

酿酒酵母 *SNF4* 基因敲除缺失菌株的构建

林晓华^{1*}, 柯崇榕^{1*}, 吴毕莎¹, 郑永标¹, 李力¹, 陈由强², 黄建忠¹

1 福建师范大学工业微生物教育部工程研究中心 生命科学学院 福建省现代发酵技术工程研究中心, 福州 350108
2 福建师范大学生命科学学院 农业部甘蔗遗传改良重点开放实验室, 福州 350108

摘要: 构建一株酿酒酵母 *SNF4* 基因缺失菌株并研究其对乙醇产量的影响。扩增带有 *SNF4* 基因上下游同源序列和 Kan^r 筛选标记的 *SNF4* 基因敲除组件, 转化到酿酒酵母 YS2 获得阳性克隆子, 然后将质粒 pSH65 转到阳性克隆子中, 半乳糖诱导 pSH65 表达 Cre 酶切除 Kan^r 筛选标记, 获得 *SNF4* 等位基因完全缺失菌株 YS2- Δ *SNF4*。发酵实验结果表明, 缺失菌株 YS2- Δ *SNF4* 乙醇产量较出发菌株提高了 7.57%。利用 Cre-LoxP 系统, 成功构建了 *SNF4* 等位基因完全缺失菌株并提高乙醇产生量。

关键词: 酿酒酵母, *SNF4*, 基因敲除

Construction of *Saccharomyces cerevisiae* mutant with knockout of *SNF4* gene

Xiaohua Lin^{1*}, Chongrong Ke^{1*}, Bisha Wu¹, Yongbiao Zheng¹, Li Li¹, Youqiang Chen², and Jianzhong Huang¹

1 Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Engineering Research Center of Fujian Modern Fermentation Technology, College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China

2 Key Laboratory of Sugarcane Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China

Abstract: Construction and ethanol production effects of *SNF4* gene knockout in *Saccharomyces cerevisiae* were described in this paper. For knockout of *SNF4* gene in *S. cerevisiae* YS2, a PCR-amplified disruption cassette was used, encoding the short flanking homologous regions to the *SNF4* gene and Kan^r as selectable marker. The *SNF4* gene disruption cassette was transformed into *S. cerevisiae* YS2 through LiAc/SS Carrier DNA/PEG. The positive transformants were grown on G418 plates and verified by PCR. The Kan^r marker was rescued by transforming plasmid pSH65 into positive transformants and inducing expression of Cre recombinase in galactose-containing medium. Lastly, the YS2- Δ *SNF4* strain, in which *SNF4* allele gene were completely

Received: August 3, 2010; **Accepted:** December 16, 2010

Supported by: Earmarked Fund for Modern Agro-Industry Technology Research System (No. nycytx-024-01-20), National Department Public Benefit Research Foundation (No. nyhyzx07-019), 948 Ministry of Agriculture Project (No. 2006-G37), Fujian Provincial Development and Reform Commission (No. [2004]477), Fujian Provincial Department of Science and Technology (No. 2005Q007).

Corresponding author: Jianzhong Huang. Tel/Fax: +86-591-22868212; E-mail: hjz@fjnu.edu.cn

*These authors contributed equally to this study.

现代农业产业技术体系建设专项资金 (No. nycytx-024-01-20), 公益性行业 (农业) 科研专项项目 (No. nyhyzx07-019), 农业部 948 项目 (No. 2006-G37), 福建省发改委重大项目 (No. [2004]477), 福建省科技厅平台建设项目 (No. 2005Q007) 资助。

knocked out, was obtained by repeating the same procedure. The result of anaerobic fermentation showed that ethanol production of the *SNF4* gene knockout strain had increased by 7.57 percent as compared with the original strain YS2. The experiment indicated ethanol production could be improved significantly with the approach of *SNF4* gene knockout by Cre-LoxP system.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, *SNF4*, gene knockout

20 世纪 80 年代后, 随着能源危机的加剧, 生物燃料乙醇作为一种可再生的能源, 备受各个国家的关注, 构建高产乙醇的酿酒酵母工程菌株成为研究热点。近几年来, 利用代谢工程技术对酿酒酵母进行遗传改造, 控制乙醇生物合成代谢流, 降低乙醇分解, 已成为构建工程菌的重要方向之一^[1]。参与乙醇代谢过程的乙醇脱氢酶系 (Adh1p-Adh5p) 之一的 Adh2p 是具有催化乙醇生成乙醛的功能^[2], 产生葡萄糖阻遏效应。在发酵培养过程中, 当环境中葡萄糖耗尽时, 受葡萄糖阻遏的 *ADH2* 基因起始表达, 从而利用乙醇作为碳源进行生长, 导致乙醇产量的降低^[3-4]。

Snf1 蛋白激酶复合体是属于高保守的丝氨酸和苏氨酸蛋白激酶类家族, 包括 Snf1p、Snf4p 和 Sip1p/Sip2p/Ga83p 五个亚基, 是受葡萄糖阻遏效应的基因的主要转录调控蛋白^[5-7]。其中 Snf4p 对具有调节 Snf1 蛋白激酶的活性具有重要的功能。当环境中葡萄糖浓度高时, Snf1p 自抑制使 Snf1 蛋白激酶处于非活性状态; 当葡萄糖消耗殆尽时, Snf4p 与其 Snf1p 催化区域相结合从而降低 Snf1p 的自抑制, 激活 Snf1 蛋白激酶活性, *ADH2* 基因起始表达^[8-10]。因此敲除 *SNF4* 基因, 可以在降低 *ADH2* 基因的表达量, 在一定程度上降低乙醇的利用率, 提高乙醇产量。本研究采用 Cre-LoxP 系统、Kan^r 抗性标记和同源重组技术敲除 *SNF4* 基因, 构建酿酒酵母 *SNF4* 等位基因缺失菌株并提高了酿酒酵母 YS2 的乙醇产量 7.57%。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒

酿酒酵母 YS2 (HIS3/URA3/LEU2/TRP1) 由福

建师范大学工业微生物教育部工程研究中心保藏, 是一株工业乙醇生产菌株, 原养型, 双倍体; 质粒 pUG6、pSH65 购自德国 EUROSCARF, 其中 pUG6 携带 Kan^r 筛选标记基因, 两端带有 LoxP 位点; pSH65 携带 Ble^r 筛选标记基因, 在半乳糖的诱导下能表达 Cre 酶。

1.1.2 酶和试剂

rTaq 酶、限制性内切酶 *Pst* I、*Xho* I 均购于 TaKaRa 公司; Pfu 酶、G418、Zeocin 购自上海生工; PEG3350 及鲑鱼精 DNA 购于 Sigma 公司; 其余试剂均为进口或国产分析纯。引物由 TaKaRa 公司合成。

1.1.3 培养基

LB 培养基 (%): 蛋白胨 1, 氯化钠 0.5, 酵母浸出物 0.5。YPD 培养基 (%): 酵母提取物 1, 蛋白胨 2, 葡萄糖 2。YPG 诱导培养基: 即将 YPD 培养基中的葡萄糖改为半乳糖。发酵培养基 (%): 蔗糖 17, 酵母粉 0.8, KH₂PO₄ 0.2, (NH₄)₂SO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.2。

1.1.4 引物

根据 SGD (*Saccharomyces* genome database) 数据库的 *SNF4* 基因 (S000003083) 和 GenBank 的 pUG6 序列 (Accession No. AF298793.1) 设计引物, 所涉及的引物及其序列见表 1。

1.2 方法

1.2.1 基因敲除组件的构建

利用碱裂解法制备质粒, 以其为模板, 以 F1、R1 为引物进行 PCR 扩增获得同源臂较短的 *SNF4* 基因敲除组件。以短同源臂的基因敲除组件为模板, 以 F2、R2 为引物, PCR 扩增获得同源臂较长的 *SNF4* 基因敲除组件。

表 1 引物列表

Table 1 List of primers

Primers name	Primer sequence (5'-3')	Notes
A	AAAAATAAAAGTTCATGTC AAGGCA	Located upstream of <i>SNF4</i>
B	GTGATTTCTTCTACTAACAA CGAGGT	Located within <i>SNF4</i>
C	TACTTCTCCAATCCAGATA AGTTCCG	Located within <i>SNF4</i>
D	GACAATACTACAAAAGGC TTTGCAT	Located downstream of <i>SNF4</i>
KanB	CAGCCAGTTTAGTCTGACC ATCT	Located within kanMAX
KanC	CCTCGACATCATCTGCCAG	Located within kanMAX
F1	TGTTAGCATTAGGAGGAA GCGAAAAGGAAAATACAT AATG	From directly upstream of <i>SNF4</i> ORF
	CAGCTGAAGCTTCGTACGC	Derived from upstream of LoxP position
R1	TATAGTATGTACACAAAAA TCTCATCGGCTCGTTTCA	From directly downstream of <i>SNF4</i> ORF
	GCATAGGCCACTAGTGGAT CTG	Derived from downstream of LoxP position
F2	ATCTTCTGCTGTGTTAGCA TTAGGAGG	From directly upstream of <i>SNF4</i> ORF
R2	TAGTTGCATTTATTTATAGT ATGTACACAA	From directly downstream of <i>SNF4</i> ORF

1.2.2 *SNF4* 显性等位基因敲除菌株的构建

根据 LiAc/SS Carrier DNA/PEG 高效酵母转化法^[11], 将 *SNF4* 敲除组件转入感受态酿酒酵母 YS2。利用 G418 筛选与同源组件发生重组的克隆子, 并以使用 A-B、C-D、A-D、A-KanB、KanC-D 引物进行 PCR 验证。采用 pSH65 质粒与 YPG 诱导、G418 抗性筛选 Kan^r 抗性标记丢失克隆子, 用 A-KanB、KanC-D、A-D 引物进行 PCR 验证。将阳性克隆连续传 8~10 代, 诱导 pSH65 质粒丢失, 最终获得 *SNF4* 显性等位基因的敲除菌株。

1.2.3 *SNF4* 等位基因完全敲除菌株的构建

重复 *SNF4* 显性等位基因敲除步骤, 敲除 *SNF4* 隐性等位基因, 获得 *SNF4* 等位基因完全敲除菌株 YS2- Δ *SNF4*。

1.2.4 *SNF4* 等位基因完全敲除菌株遗传稳定性

将 YS2- Δ *SNF4* 连续传 18 代, 每 36 h 转接 1 次, 随机挑取每一代酵母的单菌落使用 A-D、A-B、C-D 三对引物进行 PCR 验证, 研究其遗传稳定性。

1.2.5 *SNF4* 等位基因完全敲除菌株生长速率分析

以 1% 的接种量分别接种 YS2 和 YS2- Δ *SNF4* 于 50 mL YPD 液体培养基, 28 °C、250 r/min 振荡培养, 每 2 小时取样检测其 OD₆₀₀ 值。

1.2.6 *SNF4* 等位基因完全敲除菌株乙醇产量分析

将 YS2、YS2- Δ *SNF4* 接种到 100 mL 液体发酵培养基, 28 °C 摇床培养 (0~8 h: 好氧培养, 8 h 后发酵结束: 静置厌氧培养), 每隔 12 小时取样, 检测残糖量和发酵液中乙醇含量^[12]。

2 结果与分析

2.1 酿酒酵母 YS2 中 *SNF4* 基因的克隆和序列分析

利用玻璃珠法提取 YS2 基因组^[13], 以基因组 DNA 为模板, 用引物 A-D 扩增获得 *SNF4* 基因全长 (GenBank Accession No. HQ386858)。Blast 分析表明, *Saccharomyces cerevisiae* YS2 的 *SNF4* 基因与 *Saccharomyces cerevisiae* S288c 的 *SNF4* 基因 (SGD No. S000003083) 具有很高的同源性。

2.2 *SNF4* 等位基因敲除组件的构建

以 F1、R1 为引物, 利用 PCR 获得带有 2 个 LoxP 位点和 Kan^r 筛选标记基因片段, 结果表明大小与理论预计 (1 690 bp) 一致。以 F2、R2 为引物, PCR 扩增到具有同源臂较长的 *SNF4* 等位基因敲除组件, 结果表明大小与理论预计 (1 715 bp) 一致, *SNF4* 等位基因敲除组件构建成功。

2.3 *SNF4* 显性等位基因敲除菌株的验证

PCR 验证结果 (图 1) 可知, 在出发菌株 YS2 中, 泳道 1~3 条带大小与预期大小 (542 bp、1 603 bp、951 bp) 一致, 表明 YS2 中存在 *SNF4* 基因。在转化克隆子中, 泳道 6 有 2 条带, 泳道 7~8 均有单一条带并与理论值 (2 200、1 600、1 076、928 bp) 相符, 表明酿酒酵母 YS2 基因组中 *SNF4* 显性等位基因已

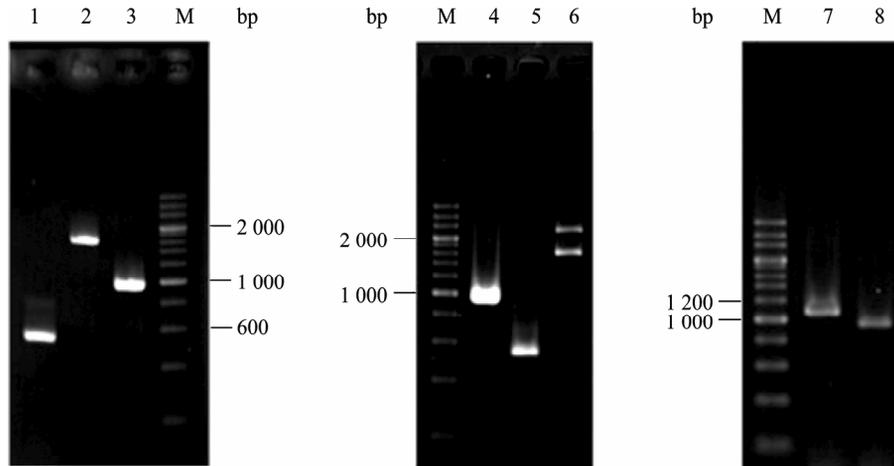


图 1 筛选阳性克隆子

Fig. 1 Screening for positive clones. M: 200 bp marker; 1,5: A-B; 2,6: A-D; 3,4: C-D; 7: A-KanB; 8: KanC-D.

经与敲除组件发生了正确的同源重组, 成功敲除了 *SNF4* 显性等位基因。然而, 泳道 4~6 均有与 *SNF4* 基因大小相一致的条带, 表明转化克隆子中还存在 *SNF4* 隐性等位基因。

2.4 Kan^r 筛选标记的切除

pSH65 质粒转到阳性克隆子中, 在 YPG 的诱导下会产生 Cre 重组酶, 切除方向相同的 2 个 LoxP 位点间的序列, 留下 1 个 LoxP 位点。通过平板影印技术和 G418 抗性筛选, 可从 YPD 平板上获得抗性标记丢失的菌株 (图 2), 使用引物 A-KanB、KanC-D、A-D 进行验证 (图 3), 其中用 A-KanB、KanC-D 引物没有条带出现, 用 A-D 得到的目的条带大小与预测的结果 ((746+1 603) bp) 一致, 说明了 Kan^r 已被正确切除。

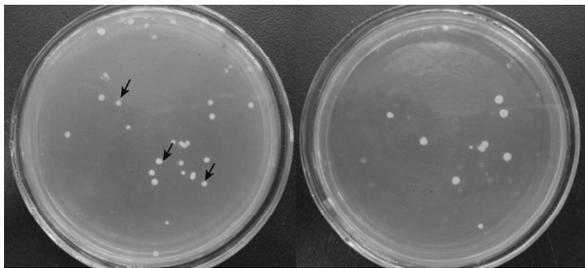


图 2 G418 抗性丢失细胞的筛选

Fig. 2 Selection of cells without G418 resistance. Left: YPD plate; right: YPD+G418 plate.

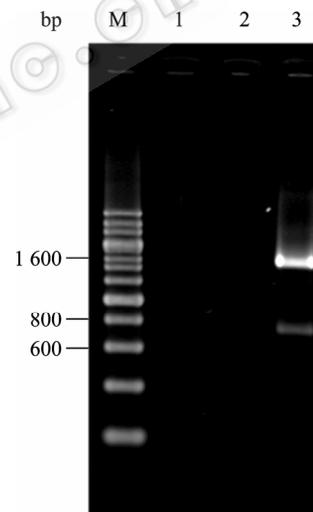


图 3 *SNF4* 单倍体缺失菌株 Kan^r 基因的验证

Fig. 3 Verification of *SNF4* haploids with Kan^r lost. M: 200 bp marker; 1: A-KanB; 2: KanC-D; 3: A-D.

2.5 *SNF4* 等位基因的完全敲除与验证

采用相同的转化和筛选方法敲除 *SNF4* 隐性等位基因, 切除 Kan^r 筛选标记, 用引物 A-B、C-D、A-D 验证阳性克隆子, 电泳结果 (图 4) A-B、C-D 没有克隆出条带, A-D 得到的条带与理论值 (746 bp) 一致。将 A-D 得到的 PCR 产物连接到 PMD-18T 载体上测序, 与 SGD 上的序列比对, 结果一致。表明酿酒酵母 YS2 的 *SNF4* 等位基因已经完全被敲除。

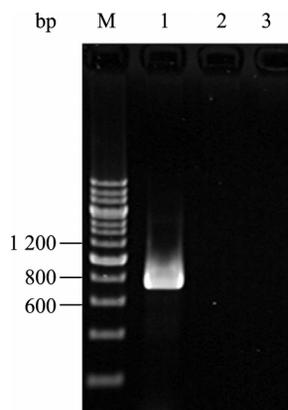


图4 *SNF4* 二倍体缺失菌株的验证

Fig. 4 Verification of diploid with *SNF4* lost. M: 200 bp marker; 1: A-D product of PCR; 2: A-B product of PCR; 3: C-D product of PCR.

2.6 缺失菌株 *YS2-ΔSNF4* 的遗传稳定性

在连续传代 18 代的缺失菌株中, 随机挑取 98 个单菌落进行 PCR 验证。结果 (表 2) 表明: A-B、C-D 均没有克隆出任何条带, A-D 均可得到预期的条带, 表明所构建的缺失菌株 *YS2-ΔSNF4* 具有很高的遗传稳定性。

表 2 缺失菌株 *YS2-ΔSNF4* 的遗传稳定性

Table 2 Genetic stability test of *YS2-ΔSNF4*

Generation	A-D	A-B/C-D
11	+++	---
12	+++	---
13	+++	---
14	+++	---
15	+++	---
16	+++	---
17	+++	---
18	+++	---

2.7 细胞的生长情况

液体平行培养 *YS2* 和 *YS2-ΔSNF4* 菌株, 绘制生长曲线 (图 5)。从图中可以看出, 在生长的前期 (0~34 h), *YS2-ΔSNF4* 比 *YS2* 生长速度慢, 但在后期 (36 h 之后), 两株菌的生长速率基本一致。

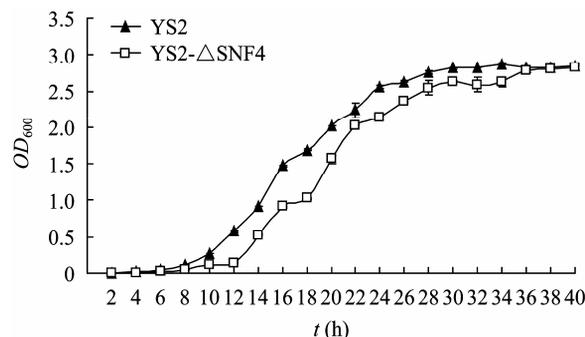


图 5 *YS2-ΔSNF4* 和 *YS2* 生长曲线

Fig. 5 Culture curve of *YS2* and *YS2-ΔSNF4*.

2.8 乙醇发酵的试验

对 *YS2* 和 *YS2-ΔSNF4* 分别进行静置厌氧发酵, 用 DNS 法测残糖量和用气相色谱分析乙醇含量 (图 6)。结果说明, 缺失菌株 *YS2-ΔSNF4* 和出发株 *YS2* 在 96 h 时乙醇产量均为最高, *YS2-ΔSNF4* 可达 8.38% (V/V), 比 *YS2* (7.79%) 提高了 7.57%。96 h 后葡萄糖消耗殆尽, *YS2-ΔSNF4* 发酵液乙醇含量基本不变, 而 *YS2* 菌株发酵液乙醇含量却下降了 2.46%。以上结果表明, 缺失菌株 *YS2-ΔSNF4* 在葡萄糖阻遏效应后的乙醇消耗能力降低了。

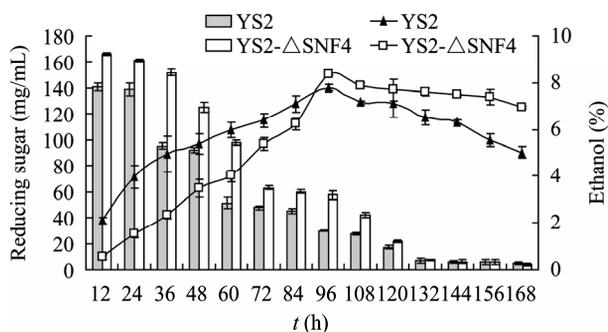


图 6 厌氧发酵残糖量和乙醇的变化图

Fig. 6 Changes in reducing sugar and ethanol production during anaerobic fermentation of the *YS2* and *YS2-ΔSNF4*.

3 讨论

基因敲除技术是 20 世纪 80 年代发展起来的一项新型的分子生物学技术, 它能应用于特定突变的工程菌的构建, 与代谢工程相联系, 可改变细胞的代谢流向, 阻断代谢支路来提高产量, 从而达到生

物育种的目的^[14-15]。如醛脱氢酶基因 (*ALDH*) 的敲除使克氏肺炎杆菌合成 1,3-丙二醇的浓度提高了 27%~42%^[16], 敲除黑曲霉的 *MNN9* 基因, 使外源蛋白漆酶的分泌表达提高 14%^[17]。另外, 利用 Cre-LoxP 系统的基因敲除方法, 可以重复利用抗性标记基因, 解决了工业酿酒酵母有效筛选标记的缺乏问题。

在酿酒酵母中, 基因敲除对其细胞的生长情况具有一定的影响^[18]。YS2- Δ *SNF4* 基因缺失突变株与出发菌株 YS2 相比, 在生长初期, 突变株的生长速度较慢, 这与 Aon、Lin 等的报道一致^[19-20]。说明 *SNF4* 基因对于维持酿酒酵母正常生长起到一定的作用, 敲除后细胞的生长能力减弱。在耗糖方面, 突变株在初期消耗速度较慢, 可能是生长速度较慢导致的, 但是在 84~96 h 时, 葡萄糖消耗殆尽, YS2 和 YS2- Δ *SNF4* 两株菌株的乙醇的产量达到最高。此后, 缺失菌株 YS2- Δ *SNF4* 乙醇的含量基本上保持稳定, 而出发菌 YS2 的乙醇含量则逐渐下降, 开始利用以乙醇作为碳源进行生长。这说明当葡萄糖消耗殆尽, *SNF4* 基因缺失菌株在一定程度上影响了 Snf1 蛋白激酶复合体的活性^[5,21], 减少了 *ADH2* 基因的表达量, 即不能利用乙醇作碳源, 减弱乙醇至乙醛的分支代谢作用^[21], 阻止乙醇再次被利用的可能性, 进而提高了乙醇的产量。

酿酒酵母的代谢调控网络非常精细, 基因间相互联系, 具有很强的调控能力。*SNF4* 基因不仅对 *ADH2* 基因具有调控作用, 另外对 *ALD6*、*SFA1*、*CAT8* 等基因存在一定的联系^[6,22], 因此, 单一敲除 *SNF4* 基因在一定程度上可以提高乙醇的产量, 但要想进一步提高乙醇的产率, 可以通过原生质体融合优良的菌种或连续敲除几个相关基因来实现。

REFERENCES

[1] Qin LN, Jiang XZ, Tian BY, et al. Recent advances in application of methods based on metabolic engineering in breeding *Saccharomyces cerevisiae*. Food Ferment Ind,

2007, 33(12): 104-110.

秦丽娜, 江贤章, 田宝玉, 等. 代谢工程在酿酒酵母菌育种中的应用研究进展. 食品与发酵工业, 2007, 33(12): 104-110.

[2] Smith MG, Desetages SG, Snyder M. Microbial synergy via an ethanol-triggered pathway. Mol Cellular Biol, 2004, 24(9): 3874-3884.

[3] Guo XX, Song HL, Jiang XZ, et al. Construction of a *Saccharomyces cerevisiae* heterozygote strain with an *ADH2* allele deletion. Chin Med Res Clin, 2006, 4(9): 7-11.

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.

[4] Voronkova V, Kacherovsky N, Tachibana C, et al. Snf1-dependent and Snf1-independent pathways of constitutive *ADH2* expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 2006, 172(4): 2123-2138.

[5] Usaite R, Jewett MC, Oliveira AP, et al. Reconstruction of the yeast Snf1 kinase regulatory network reveals its role as a global energy regulator. Mol Systems Biol, 2009, 5: 319

[6] Turcotte B, Liang XB, Robert F, et al. Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. FEMS Yeast Res, 2009, 10(1): 2-13.

[7] Hedbacker K, Carlson M. SNF1/AMPK pathways in yeast. Front Biosci, 2008, 13: 2408-2420.

[8] Walther K, Schüller HJ. Adr1 and Cat8 synergistically activate the glucose-regulated alcohol dehydrogenase gene *ADH2* of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology, 2001, 147(8): 2037-2044.

[9] Young ET, Dombek KM, Tachibana C, et al. Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. J Biol Chem, 2003, 278(28): 26146-26158.

[10] Santangelo GM. Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol Rev, 2006, 70(1): 253-282.

[11] Gietz RD, Schiestl RH. Quick and easy yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. Nat Protoc, 2007, 2(1): 35-37.

[12] Zhang CW. Rapid analyzing beer ethanol content a kind of method—Gs Chromatogra. Metrol Measur Tech, 2005, 32(7): 46.

张丛文, 一种快速测定啤酒酒精含量的方法——气相色谱

