

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，大约有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”（petite）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 ρ^+ ，线粒体基因组有缺陷的菌株（大多数是突变型）为 ρ^- ，而缺乏全部线粒体基因组的菌株为 ρ^0 。经常出现的错误概念是认为 ρ^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 ρ^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'-二己基噻唑花青碘化物) 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	ade2	his3	leu2	ura3
1-2	TSY807	MAT α	his3	leu2	lys2	ura3
1-3	TSY800	MAT α/α	ADE2/ade2	his3/his3	leu2/leu2	lys2/LYS2 ura3/ura3
1-4	TSY481	MAT α/α	ADE2/ade2	his3/his3	leu2/leu2	lys2/lys2

ura3/ura3 [pTS568]
1-5 TSY514 MATa *his3 leu2 lys2 ura3* [pTS592]

质粒

pTS568 CEN URA3 GFP
pTS592 CEN URA3 TUB4-GFP

程序

安全须知

甲醛有毒并且是一种致癌物，它可以通过皮肤吸收，对眼睛、皮肤、粘膜和上呼吸道有刺激性，需带手套，安全面罩，始终保持在通风橱里操作。

DAPI是一种可能的致癌物，如果吸入、吞咽或通过皮肤吸收将是有害的。也可能引起发炎，需带手套，面具，安全镜，不要吸入尘粉。

第1天

提供给你在对数期或稳定期已被固定化菌株 1-2 的培养物，使用相差或 DIC显微镜观察，并从每个培养物中数 100 个细胞，注意无芽、出小芽和大芽的细胞数。

再提供给你已固定化菌株 1-1 和 1-2 细胞的交配混合培养物，使用相差或 DIC显微镜检查培养物，根据它们的不同形态鉴定西蒙斯细胞和合子。

比较单倍体细胞 1-2 和二倍体细胞 1-3，找出细胞大小和形态的差异。

将下列菌株置 30°C 培养过夜：

菌株 1-3 在 10ml 的 YPD 中

菌株 1-3 在 5ml 的 YPEG（除了用 3% 乙醇和 3% 甘油代替葡萄糖作为碳源外，其他成分同 YPD）中

菌株 1-4 和 1-5 在 5ml 的 SGal-ura（用 2% 半乳糖作碳源的基本培养基）中，以备第二天早上之用

第2天

如果昨天的细菌生长过头，须稀释培养物，再培养到对数生长早期。

- 1) 直接加 0.5ml 甲醛（终浓度是 3.7%，标准母液是 37%）到培养物中，固定生长在 YPD 中的 5ml 菌株 1-3，室温（约 23°C）培养 1~2 小时，用一个医用离心机收集细胞，用 0.1mol/L 磷酸钾（pH 7.5）洗 2 次，在 4°C 贮存细胞过夜。
- 2) 按照“技术和方案 10，酵母活体染色法”，用 DiOC₆ 对生长在 YPD 和 YPEG 中菌株 1-3 活细胞进行染色。
- 3) 按照“技术和方案 10，酵母活体染色法”，用 Calcofluor 对生长在 YPD 中的菌株 1-3 进行活细胞染色。
- 4) 按上述处理把菌株 1-4 和 1-5 制成水浸片，然后用荧光素滤片观察。

第3天

- 1) 按照“技术和方案 11 ,酵母免疫荧光法”,用抗微管蛋白第一抗体 FITC 连接的羊抗兔第二抗体和 DAPI 对已固定化的菌株 1-3 细胞 (在 YPD 中) 进行染色。
- 2) 按照“技术和方案 12 ,固定细胞的肌动蛋白染色法”,用罗丹明 -鬼笔环肽对已固定化的菌株 1-3 细胞 (在 YPD 中) 进行染色。

材料

第1天

10ml YPD
5ml YPEG
10ml SGal-ura

第2天

甲醛 (37% 贮存液)
PBS
DiOC₆ (10 μ g/ml 贮存液, 用乙醇配制)
Calcofluor [1mg/ml 贮存液, 用 100mmol/L 磷酸钾溶液 (pH 7.5) 配制]

第3天

Zymo lyase® 100T (120493-1, Seikagaku America Inc.)
100mmol/L 磷酸钾 (pH 7.5)
巯基乙醇
聚赖氨酸
PBS
-20°C 的甲醇和丙酮
PBS + 3% BSA
1/34 体积的抗微管蛋白抗体
羊抗鼠荧光素连接的第二抗体
DAPI (Sigma D 9542 或 Accurate Chemical and Scientific Corp.)
封固剂
罗丹明 -鬼笔环肽

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

因为自发突变的频率很低，所以通常用紫外线、亚硝酸、甲基磺酸乙酯（EMS）、硫酸二乙酯和 1-甲基-硝基-亚硝基胍（1-methyl-nitro-nitrosoguanidine）等诱变剂来提高突变发生的频率。这些诱变剂十分有效且在不破坏细胞结构的条件下以 $5 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-2}$ 的频率诱发突变。虽然在有的方法中可使用制霉菌素和其他药剂杀死未突变细胞以提高突变率，但一般不需要使用这些选择方法就可以获得大量的突变株。在这个实验中，将利用 EMS 处理酵母细胞的方法分离营养缺陷型、温度敏感型和紫外敏感型突变株。

营养缺陷型突变株对于阐明生化反应过程及其研究酶结构和功能之间的关系具有非常重要的价值，通过对氨基酸营养缺陷型所积累中间产物的研究已经揭示了许多生化反应途径。

对温度敏感型突变株的研究将会扩大基因组遗传学研究的前景。酵母中一大部分基因参与编码必需蛋白质（例如：RNA 聚合酶、tRNA 合成酶等），造成这些蛋白质完全丧失活性的突变会导致细胞死亡，即使造成部分活性丧失的突变也会导致遗传和生化上的障碍。但有一种突变十分有用，它造成这些必需蛋白中一种蛋白结构发生变化，使其在低温时能发挥作用而在常温时却不能。具有这种突变的菌株在低温时能以正常或接近正常的速率生长，但在高温时却不能在任何培养基上生长。利用这种表型特征就可将发生重大功能突变的温度敏感型突变株与可补充温度敏感型突变株（即一种氨基酸生物合成存在缺陷的突变株）区分开来。全面研究温度敏感型突变株就可以确证和了解几乎整个基因组的功能，这种可能性已经在数种噬菌体中成为现实。

利用紫外敏感型（或 Rad^- ）突变株可以对 DNA 的修复和重组过程进行研究。其理论根据是 DNA 紫外损伤的修复需要酶系统。编码这些酶的 *RAD* 基因发生突变会导致细胞丧失修复紫外损伤的能力，从而使其比野生型细胞对辐射更加敏感。因为一些紫外敏感型突变株仍具备受损的重组能力，故认为 DNA 修复和重组有相似的发生机制。此外，一些 *RAD* 基因控制重要功能，它们的破坏会导致细胞死亡。

在某些情况下，能够直接筛选特定基因的突变是十分有用的。例如：有时不通过遗传杂交就能很容易将营养缺陷型标记引入菌株。直接筛选营养缺陷型突变的两种非常简单的方法是：使用 αAA （ α -氨基乙酸）筛选 *lys2* 和 *lys5* 突变（Chattoo et al. 1979; Zaret and Sherman 1985）；使用 5-FOA（5-氟乳清酸）筛选 *ura3* 和 *ura5* 突变（Boeke et al. 1986）。

这里所提出的标准处理法包括用 EMS 处理野生型酵母菌株。一半学生将诱变 *MAT α* 菌株，另一半学生将诱变 *MAT α* 菌株。诱变以后，将菌株稀释，并以每平板大约 100~200 个细胞的浓度涂布于完全培养基上。这些细胞长成菌落后，将它们用平板影印法转移到各种培养基上。将平板在室温（23℃）和 37℃ 条件下培养，然后进行成

对比较，即可检测出温度敏感型突变株。将照射处理的平板与不处理的对照平板进行比较即可检测出紫外敏感型突变株。在含有葡萄糖、磷酸钾、硫酸铵、一些维生素、盐和微量矿物质的基本培养基上让菌株生长，即可检测出营养缺陷型突变株。把 YPD 平板上的菌落转接到不同的合成培养基上生长，根据生长情况可以测定出不同菌株的特殊需求，通过检测含有各种合成物的原始 YPD 平板上菌落的生长情况，就可以确定不同菌株生长所需要的特定条件。

鉴别营养缺陷型突变株，可将待测突变株按同一方式涂于 YPD 平板上。待形成菌落后，再将它们转移到含有各种不同氨基酸、嘌呤、嘧啶和其他代谢物的基本培养基上。通过观察特定菌株的生长情况，就可以鉴别出突变菌株生长所需要的特定条件。

库	1	2	3	4	5
6	腺嘌呤	嘌呤	半胱氨酸	甲硫氨酸	尿嘧啶
7	组氨酸	亮氨酸	异亮氨酸	缬氨酸	赖氨酸
8	苯丙氨酸	酪氨酸	色氨酸	苏氨酸	脯氨酸
9	谷氨酸	丝氨酸	丙氨酸	天冬氨酸	精氨酸

一般情况下，对于含有库 1~5 中培养物的平板，一个菌落至少可在其中之一上生长，对含有库 6~9 中培养物的平板同样如此，这样就可以一个一个的鉴定出生长所需要的成分。例如：能在库 1 和 7 上生长的菌落需要组氨酸，能在库 3 和 8 上生长的菌落需要色氨酸。如果一个菌落只能在九种库中的一种上生长，那就说明它需要不止一种该库所含的营养。在芳香氨基酸生物合成早期受阻的突变株将只能在库 8 中生长。

菌株

2-1 S288C *MAT α mal gal2*

2-2 D665-1A *MAT α*

程序

安全须知

EMS 是一种很强的诱变剂，应戴手套并在通风厨中操作，在废弃之前，用 5% 硫代硫酸钠中和所有 EMS 废液，所有操作都应使用一次性移液器。

皮肤和眼睛暴露于紫外射线是有危险的，应该避免。为了防止暴露，照射平板应在一个带有活门装置的封闭盒里进行。

第 1 天

用上述菌株接种 5ml YPD (一半学生使用 *MAT α* 菌株 2-1，另一半学生使用 *MAT α* 菌株 2-2)，记住用一个装有培养基而不接种的试管作为对照，在 30°C 下培养过夜。

第2天

培养物将含有约 2×10^8 细胞/ml, 分别转 1ml 过夜培养物到两个无菌离心管中, 离心收集细胞, 用无菌蒸馏水洗两次 (离心 5 秒钟, 酵母细胞便可沉淀)。悬浮细胞在 1ml 无菌磷酸钠缓冲液 (pH 7), 用计数器测定确切的细胞密度, 加 30 μ l EMS 到其中一支离心管中, 振荡分散细胞 (另一管作为非诱变对照)。将两支试管置 30 $^{\circ}$ C 摇床培养 1 小时, 离心, 悬浮细胞于无菌水中, 转入洁净离心管, 用 5% 硫代硫酸钠洗两次, 再悬浮细胞于 1ml 无菌水中。用 EMS 处理将引起约 40%~70% 的细胞失活。以下三步用诱变培养基进行:

- 1) 直接把细胞涂在 α AA 培养基和 5-FOA 培养基用于筛选 *lys2* 和 *ura3* 突变株。
- 2) 细胞在 YPD 培养基中培养过夜, 然后, 涂在 α AA 和 5-FOA 培养基上。
- 3) 稀释细胞, 涂 YPD 平板以便筛选其他突变菌落。

第一, 直接涂 0.1ml 诱变细胞在 α AA 和 5-FOA 平板上, 另外, 涂 0.1ml 洗过的非诱变细胞在相同的 α AA 和 5-FOA 平板上作为对照, 通过诱变和非诱变培养物所长出的菌落数可测出由 EMS 处理所引起的诱变频率。

第二, 将每种细胞悬浮液 0.1ml 接到 1ml 的 YPD 培养液, 在 30 $^{\circ}$ C 下培养过夜。

第三, 为了获得 100~200 个成活细胞/平板, 用无菌水稀释 EMS 处理细胞 (细胞处在硫代硫酸钠溶液中) 到 10^{-5} , 稀释度可根据使用细胞的起始浓度进行调整, 分别将 0.1、0.2 和 0.4ml 菌液涂于 YPD 平板上, 每种菌液涂 10 套平板, 室温 (23 $^{\circ}$ C) 培养 3~4 天。

第3天

水洗来自前一天的 1ml YPD 过夜培养物, 悬浮在 1ml 无菌水中, 涂 0.1ml 在相同的 α AA 和 5-FOA 平板上, 在 30 $^{\circ}$ C 下培养。

第5天

选择 10 套或更多含有 25~200 个菌落/平板的 YPD 平板用于分离①营养缺陷型突变株、②温度敏感型突变株和③紫外敏感型突变株。用影印法把每个 YPD 平板的菌落转到 1 个 SD 平板、1 个 SC 平板和 4 个 YPD 平板, 记录被转移菌落的编号, 每个平板要编号, 并且在背面做一个方向性记号。对营养缺陷型突变株的检测, 在 30 $^{\circ}$ C 下培养 SC 和 SD 平板 1 天。对温度敏感型突变株, 从每组 YPD 影印板中取一套在 37 $^{\circ}$ C 下培养 1 天, 另外一套在室温 (23 $^{\circ}$ C) 培养 1 天。对紫外敏感型突变株, 从每组 YPD 影印板中取一套用紫外光 (置 Stratalinker, 400 μ J) 处理, 把经紫外照射处理和未经处理的平板在 30 $^{\circ}$ C 下培养 1 天, 测数 EMS 处理后的成活率。

第6天

营养缺陷型突变株把 10 套 SD 平板与 SC 平板进行两两比较, 使用无菌牙签, 把 SD 平皿上不能生长的菌落接到 9 个含有不同代谢物库的平板上, 一个 SC 平板和一个 SD 平板, 这样的菌落应该有 5% 左右。同时接菌株 2-1 或 2-2, 在 30 $^{\circ}$ C 下培养过夜。

紫外敏感型突变株 比较照射平板与非照射平板。用牙签将照射平板上不生长的菌落接到两个 YPD 平板上, 也包括菌株 2-1 或 2-2, 像以前一样照射其中一个平板, 在 30°C 下培养两套平板过夜。

温度敏感型突变株 比较 37°C 平板和 23°C 平板, 用牙签将在高温下不能生长的菌落接到两个 YPD 平板上, 一个平板以 37°C 培养 1 天, 另外一个平板以室温培养, 也包括菌株 2-1 或 2-2 作为对照。制作一个含有 30% 蔗糖的影印 YPD 平板, 这个平板将允许这些温度敏感型突变株在 37°C 生长, 这是因它的缺陷在 YPD 平板上引起渗透裂解, 而在高渗条件下, 这种缺陷被抑制(渗透补救突变株)。

lys2 和 ura3 突变株 计数第 2 天和第 3 天涂布的 αAA 和 5-FOA 平板上生长的菌落数, 取 2×10^8 细胞/ml 作为饱和密度的 YPD 过夜培养物, 估算每个类型突变株在诱变前后和随着诱变出现生长晕(outgrowth)前后的频率。用 YPD 平板, 从一套 αAA 平板中或 5-FOA 平板中分别纯化 4 个菌落用于检测它们的 Lys 和 Ura 表型, 在 30°C 下培养平板, 每种突变型在诱变之后增加了吗? 为什么诱变之后生长可能影响每种突变型的恢复?

第 7~8 天

营养缺陷型突变株 记录生长情况, 给每个突变株标号, 在 YPD 平板上划线突变株原种, 在 30°C 下培养过夜。

紫外敏感突变株 记录生长情况, 给每个突变株标号, 这些菌株也可用于检测它们的其他表型——X 射线敏感和烷化剂敏感以及筛选标记的恢复和重组比率。在 YPD 平板上划线接种突变株原种, 30°C 下培养。

温度敏感突变株 记录突变株在 23°C 和 37°C 下的生长情况。给每个突变株标号, 在 YPD 平板上划线接种突变株原种, 室温培养过夜。

lys2 和 ura3 突变株 用牙签将已纯化的 αAA^R 菌落接种到 SD 和 SD + ura 平板测试 Ura 表型。

第 9 天

与伙伴交换从相对交配型菌株中分离的相似表型的突变株, 在 YPD 平板上杂交突变株, 室温培养过夜。

第 10 天

营养缺陷型突变株 将杂交平板影印到 SD 平板用于互补试验, 室温培养 1~2 天。

紫外敏感突变株 将杂交平板影印到 YPD 平板, 照射。如果一个二倍体来自不同基因座突变的两个隐性 Rad⁻ 菌株, 它将有一个正常的紫外敏感, 室温培养 1~2 天。

温度敏感突变株 将杂交平板影印到 YPD 平板上, 在 37°C 下培养 1~2 天。

第 12 天

评价互补试验, 记录来自整个班的资料, 测定控制每个特征的最少基因数。

lys2 和 ura3 突变株 记录来自第 7~8 天 lys2 和 ura3 的生长情况。

材料

注意：提供的材料量仅供两人之用。

第 1 天

2 支含有 5ml YPD 培养液的试管

第 2 天

无菌蒸馏水

5ml 无菌 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7)

EMS (甲基磺酸乙酯; Sigma M 0880)

无菌 5% 硫代硫酸钠 (w/v)

2 支含有 1ml YPD 的培养管

2 套 α AA 平板

2 套 5-FOA 平板

30 套 YPD 平板

第 3 天

2 套 α AA 平板

2 套 5-FOA 平板

第 5 天

10 套 SC 平板

10 套 SD 平板

40 套 YPD 平板

无菌绒垫

第 6 天

11 套 YPD 平板

9 种营养库平板, 每种 2 套

2 套 SD 平板

4 套 YPD 平板

2 套含有 30% 蔗糖的 YPD 平板

2 套 SC 平板

无菌绒垫

第 7~8 天

6 套 YPD 平板

2套 SD 平板
1套 SD + lys 平板
1套 SD + ura 平板

第 9~11 天

5套 YPD 平板
5套 SD 平板
无菌绒垫

参考文献

营养缺陷型突变株

- Lindgren, G., L. Y. Hwang, Y. Oshima, and C. Lindgren. 1965. Genetical mutants induced by ethyl methanesulfonate in *Saccharomyces*. *Can. J. Genet. Cytol.* 7: 491~499.
- Lingens, F. and O. Oltmanns. 1964. Erzeugung und untersuchung Biochemischer and Mangelmutanten von *Saccharomyces cerevisiae*. *Z. Naturforsch.* 19B: 1058~1065.
- Lingens, F. and O. Oltmanns. 1966. Über die Mutagene Wirkung von 1-nitroso-3-nitro-1-methyl-guanidin (NNMG) und *Saccharomyces cerevisiae*. *Z. Naturforsch.* 21B: 660~663.

温度敏感型突变株

- Hartwell, L. H. 1967. Macromolecule synthesis in temperature-sensitive mutants of yeast. *J. Bacteriol.* 93: 1662~1670.
- Pringle, J. R. and L. H. Hartwell. 1981. The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. In *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: Life cycle and inheritance* (ed. J. N. Strathern et al.), pp. 97~142. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.

紫外敏感型突变株

- Cox, B. S. and J. M. Parry. 1968. The isolation, genetics and survival characteristics of ultraviolet-light-sensitive mutants in yeast. *Mutat. Res.* 6: 37~55.
- Game, J. C. and B. S. Cox. 1971. Allelism tests of mutants affecting sensitivity to radiation in yeast and a proposed nomenclature. *Mutat. Res.* 12: 328~331.
- Moustacchi, E. 1972. Evidence for nucleus independent steps in control of repair of mitochondrial damage. I. UV-induction of the cytoplasmic "petite" mutation in UV-sensitive nuclear mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 114: 50~58.
- Resnick, M. A. 1969. Genetic control of radiation sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 62: 519~531.

营养缺陷型筛选

- Boeke, J. D., F. LaCroute, and G. R. Fink. 1986. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast; 5'-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.* 197: 345~346.
- Chattoo, B. B., F. Sherman, D. A. Azubalis, T. A. Fjellstedt, D. Mehnert, and M. Ogur. 1979. Selection of *Lys2* mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by the utilization of α -amino adipate. *Genetics* 93: 51~65.
- Zaret, K. S. and F. Sherman. 1985. α -Amino adipate as a primary nitrogen source for *Saccharomyces cerevisiae* mutants of yeast. *J. Bacteriol.* 162: 579~583.

富积方法

- Henry, S. A., T. F. Donahue, and M. R. Culbertson. 1975. Selection of spontaneous mutants by inositol starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 148: 5~11.
- Snow, R. 1966. An enrichment method for auxotrophic yeast mutants using the antibiotic "nystatin" *Nature* 211: 206~207.

- Thouvenot, D. R. and C. M. Bourgeois. 1971. Optimisation de la selection de mutants de *Saccharomyces cerevisiae* par la nystatine. *Ann. Inst. Pasteur* 120: 617~625.
- Walton, B. F. , B. L. A. Carter, and J. R. Pringle. 1979. An enrichment method for temperature-sensitive and auxotrophic mutants of yeast. *Mol. Gen. Genet.* 171: 111~114.

实验三 减数分裂作图

通过减数分裂作图（即四分体分析）和有丝分裂作图可以进行连锁研究。一个子囊内的四个孢子是一次减数分裂的产物，对这些四分体的遗传分析能提供杂合态基因的连锁关系。若已知着丝粒连锁的基因存在于杂种中，那么就可以绘出其着丝粒相关基因的图谱。尽管从一个子囊里分离四个孢子是相当困难的技术，它需要显微操作器和大量的实践。四分体分析不仅用于连锁研究，也可用于构建遗传和生化实验所需的一些菌株，有时候，孢子可随机分离（参见实验四中的例证）。

四分体可分为三类——亲代双型（PD）、非亲代双型（NPD）和四型（T）——来源于两个杂合二倍体的两个标记 $AB \times ab$ 的关系表示如下：

PD	NPD	T
AB	aB	AB
AB	aB	Ab
ab	Ab	ab
ab	Ab	aB

随机分配 1:1:4
 连锁 >1:<1
 着丝粒连锁 1:1:<4

如果两基因连锁，亲代双型（PD）子囊数目多于非亲代双型（NPD）子囊；如果两基因位于不同染色体上且与各自的着丝粒连锁，那么四型（T）子囊的比例就会减少。如果两基因位于不同染色体上且至少一个基因为非着丝粒连锁或者两基因在同一着丝粒上分离较远，那么就遵循独立分配，PD:NPD:T 的比例为 1:1:4。

既然非亲代双型（NPD）四分体有 4 个重组子，四型（T）四分体仅有 2 个重组子，那么重组的百分比等于：

$$100 \frac{1/2 (T) + NPD}{\text{总四分体}} = 100 \frac{T + 2 (NPD)}{2(PD + NPD + T)}$$

这个值等于两个基因间以厘摩（cM）为单位的基因图距，前提是在间隔中有最大一次交换。如没有非亲代双型（NPD）子囊，距离等于 T 型子囊百分数的一半。如果非亲代双型子囊的比例很少且连锁的标记间有两次或更少的交换，则用厘摩表示的距离大约为：

$$100 \frac{1/2 (T - 2[NPD]) + 4(NPD)}{\text{总四分体}} = 100 \frac{T + 6 (NPD)}{2(PD + NPD + T)}$$

有四种双交换子代类型，一种类型产生 PD、T，而第四种类型产生 NPD。因为只有一种是 NPD，假设在无染色体单体干扰条件下，所有双交换频率能被推断是 4 (NPD)。对单一的交换必须作个修正，即减去产生四分体的双交换，因此结果修正为 $T - 2 (NPD)$ 。

关于干扰的若干假设必须考虑用以测定较大间隔的图距。另外，因为间距接近极限值，计算也变得不精确，惟一精确的方法是通过较短间距的累积来测量较长的间距。

一个基因与其着丝粒的间距可通过第二次分离（SDS）的频率来测量，这个频率与两个标记基因 T 型子囊的频率相似。如果基因与着丝粒间距较小，则以厘摩为单位的间距等于 SDS 百分率的一半。SDS 的百分率（对一个特定基因）在下述条件下很容易确定：如果杂种包含一个紧密连锁的着丝粒标记如 *trp1*，它与着丝粒的距离大约为一个厘摩单位。在这种情况下，SDS 的百分率等于 T 型子囊的百分率，其误差不超过 1%，这是因为 *trp1* 在第一次减数分裂时随着丝粒而分离。若杂种包含两个或更多着丝粒连锁的标记基因，它们并不像 *trp1* 靠近着丝粒，这样就可以确切地计算 SDS 的百分率。在这种情况下，SDS 的顺序由着丝粒连锁的标记基因一致性所决定。也应注意到在不同染色体上两个基因座 A 和 B 的 SDS 频率与四型子囊 $(T)_{AB}$ 的相关频率可表示为：

$$(T)_{AB} = (SDS)_A + (SDS)_B - 3/2 (SDS)_A (SDS)_B$$

然而，上述关系只有在下列条件下成立：即至少其中一个标记基因与其相应着丝粒距离相当近。

当二倍体细胞转到孢子形成培养基时，通常在 4 天内发生有丝分裂和孢子形成。这时，形成孢子的培养物实际上是含有未形成孢子的二倍体细胞、拥有四个单倍体孢子的子囊和少于四个孢子的子囊组成的混合体。在孢子形成培养基上，孢子不会萌发或分裂，大多数孢子形成培养物在冰箱内可保存数月而不会失活。解剖的第一步包括用消解酶（Zymolyase）处理已形成孢子的培养物，它可以酶解子囊壁，但不会破坏子囊中四个孢子的缔合。用一个无菌接种环小心地把已酶解的子囊转到 YPD 平板上，然后使用显微操作器把四个孢子相互分离，孢子萌发并在 2~3 天后形成菌落，将孢子菌落转入斜面或 YPD 平板以便保存。将这些菌株接种 YPD 制备一个原平板，通过影印到适当的培养基可对大部分表型进行分析。通过影印原平板到两个 YPD 平板和拥有 *MATa* 和 *MATα* 供试菌株菌苔的平板上用以测定交配型，互补标记和单基因内的特定等位基因。将交配混合物在 YPD 平板培养 1 天后影印到基本培养基上。

通过对菌株 3-1 和 3-2 杂交所构建的二倍体菌株 3-3 的四分体分析，可以阐明许多技术和染色体作图的原理。本实验将提供以上菌株的孢子形成培养物，作为显微操作练习材料，只有在许多子囊已经成功地解剖后，实验方可以开始进行。

菌株

3-1	1385-3B	<i>MATa his4-G met13 lys2 ho.:: LYS2</i>
3-2	1384-10D	<i>MATα his4-N met4 ura3 leu2 trp1 lys2 ho.:: LYS2</i>
3-3	1385-3B × 1384-10D	
3-4	FW786	<i>MATa ade8</i>
3-5	FW787	<i>MATα ade8</i>
3-10	ERX-17C	<i>MATa his4-N met4 ade8</i>
3-11	ERX-3C	<i>MATα his4-G met4 ade8</i>
3-12	ER3a	<i>MATa his4-G met13 ade8</i>

注意：菌株 3-3 在 YPD 培养基上培养后将形成孢子。二倍体可以通过菌株 3-1 和 3-2 交配后重新构建。

程序

第 1 天:

显微针的制备 用玻璃显微针加到任何一种显微操作器上 (Sherman 1975) 进行子囊孢子的分离。一种简单的用来分离子囊孢子 (也使用于细胞和合子) 的显微针可用一个普通喷灯轻易制得。最近, 常用一个更容易制作解剖针的方法, 它只需要一些强力胶水 (Super Glue) 和一些光纤玻璃。下面介绍三种方法, 本实验将使用最简单的第 3 种方法。

方法 1: 利用喷灯将一个直径 2mm 的玻璃棒的一端拉成细尖, 然后将其在小火上成直角拉出更纤细的尖头 (如图 3.1 所示)。末端断开时形成一个直径为 10~100 μm , 长几毫米的细尖。其直径的大小不是关键, 对不同的研究人员有不同的选择。较大的直径便于将子囊挑起和转移, 而在细胞密度大的区域用直径较小的微针较好, 一般用直径为 40 μm 的显微针为宜。显微操作针的长度依操作空间高度而定, 太短会因显微针基杆发光不便操作。在平板表面操作时, 一般需要较长的显微针。拉出的尖端可以用刀片切断或者在两块玻片之间折断, 最关键的是显微针末端要平齐, 有时需要几次尝试才能成

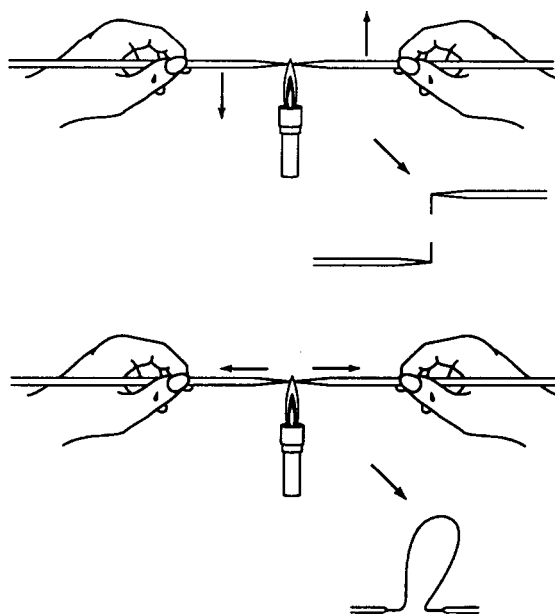


图 3.1 显微针的制作。分离子囊孢子的显微针也可以这样制作：先将 2mm 直径的玻璃棒拉出一细尖, 再将末端拉成呈直角更细的尖端 (上), 显微针的直角尖端也可通过纤细部分拉成环制得 (下)。