

酿酒酵母基因组位置效应对外源基因表达的影响

张文政^{1,2}, 唐继军^{2,3}, 李炳志^{1,2}, 元英进^{1,2}

1 天津大学 系统生物学教育部重点实验室, 天津 300072

2 天津大学 化工学院 天津化学化工协同创新中心, 天津 300072

3 天津大学 计算机与科学技术学院, 天津 300072

张文政, 唐继军, 李炳志, 等. 酿酒酵母基因组位置效应对外源基因表达的影响. 生物工程学报, 2016, 32(7): 901-911.

Zhang WZ, Tang JJ, Li BZ, et al. Effect of integration loci of genome on heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Chin J Biotech, 2016, 32(7): 901-911.

摘 要: 外源基因元件和模块在底盘细胞中发挥特定功能是合成生物学研究的基本过程, 而外源元件和模块在基因组中的位置对其功能的实现具有显著影响。为了系统、全面地表征酿酒酵母基因组位置效应对外源基因的表达影响, 以绿色荧光蛋白为报告基因, 通过双交换同源重组方法, 对酿酒酵母单基因敲除库进行高通量转化, 构建酿酒酵母基因组单位点荧光标记菌株库。结合流式细胞术和高通量测序技术对单位点荧光标记库菌株进行分析, 构建高表达位点库和低表达位点库, 共发现促进绿色荧光蛋白表达的位点 428 个, 抑制绿色荧光蛋白表达的位点 444 个。通过分析高、低表达位点在酵母染色体上的分布, 从全基因组尺度上对酿酒酵母基因组整合位置对基因表达的影响进行表征。本研究可为酿酒酵母基因组位置效应的分布规律和产生机理研究提供重要参考, 对外源蛋白工业生产和合成生物学中的基因表达精细调控也具有重要的指导意义。

关键词: 合成生物学, 酿酒酵母, 染色体位置效应, 外源基因表达

Received: October 21, 2015; **Accepted:** December 4, 2015

Supported by: International Science and Technology Cooperation Program of China (No. 2015DFA00960), National Natural Science Foundation of China (No. 21390203), Tianjin Municipal Science and Technology Program (No. 13RCGFSY19800).

Corresponding author: Bingzhi Li. Tel: +86-22-27402503; Fax: +86-22-27403888; E-mail: bzli@tju.edu.cn

国家国际科技合作项目 (No. 2015DFA00960), 国家自然科学基金 (No. 21390203), 天津市科技计划项目 (No. 13RCGFSY19800) 资助。

Effect of integration loci of genome on heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*

Wenzheng Zhang^{1,2}, Jijun Tang^{2,3}, Bingzhi Li^{1,2}, and Yingjin Yuan^{1,2}

1 Key Laboratory of Systems Bioengineering (Ministry of Education), Tianjin University, Tianjin 300072, China

2 SynBio Research Platform, Collaborative Innovation Center of Chemical Science and Engineering (Tianjin), School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

3 School of Computer Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

Abstract: Chromosomal integration of heterologous genes or pathways is preferred over the use of episomal plasmids for its inherently stability and thus more desirable in the industrial setting. However, the position of integration of heterologous genes in the genome influences the expression levels. In combination of high throughput transformation of the Yeast Knock-out Collection (YKO) and FACS analysis, the position effect on heterologous reporter gene *gfp* was identified across the whole genome in yeast. In total 428 high-expressed sites and 444 low-expressed sites were spotted, providing massive data to analyze patterns and reasons for region dependency of gene expression on the genome-wide scale.

Keywords: synthetic biology, *Saccharomyces cerevisiae*, chromosomal region, heterologous gene expression

酿酒酵母具有蛋白翻译后修饰功能,适合复杂结构蛋白的表达和功能发挥,被广泛应用于复杂化合物的生产^[1-3]。合成生物学领域的最新研究进展表明,外源基因元件和模块能够在酿酒酵母细胞中发挥功能,实现复杂天然化合物的生产^[4-6]。外源基因元件或模块通常以游离型质粒为载体存在于酿酒酵母细胞中,或插入酿酒酵母基因组。与游离型质粒相比,将外源基因元件或模块整合至酵母基因组具有可精确控制拷贝数、稳定强、无需抗生素或其他化合物的添加以维持筛选压力等优点。然而研究表明,酿酒酵母基因组对外源基因的表达存在明显的位置效应^[7],与插入位点相关的表观遗传效应能够影响外源基因的表达,插入本身可能会激活或者抑制某些基因,造成内源基因的异常表达和有毒代谢产物的积累。因此酿酒酵母基因组位置效应对外源基因表达的影响的研究具有重要意义。

目前,研究人员已在多种生物体系中发现基

因组位置效应的存在,如大肠杆菌^[8]、酿酒酵母^[9-10]、乳酸乳球菌^[11]、果蝇^[12]和人类细胞^[13]等。Yamane 等^[9]以 *lacZ* 为报告基因,将其整合至酵母III号染色体的不同位点,通过测定 β -半乳糖苷酶的活性表征 *lacZ* 的转录水平,对酵母III号染色体的位置效应进行了研究;Bai 等^[10]采用类似的方法,在酿酒酵母基因组上选取了 20 个可能适合外源基因整合的位点,对插入这些位点的 *lacZ* 基因的表达情况进行了测定,发现不同位点间 *lacZ* 的表达水平存在明显差异,最高可达 20 倍;Thomson 等^[14]的研究则采用了一种随机插入的策略,并未对报告基因的插入位置进行确定。上述研究仅对酿酒酵母的位置效应对外源基因表达的影响进行了初步探索,研究局限于有限位点或单条染色体,缺乏对整个酿酒酵母基因组的位置效应系统、全面的探究。

酿酒酵母单基因敲除库 (Yeast knock-out collection, 简称为 YKO)^[15]含有菌株 4 817 株,

每个菌株均有 1 个非必需基因的开放阅读框 (ORF) 被 *kanMX* 表达盒替代, 具有 G418 抗性。表达盒上下游各含有一个长度为 20 bp 的“条码区”识别区, 用于特异性识别被替换的非必需基因。本研究通过同源重组将 *kanMX* 表达盒替换为报告基因 *gfp*, 结合流式细胞分选技术和高通量测序技术, 构建酿酒酵母单位点荧光标记库、高表达位点库和低表达位点库, 实现对酿酒酵母基因组多位点上外源基因表达水平差异的表征。本研究方法具有高通量、能够精准定位 *gfp* 插入位置的特点, 不仅能够筛选出增强和抑制外源基因表达的位点, 而且能够从基因组尺度上揭示酵母位置效应的分布规律和产生机理。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

实验背景菌株均为 S288c 菌株 BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*)^[16]。以 BY4741 为背景菌株的酵母单基因敲除库由美国 Jef D. Boeke 教授实验室保存馈赠。大肠杆菌质粒 pUC19^[17], 酵母复制型质粒 pRS416^[18], 均为本实验室保存。带有 *gfp* 基因的质粒 pGRB2.3 由美国 Brendan Cormack 教授实验室保存馈赠。用于质粒扩增的菌株为大肠杆菌 DH5α, 购自北京博迈德生物技术有限公司。

1.2 培养基与试剂

YPD 培养基组成成分为 10 g/L 酵母浸粉, 20 g/L 蛋白胨, 20 g/L 葡萄糖。SD 培养基组成成分为 6.7 g/L 不含氨基酸的酵母氮源, 2 g/L 氨基酸混合物, 20 g/L 葡萄糖, 20 mg/L 组氨酸, 20 mg/L 色氨酸, SD-URA 缺陷型培养基添加 100 mg/L 亮氨酸, SD-LEU 缺陷型培养基添加 20 mg/L 尿嘧啶, 用 10 mol/L NaOH 调节 pH 至 6.5。LB 培养基组成

成分为 10 g/L 氯化钠, 5 g/L 酵母浸粉, 10 g/L 蛋白胨, 添加 0.1 mg/mL 氨苄霉素用于筛选。固体培养基添加 20 g/L 琼脂粉。培养含有 *kanMX* 基因的菌株细胞时, 培养基中额外添加 0.2 mg/mL G418。

培养基所用试剂购自北京鼎国生物技术有限公司; 质粒提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; *PfuUltra*TM 高保真 DNA 聚合酶购自美国 Stratagene 公司, 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自美国 Fermentas 公司; 转化所用 PEG3350、DMSO 购自美国 Sigma 公司, 鲑鱼精 DNA 购自北京鼎国生物技术有限公司。

1.3 表达盒构建

突变 pUC19 质粒去除 *Xba* I 酶切位点, 作为 *gfp* 基因表达载体。采用 OE-PCR 法^[19]构建整合型表达盒, 总长 3.9 kb, 由 5 个 DNA 片段组成: 与 *kanMX* 基因同源的上游同源臂和下游同源臂、酿酒酵母内源弱启动子 *ura3p*、*gfp* 开放阅读框与其相应的终止子和 *leu2* 营养筛选标记, PCR 引物见表 1。最终得到带有 *gfp* 表达盒的整合型质粒 pUC19M-1 (图 1)。

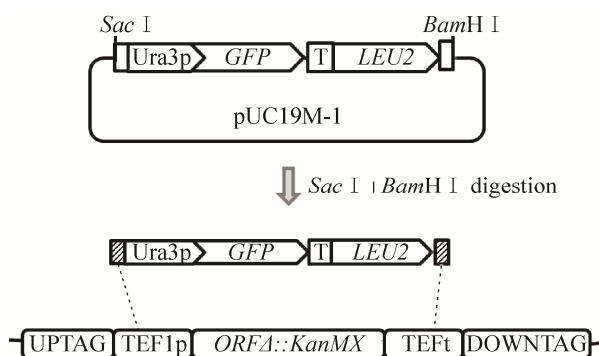


图 1 绿色荧光蛋白表达盒的构建及酿酒酵母单基因敲除库的插入整合示意图

Fig. 1 Construction of the *gfp* expression cassette and integration strategy.

1.4 酿酒酵母单位点荧光标记库的构建

利用大肠杆菌对整合型质粒 pUC19M-1 进行扩增, 酶切回收目的 DNA 片段 20 μg , 对酿酒酵母单基因敲除库进行转化。筛选出具有 LEU⁺G418⁻表型的转化子, 构建单位点荧光标记菌株库。将该菌株库在液体 SD-LEU 营养缺陷型培养基中进行培养以抑制假阳性细胞的生长。取部分培养后的细胞稀释涂布于 YPD 固体平板并翻印至 SD-LEU 营养缺陷型平板以统计酿酒酵母单位点荧光标记库的细胞阴性率。

1.5 酿酒酵母单位点荧光标记库的分选

将酿酒酵母单位点荧光标记库过夜培养, 去除培养基后悬于 PBS 缓冲液中, 细胞密度调

整至 1×10^7 个细胞/mL。用流式细胞仪对细胞进行分选, 根据细胞荧光蛋白表达强度的分布图谱 (图 2), 选取荧光蛋白表达量较高和较低的细胞, 分选出的细胞数分别占细胞总量 10%。将得到的细胞再次分选, 去除干扰细胞, 纯化细胞库, 形成高表达位点库和低表达位点库。

1.6 高/低表达位点库的测定与分析

提取酿酒酵母单基因敲除库、酿酒酵母单位点荧光标记库、高表达位点库和低表达位点库的基因组 DNA, 采用 Tag-array hybridization 法^[20]测定表达盒上下游“条码区”的 DNA 序列, 确定库中所含菌株和 *gfp* 基因插入位置。

表 1 构建 *gfp* 整合型表达质粒引物列表

Table 1 Primer for constructing the designer cassette for integrative transformation

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Re site	Amplicon size (bp)
<i>KanMXL</i> -fw	GTGCGAGCTCTCTGTTTAGCTTGCCTCGTC	<i>Sac</i> I	123
<i>KanMXL</i> -rv	AAGCTGTGGTATGGTGCACCTCAGATCTAATGTACG GGCGACAGTCA	<i>Bgl</i> II	
<i>ura3p</i> -fw	TGACTGTCGCCCCGTACATTAGATCTGAGTGCACCAT ACCACAGCTT	<i>Bgl</i> II	225
<i>ura3p</i> -rv	CTTCACCTTTAGACATGAATTCCTTCTAGAGGATTT ATCTTCGTTTCCTGCA	<i>Xba</i> I	
<i>gfp</i> -fw	TGCAGGAAACGAAGATAAATCCTCTAGAAGGAATT CATGTCTAAAGGTGAAG	<i>Xba</i> I	1 139
<i>gfp</i> -rv	TGGTTGCTAAGAGATTCGAACCTTAATTAAGGCGGT ACCTTTACCTCTATATC	<i>Pac</i> I	
<i>leu2</i> -fw	CGATATAGAGGTAAAGGTACCGCCTTAATTAAAGTT CGAATCTCTTAGCAACCA	<i>Pac</i> I	1 797
<i>leu2</i> -rv	TCTTTCCAGACTTGTTCAACAGTGGTCAGGTCATTG AGTGTT	—	
<i>KanMXR</i> -fw	AACACTCAATGACCTGACCACTGTTGAACAAGTCT GGAAAGA	—	537
<i>KanMXR</i> -rv	CGCGGATCCATTCGACACTGGATGGCG	<i>Bam</i> H I	

Restriction enzyme sites are indicated in bold.

表 2 酿酒酵母单位点荧光标记库、高表达位点库和低表达位点库中菌株表型验证

Table 2 Phenotype verification for strains in the starting pool (SP), high-expressed pool (HP) and low-expressed pool (LP)

	SP	HP	LP
Transformants plated	4 200	2 150	3 050
Incorrect phenotype	84	0	35
Negative rate (%)	2	0	1.1

2 结果与讨论

为了系统研究酿酒酵母基因组位置效应对外源基因表达的影响,本实验中对酿酒酵母单基因敲除库进行了高通量转化,以报告基因 *gfp* 替换单基因敲除菌株的 *kanMX* 序列。通过对转化子的表型筛选,得到 1.3×10^4 个具有 LEU^+G418^- 表型的转化子,构建酿酒酵母基因组单位点荧光标记菌株库。酿酒酵母单基因敲除库中共有菌株 4 817 株,根据计算,单位点荧光标记库对单基因敲除库的覆盖率为 2.6 倍,单个单基因敲除菌株被转化的概率为 92.8%。单基因敲除菌株库中存在部分生长缓慢菌株,在培养、转化过程中可能遗失;某些基因的缺失会对整合型转化产生影响^[21];此外,长片段外源 DNA 的整合型转化效率远低于游离型质粒转化。考虑上述因素,我们认为实验中所构建的酿酒酵母单点荧光标记库基本实现了对原单基因敲除库的替换。

与抗性筛选不同,营养缺陷型筛选过程中会产生假阳性转化子,为避免这些转化子影响后续的分选和测序,实验中对酵母单位点荧光标记库、高表达位点库和低表达位点库中菌株的表型进行了验证。在统计的 4 200 个单位点荧

光标记库菌株菌落中,表型为 LEU^- 的菌落 84 个,阴性率为 2% (表 2)。采用同样的方法对高、低表达位点库的细胞阴性率进行检测,结果显示高表达位点库的阴性率为 0%,低表达位点的阴性率为 1.1% (表 2)。由于经过营养缺陷型培养基中的传代培养和流式细胞仪的分选,两者的阴性率与单位点荧光标记库菌株阴性率相比均有明显降低。但是低位点表达库仍存在 1.1% 的假阳性细胞,这是由于流式细胞仪的分选受精度所限,未能将部分无荧光强度的细胞与荧光强度较低的细胞区分开来。由于后续的测序实验能够排除假阳性菌株,因此当库中细胞阴性率低于 2% 时,不会对后续实验结果造成显著影响。

利用高通量测序技术测定表达盒上下游“条码区”的 DNA 序列,确定酿酒酵母单位点荧光标记库中所含菌株和 *gfp* 基因插入位置。数据分析显示,酿酒酵母单位点荧光标记库中共含菌株 3 455 个,占原酵母单基因敲除库的 72%。分析测定结果少于酵母单基因敲除库菌株数的原因如下: 1) 在原始的 4 817 个菌株中,有部分菌株具有生长缓慢表型。这些菌株无论是在最开始的转化操作,还是后续的培养、分选和测序过程中均可能因为生长过于缓慢丢失。2) 基因的缺失和插入位置的不同会对转化效率造成影响^[21],使得部分菌株未能成功插入 *gfp* 报告基因。3) 分析和测序过程中会造成一部分菌株的缺失。

由酵母单位点荧光标记库的流式细胞分选图 (图 2) 可以看出,部分细胞的 *gfp* 表达量明显高于或低于其他细胞,说明处于这些位点上的 *gfp* 基因表达受位置影响较大。

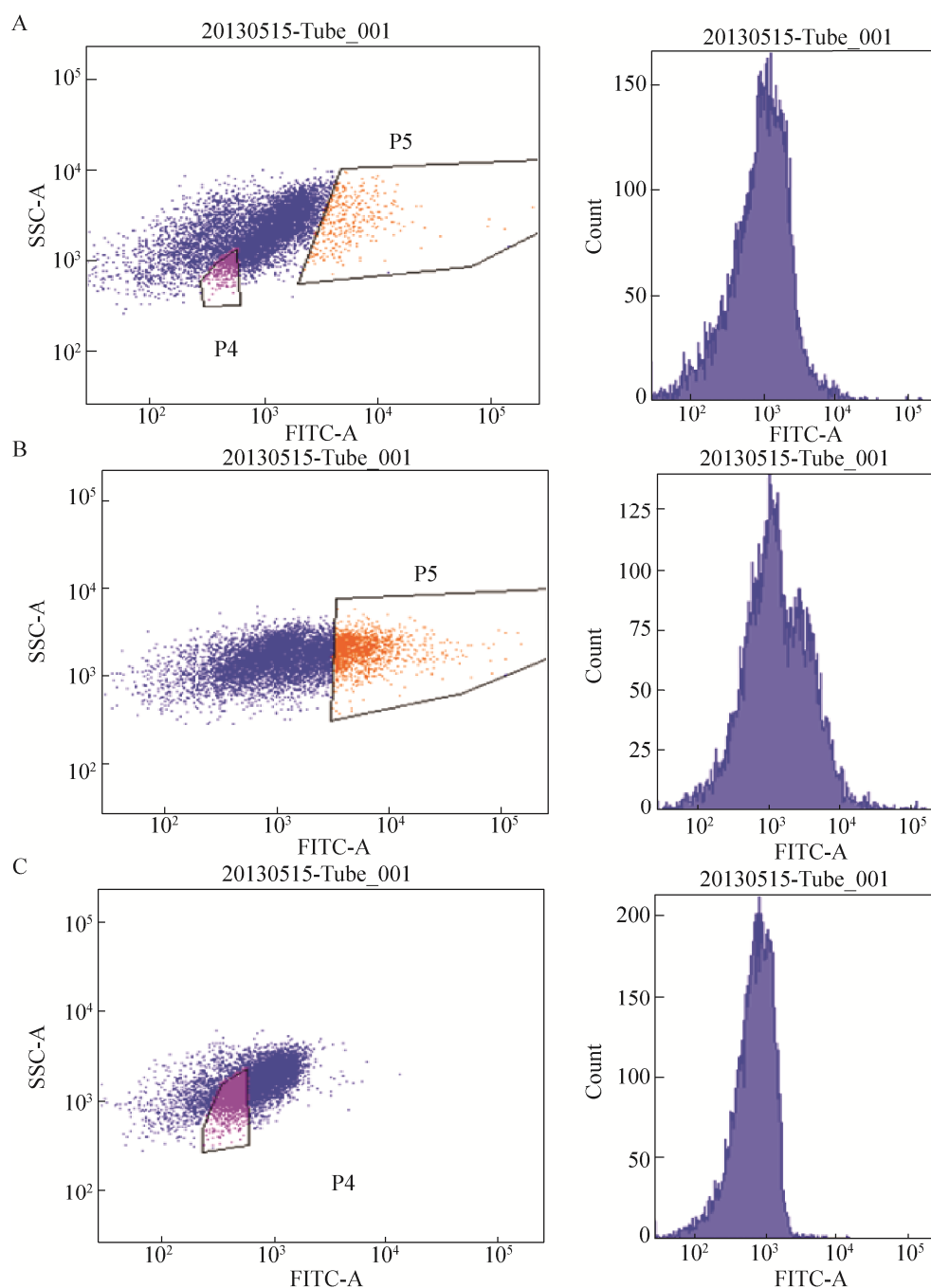


图 2 酿酒酵母单位点荧光标记库菌株分选 (A: 以酿酒酵母单位点荧光标记库为起始的第一轮分选, P4 框中为 *gfp* 高表达细胞, P5 框中的 *gfp* 低表达细胞; B: 以第一轮分选出的 *gfp* 高表达细胞为起始进行的第二轮分选; C: 以第一轮分选出的 *gfp* 低表达细胞为起始进行的第二轮分选)

Fig. 2 Sorting for cells with high/low *gfp* expression. (A) Sort 1 from the starting pool. (B) Sort 2 for cells with high *gfp* expression from P5 in sort 1. (C) Sort 2 for cells with low *gfp* expression from P4 in sort 2. Red dots enclosed in P5 indicated cells with high *gfp* expression. Purple dots enclosed in P4 indicated cells with low *gfp* expression.

实验中将位置效应明显的细胞分选出来,构建高表达位点库和低表达位点库。测序分析结果显示,高表达位点库中含有菌株 428 个,占单位点标记库的 12%;低表达位点库中含有菌株 444 个,占单位点标记库的 13% (菌株列表见补充材料)。在荧光显微镜下观察酵母单位点荧光标记库、高表达位点库菌株细胞的 *gfp* 表达情况 (图 3),图 3B 为酵母单位点荧光标记库细胞的观察结果,可以看出细胞之间荧光强度存在明显差异;图 3C 为高表达库菌株的细胞,其荧光强度明显强于低表达库菌株的细胞 (图 3D)。对酵母单位点荧光标记库、高表达位点库和低位点表达库荧光表达强度的定量测定与镜检结果相吻合 (图 4)。图 4B 为未分选的酵母单位点荧光标记库细胞的荧光蛋白表达量分布图,沿横坐标轴分布较为分散,说明库中细胞荧光蛋白表达量差异较大;图 4C 为高表达位点库细胞的荧光蛋白表达量分布,与图 4B 相比明显沿坐标轴向右偏移,说明细胞中荧光蛋白的表达量明显增强;而从代表低表达位点库的图 4D 中可以看出,细胞分布沿坐标轴右移,说明细胞中荧光蛋白的表达量明显降低。通过分布图的量化数据可知,低表达位点库菌株的平均 *gfp* 表达量为 18.02,高表达位点库菌株的平均 *gfp* 表达量为 137.84,为低表达位点库平均 *gfp* 表达量的 7.6 倍。

为了进一步探寻酿酒酵母位置效应的分布规律,将高表达位点库和低表达位点库中报告基因所在位点绘制成图谱 (图 5)。高/低表达位点分布图显示,对于外源基因表达存在显著影响的位点在酵母基因组的 16 条染色体上均有分布。一些高表达和低表达位点集中分布在染色体的特定位置,呈现出一定的区域性。存在下

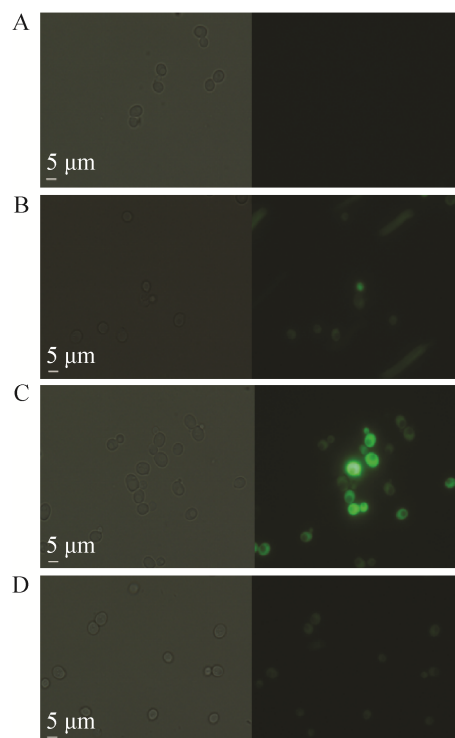


图 3 荧光显微镜下酿酒酵母单基因敲除库、高表达位点库和低表达位点库的绿色荧光蛋白表达情况 (A: 未转化的酿酒酵母单基因敲除库细胞; B: 未经过分选的酿酒酵母单位点荧光标记库细胞; C: 高表达位点库细胞; D: 低表达位点库细胞。左侧图片为白光观测,曝光时间 100 ms;右侧图片为荧光观测,曝光时间 2 000 ms)

Fig. 3 Cells from starting pool, high-expressed pool and low-expressed pool under the fluorescence microscope. (A) Original YKO pool as negative control. (B) Cells from the starting pool. (C) Cells from the high-expressed pool. (D) Cells from the low-expressed pool. Photos on left line were taken under white light with 100 ms exposure time. Photos on right line were taken under green light with 2 000 ms exposure time.

调基因表达的“抑制区”和上调外源基因表达的“热点区”。一个典型的例子就是端粒位置效应,表现为处于端粒序列附近的基因的表达受到抑制^[22]。从图 5 中可以看出,低表达位点在端粒位置的分布较为集中,如Ⅶ号、ⅩⅣ号染色体,

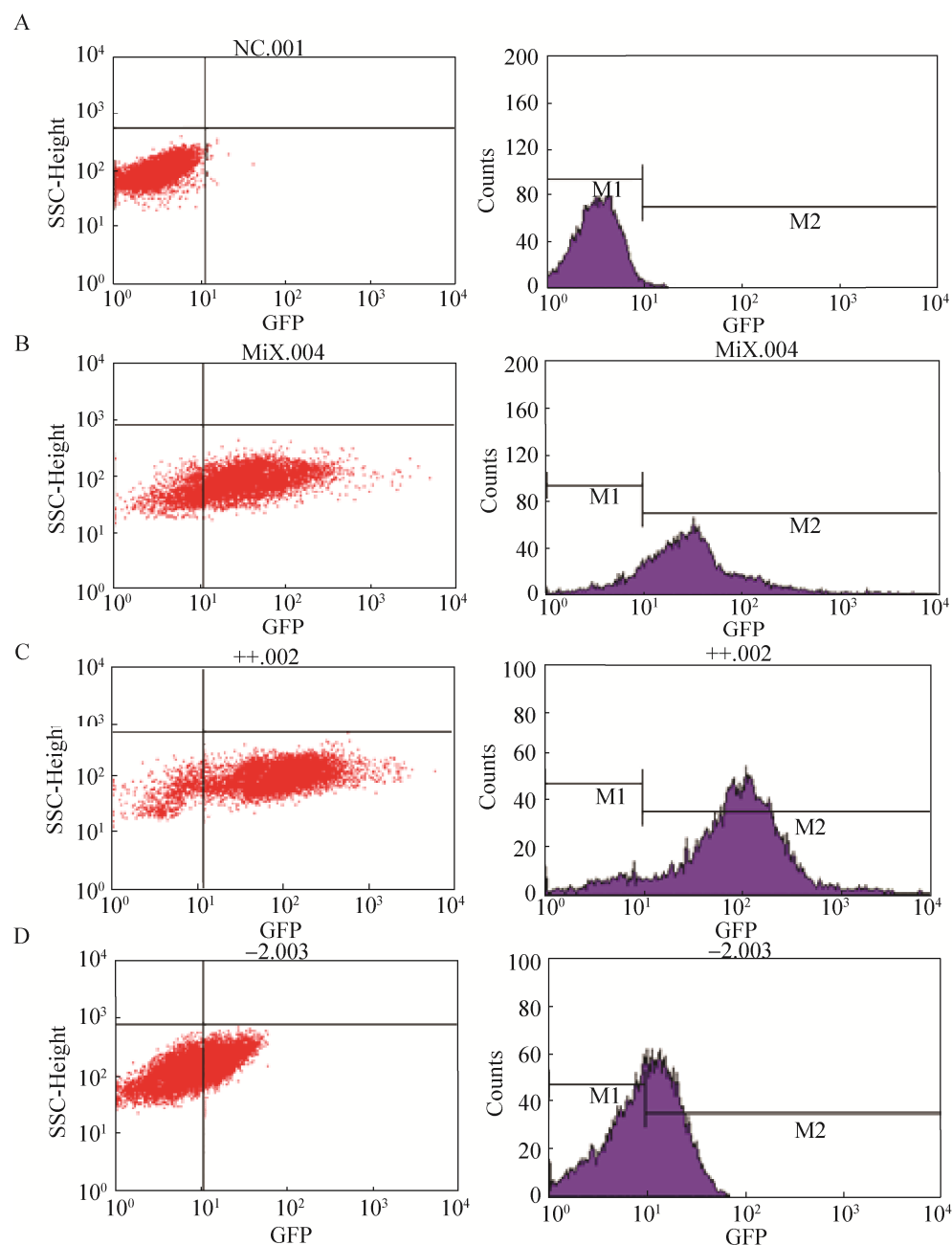


图 4 *gfp* 表达量测定图 (A: 未转化的酿酒酵母单基因敲除库; B: 未经过分选的酿酒酵母单位点荧光标记库; C: 经过两轮分选得到的高表达位点库; D: 经过两轮分选得到的低表达位点库)

Fig. 4 FACS analysis for cells before and after sorting. (A) Original yeast knockout collection pool as negative control. (B) Starting pool. (C) High-expressed pool. (D) Low-expressed pool.

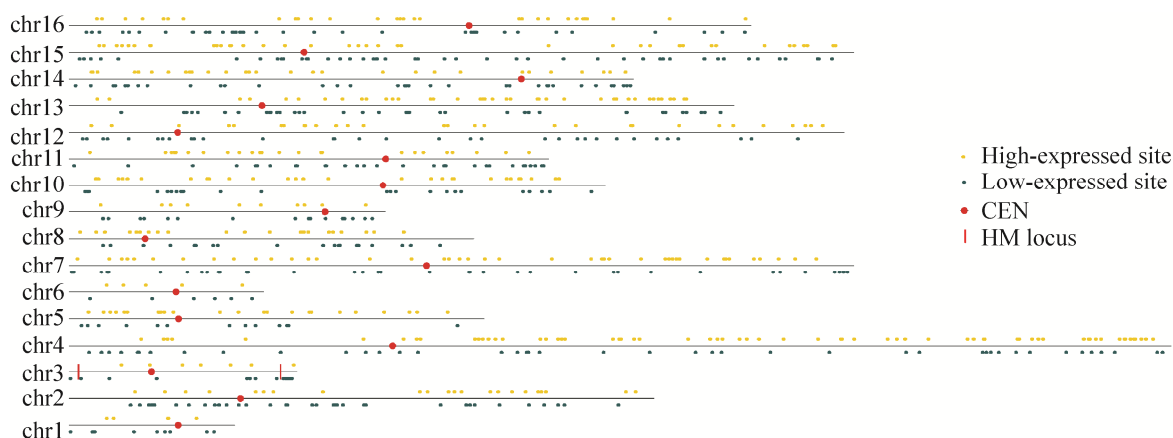


图5 高/低表达位点在酿酒酵母染色体上的分布示意图 (线上部黄色点代表高表达位点; 线下部蓝色点代表低表达位点; 线中红色点代表染色体着丝粒; III号染色体上的红线代表交配型位点 (*HML* 和 *HMR*))

Fig. 5 Landscape of high/low expression sites on the chromosome of *Saccharomyces cerevisiae*. Yellow dots upon the line represent sites with high *gfp* expression; cyan dots below the line represent sites with low *gfp* expression; red dots on the line represent centromere on each chromosome; red lines on chr 3 and chr 4 represent *HML* and *HMR* locus.

端粒沉默效应抑制了其附近位点基因的表达, 这一现象与染色质的组织结构有关^[23-24]。此外, 低表达位点还多集中于着丝粒位置和 *HML-HMR* 位点, 产生这一现象的原因为着丝粒和 *HM* 位点具有特殊的 DNA 序列, 容易与蛋白质结合形成稳定的聚合体, 不利于外源蛋白的表达^[25-26]。除上述位点之外, 染色体上还存在一些外源基因表达抑制区, 如 II 号染色体的 100–119 kb 位置, VIII 号染色体的 136–159 位置, XVI 号染色体的 226–204 kb 位置等, 其抑制机理有待进一步研究。此外, 在染色体上存在一些高表达位点相对较为集中的热点区域, Yamane 等^[8]和 Flagfeldt 等^[10]在其针对酿酒酵母基因组位置效应的研究中发现热点区域附近存在自主复制序列 (ARS), 促进外源基因的表达, 本实验证实了这一现象并发现了更多类似热点区, 如 IV 号染色体 755–768 kb (ARS423), VII 号染色体 828–849 kb (ARS731), XVI 号染色体 455–465 kb

(ARS1633)等。研究过程中我们还发现一些热点区域能够造成外源基因表达量增加, 如 VIII 染色体 320–336 kb, XII 染色体 571–589 kb 等。但其作用机理尚不明确。

本研究以酿酒酵母单基因敲除库为基础, 构建酿酒酵母基因组单位点荧光标记库、高表达位点库和低表达位点库, 从全基因组尺度上对酿酒酵母基因组的位置效应进行了表征。获得高表达位点428个, 低表达位点444个。通过对这些位点分布的分析揭示了位置效应在染色体上的分布规律。研究结果对合成生物学研究中精确调控外源基因表达和重要蛋白生产工业都具有重要的指导意义。

致谢: 感谢美国纽约大学的 Jef D. Boeke 教授对本研究的悉心指导和支持; 本文的测序工作和位点图谱绘制得到了 Boeke 课题组 Anna Sliva 和 Zheng Kuang 的协助, 在此对他们表示感谢。

REFERENCES

- [1] Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 2006, 440(7086): 940–943.
- [2] Luo YZ, Li BZ, Liu D, et al. Engineered biosynthesis of natural products in heterologous hosts. *Chem Soc Rev*, 2015, 44(15): 5265–5290.
- [3] Froissard M, D'andréa S, Boulard C, et al. Heterologous expression of AtClo1, a plant oil body protein, induces lipid accumulation in yeast. *FEMS Yeast Res*, 2009, 9(3): 428–438.
- [4] Engles B, Dahm P, Jennewein S. Metabolic engineering of taxadiene biosynthesis in yeast as a first step towards Taxol (Paclitaxel) production. *Metab Eng*, 2008, 10(3/4): 201–206.
- [5] Fossati E, Ekins A, Narcross L, et al. Reconstitution of a 10-gene pathway for synthesis of the plant alkaloid dihydrosanguinarine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Commun*, 2014, 5: 3283.
- [6] Siddiqui MS, Thodey K, Trenchard I, et al. Advancing secondary metabolite biosynthesis in yeast with synthetic biology tools. *FEMS Yeast Res*, 2012, 12(2): 144–170.
- [7] Velculescu VE, Zhang L, Zhou W, et al. Characterization of the yeast transcriptome. *Cell*, 1997, 88(2): 243–251.
- [8] Sousa C, de Lorenzo V, Cebolla A. Modulation of gene expression through chromosomal positioning in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 1997, 143(6): 2071–2078.
- [9] Yamane S, Yamaoka M, Yamamoto M, et al. Region specificity of chromosome III on gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Appl Microbiol*, 1998, 44(4): 275–281.
- [10] Bai Flagfeldt D, Siewers V, Huang L, et al. Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2009, 26(10): 545–551.
- [11] Siezen RJ, Bayjanov JR, Felis GE, et al. Genome-scale diversity and niche adaptation analysis of *Lactococcus lactis* by comparative genome hybridization using multi-strain arrays. *Microb Biotechnol*, 2011, 4(3): 383–402.
- [12] Markstein M, Pitsouli C, Villalta C, et al. Exploiting position effects and the gypsy retrovirus insulator to engineer precisely expressed transgenes. *Nat Genet*, 2008, 40(4): 476–483.
- [13] Gierman HJ, Indemans MHG, Koster J, et al. Domain-wide regulation of gene expression in the human genome. *Genome Res*, 2007, 17(9): 1286–1295.
- [14] Thompson A, Gasson MJ. Location effects of a reporter gene on expression levels and on native protein synthesis in *Lactococcus lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(8): 3434–3439.
- [15] Winzler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, et al. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, 1999, 285(5429): 901–906.
- [16] Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, et al. 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.
- [17] Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J, et al. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 1985, 33(1): 103–119.
- [18] Sikorski RS, Hieter P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 1989, 122(1): 19–27.
- [19] Horton RM, Hunt HD, Ho SN, et al. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, 1989, 77(1): 61–68.
- [20] Pan XW, Yuan DS, Ooi SL, et al. dSLAM analysis of genome-wide genetic interactions in

-
- Saccharomyces cerevisiae*. Methods, 2007, 41(2): 206–221.
- [21] Aslankoohi E, Voordeckers K, Sun H, et al. Nucleosomes affect local transformation efficiency. Nucl Acids Res, 2012, 40(19): 9506–9512.
- [22] Ottaviani A, Gilson E, Magdinier F. Telomeric position effect: from the yeast paradigm to human pathologies?. Biochimie, 2008, 90(1): 93–107.
- [23] Grewal SIS, Moazed D. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. Science, 2003 301(5634): 798–802.
- [24] Fox CA, McConnell KH. Toward biochemical understanding of a transcriptionally silenced chromosomal domain in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2005, 280(10): 8629–8632.
- [25] Smith JS, Boeke JD. An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. Genes Dev, 1997, 11(2): 241–254.
- [26] Aparicio OM, Billington BL, Gottschling DE. Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. Cell, 1991, 66(6): 1279–1287.

(本文责编 郝丽芳)