

文章编号 1006-8147(2016)03-0256-03

论著

基础医学模式生物酿酒酵母接合型的鉴定—PCR 法

刘超, 韩雅婷, 杨冰, 孙琰, 王玺

(天津医科大学基础医学院细胞生物学系, 天津 300070)

摘要 目的: 利用 PCR 法鉴定酿酒酵母 a、 α 单倍体或 a/ α 双倍体三种接合型。方法: 根据酿酒酵母 a、 α 或 a/ α 三种接合型 MAT 基因座及附近序列信息, 分别设计特异的寡核苷酸引物。提取酿酒酵母 DNA 作为模版和利用单菌落 PCR 法, 进行特异性 PCR 扩增。结果: MATa 基因座特异性引物能在 a 和 a/ α 接合型中扩增出特异性条带; MAT α 基因座特异性引物则能在 α 和 a/ α 接合型中扩增出特异性条带。结论: 利用 PCR 鉴定酿酒酵母接合型是一种操作简单、准确灵敏的方法, 为基础医学单细胞真核模式生物的研究提供方便。

关键词 酿酒酵母; 接合型; MAT 基因座; PCR 鉴定; 单菌落 PCR

中图分类号 Q2

文献标志码 A

Identification of the mating-type of model organism *S. cerevisiae* in basic medical science by PCR

LIU Chao, HAN Ya-ting, YANG Bing, SUN Yan, WANG Xi

(Department of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To identify *S. cerevisiae* mating-type to be a, α haploid or a/ α diploid by PCR. **Methods:** Specific PCR primers were designed according to the MAT locus and its nearby sequence of the three mating-types, and applied in specific PCR reaction using genome DNA as template or the method of colony PCR. **Results:** A specific band was obtained in a or a/ α mating-type when specific primers were used on MATa, while a specific band was obtained in α or a/ α mating-type by using specific primers on MAT α . **Conclusion:** With specific primers, PCR may be a convenient, fast and precise method to identify *S. cerevisiae* mating-type, which could facilitate the study of monocellular eukaryotes model organism in basic medical science.

Key words *S. cerevisiae*; mating-type; MAT locus; PCR identification; colony PCR

在基础医学研究中, 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是一种低等的单细胞真核生物, 具有易培养、生长速度快、遗传背景清楚、基因工程操作简便等特点, 广泛用于真核细胞的研究, 包括细胞代谢、细胞周期、染色体结构与功能、DNA 复制与修复、基因表达与信号通路调控、自噬等生物过程以及线粒体相关疾病、抗癌药物的研发和筛选等^[1-5]。因此, 酿酒酵母是基础医学中重要的研究工具。酿酒酵母具有单倍体 a 或 α 、二倍体 a/ α 三种接合型, 由位于 III 号染色体长臂上的 MAT 基因座决定, 不同接合型的酿酒酵母具有性别特异的基因表达。传统检测酵母接合型的方法是通过观察其是否能与已知接合型的测试菌株杂交。但是这种方法操作繁琐, 耗时至少要 1 d, 结果准确率低, 易受细胞状态、环境因素和遗传背景影响^[6]。MAT 基因座位于 III 号染色体长臂上, 距中心粒约 100 kb, 分为 5 个区域(W, X, Y, Z1 和 Z2), Ya 和 Y α 分别包含有性别特异基因的启动子和开放读码框^[7-8]。本研究计划根据

基因组中性别决定的 MAT 基因座及附近序列信息分别设计特异性引物, 通过 PCR 法鉴定菌株的接合型。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 酿酒酵母菌种 YPH499(MATa)、YPH500(MAT α)和 YPH501(MATa/ α)(天津医科大学发育与肿瘤发生表观遗传学实验室), 含 2%葡萄糖 YPD 培养基, Taq DNA 聚合酶、dNTP (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), DNA HyperLadder I (美国 Gentuar 公司)。

311 系列 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), ZWY-240 全温型多振幅轨道摇床 (上海智城公司), S1000 梯度 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司), D30 核酸蛋白测定仪、Centrifuge 5427R 冷冻高速离心机 (德国 Eppendorf 公司), SynGene Gene Genius 全自动凝胶成像系统 (美国 SynGene 公司), EPS 200 电泳仪 (上海天能公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 根据 GenBank 中酿酒酵母性别决定的 MATa 和 MAT α 基因座及附近基

作者简介 刘超(1990-), 男, 硕士在读, 研究方向: 肿瘤表观遗传学;
通信作者: 王玺, E-mail: wangxi@tjmu.edu.cn。

因序列,设计并委托生物工程(上海)有限公司合成引物(表1)。

表1 PCR 引物

Tab 1 PCR primers

引物名称	引物序列
P1	5'-CCTCTACTGTGGAGGCACC-3'
P2	5'-CAAGCACGGGCATTTTATAGAAC-3'
P3	5'-CCTCTCGATTTTAAATAAAATCC-3'

1.2.2 酵母基因组的提取 提取酵母基因组 DNA 方法参照文献[9]。接种酵母到 2.5 mL 酵母试管培养基中(YPD 培养基),30 ℃培养 16~18 h($OD_{600}=0.4$);取 200 μ L 酵母培养液,室温下,1 500 $\times g$ 离心 5~10 min 收集菌体;菌体用灭菌水洗 1 次,1 500 $\times g$ 离心 5 min。用 100 μ L CH_3COOLi (0.2 mol/L 醋酸锂,1% SDS)重悬细胞,70 ℃孵育 5 min,加入 300 μ L 无水乙醇,充分混匀,15 000 $\times g$ 离心 3 min,将沉淀用 70%的酒精洗涤 1 次后风干。风干后的 DNA 溶于 100 μ L H_2O 或 TE 缓冲液中,15 000 $\times g$ 离心 15 s 去除细胞碎片,转移上清到新的 1.5 mL 离心管中,-20 ℃保存。

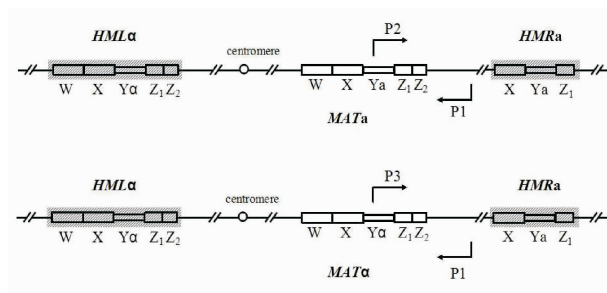
1.2.3 单菌落 PCR 模板制备 取直径为 1 mm 的单菌落,用 5 μ L 水悬浮,95 ℃处理 5 min^[10]。

1.2.4 PCR 扩增 反应体系为 25 μ L,包括:10 \times PCR 缓冲液(含 Mg^{2+})2.5 μ L,提取的酵母基因组或单菌落 PCR 模板 DNA 1 μ L,Taq DNA 聚合酶 0.25 μ L,dNTP(2.5 mmol/L)2 μ L,上下游引物(2.5 μ mol/L)各 2.5 μ L,其余用 ddH₂O 补足。

PCR 扩增条件:95 ℃预变性 5 min,95 ℃变性 45 s,55 ℃复性 45 s,72 ℃延伸 1.5 min,21 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min;4 ℃保存。PCR 扩增产物在含溴化乙锭的 2%琼脂糖凝胶中进行电泳,在凝胶成像系统中进行观察,并照相保存。

2 结果

位于 III 号染色体长臂上的 MAT 基因座,长约 2 500 bp,其中 Ya 长约 700 bp,Y α 长约 850 bp,含有各自性别特异的基因序列。III 号染色体上还具有另外两个具有 Y 区的基因座,分别为位于短臂上的 HML α 基因座和长臂上 MAT 基因座与端粒之间的 HMR α 基因座,这两个基因座通常是沉默的,在接合型突变中作为基因重组的供体(图 1)。根据 MAT 基因座 Ya 和 Y α 的序列差异分别设计接合型特异的引物,P1 为 MAT 基因座下游公共的下游引物,P2 和 P3 分别为 Ya 和 Y α 序列特异的上游引物(图 1)。引物序列见表 1。



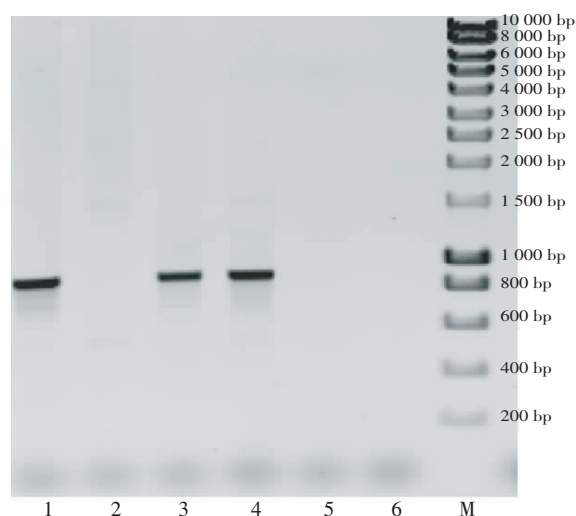
位于 III 号染色体长臂的 MAT 基因座,分为 5 个区域 W、X、Y、Z1 和 Z2,Ya 长约 700 bp,Y α 长约 850 bp。HML α 基因座和 HMR α 基因座分别位于 III 号染色体短臂和 MAT 基因座下游。P1:MAT 基因座下游引物,P2:Ya 区序列特异引物,P3:Y α 区序列特异引物

图1 III号染色体上的 MAT 基因座

Fig 1 The MAT locus in chromosome III

从电泳图谱可以看出,常规 PCR 和单菌落 PCR 中,阴性对照无条带,P1 和 P2 作上下游引物时能够在 a 接合型和 a/ α 接合型酵母中扩增出约 864 bp 的条带,而在 α 接合型酵母中则无条带(图 2);P1 和 P3 作上下游引物时能够在 α 接合型和 a/ α 接合型酵母中扩增出约 864 bp 的条带,而在 a 接合型酵母中则无条带(图 3)。两组引物扩增出的条带均与期望的条带大小一致。

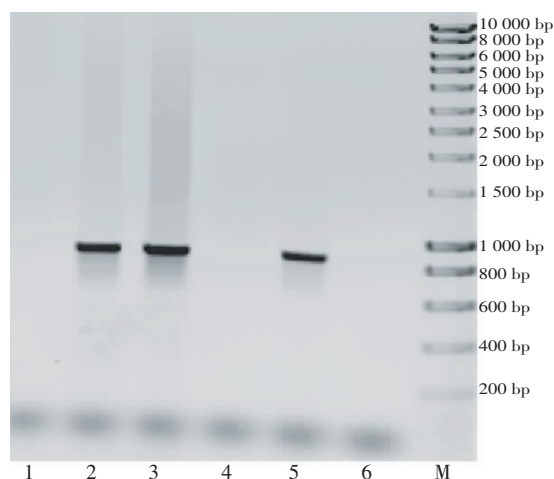
单菌落 PCR 和提取基因组进行常规 PCR 的结果相似,都获得了大小一致且清晰的条带,证明设计的引物扩增效率高、特异性好。由于单菌落 PCR 的方法成本低、操作快速简便,实用性更强。



1:a 接合型单倍体酵母提取基因组作模板;2:α 接合型单倍体酵母提取基因组作模板;3:a/ α 接合型双倍体酵母单菌落 PCR;4:a 接合型单倍体酵母单菌落 PCR;5:α 接合型单倍体酵母单菌落 PCR;6:阴性对照;M:DNA Marker

图2 P1 和 P2 作引物 PCR 检测 MATa

Fig 2 Identification of MATa by PCR with P1 and P2



1: a 接合型单倍体酵母提取基因组作模板; 2: α 接合型单倍体酵母提取基因组作模板; 3: a/ α 接合型双倍体酵母单菌落 PCR; 4: a 接合型单倍体酵母单菌落 PCR; 5: α 接合型单倍体酵母单菌落 PCR; 6: 阴性对照; M: DNA Marker

图 3 P1 和 P3 作引物 PCR 检测 $MAT\alpha$

Fig 3 Identification of $MAT\alpha$ by PCR with P1 and P3

3 讨论

酿酒酵母是主要的生物乙醇和酿酒业发酵菌株,而且作为研究真核细胞的模式生物,在阐明许多生物过程和机制中发挥了重要作用,对于细胞自噬作用分子机制、基因表达调控机制、染色质结构、基因重组机制、衰老与凋亡机制等的了解,几乎都来源于对酵母的研究。例如,对于酿酒酵母接合型转换的研究,从这一高度精细调控的生物过程中,了解了基因表达调控、染色体结构、同源重组机制的许多方面,如 Sir 蛋白家族通过严格调控 HO 基因的表达,并以 $HML\alpha$ 或 $HMR\alpha$ 作为同源重组的供体,调节接合型之间的转换^[1]。在利用酵母进行的过程中,经常需要测定菌株接合型。传统测定酵母接合型的方法主要是通过观察待测菌株是否能与已知接合型的单一营养缺陷型测试菌株杂交。例如以 $MA Ta(thr4-)$ 或 $MA T\alpha(thr4-)$ 作为测试菌株,而待测菌株通常为野生型,可能具有多种营养缺陷但不包含 $thr4-$,这样测试菌株和待测菌株都不能单独在基本培养基上生长,只有发生异性接合相互弥补各自的营养缺陷所形成的二倍体菌体,才能在基本培养基上生长,由此实现待测菌株接合型的鉴定。但是这种方法操作过程繁琐,耗时长,结果易受多种因素影响,出现假阳性或假阴性结果。例如细胞状态、培养板和温度等环境因素可能会影响杂交的效率,菌株间的遗传背景可能会发生营养缺陷并不互补情况等^[6]。而且有时为了获得合适的酵母菌株,往往需要筛选数十个甚至上百个重组子,使得鉴定

酿酒酵母接合型的工作量增加,实验成本升高。

本研究利用 PCR 方法,根据酵母单倍体 a、 α 或二倍体 a/ α 三种接合型中 III 号染色体性别决定的 $MA Ta$ 和 $MA T\alpha$ 基因座及其附近序列信息,分别设计特异性寡核苷酸引物,进行 PCR 扩增。 $MA Ta$ 的特异性引物能在 a 和 a/ α 接合型中扩增出 864 bp 特异性条带; $MA T\alpha$ 的特异性引物则能在 α 和 a/ α 接合型中扩增出 864 bp 特异性条带。通过使用不同引物进行 PCR 并观察结果的条带位置,一般不超过 6 h,便能鉴定出酿酒酵母的接合型。本方法的特点是:首先,本研究是根据酿酒酵母基因组序列设计并合成的寡核苷酸引物,具有序列特异性;第二,这是一种新建的利用 PCR 鉴定酿酒酵母接合型的方法,与传统方法相比,具有耗时少,结果准确,不受细胞状态、遗传背景、环境因素等影响的优点。第三,本研究采用的单菌落 PCR 法,其实验结果与提取酵母基因组作为模板的常规 PCR 法的实验结果相同,也有效地扩增出了目的条带。但是单菌落 PCR 省去了提取基因组步骤,不仅实验成本低,而且进一步节省了约 18 h 的实验时间,具有更加简单、经济、高效的特点^[12-13]。

综上所述,本文提供利用设计的特异性寡核苷酸引物新建的 PCR 法能够直接快速地鉴定酿酒酵母的接合型,在酿酒酵母研究中具有较大的应用前景。这种设计并利用特异性寡核苷酸引物进行 PCR 用于鉴定单细胞真核模式生物性别的方法为基础医学研究提供了方便。

参考文献:

- [1] Wang R, Mozziconacci J, Bancaud A, et al. Principles of chromatin organization in yeast: relevance of polymer models to describe nuclear organization and dynamics[J]. Curr Opin Cell Biol, 2015,34: 54
- [2] Ren J, Wang C L, Sternglanz R. Promoter strength influences the S phase requirement for establishment of silencing at the *Saccharomyces cerevisiae* silent mating type Loci[J]. Genetics, 2010, 186(2):551
- [3] Feng Y, He D, Yao Z, et al. The machinery of macroautophagy[J]. Cell Res, 2014, 24(1):24
- [4] Lasserre J P, Dautant A, Aiyar R S, et al. Yeast as a system for modeling mitochondrial disease mechanisms and discovering therapies[J]. Dis Model Mech, 2015, 8(6):509
- [5] Matuo R, Sousa F G, Soares D G, et al. *Saccharomyces cerevisiae* as a model system to study the response to anticancer agents[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2012, 70(4): 491
- [6] Sherman F. Getting started with yeast[J]. Methods Enzymol, 1991, 194:3
- [7] Astell C R, Ahlstrom-Jonasson L, Smith M, et al. The sequence of

(下转第 261 页)

3 讨论

退行性腰椎管狭窄症指脊柱退变引起的椎管或神经根管矢状径狭窄,刺激或压迫马尾神经或神经根而引起的一系列临床症状^[1-2]。此病的病理基础始于椎间盘退变,导致椎间隙高度下降,椎间和小关节出现异常活动,继发骨刺形成及关节突增生内聚,造成侧隐窝狭窄。患者常有腰痛、单侧或双侧根性疼痛,部分患者存在鞍区感觉异常、大小便及性功能障碍^[3]。传统手术治疗以全椎板切除减压为主,术中往往需要切除增生的关节突关节的内侧部分,以充分暴露导致椎管狭窄因素^[4-5]。椎管减压手术必然影响脊柱稳定性。目前临床手术主张减压同时要尽量减少对腰椎稳定性结构的破坏,李明全等^[6]研究表明单侧关节突切除对脊柱稳定性并无影响,无须行椎间融合术。随着CT、MRI检查广泛应用于临床,术者在手术前通过对患者症状、体征及影像学分析,可明确引起症状的责任节段,进而有针对性的选择手术方案。经皮椎板间入路神经根管探查、减压术通过切除狭窄节段的椎板及部分切除单侧关节突关节,侧隐窝减压充分可靠,对脊柱稳定性无明显影响。术中可以避开高位髂嵴的阻挡,通过转动操作鞘圆钝剖口,可推开并保护硬膜囊与神经根,确保了手术的安全性。本组病例术中小关节切除范围小于50%,手术时间约40~60 min,平均 (51 ± 10.5) min;术中出血量约12~20 mL,平均 (12 ± 2.5) mL,术后3年内随访VAS及JOA评分较术前明显提高。Sihvonen等^[7]研究了一组严重背部手术后失败综合征患者发现,受破坏的背部肌肉神经支配和肌肉支持的丧失是背部手术后失败综合征中的一个重要因素。本研究经皮椎板间入路微创神经根减压手术减少了对腰骶部肌肉的损伤,可有效避免背部手术失败综合征的发生。

脊柱外科在先进的手术器械和影像设备中快速发展,微创是必不可挡的发展趋势,其有广阔的发展及应用前景^[8-9]。经皮椎板间神经根减压手术治疗以根性症状为主的腰椎退行性疾病,可彻底解除神经根的压迫因素,从而在以最小的创伤保留脊柱稳定性的同时获得最佳的疗效。但由于该技术国内开展时间较短,仍需严格把握好适应证,邻近节段是否退变等问题仍需进行远期随访进一步明确其远期疗效。

参考文献:

- [1] Smith W D, Christian G, Serrano S, et al. A comparison of perioperative charges and outcome between open and mini-open approaches for anterior lumbar discectomy and fusion[J]. J Clin Neuroscience, 2012, 19(5): 673
- [2] Kim D Y, Lee S H, Chung S K, et al. Comparison of multifidus muscle atrophy and trunk extension muscle strength: percutaneous versus pedicle screw fixation[J]. Spine, 2005, 30(1): 123
- [3] Eliyas I K, Karahalios D. Surgery for degenerative lumbar spine disease[J]. Dis Mon, 2011, 57(10): 592
- [4] 梁博伟,殷国前,赵劲民,等.显微镜下精准减压术治疗退变性腰椎管狭窄症[J]. 中国矫形外科杂志, 2012, 20(5): 397
- [5] Arnold P M, Anderson K K, McGuire R J. The lateral transpossoas approach to the lumbar and thoracic spine: a review[J]. Surg Neural Int, 2012, 3(3): 198
- [6] 李明全,袁志,陈拱治.极外侧型腰椎间盘突出症[J].中华骨科杂志, 1995, 15(4): 239
- [7] Snyder L A, O'toole J, Eichholz K M, et al. The technological development of minimally invasive spine surgery[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 203582
- [8] Takahashi Y, Sato T, Hyodo H, et al. Incidental durotomy during lumbar spine surgery: risk factors and anatomic locations: clinical article [J]. J Neurosurg Spine, 2013, 18(2): 165
- [9] Hoogland T, Schubert M, Miklitz B, et al. Transforaminal posterolateral endoscopic discectomy with or without the combination of a low-dose chymopapain: a prospective randomized study in 280 consecutive cases[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2006, 31(24): E890

(2015-10-27 收稿)

(上接第258页)

- the DNAs coding for the mating-type loci of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Cell, 1981, 27(1 Pt 2): 15
- [8] Haber J E. Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Genetics, 2012, 191(1): 33
 - [9] Lloke M, Kristjuhan K, Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications[J]. Biotechniques, 2011, 50(5): 325
 - [10] 陈忠翔,房志家,陈婷,等.一种简单高效的酵母单菌落PCR方法[J]. 生物技术通讯, 2013(2): 225

- [11] Li J, Coic E, Lee K, et al. Regulation of budding yeast mating-type switching donor preference by the FHA domain of Fkh1[J]. PLoS Genet, 2012, 8(4): e1002630
- [12] Güssow D, Clackson T. Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction[J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17(10): 4000
- [13] 徐丽,蔡俊鹏.菌落PCR方法的建立及其与常规PCR方法的比较[J]. 华南理工大学学报:自然科学版, 2004, 32(5): 51

(2015-10-27 收稿)