



生命科学实验指南系列



Methods in Yeast Genetics

酵母遗传学方法实验指南

(第二版)

〔美〕 D.C. 安伯格 等 编著
霍克克 主译



科学出版社

生命科学实验指南系列·典藏版

Methods in Yeast Genetics

酵母遗传学方法实验指南

(第二版)

〔美〕 D. C. 安伯格 等 编著

霍克克 主译

科学出版社

北京

图字：01-2006-3352 号

内 容 简 介

“生命科学实验指南系列”图书均出自名家，包括众多从 Cold Spring Harbor Laboratory Press 和 John Wiley & Sons 等国际知名出版社引进的实验室必备工具书，是生命科学领域最先进、实用、权威的实验手册类优秀图书。该系列图书简单明了，囊括了全世界最著名的生物类实验室操作方法，无论是初学者还是需要深入研究的科研工作者都能从中获益。该系列图书在读者群中有较高的知名度和美誉度，特别是以《分子克隆实验指南》和《精编分子生物学实验指南》为代表，堪称经典，分别被喻为生命科学领域的“蓝宝书”和“红宝书”。现挑选其中的精品集结成典藏版。

Methods in Yeast Genetics, 2005 Edition

By David C. Amberg, Daniel J. Burke, Jeffrey N. Strathern

Translation rights arranged with the permission of Cold Spring Harbor Laboratory Press

All rights reserved. © 2005 by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

图书在版编目 (CIP) 数据

生命科学实验指南系列：典藏版/雷东锋等编著. —北京：科学出版社，2016

ISBN 978-7-03-047486-5

I. ①生… II. ①雷… III. ①生命科学—实验—指南 IV. ①Q1-0

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 043878 号

责任编辑：王 静 李 悦

责任印制：张 伟 / 封面设计：刘新新

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码：100717

<http://www.sciencep.com>

北京厚诚则铭印刷科技有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016年7月第一版 开本：787×1092 1/16

2016年7月第一次印刷 印张：1310 1/2

字数：31 074 000

定价：4500.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

本书译者名单

主 译：霍克克

翻译和审校人员：（按姓氏汉语拼音排序）

霍克克 李 琳 马 琪 石羽杰
王佳琦 吴冬华 伍慧玲 严 晶
张 迪 周 莉

译者序

酵母菌是一种单细胞真核生物。它既有一切真核细胞生命活动最基本的重要特征，又有实验微生物所具备的背景清楚、生长迅速、易于操作等许多优点。现今遗传学、生物化学和细胞生物学中的许多规律性认识都是以酵母为研究材料得出的。酵母菌是世界上首个被测出基因组 DNA 全序列的真核生物，在其 6607 个可读框（ORF）中已有 4752 个得到了证实，其中许多是与细胞基本生命活动密切相关的重要基因，在结构与功能方面与高等真核生物有很强的进化保守性。至今已发现有约 300 种蛋白质在人与酵母中是同等功能的，其中许多与人类疾病相关蛋白是类似的。因此，以酵母为模型研究高等真核生物的重要生理功能和疾病发生发展的分子机理，以及寻找药物作用靶点等都有其独特的优势。此外，基于酵母菌研究的模式生物技术（如基因敲除、基因功能补偿和酵母双杂交技术等）在生命科学的研究中，尤其是在后基因组时代对基因功能的研究中，得到了广泛的应用。随着当代生命科学的发展，酵母菌作为一种模式生物的实用性和高效性在科研实践中得到了充分体现。

美国冷泉港实验室（Cold Spring Harbor Laboratory）被称为世界生命科学的圣地与分子生物学的摇篮，为全球影响最大的十大研究机构之一；同时，冷泉港实验室还是国际生命科学的会议中心与培训基地，经过这里培训的优秀科学家如今已遍布全球各地。《酵母遗传学方法实验指南》就是冷泉港实验室组织该领域知名学者合编的一本培训教程，迄今已有 47 年的历史，其间已更新再版多次，以及时适应这个领域的最新进展。本教程最大的特点在于其权威性、全面性和可操作性，它将酵母经典遗传学和分子生物学实验的基本原理与操作方法都做了详尽的介绍。因此，无论对于专业科研人员还是初学者，都是一本不可多得的必备参考书。

参与本书翻译的人员主要是正在从事酵母遗传学和分子生物学工作的研究生和博士后，由于译者的翻译水平有限，译文中难免存在错误和不妥之处，敬请读者批评指正。

复旦大学生命科学学院
遗传工程国家重点实验室

霍克克

2008 年 12 月

原 著 序

本实验指南收录了以往“冷泉港酵母遗传课程 (Cold Spring Harbor Yeast Genetics Courses)”的重要内容。尽管目前大部分实验已经进行了修订,并且增加了一些新的实验技术,但这本教程的思路和结构 30 年来从未改变。在此,感谢我们的前辈 Fred Sherman、Gerry Fink、Jim Hicks、Cal McLaughlin、Brian Cox、Mark Rose、Fred Winston、Phil Hieter、Susan Michaelis、Aaron Mitchell、Alison Adams、Chris Kaiser、Dan Gottschling、Tim Stearns、Dean Dawson 和 Orna Cohen-Fix,他们在执教生涯中使这本教程成为酵母遗传学研究的重要参考书。同时,我们还要对 Mike Cherry 在遗传和物理图谱方面的宝贵协助表示感谢。

Dave Amberg

Dan Burke

Jeff Strathern

前 言

自上一版指南出版以来，新的基因组学和蛋白组学技术广泛采用酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 作为实验材料。由于将这些方法完全融入一个为期三周的实验教程显然比较困难，因此我们在本书中只将一些最权威的方法收录在实验部分，技术和方案部分也尽可能地详尽。然而，大多数的最新技术只是一个起点，需要随后经典酵母遗传学的分析，基于这一理由，本书大部分内容与之前的版本没有本质上的改变。酵母模式生物系统的重要性在于它的有性生殖周期、能做四分体分析和很高的同源重组率。我们希望本书能继续作为有效开展酵母遗传实验的资源。

本书实验部分添加了更多的活体染色剂，如内吞隔室的 FM4-64 染色法和绿色荧光蛋白 (GFP) 标记蛋白的显影 (实验一)。在实验七 (基因置换) 中，我们采用了 Boone 实验室首先描述的系统遗传分析 (SGA) 方法，即用合成致死分析的方法研究基因功能。现代化的基因置换实验采用新的药物抑制标记物如 kanMX6，以及源于相关酵母但不易与酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 基因座重组的标记物，如粟酒酵母 *his 5⁺* (*S. pombe his 5⁺*)。 *ras 2* 抑制基因的分离中添加了高拷贝抑制物以考察这种方法对信号通路的影响 (实验八)。双杂交实验被另一种基于双杂交但能识别功能突变分离的方法所取代 (实验十一)。在技术和方案部分，我们增加了一种源于 Seraphin 实验室 (Rigaut et al. 1999) 首先研发的串联亲和蛋白标记的蛋白纯化技术 (技术与方案 5)，以及一种采用双融合聚合酶链式反应做到的基因裂解技术 (技术和方案 14)。本书也提到了如何处理在系统研究中产生的大量酵母菌株，酵母缺陷株的保藏就是一个例子。我们也收录了提取蛋白质和菌落 PCR 的更简便可信的方法。我们还添加了一种改进的流式细胞计量术，该方案中采用了 Steve Haase (Haase and Reed 2002) 提到的 SYTOX Green 染料；同时我们还添加了一些操作大肠杆菌 (*E. coli*) 的基本方案，以用于一些新实验或改进实验 (DNA 小量制备和转化实验)。最后，考虑到传统工具和网络工具的更新改革极为迅速，我们在本前言之后列出了许多有参考价值的文献、书籍名称和网址。

20 世纪 30 年代，Winge 及其同事首创了酵母遗传学研究。约 10 年后，Lindgren 及其同事也开始了全面的研究工作。这两个研究小组的工作揭示了酵母遗传学研究的基本原理和基本方法。今天，酵母被广泛认为是一种理想的用于生化和遗传学研究的真核微生物。尽管酵母比细菌的遗传性状复杂得多，但许多用于原核微生物及其病毒的分子遗传学技术与进展同样适合于酵母研究。酵母特别适合于遗传学研究的一些属性包括：存在稳定的单倍体和二倍体细胞，生长快速，无性繁殖，与非同源末端连接物结合的高同源重组率，简便的平板影印，突变体分离以及通过微解剖四分体子囊分离得到减数分裂的各单倍体产物的能力。酵母已被成功地应用于遗传学研究的各个领域，如诱变、重组、染色体分离、基因表达和调控，以及一些明显独特于其他真核生物系统的方面，如线粒体遗传学等。

DNA 转化使酵母可以很容易地用于基因克隆和基因工程技术。与任何一种遗传学

特征相对应的结构基因都可通过与质粒文库的互补作用被鉴定出来。DNA 引进酵母细胞时既可以是自主复制的分子，也可以整合到基因组。与大多数其他生物相比，酵母中转化 DNA 的整合重组主要是通过同源重组的方式，这样就可以有目的、高效率地将 DNA 序列整合到基因组中。同源重组结合高水平的基因转化已经使得用基因工程 DNA 序列直接置换正常染色体基因座的技术得到发展。这种简便的直接基因置换技术在真核生物中是独一无二的，并已被广泛用于酵母遗传学、细胞生物学、生理学以及生物化学的各个方面。《酶学方法》(*Methods in Enzymology*) 第 194 卷 (Guthrie and Fink 1991) 和第 350~351 卷 (Guthrie and Fink 2002) 及 Rose (1995) 的著作对现代遗传学的许多技术进行了综述。

酿酒酵母基因组 DNA 全序列的测定和全系列缺失突变体的构建是现代酵母遗传学的最新研究成果。这个全序列汇集入公开的序列数据库后，酵母成为对真核生物细胞学功能和基因组精细研究的首选生物。一些因特网网址提供了方便而有序地进入序列数据库的途径，如酵母基因组数据库 (*Saccharomyces Genome Database, SGD*) 和慕尼黑蛋白质序列信息中心 (*Munich Information Center for Protein Sequences, MIPS*)。这些网络资源通过强大的搜索功能来扩大序列数据库，其搜索功能包括：基因组分析、相关数据库的链接，如参阅文献数据库或酵母基因产物的蛋白质结构数据库。另外，在酵母蛋白质数据库 (*Yeast Protein Database, YPD*) 中存有每种酵母蛋白质的数据，并能预测可读框的结构信息以及基因突变伴随的表型突变。

名为《酿酒酵母的分子生物学》(*The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*) (Strathern et al. 1981, 1982) 和《酿酒酵母的分子细胞生物学》(*The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*) (Broach et al. 1991; Jones et al. 1992; Pringle et al. 1997) 的两套评论性丛书是关于酿酒酵母生物学非常有用的书籍。后一套丛书中某些章节收集了自第一套丛书出版以来的新进展，而这两套丛书的每一卷都综合了大量酵母生物学文献的详细评论，这些内容是在其他任何地方都找不到的。每一位酵母生物学家都应该收藏这 5 本书。此外，《酵母遗传学初论》(*The Early Days of Yeast Genetics*) (Hall and Linder 1993) 也值得一读，因为它以历史的眼光揭示了为什么酵母会成为一种模式生物，并描述了酵母遗传学研究的发展对现代遗传学和真核生物分子生物学的影响。

本书全面而集中地介绍了面包酵母菌——酿酒酵母。读完本书后，读者应该能够运用酵母遗传学家常用的技术，比较轻松地领会各种有关文献。除子囊解剖外，大多数技术方法与操作其他微生物没有太大差别。因此，这些技术稍加实践便可很快掌握。本书中所有实验都将分为两人一组，且尽可能使比较熟悉微生物技术的研究者搭配一个缺乏经验的同伴。由于大多数实验内容安排在本书的上半部分，故建议大家仔细通读本书。请注意：一些实验由于需要进行连续培养，将会持续数天。

值得强调的是，在本书里，一些操作程序为了节约时间已经简化，并非是研究工作所必须遵循的操作标准。例如，突变株通常经亚克隆起始菌株得以纯化。另外，有些技术也许不能直接解决科研问题，但它们有助于阐明基本原理和方法。

推荐阅读资料

- Bartel P.L. and Fields S. 1997. *The yeast two-hybrid system*. Oxford University Press, United Kingdom.
- Broach J.R., Jones E.W., and Pringle J.R. 1991. *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*. I. *Genome dynamics, protein synthesis, and energetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Campbell I. and Duffus J.H. 1988. *Yeast: A practical approach*. IRL Press, Oxford.
- Fincham J.R.S., Day P.R., and Radford A. 1979. *Fungal genetics*. University of California Press, Berkeley.
- Guthrie C. and Fink G.R., eds. 1991. Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol.*, vol. 194.
- . 2002. Guide to yeast genetics and molecular and cell biology. *Methods Enzymol.*, vol. 350, Part B.
- . 2002. Guide to yeast genetics and molecular and cell biology. *Methods Enzymol.*, vol. 351, Part C.
- Haase S.B. and Reed S.I. 2002. Improved flow cytometric analysis of the budding yeast cell cycle. *Cell Cycle* **1**: 132–136.
- Hall M.N. and Linder P. 1993. *The early days of yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Johnston J.R. 1994. *Molecular genetics of yeast: A practical approach*. IRL Press, Oxford.
- Jones E.W., Pringle J.R., and Broach J.R. 1992. *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*. II. *Gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Pringle J.R., Broach J.R., and Jones E.W. 1997. *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*. III. *Cell cycle and cell biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Rigaut G., Shevchenko A., Rutz B., Wilm M., Mann M., and Seraphin B. 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.* **10**: 1030–1032.
- Rose M.D. 1995. Modern and post-modern genetics in *Saccharomyces cerevisiae*. In *The yeasts*, 2nd edition (ed. A.E. Wheals et al.), vol. 6, pp. 69–120. Academic Press, New York.
- Strathern J.N., Jones E.W., and Broach J.R., eds. 1981. *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: Life cycle and inheritance*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- . 1982. *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: Metabolism and gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Tong A.H., Evangelista M., Parsons A.B., Xu H., Bader G.D., Page N., Robinson M., Raghibizadeh S., Hogue C.W., Bussey H., Andrews B., Tyers M., and Boone C. 2001. Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science* **294**: 2364–2368.

实用网络资源

The Brown Lab Microarray Resource
<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/>

The Definitive Yeast Transformation Homepage
<http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/biochem/gietz/Trafo.html>

European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis
http://www.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/col_index.html

GRID (database of Genetic and Physican Interactions and Osprey Network Visualization Software)
<http://biodata.mshri.on.ca/grid/servlet/Index>

Incyte Proteome BioKnowledge Library

<http://www.incyte.com/control/researchproducts/insilico/proteome>

Munich Information Center for Protein Sequences

<http://mips.gsf.de/genre/proj/yeast/index.jsp>

Saccharomyces Genome Database

<http://www.pathway.yeastgenome.org/>

TRIPLES (database of Transposon-Insertion Phenotypes, Localization, and Expression in
Saccharomyces)

<http://ygac.med.yale.edu/triples/>

The University of Washington Yeast Resource Center

<http://depts.washington.edu/~yeastrc/>

Yeast GFP Fusion Localization Database

<http://yeastgfp.ucsf.edu/>

目 录

译者序	
原著序	
前言	
遗传学命名法	1
实验篇	
实验一 酵母细胞的观察	5
实验二 营养缺陷型、温度敏感型和渗透压敏感型突变株的分离和鉴别	12
实验三 减数分裂作图	20
实验四 有丝分裂重组和随机孢子分析	30
实验五 酵母转化	39
实验六 合成致死突变体	47
实验七 基因置换	52
实验八 <i>ras2</i> 抑制基因的分离	68
实验九 细胞型操作	76
实验十 用插入诱变法分离突变体	85
实验十一 利用双杂交差异互作筛选以分离功能突变体	91
技术和方案篇	
技术和方案 1 酵母的高效转化	98
技术和方案 2 快速粗放的酵母菌落质粒转化法	100
技术和方案 3 酵母 DNA 分离	101
技术和方案 4 酵母蛋白质的抽提	107
技术和方案 5 TAP 纯化方法	108
技术和方案 6 酵母 RNA 的分离	111
技术和方案 7 质粒 DNA 的羟胺突变	115
技术和方案 8 酵母 β -半乳糖苷酶的测定	116
技术和方案 9 羧肽酶 Y 的平板鉴定	120
技术和方案 10 随机孢子分析	121
技术和方案 11 酵母活细胞染色	122
技术和方案 12 酵母免疫荧光法	124
技术和方案 13 已固定细胞的肌动蛋白染色	127
技术和方案 14 PCR 介导基因破坏法	129
技术和方案 15 酵母菌落 PCR	133

技术和方案 16	分光光度法测酵母细胞密度	134
技术和方案 17	细胞同步化	136
技术和方案 18	染色质免疫沉淀	138
技术和方案 19	酵母 DNA 流式细胞记数	143
技术和方案 20	对数生长	145
技术和方案 21	EMS 诱变	146
技术和方案 22	四分体解剖	148
技术和方案 23	制备四分体解剖针	150
技术和方案 24	挑取合子	152
技术和方案 25	测定铺板效率	153
技术和方案 26	小量提取 <i>E. coli</i> DNA	154
技术和方案 27	<i>E. coli</i> 感受态的制备与转化	156
技术和方案 28	系统缺失菌株的保存及操作	159
附录 A	培养基	161
附录 B	菌株保存	171
附录 C	酵母遗传图谱和物理图谱	172
附录 D	平板划线模板	179
附录 E	菌株核型分析电泳的 Southern 印迹作图	181
附录 F	菌株	183
附录 G	用标准血球计数板进行酵母细胞计数	186
附录 H	四分孢子计分表	187

遗传学命名法

染色体基因

用于酵母遗传学中的术语和习惯用语的早期提法已经被 Sherman 和 Lawrence (1974) 及 Sherman (1981) 总结过了。通常, 基因符号与 Demerec 等 (1966) 提出的标准一致, 即用三个斜体字母命名 (如 *arg*)。与 Demerec 的标准不同的是, 遗传学基因座将由基因符号后加一个数字 (而非字母) 来表示 (如 *arg2*)。显性等位基因用三个都大写的斜体字母的基因符号来表示 (如 *ARG2*)。都小写的字母则表示隐性等位基因 (如营养缺陷型 *arg2*)。野生型基因由一个上标加号表示 (*sup6⁺* 或 *ARG2⁺*)。等位基因是由连字符把一个数字和一个基因座数字分开来表示的 (如 *arg2-14*)。基因座序号与最初的分配是一致的; 但等位基因序号对个别实验室可以是特定的。

表型名称通常用带有上角“+”或“-”的罗马字体基因符号注明。例如, 精氨酸非依赖型和需求型可以被分别注明为 *Arg⁺* 和 *Arg⁻*。

下面举例说明了用于酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 的遗传术语的惯例。

<i>ARG2</i>	一个基因座或显性等位基因
<i>arg2</i>	一个表型为精氨酸需求型的基因座或隐性等位基因
<i>ARG2⁺</i>	该基因为野生型等位基因
<i>arg2-9</i>	一个特定等位基因或在 <i>ARG2</i> 基因座的突变体
<i>Arg⁺</i>	不依赖精氨酸的株系
<i>Arg⁻</i>	依赖精氨酸的株系
<i>Arg2p</i>	指示为 <i>ARG2</i> 基因的蛋白产物

对于这些一般的规则而言, 还存在大量的例外。基因簇、同一基因内的互补群或一个基因内具有不同特征的区域都能够用基因座序号加上大写字母来表示 (如 *his4A*, *his4B*)。伴随酵母重组 DNA 技术的广泛使用, 出现了一种适合于基因插入、基因融合和质粒命名的方法。

<i>ARG2 :: LEU2</i>	<i>LEU2</i> 基因插入在 <i>ARG2</i> 基因座, 插入没有破坏 <i>ARG2</i> 的功能
<i>arg2 :: LEU2</i>	<i>LEU2</i> 基因插入在 <i>ARG2</i> 基因座, 插入破坏了 <i>ARG2</i> 的功能
<i>arg2-101 :: LEU2</i>	<i>LEU2</i> 基因插入在 <i>ARG2</i> 基因座, 插入破坏了 <i>ARG2</i> 的功能, 并且标明了被破坏等位基因的位置
<i>arg2Δ0 :: LEU2</i>	<i>LEU2</i> 基因插入在 <i>ARG2</i> 基因座, 插入破坏了 <i>ARG2</i> 的功能是由于准确地替换了 <i>ARG2</i> 的整个可读框
<i>cycl-arg2</i>	<i>CYCl</i> 和 <i>ARG2</i> 发生基因融合, 融合后每个基因均无功能
<i>P_{cycl}-ARG2</i>	在 <i>CYCl</i> 基因的启动子和 <i>ARG2</i> 间发生基因融合, 结果是 <i>ARG2</i> 基因具有功能
[<i>YCP-ARG2</i>]	携带有一个功能性的 <i>ARG2</i> 基因座的着丝粒质粒
[<i>pCK101</i>]	指一个特定的质粒, 它的结构可查

虽然应该避免上标的使用, 但有时为了方便也会用上标 R 或 S 来区别基因的敏感

性和抗性。例如，控制刀豆氨酸硫酸盐抗性 (*CAN1*)、硫酸铜抗性 (*CUP1*) 及其敏感性等位基因可以分别用 *can^R1*、*CUP^R1*、*CAN^S1* 和 *cup^S1* 来表示。

接合型的野生型和突变型等位基因以及相关座位并不遵从标准法则。接合型座位的两个野生型等位基因被指定为 *MATa* 和 *MAT α* 。注意小写字母“a”是粗体非斜体，“ α ”是斜体非粗体字母。*MAT α* 座位的两个互补群被注明为 *MAT α 1* 和 *MAT α 2*。*MAT* 基因的突变被注明为 *mata-1* 和 *matal-1*。在 *HMR* 和 *HML* 座位的野生型同宗配合 (homothallic) 等位基因被注明为 *HMRa*、*HMR α* 、*HMLa* 和 *HML α* 。这些位点的突变被注明为 *hmra-1*、*hml α -1*。*MATa* 和 *MAT α* 细胞的接合表型可以分别注明为 **a** 和 α 。

显性和隐性抑制子应该分别由三个大写或小写字母后跟一个座位名来注明 (如 *SUP4*、*SUF1*、*sup35*、*suf11*)。在某些例子中，UAA 抑制子和 UAG 抑制子在座位名后被分别多加一个 o 和 a。例如，*SUP4-o* 指的是在 UAA 位置插入酪氨酸残基的 *SUP4* 座位的抑制子，而 *SUP4-a* 指的是在 UAG 位置插入酪氨酸残基的同一个 *SUP4* 座位的抑制子。相应的编码正常酪氨酸 tRNA 并且缺少抑制子活性的野生型座位可以被注明为 *sup4⁺*。因此，在酵母中描述抑制子和野生型等位基因的术语与用于细菌中的术语无关。例如，在 UAA 和 UAG 位置插入酪氨酸残基的赭石大肠杆菌抑制子被注明为 *su₄⁺*，编码正常酪氨酸 tRNA 并且缺少抑制子活性的野生型座位可以被注明为 *Su₄*、*su₄⁻* 或 *supC*。

对于大多数编码蛋白的结构基因，功能性野生型等位基因对于它的突变型通常是显性的。在酵母中，显性基因的惯例是使用如 *HIS4* 和 *LEU2* 的斜体符号。由于隐性突变位置经常被用于遗传图谱，因此出版的染色体图谱经常含有基因的突变型。例如，3 号染色体含有 *his4* 和 *leu2*，然而 9 号染色体含有 *SUP22* 和 *FLD1*。因为大写字母被用来代表控制相同性状的显性野生型基因 (如 *SUC1*、*SUC2*)，并且，因为显性形式被用于遗传图谱，所以，染色质座位在遗传图谱上被注明为大写字母。此外，大写字母被用于指示一定的 DNA 片段，它的位置已经被重组 DNA 技术和经典作图法共同决定了 (如 *RDN1*，编码核糖体 RNA 的片段)。

非孟德尔遗传因素

必要时，非孟德尔基因型可以用括号包围起来以便与染色质基因型加以区别。无论何时使用，都建议使用上述原则来命名非孟德尔基因，并且避免使用希腊字母。然而，当涉及一个完全的非孟德尔遗传因素时，最好分别保留最初符号 [ρ^+]、 $[\rho^-]$ 、 $[\psi^+]$ 和 $[\psi^-]$ ，或者使用它们音译 [*rho*⁺]、*[rho*⁻]、*[PSI*⁺] 和 *[psi*⁻]。对于线粒体突变子的详细命名在 Dujon (1981) 和 Grivell (1984、1990) 的文献中已经提到，对放毒菌株的命名在 Wickner (1981) 的文献中提到。与其他非孟德尔遗传因素不同的是，*[PSI*⁺] 和 *[URE3]* 不是基于核酸的不同，更恰当地说，*[PSI*⁺] 和 *[URE3]* 的性状来自于蛋白质的可遗传性的构象状态。这些性状的与众不同的行为可以用普里昂假说 (prion hypothesis) 来解释，普里昂假说现在已被用来解释诸如在哺乳动物中的传染性神经退化疾病，如羊瘙痒症 (Lindquist 1997)。*[PSI*⁺] 相应于一个翻译终止因子 Sup35p 的可遗传构象状态，而 *[URE3]* 相应于产物参与氮调节的基因 *URE2* 的可遗

传的无活性状态。已知的酵母中非孟德尔遗传因素列在表 1 中。

表 1 酵母中的非孟德尔遗传因素

野生型	突变变异体	成分	突变性状
[ρ^+]	[ρ^-]	线粒体 DNA	呼吸缺陷
[<i>KIL-k₁</i>]	[<i>KIL-o</i>]	RNA 质粒	对杀伤毒素敏感
[<i>cir⁺</i>]	[<i>cir^o</i>]	2 μ 质粒	无
[<i>psi⁻</i>]	[<i>PSI⁺</i>]	Sup35p 的普里昂形式	增强无义密码子的抑制
[<i>ure3⁻</i>]	[<i>URE3</i>]	Ure2p 的普里昂形式	脲基琥珀酸吸收紊乱

遗传背景

在设计实验时，酿酒酵母菌株来源的遗传背景经常是基因型不被注意的一个方面，它其实应该被考虑到。在现代遗传学研究中用到的大多数菌株来自一小组遗传背景之一，包括 S288C, X2180, A364a, W303a, Σ 1278b, AB972, SK1 和 FL100。20 世纪 40 年代，在野生酵母和酿酒菌株间进行杂交 (Mortimer and Johnston 1986) 的基础上，近来对这些遗传背景中的一些系谱进行了重新构建。这个分析显示，尽管大多数遗传背景享有共同的祖先，由于异型远交，仍引起了显著的遗传异质性。实际上，远源菌株间的杂交经常导致等位基因产生不利于存活组合的方式，从而产生许多不能生长的孢子，但遗传背景相同的菌株之间的杂交所产生的孢子，其存活率通常达 95% 以上。菌株 S288C 和 A364a 遗传背景具有相似的谱系，且杂交后产生的孢子存活率很高，但通过对这些菌株的基因组序列分析发现，基因组 DNA 上平均每 1kb 有 3.4 个核苷酸序列的差异。因此，即使亲缘关系非常接近的菌株，也会在许多位点上有所不同。

不同菌株背景间的等位基因差别能严重影响很多不同类型实验的结果，因此尽可能通过使用单一遗传背景的菌株来避免遗传异质性。在开始寻找新突变体时，值得考虑的是使用哪种菌株背景——通常在同一研究领域内被大多数研究人员用到的菌株是最好的选择。S288C 或许是最被普遍使用的，然而，其他遗传背景的菌株在特定类型的实验中有其独特的优势。例如， Σ 1278b 将形成假丝，而 S288C 不会，并且 SK1 比 S288C 更快形成孢子。通常需要将目标突变从一种背景移到另一种背景时，理想的可以通过用重组质粒和实验七中描述的基因置换的方法来进行。没有被克隆的突变体可以通过与想要背景的菌株回交来得到（通常为了得到想要的性状，执行连续回交直到明晰的分离型 2:2 时）。

参考文献

- Demerec M., Adelberg E.A., Clark A.J., and Hartman P.E. 1966. A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics* **54**: 61–76.
- Dujon B. 1981. Mitochondrial genetics and functions. In *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: Life cycle and inheritance* (ed. J.N. Strathern et al.), pp. 505–635. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Grivell L.A. 1984. Restriction and genetic maps of yeast mitochondrial DNA. In *Genetic maps*, 3rd edition (ed. S.J. O'Brien), pp. 234–247. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

-
- . 1990. Mitochondrial DNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In *Genetic maps*, 5th edition (ed. S.J. O'Brien), pp. 3.50–3.57. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Lindquist S. 1997. Mad cows meet psi-chotic yeast: The expansion of the prion hypothesis. *Cell* **89**: 495–498.
- Mortimer R.K. and Johnston J.R. 1986. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* **113**: 35–43.
- Sherman F. 1981. Genetic nomenclature. In *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: Life cycle and inheritance* (ed. J.N. Strathern et al.), pp. 639–640. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sherman F. and Lawrence C.W. 1974. *Saccharomyces*. In *Handbook of genetics: Bacteria, bacteriophages, and fungi* (ed. R.C. King), vol. 1, pp. 359–393. Plenum Press, New York.
- Wickner R.B. 1981. Killer systems in *Saccharomyces cerevisiae*. In *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: Life cycle and inheritance* (ed. J.N. Strathern et al.), pp. 415–444. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

实验一 酵母细胞的观察

酵母细胞的直径大约 $5\ \mu\text{m}$ ，它们的很多重要特征在光学显微镜下都能够观察到。在实验室中，最好定期在相差显微镜下观察酵母培养物，以掌握细胞的生理状态以及污染情况。很多现代酵母细胞生物学研究采用复杂检测方法，用蛋白质特异抗体或特异结合某些细胞器的荧光染料对酵母细胞染色，近来，开始使用绿色荧光蛋白（GFP）与感兴趣的酵母蛋白进行融合来标记细胞。本实验会提供一些将光学显微镜用于酵母细胞检测的标准类型例子。

培养物的检测

生长特性

酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）细胞以出芽方式生长。出芽细胞称为母细胞，新产生的芽有时被指作子细胞。细胞生长刚刚开始时，母细胞上出现的新芽处于细胞周期的开始阶段，并且不断生长直到细胞生长周期结束时才从母细胞上分离下来。由于一个酵母细胞的全部生长都集中于芽，而且这种生长实际上贯穿整个细胞周期，故通过观察芽的大小就可以粗略估计出一个给定细胞处于细胞的什么阶段。在以指数生长的酵母细胞培养物中，大约有 $1/3$ 的细胞无芽， $1/3$ 细胞有小芽， $1/3$ 细胞出现大芽。当生活细胞耗尽营养物后，它们就会像未出芽细胞一样停止生长而滞留在细胞周期的某个阶段。因此，掌握培养物生长状态的一种简单方法就是在显微镜下确定出芽细胞的频率。注意，对某些菌株而言，尽管它们已经完成了胞质分裂，但其母细胞和子细胞仍黏附在一起。在这种情况下，镜检前必须对培养物进行振荡或超声波处理以分开细胞。许多种类的突变子会停滞在细胞周期的某个阶段，从某种意义上讲，这也是它们的一种表型特征。例如，有丝分裂纺锤体缺陷的细胞会以带有大芽的形态停滞生长，通常从这点可以判断细胞正处于细胞周期的有丝分裂阶段。需要着重指出的是，突变细胞的停滞点或最终表型在形态上和正常培养物中的其他任何表型都不相同。在上述有丝分裂突变子中，母细胞和子细胞在停滞点处继续生长，结果两者均比正常酵母细胞要大得多。

单倍体和二倍体的比较

酵母单倍体和二倍体细胞（图 1.1）在形态学上十分相似，但也存在几点重要的差异。①二倍体细胞比单倍体细胞大。二倍体细胞胞质体积成倍增长，并且细胞直径大约是单倍体细胞的 1.3 倍，当单倍体与二倍体细胞并排在一起进行比较时，就会很容易发现它们的差异。由于二倍体细胞比较大，所以它们（某些情况下甚至为四倍体细胞）经常用来做荧光镜检，此时其比较大的形态有助于分辨小的细胞结构。②在形态上二倍体细胞呈长形或卵圆形，而单倍体细胞通常近似圆形。③二倍体和单倍体细胞的出芽方式不同。酵母细胞在衰老前一般出芽 20 次，在母细胞表面以定型的方式连续出芽。单倍