

李素梅, 卢颖洪, 周敏. 利用 PCR 介导的同源重组制备 V 型 ATP 酶的亚基蛋白 VPH1[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(5): 1016-1021.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.05.009

利用 PCR 介导的同源重组制备 V 型 ATP 酶的亚基蛋白 VPH1

李素梅, 卢颖洪, 周敏

(南京理工大学化工学院, 江苏 南京 210094)

摘要: V 型三磷酸腺苷酶(ATP 酶)是真核生物调节胞质内细胞器酸碱度的核心元件,对盐胁迫环境下细胞膜的稳定起着重要作用。VPH1 是 V 型 ATP 酶蛋白复合物膜上的 1 个亚基蛋白,其跨膜结构对 V 型 ATP 酶的功能有很大影响。本研究利用 PCR(Polymerase chain reaction)介导的同源重组技术,构建毕赤酵母内源 VPH1 C 端的定点融合 FLAG 标签,筛选重组菌株进行培养,分离出目的蛋白,去污剂溶解后通过 FLAG 亲和纯化获得 VPH1 蛋白,为其后续结构的研究奠定基础。说明,PCR 介导的同源重组技术能快速筛选到毕赤酵母重组转化子,FLAG 标签添加到 VPH1 的 C 端可以成功纯化出目的蛋白。同时本研究所用的载体和研究思路也可以用于其他感兴趣膜蛋白的重组纯化。

关键词: PCR 介导; 同源重组; V 型 ATP 酶; VPH1 蛋白制备

中图分类号: Q784 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)05-1016-06

Preparation of VPH1 protein of V-ATPase using PCR-mediated homologous recombination

LI Su-mei, LU Ying-hong, ZHOU Min

(School of Chemical Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China)

Abstract: V-ATPase, the core component of eukaryotes to adjust pH of cytoplasmic organelles, plays an important role in cell membrane stability under stress environment. VPH1 is one subunit of V-ATPase membrane-bound V_0 protein complex and its structure decides the function of V-ATPase to a large extent. PCR-mediated DNA homologous recombination transformation was adopted to tag C-terminus of *P. pastoris* VPH1. The screened recombinant strain was cultured for isolating target protein. Subsequently detergent dissolving was applied to anti-FLAG agarose for VPH1 purification. The results showed that the VPH1 protein from *P. pastoris* was successfully isolated using a fusion FLAG tag attached to the C-terminus of VPH1.

Key words: polymerase chain reaction(PCR)-mediation; homologous recombination; V-ATPase; VPH1 preparation

V 型三磷酸腺苷酶(ATP 酶)是 ATP 酶家族的一员,广泛分布在真核细胞的囊泡、溶酶体、突触小泡、内体、高尔基体等各种细胞器内膜系统上^[1],V 型 ATP 酶依靠水解 ATP 产生的能量转移质子,从而产生跨膜的电化学梯度并调节细胞内外的 pH 值,

为某些生化反应提供特定的 pH 环境^[2]。V 型 ATP 酶利用 ATP 水解产生的能量向膜内转运质子,建立跨膜电势,为物质的跨膜运输提供动力,如在盐胁迫环境下,依赖 V 型 ATP 酶建立的跨膜电势有效地将细胞质内的 Na^+ 排到细胞外或液泡内,以减轻过量 NaCl 对植物造成的伤害,保证植物细胞的存活能力,稳定细胞膜内环境,此过程中酶的活性在一定范围内随着胁迫强度的增加而提高^[3-4]。

V 型 ATP 酶是一种多亚基组成的异聚体蛋白,其组成和化学计量在不同物种间有显著的差

收稿日期:2017-04-08

基金项目:国家自然科学基金项目(21375062)

作者简介:李素梅(1978-),女,安徽合肥人,博士,助理研究员,主要从事膜蛋白制备研究。(E-mail) smli321@163.com

通讯作者:周敏,(E-mail) minzhou@njjust.edu.cn

异,但均包括水溶性的膜外 V_1 和脂溶性的膜上 V_0 2 个结构复合体。水溶性 V_1 催化 ATP 水解,由 8 个亚基组成,包埋在膜内的脂溶性 V_0 传递质子,由至少 6 个亚基组成^[5]。然而 V 型 ATP 酶的组成和化学计量在不同物种间有显著的差异,这种物种间的差异对生物学功能和进化的研究也非常重要,比如耐盐植物和非耐盐植物应答外界环境盐胁迫的响应不同,V 型 ATP 酶的表现也不相同。耐盐植物如甜菜亚基的表达是同步的,且对应亚基的启动子活性在盐胁迫中也大大提高^[6],而不耐盐的植物,如西红柿和拟南芥,V 型 ATP 酶的亚基表达水平是瞬间的或不应答^[7]。过多施肥引起的次生盐渍化严重影响了作物对养分的吸收利用,利用生物技术改良可以提高耐盐性^[4]。VPH1 是 V 型 ATP 酶蛋白复合物膜上最大亚基 a 的蛋白,大小约 100 000,由 2 个主要的结构域组成,N 端细胞质部分和 C 端膜上部分各占一半。N 端作为定子与膜外 V_1 连接,保证质子转移中复合物的稳定性^[8],C 端与质子转运中心的 c 环形成 1 个半通道,便于质子跨膜进行转运^[5]。VPH1 的 C 端有 8 个膜镶嵌的 α 螺旋,不对称地与脂双层和 c 环连接^[5,9-10],其中第 8 个螺旋的 Arg-735 对于质子转移至关重要^[11]。此外,也有研究结果表明,V 型 ATP 酶的 a2 亚基是一个潜在的内体 pH 感应器^[12]。酶的可逆解离过程中亚基 a 可能封锁膜上质子的被动转运^[13]。因此,VPH1 的折叠和跨膜拓扑结构对 V 型 ATP 酶的生理生化都有重要作用。

蛋白质功能性结构的研究首先需要制备目标产物,而膜蛋白因其表达量低、稳定性差以及脂溶性等特点使得制备较为困难。因此,本研究拟通过 PCR (Polymerase chain reaction) 介导的 DNA 同源重组将毕赤酵母内源 VPH1 的 C 端加上 FLAG 标签,利用带有 FLAG 标签的重组子进行膜组分分离和目标蛋白亲和纯化,制备 VPH1 蛋白,以期为后续的功能结构分析奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株和质粒 菌种 DH5 α 用于载体重建,蛋白酶缺陷型的毕赤酵母 SMD1168H (*pep4*) 作为同源重组的宿主,含有博来霉素 zeocin 抗性基因的表达载体 pPICZA 由 Invitrogen 公司提供。

1.1.2 试剂 限制性内切酶 *Xho* I、限制性内切酶 *Sal* I、T4 DNA 连接酶、小量质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒及 DNA 分子量 Marker 均购自宝生物工程(大连)有限公司 (TaKaRa),酵母基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,博来霉素购自 Invitrogen 公司,其他一般生物试剂购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.1.3 培养基 细菌培养用低盐的 LB 培养基(蛋白胨 10 g/L、酵母粉 5 g/L、氯化钠 5 g/L),博来霉素抗性筛选的浓度为 25 μ g/L,酵母培养用 YPD 培养基(蛋白胨 20 g/L、酵母粉 10 g/L、葡萄糖 20 g/L),博来霉素抗性筛选的浓度为 100 μ g/L,固体培养基含 1.5% 琼脂糖。

1.2 试验方法

1.2.1 载体重建 毕赤酵母表达载体 pPICZA 和化学合成的 3 \times FLAG 序列结构同时采用 *Xho* I 酶和 *Sal* I 酶进行双酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳分离后,切胶回收目的片段,T4 DNA 连接酶连接,博来霉素筛选,酶切鉴定获得 FLAG 标签载体 pPICZT。

1.2.2 PCR 扩增 分析 pPICZT 载体的 FLAG 序列和博来霉素终止子区域的序列,利用 Primers 5 设计载体引物以扩增 FLAG 标签和筛选标记的基因序列,正向引物 P1,5'-GGAGCGCCTTATCGGCCATTTGCTTTCAAAATCGTGCTGCTAGATGATGAAGAAGACTACAAAGACCATGACGGTGAT-3',反向引物 P2,5'-ATTAAAGAATTGACCAGGCAATTGAGTAATCGCCCCCTTCTGAGAGATTA CCTTCGAGCGTCCCAAACCTTC T-3',斜体是载体上的引物序列,正体是外挂的 VPH1 终止子上下游序列。95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,20 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后,切胶回收作为第二轮 PCR 模板。第二轮 PCR 的目的是在第一轮 PCR 产物的基础上,向 5'端再延伸同源序列的长度至 100bp,正向引物 P3:5'-CATTCTCTGAGACTACACTGGGTTGAAAGCATGTCCAAATTTTT CGAAGGTGAGGGAGCGCCTTATCGGCCATTT-3',反向引物 P4:5'-GTGACTCTATGGAAAAAATA TTCAAAAAGACTACATTCTATAGAAATTTAAAGAAT TGACCAGGCAATTGAGTAAT-3',下划线部分是 2 次引物重叠区域,PCR 条件同第一轮,产物经电泳分离回收,DNA 片段测序确认后用作后续同源重组转化。

1.2.3 转化和筛选 过夜培养的毕赤酵母

SMD1168H 按照 1/100 比例转接到新鲜的 YPD 培养基中,28 ℃ 继续培养 5 h 用来制备感受态细胞。酵母感受态细胞的制备:使用 1 mol/L 山梨醇,按照标准方法进行,感受态细胞现做现用。5 μg 的 DNA 片段加入 80 μl 感受态细胞,冰上孵育 10 min,电转仪设置 1 500 V 进行转化,转化后的细胞加入预冷的 1 mol/L 山梨醇 5 ml,28 ℃ 预培养 2 h,期间可手动翻转混匀几次,稍离心涂布在含有 100 μg/L 的 YPD 平板上,28 ℃ 培养至白色单克隆长出。随机挑选单克隆,转入含 100 μg/L 博来霉素的液体培养基中进行扩大培养,培养至一定浓度后收取菌液。根据试剂盒操作说明提取酵母基因组 DNA,同时提取没有转化的酵母基因组 DNA,以此基因组 DNA 为模板,基因组上横跨插入片段的引物进行 PCR 反应,PCR 正向引物 J1:5'-CTGTGTCCCATGGCTATTGCTGTT-3',反向引物 J2:5'-AGAGCACAAATCCTGGGTCAAAG-3',95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 30 s,60 ℃ 2 min,72 ℃ 1 min,30 个循环,72 ℃ 延伸 10 min,产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳分离,对理论上含有插入序列的 PCR 产物进行测序。

1.2.4 膜蛋白提取和 FLAG 亲和纯化 筛选到的插入菌株用含 100 μg/L 博来霉素的液体 YPD 预培养至 $OD_{600}=5$,按照 1/100 比例转接到 500 ml 新鲜的 YPD 培养基中,放置 2 L 摇瓶进行大规模培养,过夜后离心收集菌体。取约 20 g 的湿菌悬浮在 100 ml 裂解液(25 mmol/L HEPES、8% 蔗糖、5% 山梨醇、2% 葡萄糖、150 mmol/L 氯化钾、2 mmol/L 氯化镁、1 mmol/L DTT、1 mmol/L PMSF、1 mmol/L 蛋白酶抑制剂,pH 8.0)中,用均质机进行破碎处理,5 000 g 低速离心去除细胞残渣,100 000 g 高速离心 2 h,弃去上清,沉淀是含有目的蛋白的膜组分,加含 1.000% 十二烷基-β-D-麦芽糖苷(DDM)的 50 ml 缓冲液(25 mmol/L HEPES、150 mmol/L 氯化钾、2 mmol/L 氯化镁、1 mmol/L DTT,

pH 8.0)进行溶解,离心去除不溶物。上清使用 FLAG 凝胶,按照说明进行亲和纯化,含 0.025% DDM 的 TBS 洗去非特异性结合蛋白,用 500 μl 含 150 μg/ml 的 3×FLAG 肽洗脱液分别洗脱 5 次,收集洗脱液 E1~E5。以上所有步骤均在冰上或 4 ℃ 下操作。

1.2.5 SDS-PAGE 电泳和免疫印迹(western blot)分析 分别取洗脱液 E1~E5 各 20 μl,加 5 μl 5×上样缓冲液,65 ℃ 变性 10 min,12% 的 SDS-PAGE 进行电泳分离,考马斯亮蓝染色分析。取 E1、E3、E5 样品经 SDS-PAGE 分离后,常温 50 mA,60 min 半干转至 NC 膜上,含 5% 脱脂蛋白的 TBST 室温封闭 2 h,加入 anti-FLAG 抗体 4 ℃ 孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,1 次 10 min,再加二抗室温孵育 1 h,洗涤后用 ECL 显影剂进行显色拍照。

1.2.6 质谱测序 质谱仪器与操作系统均为 Thermo 的 Q-exactive 系列。SDS-PAGE 分离出来的 VPH1 用手术刀片从胶上切下,小心地将胶块切成约 1 mm³大小放置在 eppendorf 管中,参照胰蛋白酶的说明进行胶内酶解。酶解液用流动相 a(0.1% 甲酸、99.9% 水)和流动相 b(0.1% 甲酸、99.9% 乙腈)进行分离,质谱检测数据用软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 FLAG 标签载体的构建与鉴定

在毕赤酵母表达载体 pPICZA 的基础上改造重建带有适宜于真核生物蛋白纯化的标签 FLAG,图 1 显示,用 3×FLAG 序列替换原有载体的 *c-myc* 抗原序列,获得的 FLAG 标签载体 pPICZT 经 *Xho* I 酶和 *Bam* H I 酶双酶切验证(图 2),以及质粒进行测序,确认含有 3×FLAG 序列(图 3)。新建的 pPICZT 载体含有多克隆位点 MCS、FLAG 标签、His 标签和博来霉素筛选标记,可用于任何感兴趣目标蛋白的 C 端添加 FLAG 标签,再利用博来霉素筛选转化子。

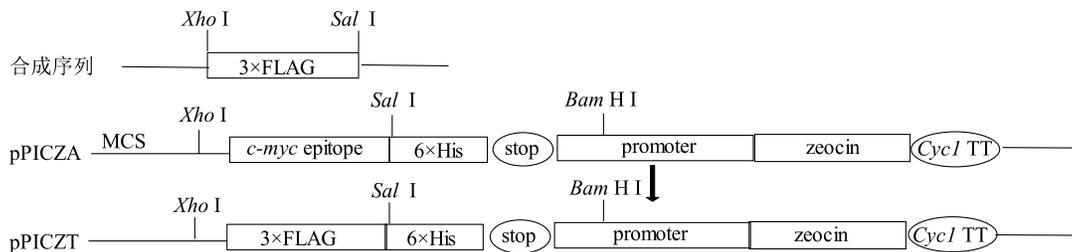
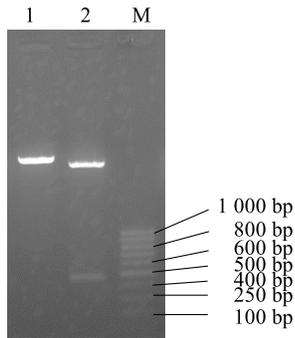


图 1 载体重建示意图

Fig.1 Schematic of the reconstructing vector



1: *Bam* H I 线性化质粒; 2: *Xho* I 酶和 *Bam* H I 酶双酶切质粒; M: 100 bp DNA ladder。

图 2 pPICZT 质粒的酶切鉴定

Fig.2 Identification of pPICZT plasmid by enzyme digestion

2.2 VP1 同源重组 DNA 片段扩增

以上述含有 FLAG 标签的 pPICZT 质粒为模板, 扩增 FLAG 标签和博莱霉素筛选标记片段, 同时利用引物 5' 端外挂目标蛋白的同源序列, 获得同源重组的 DNA 片段。第一轮 PCR 要保证正向引物中载体序列和同源序列的完好融合, 20 个反应后的 PCR 产物切胶纯化作为第二次 PCR 的模板, 再利用外挂引物向 VP1 上下游再次延伸 50 bp, 最终的 PCR 产物两端各外挂 100 bp 的同源序列 (图 4), 第二轮 PCR 产物要回收进行酵母转化, 所以扩大反应体系以获得更多的产量。

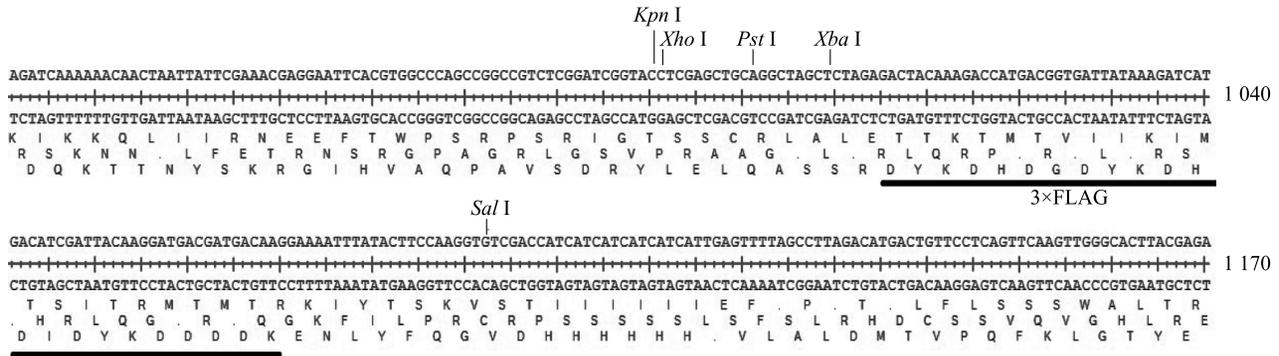
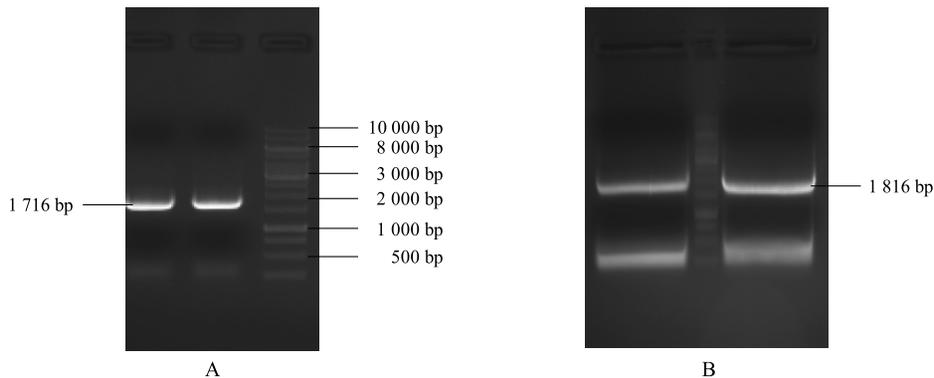


图 3 pPICZT 的测序鉴定

Fig.3 Identification of pPICZT plasmid using sequence analysis



A: 第一轮 PCR; B: 第二轮 PCR。

图 4 DNA 片段的 PCR 扩增

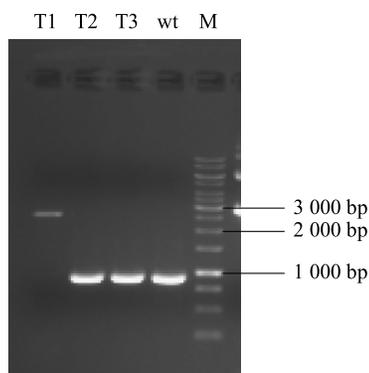
Fig.4 PCR amplification of DNA fragment

2.3 VP1 同源重组转化子鉴定

基因组上横跨插入区引物的 PCR 产物电泳见图 5, 理论上没有插入序列的基因组 PCR 产物大小是 900 bp, 假阳性的重组子也扩增到同样大小的产

物, 含有插入序列的转化子 PCR 产物 2 500 bp, 包括了 1 610 bp 的插入片段, 如图 5 的 T1 转化子。T1 对应的 PCR 产物进一步测序结果也证实了 FLAG 标签序列已经融合到 VP1 终止子的后面, 并且表

达框架正确,用 T1 菌株来进行膜蛋白 VPH1 的蛋白表达和纯化制备。



T1~T3:转化子 1~3;wt:未转化的 SMD1168H;M:1 000 bp DNA ladder。

图 5 转化子基因组 PCR 鉴定

Fig.5 Identification of the transformants using PCR amplification

2.4 膜蛋白 VPH1 的表达纯化

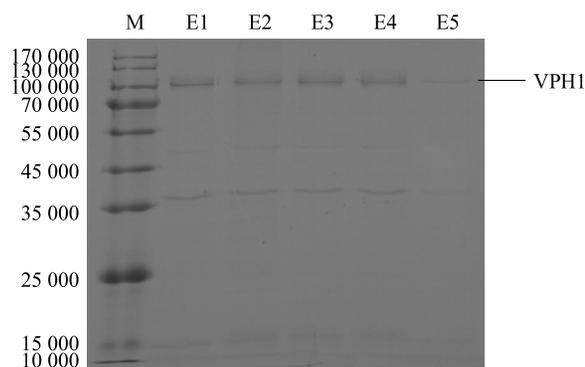
超速离心收集的膜组分中含有膜蛋白 VPH1,经去污剂 DDM 溶解后 FLAG 凝胶亲和层析,FLAG 多肽洗脱的洗脱液 SDS-PAGE 分析结果(图 6)显示,FLAG 多肽洗脱的蛋白不仅包括了分子量大于 100 000 的膜蛋白 VPH1(a 亚基),还出现了其他条带,其中分子量为 37 000 和分子量为 15 000 的 2 条条带大小与 VPH1 所在复合物的 VMA6(d 亚基)和 VMA3(c 亚基)相匹配,由此可见,标签 VPH1 的 C 端不仅获得了 VPH1 蛋白本身,也获得了其所在复合物的其他亚基,同时也说明 VPH1 的 C 端 FLAG 标签不会影响亚基间的相互作用。

2.5 免疫印迹验证与质谱蛋白鉴定

取上面纯化的样品 E1、E3、E5 进行免疫印迹验证,结果显示 100 000 处的条带正是被 FLAG 标记的 VPH1(图 7)。SDS-PAGE 上的对应的 VPH1 条带切下来,胰蛋白酶消化后的肽段进行质谱序列分析比对,结果有 37 个肽段与毕赤酵母 VPH1 相符合,得分 336,覆盖率 43%。再次证明获得的是目的蛋白 VPH1。

3 讨论

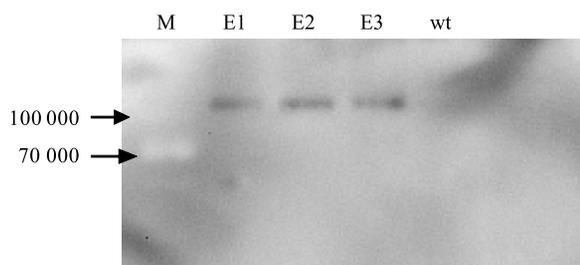
FLAG 融合表达标签因其不与目的蛋白相互作用,不影响目的蛋白的功能性质,非变性纯化效率高特点被广泛用于真核生物低丰度蛋白的纯化中,



M:Marker;E1~E5:连续收集的 1~5 管洗脱液。

图 6 SDS-PAGE 分析 FLAG 凝胶纯化后的 VPH1

Fig.6 SDS-PAGE analysis of VPH1 purified by FLAG agarose



M、E1、E3、E5 见图 6 注,wt 见图 5 注。

图 7 VPH1 的 FLAG 免疫印迹检测

Fig.7 Western blotting of VPH1 using anti-FLAG

并且方便后续免疫印迹的鉴定。重建的含有 FLAG 标签的毕赤酵母表达载体 pPICZT,可以通过构建 DNA 片段使内源蛋白同源重组带上标签,也可以将感兴趣的基因放在 FLAG 标签前面的多克隆位点 MCS 上,线性化处理转化毕赤酵母实现蛋白的异源表达,再用 FLAG 进行亲和纯化制备。

PCR 介导的基因修饰已经为酿酒酵母的功能蛋白分析提供了有价值的工具^[14],这个技术可以更好更快的在功能基因的 N 端或 C 端加上标签以便于后续的纯化,尤其 C 端标签还能保证目标蛋白在本身的启动子下进行表达,不会改变目标蛋白的表达方式。酿酒酵母的研究结果表明,同源重组的同源序列有 50 bp 就可以进行,对于毕赤酵母为了提高其同源重组的效率,本研究延长同源序列的长度至 100 bp,随机挑选 3 个单克隆基因组进行 PCR,发现 1 个是阳性重组子。PCR 产物测序分析结果表明,FLAG 标签已经融合到目标基因碱基序列的 3' 端,PCR 介导的 100 bp 同源序列 DNA 重组可以实

现。

本研究 PCR 介导同源重组标签的 VPH1 是 V 型 ATP 酶膜上复合物 V_o 的一个亚基,通过 FLAG 对 VPH1 的亲纯化也获得了 V_o 复合物的其他亚基蛋白,这对蛋白复合物的制备尤为重要。因为蛋白质往往不是单独行使功能的,而是呈复合物协调进行的,尤其是涉及关键生物过程的蛋白复合物^[15]。对于这些重要性的蛋白复合物使用重组方法依然很难获得,尽管有先进的 DNA 重组技术和复杂的超表达策略,但是在这种情况下,从生物体内提取分离多亚基的蛋白复合物是唯一的选择,方法就是选择标记复合物其中的一个亚基,通过非变性纯化获得与亚基相结合的复合物。本研究采用的毕赤酵母是能高密度培养易于制备膜蛋白的内源宿主^[16],因为 V 型 ATP 酶膜上 V_o 复合物亚基的化学计量和分子量大小不等,SDS-PAGE 上可分辨的蛋白条带有限,分子量相对较大的 d 亚基和八倍体的 c 亚基在小量的纯化中均能分辨,理论上扩大纯化体系能获得完整的 V 型 ATP 酶的膜上 V_o 复合物,以及后期运用分子排阻等技术可以更好地对目标蛋白进行提纯。

参考文献:

- [1] WILKENS S, ZHANG Z, ZHENG Y. A structural model of the vacuolar ATPase from transmission electron microscopy [J]. *Micron*, 2005, 36(2): 109-126.
- [2] TOEI M, SAUM R, FORGAC M. Regulation and isoform function of the V-ATPases [J]. *Biochemistry*, 2010, 49(23): 4715-4723.
- [3] WAKEEL A, HANSTEIN S, PITANN B, et al. Hydrolytic and pumping activity of H^+ -ATPase from leaves of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) as affected by salt stress [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167(9): 725-731.
- [4] ZHOU S, ZHANG Z, TANG Q, et al. Enhanced V-ATPase activity contributes to the improved salt tolerance of transgenic tobacco plants overexpressing vacuolar Na^+/H^+ antiporter AtNHX1 [J]. *Biotechnology Letters*, 2011, 33(2): 375-380.
- [5] MAZHAB-JAFARI M T, ROHO A, SCHMIDT C, et al. Atomic model for the membrane- embedded V_o motor of a eukaryotic V-ATPase [J]. *Nature*, 2016, 539: 118-122.
- [6] LEHR A, KIRSCH M, VIERECK R, et al. cDNA and genomic cloning of sugar beet V-type H^+ -ATPase subunit A and c isoforms: evidence for coordinate expression during plant development and coordinate induction in response to high salinity [J]. *Plant Molecular Biology*, 1999, 39(3): 463-475.
- [7] QUEIR6S F, FONTES N, SILVA P, et al. Activity of tonoplast proton pumps and Na^+/H^+ exchange in potato cell cultures is modulated by salt [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(4): 1363-1374.
- [8] KARTNER N, YAO Y, BHARGAVA A, et al. Topology, glycosylation and conformational changes in the membrane domain of the vacuolar H^+ -ATPase a subunit [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2013, 114(7): 1474-1487.
- [9] ZHAO J, BENLEKBIR S, RUBINSTEIN J L. Electron cryomicroscopy observation of rotational states in a eukaryotic V-ATPase [J]. *Nature*, 2015, 521: 241-245.
- [10] SCHEP D G, ZHAO J, RUBINSTEIN J L. Models for the a subunits of the *Thermus thermophilus* V/A-ATPase and *Saccharomyces cerevisiae* V-ATPase enzymes by cryo-EM and evolutionary covariance [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(12): 3245-3250.
- [11] KAWASAKI-NISHI S, NISHI T, FORGAC M. Arg-735 of the 100-kDa subunit a of the yeast V-ATPase is essential for proton translocation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(22): 12397-12402.
- [12] MARSHANSKY V. The V-ATPase a2-subunit as a putative endosomal pH-sensor [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2007, 35: 1092-1099.
- [13] COUOH-CARDEL S, MILGROM E, WILKENS S. Affinity purification and structural features of the yeast vacuolar ATPase V_o membrane sector [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(46): 27959-27971.
- [14] LONGTINE M S, MCKENZIE III A, DEMARINI D J, et al. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Yeast*, 1998, 14(10): 953-961.
- [15] MESA P, DENIAUD A, MONTROYA G, et al. Directly from the source: endogenous preparations of molecular machines [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2013, 23(3): 319-325.
- [16] BYRNE B. *Pichia pastoris* as an expression host for membrane protein structural biology [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2015, 32: 9-17.

(责任编辑:王 妮)