



酿酒酵母荧光定位报告菌株的开发

杨丽娟², 赖芬菊², 谢宁清², 戴益民^{1*}

¹江西农业大学动物科学技术学院, 江西 南昌 330045

²江西农业大学生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045

摘要:【目的】为了给外源蛋白在酿酒酵母细胞中的定位提供参考, 构建酿酒酵母荧光定位报告菌株。

【方法】运用染色体同源重组的方法, 将突变的、已进行酵母表达优化的红色荧光蛋白 RedStar 分别整合到 12 个酵母细胞器标记蛋白的 C 端, 与之进行融合表达, 用特异性引物对每一个酵母荧光定位报告菌株进行 PCR 扩增和测序验证, 用激光共聚焦显微镜进行荧光检测, 对线粒体和细胞核进行特异性染料染色, 用 EGFP 标记沙门氏菌已知定位蛋白 SipA, 与构建的相应荧光定位报告菌株进行共定位。

【结果】构建的酿酒酵母荧光定位报告菌株可分别标示酵母细胞的肌动蛋白、晚期胞内体、细胞核、核周质、纺锤体、线粒体、过氧化物酶体、脂滴、初级内吞体、次级内吞体、高尔基体顺面及高尔基体反面。PCR 扩增及测序验证、荧光检测、染料与相应报告菌株的共定位、已知定位蛋白 SipA 与相应报告菌株的共定位均提示报告菌株构建成功。【结论】这些报告菌株的构建, 为日后在酵母中观察细胞器动态变化, 以及未知蛋白在酵母中的定位提供了基础性工具。

关键词: 蛋白定位, RedStar, 酵母报告菌株, 共定位

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是第一个完成基因组测序的单细胞真核生物, 遗传背景非常清楚^[1-3]。酿酒酵母基因组数据库(*Saccharomyces Genome Database, SGD*)含有酵母基因组的详细注释, 是研究真核细胞遗传学和生理学的重要工具。酿酒酵母具有生长迅速、易于遗传操作、含有稳

定的单倍体和二倍体、易于突变、高效转化和同源重组率高等特点。酿酒酵母的基因结构、转录及转录后加工、翻译及修饰、细胞周期调控、细胞信号传导、环境胁迫反应、能量代谢等生物学进程, 都比其他高等真核生物保守^[4-5]。因此, 酿酒酵母是研究真核生物细胞生化活动进程的经典

基金项目: 国家自然科学基金(31360617, 31802213); 江西省自然科学基金(20161BAB204183); 大学生创新创业训练计划(201810410018)

*通信作者。Tel: +86-791-83813503; E-mail: daiym1125@jxau.edu.cn

收稿日期: 2019-06-19; 修回日期: 2019-08-04; 网络出版日期: 2019-12-05

模式生物, 在人类癌症、衰老、凋亡、抗癌药物、抗菌药物、抗衰老药物的研发中都有广泛的应用。

酿酒酵母细胞内具有复杂的膜相结构, 可将细胞区分为不同的隔室, 执行特定的生物学功能, 从而对细胞内各种途径进行严格的时空调控。解析外源目的基因在酿酒酵母中的定位、互作蛋白、靶标及生物学功能是一种常用的研究方法^[6-8]。蛋白质必须到达特定的部位才能发挥其生物学功能, 因此确定目的蛋白在细胞中的定位, 对于揭示其功能、互作蛋白和解析其参与的生物学过程至关重要。

蛋白胞内定位研究的首要任务是给目的蛋白标记上一个便于检测的信号。目前, 通过 3 种不同的标记方法: 免疫荧光标记、小分子有机染料染色或荧光蛋白对目的蛋白进行标记。免疫荧光标记是将已知的抗原或抗体标记上荧光素, 制成荧光标记物, 再用荧光抗体作为分子探针检查酵母细胞内的目的蛋白, 其局限在于它的作用对象只能是已经被固定的死细胞。小分子有机染料可以发出荧光, 并且能与特定蛋白质或某种细胞器结合, 进行活细胞特异性荧光染色。比较常用的如 DAPI (4,6-二脒基-2-苯基吡啶) 可以标记 DNA, Mito traker 标记线粒体。利用荧光蛋白能稳定遗传且根据启动子特异性地表达这一优点, 选择荧光蛋白对目的蛋白进行标记, 通常是将目标蛋白和

荧光蛋白(绿色荧光蛋白 GFP 及其衍生物、红色荧光蛋白 RFP 及其衍生物)标签融合^[9-12], 然后与各酵母荧光定位报告菌株进行共定位来间接确定目的蛋白的定位。因此, 构建酿酒酵母定位报告菌株是进行外源蛋白定位的前提条件。

本试验利用染色体同源重组的方法, 构建了 12 个组成型表达突变红色荧光 RedStar 的酵母细胞器荧光定位报告菌株^[9], 用特异性引物 PCR 扩增并测序进行逐一验证, 并用激光共聚焦显微镜进行了各亚细胞器形态特征检测。另外, 还对线粒体和细胞核进行了特异性染料染色, 用 EGFP 标记沙门氏菌已知定位蛋白 SipA, 与相应报告定位菌株进行共定位, 进一步证明了这些报告菌株构建成功, 为日后在酵母中观察亚细胞水平细胞器动态变化, 以及未知目标蛋白在酵母中的定位提供了基础性工具。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

本实验所用菌株和质粒见表 1。

1.2 试剂

PrimeSTAR[®] HS DNA 聚合酶、dNTP、限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、*Xho* I、T4 DNA 连接酶、DNA 分子量标准 DL5000 均购自 TaKaRa

表 1. 本研究所用菌株及质粒

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strains/Plasmids	Genotype/ Description	Source
W303-1A	<i>MATa</i> ade2-1 ura3-1 his3-11, 15 trp1-1 leu2-3, 112 can1-100	Lab stock
<i>Salmonella enterica</i>	subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Agona</i> str. SL483	Gift from Dr. Jinghua Zhang, School of Animal Science and Technology
DH5 α	F ⁻ Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK ⁻ , mK ⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1	Lab stock
pYM38	RedStar, kanMX4	Clontech
pEGFP	CMV, neomycin, kanamycin, EGFP	Clontech
pYES2-NTA	2 μ origin, GAL1 promoter, URA3, ampicillin	Invitrogen

公司; 质粒 DNA 小提试剂盒、胶回收试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司; Yeast DNA Kit 购于广州飞扬生物工程有限公司; 遗传霉素 G418 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 抗荧光淬灭 PVP 封片液购于碧云天生物技术; DAPI (4',6-

Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate)、Mito Tracker™ Green FM 购于赛默飞世尔科技有限公司。

1.3 酿酒酵母荧光标记同源重组引物的设计

本实验的 12 个细胞器荧光定位报告菌株引物见表 2。参照 Janke 等^[13]方法, 以带有标记基因

表 2. 本研究所用引物
Table 2. Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')		
Sac6-F	GATTAATTACTTTTATCGCTTCGTTAATGACTTTGAACAAACGTACGCTGCAGGTC		
Sac6-R	AAAGCTGAGTAGAAAACAGGTTACGAAAGTTGTTTGTGGCTCAATCGATGAATTCGAG		
Cop1-F	TTTCTAAGATCGGTGCACCTGCATCCGGATTAAGAATACGTGTACGTACGCTGCAGGTC		
Cop1-R	GCAGAATACAATCCCGAGAAAATCAATAGGCAAAAATAGCATTTAATCGATGAATTCGAG		
Snf7-F	AAGATGAAAAAGCATTAAAGAGAACTACAAGCAGAAATGGGGCTTCGTACGCTGCAGGTC		
Snf7-R	CACCTTTTTTTTTCTTTCATCTAAACCGCATAGAACACGTTCAATCGATGAATTCGAG		
Sec13-F	AAAATCTTGAGGGTAAATGGGAACCCGCTGGTGAAGTTCATCAGCGTACGCTGCAGGTC		
Sec13-R	TTTTCTTTTGAGATGTTTCATTTTAAATTCTTGATACTCTTCAATCGATGAATTCGAG		
Anp1-F	AACATCTAAAGAAGTTCCATTAGACTTCGACCCTGATAGAAACCGTACGCTGCAGGTC		
Anp1-R	ATGAATTCGTAATTCATATGTAGGTCATAAAAAACCGAGCCTAATCGATGAATTCGAG		
Chc1-F	TGATGCTGATGAACAGCGCGATGAACGTTCAACCCACAGGATTTTCGTACGCTGCAGGTC		
Chc1-R	TACACGATGGGGTACAGCAAACGAATTATTTTATCCACGTCTTAATCGATGAATTCGAG		
Erg6-F	AAAACGCCGAAACCCCTCCCAAACCTCCCAAGAAGCAACTCAACGTACGCTGCAGGTC		
Erg6-R	TATATCGTGCCTTTATTTGAATCTTATTGATCTAGTGAATTTAATCGATGAATTCGAG		
Sik1-F	AAGATAAAAAGGAAAAGAAGGATAAAAAGAAGAAAAGTAAGGATCGTACGCTGCAGGTC		
Sik1-R	CAAAAAGATGGGATATACTTTATTTTCGATTCATTGTTCTTTTAAATCGATGAATTCGAG		
Nic96-F	CAAGGAAACGTACAGCACTTTAATTAATATAGACGTCTCTACGTACGCTGCAGGTC		
Nic96-R	GATATATAGATATAAAACAAAAATATACAATATTTAAAAAAATCAATCGATGAATTCGAG		
Pex3-F	TATACAGCAACTTTGGCGTCTCCAGCTCGTTTTCTTCAAGCCTCGTACGCTGCAGGTC		
Pex3-R	ATATATATATTCTGGTGTGAGTGTGACTTATTTCAGAGATTAATCGATGAATTCGAG		
Spc42-F	ATAATATGTCAGAAACATTTCGCAACTCCCACTCCCAATAATCGACGTACGCTGCAGGTC		
Spc42-R	CTTTAAGAATGCGCCATACTCTTAACTGCTTTTTTAAATCATCAATCGATGAATTCGAG		
Cox4-F	ACAACTAAACCCTGTTGGTGTTCAAATGATGACCACCATCACCGTACGCTGCAGGTC		
Cox4-R	AAAAGTAAAAGAGAAACAGAAGGGCAACTTGAATGATAAGATTAATCGATGAATTCGAG		
EGFP-F	CCG <u>GAATTC</u> TGGCAGGTGCTGGTGTGCTGGAGCAATCCTGGTGTGAGCAAGGGCGA AGAGAGAGAIL*(<i>EcoR</i> I)		
EGFP-R	CCG <u>CTCGAG</u> CTTACTTGTACAGCTCGTC(<i>Xho</i> I)		
SipA-F	AAGGTACCTAGGATCCAGGTTACAAGTGTAAGGACT(<i>Bam</i> H I)		
SipA-R	AGCACCTGCCAGAATTCACGCTGCATGTGCAAGCC(<i>Eco</i> R I)		
D-Sac6-F	ACGTCGGTTGGTTG	D-Cop1-F	ATCTGCAGAAGTCAGGT
D-Snf7-F	ATGTGGTCATCACTT	D-Sec13-F	CACGTTGACTGGCCA
D-Anp1-F	AATCAGAAGGGGGTC	D-Chc1-F	AAGTTTCTAACTTAGAAAT
D-Erg6-F	AGCAAGAGAGATTGC	D-Sik1-F	ATGGCTCCTATTGAATACC
D-Nic96-F	AGTCGGGAAACAGTACCT	D-Pex3-F	ATCGTGGTGGAGCG
D-Spc42-F	CCTACAGATAAAAATAAGCG	D-Cox4-F	ATGCTTCACTACGT
D-R	ATCGATGAATTCGAG		

*The coding region of the EGFP was cloned into the multiple cloning site of pYES2-NTA plasmid preceded by a spacer sequence that codes for the peptide 'AGAGAGAGAIL'. This spacer peptide can facilitate the correct folding of the fluorescent proteins when coupled to the protein of interest. The restriction endonuclease sites are underlined.

(荧光标记: RedStar; 抗生素标记: kanMX4)的质粒 pYM38 为 PCR 模板,设计与特定细胞器定位基因终止密码子上下游含有同源臂标记基因扩增引物。设计原则为上游引物 5'带有目的基因终止密码子 TGA、TAA 或 TAG (不含终止密码子)上游同源序列(44 bp), 3'端为质粒 pYM38 上 RedStar 和 kanMX4 模块上游的部分序列(15 bp); 下游引物 5'端由目的基因终止密码子开始向后 45 bp 的反向互补序列(含终止密码子), 3'端与模板 pYM38 上 RedStar 和 kanMX4 模块下游的部分序列反向互补(15 bp)。上下游 5'端 44 bp 用于与特定基因编码框进行同源重组, 3'端 15 bp 序列用于扩增 RedStar 和 kanMX4 模块。

1.4 含同源臂的 RedStar 和 kanMX4 模块的扩增

以质粒 pYM38 为模板(0.1 ng),用细胞器荧光标记引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行分离, EB 染色, 凝胶成像仪进行检测。

1.5 酿酒酵母细胞的转化

采用醋酸锂化学转化方法转化质粒或 PCR 产物至酵母细胞中。接种新鲜 W303-1A 酵母单菌落到 3 mL YPD 培养基中, 220 r/min、30 °C 过夜培养。用新鲜培养基稀释至 5×10^6 细胞/mL ($OD_{600} \approx 0.5$), 摇床培养 3–4 h, 5000 r/min 离心 2 min 收集细胞, 无菌 ddH₂O 洗涤, 离心重复洗涤 1 次; 然后分装大约 10^8 个细胞进行一个转化, 离心弃上清后加入 200 μ L 0.1 mol/L 的醋酸锂重悬细胞, 30 °C 水浴 15 min; 5000 r/min 离心 2 min, 弃上清, 加入 240 μ L 50% PEG3350 (W/V) 涡旋混匀后, 加入 110 μ L 转化混合物(36 μ L 1 mol/mL 醋酸锂; 24 μ L 10 \times TE, pH=7.5; 5 μ L 10 mg/mL ssDNA; 5 μ L PCR 产物或 100 ng 质粒 DNA; 用无菌 ddH₂O 补齐至 110 μ L)

重悬细胞沉淀; 30 °C 温浴 30 min; 加入 40 μ L DMSO, 充分混匀后 42 °C 热激 20 min。12000 r/min 离心 30 s, 移去上清, 加入 100–200 μ L 无菌 ddH₂O 重悬细胞, 涂布在含 200 mg/L G418 的 YPD 平板上, 待菌落长出后挑取单克隆, 划线在新的含有 200 mg/L G418 的 YPD 平板上, 接种单菌落进行 PCR 鉴定。

1.6 酿酒酵母定位菌株的 PCR 验证

使用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计定位菌株 PCR 验证引物。原则为上游引物位于定位基因的编码框中, 下游引物位于质粒 pYM38 的 RedStar 和 kanMX4 模块中(共用), 引物长度为 15–20 bp。提取 G418 平板上筛选得到的阳性克隆基因组 DNA, 以基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增, PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行分离, EB 染色, 凝胶成像仪检测。扩增产物符合预设的菌株可用作下一步荧光观察。

1.7 酿酒酵母定位菌株的荧光显微镜观察确认

取适量对数生长期的酵母细胞(不多于 10^7 细胞/mL), 用 500 μ L 无菌 ddH₂O 重悬洗涤, 离心 10000 r/min 10 s, 再用 1 mL PBS 洗涤 2 次, 离心, 去上清后加入 1 mL 70% 乙醇室温固定 20 min, 离心 12000 r/min 20 s, 去上清, 用 1 mL PBS 洗涤 2 次, 重悬于 100 μ L PBS 中。取 10 μ L 细胞悬液滴加到载玻片, 加入 5 μ L 抗荧光淬灭剂, 用微量移液器吹打均匀, 盖上盖玻片, 晾干后使用激光共聚焦显微镜, 通过油镜(放大倍数 $\times 100$ 倍)观察其荧光定位情况并拍照记录。

1.8 酿酒酵母的活细胞染色

运用荧光染料 DAPI 标记酵母细胞核, 用线粒体绿色荧光探针 Mito tracker Green 标记酵母线粒体, 然后在激光共聚焦显微镜下观察相应酵母

定位菌株与荧光染料的共定位情况。细胞收集和处理步骤与 1.7 相同, 在重悬于 100 μ L PBS 后, 加入 1 mg/ μ L DAPI 或 1 mg/ μ L Mito tracker Green, 室温暗处孵育 15 min, 离心去上清后用 1 mL PBS 洗涤 3 次, 余 50 μ L PBS 重悬细胞, 取 10 μ L 细胞悬液滴加到载玻片, 加入 5 μ L 抗荧光淬灭剂用微量移液器吹打均匀, 盖上盖玻片, 稍微静置晾干后使用激光共聚焦显微镜, 通过油镜(放大倍数 \times 100 倍)观察红色荧光(Excited: 570 nm, Emission: 595 nm)、蓝色荧光(Excited: 358 nm, Emission: 461 nm)、绿色荧光(Excited: 488 nm, Emission: 509 nm)及在可见光下的细胞形态, 拍照记录经成像软件生成 DAPI 标记的细胞核和 RedStar 标记的细胞器或 Mito tracker Green 标记的线粒体和 RedStar 标记的细胞器共定位图片。

1.9 沙门氏菌 SipA-EGFP 质粒的构建

采用两步克隆的方法构建沙门氏菌 SipA-EGFP 质粒。以质粒 pEGFP 为模板, 设计 EGFP 特异性扩增引物, 进行 PCR 扩增。用 *EcoR* I 和 *Xho* I 对 EGFP 扩增产物和 pYES2-NTA 质粒分别进行双酶切, 将回收的扩增产物和质粒酶切产物用 T4 连接酶连接并转化至 DH5 α 感受态细胞。用扩增引物对所得到的转化子进行菌落 PCR, 1% 琼脂糖凝胶检测, 并将阳性转化子送上海生工进行测序, 保存得到的 pYES2-NTA-EGFP 质粒。

以肠炎沙门氏菌基因组 DNA 为模板, 设计 SipA 特异性基因扩增引物, 进行 PCR 扩增。用 *Bam*H I 和 *EcoR* I 对 SipA 扩增产物和 pYES2-NTA-EGFP 质粒分别进行双酶切, 将回收的扩增产物与质粒酶切产物用 T4 连接酶连接并转化至 DH5 α 感受态细胞。用扩增引物对所得到的转化子进行菌落 PCR, 1% 琼脂糖凝胶检测, 并将阳性

转化子送上海生工进行测序, 保存得到的 pYES2-NTA-SipA-EGFP 质粒。

1.10 沙门氏菌 SipA 在酿酒酵母细胞内的定位研究

将含有沙门氏菌 SipA-EGFP 融合质粒的酵母菌株接种于 SCM-Ura (2% 葡萄糖)液体中, 30 $^{\circ}$ C 过夜培养。用新鲜培养基将培养液稀释至 5×10^6 细胞/mL ($OD_{600}\approx 0.5$), 摇床培养 3–4 h, 5000 r/min 离心 2 min 收集细胞, 无菌 ddH₂O 洗涤, 离心重复洗涤 1 次。将细胞重悬于 SCM-Ura (2% 半乳糖)液体中, 诱导表达 6 h。离心收集细胞, 用 ddH₂O 洗涤 1 次, 无菌 ddH₂O 重悬调整至合适的浓度, 取 10 μ L 酵母细胞滴加于载玻片上, 加入 5 μ L 抗荧光淬灭剂, 用微量移液器吹打均匀, 盖上盖玻片, 于暗处稍微静置晾干使用激光共聚焦显微镜通过油镜镜检观察其绿色荧光、红色荧光及在可见光下的细胞形态, 拍照记录相应的荧光及可见光图像, 经成像软件叠加绿色荧光、红色荧光及可见光的图片, 生成 EGFP 标记的 SipA 和 RedStar 标记的细胞器的共定位图片, 分析 SipA 在酵母细胞中的定位情况。

2 结果和分析

2.1 酿酒酵母定位报告基因的选择

本实验参照相关文献, 选择了 12 个定位于不同细胞器的基因作为报告基因来进行构建^[14], 基因简要描述见表 3。

2.2 酿酒酵母定位报告菌株构建原理

利用酿酒酵母同源重组率高的特点, 定位菌株的构建原理如图 1, 将红色荧光蛋白 RedStar 和抗生素 kanMX4 的序列, 通过同源重组的方式分

表 3. 本研究所选择基因的标准名、定位及其简要描述
Table 3. The standard name, localization and description of selected gene

Standard name	Localization	Description
Sac6	Actin cytoskeleton	Fimbrin, actin-bundling protein; cooperates with Scp1p in organization and maintenance of the actin cytoskeleton; modulate actin filament binding affinity and actin cable dynamics
Cop1	Early Golgi/COPI	Alpha subunit of COPI vesicle coatmer complex; complex surrounds transport vesicles in the early secretory pathway
Snf7	Endosome	Endosomal sorting complex required for transport III, involved in the sorting of transmembrane proteins into the multivesicular body (MVB) pathway; recruited from the cytoplasm to endosomal membranes
Sec13	Endoplasmic reticulum to Golgi	Subunit of the Nup84p nuclear pore subcomplex that contributes to nucleocytoplasmic transport and NPC biogenesis; subunit of the COPII vesicle coat required for ER-to-Golgi transport
Anp1	Golgi apparatus	Type II membrane protein; a role in retention of glycosyltransferases in the Golgi
Chc1	Late Golgi/clathrin	Subunit of the major coat protein involved in intracellular protein transport and endocytosis; the light chain (CLC1) is thought to regulate function
Erg6	Lipid particle	Localized to lipid particles, the plasma membrane-associated endoplasmic reticulum, and the mitochondrial outer membrane
Sik1	Nucleolus	Essential evolutionarily-conserved nucleolar protein; overexpression causes spindle orientation defects
Nic96	Nuclear periphery	Linker nucleoporin component of the nuclear pore complex (NPC); contributes to nucleocytoplasmic transport and NPC biogenesis
Pex3	Peroxisome	Peroxisomal membrane protein (PMP); required for proper localization and stability of PMPs; anchors peroxisome retention factor Inp1p at the peroxisomal membrane
Spc42	Spindle pole	Central plaque component of spindle pole body (SPB); involved in SPB duplication, may facilitate attachment of the SPB to the nuclear membrane
Cox4	Mitochondria	Subunit IV of cytochrome c oxidase; the terminal member of the mitochondrial inner membrane electron transport chain; precursor N-terminal 25 residues are cleaved during mitochondrial import

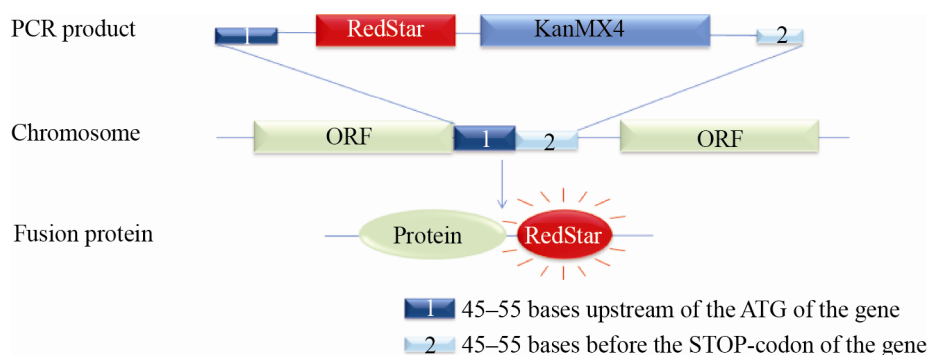


图 1. 菌株构建策略

Figure 1. Strategy for strains construction.

别整合到 12 个报告基因 C 端, 该定位基因表达时, 与红色荧光蛋白 RedStar 融合表达。在适当的激发光激发下产生的红色荧光可指示该特定基因的定

位, 这种菌株构建的方法使得荧光蛋白在酵母胞内的表达受标记基因的调控模式所调控, 其表达水平和表达模式与野生型相似, 干扰最小。

2.3 检测含同源臂的 RedStar 和 kanMX4 模块的扩增产物

将含同源臂的 RedStar 和 kanMX4 模块的扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶检测(图 2)。从图中可以看出, 产物扩增片段长度为 2500 bp, 与预计大小相符。

2.4 酿酒酵母阳性转化株的鉴定

将含同源臂的 RedStar 和 kanMX4 模块的扩增产物转化酿酒酵母菌株 W303-1A, 在 YPD+G418 选择性平板上培养, 挑取转化株, 划线至新的 YPD+G418 板上, 挑取单克隆菌株提取基因组, 用验证引物(前引物为报告基因特异, 后引物位于 RedStar 和 kanMX4 模块内, 公用)进行 PCR 扩增, 以鉴定筛选阳性转化株。如图 3 所示, PCR 扩增产物与预计扩增产物大小一致, 将扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 结果与预期相符, 可对酵母转化株进行下一步的胞内蛋白定位的荧光显微镜检测。

2.5 酿酒酵母荧光标记的荧光观察

在激光共聚焦显微镜下检验和评估各个酵母报告菌株的荧光定位和信号强弱。对 12 株酵母荧光定位报告菌株的荧光显微镜观察的结果如图 4 和图 5 所示, 12 株菌株均观察到红色信号, 表明菌株 RedStar 表达正常, 各菌株之间 RedStar 分布模式存在定位差异, 各亚细胞器形态特征与已有参考文献相符^[14], 可用作本实验研究的酵母荧光定位报告菌株。

2.6 酿酒酵母荧光标记与小分子染料特异染色共定位分析

为了进一步验证构建的荧光定位报告菌株, 利用构建的荧光定位报告菌株与小分子染料特异染色进行共定位分析。Sik1 是小分子核仁核糖核蛋白(snoRNP)复合物成分, 定位于核仁。在构建的酵母定位报告菌株 Sik1-Redstar 中, 使用 DAPI 标记细胞核, 在激发光下会发出蓝色荧光, 与 Sik1-Redstar 的红色荧光共定位后重合, 产生紫色荧光(图 5)。

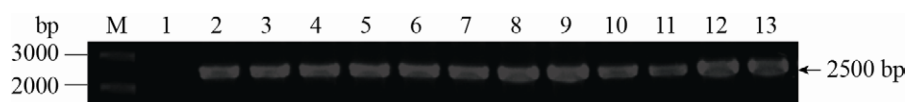


图 2. 含有 RedStar 和 kanMX4 模块的 PCR 框的扩增

Figure 2. Amplification of PCR-cassettes containing RedStar and kanMX4 Modules. M: DL5000 DNA marker; 1: Negative control; 2: Sac6; 3: Cop1; 4: Snf7; 5: Sec13; 6: Anp1; 7: Chc1; 8: Erg6; 9: Sik1; 10: Nic96; 11: Pex3; 12: Spc42; 13: Cox4.

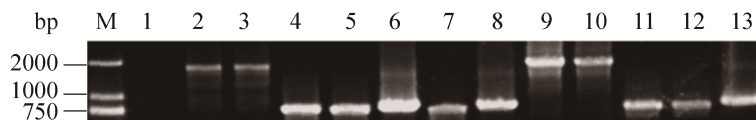


图 3. 12 株荧光定位报告菌株的特异性 PCR 检测

Figure 3. Special PCR detection of 12 fluorescent localization report strains. M: DL2000 DNA marker; 1: Negative control; 2: Sac6 (1700 bp); 3: Cop1 (1700 bp); 4: Snf7 (750 bp); 5: Sec13 (750 bp); 6: Anp1 (750 bp); 7: Chc1 (750 bp); 8: Erg6 (750 bp); 9: Sik1 (1700 bp); 10: Nic96 (1700 bp); 11: Pex3 (750 bp); 12: Spc42 (750 bp); 13: Cox4 (750 bp).

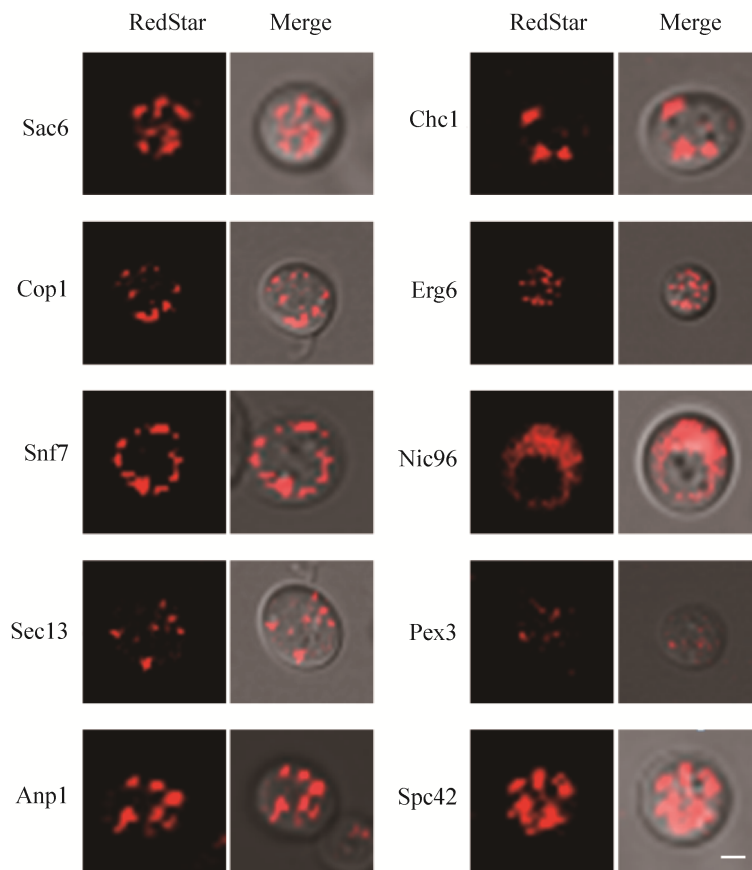


图 4. 10 株不同亚细胞红色荧光蛋白定位酿酒酵母菌株荧光检测

Figure 4. Fluorescence detection of 10 specific sub-cellular Redstar-tagged *S. cerevisiae* strains. The cells were collected in logarithmic growth and fixed with paraformaldehyde. The cells were analysed by fluorescence microscopy. Bars: 2 μ m.

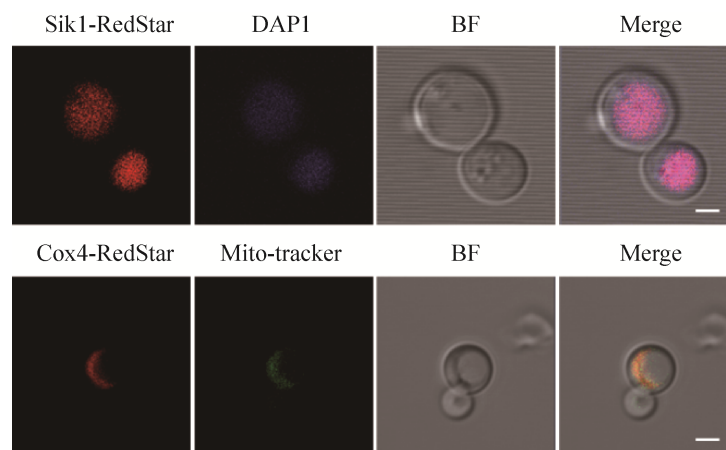


图 5. Sik1 和 Cox4 标记的报告菌株与小分子染料特异染色的共定位分析

Figure 5. Co-localization analysis of reported strains labeled with Sik1 and Cox4 and specific staining with small molecular dyes. The cells were collected in logarithmic growth and fixed with paraformaldehyde. The cells were analysed by fluorescence microscopy. Bars: 2 μ m.

Cox4 是线粒体中细胞色素 C 氧化酶(线粒体内膜电子传递链中心酶复合物)的第 4 亚基。使用线粒体特异性染料 Mito tracker 对构建的酵母定位报告菌株 Cox4-Redstar 进行染色后发现, 绝大部分的 Cox4 的红色荧光与染料的绿色荧光共定位后重合, 产生黄色荧光(图 5)。这一结果验证了构建的菌株的正确性。

2.7 肺炎沙门氏菌 SipA-EGFP 融合表达质粒的构建

为了进一步验证构建的酵母荧光定位报告菌株可以用于目的蛋白的共定位研究, 选择已知定位的肺炎沙门氏菌效应蛋白 SipA 作为目的蛋白。本实验用两步克隆方法构建了沙门氏菌 SipA-EGFP 融合表达质粒, 中间过程中提取的质粒、扩增产物和酶切产物均用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 凝胶成像仪进行检测(图 6)。选送相应的目标克隆质粒进行测序后发现, 序列与 NCBI 上传(序列号: AF458099.1)氨基酸序列一致, 质粒构建成功, 可进行下一步实验。本实验用两步克隆方法构建了沙门氏菌 SipA-EGFP 融合表达质粒(图 6-B)。

2.8 肺炎沙门氏菌 SipA 与肌动蛋白标记的酿酒酵母的共定位分析

已有文献表明, SipA 在酿酒酵母中表达时, 会与丝状肌动蛋白结合, 降低肌动蛋白聚合所需的肌动蛋白浓度, 与肌动蛋白骨架共定位^[15]。与野生型相比, 诱导表达 SipA 会使得酵母的丝状肌动蛋白束变厚, 体外表达的 SipA 会抑制肌动蛋白解聚^[16]。

Sac6 是一种丝束蛋白, 能够横向连接相邻微丝, 形成排列紧密的微丝束。因此, Sac6 的定位可以间接反映细胞中聚合的纤维状肌动蛋白(微丝)的形态和动态变化。

为了鉴定 SipA、Sac6 这两种肌动蛋白结合蛋白在酿酒酵母中是否存在共定位, 在构建的 Sac6-RedStar 菌株中转入 pYES2-NTA-SipA-EGFP 质粒, 并进行 SipA-EGFP 融合蛋白的诱导表达。

利用激光共聚焦显微镜, 通过绿、红、可见光三通道对 pYES2-NTA-SipA-EGFP 转化株进行观察, 拍照记录各通道的图像, 并对其进行叠加生成 EGFP 标记的效应蛋白和 RedStar 标记的丝束蛋白的共定位图片。从图 7 中可以看出, 融合蛋

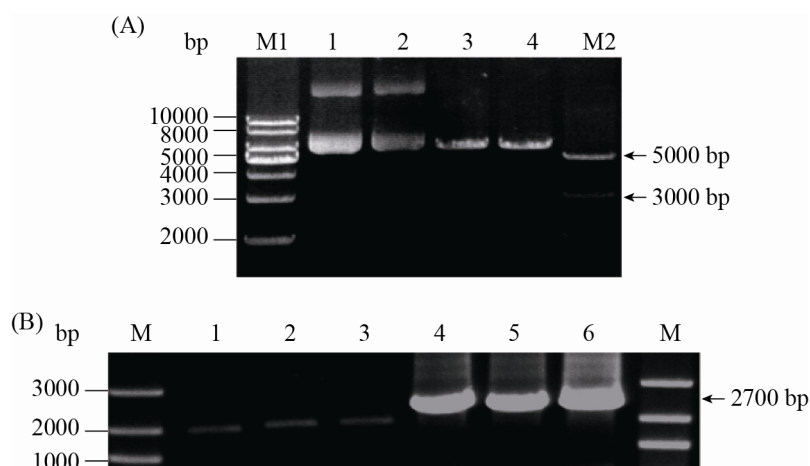


图 6. SipA-EGFP 质粒构建

Figure 6. Construction of SipA-EGFP plasmid. A: M1: DL1 kb DNA marker; M2: DL5000 DNA marker; lane: 1-2: pYES2-NTA plasmid; lane:3-4: pYES2-NTA plasmid digested by *EcoR* I and *Xho* I. B: M: DL5000 DNA marker; lane:1-3: SipA PCR-product; lane: 4-6: Colony PCR-product of pYES2-NTA-SipA-EGFP.

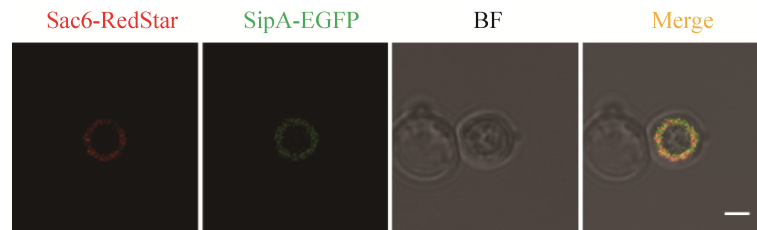


图 7. 肺炎沙门氏菌 SipA 与 Sac6 标记的报告菌株的共定位分析

Figure 7. Co-localization analysis of reported strains labeled with SipA and Sac6 of *Salmonella pneumoniae*. The cells were collected in logarithmic growth and fixed with paraformaldehyde. The cells were analysed by fluorescence microscopy. Bars: 2 μm .

白 SipA-EGFP 和 Sac6-RedStar 吻合叠加产生黄色，表明沙门氏菌的效应蛋白 SipA 与丝束蛋白 Sac6 存在共定位。

3 讨论

本试验利用染色体同源重组的方法构建了 12 个组成型表达红色荧光的酵母细胞器荧光定位报告菌株，用特异性引物进行 PCR 扩增和验证，用激光共聚焦显微镜进行荧光检测，各亚细胞器形态特征与已有参考文献相符^[14]。对线粒体和细胞核进行了特异性染料染色，用 EGFP 标记沙门氏菌已知定位蛋白 SipA，与相应报告定位菌株进行共定位，进一步证明了这些报告菌株构建成功，为日后在酵母中观察亚细胞水平细胞器动态变化，以及未知目标蛋白在酵母中的定位提供了基础性工具。

2003 年，Huh 课题组首次尝试在真核模式生物——酿酒酵母细胞中全面确定每种蛋白质的亚细胞定位^[14]。Huh 等利用染色体同源重组技术将绿色荧光蛋白(GFP)和选择标记(G418)分别融合到 97% 已命名的酵母开放阅读框的 C 端^[14]。这种方法利用定位基因自身的启动子，不会造成过度表达影响定位。该课题组又用同样方法，将红色

荧光蛋白(mRFP)融合到已知定位的酵母细胞器标记基因 C 端，构建了 11 个共定位参考菌株^[14]。本实验参考了这 11 个定位标记基因，添加线粒体标记基因 Cox4，构成一套酿酒定位报告菌株。本试验用红色荧光蛋白的突变体 RedStar，替代 Huh 课题组所用的 mRFP，作为融合的荧光蛋白。RedStar 寡聚化程度低、成熟速率快。pYM38 中编码的 RedStar 序列，根据酿酒酵母的密码子偏爱性进行了同义突变，适合在酵母中表达^[17]。

国内谢志平课题组构建两套含有酵母细胞器标记蛋白和 GFP/mCherry 荧光蛋白标签相融合的组成型表达质粒^[18]，利用 Western blotting 及密度梯度离心法进行检测标记基因。其选用的定位基因与我们选择的基因有部分重合，分别得到两套定位参考质粒和一套定位参考菌株，可视自身需要，选用任意一种构建下一步的共定位实验。

Huh 课题组和谢志平组均运用荧光显微镜对参考菌株进行了荧光观察^[14,17]。本实验运用激光共聚焦显微镜来检测和跟踪荧光。酵母细胞较小，直径只有 3–5 μm 左右(哺乳动物细胞可达到 10–100 μm)，一般的荧光显微镜难以产生好的荧光图片，而共聚焦显微镜的精度已提高到了 0.4 μm ，足以全面多角度观察酵母细胞的内部结构。因此，本实验中各细胞器定位基因的亚细胞分布及形态

特征更清晰明确。

在使用激光共聚焦显微镜观察野生型菌株中 Sac6 的定位, 发现 Sac6 在细胞中呈点状或斑状, 显示其可能与微丝中的皮质斑共定位, 但当有 SipA-EGFP 诱导表达时, Sac6 在细胞中呈环状分布。已有研究文献中都是用荧光素标记的鬼笔环肽对细胞中的肌动蛋白细胞骨架进行染色, 并未得到相似结果^[15]。因此, 用 Sac6 和鬼笔环肽对微丝进行定位的区别还有待进一步解析, SipA 与 Sac6 是否存在互作, SipA 是否会影响 Sac6 与肌动蛋白的结合, 还有待进一步实验来确认。

参考文献

- [1] Duina AA, Miller ME, Keeney JB. Budding yeast for budding geneticists: a primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics*, 2014, 197(1): 33–48.
- [2] Siggers KA, Lesser CF. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a versatile model system for the identification and characterization of bacterial virulence proteins. *Cell Host Microbe*, 2008, 4(1): 8–15.
- [3] Popa C, Coll NS, Valls M, Sessa G. Yeast as a heterologous model system to uncover type III effector function. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(2): e1005360.
- [4] Kwak GH, Kim JR, Kim HY. Expression, subcellular localization, and antioxidant role of mammalian methionine sulfoxide reductases in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMB Reports*, 2009, 42(2): 113–118.
- [5] Matsushika A, Watanabe S, Kodaki T, Makino K, Inoue H, Murakami K, Takimura O, Sawayama S. Expression of protein engineered NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 81(2): 243–255.
- [6] Curak J, Rohde J, Stagljar I. Yeast as a tool to study bacterial effectors. *Current Opinion in Microbiology*, 2009, 12(1): 18–23.
- [7] Suter B, Auerbach D, Stagljar I. Yeast-based functional genomics and proteomics technologies: the first 15 years and beyond. *Biotechniques*, 2006, 40(5): 625–644.
- [8] Chong YT, Koh JL, Friesen H, Duffy K, Cox MJ, Moses A, Moffat J, Boone C, Andrews BJ. Yeast proteome dynamics from single cell imaging and automated analysis. *Cell*, 2015, 161(6): 1413–1424.
- [9] Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods*, 2005, 2(12): 905–909.
- [10] Pédélec JD, Cabantous S, Tran T, Terwilliger TC, Waldo GS. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 2006, 24(1): 79–88.
- [11] Gerdes HH, Kaether C. Green fluorescent protein: applications in cell biology. *FEBS Letters*, 1996, 389(1): 44–47.
- [12] Chudakov DM, Lukyanov S, Lukyanov KA. Using photoactivatable fluorescent protein Dendra2 to track protein movement. *Biotechniques*, 2007, 42(5): 553–563.
- [13] Janke C, Magiera MM, Rathfelder N, Taxis C, Reber S, Maekawa H, Moreno-Borchart A, Doenges G, Schwob E, Schiebel E, Knop M. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast*, 2004, 21(11): 947–962.
- [14] Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS, O'Shea EK. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, 2003, 425(6959): 686–691.
- [15] Lesser CF, Miller SI. Expression of microbial virulence proteins in *Saccharomyces cerevisiae* models mammalian infection. *The EMBO Journal*, 2001, 20(8): 1840–1849.
- [16] Zhou DG, Mooseker MS, Galán JE. Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science*, 1999, 283(5410): 2092–2095.
- [17] Knop M, Barr F, Riedel CG, Heckel T, Reichel C. Improved version of the red fluorescent protein (drFP583/DsRed/RFP). *Biotechniques*, 2002, 33(3): 592, 594, 596–568.
- [18] 赵柏淞. 酵母细胞器荧光标记系统的开发及鉴定. 上海交通大学博士后学位论文, 2017.

Development of fluorescent localization reporter strains of the budding yeast

Lijuan Yang², Fenju Lai², Ningqing Xie², Yimin Dai^{1*}

¹ School of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi Province, China

² School of Biology Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi Province, China

Abstract: **[Objective]** To facilitate the localization of proteins in budding yeast, we developed yeast reporter strains expressing fusion proteins that localize to specific subcellular structures. **[Methods]** The yeast expression vectors expressed organelle-specific proteins tagged with much brighter variant red fluorescent protein (RedStar) at their carboxy terminal were constructed and transferred into yeast cells to generate the reporter strain collection. To this end, the yeast codon that optimized coding sequence of RedStar were in-frame inserted immediately preceding the stop codon of each ORF that controlled by their endogenous promoters. Each strain was verified by PCR and sequencing, and then analyzed by fluorescence microscopy. Co-localization of DNA-binding dyes (DAPI), Mitotracker (mitochondria) and SipA from *Salmonella enteritidis* in the corresponding reporter strain were also performed. **[Results]** The yeast strain collection containing indicators for the actin, endoplasmic reticulum, nuclei, mitochondria, peroxisomes, lipids, endosomes, and the Golgi apparatus were constructed successfully. **[Conclusion]** Our studies provide a fundamental tool for observing the dynamic changes of organelles and identifying the localization of unknown proteins in yeast.

Keywords: subcellular localization, RedStar, yeast reporter strains, co-localization

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31360617, 31802213), by the Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20161BAB204183) and by the National Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program (201810410018)

*Corresponding author. Tel: +86-791-83813503; E-mail: daiym1125@jxau.edu.cn

Received: 19 June 2019; Revised: 4 August 2019; Published online: 5 December 2019