

权 利 要 求 书

1. 一株糠醛等抑制物耐受酵母出发菌株, 其特征在于, 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。

~~2. 一株糠醛等抑制物耐受酵母工程菌, 其特征在于, 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。~~

23. 一株糠醛等抑制物耐受酵母工程菌的构建方法, 其特征在于, 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;

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 DH5 α 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*-*YAP1*-*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-YAP1-CYC1t 用 *Bam*HI 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；

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[权利要求 1 所述的](#)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；

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-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；

步骤 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-YAP1-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 7、将 *EcoRV* 线性化的 pRS42H-*TEF1p-YAP1-CYC1t* 与 *TEF1p-RPN4-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-YAP1-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-YAP1-CYC1t-TEF1p-RPN4-CYC1t 重组质粒转化到 P 菌株细
胞浆中，在含 300 μg/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。

43. 根据权利要求 32 所述的构建方法，其特征在于，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。

54. 根据权利要求 32 所述的构建方法，其特征在于，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。

65. 根据权利要求 32 所述的构建方法，其特征在于，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。

76. 根据权利要求 32 所述的构建方法，其特征在于，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。

87. 根据权利要求 [32](#) 所述的构建方法, 其特征在于, 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。

98. 根据权利要求 [32](#) 所述的构建方法, 其特征在于, 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。

109. 一种[权利要求 3-8 任一权利要求所述的](#)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。