

酿酒酵母中 *PiggyBac* 转座子筛选系统的构建

周林希, 柳艺石, 赵神保, 张慧杰, 高晓冬, 藤田盛久*

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: *PiggyBac* (PB) 是来源于粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 的 TTAA 型转座子。PB 转座子系统可作为一种插入型突变工具, 应用于多种真核细胞中。本研究在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中构建了一个基于 PB 转座子的筛选系统。系统由插入 ADE2 基因编码框的 PB 转座子及由半乳糖启动子调控表达的 PB 转座酶 (PBase) 两部分组成。在 PBase 诱导下, PB 转座子可以从原始位点无痕移除并随机插入新的基因位点。PB 转座子在转座过程中保持单一拷贝数, 在每个突变细胞中只有一个插入位点, 并可快速检测突变基因。实验结果表明: 所构建的 PB 转座子筛选系统可应用于酿酒酵母中的基因筛选。

关键词: 酿酒酵母; *PiggyBac* 转座子; 基因筛选

中图分类号: Q 786 文章编号: 1673-1689(2019)10-0015-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.10.003

PiggyBac Transposon Screening System in Budding Yeast

ZHOU Linxi, LIU Yishi, ZHAO Shenbao, ZHANG Huijie, GAO Xiaodong, Morihisa Fujita*

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The *piggyBac* (PB) transposon is a TTAA-specific transposon isolated from the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*. The PB transposon system works in various eukaryotic cells, and is used as a tool for insertional mutagenesis. We here developed the PB transposon screening system for *in vivo* mutagenesis in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. We established a system for PB-based mutagenesis consisting of a yeast strain containing a PB element, which was inserted in the ADE2 gene coding sequence, and expressing the PB transposase gene under a galactose-inducible promoter. The PB element was precisely excised from and re-inserted into the genome by PBtransposase expression in the strain. The PB element keeps one copy during transposition, and only one insertion site was found in each mutant cell. The DNA region containing the inserted PB elements can be easily identified. This study suggests our PB-based screening system is useful for isolating genes required for phenotypes of interest in budding yeast.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, *piggyBac* transposon, gene screening

收稿日期: 2017-02-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31400693); 江苏省自然科学基金项目(BK20140141); 中央高校基本科研业务费专项(JUSRP51508)。

* 通信作者: 藤田盛久(1979—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事细胞糖生物学相关研究。E-mail: fujita@jiangnan.edu.cn

引用本文: 周林希, 柳艺石, 赵神保, 等. 酿酒酵母中 *PiggyBac* 转座子筛选系统的构建[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(10): 15-22.

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 是一种可用于研究真核细胞系统中蛋白分泌和膜运输的模式生物^[1]。酿酒酵母具有稳定维持单倍体形态的优点, 可以利用这一特性对酵母菌株进行正向和反向的遗传学分析。正向基因筛选经常使用化学诱变或者物理诱变来获取突变株, 比如甲基磺酸乙酯和紫外诱变等^[2-3]。鉴定导致突变的相关基因时需要表达质粒回补或者定位克隆, 这些方法耗时长并且操作困难^[4]。与传统诱变方法相比, 插入型诱变更具有优势。插入型诱变通过将一段 DNA 插入基因, 达到破坏基因功能的目的。引发突变的 DNA 模块上含有通用序列, 可以用这个序列来检测插入位点^[5], 因此插入诱变能够根据已知序列较容易地分析导致突变的相关基因。目前已有研究在酿酒酵母中使用基于转座子的酵母突变基因组文库进行基因筛选^[6]。在这个系统中, 转座子在大肠杆菌中通过转座酶被插入含有酵母基因组的质粒文库中。随后将突变的质粒文库转入酵母并替换染色体上的等位基因, 由此引起突变^[7]。尽管这一方法适用于在酵母体内进行遗传筛选, 但仍然存在一些问题, 比如整合效率低, 筛选覆盖范围有限以及突变文库的保存比较困难。相比之下在酵母细胞内使用转座子进行突变比转座子文库更高效。酵母本身有一种内源性的反转录转座子 Ty1 可以高效地进行转座, 使用这种转座子进行插入型诱变的方法被称为遗传足迹法^[8]。在这个系统中, 大量的 Ty1 转座子在整个基因组范围内进行插入突变。可以通过比较转座子插入前后, 细胞的生长状况, 来分析一些特殊的基因是否是细胞生长所必须的^[9]。但是这个系统也存在一些缺陷, 比如由于大量的 Ty1 转座子同时进行插入突变, 很难在全基因组范围内对于突变位点进行精确的分析^[8]。其他类型的转座子如来源于鲑鱼基因组的 *Sleeping Beauty* (SB) 转座子, 从初始位点移除并再插入其它位点后会留下原始插入位点留下痕迹^[10-12], 所以大多数的转座子都不适用于在酵母体内进行突变。

PiggyBac (PB) 转座子最初来源于鳞翅目昆虫粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*)^[13-14]。PB 转座子通过一种“剪切和粘帖”机制进行基因转座^[15]。在 PB 转座酶 (PBse) 的作用下, PB 转座子从宿主 DNA 位点被精

准地移除, 并且这种移除不会留下任何痕迹^[14-15]。同时被移除的 PB 转座子重新插入其他基因序列中的 TTAA 位点。与其他转座子方法相比, PB 转座子系统效率更高, 并且 PB 在基因组中的插入位点分布比较均匀^[16]。因此 PB 转座子可以作为一种筛选工具应用于许多生物物种, 包括原生动物, 裂殖酵母, 植物细胞, 昆虫和脊椎动物^[17-18]。

本文在酿酒酵母中使用 PB 转座子构建了一个筛选系统。本研究将 3'PB-TEFp-HIS3-5'PB 转座子插入酵母 ADE2 基因编码框中, PBse 基因则由另一个游离型质粒上的半乳糖启动子调控表达。在 PB 转座酶的作用下, PB 转座子可以从原始位点无痕移除并随机插入新的基因位点。PB 转座子在转座过程中保持单一拷贝数, 在每个突变细胞中只有一个插入位点。使用限制性内切酶酶切降解基因组, 连接接头并进行聚合酶链式反应 (PCR) 扩增, 测序比序列可快速检测到 PB 插入位点。通过对 PB 系统的转座效率进行检测, 结果表明 PB 转座子系统能很好地应用于酿酒酵母菌株中, 并可利用这一转座工具进行目的基因的筛选。

1 材料与方法

1.1 质粒和酵母菌株

本文中用到的质粒如表 1 所示。使用 YW1 和 YW2 引物从 pCMV-hyPBse 质粒扩增 PBse 片段, 将片段通过 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点插入 pRS316-GAL1p 质粒, 得到质粒 pRS316-GAL1p-PBse。使用 YW5 和 YW6 引物从 pFA6a-HIS3MX6 质粒扩增 TEFp-HIS3 片段, 将片段通过 *Nhe* I 和 *Spe* I 酶切位点插入 pPB-R1R2-NP 质粒, 得到质粒 pPB-TEFp-HIS3。

本文中所用酿酒酵母出发菌株为 MATa *his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0* BY4741, 购买于 Addgene。使用 YW3 和 YW4 引物从质粒 pPB-TEFp-HIS3 上扩增 3'PB-TEFp-HIS3-5'PB 片段。通过同源重组^[19], 将 3'PB-TEFp-HIS3-5'PB 转座子插入酿酒酵母 ADE2 基因编码框, 得到实验菌株 MATa *his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ade2::PB-HIS3 suc2Δ::hphMX* BY4741。

研究中所用引物如表 2 所示。

表 1 本研究所用质粒

Table 1 Plasmids used in this study

质粒名称	质粒用途	来源
pRS316-GAL1p-PBase	表达 PB 转座酶	本研究
pPB-TEFp-HIS3	扩增 3'PB-TEFp-HIS3-5'PB 模块	本研究
pCMV-hyPBase	扩增 PB 转座酶序列	文献[20]
pRS316-GAL1p	表达 PB 转座酶载体质粒	本实验室
pPB-R1R2-NP	含有 PB 转座子序列	文献[21]
pFA6a-HIS3MX6	扩增 TEFp-HIS3 片段	本实验室
pBluescript II	测序载体	Agilent

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

引物命名	引物说明	引物序列(5'—3')
YW1	扩增转座酶序列	AAAAGAATTCATCGGCAGCAGCCTGGACGA
YW2	扩增转座酶序列	GAATCTCGAGTCAGAAACAGCTCTGGCACA
YW3	将 PB 转座子序列插入 ADE2 编码框	TGGTATATTTGGTGTGGAATGTTCTATTTAGAAACAGGGGAATTGCTTATTAACC CTAGAAAGATAGTCTGCGTAAAAATTG
YW4	将 PB 转座子序列插入 ADE2 编码框	AAGCATCAATGCTATAATGTCCAGAGTTGTGAGGCCTTGGGGCAATTCGTTAAAC CCTAGAAAGATAATCATATTGTGACGT
YW5	扩增 TEFp-HIS3 基因	AAAAGCTAGCCCGGTTAATTAA
YW6	扩增 TEFp-HIS3 基因	AAAACTAGTGAGCTCGTTTAAAC
YW7	Spl-top1 合成接头引物	CGAATCGTAACCGTTCGTACGAGAATTCGTACGAGAATCGCTGTCTCTCCAACG AGCCAAAGG
YW8	SplB-BLT 合成接头	CCTGGCTCGTTTTTTTTTGCAAAAA
YW9	Spl-P1 突变验证引物	CGAATCGTAACCGTTCGTACGAGAA
YW10	3PB-1st 突变验证引物	TATACAGACCGATAAAACACATGCGT
YW11	Spl-P2 突变验证引物	TCGTACGAGAATCGCTGTCTCTCC
YW12	3PB-2nd 突变验证引物	CGCATGATTATCTTTAACGTACGTCACAA

注:酶切位点加粗标记

1.2 细胞培养

1) 酵母完全培养基:YPAD(1%酵母提取物,2%蛋白胨,0.003%腺嘌呤,2%葡萄糖)。

2) 酵母基本培养基:SD (0.67%无氨基酵母氮源,2%葡萄糖以及需要的氨基酸),SG (0.67%无氨基酵母氮源,2%半乳糖以及需要的氨基酸)。

3) 大肠培养基:2×YT/Amp 培养基:1.6%(W/V)胰蛋白胨,1%(W/V)酵母提取物,0.5%(W/V) NaCl。氨苄青霉素培养基应在灭菌后的培养基中添加终浓度为 100 μg/mL 的氨苄青霉素。

SOB 培养基:2%(W/V) 胰蛋白胨,0.5%(W/V) 酵母提取物,0.05%(W/V) NaCl,2.5 mmol/L KCl,10 mmol/L MgCl₂。

SOC 培养基:1 L SOB 中添加 10 mL 2 mol/L 葡萄糖溶液。

1.3 PB 转座子系统筛选方法

将质粒 pRS316-GAL1p-PBase 转入实验菌株 BY4741-*ade2*:*;**PB-HIS3-suc2Δ*:*;**hphMX*, 得到筛选菌株。在尿嘧啶缺陷型葡萄糖选择性培养基 (SD-Ura) 中接种筛选菌株,过夜培养。为使转座酶有足够的时间诱导 PB 转座子发生转座,且使诱导后的酵母细胞仍处于对数生长期,转接 0.025OD 细胞至 25 mL 尿嘧啶缺陷型半乳糖选择性培养基 (SG-Ura),使起始 OD 为 0.001。30 ℃振荡培养 27 h 后,涂布至腺嘌呤和组氨酸缺陷型葡萄糖选择性培养基 (SD-Ade-His)。30 ℃静置培养,待平板上出现明显的酵母菌落,随机挑取菌落并在含有 5-氟乳清酸 (5-FOA) 的 SD 培养基上再划线,从而移除含有 URA3 标签的 PB 转座酶表达质粒,得到 PB 插入型稳定突变株。

1.4 巢式聚合酶链式反应验证 *PB* 插入位点

用酵母基因组 DNA 纯化试剂盒(上海生工)提取 *PB* 突变株酵母基因组,样品浓度大于 2 μg 。并使用 *Hae* III(NEB, #R0108S)限制性内切酶降解基因组 DNA,37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切反应 12~16 h。酶切反应结束后,80 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min 灭活 *Hae* III 限制酶。使用梯度 PCR 技术在 95 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min,之后每 15 s 降温 1 $^{\circ}\text{C}$ 直至 4 $^{\circ}\text{C}$,使接头引物 YW7 和 YW8 形成发卡结构。将处理后的接头引物与降解的基因组 DNA 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下连接,反应 12~16 h。65 $^{\circ}\text{C}$ 加热 20 min 灭活 T4 DNA 连接酶,将连接产物与溶胶液混合,使用柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海生工)纯化连接产物。最终得到浓度为 5~15 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的 DNA 产物。通过巢式 PCR 技术来扩增被 *PB* 转座子插入的基因片段。使用引物 YW9 和 YW10 进行第一轮 PCR,再用第 1 轮 PCR 的产物为模板,使用引物 YW11 和 YW12 进行第 2 轮巢式 PCR。胶回收 PCR 终产物,使用 T4PNK 酶将扩增的基因片段产物磷酸化。使用 PCR 产物纯化试剂盒(上海生工)纯化磷酸化产物,之后将磷酸化产物与经 *Eco*RV 酶切并用碱性磷酸酶 CIAP 处理后的载体 pBluescript 相连接。最后将连接产物转入大肠杆菌中培养以扩增质粒,提取质粒并送测序。根据测序结果,与 NCBI 酵母基因组数据库进行序列比对,得到 *PB* 插入位点的基因序列。

1.5 生长曲线测定

将质粒 pRS316-*GAL1p*-PBBase 转入实验菌株 BY4741-*ade2::PB-HIS3-suc2 Δ ::hphMX*,得到筛选菌株。在 SD-Ura 液体培养基中接种筛选菌株,30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜培养,转接 0.025OD 细胞至 25 mL SG-Ura 液体培养基,使起始 OD 为 0.001。分别选取 0,7,14,24,27,30,34,38,49,55 h 作为取样点。在 OD₆₀₀ 下测定培养液吸光度,以培养时间为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制生长曲线。

1.6 *PB* 转座子移除率和再插入率计算

将筛选菌株接种于 SG-Ura 液体培养基,转座酶在半乳糖启动子诱导下表达,诱导 *PB* 转座子发生转座。经过一段时间诱导后,在 3 种酵母基本培养基上分别涂布适量的酵母菌。SD 平板上生长的酵母菌包括所有未发生转座及转座子发生移除和再插入的菌株。当 *PB* 转座子发生移除,离开原始插入位点 *ADE2* 基因编码框,这些酵母菌株能在腺嘌呤

缺陷型葡萄糖选择性培养基(SD-Ade)上生长。当 *PB* 转座子发生移除并再插入新的基因位点时,这些酵母菌株能在 SD-Ade-His 平板上生长。转座子移除率及再插入率为

$$\text{转座子移除率} = \frac{\text{SD-Ade 平板上生长的菌落数}}{\text{SD 平板上生长的菌落数}} \quad (1)$$

转座子再插入率=

$$\frac{\text{SD-Ade-His 平板上生长的菌落数}}{\text{SD 平板上生长的菌落数}} \quad (2)$$

2 结果与分析

2.1 酿酒酵母菌株中构建 *PB* 转座子系统

已有研究报导 *PB* 转座子能在出芽酵母中进行转座^[15]。其将 *PB* 转座子插入游离质粒的 *URA3* 编码框中,用以分析 *PB* 转座活力。然而,在出芽酵母中使用 *PB* 转座子系统进行基因筛选还未有报导。为了在酿酒酵母中使用 *PB* 转座子系统,本研究构建了一个含有 3'-*PB-TEFp-HIS3-5'PB* 转座子的质粒 pPB-*TEFp-HIS3*,其中 *HIS3* 基因由 *TEF* 启动子控制,位于两段末端 *PB* 反向重复序列之间(图 1)。以这个质粒为模板,使用引物 YW3 和 YW4 扩增 *PB* 转座子序列,通过同源重组技术,将 *PB* 转座子插入酵母 *ADE2* 基因编码框的 TTAA 序列中(图 2)。同时构建了表达 *PB* 转座酶(PBase)的质粒,由 *GAL* 启动子调控 PBase 的表达。

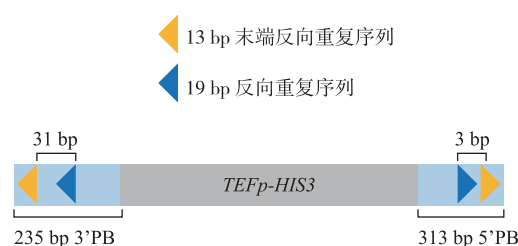


图 1 *PB* 转座子结构

Fig. 1 Structure of the *PB* transposon

当 *PB* 转座子插入 *ADE2* 基因的编码框后, *ADE2* 基因不能正常表达,在 SD 平板上生长的酿酒酵母菌落会呈红色。当在含半乳糖的培养基中培养时 PBase 被诱导表达,部分 *PB* 转座子可以从 *ADE2* 基因中移除,此时 SD 平板上可以同时观察到白色和红色的菌落(表 3 和图 3),其中白色酵母菌落中 *ADE2* 基因可以正常表达。而在 SD-Ade 平板上,只能观察到白色的酵母菌落,说明 3'-*PB-TEFp-HIS3*-

5' *PB* 转座子从 *ADE2* 基因编码框移除。此外,由于其中一些白色酵母菌落中,被移除的 3' *PB-TEFp-HIS3-5'PB* 转座子又再插入到新的基因中,*ADE2* 基因和 *HIS3* 基因均可以正常表达,因此这些菌株还可以在 SD-Ade-His 平板上生长(图 3)。这些结果说明诱导 *PBase* 表达可使 *PB* 转座子发生转座,并且通过在不同培养基中的培养,监测转座或突变状态的酵母菌株十分简便。证明研究中构建的 *PB* 系统可以很好地应用于酿酒酵母中。

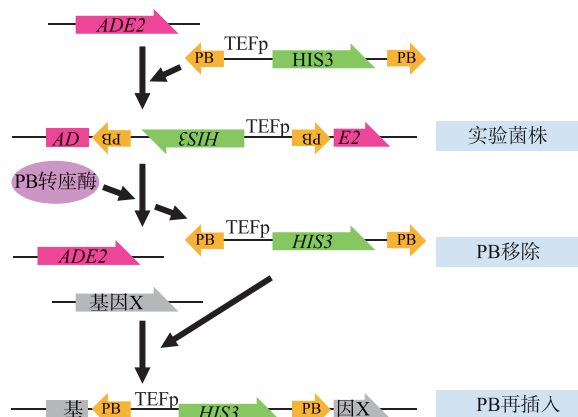
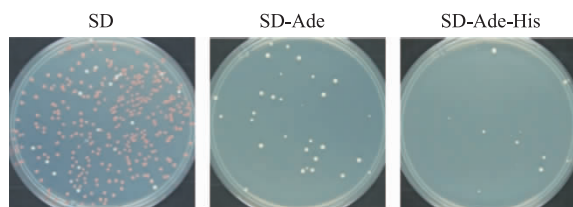


图 2 酿酒酵母中 *PB* 转座子系统

Fig. 2 *PB* transposon system in *Saccharomyces cerevisiae*



注:实验菌株经过 *PB* 转座酶诱导,分别涂布 250 个细胞于 3 种培养基,比较菌落生长情况。

图 3 *PB* 转座子在酿酒酵母中进行转座

Fig. 3 Transposition of *PB* element in *Saccharomyces cerevisiae*

表 3 菌株生长情况

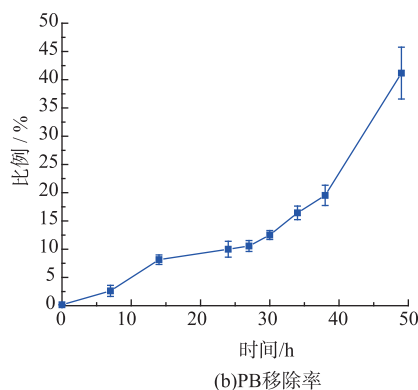
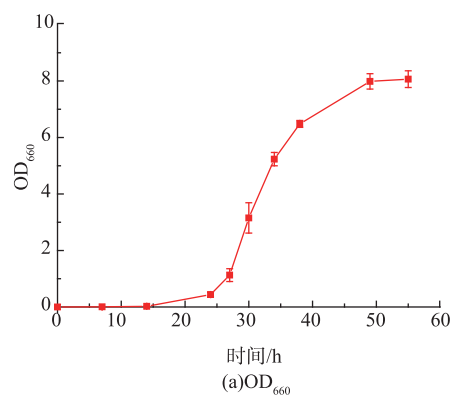
Table 3 Yeast cell growth condition

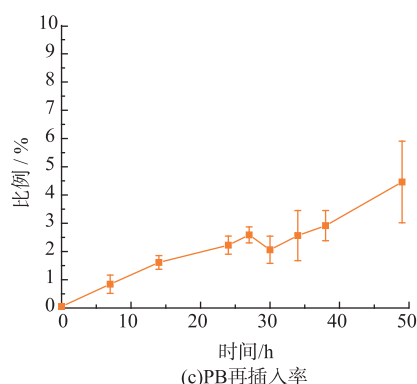
菌株	菌落颜色	SD-Ade	SD-His
BY4741	白色	+	-
实验菌株	红色	-	+
<i>PB</i> 移除	白色	+	-
<i>PB</i> 再插入	白色	+	+

2.2 转座系统中 *PB* 移除率和再插入率

PB 转座子可以在酿酒酵母菌株中灵活转座,通

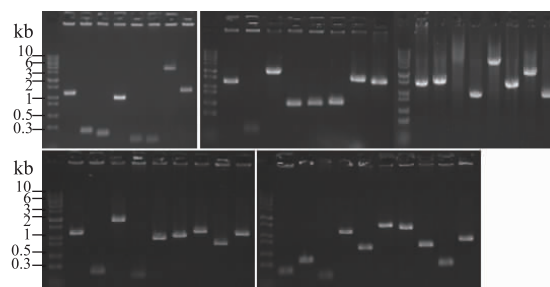
过诱导 *PBase* 表达,本研究进一步检测 *PB* 转座子被移除和再插入的效率。实验中分析了在 SG-Ura 培养基中培养的酵母的生长曲线,以及 3' *PB-TEFp-HIS3-5'PB* 转座子的移除率和再插入率(图 4)。所有数据均进行 3 次实验,取平均值。按照测定生长曲线的取样点,当细胞在半乳糖培养基中诱导培养 0,7,14,24,27,30,34,38,49 h,在每个时间点分别取 300 个细胞涂布于 SD 平板,SD-Ade 平板以及 SD-Ade-His 平板。根据式(1)和式(2),计算转座子移除率和再插入率。实验结果表明:随着培养时间增加,移除率持续上升(图 4(b))。当 *PBase* 诱导 27 h 后,转座子再插入率停止增加,之后一段时间内再插入率出现下降,接着再逐渐增加(图 4(c))。作者推测已经插入酵母基因组的转座子在 *PBase* 的作用下被再次从插入位点移除,导致再插入率出现下降。之后再次增加是因为被再次移除的转座子又被再次插入基因组,转座子进行二次转座。根据曲线,当 *PBase* 诱导酵母生长 27 h 时,移除率达到 10.57%,再插入率达到 2.59%。从酵母生长曲线可以看出,经过 27 h 诱导,酵母处于对数生长期,细胞生长状态良好,且 *PB* 转座子未发生二次转座。因此本研究可以选择 27 h 作为 *PB* 转座的诱变时间。



图4 *PB* 转座子的转座效率Fig. 4 Transposition efficiency of *PB*

2.3 转座过程中 *PB* 转座子拷贝数的检测

根据 *PB* 移除率和再插入率曲线, 研究中选取 27 h 作为菌株诱变时间。酿酒酵母中 *PBase* 诱导 *PB* 转座子发生插入突变后, 作者在 SD-Ade-His 平板上随机挑取了 *PB* 转座子从原始位点移除并进行再插入的 43 个酵母菌落, 提取每个菌株的基因组, 用于检查其中的 *PB* 插入数以及插入基因位点。通过 1.4 节中所述的巢式 PCR 技术扩增插入 *PB* 转座子的 DNA 区域。核酸凝胶电泳结果显示, 从这些菌落基因组中可扩增出多种不同大小的片段 (图 5), 说明 *PBase* 诱导后 *PB* 转座子可再次随机插入酵母基因组中。且每个基因组样品均只能扩增出一条 DNA 片段, 说明 *PB* 转座子在转座过程中仍维持初始的单拷贝, 不会发生复制。表 4 列出了部分 *PB* 转座子插入的基因序列, 其中近 23% 的 *PB* 转座子插入酵母基因编码框中, 影响基因功能正常表达, 引起突变。且被 *PB* 转座子插入编码框的 8 个基因均为非必须基因, 说明转座子在诱变时更倾向插入非必须基因。其余 77% 的转座子可插入基因启动子区域或者终止子区域, 通过影响基因表达量改变相应性状。在原始筛选菌株中, *PB* 转座子位于第 15 号染色体的 *ADE2* 基因编码框。经过诱导转座后, *PB* 转座子可随机插入酵母基因组其他染色体 (表 4)。这些结果说明使用本研究所构建的 *PB* 转座子系统进行筛选时, 在一个酵母菌株中只含有一个转座子插入导致的突变位点, 且插入位点随机, 均匀分布于酵母基因组, 并可快速检测该插入基因, 进一步证明此系统可应用于酿酒酵母菌株中的基因筛选。

图5 *PB* 插入位点扩增片段Fig. 5 Genomic amplified bands of *PB* insertion sites表4 突变菌株中 *PB* 插入位点Table 4 *PB* insertion sites in mutant strains

突变菌株编号	<i>PB</i> 插入基因位点	染色体
1	<i>ADE2</i> 基因与 <i>AFI1</i> 基因之间, 靠近 <i>AFI1</i> 基因终止子区域	chr15
2	<i>ASE1</i> 基因启动子区域	chr15
3	<i>RPL19A</i> 基因终止子区域与 <i>MIS1</i> 基因终止子区域	chr2
4	<i>INP51</i> 基因与 <i>YIL001W</i> 基因之间, 靠近 <i>INP51</i> 基因启动子区域	chr9
5	<i>SCY1</i> 基因与 <i>GUP1</i> 基因之间, 靠近 <i>SCY1</i> 基因启动子区域	chr7
6	<i>RGA1</i> 编码区	chr15
7	<i>YKL162C</i> 编码区	chr11
8	<i>AFI1</i> 编码区	chr15
9	<i>RDN25-1</i> 基因与 <i>RDN37-1</i> 基因之间	chr12
10	<i>YBR139W</i> 启动子区域	chr2
11	<i>TRK1</i> 终止子区域	chr10
12	<i>FZO1</i> 启动子区域	chr2
13	<i>TEF1</i> 启动子区域	chr16
14	<i>APD1</i> 编码框	chr2
15	<i>MRPL23</i> & <i>RPB2</i> 终止子区域	chr15
16	<i>YNL143C</i> 编码框	chr14
17	<i>LEA1</i> 编码框	chr16
18	<i>FUI1</i> 启动子区域	chr2
19	<i>IDH2&SIA1</i> 终止子区域	chr15
20	<i>PLB1</i> 启动子区域	chr13
21	<i>VTH1&IMA3</i> 终止子区域	chr9
22	<i>CCH1</i> 编码框	chr7
23	<i>PHR1</i> 终止子区域	chr15
24	<i>YGR012W</i> 启动子区域	chr7
25	<i>UBP2</i> 启动子区域与 <i>CAT5</i> 终止子区域之间	chr15
26	<i>PMP2</i> 基因与 <i>GTT3</i> 基因之间	chr5
27	<i>MMS4</i> 基因与 <i>FES1</i> 基因之间	chr2
28	<i>YOR387C</i> 启动子区域	chr15
29	<i>SAM35</i> 基因与 <i>STE12</i> 基因之间	chr8
30	<i>PFK1</i> 基因与 <i>YGR240C-A</i> 基因之间	chr7
31	<i>MUD2</i> 编码框	chr11
32	<i>COQ6</i> 启动子区域与 <i>GND2</i> 启动子区域之间	chr7
33	<i>DNF2</i> 启动子区域	chr4
34	<i>DYN1</i> 启动子区域与 <i>RHO4</i> 启动子区域之间	chr11
35	<i>ARG4</i> 启动子区域	chr8

3 讨论

来源于粉纹夜蛾的 *piggyBac* 转座子可以运用在多种生物中,除了昆虫细胞外,还可应用于酵母,原生动物,植物和脊椎动物等^[17]。*PB* 转座子已被应用为一种基因编辑方法,进行转基因和基因突变。研究昆虫和小鼠基因功能时,可使用 *PB* 转座子实现插入型突变^[22-23]。已有研究报道运用 *PB* 转座子在裂殖酵母中进行基因筛选^[24-25]。运用 *PB* 转座子和同属 *PB* 家族来源于棕蝙蝠 (*Myotis lucifugus*) 的 *piggyBat* 基因元件,可在酿酒酵母中实现体内、外转座^[15,26]。此外,检测 *PB* 转座子移除和插入的分析方法也简便易行。然而,还没有在酿酒酵母体内用 *PB* 转座子进行目的基因筛选的报道。本研究在酿酒酵母中构建了 *PB* 转座子筛选系统。首先将 *PB* 转座子插入酿酒酵母 *ADE2* 基因编码框,当 *PB* 转座酶表达时,*PB* 转座子从原始位点移除并再次插入基因组中的其他位置,发生转座引起插入突变。作者随机挑选了 43 个被 *PB* 转座子插入突变的酵母单菌落,并检测其基因组中 *PB* 转座子数目及插入位点。实验发现所有的酵母细胞只含有一个 *PB* 插入位点且插入位点十分随机。有研究表明,*PB* 转座子在裂殖酵母中进行转座时,由于 *PB* 转座发生在细胞分裂 S 期或者 G2 期,8% 的酵母细胞中 *PB* 转座子发生复制^[25,27]。本研究构建的系统中,原始 *PB* 转座子位于基因组中,在转座过程中不会发生复制仍可维持单拷贝。由于在裂殖酵母的 *PB* 系统中,*PB* 转座子位于

低拷贝的外源质粒上,这一原始位点的差异很可能是造成 *PB* 转座子在两个不同的菌株中拷贝数不同的原因。

利用本研究中构建的 *PB* 转座子系统进行体内突变有以下优势:1)与传统化学诱变相比,诱导 *PB* 转座酶表达就可以使转座发生,避免了化学诱变剂的使用,不会对细胞造成其他伤害。2)*PB* 转座子在一个细胞基因组内只有一个插入位点,突变基因单一有利于细胞突变型的鉴定和分析。3)*PB* 转座子插入位点的检测通过 PCR 技术和基因测序即可实现,简便快速。而鉴定传统诱变导致突变的相关基因需要使用文库进行质粒回补,耗时长并且操作复杂。4)与 *Sleeping beauty* (*SB*) 转座子相比,*PB* 转座子移除后在原始插入位点不留任何足迹,但 *SB* 转座子被移除后会在原始位点留下 3 个碱基,产生移除痕迹^[28]。5)在半乳糖启动子的调控下,可以通过再次诱导表达 *PBase* 转座酶,使 *PB* 转座子从插入位点移除,回复突变。

4 结语

本研究中所构建的酿酒酵母 *piggyBac* 转座子基因筛选系统,可有效应用于酿酒酵母进行相关基因筛选。后期可应用该 *PB* 筛选系统对影响酿酒酵母中重要蛋白功能的基因进行筛选。未来还可通过引入下一代测序技术扩大检测范围,在全基因组范围内验证突变位点。

参考文献:

- [1] SCHEKMAN R. Genetic and biochemical analysis of vesicular traffic in yeast [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 1992, 4 (4): 587-592.
- [2] LAWRENCE C W. Classical mutagenesis techniques[J]. *Methods in Enzymology*, 1991, 194(1): 273-281.
- [3] SHENG Cui, ZHANG Yiping, LU Maolin. Study on breeding up high-yield strain of guanosine by protoplast mutagenesis[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2009, 28(2): 279-83. (in Chinese)
- [4] ROSE M D, BROACH J R. Cloning genes by complementation in yeast[J]. *Methods in Enzymology*, 1991, 194(4): 195-230.
- [5] HORECKA J, JIGAMI Y. Identifying tagged transposon insertion sites in yeast by direct genomic sequencing[J]. *Yeast*, 2000, 16 (10): 967-970.
- [6] KUMAR A, SNYDER M. Genome-wide transposon mutagenesis in yeast[J]. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2000, 13 (3): 1-15.
- [7] ROSS-MACDONALD P, SHEEHAN A, FRIDDLE C, et al. Transposon mutagenesis for the analysis of protein production, function, and localization[J]. *Methods in Enzymology*, 1999, 303(3): 512-532.
- [8] VIDAN S, SNYDER M. Large-scale mutagenesis: yeast genetics in the genome era [J]. *Current Opinion in Biotechnology*,

- 2001, 12(1):28-34.
- [9] GARFINKEL D J. Insertional mutagenesis by Ty elements in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **Methods in Molecular Biology**, 1996, 53:227-237.
- [10] KIDWELL M G, LISCH D R. Transposable elements and host genome evolution [J]. **Trends in Ecology & Evolution**, 2000, 15(3):95-99.
- [11] PLASTERK R H. The origin of footprints of the Tc1 transposon of *Caenorhabditis elegans* [J]. **Embo Journal**, 1991, 10(7):1919-1925.
- [12] WEIL C F, KUNZE R. Transposition of maize Ac/Ds transposable elements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **Nature Genetics**, 2000, 26(2):187-190.
- [13] CARY L C, GOEBEL M, CORSARO B G, et al. Transposon mutagenesis of baculoviruses; analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses[J]. **Virology**, 1989, 172(1):156-169.
- [14] FRASER M J, CARY L, BOONVISUDHI K, et al. Assay for movement of Lepidopteran transposon IFP2 in insect cells using a baculovirus genome as a target DNA[J]. **Virology**, 1995, 211(2):397-407.
- [15] MITRA R, FAIN-THORNTON J, CRAIG N L. piggyBac can bypass DNA synthesis during cut and paste transposition [J]. **Embo Journal**, 2008, 27(7):1097-1109.
- [16] THIBAUT S T, SINGER M A, MIYAZAKI W Y, et al. A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac[J]. **Nature Genetics**, 2004, 36(3):283-287.
- [17] YUSA K. *piggyBac* transposon[J]. **Microbiology Spectrum**, 2015, 3(2):875-892.
- [18] YANG Huanhuan, WEI Feng, LIU Quan. Advance in application of *piggyBac* transposon[J]. **Progress in Veterinary Medicine**, 2010, 31(12):91-94. (in Chinese)
- [19] LONGTINE M S, DEMARINI D J, SHAH N G, et al. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Yeast**, 1998, 14(10):953-961.
- [20] YUSA K, ZHOU L, LI M A, et al. A hyperactive *piggyBac* transposase for mammalian applications [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2011, 108(4):1531-1536.
- [21] YUSA K, RASHID S T, STRICKMARCHAND H, et al. Targeted gene correction of α 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells[J]. **Nature**, 2011, 478(7369):391-394.
- [22] DING S, WU X, LI G, et al. Efficient transposition of the *piggyBac* (PB) transposon in mammalian cells and mice [J]. **Cell**, 2005, 122(3):473.
- [23] HANDLER A M. Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the *piggyBac* transposon vector[J]. **Insect Molecular Biology**, 1999, 8(4):449-457.
- [24] LI J, DU L L. *piggyBac* transposon-based insertional mutagenesis for the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*[J]. **Methods in Molecular Biology**, 2014, 1163(6):213-222.
- [25] LI J, ZHANG J M, LI X, et al. A *piggyBac* transposon-based mutagenesis system for the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* [J]. **Nucleic Acids Research**, 2011, 39(6):40-51.
- [26] MITRA R, LI X, KAPUSTA A, et al. Functional characterization of piggyBat from the bat *Myotis lucifugus* unveils an active mammalian DNA transposon [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2013, 110(1):234-239.
- [27] ENGELS W R, JOHNSONSCHLITZ D M, EGGLESTON W B, et al. High-frequency P element loss in *Drosophila* is homolog dependent[J]. **Cell**, 1990, 62(3):515-525.
- [28] LUO G, IVICS Z, IZSVAK Z, et al. Chromosomal transposition of a Tc1/mariner-like element in mouse embryonic stem cells[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1998, 95(18):10769-10773.