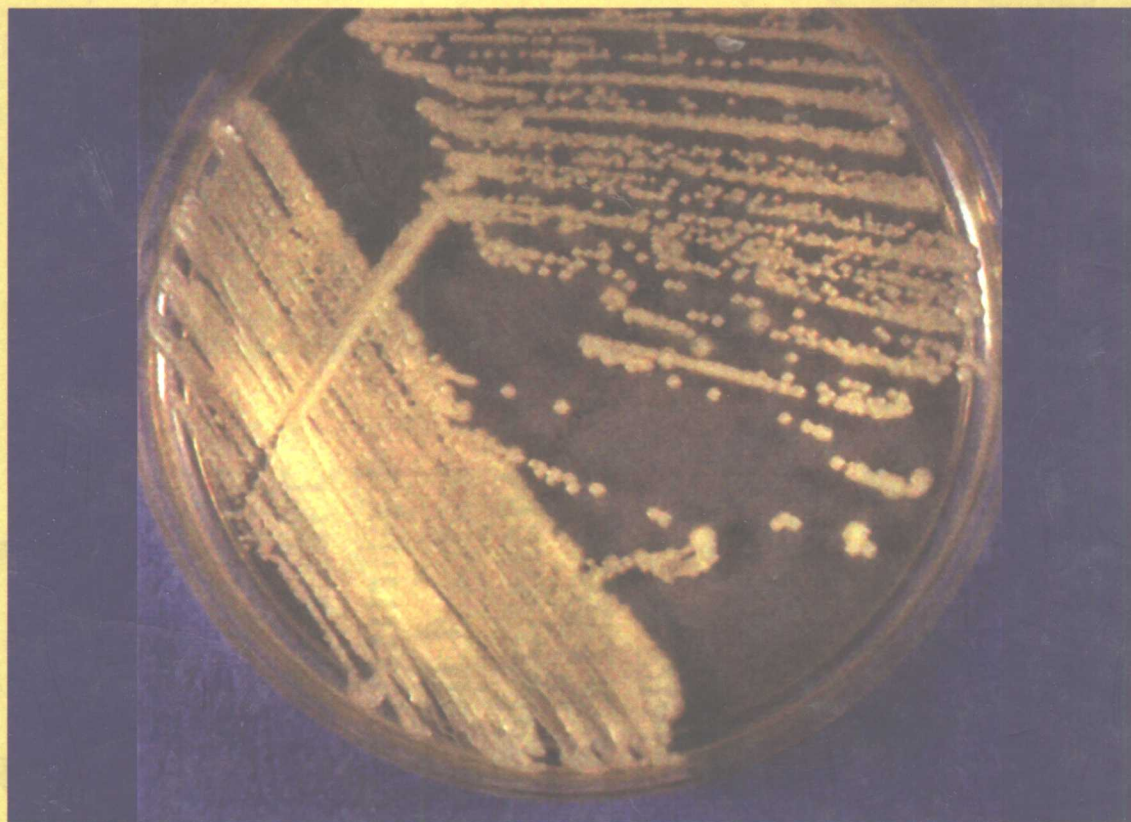


现代生物技术译丛

酵母遗传学方法实验指南

Methods in Yeast Genetics : A Cold Spring Harbor
Laboratory Course Manual



〔美〕 A. 亚当斯 D. E. 戈特施林
C. A. 凯泽 T. 斯特恩斯

科学出版社

内 容 简 介

本书通过 11 个有关酵母减数分裂作图、四分子分析、转化、胞导和核配、基因置换等经典实验, 以及 14 种酵母分子生物学的技术方法, 酵母蛋白质的抽提、RNA 的分离、DNA 的羟胺诱变、活体染色等, 全面、详细地介绍了酵母遗传操作的最新技术和实验方法, 很好地做到了兼顾经典和前沿两个方面, 成为《分子克隆实验指南》等经典实验手册的必要补充。

全书内容丰富、新颖, 文字简洁明了。适合于大专院校、科研单位的科研人员、教师、研究生、大学生作为实验指导书, 亦可供从事与酵母相关生物制品行业的科技人员参考。

Alison Adams, Daniel E. Gottschling, Chris A. Kaiser, Tim Stearns
METHODS IN YEAST GENETICS: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual

©Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998

图字: 01-1999-2149

图书在版编目 (CIP) 数据

酵母遗传学方法实验指南/[美] A. 亚当斯等著; 刘子铎译.-北京: 科学出版社, 2000
(现代生物技术译丛)

ISBN 7-03-007820-9

I. 酵… II. ①亚… ②刘… III. 酵母菌科-制造-遗传工程-实验
IV. TQ926-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (1999) 第 36695 号

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号
邮政编码: 100717

科 地 亚 印 刷 厂 印 刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

2000 年 1 月 第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2000 年 1 月 第 一 次 印 刷 印张: 9 1.4

印数: 1—32 00 字数: 194 000

定 价: 30.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换〈新欣〉)

译者的话

众所周知，被西方学者誉为现代分子生物学技术“圣经”的《分子克隆实验指南》(*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*)一书已风靡全球，为世人所感叹。然而，在这本“圣经”里却没有涉及有关酵母遗传学的操作技术。由于酵母作为真核生物的模式菌，在遗传学、生物化学、分子生物学、真核生物的代谢调控以及生化制品的开发等领域具有不可替代的地位。因此，冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory)的科学家们编写了本书——《酵母遗传学方法实验指南》(*Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*)一书，实际上，本书是《分子克隆实验指南》的一个重要补充。

本书系统地介绍了酵母遗传学操作最常用的实验方法，著者具有丰富的理论知识和实践经验，所编写的每个实验，都从理论基础、操作方法、必备材料、结果分析、注意事项、参考文献等作了详尽的介绍。

译稿经喻子牛教授和赵斌教授审校，旨在忠实地将原文信息奉献给读者。由于译者学识有限，译文中不妥和谬误之处在所难免，望批评指正。

华中农业大学生命科学技术学院
农业部农业微生物重点开放实验室

刘子铎

一九九九年六月二十日

序 言

这本实验教程手册编入了以前“Cold Spring Harbor Yeast Genetics Courses”中的重要部分，尽管目前大部分实验内容已经进行了修订并且还增加了一些新的实验技术，但这本教程的着重点与 27 年来一直使用的“Cold Spring Harbor Yeast Genetics Courses”是相同的。我们的前辈：Fred Sherman, Gerry Fink, Jim Hicks, Mark Rose, Fred Winston, Phil Hieter, Susan Michaelis 和 Aaron Mitchell 在其执教生涯中使这本教程成为酵母遗传学研究中的一本重要文献，为此，我们对他们所作的全部贡献表示衷心的感谢。同时，我们还要对 Mike Cherry 在遗传和物理图谱方面所给的宝贵协助表示感谢。

A. Adams

D. E. Gottschling

C. A. Kaiser

T. Stearns

前 言

早在本世纪 30 年代, Winge 和他的同事们就开创了酵母遗传学研究, 大约 10 年以后, Lindegren 和他的同事们也开始了更全面的研究工作, 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的多, 但许多用于原核微生物及其病毒的分子遗传学技术同样适用于酵母研究。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, 简便的平板影印, 突变体分离以及通过微解剖四分体子囊从而分离得到减数分裂的每一种单倍体产物的能力。酵母已经被成功地用于遗传学研究的各个领域, 例如: 诱变、重组、染色体分离、基因表达和调控以及一些明显不同于真核生物系统的方面, 比如线粒体遗传学等。

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以通过与质粒文库的互补作用而鉴定出来。DNA 既能以自主复制的分子形式, 又可以整合到基因组的方式而被引进酵母细胞。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方式进行的, 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, 并已被广泛地用于酵母遗传学、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 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 全序列的测定是现代遗传学最新的一项成就。它汇集了公开的序列数据库, 使酵母成为真核生物细胞学功能和基因组精细研究的首选生物。一些互联网址提供了方便而有序地进入序列数据库的途径, 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*) 是两个常用的网址。这些网址通过强大的搜索功能来扩大序列数据库, 其功能包括: 基因组分析, 相关数据库的联系, 如: 参阅文献数据库或酵母基因产物蛋白质结构数据库。另外, 在酵母蛋白质数据库 (YPD) 中存有每种酵母蛋白质的数据, 并能预测开放阅读框的结构信息以及开放阅读框中基因突变伴随的表型变化。

名为《酿酒酵母的分子生物学》(*The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces* 1981, 1982) 和《酿酒酵母的分子细胞生物学》(*The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces* 1991~1997) 两套评论性丛书是关于酿酒酵母生物学非常有用的书籍。由于后一套丛书中某些章节收集了自第一本丛书出版以来所取得的一些新进展, 所以这两套丛书的每一册都综合了大量酵母生物学文献的详细评论, 这些内容是其他任何书籍所没有的。每一位酵母生物学家都应该收藏这 5 本书。《酵母遗传学初论》(*The Early Days of Yeast Genetics*) 这本书也值得一读, 因为它以历史的眼光回答了为

什么酵母会成为一种模式生物，同时还描绘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。

这本教程全面而集中地介绍了面包酵母菌——酿酒酵母。学完这本教程后，你应该能够运用酵母遗传学家常用的全部技术，比较轻松地领会各种有关文献。除了子囊解剖外，大部分方法与应用于其他微生物的方法没有太大区别，因此，一些技巧稍加实践将很快可以掌握。所有实验都将分为两人一组，如有可能，尽量使对微生物学技术比较熟悉的研究者配一个经验缺乏的伙伴。由于大多数实验将在教程一开始就进行，故建议大家仔细通读手册。请注意：由于需要连续培养，一些实验会持续数天。

值得强调的是，在这个手册里，一些操作程序已经浓缩以便节约时间，而不是以研究为目的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。有些技术不可能直接用于解决问题，但它们有助于阐明基本原理和方法。

高等参考书

- Broach, J. R., E. W. Jones, and J. R. Pringle. 1991. *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*, vol. 1, *Genome dynamics, protein synthesis, and energetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Guthrie, C. and G. R. Fink, eds. 1991. *Methods in Enzymology*, vol. 194, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*. Academic Press, New York.
- Jones, E. W., J. R. Pringle, and J. R. Broach. 1992. *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*, vol. 2, *Gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Pringle, J. R., J. R. Broach, and E. W. Jones. 1997. *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*, vol. 3, *Cell cycle and cell biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Strathern, J. N., E. W. Jones, and J. R. Broach, 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.

其他与酵母有关的书

- Fincham, J. R. S., P. R. Day, and A. Radford. 1979. *Fungal genetics*. University of California Press, Berkeley and Los Angeles.
- Rose, M. D. 1995. *Modern and post-modern genetics in Saccharomyces cerevisiae*. In *The yeasts* (ed. A. E. Wheals et al.), 2nd ed., vol. 6. Academic Press, New York.
- Hall, M. N., and P. Linder. 1993. *The early days of yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

酵母网址

- 慕尼黑蛋白质序列信息中心
<http://speedy.mips.biochem.mpg.de/mips/yeast/>
酿酒酵母基因组数据库
<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>
酵母蛋白质数据库
<http://www.proteome.com/YPDhome.html>

(刘子铎译)

遗传学命名法

染色体基因

用于酵母遗传学早期介绍的命名法及其规则已由 Sherman 和 Lawrence (1974) 以及 Sherman (1981) 作了概述。基因符号应尽量与 Demerec 等 (1966) 提出的标准相一致, 即用三个斜体字母命名 (例如: *arg*)。与 Demerec 等 (1966) 提出的标准相反, 遗传学基因座通过跟在基因符号后的一个数字 (而不是字母) 来表示, 如: *arg2*。显性等位基因通过使用基因符号的三个斜体大写字母来表示, 如: *ARG2*。左下角小写字母则代表隐性等位基因, 如: 营养缺陷型 *arg2*。野生型基因用一个右上角带 + 的符号表示, 如 *sup6⁺* 或 *ARG2⁺*。用一个连字符号将一个数字与一个基因座标记隔开的方式表示该座位上的等位基因, 如: *arg2-14*。座位序号应与原来的标记一致, 但等位基因的序号可因不同实验室而异。

表型的名称通常用右上角带有 + 或 - 的罗马字的相应基因标记表示, 如: 用 *Arg⁺* 和 *Arg⁻* 分别表示精氨酸非依赖型和精氨酸依赖型。

下面的例子说明了用于酿酒酵母遗传学命名的规则:

<i>ARG2</i>	一个基因座或显性等位基因
<i>arg2</i>	一个产生依赖精氨酸作为表型的基因座或隐性等位基因
<i>ARG2⁺</i>	该基因的野生型等位基因
<i>arg2-9</i>	一个特异等位基因或在 <i>ARG2</i> 基因座突变
<i>Arg⁺</i>	一个不依赖精氨酸的菌株
<i>Arg⁻</i>	一个依赖精氨酸的菌株
<i>Arg2p</i>	表示 <i>ARG2</i> 基因的蛋白质产物

除了这些普遍规则外, 还存在一些特殊规则。基因簇、同一基因内的互补群或一个基因中具有不同特性的区域可以用带有大写字母的相应基因座标记表示, 如: *his4A*、*his4B*。

随着酵母重组 DNA 技术的广泛应用, 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 <i>ARG2</i> 基因座, 但插入的位置没有破坏 <i>ARG2</i> 的功能
<i>arg2::LEU2</i>	<i>LEU2</i> 基因插入 <i>ARG2</i> 基因座, 但插入的位置破坏了 <i>ARG2</i> 的功能
<i>arg2-101::LEU2</i>	<i>LEU2</i> 基因插入 <i>ARG2</i> 基因座, 插入的位置破坏了 <i>ARG2</i> 的功能且标明了被破坏等位基因的位置。

<i>cyc1-arg2</i>	CYC1 和 ARG2 基因发生融合，融合后的两个基因都是无功能的
P_{cyc1} -ARG2	CYC1 基因启动子和 ARG2 基因的融合体，融合后的 ARG2 基因是有功能的
[YCp-ARG2]	携带一个有功能 ARG2 基因座的着丝粒质粒
[pCK101]	表示一个具体的质粒，其结构可查资料

尽管应尽量避免使用上标，但有时为了方便也会分别使用右上标 R 或 S 来区分抗性 or 敏感基因。例如：控制刀豆氨酸硫酸盐抗性 (*can1*) 和硫酸铜抗性 (*CUP1*) 的基因及其敏感等位基因可分别用 can^{R1} 、 CUP^{R1} 、 CAN^{S1} 和 cup^{S1} 表示。

交配型和相关基因座的野生型和突变型等位基因的命名法并不遵循上述标准规则。交配型基因座的两种野生型等位基因用 $MATa$ 和 $MAT\alpha$ 表示； $MAT\alpha$ 的两个互补群用 $MAT\alpha1$ 和 $MAT\alpha2$ 表示； MAT 基因的突变基因用 $mata-1$ 、 $mata1-1$ 表示； HMR 和 HML 基因座的野生型同宗配合等位基因用 $HMRa$ 、 $HMR\alpha$ 、 $HMLa$ 和 $HML\alpha$ 表示。这些基因座的突变型基因用 $hmra-1$ 、 $hml\alpha-1$ 表示。 $MATa$ 和 $MAT\alpha$ 细胞的交配型分别用简单的 a 和 α 表示。

显性和隐性抑制基因应分别用带有基因座序号的 3 个大写字母或 3 个小写字母表示，如： $SUP4$ 、 $SUF1$ 、 $sup35$ 、 $suf11$ 。在一些情况下，UAA 抑制基因和 UAG 抑制基因还要分别在基因座序号后加上 o 和 a 。例如： $SUP4-o$ 代表 $SUP4$ 基因座的抑制基因，它将酪氨酸残基插入 UAA 位点； $SUP4-a$ 同样代表 $SUP4$ 基因座的抑制基因，但它将酪氨酸残基插入 UAG 位点。相应编码正常的酪氨酸 tRNA 并且无抑制活性的野生型座位可以用 sup_4^+ 表示。因此，酵母中抑制基因及其野生型等位基因的命名法与细菌的命名法无关。例如：用 su_4^+ 表示一种大肠杆菌赭石抑制基因，它可将酪氨酸残基同时插入 UAA 和 UAG 位点；而用 Su_4 、 su_4^- 或 $supC$ 表示编码正常酪氨酸 tRNA 且无抑制活性的野生型等位基因。

对于大多数编码蛋白质的结构基因而言，有功能的野生型等位基因通常其突变型基因为显性。酵母中，习惯使用斜体符号如： $HIS4$ 、 $LEU2$ 来表示显性基因。因为，通常使用隐性突变位点进行遗传作图，而已发表的染色体图谱通常含有某基因的突变型。例如：染色体 III 含有 $his4$ 和 $leu2$ ，而染色体 IV 含有 $SUP22$ 和 $FLD1$ 。由于大写字母被用来代表控制相同性状的显性野生型基因（如 $SUC1$ ， $SUC2$ ），而遗传学作图时使用基因的显性形式，所以在遗传学图谱中，那些染色体基因座用大写字母表示。此外，使用重组 DNA 技术与经典作图相结合的方法已经对某些 DNA 片断进行了定位，大写字母也用来为这些 DNA 片断命名，如： $RDN1$ ，一种编码核糖体 RNA 的片断。

非孟德尔决定因子

必要时，可以用加括弧的方法来区分非孟德尔基因型和染色体基因型。只要允许，最好使用上述方法以避免使用希腊字母来命名非孟德尔基因。但是当提到整个非孟德尔因子时，最好仍然使用原来的希腊符号 $[\rho^+]$ 、 $[\rho^-]$ 、 $[\psi^+]$ 和 $[\psi^-]$ ，或分别用其音译符号表示 $[rho^+]$ 、 $[rho^-]$ 、 $[PSI^+]$ 和 $[psi^-]$ 。Dujon (1981) 和 Grivell (1984)；

1990) 提出了为线粒体突变子命名的详细方法, Wickner (1981) 则为放毒者细胞株 (killer strains) 提出了命名法。与其他非孟德尔决定因子不同, $[PSI^+]$ 和 $[URE3]$ 的特性并不是由核酸的构型决定的, 而是由可遗传的蛋白质构象所决定的。这些特性所造成的异常结果可用朊病毒假说 (prion hypothesis) 来解释, 这个假说也用来解释哺乳动物中出现的可传染的神经退化疾病, 如: 瘙痒病 (Lindquist 1997)。 $[PSI^+]$ 由翻译终止因子 Sup35p 的一种可遗传构象决定, 而 $[URE3]$ 由基因 *URE2* (其产物与氮素调节有关) 的一种可遗传失活状态决定。酵母中已知的非孟德尔决定因子列于表 1。

表 1 酵母的非孟德尔决定子

野生型	突变型	因子	突变特征
$[\rho^+]$	$[\rho^-]$	线粒体 DNA	呼吸频率
$[KIL-k_1]$	$[KIL-o]$	RNA 质粒	对杀伤毒素敏感
$[cir^+]$	$[cir^o]$	2μ 质粒	无
$[psi^-]$	$[PSI^+]$	Sup35p 的朊病毒形式	加强无义密码的抑制作用
$[ure3^-]$	$[URE3]$	Ure2p 的朊病毒形式	对脲基琥珀摄取失去控制

遗传背景

当设计实验时, 酿酒酵母基因型来源的遗传背景是一个应该考虑但又经常疏忽的方面。现代遗传学研究中使用的大部分菌株属下列菌株之一, 包括: S288C、X2180、A364A、W303、 Σ 1278b、AB972、SK1 和 FL100。在 20 世纪 40 年代进行的野生型酵母与酿造菌株杂交 (Mortimer 和 Johnston 1986) 的基础上, 最近对上述一些遗传背景的谱系进行了改造。分析表明, 尽管大多数遗传背景具有共同的祖先, 但由于异型远交仍引起一定程度的遗传异质性。实际上, 远缘菌株之间的杂交经常引起不能生长的等位基因的结合, 从而产生许多不能生长的孢子, 但相同遗传背景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 上每 1kb 平均有 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, 也会在许多位点上存在差异。

不同菌株遗传背景间等位基因的差异会严重影响许多不同类型实验的结果, 故最好尽可能使用单一遗传背景的材料来避免遗传的异质性。在开始筛选一种新的突变体时, 最好考虑使用何种遗传背景菌株——通常最好选择在同一领域中大多数研究者使用过的遗传背景清楚的菌株。菌株 S288C 是最常用的一种, 但是, 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: 菌株 Σ 1278b 可以形成假菌丝, 而菌株 S288C 却不能, 菌株 SK1 (在实验三中用来进行四分体分析的菌株) 比菌株 S288C 形成孢子的速度快得多。通常, 必需将目标突变从一种遗传背景转移到另一种遗传背景中, 在理论上, 可以通过使用重组质粒和实验七中所描述的基因置换来实现。未克隆出的突变可以通过回交获得理想的菌株 (通常要进行连续回交直到实现目标性状的分离比为 2:2)。

参考文献

- Demerec, M., E. A. Adellberg, A. J. Clark, and P. E. Hartman. 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 J. R. Johnston. 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 C. W. Lawrence. 1974. *Saccharomyces*. In *Handbook of genetics: Bacteria, bac - teriophages, 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.

目 录

译者的话

序言

前言

遗传学命名法

实验篇

实验一 酵母细胞的观察	(3)
实验二 营养缺陷型、温度敏感型和紫外敏感型突变株的分离和鉴别	(8)
实验三 减数分裂作图	(15)
实验四 有丝分裂重组和随机孢子分析	(23)
实验五 酵母转化	(31)
实验六 胞导和核配	(39)
实验七 基因置换	(45)
实验八 <i>ras2</i> 抑制基因的分离	(54)
实验九 细胞型操作	(58)
实验十 用插入穿梭诱变法分离端粒沉默抑制基因	(67)
实验十一 双杂合蛋白互作分析法	(74)

技术和方案篇

技术和方案 1 酵母的高效转化	(81)
技术和方案 2 酵母菌落直接质粒转化法	(83)
技术和方案 3 酵母 DNA 分离	(84)
技术和方案 4 酵母蛋白质的抽提	(89)
技术和方案 5 酵母 RNA 的分离	(90)
技术和方案 6 质粒 DNA 的羟胺突变	(93)
技术和方案 7 酵母 β -半乳糖苷酶的测定	(94)
技术和方案 8 羧肽酶 Y 的平板鉴定	(97)
技术和方案 9 随机孢子分析	(98)
技术和方案 10 酵母活体染色	(99)
技术和方案 11 酵母免疫荧光	(100)
技术和方案 12 固定化细胞的肌动蛋白染色	(102)
技术和方案 13 PCR 介导基因破坏法	(103)
技术和方案 14 酵母菌落 PCR 方法	(105)

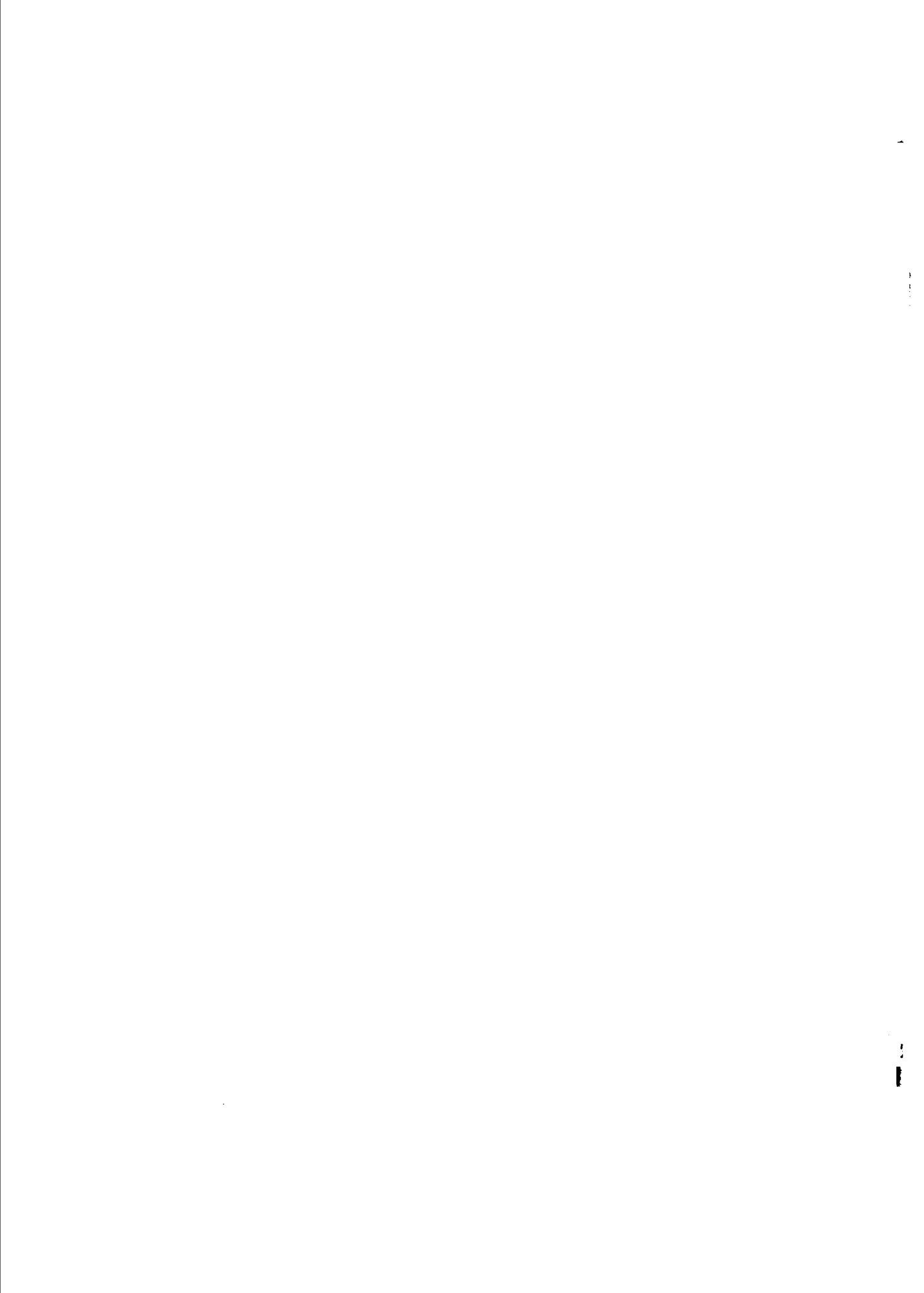
附录

附录 A 培养基	(109)
附录 B 菌株保存	(119)

• xi •

附录 C	酵母遗传图谱和物理图谱	(120)
附录 D	模格	(127)
附录 E	用于 Southern 印迹作图的菌株电泳核型	(128)
附录 F	菌株	(130)
附录 G	用标准血球计数板进行酵母计数	(132)

实验篇



实验一 酵母细胞的观察

酵母细胞的直径大约为 $5\mu\text{m}$ ，在光学显微镜下就可观察到它的许多重要特征。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，避免发生污染。在大多数现代酵母细胞生物学研究中，要对经过蛋白特异抗体处理或特异结合某些细胞器的荧光染料处理后，才能对酵母细胞进行非常复杂的镜检。这个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。

生长培养物的检测

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，新产生的芽称为子细胞。细胞生长刚刚开始时，一个母细胞上就会出现一个新芽，然后，这个芽在整个细胞生长周期会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上，而且这种生长实际上贯穿于整个细胞周期，故通过观察芽的大小就可以粗略的估计出一个给定细胞处于细胞周期的什么阶段。在以指数增长的酵母细胞培养物中，大约三分之一的细胞没有芽，三分之一的细胞出现小芽，还有三分之一的细胞出现大芽。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，对一些菌株而言，尽管它们已经完成了胞质分裂，但其母细胞和子细胞仍粘附在一起。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分离细胞。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，通常从这点就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与正常培养物中的其他任何细胞表型都不相同。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。

单倍体与二倍体的比较

酵母单倍体和二倍体细胞在形态学上十分相似，但也存在几点重要的差异。第一，二倍体细胞比单倍体细胞大。二倍体细胞胞质体积成倍增长，且细胞直径大约是单倍体细胞的 1.3 倍。当将单倍体与二倍体细胞并排放在一起进行比较时，就会很容易发现这点差异。由于二倍体细胞比较大，所以它们（在某些情况下甚至为四倍体细胞）经常用来做荧光镜检，此时其较大的形态有助于分辨微小的细胞结构。第二，在形状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。第三，二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。

单倍体细胞以沿轴向的方式出芽，每个芽与前一个芽紧密相连。二倍体细胞以极向的方式出芽，连续的芽可出现在长形的母细胞的任何一端。用钙荧光素（Calcofluor）处理细胞后就可看出细胞的出芽方式。钙荧光素是一种可以结合到几丁质环上的荧光化合物，而几丁质环则在原来的芽上，这些几丁质环被称为芽痕，只要用钙荧光素处理单倍体和二倍体细胞，就可以看出芽痕是以轴向还是以极向方式增长。

交配细胞

酵母细胞有三种交配型： $MATa$ 和 $MAT\alpha$ ，这两种细胞能够相互交配形成第三种交配型 $MATa/\alpha$ 。 $MATa/\alpha$ 细胞不能与 $MATa$ 或 $MAT\alpha$ 中的任何一种交配。一般情况下，菌株 $MATa$ 和 $MAT\alpha$ 为单倍体，菌株 $MATa/\alpha$ 为二倍体，但有时也不一定，故不能仅仅从染色体的倍性来判断细胞的交配型。在两种细胞开始交配的初期，双方互相关换信息素，这使得细胞如同无芽细胞一样停滞在细胞周期的某个阶段，并诱导交配所需蛋白质的表达。信息素也会使细胞在其表面产生一个突出物，这个突出物是进行细胞融合所必需的。突出物通常指向它所要交配的细胞。具有交配突出物的细胞称为“西蒙斯细胞”（shmoo），因为这些突出物与 20 世纪 40 年代的一个叫 Al Capp 的卡通人物十分相像。西蒙斯细胞在其凸起的顶端互相连接，接着发生胞质融合，然后是核融合，最后形成一个二倍体的 $MATa/\alpha$ 细胞核。核融合的过程称为核配（karyogamy）。新形成的二倍体称为合子（zygote），它具有独特的外观，当出第一个芽时便可很容易地鉴别出来。通过显微操作，即使在没有遗传选择的条件下也可分离二倍体的合子。从观察大量的交配细胞中，可鉴定出西蒙斯细胞和合子。

线粒体

酵母线粒体基因组编码数种与氧化磷酸化有关的蛋白质，一种核糖体蛋白以及线粒体翻译系统所需要的 rRNAs 和 tRNAs。线粒体蛋白质的大部分结构由核基因编码并经胞质运输到线粒体。因此，无论核基因组还是线粒体基因组突变均会影响线粒体功能的发挥。线粒体 DNA 发生突变的酵母细胞不能进行氧化磷酸化，所以它们必须通过发酵作用来获取所需要的全部能量。这些突变子的生长比野生型细胞要缓慢，而且不能在非发酵性的碳源（如：乳酸、甘油或乙醇）上生长。首先发现这种线粒体突变子的法国科学家称之为“小菌落”（pepité）表型。这种菌株形成乳白色小菌落，这种缺乏色素的现象在突变子 *ade2* 中尤为明显，产生红色素是突变子 *ade2* 的特性，这一过程需经过氧化磷酸化作用。二倍体小菌落菌株也不能形成孢子，故在寻找其他不产生孢子的潜在原因之前，最好先检查一下不产孢菌株是否能在非发酵碳源中生长。小菌落突变子以较高频率出现在许多普通酵母菌株中——对一些菌株而言，培养物中 10% 的细胞为小菌落。尽管线粒体基因组或核基因组的突变均可引起小菌落现象，但绝大多数小菌落是由线粒体 DNA 突变引起的。线粒体基因组以“rho”命名；野生型菌株为 rho^+ ，线粒体基因组有缺陷的菌株（大多数是突变型）为 rho^- ，而缺乏全部线粒体基因组的菌株为 rho^0 。经常出现的错误概念是认为 rho^0 就是缺乏线粒体的菌株。通过在线粒体膜上发生的一些特有反应，即便在 rho^0 菌株中用电子显微镜也可以看到一种收缩了的线粒体结构。在该实验中，将使用荧光显微技术观察野生型细胞的线粒体和线粒体 DNA。

荧光显微技术

随着细胞生物学实验中酵母细胞使用的不断增加,原来利用动物细胞确定细胞内基因产物定位的方法已逐渐用于酵母细胞。通过对特定细胞结构中基因产物的分析,已经极大的加深了对相关基因功能的了解。另外,通过检测细胞核以及细胞骨架的形态学特征,得到了关于单个细胞细胞周期阶段的准确信息,这种方法已被用于判断细胞分裂突变子。

在本实验中,将使用3种荧光显微技术来鉴别酵母细胞的结构和蛋白。第一种方法是免疫荧光显微技术,使用这种技术首先要用目标蛋白的第一抗体与固定细胞一起保温,然后再用带有荧光标记的第二抗体与第一抗体直接作用。第一抗体和第二抗体的重叠使用可以增强潜在的荧光信号。将使用带有微管蛋白抗体的荧光显微技术来观察微管的细胞骨架,这种方法的优点是可以产生很强的荧光信号,但其缺点是观察前必须对细胞进行固定,并且为了使抗体进入细胞,必须将细胞壁去掉。值得注意的是,必须采取措施避免细胞制备中带来的假象。

第二种荧光显微技术要利用一种小分子,这种小分子可以发出荧光,并且能与特定蛋白质结合,或者与某种细胞器结合。将用DAPI(4,6-二脒基-2-苯基吡啶)标记DNA,DiOC₆(3,3'-二己基噁羰花青碘化物)标记线粒体,罗丹明-鬼笔环肽(rhodamine-phalloidin)标记肌动蛋白细胞骨架。DAPI与DNA特异结合,其荧光效应很强。DiOC₆是一种可以发出荧光的疏水分子,可特异运往线粒体。鬼笔环肽是一种来自*Amanita phalloides*蘑菇的毒素,可与肌动蛋白丝状体结合,当用鬼笔环肽标记后,即可使肌动蛋白丝状体发出荧光。DAPI既可用于固定化细胞又可用于活体细胞,DiOC₆只能用于活体细胞,而罗丹明-鬼笔环肽一般用于固定化细胞。

第三种方法是目前发展最快的绿色荧光蛋白(GFP),这种蛋白是来自水母*Aequoria victoria*的一种天然荧光蛋白。GFP的独特性就在于当它在细菌、真菌、植物和动物细胞中表达时,都能发出荧光,这使它成为一种理想的荧光标记蛋白。为了检测细胞内一种蛋白质的定位,就要将该蛋白质的基因与GFP的编码序列相融合,这样就产生了一种融合蛋白质。这种融合蛋白质表达后,即可在活细胞中观察到目标蛋白质的位置,在固定化细胞中同样有用。虽然需要采取一些措施以保证融合蛋白能像野生型蛋白一样正常表达,但GFP融合法毕竟是一种很有效的方法,因为它可以对活体细胞的行为进行动态观察。我们将观察一些细胞,一种是只表达GFP,另一种是表达GFP与TUB4的融合产物。TUB4是一种存在于纺锤体极体中的蛋白。

菌株

1-1	TSY623	MAT α	<i>ade2</i>	<i>his3</i>	<i>leu2</i>	<i>ura3</i>		
1-2	TSY807	MAT α	<i>his3</i>	<i>leu2</i>	<i>lys2</i>	<i>ura3</i>		
1-3	TSY800	MAT α/α	<i>ADE2/ade2</i>	<i>his3/his3</i>	<i>leu2/leu2</i>	<i>lys2/LYS2</i>	<i>ura3/ura3</i>	
1-4	TSY481	MAT α/α	<i>ADE2/ade2</i>	<i>his3/his3</i>	<i>leu2/leu2</i>	<i>lys2/lys2</i>		