeast. Multi-gene disruption technique can delete several genes successively in the same yeast strain. After the completion of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* genome sequencing, the gene disruption technique for systematic analysis meets the need of the functional genomics in yeast. It also enlighten the study on human functional genomics.

Key words yeast, gene disruption, functional genomics

^{*} This work was supported by a grant from the National High Technology "863" Program of China (863-102-11-02-02).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-21-65643023, E-mail: kkhuo@fudan.edu

Received: April 25, 2000 Accepted: June 7, 2000