

酿酒酵母感受态细胞的低温保存及 酵母菌落 PCR-快速筛选鉴定

叶 玲* 刘建伟 刘 静

(中国人民解放军总医院老年医学研究所, 北京 100853)

摘要 异源蛋白在酵母中的表达涉及到大量重组子的筛选鉴定. 以直接煮沸 2~5 min 后的酵母菌落水悬浮液为模板, 建立了酵母克隆的 PCR 快速筛选方法. 介绍了 PCR 反应中减少引物二聚体、提高反应特异性及 -80℃ 低温保存酿酒酵母感受态细胞等技巧.

关键词 酵母, PCR 筛选, 转化

学科分类号 Q5

虽然酵母比细菌的遗传性状复杂得多, 但许多应用于原核微生物及病毒的分子遗传技术同样适用于酵母. 如 DNA 既能以自主复制的形式, 又能以整合到基因组的方式被引入酵母细胞, 使得基因克隆和基因工程技术可以很容易地在酵母这种真核生物的模式菌中开展. 但由于国内为从事酵母研究用户生产、提供专门配套试剂或技术服务的生物公司寥寥可数, 可供参考的文献有限, 各实验室只能从国外引进试剂、材料和技术, 操作者自行摸索实验条件, 费时、费钱、费力. 根据我们实验室近年来在酵母研究实践中摸索出来的经验和体会, 将酿酒酵母感受态细胞的低温保存及酵母转化子的菌落 PCR-快速筛选鉴定方法作一介绍.

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

酵母含氮碱性培养基 (Yeast Nitrogen Base w/o amino acids, YNB), 酸水解干酪素 (casein acid hydrolysates), 聚乙二醇 (PEG 4000), 醋酸锂 (LiAc), 鲑鱼精 DNA (SS-DNA), 硫酸铵 (ammonium sulfate), 色氨酸 (tryptophan).

Eppendorf 5810R 台式低温离心机, Eppendorf 5415D 台式离心机, PE-2400 基因扩增仪.

1.2 菌株、质粒和细胞培养

以酵母表达质粒 pYEX-BX 为例. pYEX-BX 含有 Cu^{2+} 可诱导的启动子 *CUP1*, 2 μ 质粒复制起始点序列, 选择性标记 *URA3* 和 *leu2-d*. 将含有目的基因的 pYEX-BX 重组质粒 (定名为 pXAG) 转化

大肠杆菌宿主菌 DH5 α , 在含有 60 mg/L 氨卞青霉素的 LB 培养基中, 于 37℃ 培养. 获得阳性克隆 pXAG 后, 小量提取制备质粒 DNA^[1].

质粒 pXAG 和 pYEX-BX 的选择性标记 *URA3* 基因上均含有一个限制性内切酶 *Apa* I 识别位点序列. 将经 *Apa* I 处理过的线性质粒 DNA 分别转化酵母宿主菌 INVSc1 (*MAT α /a*, *his3 Δ 1/his3 Δ 1*, *leu2/leu2*, *trp1-289/trp1-289*, *ura3-52/ura3-52*, Invitrogen 公司). 酵母细胞在选择性培养基 SC-UD (0.16% YNB、0.5% 硫酸铵、0.1% 酸水解干酪素、0.01% 色氨酸、2% 葡萄糖、固体培养基含 2% 琼脂粉) 或 YPD 培养基 (2% 蛋白胨、1% 酵母粉、2% 葡萄糖) 中 30℃ 培养.

1.3 酿酒酵母感受态细胞的制备和低温保存

接种酵母宿主菌 (INVSc1) 单菌落于 10 ml YPD 培养基, 30℃, 200 r/min 振摇过夜至 $A_{600} \geq 1$. 离心收集细胞 (3 000 r/min, 5 min), 将细胞转移至 50 ml 新鲜 YPD 培养基中, 30℃ 继续培养约 5~6 h, 至 $A_{600} \approx 2$. 离心收集细胞 (3 000 r/min, 5 min, 4℃), 用 25 ml 无菌 H_2O 洗涤细胞, 4℃, 3 000 r/min 离心 5 min, 弃上清. 加 1 ml 0.1 mol/L LiAc 于细胞中, 转移细胞混悬液至 1.5 ml Eppendorf 离心管, 6 000~8 000 r/min 离心 5 s, 弃上清. 加 0.5 ml 0.1 mol/L LiAc, 轻轻混匀细胞. 各取 50 μ l 混悬液于标记的离心管中, 备用.

* 通讯联系人.

Tel: 010-66937373, E-mail: lye301@btamail.net.cn

收稿日期: 2003-05-06, 接受日期: 2003-06-12

剩余的酵母感受态细胞混悬液按 50 μl 体积分装于无菌 Eppendorf 离心管, 加 250 μl 15% ~ 20% 高压灭菌的甘油, -80°C 低温保存。

1.4 DNA 对酿酒酵母感受态细胞的转化

按照 Gietz^[2] 的 LiAc/ SS-DNA/ PEG 转化 DNA 方法, 将 50 μl 酵母感受态细胞混悬液 6 000 ~ 8 000 r/min 离心 5 s, 弃上清, 小心依次加入: 240 μl 50% PEG 4000, 36 μl 1 mol/L LiAc, 25 μl 2 g/L SS-DNA (煮沸 5 min 后快速冷却), 0.1 ~ 10 μg 线性质粒 DNA 加 H_2O 稀释至 50 μl 。

剧烈振荡每个转化反应管 1 min, 30°C 保温 30 min, 42°C 热休克 20 min, 6 000 ~ 8 000 r/min 离心 15 s, 吸去上清, 加 500 μl 无菌 H_2O , 轻轻混悬细胞, 取 200 μl , 涂 SC-UD 平板, 30°C , 培养 2 ~ 4 天, 至转化子出现。

于 -80°C 冻存的酵母感受态细胞, 溶融后, 6 000 ~ 8 000 r/min 离心 5 s, 弃上清, 同上进行 DNA 转化操作。

待转化子出现后, 分别将各个菌落划线接种到画有若干方格并逐一编号的 SC-UD 平板和 YPD 平板 (同一菌落先划 SC-UD 后划 YPD), 30°C , 培养 2 天, 封好口的平板可于 4°C 保存 20 天左右。

1.5 酵母转化子的 PCR-快速筛选鉴定

用无菌接种针从 YPD 平板上挑取在 SC-UD 和 YPD 平板均对应长势良好的菌落少许, 悬浮于含 20 μl 无菌 H_2O 的 0.5 ml Eppendorf 离心管中 (离心管盖的中央预先用注射器针头扎一小孔, 防止盖子因受热膨胀崩开), 水浴煮沸 0, 2, 5, 10 min, 不需要离心。取 1 μl 悬浮液为模板进行 PCR 反应。反应混合物 I (Mix I): 10 mmol/L dNTP 0.4 μl , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物 (位于 pYEX-BX 载体 CUP1 启动子序列) 0.2 μl , DNA 模板 1 μl , 补充无菌 H_2O 至 10 μl 。反应混合物 II (Mix II): 10 $\times$ PCR 缓冲液 (含 25 mmol/L Mg^{2+}) 2 μl , 10 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物 (位于插入 pYEX-BX 载体中的目的基因序列) 0.2 μl , Taq DNA 聚合酶 (3 U/ μl) 0.2 μl , 补充无菌 H_2O 至 10 μl 。PCR 反应步骤如下: 将 Mix I 反应管置 94°C 变性 5 min 后, 加入 Mix II, 每份样品 PCR 反应总体积为 20 μl 。 94°C 变性 30 s, 50°C 退火 50 s, 72°C 延伸 1 min, 共 30 个循环。最后 72°C 延伸 7 min, 4°C 保温。另取 pYEX-BX 菌落 1 个, 平行操作, 水浴煮沸 10 min。同时以 1 μl 无菌 H_2O 为模板设一阴性对照。取 10 μl PCR 产物进行 0.7% 琼脂糖电泳。

2 结 果

2.1 DNA 对酿酒酵母感受态细胞的转化

pYEX-BX 表达载体含有一个来自酵母内源 2 μ 质粒的复制起始点序列。2 μ 序列使得质粒可在染色体外自主复制, 每个细胞的拷贝数高达 400 ~ 500, 从而外源目的基因可以在酵母菌中高水平表达。

将质粒 pYEX-BX 和重组质粒 pXAG 转化酵母宿主菌 INVSc1 后, 利用 pYEX-BX 上的选择标记 *URA3* 对 INVSc1 *ura3-52* 突变株的尿嘧啶缺陷型的互补作用, 发生 DNA 转化的酵母细胞方可在缺乏尿嘧啶营养成分的选择性培养基 SC-UD 上生长, 30°C 培养 2 ~ 4 天, 出现单菌落, 即转化子。经过对菌落的 PCR 筛选鉴定, 确定阳性转化子。

pYEX-BX 为非整合型载体, 通常将其引入酵母细胞时, 并不需要预先进行线性化处理。而我们发现, 将 pYEX-BX 和 pXAG 在 *URA3* 中的 *Apa* I 位点处经限制性内切酶处理后, 转化酵母宿主菌 INVSc1 的效率高于环状质粒 DNA 5 ~ 10 倍。其转化过程可能与质粒的修复机制有关^[3]。

分别采用新鲜制备的 INVSc1 感受态细胞和 -80°C 甘油保存 2 月以上的 INVSc1 感受态细胞进行 pYEX-BX 和 pXAG 转化实验, 转化效率无区别, 每微克 DNA 均可转化 10^3 分子以上。其密度适中, 便于挑选克隆, 完全可以满足将质粒 DNA 引入一个特定酵母菌株的实验目的要求。

2.2 酵母转化子的 PCR-快速筛选鉴定

由图 1 可见, pXAG 酵母转化菌落 1 和菌落 2 悬浮液水浴煮沸 0, 2, 5, 10 min, 均扩增出

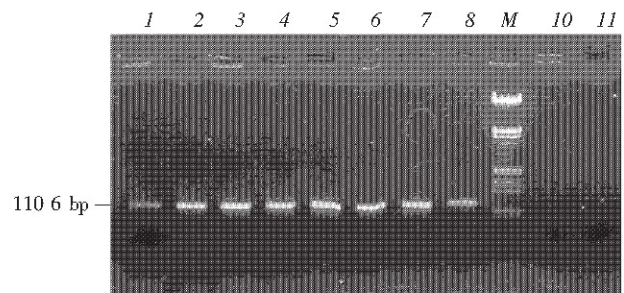


Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products from the yeast colonies

1, 3, 5, 7 and 2, 4, 6, 8 show the 1 106 bp PCR products resulting from the colony 1 and 2 of the yeast strain INVSc1 transformed by pXAG respectively. 1, 2: Templates DNA were extracted from the water suspension of the yeast colony 1 and 2 without boiling; 3, 4: boiling for 2 min; 5, 6: boiling for 5 min; 7, 8: boiling for 10 min. M: λ DNA/*Eco*R I-*Hind*III. 10: resulting from the transformant of pYEX-BX. 11: negative control of PCR without DNA.

1 106 bp 特异 DNA 片段, 无其他非特异带干扰. pYEX-BX 菌落 DNA 因为不含目的基因序列, 下游引物无相应靶序列配对, 故无扩增片段, 与预期结果一致. 重复实验 3 次, 获得相同的结果. 表明该实验无论是 PCR 引物的设计还是 PCR 条件的设定, 均较为理想. 未经煮沸的样品也可扩增出特异性 DNA 片段, 我们分析与 Mix I 反应管置 94℃ 预变性 5 min 有关, 该过程使得酵母细胞破壁. 但为了破坏有可能对 PCR 反应产生抑制作用的物质, 我们通常将样品煮沸 2 ~ 5 min.

3 讨 论

酵母菌主要由 β -葡聚糖构成厚实的细胞外壁, 使得 DNA 等物质对酵母细胞的导入、导出操作需要一定特殊的方法和试剂. 如经典的提取酵母质粒 DNA 的方法需经消解酶 (zymolyase) 处理^[4], 利于 DNA 释放; 酵母转化时, 经典方法使用的是 PEG 3350^[2]; 配制 SC-UD 选择性培养基时, 国外同行用的是酸水解酪蛋白 (casamino acids) 作为添加营养成分^[5,6], 然而, 国内提供 Zymolyase、PEG 3350 和 casamino acids 的途径极其有限. 我们通过实践摸索, 发现用低廉的酸水解干酪素和 PEG 4000 替代酸水解酪蛋白和 PEG 3350, 同样获得满意的结果.

关于酵母的 PCR 筛选鉴定技术, 文献报道各异^[7~11]. 差异集中在对酵母细胞中 DNA 的提取. 有用商品化提供的试剂盒的, 有用玻璃珠破碎的, 也有用煮沸-超低温冷冻方法的. 其裂解液中基本上含有消解酶成分或去污剂. 我们采用酵母菌落水溶液直接 PCR 鉴定的方法, 从众多的转化子中, 特异性地筛选出正确的菌落. 避免了按经典方法逐一提取制备酵母质粒 DNA 或染色体 DNA, 从而大大提高了效率.

人们在进行 DNA 对酵母的转化时, 大多需临时制备新鲜的感受态细胞. 我们发现 -80℃ 低温保存的 INVSc1 感受态细胞转化效率与新鲜制备的感受态细胞基本上没有区别. 从而可一次大量制备酵母感受态细胞, 低温长期保存, 待需要转化时, 解冻后即可使用. 省时、省事、省力, 避免了每次新鲜制备的感受态细胞用不完时就丢弃所造成的

浪费.

采用 PCR 方法对酵母菌落进行快速筛选鉴定时, 根据所转入的载体及其携带的目的基因序列, 设计出特异性高的引物, 是 PCR 成功与否的关键. 另外, 在 PCR 热启动前后将上、下游引物分开加入到反应管中, 可以减少引物二聚体的形成和非特异性产物的生成.

致谢 荷兰阿姆斯特丹大学 Swammerdam Institute for Life Sciences 的 Kruckeberg 博士赠送 pYEX-BX 质粒, 并提供建设性意见, 特此感谢!

参 考 文 献

- 1 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1. 25 ~ 1. 28
- 2 Gietz R D, Schiestl R H. Transforming yeast with DNA. Meth Mol Cell Biol, 1995, 5 (5): 255 ~ 269
- 3 Plessis A, Dujon B. Multiple tandem integrations of transforming DNA sequences in yeast chromosomes suggest a mechanism for integrative transformation by homologous recombination. Gene, 1993, 134 (1): 41 ~ 50
- 4 Adams A, Gottschling D E, Kaiser C A, et al. Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998. 35 ~ 36
- 5 Kruckeberg A L, Ye L, Berden J A, et al. Functional expression, quantitation and cellular localization of the Hxt2 hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae* tagged with the green fluorescent protein. Biochem J, 1999, 339 (Pt 2): 299 ~ 307
- 6 Ye L, Kruckeberg A L, Berden J A, et al. Construction and expression of HXT7 promoter deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. Prog Biochem Biophys, 2001, 28 (5): 662 ~ 669
- 叶 玲, Kruckeberg A L, Berden J A, et al. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28 (5): 662 ~ 669
- 7 Baere T D, Claeys G, Swinne D, et al. Identification of cultured isolates of clinically important yeast species using fluorescent fragment length analysis of the amplified internally transcribed rRNA spacer 2 region. BMC Microbiol, 2002, 2 (1): 21 ~ 27
- 8 Yamada Y, Makimura K, Merhendi H, et al. Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeasts. Jpn J Infect Dis, 2002, 55 (4): 122 ~ 125
- 9 Millar B C, Jiru X, Moore J E, et al. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. J Microbiol Methods, 2000, 42 (2): 139 ~ 147
- 10 Haaning J, Oxvig C, Overgaard M T, et al. Simple and reliable procedure for PCR amplification of genomic DNA from yeast cells using short sequencing primers. Biochem Mol Biol Int, 1997, 42 (1): 169 ~ 172
- 11 Deak T, Chen J, Beuchat L R. Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. Appl Environ Microbiol, 2000, 66 (10): 4340 ~ 4344

Frozen Storage of Competent Yeast Cells and Simple Procedure for PCR Screening Yeast Recombinant Clones

YE Ling*, LIU Jian-Wei, LIU Jing

(Institute of Gerontology & Geriatrics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

Abstract Heterologous expression of recombinant proteins in yeast involves toilsome screening of a large number of recombinants from yeast cells. A quick and easy procedure was introduced for identifying recombinant clones from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by means of PCR without any prior DNA extraction and purification steps. This method involves a simple boiling step for 2 ~ 5 min of whole yeast cells suspended in water. Both the fresh and frozen competent *S. cerevisiae* cells can be used for transformation. The method of storing the competent yeast cells at -80°C for future use is convenient and economic. A skill of decreasing the dimer products and increasing the specificity of PCR is recommended.

Key words yeast, PCR screening, transformation

* Corresponding author. Tel: 86-10-66937373, E-mail: lye301@btamail.net.cn

Received: May 6, 2003 Accepted: June 12, 2003

《生物物理研究所与生命科学仪器技术》内容简介

中国科学院生物物理研究所刚刚欢庆了研究所的创始人贝时璋院士的一百周岁华诞, 和生物物理研究所建所 45 周年。贝时璋先生在 1958 年创立生物物理研究所时就指出, “生物物理学的发展要有相应的技术发展来配合, 对于生物物理仪器, 不但要仿制、改进, 还要有不断新的创造。”

仪器是认识世界的工具。科学仪器的创新是知识创新和技术创新的前提, 是创新研究的主体内容之一和创新成就的重要体现形式。是知识创新与技术创新的组成部分。

45 年来, 生物物理研究所在贝时璋院士指导下, 努力推动生命科学仪器技术的进步, 在各个不同的历史时期研制或生产了 100 多种仪器设备, 为生物物理研究所乃至我国生命科学的发展, 为我国仪器仪表工业的发展, 做出了贡献。也造就了一支多专业、多兵种、高素质的生物物理工程技术研究队伍。

为总结生命科学仪器技术在生物物理所的发展历程和取得的成绩, 编辑出版了《生物物理研究所与生命科学仪器技术》一书。此书收录的仪器分为 8 个大类 (辐射测量仪器、空间生物学仪器、仿生学应用、光谱波谱仪器、分离仪器、实验室仪器、医疗仪器、其它仪器), 包括获院所、部委、省市奖, 获专利授权, 通过所级以上鉴定, 应用于科研、结果在正式学术期刊发表、产品销售达到一定数量的仪器设备 (包括个别重要的元器件)。书中简单地介绍了每种仪器的用途、主要性能指标、评价及应用推广情况。较全面地反映了该所的仪器研制工作。

从事仪器技术工作的几位同志还写出了他们多年工作的感想和体会。

贝时璋院士今年一百岁, 依然身体健康, 精神矍铄, 思维敏捷, 热心地为此书亲笔题词。