

说明书

一种糠醛等抑制物耐受酵母工程菌株及其构建方法与应用

5 技术领域

本发明属于基因工程技术领域，具体地说，涉及一种糠醛等抑制物耐受酵母工程菌株及其构建方法与应用。

背景技术

10 第二代生物燃料乙醇被认为是交通能源石油的最佳替代品，其工业生产主要以秸秆、甘蔗渣等木质纤维素为原料，以酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）作为乙醇发酵传统菌株。但是，木质纤维素在工业预处理过程中会产生大量以糠醛等抑制物为主的有毒副产物，对酿酒酵母的生长以及发酵有严重的抑制作用，是第二代生物燃料乙醇工业化生产的重要限制因素。虽然通过化学、物理等手段可以去除木质纤维素水解抑制物，但是会额外增加工业生产成本、降低原料利用率。研究发
15 现，酿酒酵母自身对木质纤维素水解抑制物具有耐受能力。通过采用基因芯片技术、基因组和转录组测序技术、基因敲除与过表达技术等技术手段，进一步挖掘并分析了酿酒酵母中与糠醛等抑制物耐受相关的关键转录调控基因，这为实现转录调控基因联合过表达提高酿酒酵母对
20 糠醛等抑制物的耐受能力提供了理论支撑。

与糠醛等抑制物耐受相关的转录调控基因，其编码的转录调控因子能够调控下游相应的功能基因群的表达，从而发挥其耐受能力，其中 *PDR1*、*YAP1*、*RPN4* 是最为关键转录调控基因。*PDR1* 编码的转录调控因子 Pdr1p，
25 通过识别多效耐药响应元件 pleiotropic drug response element（PDRE），激活与内、外源性有毒物质外排功能的基因群；*YAP1* 编码的转录调控因子 Yap1p，通过识别氧化应激响应元件 Yap1p response element（YRE），激活下游的抗氧化功能基因群；*RPN4* 编码的转录调控因子 Rpn4p，通过识别蛋白酶体相关控制元件 proteasome-associated control element（PACE），激活

下游与受损蛋白质修饰与降解功能的基因群。

现有技术中，酿酒酵母表达载体容纳外源基因片段的能力有限，难以容纳核酸序列超过 10 kb 长度的三个外源表达盒。

5 发明内容

有鉴于此，本发明针对上述的问题，提供了一种糠醛等抑制物耐受酵母工程菌株及其构建方法与应用，先将分子片段较大的 pUG6-TEF1p-PDR1-CYC1t 线性化重组质粒整合进染色体中；然后，剩下的两个表达盒依次整合进穿梭载体 pRS42H 中，该过程由于插入的两个片段合计大小（约为 6 kb）低于 10 kb，克服了现有技术中整合难度大的问题。

为了解决上述技术问题，本发明公开了一株糠醛等抑制物耐受酵母出发菌株，命名为 YB-A-6-1 (YBA_08)，分类命名为酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)；于 2019 年 6 月 14 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏号为 CGMCC No. 17929。

15 本发明还公开了一株糠醛等抑制物耐受酵母工程菌，命名为 PYR，分类命名为酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)，于 2019 年 6 月 14 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏号为 CGMCC No. 17930。

20 本发明还公开了一株糠醛等抑制物耐受酵母工程菌的构建方法，包括以下步骤：

步骤 1、提取酵母单倍体菌株 BY4742 的基因组并扩增 PDR1、YAP1、RPN4 基因，进行胶回收；

25 步骤 2、通过 SpeI 和 SacII 限制性内切酶对重组质粒 pUG6-TEF1p-CYC1t 进行双酶切，得到线性化的 pUG6-TEF1p-CYC1 片段，进行胶回收；同时通过 SpeI 和 SacII 限制性内切酶对 YAP1 片段进行双酶切以及纯化回收；

步骤 3、采用 T4 DNA 连接酶，将双酶切的 pUG6-TEF1p-CYC1t 片段与双酶切的 YAP1 片段进行粘性末端连接体外构建重组质粒，转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，在含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 固体平板上挑选出含重

组质粒 pUG6-*TEF1p-YAPI-CYC1t* 的阳性克隆子；将双酶切的 pUG6-*TEF1p-CYC1t* 片段与 *PDR1*、*RPN4* 片段按照分子质量比为 2: 6~2: 8 混合后，分别转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞体内重组构建重组质粒，在含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 固体平板上分别挑选出含重组质粒 pUG6-*TEF1p-PDR1-CYC1t* 与 pUG6-*TEF1p-RPN4-CYC1t* 的阳性克隆子；pUG6-*TEF1p-PDR1-CYC1t* 用 *PsiI* 单酶切以及鉴定引物扩增进行鉴定，pUG6-*TEF1p-YAPI-CYC1t* 用 *BamHI* 单酶切以及鉴定引物扩增进行鉴定，pUG6-*TEF1p-RPN4-CYC1t* 用 *PsiI* 单酶切以及鉴定引物扩增进行鉴定；

10 步骤 4、将 *PsiI* 酶切线性化的 pUG6-*TEF1p-PDR1-CYC1t* 通过同源重组方式整合进出发菌株 YB-A-6-1 染色体中，在含有 200 μ g/mL G418 的抗性 YPD 平板上挑选阳性酿酒酵母单菌落进行 PCR 鉴定，阳性菌株命名为 P 菌株；

15 步骤 5、通过 *EcoRV* 单酶切克隆载体 pRS42H 并进行胶回收，线性化 pRS42H 片段大小为 6217 bp；用表达盒扩增引物分别扩增 pUG6-*TEF1p-YAPI-CYC1t* 与 pUG6-*TEF1p-RPN4-CYC1t* 重组质粒上的 *TEF1p-YAPI-CYC1t* 和 *TEF1p-RPN4-CYC1t* 过表达盒，并进行胶回收；

20 步骤 6、将线性化 pRS42H 片段与 *TEF1p-YAPI-CYC1t* 过表达盒，按照分子质量比为 2: 6~2: 8 混合转化大肠杆菌 DH5 α 细胞，体内重组构建重组质粒，在含 100 mg/L 的氨苄青霉素的 LB 固体平板上挑选出含重组质粒 pRS42H-*TEF1p-YAPI-CYC1t* 的阳性克隆子，*EcoRV* 单酶切鉴定以及用鉴定引物进行 PCR 扩增鉴定；

25 步骤 7、将 *EcoRV* 线性化的 pRS42H-*TEF1p-YAPI-CYC1t* 与 *TEF1p-RPN4-CYC1t* 过表达盒，按照一定比例混合转化大肠杆菌 DH5 α 细胞，体内重组构建重组质粒，在含 100 mg/L 的氨苄青霉素的 LB 固体平板上挑选出含重组质粒 pRS42H-*TEF1p-YAPI-CYC1t-TEF1p-RPN4-CYC1t* 的阳性克隆子，*EcoRV* 单酶切鉴定以及用鉴定引物进行 PCR 扩增鉴定；

步 骤 8 、 将 最 后 所 得 的 环 状 pRS42H-*TEF1p-YAPI-CYC1t-TEF1p-RPN4-CYC1t* 重组质粒转化到 P 菌株细胞浆中，在含 300 μ g/mL 潮霉素的抗性平板上挑选阳性工程菌 PYR，用鉴定

引物进行 PCR 扩增鉴定，确定目标工程菌 PYR 是否含有 3 个过表达盒，获得最终的转录调控基因 *PDR1*、*YAP1*、*RPN4* 的联合过表达 PYR 菌株。

5 可选地，所述步骤 1 中的 *PDR1* 基因的扩增引物为 ScPDR1_F 和 ScPDR1_R，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 和 2 所示；*RPN4* 基因的扩增引物为 ScRPN4_F 和 ScRPN4_R，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 和 4 所示；*YAP1* 基因的扩增引物为 ScYAP1_F 和 ScYAP1_R，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.5 和 6 所示。

10 可选地，所述的步骤 3 中的 pUG6-*TEF1p-PDR1-CYC1t* 的鉴定引物为 iTEF1p-PDR1_F 和 iTEF1p-PDR1_R，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.11 和 12 所示；pUG6-*TEF1p-YAP1-CYC1t* 的鉴定引物为 iTEF1p-YAP1_F 和 iTEF1p-YAP1_R，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.13 和 14 所示；pUG6-*TEF1p-RPN4-CYC1t* 的鉴定引物为 iTEF1p-RPN4_F 和 iTEF1p-RPN4_R，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.15 和 16 所示。

15 可选地，所述的步骤 5 中的 pUG6-*TEF1p-YAP1-CYC1t* 表达盒扩增引物为 hcYAP1_F 和 hcYAP1_R，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.7 和 8 所示；pUG6-*TEF1p-RPN4-CYC1t* 表达盒扩增引物为 hcRPN4_F 和 hcRPN4_R，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.9 和 10 所示。

20 可选地，所述的步骤 6 中的含重组质粒 pRS42H-*TEF1p-YAP1-CYC1t* 的阳性克隆子的鉴定引物为 iTEF1p-YAP1_F 和 iTEF1p-YAP1_R，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.13 和 14 所示。

可选地，所述步骤 7 中的含重组质粒 pRS42H-*TEF1p-YAP1-CYC1t-TEF1p-RPN4-CYC1t* 的阳性克隆子的鉴定引物为 iTEF1p-YAP1_F 和 iTEF1p-YAP1_R、iTEF1p-RPN4_F 和 iTEF1p-RPN4_R，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.13-16 所示。

25 可选地，所述的步骤 8 中的鉴定引物为 iTEF1p-PDR1_F 和 iTEF1p-PDR1_R、iTEF1p-YAP1_F 和 iTEF1p-YAP1_R，iTEF1p-RPN4_F 和 iTEF1p-RPN4_R，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.13-18 所示。

本发明还公开了一种糠醛等抑制物耐受酵母工程菌在制备第二代生物

燃料乙醇以及以木质纤维素水解液为原料的其它生物基化学品中的应用。

与现有技术相比，本发明可以获得包括以下技术效果：

1) 本发明所构建的过表达 *PDR1*、*YAP1* 和 *RPN4* 工程菌 *PYR* 增强了其对糠醛的耐受能力，且对其正常生长未产生显著影响。

5 2) 本发明工程菌对糠醛耐受能力的提高具体表现为细胞壁抗性的明显增强，依赖于 *NADH* 作为辅酶的醛还原酶比活力的显著提高，以及一系列与有毒物质外排、细胞壁和细胞膜成分合成、蛋白质折叠、核苷酸合成等相关基因的显著上调转录表达。

10 3) 该工程菌对 5-羟甲基糠醛、乙酸、苯酚、乙醇以及玉米秸秆水解液中的抑制物等的耐受能力均有所增强，可作为较良好的工业发酵底盘菌株，具有用于第二代生物燃料乙醇以及以木质纤维素水解液为原料的其它生物基化学品工业化生产的应用潜力。

4) 本发明通过转录调控基因联合过表达构建酿酒酵母工程菌，为从基因表达层面改造酵母菌株提供了技术手段。

15 当然，实施本发明的任一产品并不一定需要同时达到以上所述的所有技术效果。

附图说明

20 此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解，构成本发明的一部分，本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明，并不构成对本发明的不当限定。在附图中：

25 图 1 是本发明酿酒酵母种属及倍型鉴定电泳图；其中，从左到右依次为 1: 倍型鉴定二重 PCR 扩增电泳图 (404 bp 和 544 bp); 2: ITS 序列 PCR 扩增电泳图 (841 bp); 3: 26S rDNA 序列 PCR 扩增电泳图 (615 bp); M: DNA marker;

图 2 是本发明扩增基因及重组质粒酶切电泳图；其中，A: 转录调控基因扩增电泳图；从左到右依次为 1: *PDR1* (3207 bp); 2: *YAP1* (1953 bp); 3: *RPN4* (1596 bp); B: 重组质粒酶切电泳图，1: pUG6-*TEF1p-CYC1t* 酶切图 (4956 bp); M: DNA marker;

图 3 是本发明重组质粒扩增及酶切鉴定电泳图；其中，A: 重组质粒扩增鉴定电泳图，从左到右依次为 1: *TEF1p-PDR1* (663 bp); 2: *TEF1p-YAP1* (622 bp); 3: *TEF1p-RPN4* (945 bp); B: 重组质粒单酶切图，从左到右依次为 1: *pUG6-TEF1p-PDR1-CYC1t* 单酶切 (8163 bp); 2: *pUG6-TEF1p-YAP1-CYC1t* 单酶切 (6909 bp); 3: *pUG6-TEF1p-RPN4-CYC1t* 单酶切 (6552 bp); M: DNA marker;

图 4 是本发明线性化质粒与酿酒酵母染色体 DNA 整合模式图；

图 5 是本发明过表达 P 菌株扩增鉴定电泳图；其中，1: P 菌株过表达盒 *TEF1p-PDR1* 鉴定引物扩增条带 (663 bp); M: DNA marker;

10 图 6 是本发明克隆载体单酶切及表达盒扩增电泳图；其中，A: 克隆载体 *pRS42H* 单酶切条带 (6217 bp); B: 过表达盒扩增条带，从左到右依次为 1: *TEF1p-YAP1* 过表达盒 (3137 bp); 2: *TEF1p-RPN4* 过表达盒 (2780 bp); M: DNA marker;

15 图 7 是本发明 *pRS42H-TEF1p-YAP1-CYC1t-TEF1p-RPN4-CYC1t* 重组质粒的构建模式图；

图 8 是本发明 PYR 工程菌构建示意图；

图 9 是本发明重组质粒单酶切及扩增鉴定电泳图；其中，A: 重组质粒 *pRS42H-TEF1p-YAP1-CYC1t* 单酶切条带 (9354 bp); B: 过表达盒 *TEF1p-YAP1* 鉴定引物扩增条带 (622 bp); C: 重组质粒 *pRS42H-TEF1p-YAP1-CYC1t-TEF1p-RPN4-CYC1t* 单酶切条带 (12128 bp); D: 从左到右依次为 1: 过表达盒 *TEF1p-YAP1* 鉴定引物扩增条带 (622 bp); 2: 过表达盒 *TEF1p-RPN4* 鉴定引物扩增条带 (945 bp); M: DNA marker;

25 图 10 是本发明 PYR 工程菌 PCR 扩增鉴定电泳图；其中，从左到右依次为 1: 过表达盒 *TEF1p-PDR1* 鉴定引物扩增条带 (663 bp); 2: 过表达盒 *TEF1p-YAP1* 鉴定引物扩增条带 (622 bp); 3: 过表达盒 *TEF1p-RPN4* 鉴定引物扩增条带 (945 bp); M: DNA marker;

图 11 是本发明糠醛应激条件下的生长曲线图；其中，A: 0 mM 糠醛; B: 25 mM 糠醛; C: 35 mM 糠醛; D: 45 mM 糠醛; CK: 出发菌 YB-A-6-1;

图 12 是本发明糠醛应激条件下菌株的醛还原酶比活力; *表示差异显

著 ($p < 0.05$); **表示差异性极显著 ($p < 0.01$); CK: 出发菌 YB-A-6-1;

图 13 是本发明其它抑制物应激条件下的生长曲线图, 其中, A: 85 mM 5-羟甲基糠醛; B: 5.2 g/L 乙酸; C: 2.0 g/L 苯酚; D: 10.5 % 无水乙醇; E: 13% 玉米秸秆水解液; CK: 出发菌 YB-A-6-1。

5

具体实施方式

以下将配合实施例来详细说明本发明的实施方式, 藉此对本发明如何应用技术手段来解决技术问题并达成技术功效的实现过程能充分理解并据以实施。

10 实施例 1 出发菌株 YB-A-6-1 的分离与鉴定:

一、出发菌株 YB-A-6-1 的分离

2011 年, 采集四川省宜宾白酒厂的酒醅样品, 置于封口塑料膜, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温保存。用移液器取 1.0 mL 菌液 (稀释度为 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7}) 涂布于丙酸钠、硫酸链霉素-YEPD 固体培养基, 于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养 48 h, 直至
15 长出乳白色菌落, 挑取具有典型酵母菌落特征的菌落, 划线分离 2~3 次, 经镜检为纯种后用接种环接入 YEPD 液体培养基, 于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床恒温培养 24 h 后与 30% 灭菌甘油按 1:1 体积注入冻存管混匀, 在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

二、出发菌株 YB-A-6-1 的鉴定:

出发菌株 YB-A-6-1 (YBA_08) 经 26S rDNA 及 ITS DNA 扩增及序列测
20 定, 其种属被鉴定为酿酒酵母; 经倍型鉴定引物 (MAT α _F 和 MAT α _R、MAT α _F 和 MAT α _R) 二重 PCR 扩增, 鉴定为二倍体型酵母菌, 命名为 YB-A-6-1, 分类命名为酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*); 于 2019 年 6 月 14 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏号为 CGMCC No. 17929。琼脂糖凝胶电泳结果见图 1 所示, 通过电泳图中片段大
25 小能够鉴定该菌为二倍体酿酒酵母。引物序列信息见表 1 所示 (26S rDNA_F 和 26S rDNA_R、ITS_F 和 ITS_R), 26S rDNA 序列测定结果见 GenBank no. KF141699.1, ITS 序列测定结果见 GenBank no. MN158119.1。

表 1 引物信息

引物	序列 (5'-3')	DNA 片段	大小 (bp)
ScPDR1_F	<u>TAGCAATCTAATCTAAGTTTTAATACTAGT</u> ATGCGAGGCTTGACACCTAAGAAC	PDR1	3207
ScPDR1_R	GGCGTGAATGTAAGCGTGACATAACTAATTACATCCGCGGTTAACTATCTGGATAAACGTCGC		
ScRPN4_F	<u>TAGCAATCTAATCTAAGTTTTAATACTAGT</u> ATGGCTTCTACGGAACCTAGCCTAAAA	RPN4	1596
ScRPN4_R	GGCGTGAATGTAAGCGTGACATAACTAATTACATCCGCGGTTAACCCATGACATAACCAATAT		
ScYAP1_F	GCGCACTAGTATGAGTGTGTCTACCGCCAAG	YAP1	1953
ScYAP1_R	GCGCCCGCGGTTAGTTCATATGCTTATTCAAAGCTAATTG		
hcYAP1_F	<u>GGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATT</u> ACTAACGCCGCCATCCAGTGTCG	YAP1 表达盒	3137
hcYAP1_R	<u>ATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGAT</u> GGGAAGAGCGCCCAATACGCCAAAC		
hcRPN4_F	<u>TGTATGCTATACGAAGTTATTAGGT</u> GGAAGAGCGCCCAATACGCAAA	RPN4 表达盒	2780
hcRPN4_R	<u>AGGCAGATGGGGATGACCGTAGTCTT</u> ACTAACGCCGCCATCCAGTGT		
iTEF1p-PDR1_F	GACCGCGAATCCTTACATCACACC	TEF1p-PDR1	663
iTEF1p-PDR1_R	TCACAGCTTGCGCAGGGAAACT		
iTEF1p-YAP1_F	GACCGCGAATCCTTACATCACACC	TEF1p-YAP1	622
iTEF1p-YAP1_R	CTTCTTCTTCGGTTGCTCGCTATC		
iTEF1p-RPN4_F	CGCCGTACCACTTCAAAACACCC	TEF1p-RPN4	945
iTEF1p-RPN4_R	TGCGGCGCTATTATCTTGAAGTGAC		
26S rDNA_F	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	26S rDNA	615
26S rDNA_R	GGTCCGTGTTTCAAGACGG		
ITS_F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	ITS	841
ITS_R	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
MAT α _F	AGTCACATCAAGATCGTTTATGG	α 型	544
MAT α _R	GCACGGAATATGGGACTACTTCG		
MATa_F	同 MAT α _F	a 型	404
MATa_R	ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG		

注：双横线序列为同源臂序列；ACTAGT: *SpeI*; CCGCGG: *SacII*。

实施例 2 PYR 的构建过程：

- 1、提取酵母单倍体菌株 BY4742 的基因组并扩增 *PDR1*、*YAP1*、*RPN4* 基因，进行胶回收，*PDR1* 片段大小为 3207 bp；*YAP1* 片段大小为 1953 bp；*RPN4* 片段大小为 1596 bp。琼脂糖凝胶电泳结果见图 2 A 所示，引物序列信息见表 1 所示中的 ScPDR1_F 和 ScPDR1_R；ScYAP1_F 和 ScYAP1_R；ScRPN4_F 和 ScRPN4_R 所示。

- 2、通过 *SpeI* 和 *SacII* 限制性内切酶对重组质粒 pUG6-*TEF1p-CYC1t* 进行双酶切，得到线性化的 pUG6-*TEF1p-CYC1* 片段 (4956 bp)，进行胶回收。电泳结果见图 2B 所示，通过电泳图中片段大小验证该质粒片段大小正确。同时通过 *SpeI* 和 *SacII* 限制性内切酶对 *YAP1* 片段进行双酶切以及纯化回收。

- 3、采用 T4 DNA 连接酶，将双酶切的 pUG6-*TEF1p-CYC1t* 片段与双酶

切的 *YAP1* 片段进行粘性末端连接体外构建重组质粒,转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,在含氨苄青霉素 (100 mg/L) 的 LB 固体平板上挑选出含重组质粒 pUG6-*TEF1p-YAP1-CYC1t* 的阳性克隆子。将双酶切的 pUG6-*TEF1p-CYC1t* 片段分别与 *PDR1*、*RPN4* 片段按照分子质量比为 2:6~2:8 混合 (按照此比例融合,能够有效地提高重组连接效率)后,分别转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞体内重组构建重组质粒,在含氨苄青霉素 (100 mg/L) 的 LB 固体平板上分别挑选出含重组质粒 pUG6-*TEF1p-PDR1-CYC1t* 与 pUG6-*TEF1p-RPN4-CYC1t* 的阳性克隆子。pUG6-*TEF1p-PDR1-CYC1t* 用 *PsiI* 单酶切以及鉴定引物 (iTEF1p-PDR1_F 和 iTEF1p-PDR1_R) 扩增进行鉴定, pUG6-*TEF1p-YAP1-CYC1t* 用 *BamHI* 单酶切以及鉴定引物 (iTEF1p-YAP1_F 和 iTEF1p-YAP1_R) 扩增进行鉴定, pUG6-*TEF1p-RPN4-CYC1t* 用 *PsiI* 单酶切以及鉴定引物 (iTEF1p-RPN4_F 和 iTEF1p-RPN4_R) 扩增进行鉴定。鉴定引物扩增出的片段大小分别为 663 bp、622 bp、945 bp; 单酶切片段大小依次为 8163 bp、6909 bp、6552 bp。电泳结果见图 3A 和图 3B 所示。

4、将 *PsiI* 酶切线性化的 pUG6-*TEF1p-PDR1-CYC1t* 通过同源重组方式整合进出发菌株 YB-A-6-1 染色体中 (整合模式过程见图 4 所示),在含有 G418 (200 μ g/mL) 的抗性 YPD 平板上挑选阳性酿酒酵母单菌落进行 PCR 鉴定,扩增片段大小为 663 bp,电泳结果见图 5 所示。阳性菌株命名为 P 菌株。

5、通过 *EcoRV* 单酶切克隆载体 pRS42H 并进行胶回收,线性化 pRS42H 片段大小为 6217 bp;用表达盒扩增引物 (hcYAP1_F 和 hcYAP1_R、hcRPN4_F 和 hcRPN4_R) 分别扩增 pUG6-*TEF1p-YAP1-CYC1t* 与 pUG6-*TEF1p-RPN4-CYC1t* 重组质粒上的 *TEF1p-YAP1-CYC1t* 和 *TEF1p-RPN4-CYC1t* 过表达盒,并进行胶回收,扩增片段大小分别为 3137 bp 和 2780 bp。上述电泳结果见图 6A 和图 6B 所示。

6、将线性化 pRS42H 片段与 *TEF1p-YAP1-CYC1t* 过表达盒,按照分子质量比为 2:6~2:8 混合 (按照此比例融合,能够有效地提高重组连接效率)转化大肠杆菌 DH5 α 细胞,体内重组构建重组质粒,在含氨苄青霉素 (100 mg/L) 的 LB 固体平板上挑选出含重组质粒 pRS42H-*TEF1p-YAP1-CYC1t* 的

阳性克隆子，*EcoRV* 单酶切鉴定以及用鉴定引物（iTEF1p-YAP1_F 和 iTEF1p-YAP1_R）进行 PCR 扩增鉴定，单酶切的片段大小为 9354 bp，鉴定引物扩增出的片段大小为 622 bp。电泳结果见图 9A 和图 9B 所示。

7、将 *EcoRV* 线性化的 pRS42H-TEF1p-YAP1-CYC1t 与
5 TEF1p-RPN4-CYC1t 过表达盒，按照分子质量比为 2: 6~2: 8 混合（按照此比例融合，能够有效地提高重组连接效率）转化大肠杆菌 DH5 α 细胞，体内重组构建重组质粒，在含氨苄青霉素（100 mg/L）的 LB 固体平板上挑选出含重组质粒 pRS42H-TEF1p-YAP1-CYC1t-TEF1p-RPN4-CYC1t 的阳性克隆子（其构建模式图如图 7 所示），*EcoRV* 单酶切鉴定以及用鉴定引物
10 （iTEF1p-YAP1_F、iTEF1p-YAP1_R、iTEF1p-RPN4_F 和 iTEF1p-RPN4_R）进行 PCR 扩增鉴定，单酶切的片段为 12128 bp，鉴定引物扩增出的片段大小分别为 622 bp 和 945 bp。电泳结果见图 9C 和图 9D 所示。

8、将最后所得的环状 pRS42H-TEF1p-YAP1-CYC1t-TEF1p-RPN4-CYC1t 重组质粒转化到 P 菌株细胞浆中，在含潮霉素（300 μ g/mL）的抗性平板上
15 挑选阳性工程菌 PYR（PYR 工程菌构建示意图见图 8），用鉴定引物（iTEF1p-PDR1_F 和 iTEF1p-PDR1_R、iTEF1p-YAP1_F 和 iTEF1p-YAP1_R、iTEF1p-RPN4_F 和 iTEF1p-RPN4_R）进行 PCR 扩增鉴定，确定目标工程菌 PYR 是否含有 3 个过表达盒，鉴定引物扩增出的片段大小分别为 663 bp、622 bp、945 bp。电泳结果见图 10 所示。获得最终的转录调控基因 *PDR1*、
20 *YAP1*、*RPN4* 的联合过表达 PYR 菌株。

基于以上特征，将菌株 PYR 鉴定为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)，于 2019 年 6 月 14 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏号为 CGMCC No. 17930。该 PYR 工程菌是在出发菌 YB-A-6-1 的基础上，通过基因重组技术构建的一株转录调控基因(*PDR1*、*YAP1*、*RPN4*)
25 联合过表达菌株。

本发明基于 *PDR1*、*YAP1*、*RPN4* 这 3 个关键转录调控基因的不同功能，通过基因重组技术实现这 3 个关键转录调控基因在持续表达的强启动子 *TEF1p* 控制下的联合过表达，从而提高酿酒酵母对于糠醛等抑制物的耐受能力，更好地实现第二代生物燃料乙醇工业生产，降低其生产成本；此外构建

的工程菌，还可以作为底盘菌株用于其它生物基化学品的生产。

实施例 3 糠醛应激条件下的迟滞期测定及抗性测定：

1、糠醛应激条件下的迟滞期测定：为了测定构建的工程菌 PYR 是否在出发菌 YB-A-6-1 的基础上进一步提高对糠醛的耐受能力，采取光密度法测定比较两株菌在糠醛应激压力下的摇瓶液体培养生长状况，通过生长曲线的迟滞期长短反映其耐受性。选取 25 mM、35 mM、45 mM 糠醛作为实验的 3 个梯度浓度值，进行糠醛耐受性测定。具体操作步骤如下：

步骤 1、将工程菌 PYR 和出发菌（CK）分别接种到含有 30 mL YPD 液体的锥形瓶中，30 ℃、200 r/min 摇床振荡过夜预培养；

步骤 2、使用分光光度计测定菌液 OD_{600} 值，用同批次的 YPD 培养液调零。待菌液 OD_{600} 值到达 1.0，以 10% 的接种量离心收集细胞，接种到预先准备好的含有 0 mM、25 mM、35 mM、45 mM 浓度糠醛的 YPD 培养液中，使菌液 OD_{600} 值约为 0.1，设置 3 个生物学重复；

步骤 3、放入摇床进行 30 ℃、200 r/min 生长培养，间隔 6 h 取样测定 OD_{600} 值。整理数据绘制生长曲线图。

如图 11 所示，在无糠醛应激条件下，工程菌 PYR 与出发菌 CK 均未出现生长迟滞期，并且生长曲线几乎重合，表明通过转录调控基因联合过表达方式构建的工程菌不会对正常的生长造成显著影响。在不同浓度糠醛抑制物下，工程菌与出发菌均出现相应的迟滞期，工程菌的生长迟滞期明显比出发菌短。在 25 mM 糠醛浓度下，工程菌的迟滞期比出发菌缩短了约 6 h；在 35 mM 糠醛浓度下，工程菌的迟滞期比出发菌缩短了约 12 h；而在 45 mM 糠醛浓度下，工程菌的迟滞期比出发菌缩短了约 24 h。试验结果表明，工程菌能够明显缩短糠醛应激条件下的迟滞期，从而更快地恢复生长进入对数期，并且随着糠醛浓度的增加效果更加明显。因此，*PDR1*、*YAP1* 和 *RPN4* 3 个转录调控基因的联合过表达提高了工程菌株 PYR 对糠醛的耐受能力。

2、细胞壁抗性测定

细胞壁是酵母细胞直接接触外界环境的关键结构组分，酿酒酵母细胞壁完整性对糠醛耐受以及维持自身特定形态方面均有重要作用。以出发菌作为对照，选取 55 mM 糠醛浓度作为该测定的浓度值，通过检测细胞对细胞壁

裂解酶 lyticase 的敏感程度，间接反映工程菌 PYR 细胞壁的抗性能力。具体操作步骤如下：

步骤 1、分别活化工程菌 PYR 和出发菌（CK），30 ℃、200 r/min 摇床振荡过夜预培养；

5 步骤 2、将处于生长对数期的菌液分别接种到含有 55 mM 浓度糠醛的体积为 30 mL 新鲜 YPD 培养液中，调节各菌液的 OD_{600} 为 1.0，设置 3 个生物学重复；

步骤 3、将两株菌在 30 ℃、200 r/min 摇床振荡培养，分别于 0 h 和 8 h 吸取 2 mL 的菌液于离心管中，离心收集菌体；无菌水洗涤，离心收集菌体；

10 步骤 4、向菌体加入 2 mL 磷酸缓冲液（0.1 mM，pH=7.5）重悬，然后添加 50 μ L 浓度为 0.6 mg/mL 的 lyticase 于 2 mL 离心管中，30 ℃ 孵育 1 h；

步骤 5、测定酶裂解处理后的细胞液在两个时间点的 OD_{600} 值，整理数据得出工程菌 PYR 和出发菌 CK 之间细胞壁抗性的结果差异。

见表 2 所示，在未经糠醛应激处理下的酵母细胞，lyticase 裂解作用 1 h
15 后，出发菌 CK 细胞 OD_{600} 的变化值约 0.629，工程菌 PYR 细胞 OD_{600} 的变化值约 0.610；在经过 55 mM 糠醛应激处理下的酵母细胞，lyticase 裂解作用 1 h 后，出发菌细胞 OD_{600} 的变化值约 1.044，工程菌细胞 OD_{600} 的变化值约 0.902。出发菌 OD_{600} 的变化值在糠醛处理与未处理情况下差值约 0.415，而工程菌 OD_{600} 的变化值在糠醛处理与未处理情况下差值约 0.293，二者之间差异极显著（ $p < 0.01$ ）。试验结果表明，出发菌细胞壁对 lyticase 的敏感程度相比于出发菌强，即出发菌细胞壁相比工程菌的裂解程度较严重，工程菌细胞壁的抗性能力相比于出发菌提高了约 29.4%。说明工程菌 PYR 的细胞壁抗性能力明显强于出发菌 YB-A-6-1。

表 2 细胞壁抗性测定

菌株	55 mM 糠醛（ OD_{600} 变化值）		
	$\Delta 0$ h	$\Delta 8$ h	$\Delta 8$ h- $\Delta 0$ h
CK	0.629 \pm 0.020	1.044 \pm 0.006	0.415 \pm 0.025
PYR	0.610 \pm 0.017	0.902 \pm 0.011	0.293 \pm 0.023**

25 注：CK 为出发菌株 YB-A-6-1； $\Delta 0$ h 指糠醛处理细胞 0 h，用 lyticase 处理

细胞壁 1 h 前后, OD_{600} 的变化值; $\Delta 8$ h 指糠醛处理细胞 8 h, 用 lyticase 处理细胞壁 1 h 前后, OD_{600} 的变化值; $\Delta 8$ h- $\Delta 0$ h 指对细胞壁进行损伤处理前后, OD_{600} 的变化值. **表示工程菌株与出发菌株之间的差异性极显著 ($p < 0.01$).

5 实施例 4 醛还原酶比活力测定

醛还原酶能够将糠醛还原为低毒的 2-呋喃甲醇从而达到脱毒作用。醛还原酶比活力大小是衡量酵母细胞对糠醛脱毒及耐受能力的重要指标。该催化反应需要辅酶 NADH 或 NADPH 的参与, 其中 NADH 在糠醛的脱毒中发挥着更为重要的作用。本测定选用 NADH 作为醛还原酶的辅酶, 酶活力通过反应所需 NADH 在 340 nm 吸光度的下降来进行测定, 以每分钟氧化 1 μ mol NADH 为 1 个酶活力单位。本试验在 45 mM 糠醛浓度应激条件下, 选取 0 h、4 h、8 h 三个时间点收集细胞进行醛还原酶比活力测定。

1、粗酶提取:

步骤 1、分别活化工程菌 PYR 和出发菌 (CK), 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床过夜培养;

步骤 2、将处于生长对数期的菌液分别接种到含有 45 mM 浓度糠醛的体积为 30 mL 新鲜 YPD 培养液中, 调节各菌液的 OD_{600} 为 1.0, 设置 3 个生物学重复;

步骤 3、将两株菌在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床振荡培养, 分别于 0 h、4 h、8 h 吸取 2 mL 的菌液于离心管中, 5000 r/min 室温离心 5 min, 去上清液, 称取酵母菌体湿重;

步骤 4、按照约每 50 mg 的菌体湿重加入 500 μL 的蛋白质提取试剂, 每毫升的提取试剂加入 1 μL 的蛋白酶抑制剂, 80 μL 的 DTT 以及 10 μL 的 PMSF, 充分混匀;

步骤 5、盖上离心管, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床振荡大约 20 min;

步骤 6、13000 r/min 离心 15 min, 将上清液转移到新的离心管中备用, 此上清液即为粗酶溶液。

2、比活测定:

步骤 1、将待测粗酶溶液样品放置于冰上, 所有试剂均在所需实验温度

下放置;

步骤 2、利用考马斯亮蓝法在 595 nm 波长测定粗酶溶液的蛋白质浓度;

步骤 3、向 30 ℃、pH=7.0 的 450 μ L 的 100 mM PBS 缓冲液中按照顺序加入 10 μ L 0.5 M 糠醛, 10 μ L 5 mM 辅酶 NADH;

5 步骤 4、最后加入 30 μ L 的粗酶溶液, 迅速混匀后转入比色皿中读取 OD_{340} 的吸光度值; 在 30 ℃ 环境下反应 2 min 后, 再次读取 OD_{340} 的吸光度值; 计算醛还原酶的比活力值。

见图 12 所示, 以 NADH 作为辅酶, 45 mM 糠醛处理 0 h 时, 出发菌 PYR 与工程菌 CK 之间的醛还原酶比活力值几乎无差异, 它们的醛还原酶比活力
10 约为 0.024 U/mg; 处理 4 h 后, 工程菌的醛还原酶比活力强于出发菌, 出发菌和工程菌的醛还原酶比活力分别约为 0.038 U/mg, 0.044 U/mg, 工程菌的醛还原酶比活力相比于出发菌提高了约 1.4 倍, 二者之间表现出显著差异 ($p < 0.05$); 处理 8 h 后, 出发菌和工程菌的醛还原酶比活力分别约为 0.035 U/mg, 0.057 U/mg, 工程菌的醛还原酶比活力相比于出发菌提高了约 1.6 倍,
15 二者之间表现出极显著差异 ($p < 0.01$)。说明工程菌在糠醛应激条件下, 依赖于 NADH 作为辅酶的醛还原酶表达水平相比出发菌得到显著提高。

实施例 5 基因转录表达分析

通过转录组测序数据结果, 进一步从基因表达层面挖掘工程菌发挥糠醛耐受性的功能基因群。其具体操作步骤如下:

20 步骤 1、分别活化工程菌 PYR 和出发菌 (CK) 进行过夜预培养, 调整菌液 OD_{600} 值为 1.0, 以 10% 的接种量收集细胞接种到含有 45 mM 糠醛的 YPD 培养液中, 在 30 ℃、200 r/min 条件下进行摇床震荡培养。实验设置 3 个生物学重复;

步骤 2、在 3 h 时间点收集细胞, 迅速经液氮冻存处理送至北京诺禾致
25 源公司进行建库测序;

步骤 3、提取样品的 RNA 并检验其浓度、纯度以及完整性;

步骤 4、进行文库构建, 通过稀释调整浓度并对文库的有效浓度进行准确定量以保证文库质量;

步骤 5、检测合格后, 按照特定的浓度值进行 Illumina 测序得到序列数

据信息;

步骤 6、对数据信息进行统计学分析, 筛选样本在糠醛应激压力下表达水平显著差异的基因, 显著差异基因筛选标准为 $\log_2(\text{Fold change}) > 1$ & p 值 < 0.05 ;

5 步骤 7、通过对差异基因集进行富集分析, 找到糠醛应激条件下工程菌糠醛耐受生物学功能相关的差异基因并进行功能注释。

通过工程菌与出发菌在糠醛应激条件下转录组水平的显著差异表达基因的功能注释, 挖掘到了工程菌发挥糠醛耐受性的重要基因, 见表 3 所示。主要是膜外排蛋白基因、细胞壁和细胞膜成分合成基因、蛋白质折叠分子伴侣基因以及磷酸戊糖途径相关的基因。膜外排蛋白基因 *AZR1* 具有将细胞内有毒物质 (进入细胞内的过量糠醛和细胞代谢产生的有毒物质) 外排到细胞外的功能。细胞壁和细胞膜成分合成基因主要涉及几丁质、麦角固醇、脂肪酸和磷脂等脂类的合成。几丁质在细胞壁重塑和拯救途径中能起到弥补受损细胞壁的作用, 麦角固醇、脂肪酸、磷脂等脂类成分能起到维持细胞膜的完整性、流动性等重要作用。蛋白质分子伴侣基因 *SSB1* 和 *SSB2* 能够帮助新生蛋白质多肽链在糠醛应激条件下的正常折叠, 从而发挥其正常的功能。磷酸戊糖途径相关的基因 *SOL3*、*GND2*、*RK11*、*PRS3* 在磷酸戊糖途径构成了一条链式催化反应, 能将 6-磷酸葡萄糖酸通过上述基因所对应的代谢途径酶转变为 5-磷酸核糖-1-焦磷酸 (PRPP), 而 PRPP 参与嘌呤核苷酸和嘧啶核苷酸的补救途径以及从头合成, 工程菌能通过更多地合成核苷酸替代 DNA 链中受损的核苷酸分子从而维持正常的生物学功能。

表 3 糠醛耐受相关的重要基因

编号	基因	功能	表达差异
ID	Gene	Function	$\log_2(\text{Fold change})$ PYR vs CK
膜外排蛋白基因			
YGR224W	AZR1	Plasma membrane transporter of the major facilitator superfamily	1.76
细胞壁和细胞膜成分合成基因			

<i>YBR038W</i>	<i>CHS2</i>	Chitin synthase	1.02
<i>YDR055W</i>	<i>PST1</i>	Cell wall protein that contains a putative GPI-attachment site	1.64
<i>YLR056W</i>	<i>ERG3</i>	Ergosterol biosynthetic process	1.26
<i>YPL170W</i>	<i>DAP1</i>	Regulation of ergosterol biosynthetic process	1.02
<i>YGL055W</i>	<i>OLE1</i>	Required for monounsaturated fatty acid synthesis	1.53
<i>YPR113W</i>	<i>PIS1</i>	Phosphatidylinositol synthase	1.19
<i>YLR372W</i>	<i>ELO3</i>	Involved in fatty acid and sphingolipid biosynthesis	1.14
<i>YBL039C</i>	<i>URA7</i>	Involved in phospholipid biosynthesis	1.58
<i>YJR063W</i>	<i>RPA12</i>	Involved in lipid metabolism	1.21
<i>YLR046C</i>	<i>YLR046C</i>	Putative membrane protein	1.48
蛋白折叠分子伴侣基因			
<i>YDL229W</i>	<i>SSB1</i>	Ribosome-associated molecular chaperone may be involved in folding of newly-made polypeptide chains	1.12
<i>YNL209W</i>	<i>SSB2</i>	Ribosome-associated molecular chaperone may be involved in folding of newly-made polypeptide chains	1.24
磷酸戊糖途径相关的基因			
<i>YGR256W</i>	<i>GND2</i>	6-phosphogluconate dehydrogenase	1.39
<i>YHR163W</i>	<i>SOL3</i>	6-phosphogluconolactonase	1.09
<i>YHL011C</i>	<i>PRS3</i>	5-phospho-ribosyl-1(alpha)-pyrophosphatase synthetase	1.43
<i>YOR095C</i>	<i>RKII</i>	Ribose-5-phosphate ketol-isomerase	1.89

注: CK 为出发菌株 YB-A-6-1.

实施例 6 其它抑制物应激条件下的迟滞期测定

木质纤维素生物质通过预处理产生的有毒抑制物除了主要抑制物糠醛外, 还含有其它抑制物: 5-羟甲基糠醛、乙酸、苯酚等, 这些抑制物也会对酿酒酵母的生长与发酵产生严重影响, 此外酿酒酵母的发酵产物乙醇也会对其生长与发酵造成影响。因此, 除了测定比较工程菌与出发菌对于糠醛的耐受性外, 有必要测定比较在这些单一抑制物 (5-羟甲基糠醛、乙酸、苯酚、

乙醇)下的耐受性以及复合抑制物(木质纤维素水解液)下的耐受性。按照实施例3方法所述,本测定选取85 mM 5-羟甲基糠醛、5.2 g/L 乙酸、2.0 g/L 苯酚、10.5%无水乙醇以及13%玉米秸秆水解液进行测定。

如图13所示,在85 mM的5-羟甲基糠醛应激的液体摇瓶培养下,工程菌PYR的生长迟滞期明显短于出发菌CK,工程菌比出发菌提前了约32 h恢复生长;在5.2 g/L的乙酸应激条件下,工程菌比出发菌提前了约6 h先恢复生长;在2.0 g/L的苯酚应激条件下,两株菌均未出现明显的生长迟滞期,但是工程菌的生长速率明显大于出发菌,并且工程菌最后到达稳定期的细胞总量也明显多于出发菌;在10.5%的无水乙醇应激条件下,出发菌在测定的72 h内,没有出现生长,而工程菌在经过约12 h的迟滞期后进入对数生长期;在13%的玉米秸秆水解液应激条件下,工程菌的迟滞期约为12 h,出发菌的迟滞期约为24 h,工程菌比出发菌提前了约12 h恢复生长。综上,工程菌PYR对于其它有毒抑制物也具有较好的耐受性。

上述说明示出并描述了发明的若干优选实施例,但如前所述,应当理解发明并非局限于本文所披露的形式,不应看作是对其他实施例的排除,而可用于各种其他组合、修改和环境,并能够在本文所述发明构想范围内,通过上述教导或相关领域的技术或知识进行改动。而本领域人员所进行的改动和变化不脱离发明的精神和范围,则都应在发明所附权利要求的保护范围内。