

稳定遗传的染色体组合整合酿酒酵母重组菌株的构建

左颀¹, 赵心清¹, 刘海军², 胡世洋², 马中义², 白凤武¹

1 大连理工大学生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023

2 中国石油天然气股份有限公司 吉林石化公司研究院, 吉林 吉林 132021

左颀, 赵心清, 刘海军, 等. 稳定遗传的染色体组合整合酿酒酵母重组菌株的构建. 生物工程学报, 2014, 30(4): 669–673.

Zuo Q, Zhao XQ, Liu HJ, et al. Development of genetically stable recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains using combinational chromosomal integration. Chin J Biotech, 2014, 30(4): 669–673.

摘要: 染色体整合表达可获得稳定遗传的基因工程菌, 是工业酿酒酵母育种的重要手段。pAUR135 整合载体是抗生素标记基因可循环使用的载体, 添加特定的同源臂后可构建在酵母染色体上稳定遗传的菌株。目前对酵母菌的分子育种常需要对多个基因进行过表达, 利用 pAUR135 载体可将不同基因分别整合在不同染色体或相同染色体的不同位点, 这种组合整合表达方法可对不同基因的表达强度比例进行调节, 构建表型优化的工业酿酒酵母菌株。本研究以木糖代谢途径基因为例, 构建了 3 个 pAUR135 整合载体, 将 3 个木糖代谢基因依次整合到工业酿酒酵母染色体的不同位点, 获得了染色体组合整合表达的代谢工程菌株。与将这 3 个基因整合在同一个位点的对照重组菌株相比, 染色体组合整合的重组菌株木糖利用率提高了 24.4%–35.5%。多基因染色体组合整合方法从新的角度对工业酵母进行代谢工程改造, 所获得的工程菌株不带有任何外来基因和选择标记, 可以保持性状的稳定, 是工业酿酒酵母分子育种的新方法。

关键词: 同源重组, pAUR135 整合载体, 工业酿酒酵母, 染色体组合整合

Development of genetically stable recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains using combinational chromosomal integration

Qi Zuo¹, Xinqing Zhao¹, Haijun Liu², Shiyang Hu², Zhongyi Ma², and Fengwu Bai¹

1 School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116023, Liaoning, China

2 Research Institute of Jilin Petrochemical Company, Ltd., PetroChina, Jilin 132021, Jilin, China

Abstract: Chromosomal integration enables stable phenotype and therefore has become an important strategy for breeding of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains. pAUR135 is a plasmid that enables recycling use of antibiotic

Received: September 2, 2013; **Accepted:** October 15, 2013

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Nos. 2012AA021205, 2012AA101805), Program for New Century Excellent Talents, Ministry of Education, China (No. NCET-11-0057), International S&T Cooperation Program (No. 2013DFA60470-1).

Corresponding author: Xinqing Zhao. Tel/: +86-411-84706319; Fax: +86-411-84706329; E-mail: xqzhao@dlut.edu.cn
Fengwu Bai. E-mail: fwbai@dlut.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (Nos. 2012AA021205, 2012AA101805), 教育部新世纪优秀人才支持计划 (No. NCET-11-0057), 国家国际科技合作专项 (No. 2013DFA60470-1) 资助。

selection marker, and once attached with designated homologous sequences, integration vector for stable expression can be constructed. Development of *S. cerevisiae* strains by metabolic engineering normally demands overexpression of multiple genes, and employing pAUR135 plasmid, it is possible to construct *S. cerevisiae* strains by combinational integration of multiple genes in multiple sites, which results in different ratios of expressions of these genes. Xylose utilization pathway was taken as an example, with three pAUR135-based plasmids carrying three xylose assimilation genes constructed in this study. The three genes were sequentially integrated on the chromosome of *S. cerevisiae* by combinational integration. Xylose utilization rate was improved 24.4%–35.5% in the combinational integration strain comparing with that of the control strain with all the three genes integrated in one location. Strain improvement achieved by combinational integration is a novel method to manipulate multiple genes for genetic engineering of *S. cerevisiae*, and the recombinant strains are free of foreign sequences and selection markers. In addition, stable phenotype can be maintained, which is important for breeding of industrial strains. Therefore, combinational integration employing pAUR135 is a novel method for metabolic engineering of industrial *S. cerevisiae* strains.

Keywords: homologous recombination, pAUR135 vector, industrial *Saccharomyces cerevisiae*, combinational chromosomal integration

酿酒酵母广泛应用于食品、酿造和燃料乙醇生产等领域,对其进行遗传育种研究一直是国内外研究的热点。染色体整合表达可实现基因工程菌的稳定遗传。目前利用同源重组构建稳定表达的酿酒酵母菌株已被广泛研究,选取的整合位点包括 rDNA 位点^[1]和 δ -序列位点^[2]等多拷贝整合位点,以及 *URA3*^[3]、*HO*^[4]位点等单拷贝整合位点。对 β -半乳糖苷酶报告基因在酿酒酵母染色体上多个位点整合结果的研究表明, *lacZ* 基因在不同位点整合后,酶活差异可达到 8.7 倍^[5],推测可能存在位置效应,即由于染色体组蛋白甲基化等表观遗传学效应导致基因在染色体的不同位置表达水平不同^[6-7]。

随着代谢工程的不断发展,微生物的遗传改造常需要对多个基因进行操作,在多基因整合时受抗生素和营养缺陷型选择标记种类的限制。Cre/loxP 和 FLP/FRT 重组系统因其可去除抗生素标记基因而被广泛应用于菌株的同源重组^[8-9]。虽然这两个系统有着非常高效的重组效率,但是重组酶识别位点 loxP 和 FRT 序列仍然留在基因组上,可能会引发新的同源重组^[9]。因此,选择可以彻底去除抗生素标记基因,并且可多次循环使用的高效重组载体,对酵母菌的生物育种非常关键。在代谢途径中限速步骤往往由多个基因控制,因此代谢工程操作需要对多个基因的表达进行平衡调控。国外学者采

用多基因启动子改组 (Multiple gene-promoter shuffling, MGPS) 方法^[10],将不同活性的启动子与关键酶基因进行组合,从而调控多基因表达水平的平衡。但研究多基因在染色体不同位点的组合整合对基因表达和代谢的影响还没有相关报道。

pAUR135 载体是可以循环使用抗生素标记的载体,该载体带有 *GIN11M86* 基因,可在 *Gall10* 启动子和半乳糖诱导下过量表达,只保留经过同源重组的不带有任何外源序列的转化子,利用该载体可对酿酒酵母进行重复多次整合表达,但国内相关的研究目前还没有充分开展。酵母菌代谢工程改造常需要多个基因的操作,多基因的表达需要进行平衡匹配,才能达到较好的效果^[11]。我们以木糖代谢途径改造为例,说明了染色体组合整合表达方法构建工业酿酒酵母菌的过程,该方法也可用于其他代谢途径基因的改造,所获得的工程菌株不带有任何外来基因和选择标记,可稳定遗传,为工业酿酒酵母的分子育种提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 菌种和培养基

XR 和 *XDH* 基因供体为树干毕赤酵母 *Scheffersomyces stipitis* JCM 10742 (日本 RIKEN

BioResource Center), *XK* 基因供体为 S288c (本实验室保存)。工业酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 6525 为本实验室保存。克隆载体 pUC18 和酵母 pAUR135 载体购自大连宝生物公司。酿酒酵母培养使用 YPD 培养基。按照实验需要, 加入终浓度为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 金担子素 (aureobasidin A, 简称 Aba^+) 进行酵母阳性克隆子筛选。

1.2 分子克隆所用酶及试剂盒

PCR 所用 Phusion High-Fidelity DNA 聚合酶和限制性内切酶购自 NEB 公司。T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司。DNA 片段纯化与回收试剂盒购自 Omega Bio-tek, Inc.。

1.3 基因克隆和载体构建

1.3.1 染色体组合整合木糖途径基因盒的扩增和构建

以 *S. cerevisiae* 6525 DNA 作为模板扩增 3 个基因的上下游 6 个同源臂序列: 12 up, 12 down, 20 up, 20 down, 21 up, 21 down, 具体引物序列见表 1。

以 *PsXR* 基因为例构建整合质粒的流程如图 1 所示。根据引物两端所连接的酶切位点将所有片段依次连接, 形成 3 个基因盒。将 3 个基因盒分别连接在 pAUR135 载体骨架上, 获得表达单个基因的表达载体。

表 1 染色体组合整合所需基因扩增引物信息

Table 1 Primers for amplification in combinational integration

Primer	Template DNA	Primer sequence (5'-3')
20up ⁻ -F	6525	TCCCCCGGGCCAGGCGCCTTTATATCAT
20up ⁻ -R	6525	CGGGGTACCCTGCAGTTTGCAGAAACCTATGCTCT
20down ⁻ -F	6525	TTCGAGCTCAATGGAAGGTCGGGATGAG
20down ⁻ -R	6525	CGGAATTCATAAAGCAGCCGCTACCAAA
PGK1 ['] _{p-<i>PsXR</i>} -F	S288c	TGCACTGCAGGGAATTCAGATCTTGAATTGATG
PGK1 ['] _{p-<i>PsXR</i>} -R	S288c	CTAGTCTAGACCCAAGCTTACCTGCTGCGC
PsXR ['] -F	JCM 10742	CTAGTCTAGATGCCTTCTATTAAGTTGAACCTCT
PsXR ['] -R	JCM 10742	TCCCCCGGGTAAGACGAAGATAGGAATCTTGT
CYC1 ['] _{i-<i>PsXR</i>} -F	S288c	TCCCCCGGGTCATGTAATTAGTTATGTCAC
CYC1 ['] _{i-<i>PsXR</i>} -R	S288c	TGCGAGCTCTGGGTACCGGCCGCAAAAT
21up ⁻ -F	6525	TCCCCCGGGAAGGAGGTGCACGCATTAT
21up ⁻ -R	6525	CATGCATGCTTCCAAGGAGGTGAAGAACG
21down ⁻ -F	6525	CGAGCTCGATGGGACGTCAGCACTGTA
21down ⁻ -R	6525	CCGGAATTCGGGTATTACTCGAGCCCGTA
PGK1 ['] _{p-<i>PsXDH</i>} -F	S288c	CATGCATGCGGAATTCAGATCTTGAATTGATG
PGK1 ['] _{p-<i>PsXDH</i>} -R	S288c	TAGTCTAGACCCAAGCTTACCTGCTGCGC
PsXDH ['] -F	JCM 10742	TAGTCTAGATGACTGCTAACCCTTCCTTG
PsXDH ['] -R	JCM 10742	TCCCCCGGGTTACTCAGGGCCGTCAATG
CYC1 ['] _{i-<i>PsXDH</i>} -F	S288c	TCCCCCGGGTTACATTACGCCCTCC
CYC1 ['] _{i-<i>PsXDH</i>} -R	S288c	CGAGCTCGAAATTAAGCCTTCG
12up ⁻ -F	6525	TCCCCCGGGGCGCTCGTAAAAACAAAAA
12up ⁻ -R	6525	CGGGCATGCCTTAGCCGGCTGAATAATCG
12down ⁻ -F	6525	TTCGGATCCTCCCCCGTCTTTCTTGCTCTA
12down ⁻ -R	6525	CGGAATTCACAATGTCGCTTCCGTA
ScXK ['] -F	S288c	ACGCCTGCAGATGTTGTGTTAGTAATTCAGAGAC
ScXK ['] -R	S288c	CGCGTCGACTTAGATGAGAGTCTTTCCAGTTC
ADH1 ['] _{p-<i>ScXK</i>} -F	S288c	TGCAGCATGCAAGAAATGATGGTAAATGAAATAGG
ADH1 ['] _{p-<i>ScXK</i>} -R	S288c	ACCGCTGCAGGCGCGGAGGGGTGTTAC
CYC1 ['] _{i-<i>ScXK</i>} -F	S288c	TCCGTGACTCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTAC
CYC1 ['] _{i-<i>ScXK</i>} -R	S288c	TGCGGATTCTGGGTACCGGCCGCAAAAT

Abbreviation of strains: JCM10742, *S. stipitis* JCM 10742; 6525, *S. cerevisiae* 6525; S288c, *S. cerevisiae* 288C.

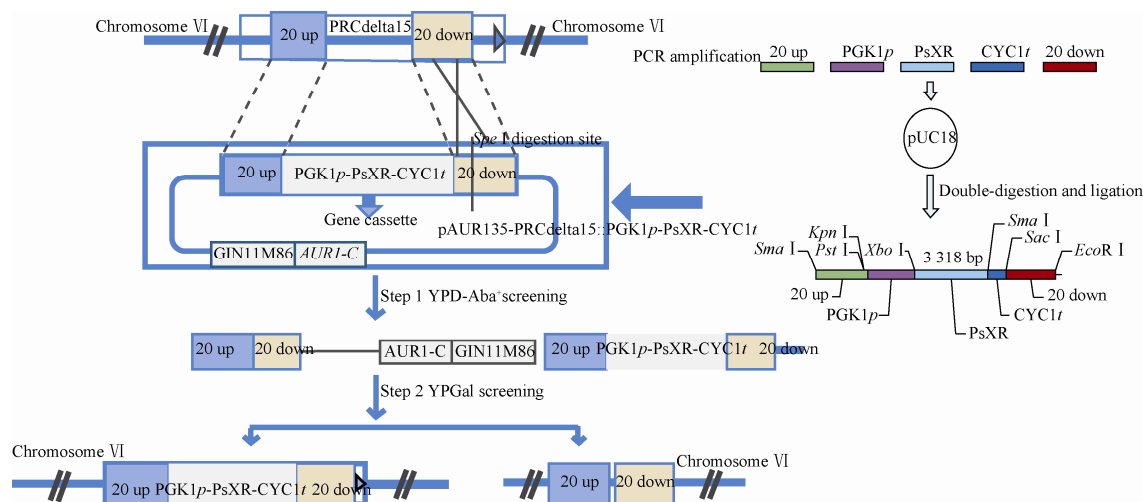


图1 基于质粒 pAUR135 的目标基因染色体整合表达示意图 (以 *PsXR* 构建为例; 虚线代表同源区域, 实线代表交换区域)

Fig. 1 Schematic diagram of pAUR135-based combinational chromosomal integration (construction of *PsXR* gene was presented as an example). Dashed lines represent homologous arms and solid lines represent exchanged regions.

1.3.2 载体线性化和酿酒酵母转化

基因盒的线性化酶切位点分别为 *Spe* 和 *EcoR*。利用电转方法将 3 个线性化的载体依次转入酿酒酵母中, 从而获得染色体 3 个位点分别整合 3 个木糖代谢基因的染色体组合整合重组酵母菌株。

1.3.3 三个木糖基因的酶活测定

粗酶液的制备和酶活的检测方法参考 Eliasson 等的文章^[12]。每个酶活实验都重复 3 次, 以平均值作为酶活数据。

1.3.4 重组酿酒酵母乙醇发酵

重组菌株在 YPD 培养基以 30 °C、200 r/min 进行限氧发酵。初始接种的 OD_{600} 为 2.0。发酵培养基为 YP 培养基 (蛋白胨 2%, 酵母提取物 1%) 分别加入 3 种混合糖浓度: 20 g/L 木糖和 40 g/L 葡萄糖; 25 g/L 木糖和 50 g/L 葡萄糖; 30 g/L 木糖和 60 g/L 葡萄糖。木糖利用率计算方法为: 利用率(%)=(初始木糖浓度-剩余木糖浓度)/初始木糖浓度。

2 结果与分析

2.1 基因盒各个片段的 PCR 扩增结果

所连接的同源臂 20 up 和 20 down 将 *PsXR* 定位为 *PRCdelta15* 位点, *PsXDH* 定位于染色体

YPRCtau3 位点, *ScXK* 基因定位于染色体 *YIRCdelta6* 位点^[5]。另外 *PsXR* 和 *PsXDH* 基因分别连接 *PGK1* 启动子, *ScXK* 基因连接 *ADHI* 启动子, 3 个基因全部使用 *CYC1* 终止子。

2.2 三个基因盒的构建及菌株稳定性

将各个组成片段通过双酶切连接在一起, 构建完整的基因盒载体 pAUR-*PsXR*、pAUR-*PsXDH* 和 pAUR-*ScXK*。然后利用内切酶进行载体的单酶切, 鉴定片段大小后电转入工业酿酒酵母中, 得到的重组木糖酵母菌传代 180 次后仍保持相应性状, 所转入的片段与传代前片段完全吻合, 测序结果也相同, 说明利用该方法构建的重组菌可以在工业育种生产中保持稳定遗传。

2.3 重组酿酒酵母木糖代谢途径基因的酶活水平比较

在构建的重组组合整合菌株中, XR 在辅因子为 NADPH 时的酶活大于辅因子为 NADH 时的酶活。XDH 的酶活水平仅为 XR 酶活的 36%。XK 的酶活水平最低, 为 XDH 的 77.8%。三个基因所用的启动子强度接近, 而且 3 个基因都是单拷贝整合, 所以表达强度的差异主要来自整合位点的

不同。与对照菌株中的 3 个酶活力相比, 染色体组合整合菌株的 XR 和 XDH 酶活明显提高 (表 2)。

表 2 重组菌株的木糖代谢关键酶酶活比较

Table 2 Comparison of enzyme activities in the recombinant strains

Strain	PsXR (NADPH)	PsXR (NADH)	PsXDH	ScXK
	(U/mg protein)			
CI*	0.16±0.04	0.09±0.01	0.09±0.02	0.07±0.03
CK	0.12±0.02	0.03±0.01	0.06±0.01	0.07±0.01

*CI represents combinational integration strain and CK represents control strain with integration in one site.

2.4 重组酿酒酵母混合糖发酵分析

将构建的染色体组合整合的木糖重组菌在含有葡萄糖和木糖的发酵培养基中进行限氧发酵。与对照重组菌株相比, 染色体组合整合的重组菌株的木糖利用率提高了 24.4%–35.5% (表 3)。发酵结果表明, 染色体组合整合表达的基因可以成功实现酵母菌株发酵性能的优化 (葡萄糖数据未列出)。

表 3 重组菌株的木糖利用率比较

Table 3 Xylose utilization rate in the recombinant strains

Medium	Xylose utilization× 100% (CK strain)	Xylose utilization× 100% (CI* strain)
20 g/L xylose and 40 g/L glucose	75.2±1.7	99.6±0.4
25 g/L xylose and 50 g/L glucose	63.5±1.0	99.0±0.6
30 g/L xylose and 60 g/L glucose	61.8±0.7	86.6±0.8

*CI strain represents combinational integration strain.

3 结论与展望

利用 pAUR135 酵母整合表达载体, 成功构建了染色体多位点组合整合的酵母菌株, 所获得的菌株可稳定遗传。构建基于 pAUR135 的整合表达载体, 通过改换不同强度启动子, 增加基因拷贝数, 变换染色体整合位点等手段实现基因表达量的组合控制, 从而可实现多基因表达的平衡。文中提供的载体构建方式可以方便应用于工业酿酒酵母, 是工业酵母菌育种的一种新方法。

REFERENCES

- [1] Zhang XR, Shen Y, Shi WL, et al. Ethanol cofermentation with glucose and xylose by the recombinant industrial strain *Saccharomyces cerevisiae* NAN-127 and the effect of furfural on xylitol production. *Bioresour Technol*, 2010, 101(18): 7093–7099.
- [2] Kato H, Matsuda F, Yamada R, et al. Cocktail δ -integration of xylose assimilation genes for efficient ethanol production from xylose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng*, 2013, 116(3): 333–336.
- [3] Kaneko S, Tanaka T, Noda H, et al. Marker-disruptive gene integration and *URA3* recycling for multiple gene manipulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 83(4): 783–789.
- [4] Li Q, Zhao XQ, Chang AK, et al. Ethanol-induced yeast flocculation directed by the promoter of *TPS1* encoding trehalose-6-phosphate synthase 1 for efficient ethanol production. *Metab Eng*, 2012, 14(1): 1–8.
- [5] Bai DM, Siewers V, Huang L, et al. Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2009, 26(10): 545–551.
- [6] Misteli T. Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell*, 2007, 128(4): 787–800.
- [7] Chen M, Licon K, Otsuka R, et al. Decoupling epigenetic and genetic effects through systematic analysis of gene position. *Cell Rep*, 2013, 3(1): 128–137.
- [8] Gueldener U, Heinisch J, Koehler GJ, et al. A second set of *loxP* marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(6): e23.
- [9] Demeke MM, Dietz H, Li YY, et al. Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. *Biotechnol Biofuels*, 2013, 6: 89.
- [10] Lu CF, Jeffries T. Shuffling of promoters for multiple genes to optimize xylose fermentation in an engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(19): 6072–6077.
- [11] Zhao XQ, Jiang RJ, Bai FW. Directed evolution of promoter and cellular transcription machinery and its application in microbial metabolic engineering- a review. *Chin J Biotech*, 2009, 25(9): 1312–1315 (in Chinese). 赵心清, 姜如娇, 白凤武. 启动子和细胞全局转录机制的定向进化在微生物代谢工程中的应用. *生物工程学报*, 2009, 25(9): 1312–1315.
- [12] Eliasson A, Christensson C, Fredrik-Wahlbom C, et al. Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying *XYL1*, *XYL2*, and *XKS1* in mineral medium chemostat cultures. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(8): 3381–3386.

(本文责编 郝丽芳)