



新型酵母蛋白表位标记和基因敲除质粒系统的构建及可行性验证

唐仕伟, 李辉, 崔时媛, 张正坦, 谢志平*

上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240

摘要:【目的】构建一套用于酿酒酵母基因功能研究的质粒。该套质粒结合 pUG 系列和 pFA6a 系列的优点, 同时采用同尾酶实现蛋白表位标签的串联插入。【方法】利用 PCR 技术分别克隆 pUG 系列质粒的 loxP 位点、pFA6a 质粒多酶切位点和 *ADHI* 终止子模块; 通过重组连接各片段, 构建 pCLHN-TRP 和 pCLHN-URA 质粒。在此基础上利用同尾酶实现多种蛋白表位标签的单个或串联重复插入, 获得一系列蛋白表位标记质粒。最后, 以 *ATG1*、*COX4* 和 *NHX1* 为例验证本质粒系列的性能。【结果】在本项工作中, 我们共构建 2 种基因敲除用质粒和 17 种表位标记用质粒(涵盖 1-8 FLAG、1-12 V5、3-9 HA、2-8 MYC、GFP 和 mCherry)。在几个靶基因上的应用证实了本套质粒的实用性。尤其值得指出的是, 通过组合采用不同重复度的串联表位标签, 在同一张膜上同时检测表达差异极大的不同蛋白而不使高表达蛋白信号饱和成为可能。【结论】本文所构建的 pCLHN 质粒系列是对现有酵母质粒工具的有益补充。

关键词: 酵母细胞, 基因敲除, 蛋白标签, 同尾酶, 表达量

酿酒酵母作为重要的真核模式生物, 在基因功能研究中起到了非常重要作用^[1-3]。1996 年酿酒酵母完整基因组序列发表, 标志着其基因功能分析进入到一个新的阶段^[4]。在酵母系统中, 基因敲除(gene deletion)^[5-7]和表位标记(epitope tagging)^[8-9]是基因功能研究的两个非常重要的基本操作工具。酵母高效的同源重组机制使人们可以方便地将 DNA 片段特异性地整合到基因组序列上, 达到基因敲除和蛋白表位标记的目的。这种操作一个顺带的好处是, 表位标记标签在基因组原位插入,

可以在基本不改变蛋白原有表达水平的情况下实现目的蛋白的检测^[10]。

在酵母中广泛应用的表位标记质粒主要是 pFA6a 系列为基础衍生的 C 端表位标记质粒系统^[11-13]。目前在酵母系统中应用的多串联蛋白标签融合质粒有 13MYC、5FLAG、3HA 和 12V5 等^[11,13-14]。在蛋白检测与纯化实验中, 不同表达水平的目的蛋白需要不同重复度的蛋白标签来满足实验要求。然而, 在酵母中表达的融合蛋白标签质粒大部分只涵盖一部分长度的蛋白标签, 同

基金项目: 上海市教育委员会科研创新计划(2017-01-07-00-02-E00035)

*通信作者。Tel: +86-21-34204090; E-mail: zxie@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2018-09-15; 修回日期: 2018-11-14; 网络出版日期: 2018-12-25

时包含短标签和长标签(多重复度)的系列化标签质粒较少。

酵母基因敲除常用的质粒系统包括 pUG 系列衍生质粒系统^[15-16]。该系列质粒采用 Cre-loxP 系统实现筛选标记的重复利用。Cre 是一种序列特异的 DNA 重组酶; loxP 位点则是 Cre 识别的位点。pUG 系列质粒在 *URA3*、*TRP1* 等常用的筛选标记两端安插 loxP 序列。利用这段两端带有 loxP 序列的 DNA 替换被敲除的基因后,再通过另一个质粒表达 Cre 酶,从而重组去除 loxP 中间的筛选基因。

在本文中,我们构建了新型的蛋白表位标记和基因敲除质粒。该套质粒不仅具有 pUG 系列 loxP 系统较好的筛选标记回复能力和 pFA6a 质粒表位标记的优点,而且通过引入同尾酶,可以方便地构建多重复标签质粒。在该套质粒系统上,我们分别在蛋白标签上游和筛选标记下游设计了 T1(D1)/LRS 位点,从而满足基因敲除和表位标记引物通用性设计。

1 材料和方法

1.1 材料

本文所用的限制性内切酶包括 *Nhe* I (#R3131S, NEB 公司)、*Avr* II (#R0174L, NEB 公司)和 *Afl* II (#R0520S, NEB 公司); Q5[®]高保真 DNA 聚合酶(#M0493L)和 T4 连接酶(#B0202S)均购自 NEB 公司;重组酶购自诺维赞公司(C112-01/02);质粒提取试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司(CW0500S);所用引物合成于 GENEWIZ 公司;所用 V5 (T40006M)、FLAG (M22001M)、HA (M2003M)和 MYC (M2002M)一抗均购自 AbMART 公司;山羊抗小鼠二抗(ZB-5305)购自北京中杉金桥公司;DH5 α 购自生工有限公司(B528413); DNA marker

购自康为世纪生物科技有限公司(DM2000、DM15000)和北京擎科新业生物技术有限公司(1 kb DNA Ladder)。

1.2 质粒载体构建

为了构建 pCLHN-URA 质粒,以质粒 pUG72、pFA6a-MX6 和酵母基因组为模板,利用 Q5 高保真 DNA 聚合酶,分别用引物 UG-F (10 μ mol/L)和 UG-R (10 μ mol/L) (表 1)扩增 pUG72 质粒的 loxP-URA3-loxP 等区域;用引物 FA6A-F (10 μ mol/L)和 FA6A-R (10 μ mol/L) (表 1)扩增质粒 pFA6a 的多酶切位点区域并在引物上添加 *Nhe* I 和 *Avr* II 酶切位点;用引物 ADH1-F (10 μ mol/L)和 ADH1-R (10 μ mol/L) 扩增 *ADH1* 终止序列。同理,为了构建 pCLHN-TRP

表 1. 本文所用到的质粒

Table 1. Plasmids used in this study

Plasmid	Description	Selection marker	Reference
pUG72	Gene deletion	URA3	[16]
pUG76	Gene deletion	TRP1	[16]
pFA6a-MX6	Gene tagging	KAN	[13]
pCLHN-TRP	Gene deletion	TRP1	This study
pCLHN-URA	Gene deletion	URA3	This study
pCLHN-FLAG	Gene tagging	URA3/TRP1	This study
pCLHN-2FLAG	Gene tagging	URA3/TRP1	This study
pCLHN-4FLAG	Gene tagging	URA3/TRP1	This study
pCLHN-8FLAG	Gene tagging	URA3/TRP1	This study
pCLHN-V5	Gene tagging	URA3/TRP1	This study
pCLHN-2V5	Gene tagging	URA3/TRP1	This study
pCLHN-4V5	Gene tagging	URA3/TRP1	This study
pCLHN-8V5	Gene tagging	URA3/TRP1	This study
pCLHN-12V5	Gene tagging	URA3/TRP1	This study
pCLHN-3HA	Gene tagging	URA3/TRP1	This study
pCLHN-6HA	Gene tagging	URA3/TRP1	This study
pCLHN-9HA	Gene tagging	URA3/TRP1	This study
pCLHN-2MYC	Gene tagging	URA3/TRP1	This study
pCLHN-4MYC	Gene tagging	URA3/TRP1	This study
pCLHN-8MYC	Gene tagging	URA3/TRP1	This study
pCLHN-GFP	Gene tagging	URA3/TRP1	This study
pCLHN-mCherry	Gene tagging	URA3/TRP1	This study

质粒, 以质粒 pUG76、pFA6a-MX6 和酵母基因组为模板, 分别用引物 UG-F (10 $\mu\text{mol/L}$)和 UG-R (10 $\mu\text{mol/L}$)扩增 pUG76 的 loxP-TRP1-loxP 等区域(图 1)。引物 FA6A-F (10 $\mu\text{mol/L}$)和 FA6A-R (10 $\mu\text{mol/L}$) (表 1)扩增质粒 pFA6a-MX6 的多酶切位点区域并在引物上添加 *Nhe* I 和 *Avr* II 酶切位点。用引物 ADH1-F (10 $\mu\text{mol/L}$)和 ADH1-R (10 $\mu\text{mol/L}$)扩增 *ADH1* 终止序列。将 DNA 片段重组后转化至 DH5 α 感受态细胞, 筛选出阳性克隆菌, 进行菌落 PCR 验证, 最后测序。

1.3 利用同尾酶技术构建 pCLHN 多重复标签质粒

在成功构建 pCLHN-URA 和 pCLHN-TRP 质粒后, 通过 PCR 技术分别扩增 MYC、HA、V5、FLAG、GFP 和 mCherry 片段, 并整合到 pCLHN-URA 和 pCLHN-TRP 质粒上。由此构建了单蛋白标签质粒 pCLHN-(MYC/HA/V5/FLAG/GFP/mCherry)-URA3/TRP1。在单蛋白标签质粒的基础之上, 通

过(*Nhe* I+*Afl* II)和(*Avr* II+*Afl* II)酶切的方式(其中 *Afl* II 酶切位点也可以用其他位于 *Avr* II 下游的单酶切位点替换)获得目的片段。用 T4 连接酶连接纯化后的目的片段, 构建多标签重复质粒(图 2)。最后将连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞, 并对阳性克隆进行菌落 PCR 验证, 鉴定后送去测序。

以构建 pCLHN-8FLAG 为例, 在构建 pCLHN-4FLAG 质粒之后, 将该质粒分别用(*Nhe* I+*Afl* II)和(*Avr* II+*Afl* II)酶切, 分别获得酶切小片段和大片段。最后用 T4 连接酶将目的片段连接成完整的 pCLHN-8FLAG 质粒。

1.4 菌株的构建

本文使用的是 TN124 背景的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)^[17]。作者挑选了 *ATG1*、*NHX1* 和 *COX4* 作为目标基因, 其中蛋白 Atg1 的表达量约为 1070 molecules/cell, 蛋白大小为 101 kDa; Nhx1 表达量为 521 molecules/cell, 蛋白大小 70.1 kDa; Cox4 表达量为 9410 molecules/cell,

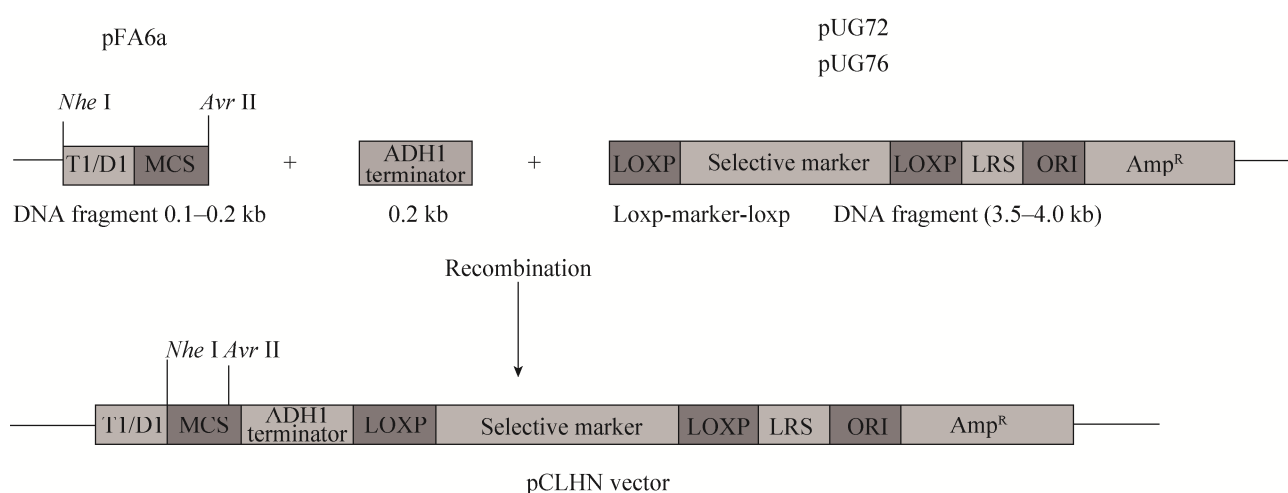


图 1. 构建 pCLHN-URA/TRP 质粒的示意图

Figure 1. Schematic representation of the construction of pCLHN-URA/TRP plasmids. The multiple restriction enzyme site from pFA6a-MX6 plasmid, the loxP system cassette from the pUG plasmid and the terminator of *ADH1* were amplified by PCR using primers FA6A-F/R, UG-F/R and ADH1-F/R, respectively (see Table 1). The target fragments were then recombined to construct pCLHN-URA/TRP plasmids.

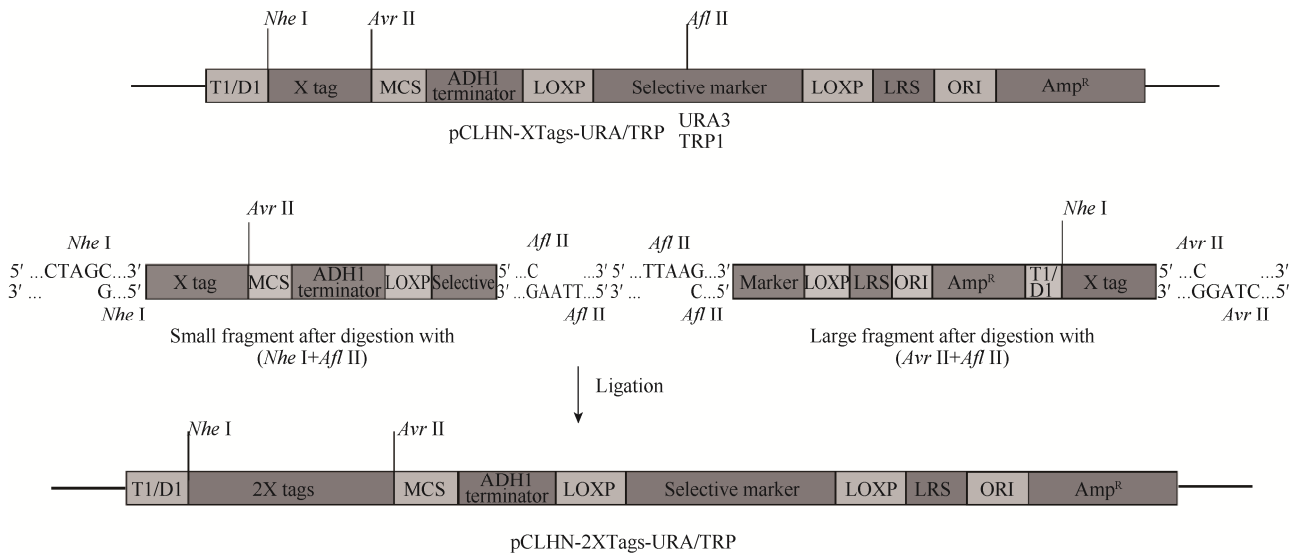


图 2. 构建 pCLHN 系列多重复标签质粒

Figure 2. Construction of pCLHN plasmids with tandem tags. Using the characteristics of isocaudomers *Nhe* I and *Avr* II, plasmids containing tandem tags were constructed by the ligation of two fragments that were produced by the digestion of single-tagged plasmids with (*Nhe* I+*Afl* II) and (*Avr* II+*Afl* II) enzyme pairs.

蛋白大小 17.1 kDa。上述数据来源于 SGD 数据库 (<https://www.yeastgenome.org/>)。以 pCLHN-(XHA、XV5、XMYC、XFLAG、GFP 和 mCherry)-URA 系列标签质粒为模板(表 1)，用引物 ATG1-T1/LRS、COX4-T1/LRS、NHX1-T1/LRS 和 VPS8-T1/LRS (表 2)来扩增目的片段，用于蛋白表位标记。PCR 产物含有两端约 40 bp 目标基因同源序列以及表达筛选标记基因 URA3/TRP1 的基因片段，用于重组插入目的基因的编码框 C 端。目的基因的敲除所需 DNA 片段采用 ATG1-D1 和 ATG1-LRS (表 2)引物获得。将 PCR 产物用 PEG/LiAc 方法转化至酵母中^[18]，获得酵母单克隆菌落。

1.5 敲除菌株的验证

利用验证引物 ATG1(YZ)-F 和 ATG1(YZ)-R (表 2，引物设计为位置分别在 *ATG1* 启动子 5'端上游和下游终止子)，通过酵母菌落 PCR 的方式，验证敲除菌株 YST45 正确性。

1.6 蛋白表位标记的检测

用引物 CLHN-F 和 CLHN-R (表 2)进行菌落 PCR 验证。将验证正确的酵母细胞培养到对数期 ($OD_{600}=1.0$)，取 3OD [$OD=OD_{600}\times$ 体积(mL)]酵母细胞，用 TCA 方法提取酵母蛋白，并进行 BCA 蛋白检测。用 Western blotting 检测 MYC、FLAG、HA 和 V5 标签：5%脱脂奶粉孵育 1 h，之后用 MYC、FLAG、HA 和 V5 一抗(AbMART 公司)(1 : 5000 稀释)孵育 2 h 后洗膜 5 次，1%脱脂奶粉+1 : 10000 的 Anti-mouse 二抗(W402B, Promega 公司)孵育 2 h 后洗膜 5 次，加入底物显色曝光。内参抗体为 GAPDH (M20028, AbMART 公司)。

1.7 ALP (alkaline phosphatase)酶活检测

挑取目的菌株于营养培养基中，将细胞在 YPD 培养基中培养至对数期，然后分别取 3OD 细胞转至氮饥饿培养基(SD-N)中饥饿 4 h，诱导自噬。本文所用到的 *pho8Δ160 pho13Δ* 菌株中，自噬

表 2. 用于质粒构建以及表位标记的引物

Table 2. Primers used in this study

Name	Sequence (5'→3')
UG-F	AGGGATAACAGGGTAATATCTGCAGGTCGACAACCCTTAAT
UG-R	GCCGCGTTCTAACGACAATATGTCCATATGGTGCACTCTC
FA6A-F	TATTGTGCTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCTT
FA6A-R	GCTAGCGATGTTAATTAACCCAGGAATCCCACGACCTGCAGCGTACGAAG
ADH1-F	ATCGCTAGCCCTAGGTGAGGCGGCCACTTCTAAATAAGCGAATTTCTTAT
ADH1-R	GCAGATATTACCCTGTTATCCCTAGCGGATCTGCCGGTAGAG
CLHN-F	TTCCTGGGTTAATTAACATCGCTAGCAGAATTGGCAAGATGCGTC
CLHN-R	TTCTTCAGCAACTTCAAGAGAAAGTGCAACGAAGGAGTCACTTTCC
ATG1-T1	CAGGTTGAAAATATTGAGGCAGAAGATGAACCACCAAAAATGCTTCGTACGCTGCAGGTCG
ATG1-D1	ATGGGAGACATTAATAAATAA AGATCACACA ACCTCTGTGAGCTTCGTACGCTGCAGGTCG
ATG1-LRS	GGTCATTTGTACTTAATAAGAAAACCATATTATGCATCACGCATAGGCCACTAGTGGATC
ATG1(YZ)-F	TTTTACAACA CCAGACGAGAAATTAAGAAA
ATG1(YZ)-R	ACTTGAAAATATAGCAGGTCATTTGTACTT
COX4-T1	CTAAACCCTGTTGGTGTTCCAAATGATGACCACCATCACGCTTCGTACGCTGCAGGTCG
COX4-LRS	AAGTAAAAGAGAAAACAGAAGGGCAACTTGAATGATAAGAGCATAGGCCACTAGTGGATC
VPS8-T1	TGTTTAATTTGCCAGACGGAATCTAACCCAAAAATAGTAGCTTCGTACGCTGCAGGTCG
VPS8-LRS	TTTTATGTAAACCAAAGTTGTATTAAATATTTAGAAAATGGCATAGGCCACTAGTGGATC
NHX1-T1	GCTACGCAATCACCTGCAGATTTCTTCCCAAACCACGCTTCGTACGCTGCAGGTCG
NHX1-LRS	ATTTATATTAGAAACAAGGAAACCATACACTTTAAAGTGCATAGGCCACTAGTGGATC

的诱导水平可以通过检测碱性磷酸酶的活性来定量分析。取 3OD 细胞(OD_{600} 值为 0.6–0.8), 加入裂解液(20 mmol/L PIPES pH 6.8, 50 mmol/L KCl, 100 mmol/L KOAc, 10 mmol/L $MgSO_4$, 10 μ mol/L $ZnSO_4$, 1 mmol/L PMSF, 0.5% Triton X-100) 150 μ L 和玻璃粉 100 μ L 振荡破碎, 离心。取上清 4 μ L, 加入裂解液和含有 ρ -对硝基苯磷酸二钠盐(ρ -nitrophenylphosphate, 1.3 mmol/L)底物的反应液(250 mmol/L Tris-HCl pH 8.5, 10 mmol/L $MgSO_4$, 10 μ mol/L $ZnSO_4$, 0.4% Triton X-100) 80 μ L 来检测酶的活性, 30 °C 反应 20–40 min 后加入终止液(1 mol/L glycine, pH 11.0) 100 μ L 来终止反应, 测量 400 nm 光吸收。

自噬水平按公式(1)计算。

$$\text{自噬活性} = \frac{(OD_{\text{样品}} - OD_{\text{碱性磷酸酶空白对照}} - OD_{\text{底物空白对照}})}{(\text{反应时间} \times \text{蛋白浓度})} \quad \text{公式(1)}$$

其中 $OD_{\text{样品}}$ 指所检测的细胞样品值; $OD_{\text{碱性磷酸酶空白对照}}$ 为用水代替样品加入到反应液中的空白对照组所检测的值; $OD_{\text{底物空白对照}}$ 是指反应液中不加入 ρ -对硝基苯磷酸二钠盐底物所检测的值。

相对自噬水平按照公式(2)计算。

$$\text{相对自噬水平}(X) = \frac{[\text{自噬活性}(X, 4 \text{ h}) - \text{自噬活性}(X, 0 \text{ h})]}{[\text{自噬活性}(WT, 4 \text{ h}) - \text{自噬活性}(WT, 0 \text{ h})]} \times 100\% \quad \text{公式(2)}$$

其中, X 代表不同的基因型。

1.8 显微镜观察

取 OD_{600} 值为 0.6–0.9 的对数生长期酵母细胞 1 OD 置于 EP 管中。取 200 μ L 细胞液滴于涂有 Concanavalin A (刀豆蛋白 A) 的载玻片上, 静置 2 min, 盖上盖玻片, 置于 IX83 荧光倒置显微镜(奥林巴斯)下, 观察细胞中荧光蛋白的分布情况。最

后通过 ImageJ 软件分析目的蛋白在细胞当中的定位。

2 结果和分析

2.1 CLHN-(V5、FLAG、HA、MYC、GFP 和 mCherry)单标签质粒构建

为了构建在酵母系统中应用的多重复标签质粒,我们首先构建了单标签质粒。pCLHN-URA 和 pCLHN-TRP 质粒(图 1)是本套质粒的骨架质粒。其设计初衷主要在 3 个方面:(1)方便筛选标记在酵母系统当中的重复使用;(2)表位标记与敲除引物设计的通用性(图 3);(3)利用同尾酶快速和简便地构建多重复标签质粒。

在酵母系统当中,pFA6a 系列具有良好的 C 端表位标记能力,而 pUG 系列拥有 loxP 系统的筛选标记回复能力,故分别挑选了 pFA6a 的多酶切位点序列(加入了 *Nhe* I 和 *Avr* II 酶切位点)、pUG 系列的 loxP 系统序列和 *ADHI* 终止子序列,构建了 pCLHN-URA 和 pCLHN-TRP 质粒(图 1)。

在获得 CLHN-URA 和 CLHN-TRP 质粒基础之上,通过以 PCR 扩增不同蛋白标签(MYC、

FLAG、HA、V5、GFP 和 mCherry),通过重组方式,构建了一系列的单标签蛋白质粒(表 1)。

2.2 多标签质粒的构建

在成功构建的单标签质粒基础之上,利用 pCLHN 系列质粒具有 *Nhe* I 和 *Avr* II 同尾酶特点,将单标签质粒分别利用(*Nhe* I+*Afl* II)和(*Avr* II+*Afl* II)酶切获得各自带有一段标签序列的载体和插入片段,最后通过 T4 连接酶连接方式构建标签加倍的质粒。以构建 pCLHN-8FLAG-URA 质粒为例(图 2),我们将构建好的 pCLHN-4FLAG-URA 质粒分别用(*Nhe* I+*Afl* II)和(*Avr* II+*Afl* II)酶切,分别得到各自含有 4FLAG 的小片段和载体,最后利用 T4 连接酶将目的片段连接成完整的 pCLHN-8FLAG 质粒(图 4)。其他多重复标签质粒的构建也是按照此方式。

2.3 敲除菌株的验证

作为应用实例,我们利用本文所构建的系列质粒对 *ATG1*^[19-20]进行了基因敲除和 C 端表位标记。在基因敲除实验中,我们采用引物 ATG1(YZ)-F 和 ATG1(YZ)-R (表 2)验证转化株 YST45 (图 5)。结果显示 YST45 菌落经 PCR 成功扩增出目的 DNA

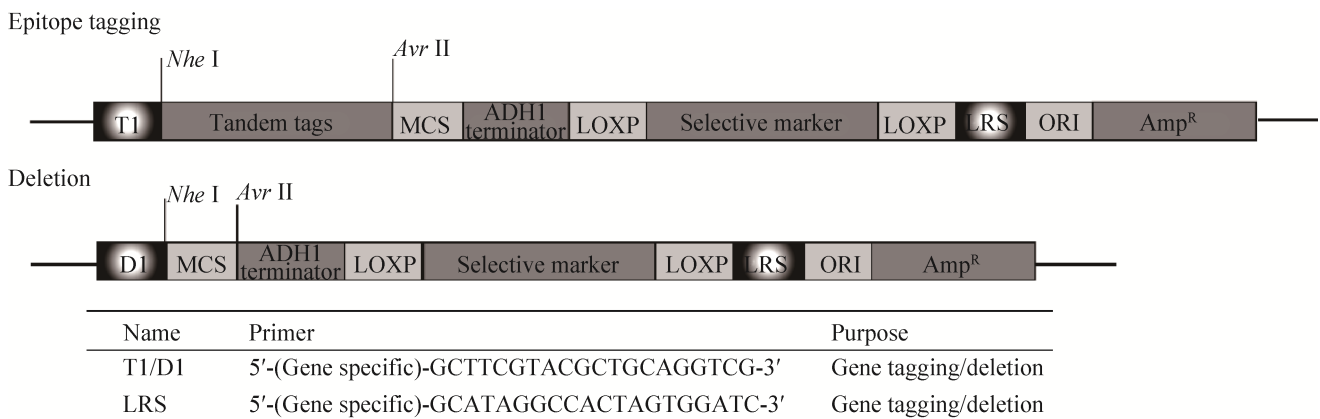


图 3. pCLHN 系列质粒中的通用引物设计

Figure 3. Universal primer design in pCLHN plasmids. The illustration shows the T1(D1)/LRS sites on the plasmid, which allows universal design of gene knockout and epitope tagging primers.

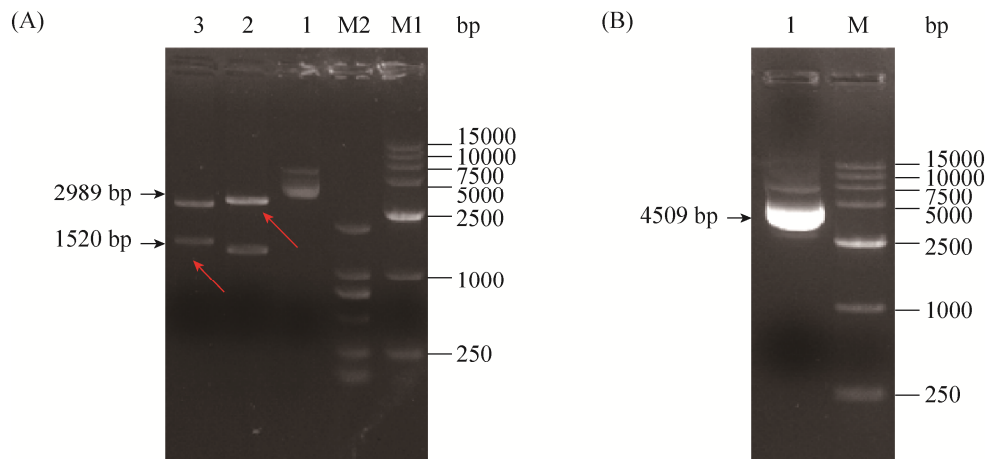


图 4. 8FLAG 多标签质粒的构建

Figure 4. Construction of the plasmid containing 8 FLAG tags. A: M1, DNA marker (DM15000); M2, DNA marker (DM2000); lane 1 is the CLHN-4FLAG-URA plasmid; lane 2 is the CLHN-4FLAG-URA plasmid digested with *Avr* II and *Afl* II; lane 3 is the same plasmid digested with *Nhe* I and *Afl* II. B: M, DNA marker (DM15000); lane 1 is the resulting CLHN-8FLAG-URA plasmid, constructed using T4 ligase.

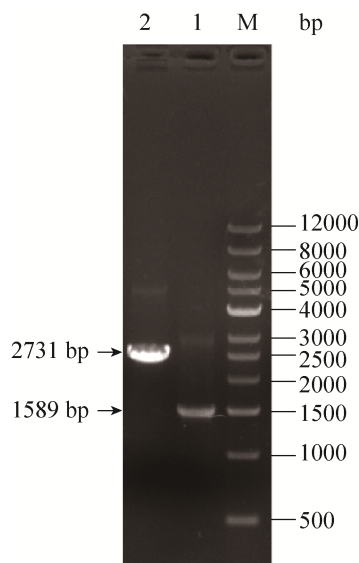


图 5. *ATG1* 敲除菌株的 PCR 验证

Figure 5. Validation of *ATG1* knockout strain by PCR. M: DNA marker (1 kb DNA Ladder); lane 1: YST45 strain (*atg1*Δ); lane 2: TN124 strain (control).

条带,相应的对照组(*ATG1* 基因没有敲除的 YST40) PCR 条带大小与预期一致,说明 YST45 中 *ATG1* 基因被有效地敲除。

2.4 经不同重复度表位标记后的目标蛋白表达检测

对于表位标记实验,在 PCR 验证多标签序列成功整合到 *ATG1* 的 C 端基础上,我们采用蛋白免疫印记检测表位标记效果。结果显示,信号水平随标签重复度增加而增强(图 6)。

2.5 经不同重复度表位标记后的目标蛋白功能检测

为了验证不同长度表位标记对于目的蛋白的功能影响,我们通过 *pho8Δ60* 实验来检测融合不同长度标签 *Atg1* 蛋白的自噬水平。该方法通过碱性磷酸酶(ALP)活性指示自噬水平。结果显示,同一种类表位标记,数量越多,其对目的基因功能影响越大,而不同种类表位标记,其对于目的蛋白的功能影响水平是不同的(图 7)。

2.6 不同表达量目标蛋白的同时检测

此外,我们以低表达的 *NHX1* 和高表达的 *COX4* 基因为例尝试同时检测表达差异较大的靶标。*Nhx1* 表达量约为 521 molecules/cell,分子量

70.1 kDa; Cox4 表达量约为 9410 mol/cell, 分子量 17.1 kDa。二者表达量差异接近一个数量级。结果显示, 通过融合不同重复数量的 V5 标签, 可

以做到让低水平表达的 Nhx1-4V5 蛋白能够被有效检测, 而高水平表达的 Cox4-1V5 蛋白信号又不至于过饱和(图 8)。

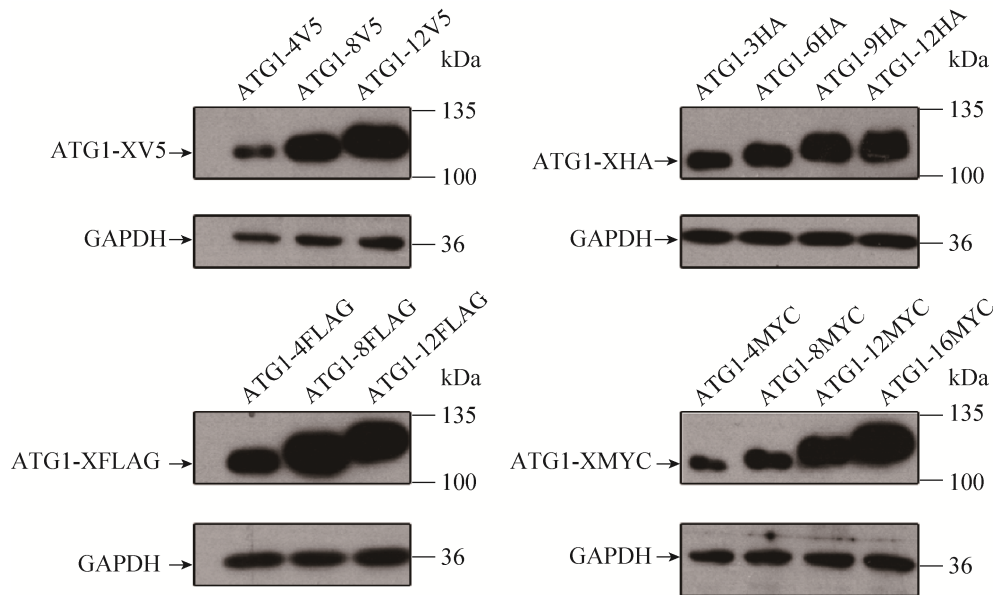


图 6. Atg1 表位标记融合蛋白的免疫检测

Figure 6. Detection of Atg1 protein with different tandem tags. Yeast cells expressing Atg1 with different tandem tags were grown to mid-log phase in YPD, and then collected for protein extraction. For each sample, 5 μ g of total protein was loaded and analyzed by Western blotting with antibodies against HA, V5, MYC, FLAG and GAPDH.

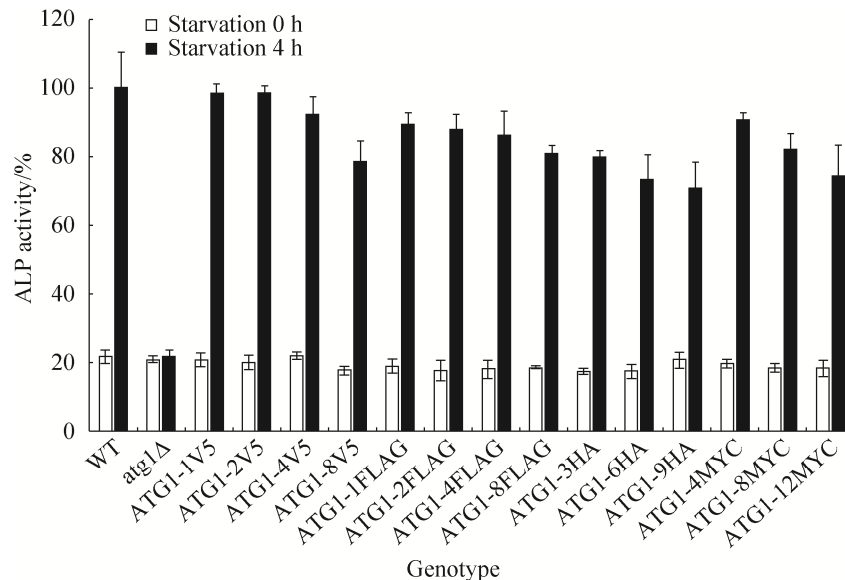


图 7. Atg1 蛋白表位标记菌株的自噬水平

Figure 7. Levels of autophagy in strains expressing tagged Atg1 proteins. The indicated strains were grown to mid-log phase in YPD, and then shifted to nitrogen starvation medium (SD-N) for 4 hours. The levels of autophagy were measured by the pho8 Δ 60 assay. Error bar=standard deviation, $n=3$.

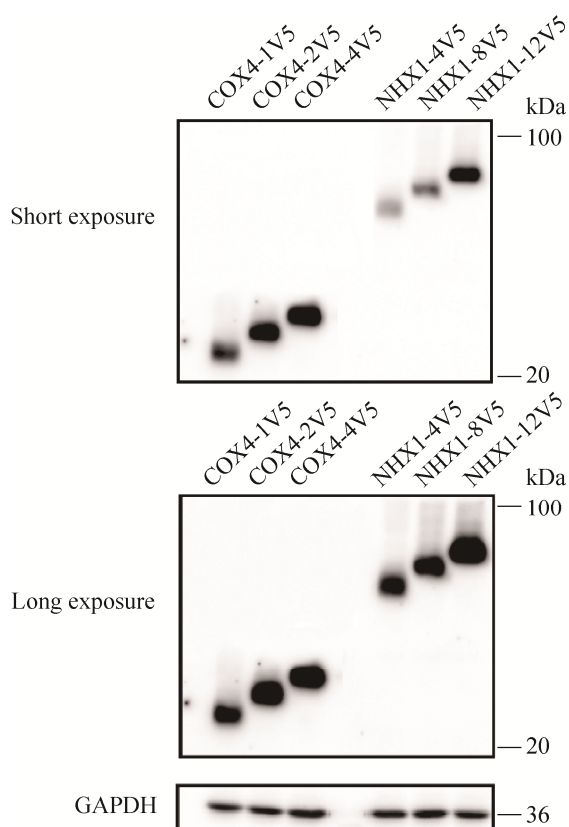


图 8. Nhx1 和 Cox4 表位标记融合蛋白的免疫检测
 Figure 8. Detection of Nhx1 and Cox4 protein with V5 tags. Yeast cells expressing Atg1 with different tandem tags were grown to mid-log phase in YPD, and then collected for protein extraction. For each sample, 5 μ g of total protein was loaded and analyzed by Western blotting with antibodies against V5 and GAPDH.

2.7 目标蛋白荧光蛋白标记的显微镜观察

我们挑选了 Cox4、Nhx1 和 Vps8 作为目标蛋白, 以质粒 pCLHN-GFP 和 pCLHN-mCherry 为模板, 通过 PCR 的方式扩增荧光蛋白 GFP 和 mCherry 片段, 并整合到目的蛋白的 C 端。显微镜结果显示, 目的蛋白能够被有效标记, 荧光信号指示了被标记的蛋白在细胞中的定位情况(图 9)。

3 讨论

通过连接 HA、FLAG 等表位标记标签, 人们无需为每个蛋白制备专用的抗体即可方便地采用免疫共沉淀、免疫电镜、ELISA 等手段研究蛋白表达和功能。由于细胞中不同蛋白的表达水平跨度很大, 为了在同一个实验中更好地检测不同表达水平的目的蛋白, 需要使用不同重复度的标签质粒调整每个蛋白的信号水平: 表达水平低的蛋白, 需要多重度的蛋白标签使其易于检测; 而表达水平高的蛋白, 需要低重复度的蛋白标签避免信号过饱和。本套质粒中的标签重复个数跨度大, 同时基本设计便于继续扩展, 可以满足检测不同表达水平蛋白的需求。

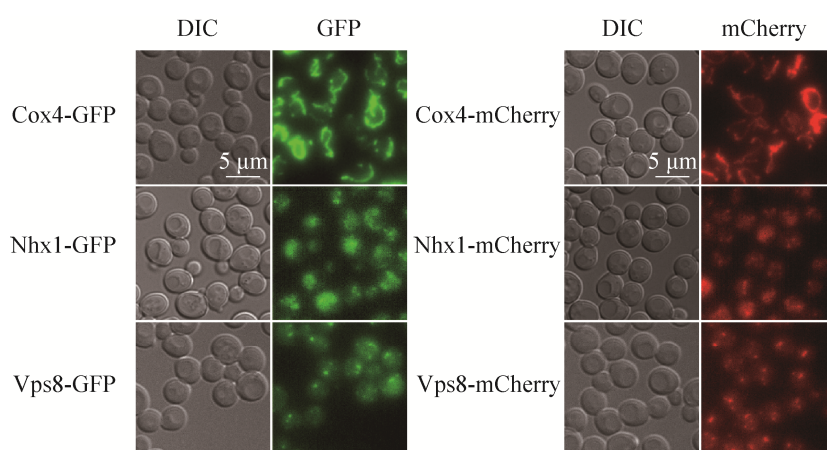


图 9. 荧光蛋白标记的 Cox4、Nhx1 和 Vps8

Figure 9. Localization of Cox4, Nhx1 and Vps8 tagged with different fluorescent proteins in yeast cells. Yeast cells expressing the indicated fusion proteins were grown to mid-log phase in YPD, and then collected for fluorescent microscope. Scale bar=5 μ m.

此外, 本套质粒还可作为其他系列化功能标签质粒构建的基础, 例如单个或串联荧光蛋白标签。荧光蛋白不仅可以用于蛋白表达检测, 而且可以用来研究目的蛋白在活细胞中的定位和蛋白相互作用^[21-23]。

参考文献

- [1] Tong AHY, Evangelista M, Parsons AB, Xu H, Bader GD, Pagé N, Robinson M, Raghizadeh S, Hogue CWV, Bussey H, Andrews B, Tyers M, Boone C. Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science*, 2001, 294(5550): 2364–2368.
- [2] Winzeler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson K, Andre B, Bangham R, Benito R, Boeke JD, Bussey H, Chu AM, Connelly C, Davis K, Dietrich F, Dow SW, El Bakkoury M, Foury F, Friend SH, Gentalen E, Giaever G, Hegemann JH, Jones T, Laub M, Liao H, Liebundguth N, Lockhart DJ, Lucau-Danila A, Lussier M, M'Rabet N, Menard P, Mittmann M, Pai C, Rebischung C, Revuelta JL, Riles L, Roberts CJ, Ross-MacDonald P, Scherens B, Snyder M, Sookhai-Mahadeo S, Storms RK, Véronneau S, Voet M, Volckaert G, Ward TR, Wysocki R, Yen GS, Yu K, Zimmermann K, Philippsen P, Johnston M, Davis RW. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, 1999, 285(5429): 901–906.
- [3] Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology*, 1998, 16(9): 373–378.
- [4] Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG. Life with 6000 genes. *Science*, 1996, 274(5287): 546–567.
- [5] Baudin A, Ozier-Kalogeropoulos O, Denouel A, Lacroute F, Cullin C. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(14): 3329–3330.
- [6] Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, Boeke JD. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, 1998, 14(2): 115–132.
- [7] Goldstein AL, McCusker JH. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1999, 15(14): 1541–1553.
- [8] Schneider BL, Seufert W, Steiner B, Yang QH, Futcher AB. Use of polymerase chain reaction epitope tagging for protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1995, 11(13): 1265–1274.
- [9] Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, 2003, 425(6959): 737–741.
- [10] Lichty JJ, Malecki JL, Agnew HD, Michelson-Horowitz DJ, Tan S. Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expression and Purification*, 2005, 41(1): 98–105.
- [11] Noguchi C, Garabedian MV, Malik M, Noguchi E. A vector system for genomic FLAG epitope-tagging in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biotechnology Journal*, 2008, 3(9/10): 1280–1285.
- [12] Sato M, Dhut S, Toda T. New drug-resistant cassettes for gene disruption and epitope tagging in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, 2005, 22(7): 583–591.
- [13] Gadaleta MC, Iwasaki O, Noguchi C, Noma KI, Noguchi E. New vectors for epitope tagging and gene disruption in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biotechniques*, 2013, 55(5): 257–263.
- [14] Bähler J, Wu JQ, Longtine M S, Shah NG, Mckenzie III A, Steever AB, Wach A, Philippsen P, Pringle JR. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, 1998, 14(10): 943–951.
- [15] Güldener U, Heck S, Fiedler T, Beinhauer J, Hegemann JH. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Research*, 1996, 24(13): 2519–2524.
- [16] Güldener U, Heinisch J, Koehler GJ, Voss D, Hegemann JH. A second set of *loxP* marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(6): e23.
- [17] Noda T, Matsuura A, Wada Y, Ohsumi Y. Novel system for monitoring autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1995, 210(1): 126–132. 20.
- [18] Hu YJ, Gao F, Zhu CB, Zhu BQ. A modified method for yeast transformation with PEG/LiAc. *Biotechnology*, 1998, 8(5): 22–26. (in Chinese)

- 胡又佳, 高枫, 朱春宝, 朱宝泉. PEG/LiAc转化酵母细胞方法的改进. *生物技术*, 1998, 8(5): 22–26.
- [19] Chan EY, Tooze SA. Evolution of Atg1 function and regulation. *Autophagy*, 2009, 5(6): 758–765.
- [20] Chang YY, Neufeld TP. An Atg1/Atg13 complex with multiple roles in TOR-mediated autophagy regulation. *Molecular Biology of the Cell*, 2009, 20(7): 2004–2014.
- [21] Laird DW, Jordan K, Thomas T, Qin H, Fistouris P, Shao Q. Comparative analysis and application of fluorescent protein-tagged connexins. *Microscopy Research & Technique*, 2001, 52(3): 263–272.
- [22] Müller-Taubenberger A. Application of fluorescent protein tags as reporters in live-cell imaging studies. *Methods in Molecular Biology*, 2006, 346: 229–246.
- [23] Dash AK, Yende AS, Tyagi R K. Novel application of red fluorescent protein (DsRed-Express) for the study of functional dynamics of nuclear receptors. *Journal of Fluorescence*, 2017, 27(4): 1225–1231.

Construction of a novel plasmid system for epitope tagging and gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*

Shiwei Tang, Hui Li, Siwon Choi, Zhengtan Zhang, Zhiping Xie*

School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Objective] For yeast gene functional studies, we constructed a plasmid set combining the advantages of pUG and pFA6a plasmid series, and allowing convenient insertion of tandem epitope tags using isocaudomers. [Methods] We cloned the loxP locus of pUG plasmids, the multiple restriction site of pFA6a plasmids and *ADHI* terminator cassette by PCR. Through homologous recombination of the DNA fragments, we obtained plasmid pCLHN-TRP and pCLHN-URA. Using introduced isocaudomer sites, we then constructed additional tagging plasmids containing either single or multiple tandem copies of various epitope tags. Finally, we tested the performance of our plasmids using *ATG1*, *COX4* and *NHX1* as target genes. [Results] We constructed two plasmids for gene deletion purposes, and seventeen plasmids for epitope tagging purposes (covering 1-8 FLAG, 1-12 V5, 3-9 HA, 2-8 MYC, GFP and mCherry). Testing on selected target genes demonstrated the usability of these plasmids. In particular, by combining different copy numbers of tandem epitopes, it was feasible to properly detect proteins with drastically different expression levels on the same blot without saturating the signal of high expression targets. [Conclusion] The pCLHN plasmids constitute a beneficial complement to existing yeast plasmid tools.

Keywords: yeast cells, gene deletion, epitope tagging, isocaudomer, expression level

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Shanghai Municipal Education Commission (2017-01-07-00-02-E00035)

*Corresponding author. Tel: +86-21-34204090; E-mail: zxie@sjtu.edu.cn

Received: 15 September 2018; Revised: 14 November 2018; Published online: 25 December 2018