

## 酿酒酵母乙醇脱氢酶 基因的超表达

秦丽娜 江贤章 田宝玉 舒正玉 黄建忠\*

(福建师范大学工业微生物教育部工程研究中心 福州 350108)

**摘 要:** 利用重叠延伸 PCR 融合磷酸甘油激酶(phosphoglycerate kinase, PGK)启动子和酿酒酵母乙醇脱氢酶基因 (alcohol dehydrogenase , *adh1*), 将该融合片段插入带有 G418 抗性基因(KanMX)和 *loxP* 位点的 pUG6 质粒中, 并在 *adh1* 基因下游插入细胞色素 c (Cytochrome c transcription, CYC1) 终止子, 构建了酿酒酵母整合表达载体 pUPGKAT. *Tth* 内切酶线性化后转化酿酒酵母乙醇脱氢酶基因 (*adh2*) 敲除菌株 YS2- $\Delta adh2$ . 根据酿酒酵母同源重组机制, 使 *adh1* 基因增加 1 个拷贝, 且其中 1 个拷贝置于 PGK 强启动子下游, 利用 PGK 启动子的调控成功实现 *adh1* 基因的超表达. 厌氧发酵试验表明该重组菌株 YS2-  $\Delta adh2$ -*adh1* 的乙醇产量较出发菌株提高了 8.84%.

**关键词:** 酿酒酵母, 同源重组, 超表达, 乙醇脱氢酶, 乙醇

## Overexpression of Alcohol Dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*

QIN Li-Na JIANG Xian-Zhang TIAN Bao-Yu SHU Zheng-Yu HUANG Jian-Zhong\*

(Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Fujian Normal University, Fuzhou 350108)

**Abstract:** To improve ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae*, an integration plasmid pUPGKAT with PGK promoter (phosphoglycerate kinase promoter), *adh1* gene (the coding sequences of alcohol dehydrogenase ) and CYC1 terminator (Cytochrome c transcription terminator) was constructed. Firstly, a fusion fragment composed of PGK promoter and *adh1* gene was generated by overlap extension PCR and ligated into pUG6 resulting in plasmid pUPGKA. Subsequently, CYC1 terminator was amplified from pSH65 by PCR and ligated to the *Spe* and *Sac* restriction site of pUPGKA. To integrate PGK-*adh1*-CYC1 into *S. cerevisiae* genome, pUPGKAT was digested by *Tth* and the linearized plasmid was used to transform *S. cerevisiae* YS<sub>2</sub>- $\Delta adh2$  (*adh2* disrupted strain) by lithium acetate method. The yeast mutant YS<sub>2</sub>- $\Delta adh2$ -*adh1* which had the *adh1* gene placed under the PGK promoter and harbored the *adh2* deletion was constructed. Anaerobic fermentation showed overexpression of *adh1* by PGK promoter resulted in a 8.84% higher ethanol production compared to YS<sub>2</sub>- $\Delta adh2$ .

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, Homologous recombination, Overexpression, Alcohol dehydrogenase, Ethanol

基金项目: 福建省科技重大专项(No.05HZ101070193)资助

\* 通讯作者: Tel: 0591-22868212; Fax: 86-591-22868195; 信箱: hjz@fjnu.edu.cn

收稿日期: 2007-10-23; 接受日期: 2007-11-28

自 20 世纪 70 年代全世界范围发生能源危机以来, 燃料乙醇作为汽油的理想替代物越来越受到重视<sup>[1]</sup>。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是乙醇发酵生产的主要菌株, 也是第一个完成全基因组测序的真核生物, 其 80% 的基因功能已得到鉴定<sup>[2]</sup>。近年来, 利用分子生物技术手段对酿酒酵母基因组进行改造优化其代谢途径, 提高乙醇产量成为研究热点。酿酒酵母中有 5 个基因 *adh1*-*adh5* 编码与乙醇代谢相关的乙醇脱氢酶(Adh1p-Adh5p), 其中除 Adh2p 催化将乙醇氧化为乙醛的反应外, 其他四种乙醇脱氢酶 Adh1p、Adh3p、Adh4p 和 Adh5p 在葡萄糖发酵过程中还原乙醛生产乙醇, 而 Adh1p 在乙醛生成乙醇的过程中发挥着最为关键的作用<sup>[3-6]</sup>。因此, 阻断 Adh2p 催化的乙醇分解代谢支路, 同时增强 Adh1p 的作用极有可能提高酿酒酵母发酵产乙醇的能力<sup>[7]</sup>。本课题组已成功地敲除了酿酒酵母 *adh2* 基因<sup>[8]</sup>, 在此基础上, 本文以质粒 pUG6 为骨架, 在 G418 抗性基因(KanMX)的下游引入 PGK 强启动子-*adh1* 基因-CYC1 终止子片段, 构建了 *adh1* 超表达载体并成功提高了酿酒酵母乙醇产量。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与质粒:** 酿酒酵母 YS<sub>2</sub>- $\Delta$ *adh2*(*adh2* 基因双敲除菌株, 二倍体)由福建师范大学工业微生物教育部工程研究中心构建<sup>[8]</sup>; 质粒 pUG6、pSH65 购自德国 EUROSCAR, 其中 pUG6 带有 G418 抗性基因, 两端具 *loxP* 位点, pSH65 带 zeocin 筛选标记, 可在半乳糖诱导下表达 Cre 重组酶。

**1.1.2 培养基:** (1) 菌种保藏采用 5°Bé 麦芽汁琼脂培养基; (2) YPD 完全培养基用于酵母培养(%): 酵母提取物 1, 蛋白胨 2, 葡萄糖 2; (3) YPG 诱导培养基: 将 YPD 培养基中的葡萄糖改为半乳糖; (4) 筛选培养基: 在 YPD 培养基中添加终浓度为 200 $\mu$ g/mL 的 G418; (5) 发酵培养基(%): 蔗糖 17, 酵母粉 0.8, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2。

**1.1.3 酶和试剂:** 限制性内切酶 *Spe*, *Sac*, *EcoR*, *Tth111*, *rTaq* 均购自 TaKaRa 公司; G418 和 zeocin 分别购于 Fluca 和 Sigma 公司, 其余试剂均为进口或国产分析纯。所有引物由 TaKaRa 公司合成, 研究中所使用的引物及其序列见表 1。

表 1 扩增引物  
Table 1 primers used for amplification

引物 Primers	长度 Length	序列(5' → 3') Sequence(5' → 3')	酶切位点 Restriction sites
<i>adh</i> -F	20	CTGAAGGCTAGGCTGTGGAT	<i>EcoR</i>
<i>adh</i> -R	20	TACACTGCCTCATTGATGGT	
PGK-F	20	GAAACCGACCATAGAAGAGT	
PGK-R	20	CAAGTCGTATTCAAAGGCAC	
F-PGK1	26	CCGGATATCCAGACAACCTTTGAAGAT	<i>Spe</i>
F-PGK2	37	GAGTTTCTGGGATAGACATTCTAACTGATCTATCCAA	
F- <i>adh1</i>	37	TTGGATAGATCAGTTAGAAATGTCTATCCCAGAAACTC	
F- <i>adh2</i>	34	GGACTAGTTTATTAGAAAGTGTCAACAACGTATC	<i>Spe</i>
CYC-F	26	GGACTAGTGGCCGCAAATTAAGCCT	<i>Sac</i>
CYC-R	28	TCCCCGCGGGTCATGTAATTAGTTATGT	
Y1	18	CTGTGCGTCTTGAGTTGA	
Y2	18	CGGAGATAGCAACCCAGT	

### 1.2 酿酒酵母总 DNA 的提取

取 1.5 mL 新鲜酵母液体培养物, 离心收集细胞, 提取基因组 DNA<sup>[9]</sup>, 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.3 重叠延伸 PCR 获得 PGK 启动子和 *adh1* 基因融合片段

**1.3.1 *adh1* 基因的扩增:** 根据 GenBank 报道的 *adh1* 基因序列, 在其两端设计引物 *adh*-F、*adh*-R 用于扩

增 *adh1* 完整 ORF。胶回收后, 以此为模板, 用引物 F-*adh1*, F-*adh2* 进行 PCR 扩增获得下游加有限制性酶切位点 *Spe*, 上游加有融合位点的 *adh1* 基因片段。

**1.3.2 PGK 启动子的扩增:** 利用引物 PGK-F, PGK-R 对酿酒酵母基因组 DNA 进行扩增, 获得 PGK(磷酸甘油激酶)启动子序列。回收 PCR 产物并以此为模板, 用引物 F-PGK1, F-PGK2 进行第二轮

PCR 扩增获得上游加有限制性酶切位点 *EcoR* , 下游加有融合位点的 PGK 启动子片段。

**1.3.3 重叠延伸 PCR:** 回收以上获得的 PCR 产物片段, 50  $\mu$ L 体系中各取 1  $\mu$ L 作为模版, 用引物 F-PGK1, F-*adh2* 进行 PCR 扩增, 获得 PGK 启动子和 *adh1* 基因融合片段, 连接 pMD18-T 载体, 获得 pTAF 质粒。

#### 1.4 整合表达载体 pUPGKAT 的构建

**1.4.1 pTAT 载体的构建:** 为维持外源 DNA 在宿主细胞的稳定性, 需在 *adh1* 基因下游插入终止子。以 pSH65 质粒为模板, 利用引物 CYC-F、CYC-R 进行扩增, 获得两端带有 *Spe* 、*Sac* 酶切位点的 CYC1(细胞色素 c)终止子片段, 连接到 pMD18-T 载体, 获得 pTAT 质粒。

**1.4.2 pUPGKA 载体的构建:** 用限制性内切酶 *EcoR* V 和 *Spe* I 对 pTAF 和 pUG6 质粒分别进行双酶切。反应完毕后, 65  $^{\circ}$ C 灭活 20 min 终止反应。分别回收酶切后的目的片段, 16  $^{\circ}$ C 过夜连接。连接产物 15  $\mu$ L, 转化 *Escherichia.coil* Top10 感受态细胞, 涂布于含 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 固体培养基平板上, 37  $^{\circ}$ C 过夜培养。克隆子长出后, 用引物 F-PGK1、F-*adh2* 进行菌落 PCR 验证。随后碱裂解法提取阳性克隆子质粒, 命名为 pUPGKA(图 1)。

**1.4.3 重组表达载体 pUPGKAT 的构建:** 用内切酶 *Spe* 和 *Sac* 分别对载体 pUPGKA 和 pTAT 进行双

酶切, 回收目的片段并连接、转化 *E.coil* Top10, 方法同上。最终获得重组表达载体 pUPGKAT(图 1)。

#### 1.5 *adh1* 基因的超表达

**1.5.1 质粒 pUPGKAT 的线性化:** 用限制性内切酶 *Tth111* 对重组质粒 pUPGKAT 上的 *adh1* 基因进行单酶切(图 2), 回收线性化的目的片段, 采用电转化法<sup>[10]</sup>将线性化的 pUPGKA 质粒转化至酿酒酵母细胞中, 电转条件为: 2 mm 转化杯, 电压: 1.5 kV, 电阻: 200  $\Omega$ , 电容: 25  $\mu$ F。线性化的 pUPGKA 载体进入酿酒酵母后即可与基因组中原有的 *adh1* 基因发生同源重组, 使 *adh1* 基因增加一个拷贝且其中一个拷贝置于 PGK 强启动子下游, 受 PGK 强启动子的调控(图 3A、B), 从而达到超表达的目的<sup>[11]</sup>。利用载体上的 G418 抗性基因(KanMX)进行初步筛选, 利用引物 Y1、Y2 对重组子进行菌落 PCR 验证(图 3B)。

**1.5.2 筛选标记的切除:** 将 pSH65 质粒转入阳性克隆子中<sup>[12, 13]</sup>, 涂布于带 Zeocin 抗性的 YPD 平板。待克隆子长出后, 在含有半乳糖的液体培养基 YPG 中诱导培养 5 h 后, pSH65 质粒表达的 Cre 重组酶即可介导两个相邻 *loxP* 位点间的重组实现标记基因 KanMX 的切除<sup>[8, 14]</sup>(图 3B、C)。随后涂布于 YPD 完全培养基平板上, 获得单菌落, 影印至含有 200  $\mu$ g/mL G418 的 YPD 平板, 筛选抗性标记 KanMX 基因已被切除的菌株。将菌株在 YPD 培养

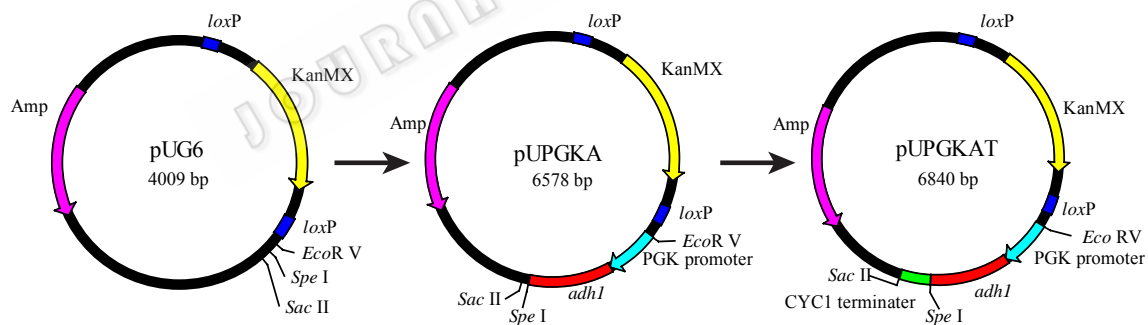


图 1 pUPGKA 和 pUPGKAT 载体的构建

Fig. 1 Construction of pUPGKA and pUPGKAT vectors

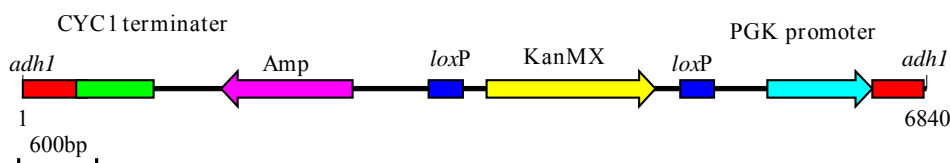


图 2 载体 pUPGKAT 的线性化

Fig. 2 Linearization of pUPGKAT vector

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

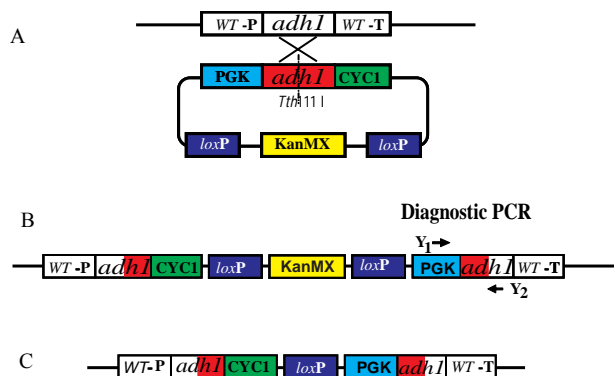


图3 pUPGKAT的同源重组及标记切除

Fig. 3 Integration and marker loss strategy for the pUPGKAT vector

A: The yeast strain is transformed with the pUPGKAT; B: Integration occurs at the locus of *adh1*, where the expression is controlled by the wild-type promoter (WT- P); C: The KanMX marker between the *loxP* sites is lost by specific Cre-mediated recombination

基中传代 5~10 次, 影印至带有 Zeocin 抗性的 YPD 平板, 挑取质粒 pSH65 已丢失的菌落进行保藏, 该菌株命名为 YS<sub>2</sub>- $\Delta$ *adh2*-*adh1*。

### 1.6 突变株发酵乙醇代谢测定

YS<sub>2</sub>- $\Delta$ *adh2* 和 YS<sub>2</sub>- $\Delta$ *adh2*-*adh1* 分别接种至 150 mL 发酵培养基中进行乙醇发酵(重复 3 次, 以平均值与标准差作图): 0~6 h 好氧培养, 转速 200 r/min, 随后静置至发酵结束。期间, 间隔一定时间取样, 气相色谱分析发酵液中乙醇含量<sup>[15]</sup>。色谱分析条件为: 色谱柱 HP-FFAP(19091F-105), 载气为氮气; 分流比 30:1; 气化室温度 200; 柱箱升温程序: 100 开始升温至 150 (10 /min); FID 检测器, 检测器温度 250。

## 2 结果与分析

### 2.1 *adh1* 基因的扩增

以酿酒酵母 YS<sub>2</sub> 的基因组为模版, *adh*-F, *adh*-R 引物进行 PCR, 成功获得与 *adh1* 基因大小相符的条带(图 4)。测序结果表明, 该条带是 *adh1* 基因完整的 ORF。

### 2.2 重叠延伸 PCR 获得 PGK 启动子与 *adh1* 融合片段

分别用引物 F-PGK1, F-PGK2 和 F-*adh1*, F-*adh2* 进行 PCR 扩增, 获得 PGK 启动子片段和 *adh1* 基因片段。随后, 以这两个片段的混合物为模版, 利用重叠延伸 PCR 扩增出 PGK 启动子和 *adh1* 基因的融

合片段。电泳结果(图 5)表明, PCR 扩增出的 PGK 启动子片段、*adh1* 基因以及它们的融合片段大小正确, 与所分析的理论值大小相符。

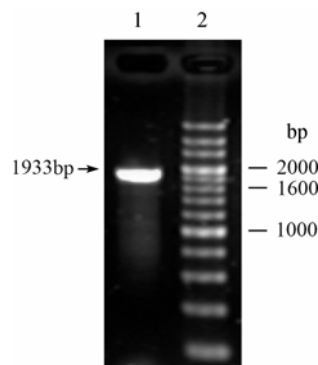


图4 *adh1* 基因的扩增

Fig. 4 Amplification of *adh1* gene

Lane 1: Product by the primers of *adh*-F and *adh*-R; Lane2: 200 bp DNA Ladder Marker

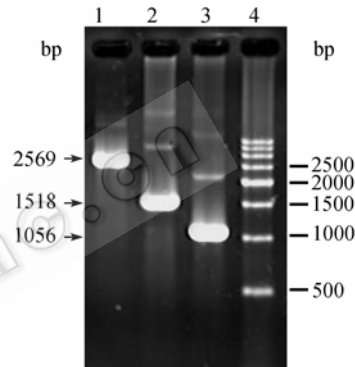


图5 重叠延伸 PCR

Fig. 5 Overlap extension PCR

Lane1: Fuse product of PGK promoter and ADH1 gene; Lane2: Fragment of PGK promoter; Lane3: Fragment of ADH1; Lane4: 500 bp DNA marker

### 2.3 载体 pUPGKAT 的构建

以 pUG6 质粒为骨架, 将 PGK 启动子和 *adh1* 基因的融合片段连入 KanMX 基因下游的 *loxP* 位点外侧, 获质粒 pUPGKA, 并用限制性内切酶 *EcoRV* 和 *Spe* 进行双酶切验证。将 *CYC1* 终止子片段插入到 pUPGKA 质粒的 *adh1* 基因下游, 构建整合表达载体 pUPGKAT, *Spe* 和 *Sac* 双酶切验证(图 6)。

### 2.4 载体 pUPGKAT 的线性化

在 *adh1* 基因的中间位点选择酶切位点 *Tth111*, 对重组整合载体 pUPGKAT 进行单酶切(图 7), 酶切完全后, 回收酶切条带用于转化。

### 2.5 菌落 PCR 验证 *adh1* 同源重组

利用引物 Y1、Y2 对 *adh1* 同源重组进行菌落 PCR 验证 (图 8), 结果表明, 扩增的条带大小为

1300 bp 左右, 与理论值 1270 bp 相符, 说明转化菌株已经发生重组整合。

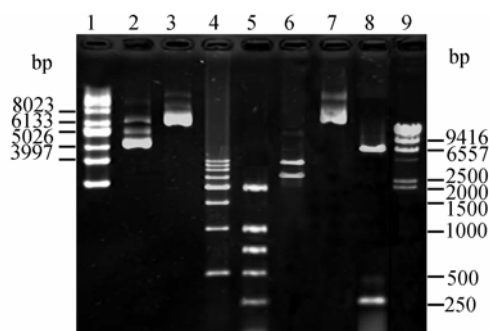


图 6 重组整合载体 pUPGKAT 的酶切分析

Fig. 6 Restriction analysis of pUPGKAT vector  
Lane1: Supercoiled DNA Ladder Marker; Lane2: Plasmid of pUG6; Lane3: pUPGKA vector; Lane4: 500bp DNA Ladder Marker; Lane5: DNA Marker DL2000; Lane6: Digestion of pUPGKA by *EcoR* and *Spe*; Lane7: pUPGKAT vector; Lane8: Digestion of pUPGKA by *Spe* and *Sac*; Lane9:  $\lambda$ -*Hind* digest Ladder Marker.

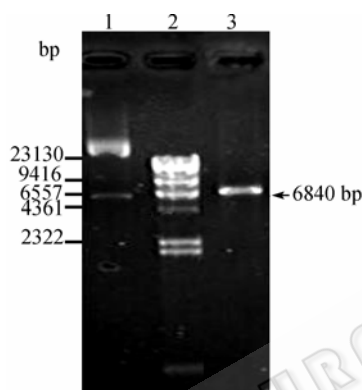


图 7 pUPGKAT 载体的线性化

Fig. 7 linearization of pUPGKAT vector  
Lane1: plasmid of pUPGKAT; Lane2:  $\lambda$ -*Hind* digest Ladder Marker; Lane3: Linear pUPGKAT

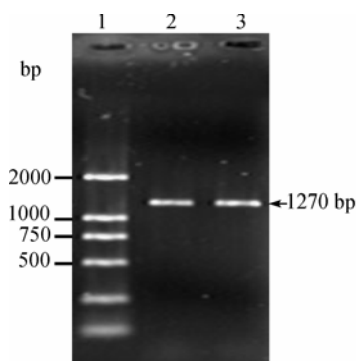


图 8 重组子菌落 PCR

Fig. 8 Recombinants clone PCR  
Lane1: DNA Marker DL2000; Lane2-3: Recombinants clone PCR products

## 2.6 筛选标记的切除

转化 pSH65 质粒于重组菌中, 克隆子长出后, 经半乳糖诱导后, 涂布在 YPD 完全培养基平板上, 待单菌落长出后, 影印至含有 200  $\mu$ g/mL G418 的 YPD 平板, 筛选抗性标记已被切除的菌株, 图 9 中箭头所示菌落是几个具有代表性的 G418 抗性丢失的菌落。连续传代 10 次, 经菌落 PCR 验证, 转化子  $YS_2^- adh2-adh1$  遗传稳定。

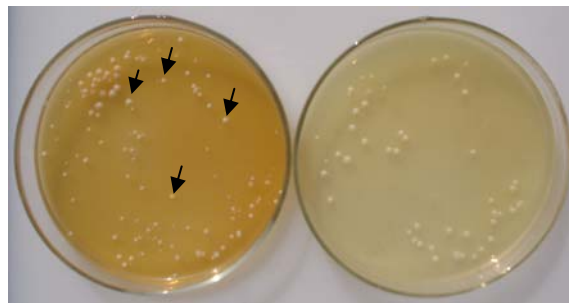


图 9 G418 抗性丢失细胞的筛选

Fig. 9 Selection of cells without G418 resistance  
Left: YPD plate; Right: YPD+G418 plate

## 2.7 突变株发酵乙醇代谢测定

对  $YS_2^- \Delta adh2$  和  $YS_2^- \Delta adh2-adh1$  分别进行厌氧发酵, 气相色谱分析乙醇产量(图 10), 结果表明两株菌在 50 h 左右乙醇产量均接近最高值, 之后  $YS_2^- \Delta adh2-adh1$  菌株的乙醇产量仍有缓慢的增加,  $YS_2^- \Delta adh2$  则基本保持稳定。  $YS_2^- \Delta adh2-adh1$  的最高乙醇产量较出发菌株  $YS_2^- \Delta adh2$  增加了 8.84%。

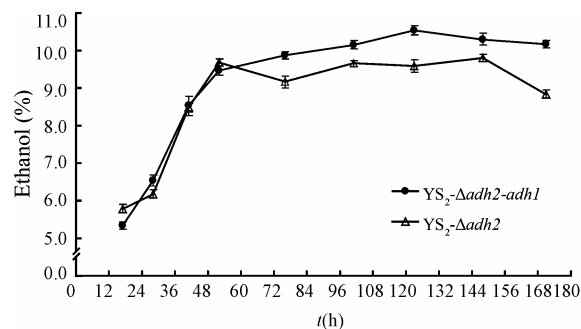


图 10  $YS_2^- \Delta adh2$  和  $YS_2^- \Delta adh2-adh1$  厌氧发酵乙醇产量变化

Fig. 10 Changes in ethanol yield during anaerobic fermentation of the  $YS_2^- \Delta adh2$  and  $YS_2^- \Delta adh2-adh1$

## 3 讨论

根据 Cre/*loxP* 系统的作用原理, 在质粒 pUG6 的基础上成功构建了酿酒酵母整合表达载体 pUPGKAT, 转化酿酒酵母后 *adh1* 基因拷贝数增加,

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>



并受到 PGK 强启动子的调控, 达到了超表达的效果。Cre/loxP 介导的表达系统还可以进行标记挽救。标记挽救时, 带有 *ble* 标记的 Cre 表达质粒 pSH65 被转化至酿酒酵母细胞, 通过半乳糖诱导 Cre 重组酶表达进而介导两个相邻 loxP 位点间的重组实现标记基因的切除。Cre/loxP 介导的标记挽救特点可以使该方法在同一酵母菌株中超表达各种不同的基因而不需要更改抗性标记, 解决了同时修饰许多基因时, 可用的抗性筛选标记有限的难题。构建菌株 YS<sub>2</sub>- $\Delta adh2$ -*adh1* 的突变同突变株 YS<sub>2</sub>- $\Delta adh2$  一样发生在染色体水平, 遗传性状较稳定, 无需在培养基中添加其它物质便可以维持其正常生长。实验结果表明在敲除催化乙醇生成乙醛的乙醇脱氢酶 (*adh2*) 基因的突变菌株中, 进一步超表达乙醇脱氢酶 (*adh1*) 基因, 乙醇产量提高了 8.84%。这说明在糖酵解之后丙酮酸生成乙醇的代谢途径中, 控制乙醛的生成量有利于提高酿酒酵母的乙醇产量。

值得指出的是用该系统进行超表达时, 会在染色体中留下 pUG6 质粒中除筛选标记 KanMX 和 1 个 loxP 位点以外的其它的大约 2400 bp 的序列, 在反复利用该方法时会不会引起错误的重组, 还需实验的进一步考证。总之, 利用 Cre/loxP 系统对细胞进行遗传修饰, 为进一步研究酿酒酵母乙醇代谢途径中的基因调控、构建乙醇高产酿酒酵母菌株提供了一个十分便捷的分析工具。

## 参 考 文 献

- [1] Prasad S, Singh A, Joshi HC. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resour Conserv Recy*, 2007, **50**(1): 1–39.
- [2] Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, *et al*. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, 2002, **415**(6874): 871–880.
- [3] Bakker BM, Bro C, Kotter P, *et al*. The mitochondrial alcohol dehydrogenase Adh3p is involved in a redox shuttle in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 2000, **182**(17): 4730–4737.
- [4] Dombek KM, Voronkova V, Raney A, *et al*. Functional analysis of the yeast Glc7-binding protein Reg1 identifies a protein phosphatase type 1-binding motif as essential for repression of ADH2 expression. *Mol Cell Biol*, 1999, **19**(9): 6029–6040.
- [5] Donoviel MS, Young ET. Isolation and identification of genes activating UAS2-dependent ADH2 expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 1996, **143**(3): 1137–1148.
- [6] Sakurai M, Tohda H, Kumagai H, *et al*. A distinct type of alcohol dehydrogenase, adh4<sup>+</sup>, complements ethanol fermentation in an *adh1*-deficient strain of *Schizosaccharomyces pombe*. *Fems Yeast Res*, 2004, **4**(6): 649–654.
- [7] Grey M, Schmidt M, Brendel M. Overexpression of ADH1 confers hyper-resistance to formaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 1996, **29**(5): 437–440.
- [8] 郭晓贤, 宋浩雷, 江贤章, 等. ADH2 等位基因缺失的酿酒酵母杂合子的构建. *中国医学研究与临床*, 2006, **4**(9): 7–11.
- [9] Cheng HR, Jiang N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnol Lett*, 2006, **28**(1): 55–59.
- [10] Suga M, Hatakeyama T. High efficiency transformation of *Schizosaccharomyces pombe* pretreated with thiol compounds by electroporation. *Yeast*, 2001, **18**(11): 1015–1021.
- [11] Johansson B, Hahn-Hagerdal B. Overproduction of pentose phosphate pathway enzymes using a new CRE-loxP expression vector for repeated genomic integration in *Saccharomyces cerevisiae*. *YEAST*, 2002, **19**(3): 225–231.
- [12] Gietz RD, Woods RA. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol*, 2002, **350**: 87–96.
- [13] Gietz RD, Woods RA. Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method. *Methods Mol Biol*, 2006, **313**: 107–120.
- [14] 宋浩雷, 郭晓贤, 杨月梅, 等. 酿酒酵母 ADH3 基因的敲除. *工业微生物*, 2006, **36**(4): 28–32.
- [15] 张丛文. 一种快速测定啤酒酒精含量的方法——气相色谱法. *计量与测试技术*, 2005, **32**(7): 46–50.