

酵母流式细胞荧光分选流程

Fluorescence Activated Cell Sorting of Yeast Cells Using Flow Cytometry

李婷婷, 李典范*

中国科学院大学, 生物化学与细胞生物学研究所, 上海

*通讯作者邮箱: dianfan.li@sibcb.ac.cn

引用格式: 李婷婷, 李典范. (2019). 酵母流式细胞荧光分选流程. *Bio-101* e1010332. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010332.

How to cite: Li, T. T. and Li, D. F. (2019). Fluorescence Activated Cell Sorting of Yeast Cells Using Flow Cytometry. *Bio-101* e1010332. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010332. (in Chinese)

摘要: 酵母文库筛选技术是蛋白质或多肽定向进化研究中的一个重要手段。利用荧光蛋白报告基因, 荧光流式分选技术可以将高表达融合蛋白的突变体进行分离, 通过鉴定后获得序列进行重组表达。此外, 还可以在酵母表面展示功能蛋白质, 如纳米抗体 (单域抗体) 等。当纳米抗体结合带荧光标记的目的蛋白后, 荧光流式分选技术同样可以将表达有亲和力高的纳米抗体的酵母进行分离鉴定, 从而达到抗体的定向进化。本文以绿色荧光蛋白 (GFP) 的纳米抗体筛选为例, 介绍流式检测及分选技术在酵母文库筛选中的应用。

关键词: 酵母文库, 纳米抗体筛选, 流式检测及分选

研究背景: 本文的酵母展示文库是一个合成库 (非免疫库), 可针对任何靶蛋白进行筛选 (Cherf 和 Cochran, 2015; McMahon 等, 2018), 其设计如图 1 所示。首先, 所有的纳米抗体的 C 端融合了一个 HA 标签, 在与荧光标记的 HA 抗体孵育的情况下, 可用于检测酵母细胞中纳米抗体的表达情况。而 HA 标签 C 端则融合一个长铰链区连接到酵母细胞表面实现有效的展示 (McMahon 等, 2018)。其次, 展示库中含有约 5×10^8 种纳米抗体序列, 其区别在于 3 个可变区的氨基酸序列 (McMahon 等, 2018)。在实际操作中, 因为文库数量巨大, 一般先采用磁珠分选的方法对能结合靶蛋白的酵母进行富集, 然后再采用更精确的荧光流式分选进行进一步富集 (Schutz 等, 2016; McMahon 等, 2018)。流式荧光分选时, 荧光信号一般来自于靶蛋白质上的化学标记, 如对赖氨酸进行特异标记的带有 N-羟基琥珀酰亚胺酯修饰的 Alexa Fluor 647 或 fluorescein isothiocyanate

(FITC) 等染料。为了方便描述，本文采用 GFP 作为靶蛋白，省略了荧光标记步骤。

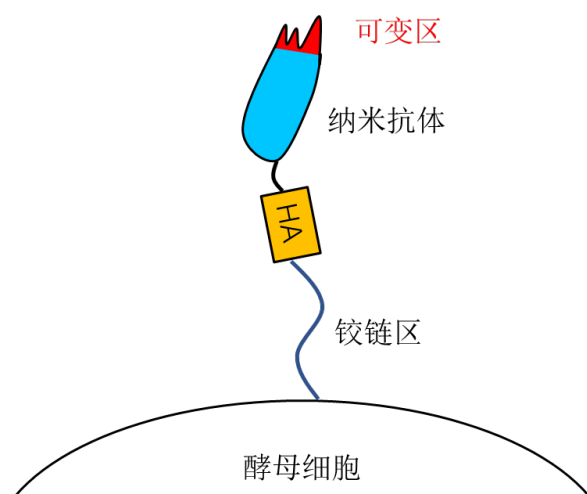


图 1. 纳米抗体展示库示意图。纳米抗体的 C 端融合了一个 HA 标签，再通过一个铰链区结合到酵母细胞壁上实现展示 (McMahon 等, 2018)。

材料与试剂

1. 孔径为 0.22 μm 的滤膜 (Tansoole, catalog number: 02026463)
2. 孔径为 40 μm 的滤网 (Falcon, catalog number: 352340)
3. 底部透明的 96 孔板 (Nunc, catalog number: 8494)
4. 细胞培养板 24 孔 [洁特, catalog number: TCP000024(EFU225)]
5. HA 小鼠源抗体 (Sigma-Aldrich, catalog number: H3663-200 μl)
6. Cy3 标记的山羊抗小鼠二抗 (Jackson, catalog number: 115-165-166)
7. 牛血清白蛋白 (Aladdin, catalog number: A104912-100G)
8. 纳米抗体酵母表面展示库 (哈佛大学 Andrew Kruse 教授组构建)
9. 色氨酸缺陷的氨基酸混合物 (Sigma-Aldrich, catalog number: Y1876)
10. 酵母基础氮源 (BD, catalog number: 291930-10 KG)
11. 柠檬酸钠 (Aladdin, catalog number: S116315-1KG)
12. 柠檬酸 (Sigma-Aldrich, catalog number: C2404-500G)
13. 葡萄糖 (国药, catalog number: 14431-43-7)
14. 链霉素青霉素 (美仑生物, catalog number: MA0110)
15. 半乳糖 (Ameresco, catalog number: 0637-500G)

16. HEPES (Ameresco, catalog number: 0511-1KG)
17. 氯化钠 (Ameresco, catalog number: 0241-10KG)
18. 麦芽糖 (Sigma-Aldrich, catalog number: M5885-100G)
19. 琼脂粉 (国药, catalog number: 10000561)
20. 氢氧化钠
21. Yglc4.5-Trp 培养基 (见溶液配方)
22. Ygal4.5-Trp 培养基 (见溶液配方)
23. Yglc4.5-Trp 平板 (见溶液配方)
24. 缓冲液 A (见溶液配方)
25. 1 M HEPES/Na (见溶液配方)

仪器设备

1. 摇床 (知楚, model: ZQZY-C)
2. 酶标仪 (Spectra Max, model: M2)
3. 旋转培养器 (Kylin-Bell lab instruments, model: QB-128)
4. 离心机 (Eppendorf, model: 5424R)
5. 流式细胞仪 (BD, model: LSRFortessa; Beckman, model: Beckman Coulter Moflo-XDP)
6. 超低温冰箱 (Eppendorf, model: CryoCube F570)
7. 水浴锅 (精宏, model: XMTD-8222)
8. 培养箱 (上海博迅, model: SPX-100B-Z)
9. 高压灭菌锅

实验步骤

1. 酵母细胞培养及纳米抗体诱导表达

- 1.1 酵母表面展示库复苏: 将构建好的酵母表面展示库 (5×10^9 个细胞) 从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中取出, 在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中迅速化开细胞后转接到 250 ml Yglc4.5-Trp 培养基中, 在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床中 250 rpm 震荡培养 24 h。

- 1.2 酵母表面展示库诱导：取细胞培养液，用单蒸水稀释 10 倍，加入 340 μ L 稀释液到 96 孔板中，在酶标仪中测定细胞的 OD₆₀₀ 值。根据测定的 OD₆₀₀ 值，用 Ygal4.5-Trp 培养基将细胞稀释到 OD₆₀₀ 值为 0.6，在 25 °C 摇床中 250 rpm 震荡培养 17 h，诱导蛋白表达。
2. 流式检测细胞表面纳米抗体表达
 - 2.1 测定诱导后细胞的密度：在 96 孔板中用酶标仪测定细胞的 OD₆₀₀ 值，根据 OD₆₀₀ 值计算细胞密度 (注意事项 1)。
 - 2.2 清洗细胞：从诱导的细胞中取两份约 1×10^6 个细胞到含有 0.8 ml 缓冲液 A 的 1.5 ml 离心管中。3,000 $\times g$, 4 °C 离心 1 min，弃上清。
 - 2.3 一抗标记细胞：按 1:5,000 比例将 HA 抗体稀释到缓冲液 A 中，用 0.5 ml 稀释好的抗体重悬其中一份细胞，作为实验组。用 0.5 ml 缓冲液 A 重悬另一份细胞，作为对照组。在 4 °C 旋转培养 1 h。
 - 2.4 清洗细胞：3,000 $\times g$, 4 °C 离心 1 min，弃上清。用 1 ml 缓冲液 A 重悬细胞，3,000 $\times g$, 4 °C 离心 1 min，弃上清。
 - 2.5 荧光二抗标记细胞：按 1:500 比例将 Cy3 标记的山羊抗小鼠的二抗稀释到缓冲液 A 中，用 0.5 ml 稀释后的抗体重悬对照组细胞和实验组细胞 (注意事项 3)。在 4 °C 避光旋转培养 1 h。
 - 2.6 清洗细胞：3,000 $\times g$, 4 °C 离心 1 min，弃上清。用 1 ml 缓冲液 A 重悬细胞，3,000 $\times g$, 4 °C 离心 1 min，弃上清。
 - 2.7 流式检测蛋白表达：用 0.5 ml 缓冲液 A 重悬细胞，用 40 μ m 滤网过滤细胞后，流式细胞仪检测蛋白的表达。根据 Cy3 的荧光信号选择 PE561 通道进行检测，具体流式检测的方法参见流式细胞仪的操作说明。
3. 流式分选能结合 GFP 的酵母细胞群
 - 3.1 清洗细胞：将经过两轮磁珠分选而富集带有能结合 GFP 蛋白的纳米抗体的酵母细胞复苏后，按照上述步骤 1 和 2 进行诱导和表达检测。从诱导的细胞中取两份约 3×10^7 个细胞到含有 0.8 ml 缓冲液 A 的 1.5 ml 离心管中。3,000 $\times g$, 4 °C 离心 1 min，弃上清。

- 3.2 靶蛋白 GFP 与酵母细胞孵育：用 0.5 ml 缓冲液 A 重悬两份细胞，在其中一份细胞中加入 1 μ M (30 mg L⁻¹) 纯化的 GFP 蛋白，作为实验组，另一份细胞中不加 GFP 蛋白，作为阴性对照组。在 4 °C 旋转培养 1 h。
- 3.3 清洗细胞：3,000 $\times$ g，4 °C 离心 1 min，弃上清。用 1 ml 缓冲液 A 重悬细胞，3,000 $\times$ g，4 °C 离心 1 min，弃上清。
- 3.4 流式分选细胞：用 0.5 ml 缓冲液 A 重悬细胞，用 40 μ m 滤网过滤细胞后，进行流式分选。根据 GFP 的荧光信号选择 FITC 通道，分选 FITC 阳性的细胞群。流式分选过程参见流式细胞仪的操作手册。
4. 流式检测筛选能结合 GFP 的单克隆酵母
 - 4.1 分离单克隆：取出部分分选后的细胞均匀涂布到 Yglc4.5-Trp 平板上，30 °C 培养两天。
 - 4.2 单克隆酵母培养诱导：挑取单克隆到 0.7 ml Yglc4.5-Trp 培养基中，在 30 °C 摇床中 180 rpm 震荡培养 24 h。测定细胞 OD₆₀₀ 值，用 Ygal4.5-Trp 培养基稀释细胞，使得 OD₆₀₀ 最终为 0.6，在 25 °C 摇床中 180 rpm 震荡培养 17 h，诱导蛋白表达。
 - 4.3 流式检测筛选结合 GFP 的单克隆：取 1 $\times$ 10⁶ 个诱导后的细胞到含有 0.8 ml 缓冲液 A 的 1.5 ml 离心管中。3,000 $\times$ g，4 °C 离心 1 min，弃上清。用含有 1 μ M GFP 的缓冲液 A 重悬细胞，并设置一个不加 GFP 的阴性对照组，在 4 °C 旋转培养 1 h 后，3,000 $\times$ g，4 °C 离心 1 min，弃上清。用 1 ml 缓冲液 A 清洗细胞一次后，用 0.5 ml 缓冲液 A 重悬细胞。用 40 μ m 滤网过滤细胞后，流式细胞仪检测 FITC 通路信号。筛选 FITC 阳性的克隆，即很有可能是能够结合 GFP 的克隆。

结果与分析

1. 酵母表面展示库的诱导表达检测

在进行纳米抗体筛选之前，首先要确定的是纳米抗体在酵母细胞中的表达。图 2 展示的是一个典型的纳米抗体表达检测的结果。比较实验组和对照组的流式分选结果可以发现，诱导后的细胞有一群荧光较高的细胞。通过软件分析计数发现这一群细

胞占有细胞数目的 32.3 %，即在检测的细胞中，32.3 % 的细胞表达了纳米抗体。

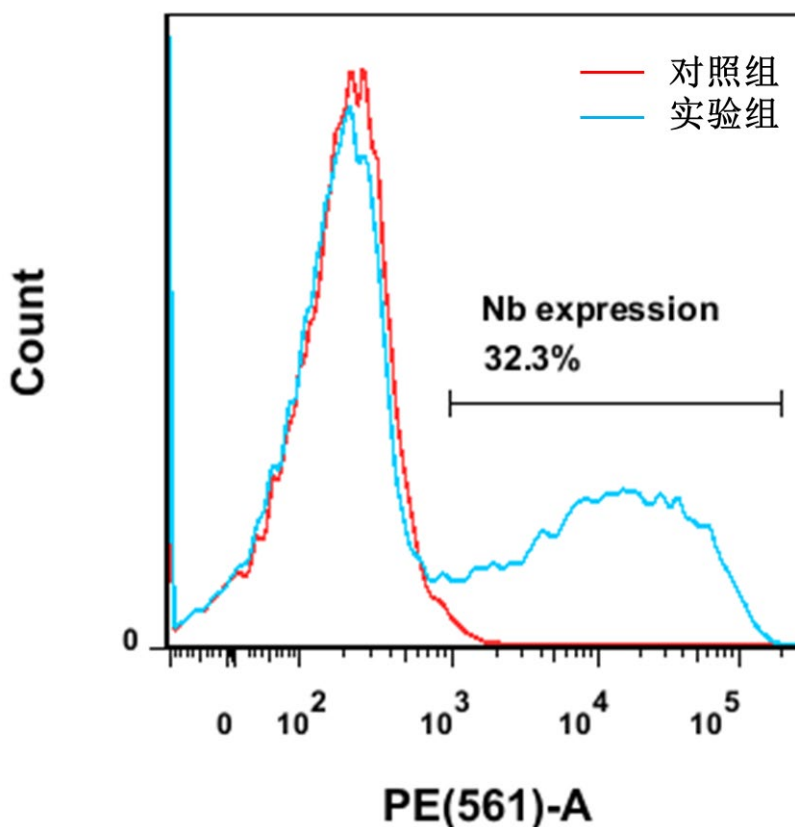


图 2. 流式检测酵母细胞表面展示蛋白的表达. 利用抗原抗体的特异性结合，通过检测 Cy3 信号 (PE561 通道) 来检测目的蛋白的表达。红线是未标记抗体的对照组，蓝线是标记抗体的实验组，Nb 是纳米抗体的简称。

2. 基于流式检测的克隆筛选

在分选出来的细胞中，不同细胞表面的纳米抗体与 GFP 的结合特异性和亲和力不同，我们希望能够筛选到高亲和力的克隆。因此，在分选结束后，我们需要再利用流式检测筛选单克隆。如果细胞能够结合更多的 GFP 分子，细胞的绿色荧光信号更强，那么在流式检测中使用的 FITC 的荧光通路信号会越强，最终筛选 FITC 信号强的克隆，再进行下游的生化实验验证筛选的结果。典型的实验结果如图 3 所示。

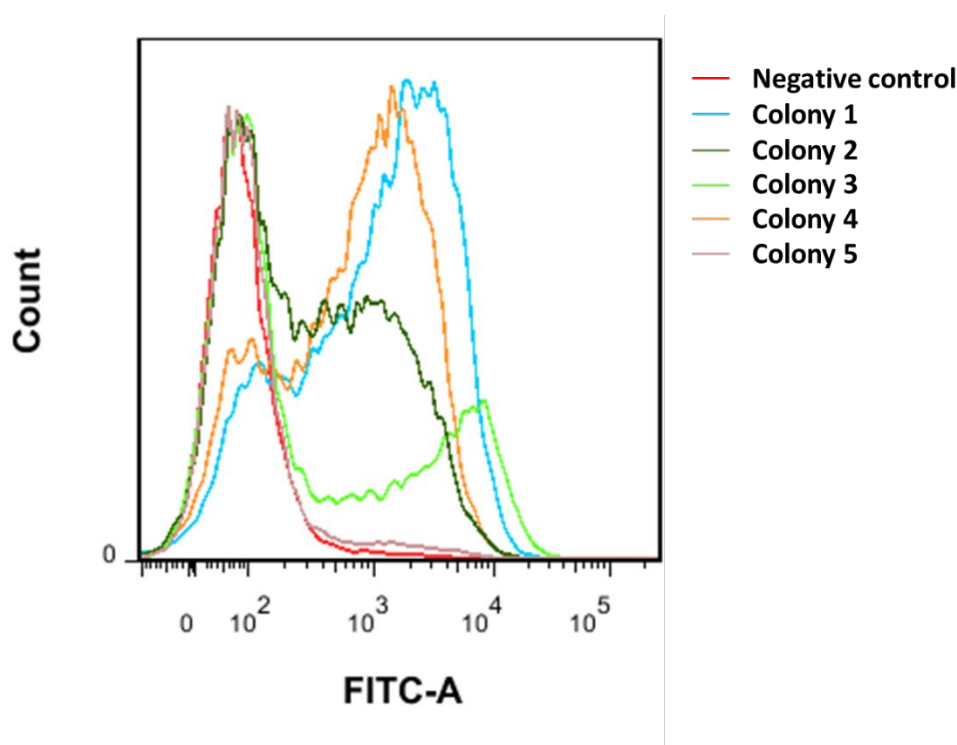


图 3. 基于流式检测的克隆筛选。 利用 GFP 的荧光信号，通过检测 FITC 信号来筛选结合 GFP 的克隆。图中阴性对照是没有加 GFP 的细胞，FITC 信号强度低。Colony 1-5 是筛选的单克隆，诱导后与 GFP 孵育的样品，检测发现不同克隆之间 FITC 信号差异比较大，其中 Colony 1 的 FITC 信号强度高于其他克隆，可能是一个结合 GFP 比较强的克隆。

注意事项

1. 细胞密度计算：

根据校准，当细胞 OD₆₀₀ 值为 1 时，细胞的密度为 1.5×10^7 个/ml。则：

细胞密度 = OD₆₀₀ × 稀释倍数 × (1.5×10^7) 个/ml。

2. 在缓冲液 A 中根据特定蛋白的特定需求可以加入配体等添加物。缓冲液 A 中的麦芽糖可以提高酵母分选后细胞的存活率。
3. 用含有 Cy3 二抗的缓冲液重悬对照组细胞，可以排除能够被 Cy3 染色的假阳性酵母细胞。

溶液配方

1. Yglc4.5-Trp 培养基 (1 L)

1.92 g 色氨酸缺陷的氨基酸混合物

6.7 g 酵母基础氮源

11.86 g 柠檬酸钠

6.76 g 柠檬酸

22 g 葡萄糖

10 ml 链霉素青霉素

调节 pH 到 4.5

用单蒸水定容到 1 L, 用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 保存在 4 °C

2. Ygal4.5-Trp 培养基 (1 L)

1.92 g 色氨酸缺陷的氨基酸混合物

6.7 g 酵母基础氮源

11.86 g 柠檬酸钠

6.76 g 柠檬酸

22 g 半乳糖

10 ml 链霉素青霉素

调节 pH 到 4.5

用单蒸水定容到 1 L, 用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 保存在 4 °C

3. Yglc4.5-Trp 平板 (1 L)

称取 20 g 琼脂粉, 加入 500 ml 单蒸水, 高压灭菌

1.92 g 色氨酸缺陷的氨基酸混合物

6.7 g 酵母基础氮源

11.86 g 柠檬酸钠

6.76 g 柠檬酸

22 g 葡萄糖

10 ml 链霉素青霉素

调节 pH 到 4.5, 用单蒸水定容到 500 ml

用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 加入到高压灭菌的琼脂粉中, 制备平

4. 缓冲液 A

20 M HEPES/Na, pH 7.5

150 mM 氯化钠

0.1% (w/v)牛血清白蛋白

5 mM 麦芽糖

5. 1 M HEPES/Na

称取 11.9 g HEPES

加入 30 ml Milli Q 水

溶解后用氢氧化钠调节 pH 至 7.5

定容至 50 ml

用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌，室温下保存

致谢

感谢哈佛大学 Andrew Kruse 教授提供纳米抗体酵母展示库。

参考文献

1. Cherf, G. M. and Cochran, J. R. (2015). [Applications of yeast surface display for protein engineering](#). *Methods Mol Biol* 1319: 155-175.
2. McMahon, C., Baier, A. S., Pascolutti, R., Wegrecki, M., Zheng, S., Ong, J. X., Erlandson, S. C., Hilger, D., Rasmussen, S. G. F., Ring, A. M., Manglik, A. and Kruse, A. C. (2018). [Yeast surface display platform for rapid discovery of conformationally selective nanobodies](#). *Nat Struct Mol Biol* 25(3): 289-296.
3. Schutz, M., Schoppe, J., Sedlak, E., Hillenbrand, M., Nagy-Davidescu, G., Ehrenmann, J., Klenk, C., Egloff, P., Kummer, L. and Pluckthun, A. (2016). [Directed evolution of G protein-coupled receptors in yeast for higher functional production in eukaryotic expression hosts](#). *Sci Rep* 6: 21508.