

热带假丝酵母 *ctpxa1* 基因缺失菌的构建及对长链二元酸积累的影响

程成, 汪俊卿, 王腾飞, 杨晓慧, 王瑞明

齐鲁工业大学 生物工程学院, 山东 济南 250353

程成, 汪俊卿, 王腾飞, 等. 热带假丝酵母 *ctpxa1* 基因缺失菌的构建及对长链二元酸积累的影响. 生物工程学报, 2017, 33(2): 237–246.

Cheng C, Wang JQ, Wang TF, et al. Effect of *ctpxa1* gene deletion in *Candida tropicalis* on long chain dicarboxylic acid accumulation. Chin J Biotech, 2017, 33(2): 237–246.

摘 要: Pxa1p 为酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 过氧化物酶体上的膜蛋白, 与 Pxa2p 组成二聚体, 参与转运长链脂肪酸进入过氧化物酶体过程。热带假丝酵母能够发酵烷烃和脂肪酸生产长链二元酸, 而过氧化物酶体中发生的 β -氧化会消耗产生的长链二元酸造成产率降低。本研究以热带假丝酵母 *Candida tropicalis* 1798 为宿主菌, 通过基于 PCR 片段的同源单交换法, 快速构建 *ctpxa1* 基因敲除菌株 *C. tropicalis* 1798-*pxa1*。利用半定量 RT-PCR 技术, 检测 *ctpxa1* 基因在 *C. tropicalis* 1798、*C. tropicalis* 1798-*pxa1* 的表达量, 灰度值比值为 2.03, 表明 *ctpxa1* 在 *C. tropicalis* 1798-*pxa1* 中的表达被弱化。经 144 h 发酵, *C. tropicalis* 1798-*pxa1* 比 *C. tropicalis* 1798 的十二碳二元酸产量明显提升, 其产出浓度为 10.3 g/L, 比野生型菌株 *C. tropicalis* 1798 提高了 94.3%。

关键词: 热带假丝酵母, 长链二元酸, *ctpxa1p* 基因, 过氧化物酶体

Effect of *ctpxa1* gene deletion in *Candida tropicalis* on long chain dicarboxylic acid accumulation

Cheng Cheng, Junqing Wang, Tengfei Wang, Xiaohui Yang, and Ruiming Wang

College of Biological Engineering, Qilu University of Technology, Jinan 250353, Shandong, China

Abstract: *Candida tropicalis* uses alkanes and fatty acids to produce long chain dicarboxylic acids. However, the yield can be affected by β -oxidation in peroxisomes. Pxa1p was a membrane protein of *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomes.

Received: June 22, 2016; **Accepted:** December 6, 2016

Supported by: Shandong Province Independent Innovation and Achievement Transformation Project (No. 201422CX02602).

Corresponding author: Ruiming Wang. Tel: +86-531-89631076; E-mail: ruiming3k@163.com

山东省自主创新及成果转化专项 (No. 201422CX02602) 资助。

Pxa1p and Pxa2p form a dimer that is involved in transporting of long chain fatty acids into peroxisomes, but the similar transporting system of *Candida tropicalis* has not yet been reported. In this study, a *ctpxa1* gene deletion strain named *C. tropicalis* 1798-*pxa1* was constructed by homologous single exchange method using PCR fragment. The expression of *ctpxa1* gene in *C. tropicalis* 1798, *C. tropicalis* 1798-*pxa1* was detected by semi-quantitative RT-PCR, and the ratio of gray value was 2.03, implying that the expression of *ctpxa1* in *C. tropicalis* 1798-*pxa1* was weakened. After 144 h fermentation, the dodecanedioic acid production of *C. tropicalis* 1798-*pxa1* was increased 94.3% than the former strain, the maximum yield was 10.3 g/L.

Keywords: *Candida tropicalis*, long chain dicarboxylic acid, *ctpxa1p* gene, peroxisomes

长链二元酸是一类重要的化工原料,可用于合成人工麝香类香料、尼龙、工程塑料、热熔胶、树脂、高级润滑油、耐寒增塑剂及液晶等物质。热带假丝酵母是重要的工业菌种,能够利用烷烃和脂肪酸作为唯一碳源和能源合成长链二元酸^[1-3],当以烷烃或脂肪酸为碳源时,在细胞内可形成大量的过氧化物酶体,同时诱导生成脂肪酸 β -氧化酶系^[4-5],二元酸可以进入过氧化物酶体经 β -氧化降解为细胞生命活动提供能量,但该过程通常会导致二元酸的过量消耗,因此对于提高烷烃的转化率和二元酸的产量是极为不利的^[6-8]。许家齐等研究结果表明,在酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 过氧化物酶体上存在一条能够特异性转运长链脂肪酸的转运体系,其中 Pxa1p 为过氧化物酶体的膜蛋白,与 Pxa2p 组成二聚体,参与转运长链脂肪酸进入过氧化物酶体中,是长链脂肪酸 β -氧化重要环节之一^[9-11],而 Dulermo 等则发现解脂耶氏酵母 *Yarrowia lipolytica* 中存在类似于 *S. cerevisiae* 的脂肪酸转运系统 YlPxa1p-YlPxa2p,但该系统功能与 *S. cerevisiae* 的 Pxa1p-Pxa2p 转运体系具有较大的差异性^[12-15],而关于其他酵母菌种特别是假丝酵母菌株的相关转运体系尚未见报道。

本研究通过 BLAST 方法在 NCBI 数据库中发现 *C. tropicalis* MYA-3404 中存在一种与

S. cerevisiae 中 Pxa1p 蛋白氨基酸序列一致性为 41%的蛋白 CTRT_01043 (NCBI No. EER36303.1),并命名为 CtPxa1p。为进一步验证 CtPxa1p 蛋白的功能,通过重叠 PCR 构建 *ctpxa1p* 基因敲除的片段 *pxa1p1-kanr*,酶切后经电转化至 *C. tropicalis* 1798 中,利用同源单交换的原理^[16],快速构建 *ctpxa1p* 基因单敲除菌株 *C. tropicalis* 1798-*pxa1*。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒、引物

热带假丝酵母购自中国工业微生物菌种保藏中心 (CICC),编号为 1798;pPIC 9K 为本实验室保藏。

表 1 引物列表

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
pxa1p F1	GGAATTCCTGCTTCTTATA CCAATGCC	28
pxa1p R1	ACCTGGCTGGGGTTGAGGC CGTTGAGCAC	29
kan F1	GTGCTTAAATATACCTGGCT GGGGTTGAGGCCGTTG	36
kan R1	CTTGCCGGGTCTTCTTTAGG GAATTCAGTTGA	32
pxa1p F2	CCAAATTGACTGGTTACA	18
Pxa1p R2	ACTAAGTGAAGGACGATTGG	20
Pxa1p F3	TATTTCTTGTTGATTGCT	18

1.1.2 试剂

限制性内切酶购自 TaKaRa 公司。*Pfu* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNA marker 及相关分子生物学试剂盒均为生工生物工程(上海)股份有限公司产品。酵母浸粉和蛋白胨为北京奥博星生产。其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基

种子培养基:葡萄糖 20 g/L,蛋白胨 20 g/L,酵母浸粉 10 g/L。

发酵培养基:葡萄糖 62 g/L,酵母浸粉 2 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L, VB₁ 0.2 g/L, NaCl 2 g/L, KH_2PO_4 8 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 10.08 g/L, 尿素 3 g/L, $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6.15 g/L。

1.2 方法

1.2.1 同源臂 *pxa1p1* 和抗性基因 *kanr* 获取

用 *S. cerevisiae* 中 *Pxa1p* 的氨基酸序列 (GenBank Accession No. AJW19428.1) 进行 Blast 搜索, 获得热带假丝酵母中同源序列, 并以此设计引物 *pxa1p* F1 和 *pxa1p* R1。使用上海生工酵母基因组 DNA 抽提试剂盒提取 *C. tropicalis* 1798 菌体的 DNA, 并以此为模板, 使用引物 *pxa1p* F1 和 *pxa1p* R1 进行 PCR 扩增, PCR 扩增条件为: 95 预变性 5 min; 94 变性 30 s, 57 退火 30 s, 72 延伸 1 min, 30 个循环; 72 延伸 10 min, 4 保存。扩增获得长度为 553 bp 用于 *pxa1p* 基因敲除的同源臂 *pxa1p1*; 使用高纯度质粒小量快速提取试剂盒提取质粒 pPIC 9K, 以质粒 pPIC 9K 为模板, 使用引物 kan F1 和 kan R1 进行 PCR 扩增, PCR 扩增条件为: 95 预变性 5 min, 94 变性 30 s, 57 退火 30 s, 72 延伸 3.5 min, 30 个循环; 72 延伸 10 min, 4 保存。扩增获得长度为 1 561 bp G418 抗性基因片段 *kanr*; 使用 SanPrep

柱式 DNA 胶回收试剂盒 (上海生工生物工程股份有限公司) 胶回收制得的 *pxa1p1* 片段与 *kanr* 片段, 保存于 -20 备用。

1.2.2 敲除片段的构建

以胶回收制得的 *pxa1p1* 片段与 *kanr* 片段为模板, *pxa1p* F1 和 kan R1 为引物进行重叠延伸 PCR 扩增, PCR 扩增条件为: 1) 95 预变性 5 min; 94 变性 30 s, 57 退火 30 s, 72 延伸 3.5 min, 5 个循环; 72 延伸 2 min; 2) 95 预变性 5 min, 94 变性 30 s, 55 退火 30 s, 72 延伸 4.5 min, 30 个循环; 72 延伸 10 min, 4 保存。扩增得到长度为 2 148 bp 的同源重组片段 *pxa1p1-kanr*, 过程如图 1 所示, 使用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒进行胶回收, 保存于 -20 备用。

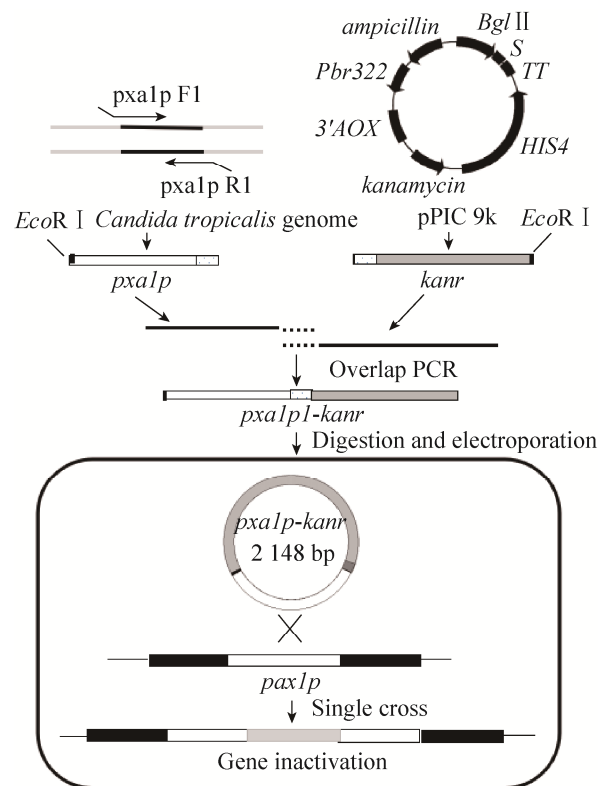


图 1 *C. tropicalis* 1798-*pxa1* 工程菌的构建流程
Fig. 1 Flowchart of construction of *C. tropicalis* 1798-*pxa1*.

1.2.3 同源重组片段 *pxa1p1-kanr* 酶切及浓缩

同源重组片段 *pxa1p1-kanr* 经 *EcoR* I 酶切后, 加入酶切产物 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 和 2.5 倍体积的无水乙醇, -20 °C 冷藏 20 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 倒掉上清液; 加入 300 μ L 70%乙醇重悬清洗一次; 12 000 r/min 离心 5 min, 倒掉上清液; 37 °C 风干 30 min, 除去乙醇, 加 16 μ L 去离子水重悬 DNA。使用核酸超微量分光光度计 (BioFuture MD2000) 测定回收 DNA 浓度, 并最终获得浓度在 500–1 000 ng/ μ L 之间的 DNA 溶液。

1.2.4 热带假丝酵母感受态制备及电击转化

挑取新鲜固体 YPD 培养基表面的 *C. tropicalis* 1798 单菌落, 接种 20 mL 液体 YPD 培养基 30 °C 培养 16–18 h, 接种过夜培养菌体 5–50 mL 新鲜液体 YPD 培养基 30 °C 培养 10 h, 使菌体浓度达到 1×10^8 个/mL, 3 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 倒掉上清, 菌体用 20 mL 无菌水悬浮, 洗涤 2 次; 离心收集菌体, 用 1 mL 1 mol/L 山梨醇重新悬浮菌体, 洗涤 1 次, 转移至 5 mL 离心管中; 离心收集菌体, 移液器吸净上清, 加入 0.2 mL 1 mol/L 山梨醇混匀菌体, 使菌体呈浓浆状, 取 0.2–0.4 mL 的菌悬液分装在 1.5 mL 的离心管, 每管中加入 10 μ L (1 μ g) DNA, 混匀, 冰浴 10 min; 将转化菌悬液全部转入已预冷的转化池中, 1 500 V、5 ms 下使用 Eppendorf Multitiporator 电转化仪进行转化; 用等体积的 1 mol/L 山梨醇将转化菌悬液从转化池中洗出, 取 200 μ L 涂布于添加了一定浓度 G418 的 YPD 平板上, 30 °C 培养箱培养 2–3 d, 筛选抗 G418 的菌株。

1.2.5 阳性重组菌株的鉴定

挑取上述单菌落于 50 mL 液体 YPD 培养基中, 30 °C 培养 12–14 h, 使用 Ezup 柱式酵母基因组 DNA 抽提试剂盒 (上海生工生物工程股份有限公司) 提

取基因组, 以提取的基因组为模板, *pxa1p* F1、*kan* R1 为引物进行 PCR 扩增, 扩增产物利用 1%琼脂糖凝胶电泳进行验证, 最终获得阳性重组菌株。

1.2.6 *C. tropicalis* 1798-*pxa1* 菌株 *ctpxa1* 基因表达量

利用 UNIQ 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒提取总 RNA, 并按照 TUREscript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 的要求将总 RNA 反转录合成 cDNA, 作为 *ctpxa1* 基因 PCR 扩增的模板, 以 *pxa1p* F2、*pxa1p* R2 为引物进行 PCR 扩增, 扩增产物利用 1%琼脂糖凝胶电泳进行验证, 并通过 Quantity One 软件对灰度值进行分析, 计算 *C. tropicalis* 1798 与 *C. tropicalis* 1798-*pxa1* 菌株中 *ctpxa1* 基因的灰度值比值。

1.2.7 种子培养

取 100 μ L 甘油管保藏的热带假丝酵母接种于 50 mL 液体 YPD 培养基, 30 °C、220 r/min 培养 12 h, 然后在装有固体 YPD 培养基的平板上划线, 30 °C 恒温培养箱培养 12–16 h, 挑取单菌落, 转接于装液量为 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶, 30 °C、220 r/min 摇床培养 12 h^[17-19]。

1.2.8 发酵培养

取种子培养液转接于装液量为 50 mL 发酵培养基的 500 mL 挡板瓶中, 接种量为 10%, 30 °C、220 r/min 摇床培养, 每 2 h 取样, 发酵液稀释一定倍数, 蒸馏水为对照, 测定 OD_{600} , 待生长稳定后调节发酵液 pH 为 7.5, 加入 5%十二烷烃, 进入产酸期, 在产酸期, 每 12 h 调节 pH 到 7.5。

1.2.9 十二碳二元酸的提取与测定

将发酵液离心, 回收上层未利用的十二烷, 用滤纸过滤上清液。取 3 mL 过滤液置于碘量瓶中, 加适量玻璃珠, 在沸水浴中加热, 用 3 mol/L 盐酸调 pH 至 3.0, 加入 100 mL 乙醚, 摇瓶至十

二碳二元酸完全溶解于乙醚中,静置 30 min 后取 50 mL 乙醚提取液于 100 mL 烧杯内,在通风橱中吹去乙醚,得白色固体十二碳二元酸。将提取到的二元酸加入 25 mL 95%中性乙醇溶解,加入 2 滴酚酞,用标准氢氧化钠溶液滴定,记录消耗的氢氧化钠体积,计算十二碳二元酸的产量。

2 结果与分析

2.1 氨基酸序列比对

目前关于酵母中 *pxalp* 基因功能的研究主

要集中在 *S. cerevisiae* 和 *Y. lipolytica* 中。通过 NCBI 分别检索 *S. cerevisiae* 中 Pxa1p (870 aa) 和 *Y. lipolytica* 中 YIPxa1p (NCBI No. AJW19428.1, 930 aa) 蛋白的氨基酸序列,并利用 DNAMAN 进行序列比对分析,结果如图 2 所示。分析发现, *C. tropicalis* 中的 CtPxa1p 长度为 732 aa, 短于 *S. cerevisiae* 和 *Y. lipolytica* 中对应的蛋白序列,同时虽然 *C. tropicalis* 中的 CtPxa1p 序列与 *S. cerevisiae* 和 *Y. lipolytica* 中对应的蛋白序列都属于 ABC 跨膜转运蛋白家族,并定位于过氧化物

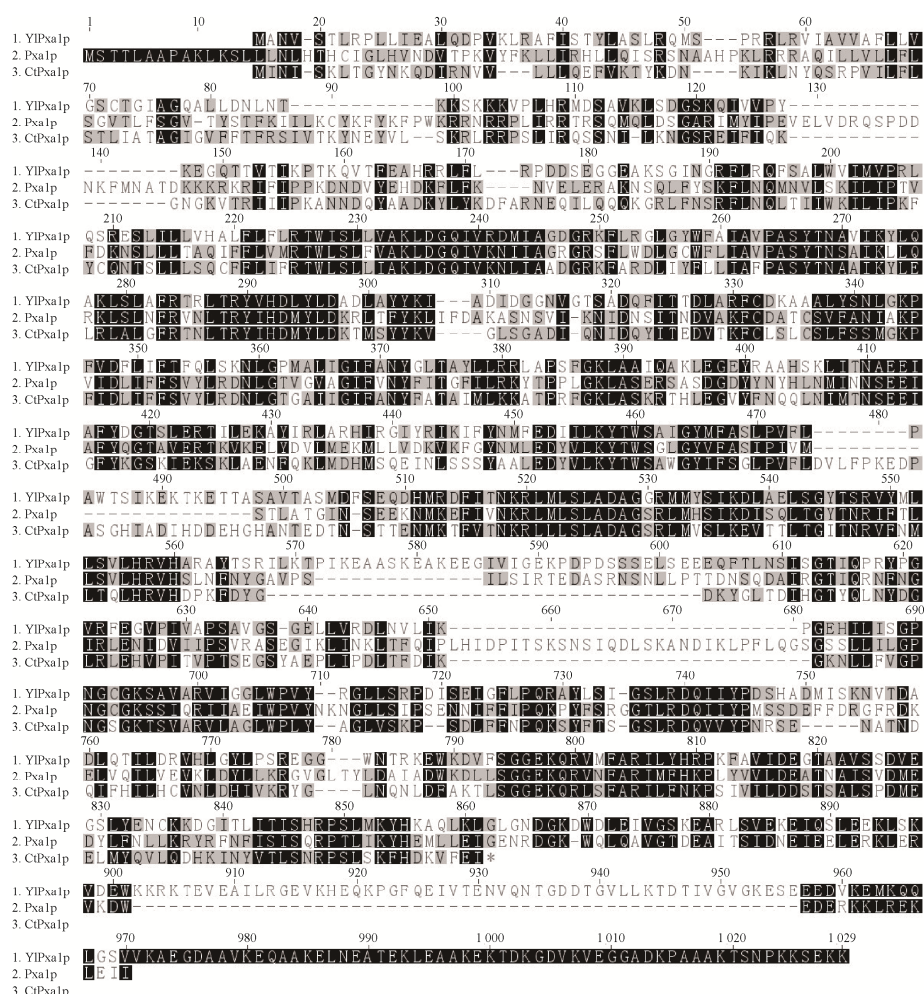


图 2 氨基酸序列相似性分析

Fig. 2 Putative amino acid sequence alignment.

酶体膜上,但与两者相比氨基酸序列一致性较低,分别仅为 41%和 38%,因此 *C. tropicalis* 中的 CtPxa1p 蛋白的具体功能还需要进一步研究。

2.2 *C. tropicalis* 1798-*pxa1* 工程菌的构建

以 *C. tropicalis* 1798 基因组为模板,以 *pxa1p* F1、*pxa1p* R1 为引物,PCR 克隆同源臂 *pxa1p1*,获得大小为 550 bp 左右的条带,结果如图 3A 所示,与理论值 553 bp 接近。以 pPIC 9K 基因组为模板,以 *kan* F1、*kan* R1 为引物,克隆 *kanr* 基因,获得大小为 1 600 bp 左右的条带(图 3B),与理论值 1 561 bp 接近。重叠 PCR 将同源臂 *pxa1p1* 与 *kanr* 基因连接起来,得到 *pxa1p1-kanr* 片段,获得大小为 2 100 bp 左右的条带(图 3C),与理论值 2 148 bp 接近,该结果表明通过重叠 PCR 方法成功获得了 *pxa1p1* 和 *kanr* 的融合片段。

2.3 *pxa1p1-kanr* 电转化及鉴定

用 *Eco*R I 酶切 1 mL *pxa1p1-kanr* 片段,并用乙醇浓缩法浓缩获得的酶切片段,使用核酸超微

量分光光度计 (BioFuture MD2000) 测定回收 DNA 浓度,结果显示 DNA 浓度为 564.32 ng/μL。将 10 μL 回收片段与 100 μL *C. tropicalis* 1798 感受态细胞混合并电转化,并使用引物 *pxa1p* F3 和 *kan* R1 对含 G418 (终浓度 800 μg/mL) 平板上生长菌落的基因组进行 PCR 扩增,扩增产物利用 1%琼脂糖凝胶电泳进行验证,获得大小为 2 200 bp 左右的条带(图 4),与理论值 2 169 bp 接近,表明 *pxa1p1-kanr* 与 *pxa1* 发生同源重组,完成 *ctpxa1* 基因的敲除。

2.4 *C. tropicalis* 1798、*C. tropicalis* 1798-*pxa1* 菌株中 *ctpxa1* 基因表达量

提取 *C. tropicalis* 1798、*C. tropicalis* 1798-*pxa1* 总 RNA 进行半定量 RT-PCR,扩增产物利用 1%琼脂糖凝胶电泳进行验证,结果如图 5 所示,通过 Quantity One 软件对灰度值进行分析,*ctpxa1* 基因在 *C. tropicalis* 1798、*C. tropicalis* 1798-*pxa1* 灰度值比值为 2.03,证明 *ctpxa1* 基因在 *C. tropicalis* 1798-*pxa1* 的表达量下降。

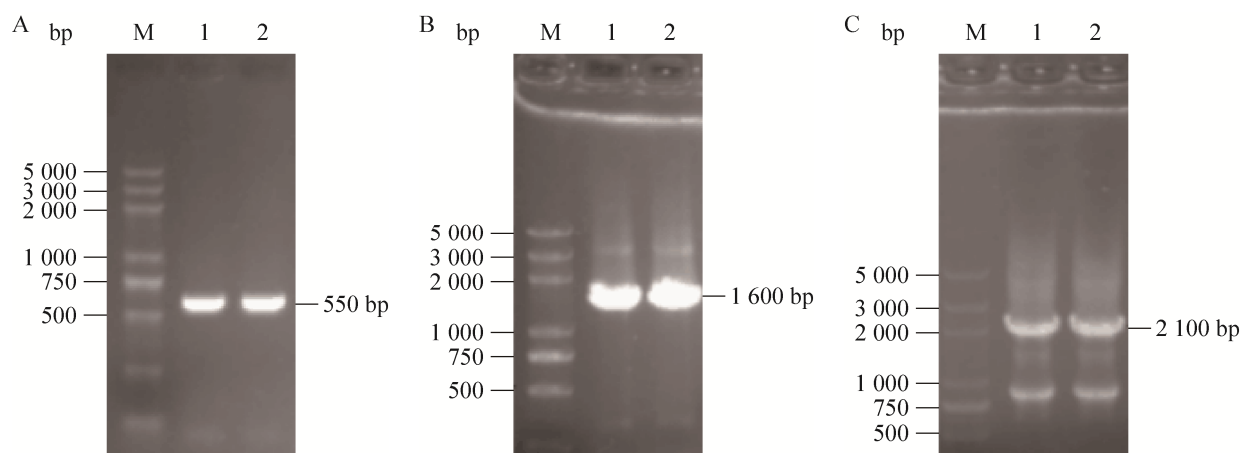


图 3 PCR 扩增目的基因

Fig. 3 PCR amplification of the target gene. (A) PCR product of homology arms *pxa1p1* gene. M: marker DL5000; 1-2: 550 bp DNA fragment of *pxa1p1* gene from *C. tropicalis* 1798. (B) PCR product of *kanr* gene. M: marker DL5000; 1-2: 1 600 bp DNA fragment of *kanr* gene from plasmid pPIC 9K. (C) Product of overlap PCR. M: marker DL5000; 1-2: 2 100 bp DNA fragment by overlap PCR.

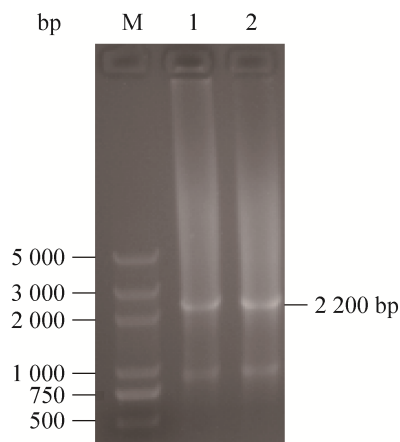


图4 工程菌 *C. tropicalis* 1798-*pxa1* 的 PCR 验证

Fig. 4 PCR verification of *C. tropicalis* 1798-*pxa1*. M: marker DL5000; 1-2: 3 700 bp PCR product of *C. tropicalis* 1798-*pxa1*.

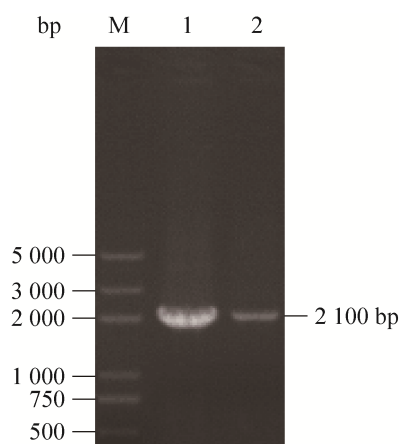


图5 PCR 扩增目的基因

Fig. 5 PCR amplification of the target gene. M: marker DL5000; 1: 2 100 bp PCR product of *C. tropicalis* 1798; 2: 2 100 bp PCR product of *C. tropicalis* 1798-*pxa1*.

2.5 *C. tropicalis* 1798、*C. tropicalis* 1798-*pxa1* 生长曲线

取种子培养液转接于装液量为 50 mL 发酵培养基的 500 mL 挡板瓶中, 接种量为 10%, 30、220 r/min, 每 2 h 取样一次, 发酵液稀释一定倍数, 蒸馏水为对照, 测定 OD_{600} , 结果

如图 6 所示。从生长曲线可以看出 *C. tropicalis* 1798 与 *C. tropicalis* 1798-*pxa1* 生长情况相近, 表明以葡萄糖为碳源培养时, *ctpxa1* 基因敲除对 *C. tropicalis* 1798 的生长没有显著影响。

2.6 以十二烷为底物 *C. tropicalis* 1798-*pxa1* 发酵验证

发酵培养 12 h 后加入 5 mL 的十二烷烃, 每 12 h 调节 pH 到 7.5 并取样, 用标准氢氧化钠溶液滴定, 测得十二碳二元酸的浓度, 结果如图 7 所示。

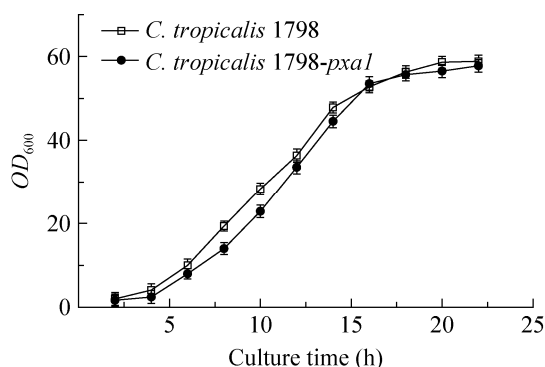


图6 *C. tropicalis* 1798 和 *C. tropicalis* 1798-*pxa1* 生长曲线

Fig. 6 The growth curves of *C. tropicalis* 1798 and *C. tropicalis* 1798-*pxa1*.

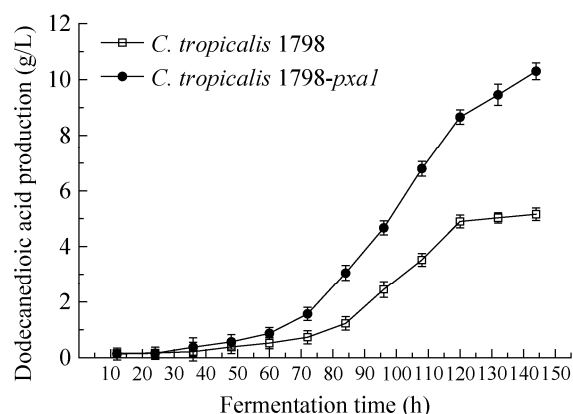


图7 *C. tropicalis* 1798 和 *C. tropicalis* 1798-*pxa1* 发酵十二烷烃曲线

Fig. 7 Fermentation curves of dodecane by *C. tropicalis* 1798 and *C. tropicalis* 1798-*pxa1*.

结果显示 *C. tropicalis* 1798-*pxa1* 比 *C. tropicalis* 1798 产十二碳二元酸的量明显提升, 其产出浓度为 10.3 g/L, 比 *C. tropicalis* 1798 产十二碳二元酸提高了 94.3%, 同时产酸阶段的时间也由野生型的 120 h 延长至 144 h, 表明 *ctpxa1* 基因敲除提高了热带假丝酵母产十二碳二元酸的能力, 同时也延长了产酸期。

3 讨论

在二元酸发酵过程中, 烷烃氧化为一元脂肪酸后, 有两条代谢途径: ω -氧化和 β -氧化。 ω -氧化将一元酸的 ω 碳末端进一步氧化, 形成目的产物二元酸, 而 β -氧化则将中间产物一元酸以及目的产物降解, 从而进入 TCA 循环, 为细胞生长提供能量。目前针对热带假丝酵母的基因工程改造多集中在提高 ω -氧化的过程上, 以降低 β -氧化为目的的菌株改造报道较少, Picataggio 等^[20]阻断 β -氧化中脂酰辅酶 A 氧化酶提高了长链二元酸的转化率。高弘等^[21-22]通过敲除发现肉毒碱乙酰转移酶基因 (CAT) 阻断乙酰辅酶 A 由过氧化物酶体到线粒体过程的转运, 减少烷烃通过 β -氧化途径的消耗, 能够提高烷烃的转化率, 但 CAT 基因的缺失会影响菌体代谢短链和中链脂肪酸的过程, 进而影响酵母的生长和产酸的过程。长链脂肪酸转运蛋白 Pxa1p 定位在 *S. cerevisiae* 中的过氧化物酶体膜上, 特异性介导长链脂肪酸进入过氧化物酶体的过程, 但该蛋白在假丝酵母中与长链二元酸的消耗的关系尚未明晰。本研究首选通过基因比对分析找到热带假丝酵母潜在的长链脂肪酸转运蛋白, 并通过基因敲除手段对该蛋白的功能进行分析, 探索阻碍部分长链脂肪酸进入过氧化物酶体, 减少长链脂肪酸消耗的新途径。

构建菌株 *C. tropicalis* 1798-*pxa1* 较原始菌株 *C. tropicalis* 1798 十二碳二元酸产量提高了 94.3%, 产出浓度为 10.3 g/L。由此推测 *ctpxa1* 基因的敲除, 阻断了部分长链脂肪酸进入过氧化物酶体中, 减弱了 β -氧化反应与长链二元酸的消耗, 提高了长链二元酸的产量。

酵母菌中目的基因敲除常用的方法是双交换同源重组^[23-24], 即采用以质粒为载体的同源双交换法, 获取目的基因上下游两段基因序列作为同源臂, 构建穿梭载体或自杀载体并转化到目的菌株中, 转化后需先后发生两次单交换, 实现目的基因的敲除^[25]。本研究与双交换同源重组之间的区别在于目的基因的敲除利用的是一次单交换, 并且通过重叠 PCR 方法直接构建热带假丝酵母敲除元件 *pxa1p-kanr*, 省去构建基因敲除载体及测序的过程。该方法具有简单、稳定、易行和节约时间等优点, 同时由于所构建的片段较短, 因此转化效率相对较高。该方法对其他微生物的基因敲除也有一定的借鉴意义。

REFERENCES

- [1] Hattori K, Suzuki T. Microbial production of d-arabitol by *n*-alkane-grown *Candida tropicalis*. Agric Biol Chem, 2014, 38(10): 1875-1881.
- [2] Ferdinandusse S, Denis S, van Roermund CWT, et al. Identification of the peroxisomal β -oxidation enzymes involved in the degradation of long-chain dicarboxylic acids. J Lipid Res, 2004, 45(6): 1104-1111.
- [3] Wang JX, Ding HY, He LF, et al. Influence of growth factor and emulsifier on dodecanedioic acid fermentation by *Candida tropicalis*. China Brew, 2011, (5): 87-89 (in Chinese).
王佳新, 丁海燕, 何连芳, 等. 生长因子和乳化剂对热带假丝酵母产十二碳二元酸发酵的影响. 中国酿造, 2011, (5): 87-89.

- [4] Lasorsa FM, Scarcia P, Erdmann R, et al. The yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter: characterization of two transport modes and involvement in Δ pH formation across peroxisomal membranes. *Biochem J*, 2004, 381(3): 581–585.
- [5] Van Roermund CWT, Ijlst L, Majczak W, et al. Peroxisomal fatty acid uptake mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2012, 287(24): 20144–20153.
- [6] Wang JJ, Zhang B, Chen SL. Oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* mutants with a disrupted fatty acyl-CoA synthetase gene accumulate saturated fatty acid. *Process Biochem*, 2011, 46(7): 1436–1441.
- [7] Beopoulos A, Mrozova Z, Thevenieau F, et al. Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(24): 7779–7789.
- [8] Court DL, Sawitzke JA, Thomason LC. Genetic engineering using homologous recombination. *Annu Rev Genet*, 2002, 36(1): 361–388.
- [9] Choi BK, Bobrowicz P, Davidson RC. Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(9): 5022–5027.
- [10] Liu SC, Li C, Fang XC, et al. Optimal pH control strategy for high-level production of long-chain α , ω -dicarboxylic acid by *Candida tropicalis*. *Enzyme Microb Technol*, 2004, 34(1): 73–77.
- [11] Beopoulos A, Nicaud JM, Gaillardin C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 90(4): 1193–1206.
- [12] Liu SC, Li SL, Yang D, et al. Fermentation of 1,13-tridecane dicarboxylic acid in an industrial pilot plant. *Petrochem Technol*, 2002, 31(7): 558–561 (in Chinese).
刘树臣, 李淑兰, 杨东, 等. 十三碳二元酸发酵工业试验. *石油化工*, 2002, 31(7): 558–561.
- [13] Green KD, Turner MK, Woodley JM. *Candida cloacae* oxidation of long-chain fatty acids to dioic acids. *Enzyme Microb Technol*, 2000, 27(3/5): 205–211.
- [14] Ma YC, Yu HM, Pan WY, et al. Identification of nitrile hydratase-producing *Rhodococcus ruber* TH and characterization of an *amiE*-negative mutant. *Bioresour Technol*, 2010, 101(1): 285–291.
- [15] De Crescenzo G, Grothe S, Zwaagstra J, et al. Real-time monitoring of the interactions of transforming growth factor- β (TGF- β) isoforms with latency-associated protein and the ectodomains of the TGF- β type II and III receptors reveals different kinetic models and stoichiometries of binding. *J Biol Chem*, 2001, 276(32): 29632–29643.
- [16] Teder T, Boeglin WE, Brash AR. Lipoxygenase-catalyzed transformation of epoxy fatty acids to hydroxy-endoperoxides: a potential P450 and lipoxygenase interaction. *J Lipid Res*, 2014, 55(12): 2587–2596.
- [17] Uccelletti D, Farina F, Mancini P, et al. KIPMR1 inactivation and calcium addition enhance secretion of non-hyperglycosylated heterologous proteins in *Kluyveromyces lactis*. *J Biotechnol*, 2004, 109(1/2): 93–101.
- [18] van Roermund CWT, Drissen R, van den Berg M, et al. Identification of a peroxisomal ATP carrier required for medium-chain fatty acid β -oxidation and normal peroxisome proliferation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(13): 4321–4329.
- [19] Cho YH, Lee HJ, Lee JE, et al. Fast determination of multiple-reaction intermediates for long-chain dicarboxylic acid biotransformation by gas chromatography-flame ionization detector. *J Microbiol Biotechnol*, 2015, 25(5): 704–708.
- [20] Picataggio S, Rohrer T, Deanda K, et al. Metabolic engineering of *Candida tropicalis* for the production of long-chain dicarboxylic acids. *Nat Biotechnol*, 1992, 10(8): 894–898.
- [21] Gao H, Zhang J, Hua YT, et al. Effects of carnitine acetyltransferase gene knockout on long chain dicarboxylic acid production and metabolism of *Candida tropicalis*. *Acta Microbiol Sin*, 2005,

- 45(1): 102–105 (in Chinese).
- 高弘, 张剑, 华玉涛, 等. 肉毒碱乙酰转移酶基因敲除对长链二元酸生产代谢过程的影响. 微生物学报, 2005, 45(1): 102–105.
- [22] Gao H, Huang YM, Liu M, et al. Effects of CAT gene knockout on DCA13 metabolic network of *Candida tropicalis*. J Chem Ind Eng (China), 2006, 57(9): 2157–2161 (in Chinese).
- 高弘, 黄英明, 刘铭, 等. CAT 基因敲除对热带假丝酵母产 DCA13 代谢网络的影响. 化工学报, 2006, 57(9): 2157–2161.
- [23] Xu Y, Tu Z. Application and progress of filamentous fungi gene targeting. J Food Sci Biotechnol, 2007, 26(1): 120–126 (in Chinese).
- 许杨, 涂追. 丝状真菌基因敲除技术研究进展. 食品与生物技术学报, 2007, 26(1): 120–126.
- [24] Xiang Z, Chen XZ, Zhang LH, et al. Development of a genetic transformation system for *Candida tropicalis* based on a reusable selection marker of *URA3* gene. Hereditas (Beijing), 2014, 36(10): 1053–1061 (in Chinese).
- 项峥, 陈献忠, 张利华, 等. 利用可重复使用的 *URA3* 标记基因建立热带假丝酵母基因敲除系统. 遗传, 2014, 36(10): 1053–1061.
- [25] Xue KJ, Liu B, Chang SH, et al. A high efficient method to knockout target gene by two-step homologous recombination in *Pichia pastoris*. Lett Biotechnol, 2010, 21(5): 650–654 (in Chinese).
- 薛奎晶, 刘波, 唱韶红, 等. 一种两步基因同源重组敲除酵母靶标蛋白基因的方法. 生物技术通讯, 2010, 21(5): 650–654.

(本文责编 郝丽芳)