

## 摘要

微生物在生长和工业发酵应用中面临多种环境压力,改善微生物盐胁迫压力耐受性对于发酵中成本控制、工艺优化及发酵产量提高具有重要意义。产甘油假丝酵母(*Candida glycerinogenes*)是一株具有多重抗逆性能的工业菌株,但其抗逆机制和抗逆基因元件的挖掘仍不充分。本论文基于课题组前期研究,以*C. glycerinogenes*为对象,挖掘盐胁迫抗逆基因,并对其抗逆机制和应用进行初探,主要内容如下:

挖掘*C. glycerinogenes*盐胁迫压力响应基因。基于胁迫下*C. glycerinogenes*转录组数据,选取七个上调基因作为潜在的抗逆基因。分别在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)过表达和在*C. glycerinogenes*反义抑制基因表达,发现DNA损伤检查点蛋白基因*Cgrad9*和RNA解旋酶基因*Cgdbp7*对盐胁迫耐受性有影响。盐胁迫下,过表达*Cgrad9*后,*S. cerevisiae*生物量提高22.8%,抑制*Cgdbp7*表达后,*C. glycerinogenes*生物量提高12.6%,表明*Cgrad9*是盐胁迫抗逆基因,而*Cgdbp7*作为负调控因子在盐胁迫中发挥作用。

对上述基因的盐胁迫压力响应机制进行初步探究。重组菌膜性质分析发现,过表达*Cgrad9*或抑制*Cgdbp7*表达后,*S. cerevisiae*膜流动性和通透性未发生明显变化,*C. glycerinogenes*膜流动性降低。RT-qPCR发现,盐胁迫下重组*S. cerevisiae*和重组*C. glycerinogenes*中离子转运蛋白*nhx1*的转录水平分别提高2.2倍和26.6倍。酵母单杂交筛选发现,转录因子Upc2能够结合*Cgrad9*启动子序列。以上结果表明*Cgrad9*和*Cgdbp7*通过影响重组菌膜流动性、离子转运蛋白转录水平改善重组菌盐胁迫耐受性。同时,转录因子Upc2与*Cgrad9*启动子序列结合,是*Cgrad9*潜在的调控因子。

将过表达菌株和反义抑制菌株应用于高盐环境和未脱毒纤维素水解液的发酵。高盐环境下,过表达*Cgrad9*后,菌株生物量较对照提高22.8%,乙醇产量提高17.3%。反义抑制重组菌株发酵结果显示,生物量较对照提高25.8%,乙醇产量为39.0 g·L<sup>-1</sup>,提高46.1%。将反义抑制重组*C. glycerinogenes*应用于未脱毒纤维素水解液发酵,生物量较对照提高8.2%,乙醇产量为22.8 g·L<sup>-1</sup>,提高13.7%。转录分析发现未脱毒纤维素水解液下,乙醇脱氢酶*adh1*转录上调,可能提高反义抑制重组菌株糠醛耐受性,使得反义抑制重组菌生物量提高,进而提高乙醇产量。以上结果表明过表达*Cgrad9*或抑制*Cgdbp7*表达能够改善重组菌在高盐及复杂环境胁迫下的发酵水平,可为酵母抗逆机制研究和应用提供借鉴。

**关键词:** 产甘油假丝酵母; 压力响应基因; 盐胁迫; 过表达; 反义抑制

## Abstract

Microorganisms face multiple environmental stresses in growth and industrial fermentation applications, and improving microbial salt stress tolerance is important for cost control, process optimization and fermentation yield improvement. *Candida glycerinogenes* is an industrial yeast strain with multiple stress tolerance properties, but its stress tolerance mechanism and stress tolerance gene elements are still not fully explored. In this thesis, based on the previous research, *C. glycerinogenes* was used as the target to mine salt stress resistance genes and to conduct a preliminary investigation on its resistance mechanism and application, mainly as follows:

Exploring of *C. glycerinogenes* salt stress response genes. Based on *C. glycerinogenes* transcriptome data under stress, seven up-regulated genes were selected as potential resistance genes. Overexpression in *Saccharomyces cerevisiae* and antisense suppression of gene expression in *C. glycerinogenes*, respectively, revealed that the DNA damage checkpoint protein gene *Cgrad9* and the RNA helicase gene *Cgdbp7* had effects on salt stress tolerance. Under salt stress, *S. cerevisiae* biomass increased by 22.8% after overexpression of *Cgrad9*, and *C. glycerinogenes* biomass increased by 12.6% after inhibition of *Cgdbp7* expression, indicating that *Cgrad9* is salt stress resistance genes, and *Cgdbp7* acts as a negative regulator in salt stress.

A preliminary investigation of the salt stress response mechanism of the above genes was conducted. Analysis of membrane properties of recombinant strain revealed that *S. cerevisiae* membrane fluidity and permeability did not change significantly after overexpression of *Cgrad9*, and *C. glycerinogenes* membrane fluidity decreased after inhibition of *Cgdbp7* expression. RT-qPCR revealed that the transcript levels of Ion transporter protein *nhx1* in recombinant *S. cerevisiae* and recombinant *C. glycerinogenes* were increased 2.2-fold and 26.6-fold under salt stress respectively. Yeast single hybridization screen revealed that the transcription factor Upc2 was able to bind the *Cgrad9* promoter sequence. These results suggest that *Cgrad9* and *Cgdbp7* improve the salt stress tolerance of recombinant strains by affecting the membrane fluidity and ion transport protein transcript levels of recombinant bacteria. Meanwhile, the transcription factor Upc2 binds to the *Cgrad9* promoter sequence and is a potential regulator of *Cgrad9*.

The overexpression strain and antisense suppressor strain were applied to the fermentation of high-salt environment and undetoxified cellulose hydrolysate. The overexpression of *Cgrad9* under high salt environment increased the biomass of the overexpressing strain by 22.8% and ethanol yield by 17.3% compared to the control. Fermentation of antisense-suppressed recombinant strain showed a 25.8% increase in biomass and a 46.1% increase in ethanol yield

of  $39.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  compared to the control. Application of antisense-suppressed recombinant *C. glycerinogenes* to the fermentation of undetoxified cellulose hydrolysate showed an 8.2% increase in biomass and a 13.7% increase in ethanol yield of  $22.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  compared to the control. Transcriptional analysis revealed that Ethanol dehydrogenase *adh1* transcription was up-regulated under undetoxified cellulose hydrolysate, which may improve furfural tolerance of antisense-suppressed recombinant strain, resulting in higher biomass of antisense-suppressed recombinant strain and thus higher ethanol yield. The above results suggest that overexpression of *Cgrad9* and inhibition of *Cgdbp7* expression have positive effects on the improvement of fermentation level, which may provide a reference for the research and application of yeast resistance mechanism.

**Key words:** *Candida glycerinogenes*; stress-response genes; salt stress; overexpression; antisense inhibition

# 目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 高盐环境对酵母生长发酵的影响 .....	1
1.2 盐胁迫应答途径.....	1
1.2.1 高渗甘油(HOG)途径 .....	1
1.2.2 蛋白激酶 A(PKA)信号途径.....	2
1.2.3 钙调神经磷酸酶途径.....	2
1.3 酵母细胞盐胁迫下生理变化 .....	2
1.3.1 渗透压保护剂.....	2
1.3.2 膜性质变化.....	3
1.3.3 离子转运蛋白.....	3
1.3.4 抗逆机制交叉及应用.....	4
1.4 产甘油假丝酵母研究进展 .....	4
1.5 本课题的研究意义及研究内容 .....	5
1.5.1 本课题研究意义.....	5
1.5.2 本课题研究内容.....	5
第二章 材料与方法 .....	6
2.1 材料.....	6
2.1.1 菌株和质粒.....	6
2.1.2 培养基.....	8
2.1.3 主要试剂.....	8
2.1.4 主要仪器.....	9
2.2 方法.....	10
2.2.1 目的基因扩增.....	10
2.2.2 酵母总 DNA 的提取.....	10
2.2.3 扩增产物回收.....	10
2.2.4 大肠杆菌质粒提取.....	11
2.2.5 DNA 片段的酶切和连接.....	11
2.2.6 大肠杆菌感受态细胞的制备.....	11
2.2.7 大肠杆菌转化.....	12
2.2.8 目的片段转入酵母细胞.....	12
2.2.9 反义 RNA 技术抑制基因表达 .....	13
2.2.10 酵母 RNA 提取和反转录 .....	13
2.2.11 RT-qPCR 法分析转录水平 .....	14
2.2.12 细胞膜流动性测定.....	15

2.2.13 细胞膜通透性测定.....	15
2.2.14 酵母单杂交.....	15
2.2.15 重组菌发酵实验.....	16
2.2.16 产物测定方法.....	16
2.2.17 酵母菌株耐受性比较.....	16
2.2.18 未脱毒纤维素水解液制备.....	17
第三章 结果与讨论 .....	18
3.1 产甘油假丝酵母抗逆基因的筛选 .....	18
3.1.1 产甘油假丝酵母潜在抗逆基因的克隆 .....	18
3.1.2 潜在抗逆基因对 <i>S. cerevisiae</i> 胁迫耐受性的影响 .....	18
3.1.3 潜在抗逆基因对 <i>C. glycerinogenes</i> 胁迫耐受性的影响 .....	20
3.1.4 不同反义抑制方式及过表达对 <i>C. glycerinogenes</i> 抗逆性能影响 .....	24
3.2 抗逆重组菌耐盐机制初探 .....	28
3.2.1 Cgrad9 和 Cgdbp7 影响重组菌膜性质 .....	28
3.2.2 Cgrad9 和 Cgdbp7 影响盐胁迫压力响应基因转录 .....	30
3.2.3 Cgrad9 和 Cgdbp7 上游调控因子筛选 .....	31
3.3 重组菌发酵分析.....	33
3.3.1 过表达重组菌高盐胁迫发酵分析.....	33
3.3.2 反义抑制重组菌高盐胁迫发酵分析.....	34
3.3.3 重组菌未脱毒纤维素水解液发酵.....	36
主要结论与展望 .....	38
主要结论.....	38
展望.....	38
参考文献.....	39
附录 II:表 .....	45

## 第一章 绪论

### 1.1 高盐环境对酵母生长发酵的影响

环境中的离子包括有钠离子、钾离子、钙离子等。高盐环境即微生物所处生长环境中离子浓度高于其最适生长的离子浓度范围。环境中高浓度盐离子的存在会严重影响菌株的生长及降低工业发酵产物产量。

不同微生物盐胁迫耐受性不同，如 *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D (CEN.PK) 和 *S. cerevisiae* W303 (W303) 在  $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 压力下生长率分别下降 75%、59%<sup>[1]</sup>，而鲁氏酵母复合酵母菌则能够在含有 16%-25% (w/v) 氯化钠压力下生长<sup>[2]</sup>，因此对于不同酵母菌，高盐环境所指盐浓度并不一致。然而高盐环境均会使得酵母菌生长受到抑制，生物量下降。

为提高发酵产能，初始发酵培养基中发酵底物浓度处于较高水平，高浓度发酵底物造成的高渗胁迫使菌株延滞期增长，发酵周期增加，发酵成本提高。然而在发酵生产氨基酸过程中，高渗环境等环境压力虽使得生物量降低，但对于产物产量提高具有正向作用。培养基优化对于改善产物产量具有重要意义，能够耐受高盐环境的微藻可以更好地利用盐废水发酵生产微生物油脂<sup>[3]</sup>，优化后的高盐液态培养基，可以使红曲霉菌胞内黄色素色价提高<sup>[4]</sup>，在高渗和乙醇胁迫培养基中分别添加 0.4% 和 1.0% (w/v) 氯化钾后产物产量显著提高<sup>[5]</sup>。

此外，尝试使用低值发酵底物生产高附加值产品一直是热点研究课题，如利用纤维素制备纤维素水解液作为发酵底物生产乙醇<sup>[6-8]</sup>。但因纤维素难以被微生物直接利用，纤维素处理制备水解液的过程使得水解液中大量有毒物质存在，影响乙醇发酵<sup>[9]</sup>。同时，发酵生产过程中环境变化，各种环境压力的存在持续地严重影响酵母菌的生长与代谢<sup>[9-11]</sup>。因此，提高酵母菌的盐胁迫压力耐受性，能够有效地激活酵母的反应过程，提高细胞环境胁迫耐受性，增加酵母细胞及其酶在体内的活性，从而促进生产。

### 1.2 盐胁迫应答途径

#### 1.2.1 高渗甘油 (HOG) 途径

HOG 途径是酵母细胞快速响应外界高渗压力的重要信号途径且高度保守，能够快速调控细胞适应外界的高渗环境，其核心是由 Hog1 介导的 MAPK 级联系统<sup>[12]</sup>。Sho1 途径和 Sln1 途径是 HOG 途径的两个分支途径，Sho1 途径为低渗传感器，Sln1 途径为高渗传感器。在渗透压胁迫下，细胞膨胀压力降低、体积萎缩、膜壁距离增大，Sln1 自磷酸化程度减弱，使得 Ssk1 快速去磷酸化并结合到 Ssk2/Ssk22，进而将磷酸化信号通

过 Pbs2 传导至 Hog1 蛋白，上游传感器的激活促使 Hog1 磷酸化进入细胞核，进而激活部分转录因子如 Msn2/4 等，调节压力响应基因的表达以响应盐胁迫<sup>[13-14]</sup>。同样的，HOG 信号通路中盐胁迫下 Hog1 直接磷酸化特定的转录因子 Sko1、Hot1 和 Smp1<sup>[15-16]</sup>等以响应外界压力。随着相关研究进程发现 Msn1 和 Yap4 的激活子同样是 HOG 途径的下游靶标<sup>[17-18]</sup>。此外，Hog1 对几个代谢节点的调节作用和体积变化的影响在适应高盐环境过程中起重要作用，包括激活甘油合成途径关键酶 Gpd1、Gpp2 以提高胞内甘油含量，抑制 Pyk1、Pdc1 以降低丙酮酸和三羧酸循环通量和关闭 Fps1 通道以降低甘油外排，以及乙醇合成的下调和 Ad6 的上调<sup>[19-20]</sup>。

### 1.2.2 蛋白激酶 A (PKA) 信号途径

PKA 信号途径在高渗响应的转录调控中起作用。PKA 信号途径的主要功能为从呼吸代谢到发酵代谢的适应<sup>[21]</sup>，对胁迫下基因表达的调控具有重要意义。一般来说，在良好的生长条件下，高 PKA 活性促进细胞生长、糖酵解和细胞周期进展，而抗逆性则下调。PKA 活性与 Msn2 和 Msn4 转录因子介导的盐胁迫压力响应基因表达直接相关<sup>[22-23]</sup>。Msn2/4 受 PKA 磷酸化的负调控，并在正常情况下保留在细胞质中<sup>[21]</sup>，渗透压胁迫改变这种负调控，Msn2/4 在细胞核积累，随后盐胁迫压力响应基因子集被转录激活<sup>[22]</sup>。此外，转录因子 Sko1 可能也受 PKA 控制。PKA 活性通过 Sko1 中的特定磷酸化位点起作用，促进 Sko1 的核输入，并干扰 Sko1 调控的基因表达<sup>[24-25]</sup>。

### 1.2.3 钙调神经磷酸酶途径

钙调神经磷酸酶途径是调节胞内钙离子浓度的重要途径，胞内钙离子浓度的改变能够改善酵母细胞盐胁迫下生长情况。研究表明钙调神经磷酸酶突变体对阳离子特定应力高度敏感<sup>[26]</sup>，高盐环境会诱使胞内  $\text{Ca}^{2+}$  增加，钙调蛋白与胞内过量的  $\text{Ca}^{2+}$  结合后激活钙调神经磷酸酶，依赖于钙调神经磷酸酶的转录激活因子 Crz1 去磷酸化实现盐胁迫下基因表达的调节<sup>[27]</sup>，基因组图谱显示钙调神经磷酸酶影响酵母中大量基因的表达<sup>[28]</sup>。盐胁迫下，响应压力而被激活的钙调神经磷酸酶促进了去磷酸化的 Crz1 的核输入，刺激 Crz1 结合启动子进行转录<sup>[29]</sup>，影响定位于液泡膜的离子转运蛋白 *pmc1* 及定位于内质网和高尔基体等细胞器膜上的钙泵蛋白 *pmr1* 等基因的表达<sup>[30]</sup>，从而维持细胞正常生长，同时 Pmc1 和 Pmr1 的协同功能是适当激活钙调神经磷酸酶途径以应对细胞内外环境变化所必需的<sup>[31-32]</sup>。

## 1.3 酵母细胞盐胁迫下生理变化

### 1.3.1 渗透压保护剂

盐胁迫下，酵母菌产生多种渗透压保护剂，如甘油、海藻糖和糖原等。渗透压保护剂通过调节胞浆渗透势调节渗透平衡，这种积累不会抑制普通的代谢反应。相容性溶质

通常是亲水的，在渗透压力下，它们会在蛋白质-蛋白质复合物或膜表面取代水，从而充当渗透压保护剂和低分子量伴侣<sup>[33]</sup>。高浓度时，相容溶质可以降低离子对酶活性的抑制作用，提高酶的稳定性，并防止酶复合体的解离，如 Photosystem II 的氧进化复合体<sup>[34]</sup>。甘油合成主要方式为糖酵解中间产物磷酸二羟丙酮在 3-磷酸甘油脱氢酶 Gpd1 或 Gpd2 的作用下转化为 3-磷酸甘油，随后在 3-磷酸甘油酯酶 Gpp1 或 Gpp2 作用下合成甘油<sup>[35-36]</sup>。*S. cerevisiae* 中 *gpd1* 和 *gpp2* 的表达受到高渗压力的诱导<sup>[37]</sup>。而在 *C. glycerinogenes* 中，*gpd1* 的转录水平和酶活同样受环境中盐胁迫的影响而提高<sup>[14]</sup>，*gpd1* 的缺失则使得敲除菌失去甘油合成能力<sup>[38]</sup>。

### 1.3.2 膜性质变化

细胞膜是微生物抵御外界环境变化的第一道防线，同时也是与外部环境进行物质交换的通道。细胞膜由一个高度动态的脂质双分子层组成，其中嵌入酶或受体等蛋白质<sup>[39]</sup>。当细胞面临环境压力时，细胞膜会最先感知到环境压力并响应。环境中盐浓度的微小改变都会使得细胞膜通透性发生改变<sup>[40]</sup>。在适宜的生长条件下，细胞膜的磷脂双分子层被认为主要处于液晶相。而高渗环境下，细胞膜发生磷脂相变，即随着细胞脱水过程磷脂的头基被迫聚集在一起，使得磷脂双分子层从液晶相转变为凝胶相，进而改变细胞膜形态<sup>[41]</sup>。而细胞膜的磷脂相变被认为是导致细胞死亡的重要原因<sup>[42]</sup>。

### 1.3.3 离子转运蛋白

盐胁迫压力响应通过控制胞内钠离子浓度，可能是限制钠离子的内流或是通过增加离子的外排，将钠离子和氯离子固存到液泡或内体中的方式介导<sup>[28]</sup>。*Ena1* 能够实现阳离子外排以平衡细胞内外离子，是影响细胞耐盐性的关键因素<sup>[41]</sup>。*S. cerevisiae* 中 *Ena1* 敲除后，阳离子敏感性显著提高<sup>[42]</sup>。*Nhx1* 有助于将有毒的钠和锂离子以及多余的钾隔离在内体和液泡中<sup>[43]</sup>，并参与细胞对高渗休克的早期适应<sup>[44]</sup>。此外，它的活性显著有助于维持细胞内 pH 的稳定，并且它对于蛋白质在内体和其他细胞器之间正确运输过程中不可或缺<sup>[45-46]</sup>。*Nhx1* 是最早发现的酵母胞内反向转运蛋白，能够将胞内  $\text{Na}^+$  转运至内体中，从而降低胞内盐离子毒性。*Nhx1* 定位于泡前室膜，*nhx1* 的缺失导致细胞对盐和低 pH 的敏感度增加，同时细胞液 pH 下降<sup>[46-47]</sup>。此外还有诸多离子转运蛋白对于盐胁迫响应具有重要作用，如 *Pmc1*，*Pmr1* 和 *Vnx1* 等。



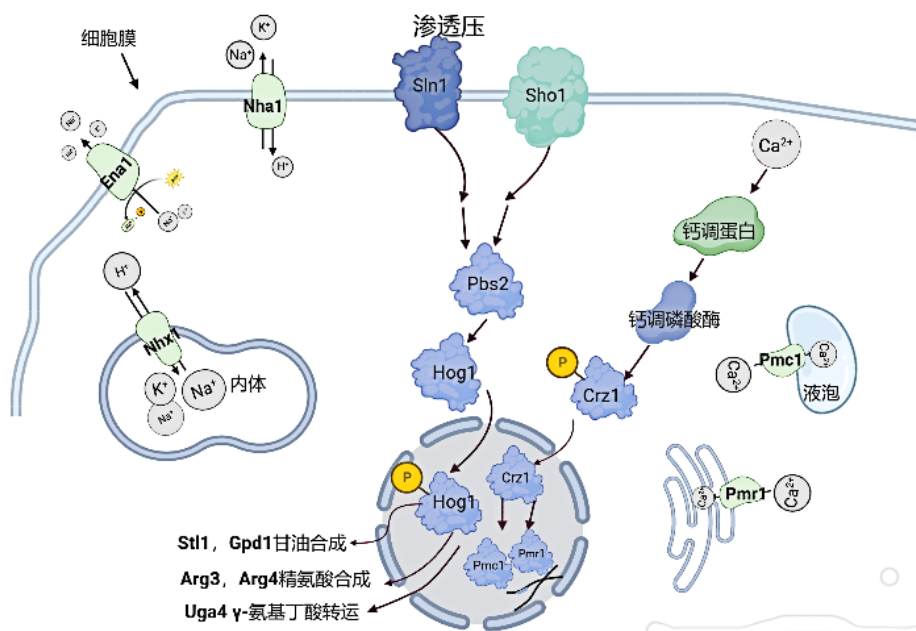


图 1 酵母细胞耐盐机制

Fig. 1 Yeast salt tolerance mechanism

### 1.3.4 抗逆机制交叉及应用

高盐环境造成的盐胁迫压力响应与高温、高糖存在机制上的重叠<sup>[43]</sup>。过高的离子浓度引起的活性氧累积和细胞 DNA 损伤与高温相近，而高糖环境和高盐环境均会引起渗透压变化<sup>[44]</sup>。因此对酵母菌盐胁迫压力响应机制的研究不仅可以改善酵母菌高盐环境下的生长，同时对于酵母菌的高温高糖耐受性可能同样存在一定的响应。

高盐环境下，外界的高渗透压和高浓度盐离子的存在对酵母细胞生长产生影响。仅高盐压力下，酵母细胞暴露于高盐环境，细胞迅速脱水，盐离子造成 DNA 损伤和胞内离子环境变化，并阻止细胞生长<sup>[29]</sup>。但当高盐压力与高温压力共同存在时，酵母菌能够通过利用高盐环境引起的细胞色素 c 氧化酶和 ATP 合酶转录上调使得 ATP 含量提高，进而改善酵母菌高温压力耐受性。此外，外源添加一定浓度 NaCl 时，酵母菌能够生成更多的六磷酸葡萄糖和三磷酸甘油醛，有助于磷酸戊糖途径和糖酵解的催化反应进行<sup>[45]</sup>。高温环境下，高盐环境不仅有利于酵母菌的生长，同时能够进一步改善产物发酵水平。

## 1.4 产甘油假丝酵母研究进展

产甘油假丝酵母 (*Candida glycerinogenes* WL2002-5) 是一株从自然界中筛选的具有工业抗逆性能的高产甘油酵母菌株<sup>[36]</sup>。它的快速生长性、对高盐和高糖的渗透压耐受性、对多种酸胁迫的耐受性、对 2-苯乙醇等有毒物质的耐受性以及进行浓醪发酵和快速代谢底物中糖的能力，使其成为发酵工业中具有优秀应用前景的工业菌株<sup>[46-47]</sup>。*C. glycerinogenes* 是一株非模式酵母菌株，具有不同于模式酵母菌株 *S. cerevisiae* 的盐胁迫耐受机制。以往的工作已开展对 *C. glycerinogenes* 高渗耐受性研究，发现 HOG 应答途

径是 *C. glycerinogenes* 响应高渗透压的重要途径。不同于模式酵母 *S. cerevisiae*, HOG 途径分支途径, *C. glycerinogenes* Sho1 途径部分蛋白缺失, 更多依赖于 Sln1 分支途径响应盐胁迫, 而 Sln1 分支具有比 Sho1 分支更广的渗透压感知范围及对下游关键分子 Pbs2 更强的激活作用<sup>[13-14]</sup>。此外, *C. glycerinogenes* 仅发现甘油合成关键酶基因 *gpd1*, 基因组注释未能获取 *gpp1* 同源基因, 但较 *S. cerevisiae* 具有两个甘油转运蛋白 Stl1 和 Stl2。同时, 盐胁迫下 *C. glycerinogenes* 中精氨酸和脯氨酸合成及分解相关基因受 Hog1 调控, 调节胞内脯氨酸含量以响应盐胁迫。而  $\gamma$ -氨基丁酸也会在盐胁迫下产生累积, 且其外源添加有助于增强其盐胁迫耐受性<sup>[14-48]</sup>。以上 *C. glycerinogenes* 不同于 *S. cerevisiae* 的耐盐机制可能是 *C. glycerinogenes* 较 *S. cerevisiae* 具有更强耐盐性的原因。对于 *C. glycerinogenes* 在乙酸、糠醛胁迫下的应答机制, 在不同的发酵条件下的有机酸代谢, 及高温高糖胁迫条件下 *C. glycerinogenes* 的耐高温机制也开展了相关研究。这些结果表明 *C. glycerinogenes* 的抗逆机制十分复杂且涉及范围广泛。

## 1.5 本课题的研究意义及研究内容

### 1.5.1 本课题研究意义

本研究课题获得国家自然科学基金(22278187)的资助。以纤维素为原料合成生物乙醇是实现碳中和的重要途径。在纤维素水解处理过程中, 残留盐离子等有毒物质。同时, 高浓度发酵底物造成的渗透压胁迫和发酵过程中代谢产生的有毒物质等限制菌株发酵。因此, 提高酵母菌株的盐胁迫耐受性有助于提高微生物发酵能力。前期转录组学研究发现, 工业抗逆菌株 *C. glycerinogenes* 的 RNA 解旋酶等基因在环境胁迫条件下转录上调, 与模式酵母菌株酿酒酵母相反, 表明其抗逆机制具有独特性。基于其抗逆性能, *C. glycerinogenes* 是研究酵母盐胁迫机制、获取高效抗逆元件的优良底盘菌株, 能够为工业菌株独特抗逆机制的研究和应用提供新思路 and 遗传资源。

### 1.5.2 本课题研究内容

(1) 对潜在抗逆基因克隆并对其在 *S. cerevisiae* 过表达和在 *C. glycerinogenes* 中反义抑制从而获得相应重组菌株, 在高盐等胁迫条件下进行点板和摇瓶实验, 筛选盐胁迫抗逆基因。

(2) 为研究不同抗逆基因响应高盐胁迫的耐受机制, 考察重组菌的膜流动性和通透性变化, 分析胁迫下重组菌压力响应基因相对转录水平变化, 并利用酵母单杂交技术筛选获取潜在的转录调控因子。

(3) 分析在高盐环境和未脱毒纤维素水解液中重组 *S. cerevisiae* 及重组 *C. glycerinogenes* 的乙醇和甘油发酵情况, 并对菌株生长能力、乙醇和甘油产量及葡萄糖消耗能力等方面进行分析, 探究重组 *S. cerevisiae* 和重组 *C. glycerinogenes* 在高盐环境下发酵时的高产机制。

## 第二章 材料与方法

## 2.1 材料

## 2.1.1 菌株和质粒

研究中所使用的所有菌株及菌株所对应的特征或者是简称详见表 2-1。

表 2-1 本研究所用菌株

Table 2-1 Strains used in this study

菌名	特征/简称	来源
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>E. coli</i> JM109	课题组保藏
<i>Candida glycerinogenes</i> WL2002-5	<i>C. glycerinogenes</i>	课题组保藏
<i>C. glycerinogenes</i> UA5 ( <i>ura5<sup>-</sup></i> )	<i>C. glycerinogenes</i> /Δ <i>Ura5</i>	课题组保藏
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK2-1C	<i>S. cerevisiae</i> CEN	课题组保藏
<i>S. cerevisiae</i> AH109	<i>S. cerevisiae</i> AH109	王玉芹惠赠
<i>C. glycerinogenes</i> /pURGAP	<i>C. glycerinogenes</i> /pURGAP	本研究构建
<i>C. glycerinogenes</i> /antiCgdbp3	<i>C. glycerinogenes</i> /antiCgdbp3	本研究构建
<i>C. glycerinogenes</i> /antiCgdbp7	<i>C. glycerinogenes</i> /antiCgdbp7	本研究构建
<i>C. glycerinogenes</i> /antiCgded1	<i>C. glycerinogenes</i> /antiCgded1	本研究构建
<i>C. glycerinogenes</i> /antiCgirc5	<i>C. glycerinogenes</i> /antiCgirc5	本研究构建
<i>C. glycerinogenes</i> /antiCghppd	<i>C. glycerinogenes</i> /antiCghppd	本研究构建
<i>C. glycerinogenes</i> /antiCgrad9	<i>C. glycerinogenes</i> /antiCgrad9	本研究构建
<i>C. glycerinogenes</i> /antiCgadk1	<i>C. glycerinogenes</i> /antiCgadk1	本研究构建
<i>S. cerevisiae</i> CEN/pYX212	<i>S. cerevisiae</i> /pYX212	本研究构建
<i>S. cerevisiae</i> CEN/pYX212-Cgdbp3	<i>S. cerevisiae</i> /Cgdbp3	本研究构建
<i>S. cerevisiae</i> CEN/pYX212-Cgdbp7	<i>S. cerevisiae</i> /Cgdbp7	本研究构建
<i>S. cerevisiae</i> CEN/pYX212-Cgded1	<i>S. cerevisiae</i> /Cgded1	本研究构建
<i>S. cerevisiae</i> CEN/pYX212-Cgirc5	<i>S. cerevisiae</i> /Cgirc5	本研究构建
<i>S. cerevisiae</i> CEN/pYX212-Cghppd	<i>S. cerevisiae</i> /Cghppd	本研究构建
<i>S. cerevisiae</i> CEN/pYX212-Cgrad9	<i>S. cerevisiae</i> /Cgrad9	本研究构建
<i>S. cerevisiae</i> CEN/pYX212-Cgadk1	<i>S. cerevisiae</i> /Cgadk1	本研究构建
<i>S. cerevisiae</i> AH109/pGADT7+pGBKT7- <i>his3</i>	AH109-GAD- <i>his3</i>	本研究构建
<i>S. cerevisiae</i> AH109/pGADT7-upc2+ pGBKT7-P <sub>Cgrad9</sub>	AH109-upc2-P <sub>Cgrad9</sub>	本研究构建

(续表 2-1)

表 2-1 本研究所用菌株

Table 2-1 Strains used in this study

菌名	特征/简称	来源
<i>S cerevisiae</i> AH109/ pGADT7-hal9+ pGBKT7-P <sub>Cgdbp7</sub>	AH109-hal9-P <sub>Cgdbp7</sub>	本研究构建

研究中所使用的所有质粒及其对应的特征或描述详见表 2-2。

表 2-2 本研究所用质粒

Table 2-2 Plasmids used in this study

质粒	特征/描述	来源
pURGAP	Amp <sup>r</sup> , URA5, 2μ	课题组保藏
pURGAP-antisenseCgdbp3	Amp <sup>r</sup> , URA5, 2μ, antiCgdbp3	本研究构建
pURGAP-antisenseCgdbp7	Amp <sup>r</sup> , URA5, 2μ, antiCgdbp7	本研究构建
pURGAP-antisenseCgded1	Amp <sup>r</sup> , URA5, 2μ, antiCgded1	本研究构建
pURGAP-antisenseCgirc5	Amp <sup>r</sup> , URA5, 2μ, antiCgirc5	本研究构建
pURGAP-antisenseCghppd	Amp <sup>r</sup> , URA5, 2μ, antiCghppd	本研究构建
pURGAP-antisenseCgrad9	Amp <sup>r</sup> , URA5, 2μ, antiCgrad9	本研究构建
pURGAP-antisenseCgadk1	Amp <sup>r</sup> , URA5, 2μ, antiCgadk1	本研究构建
pYX212	Amp <sup>r</sup> , URA3, 2μ	课题组保藏
pYX212-Cgdbp3	Amp <sup>r</sup> , URA3, 2μ, pYX212-Cgdbp3	本研究构建
pYX212-Cgdbp7	Amp <sup>r</sup> , URA3, 2μ, pYX212-Cgdbp7	本研究构建
pYX212-Cgded1	Amp <sup>r</sup> , URA3, 2μ, pYX212-Cgded1	本研究构建
pYX212-Cgirc5	Amp <sup>r</sup> , URA3, 2μ, pYX212-Cgirc5	本研究构建
pYX212-Cghppd	Amp <sup>r</sup> , URA3, 2μ, pYX212-Cghppd	本研究构建
pYX212-Cgrad9	Amp <sup>r</sup> , URA3, 2μ, pYX212-Cgrad9	本研究构建
pYX212-Cgadk1	Amp <sup>r</sup> , URA3, 2μ, pYX212-Cgadk1	本研究构建
pGADT7	Amp <sup>r</sup> , LEU2, 2μ	王玉芹惠赠
pGADT7-Cgupc2	Amp <sup>r</sup> , LEU2, 2μ, pGADT7-Cgupc2	本研究构建
pGADT7-Cghal9	Amp <sup>r</sup> , LEU2, 2μ, pGADT7-Cghal9	本研究构建
pGBKT7	Amp <sup>r</sup> , TRP1, 2μ	王玉芹惠赠
pGBKT7-his3	Amp <sup>r</sup> , TRP1, 2μ, pGBKT7-his3	本研究构建
pGBKT7-P <sub>Cgrad9</sub> -his3	Amp <sup>r</sup> , TRP1, 2μ, pGBKT7-P <sub>Cgrad9</sub> -his3	本研究构建
pGBKT7-P <sub>Cgdbp7</sub> -his3	Amp <sup>r</sup> , TRP1, 2μ, pGBKT7-P <sub>Cgdbp7</sub> -his3	本研究构建

### 2.1.2 培养基

LB 培养基：每 100 mL 中加入 1 g 氯化钠，1 g 蛋白胨和 0.5 g 酵母提取物。Amp 抗性培养基配制需另加  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的氨苄青霉素，Kan 抗性培养基配制需另加入  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  卡纳霉素，用以筛选本研究中含有所构建的载体大肠杆菌，若所需使用培养基为固体，则每 100 mL 液体培养基中需要另外添加 2 g 琼脂粉以使其常温状态下凝固而不影响菌株生长。

YPD 培养基：每 100 mL 中加入 2 g 葡萄糖，2 g 蛋白胨和 1 g 酵母粉，用以培养 *C. glycerinogenes* 和 *S. cerevisiae* CEN，若所需使用培养基为固体，则每 100 mL 液体培养基中需要另外添加 2 g 琼脂粉。

MM 培养基：每 100 mL 培养基中入 2 g 葡萄糖，0.67 g 无氨基酵母氮源（Yeast Nitrogen Base, YNB），pH 调至 7.0，用以筛选 *C. glycerinogenes* 反义 RNA 抑制重组菌株，若所需使用培养基为固体，则每 100 mL 液体培养基中需要另外添加 2 g 琼脂粉。

尿嘧啶缺陷培养基：每 100 mL 中加入 2 g 葡萄糖，0.67 g YNB，2 mg 色氨酸、2 mg 组氨酸以及 6 mg 亮氨酸，pH 调至 6.2-6.5，用以筛选 *S. cerevisiae* 过表达重组菌，若所需使用培养基为固体，则每 100 mL 液体培养基中需要另外添加 2 g 琼脂粉。

YPDA 培养基：每 100 mL 中加入 2 g 葡萄糖，2 g 蛋白胨和 1 g 酵母浸膏，2 mg 腺嘌呤硫酸盐，用以培养 *S. cerevisiae* AH109，若所需使用培养基为固体，则每 100 mL 液体培养基中需要另外添加 2 g 琼脂粉。

SD-TL 培养基：每 100 mL 中加入 2 g 葡萄糖，0.67 g YNB，2 mg 尿嘧啶、2 mg 组氨酸和 2 mg 腺嘌呤硫酸盐，用以筛选酵母单杂交菌株，若所需使用培养基为固体，则每 100 mL 液体培养基中需要另外添加 2 g 琼脂粉。

SD-TLH 培养基：每 100 mL 中加入 2 g 葡萄糖，0.67 g YNB，2 mg 尿嘧啶和 2 mg 腺嘌呤，需根据菌株生长情况加入 3-氨基-1,2,4-三唑（3-AT）以降低自激活出现的背景过高，用以进行酵母单杂交结果验证，若所需使用培养基为固体，则每 100 mL 液体培养基中需要另外添加 2 g 琼脂粉。

发酵培养基：每 100 mL 中加入 16 g 葡萄糖，2 g 蛋白胨和 1 g 酵母粉，用于重组 *C. glycerinogenes* 发酵。

### 2.1.3 主要试剂

本研究主要试剂见表 2-4。

表 2-4 主要试剂

Table 2-4 Experiment reagents

生产厂家	试剂
OXOID 公司	Yeast Extract、Tryptone
上海生工生物工程股份	氨苄青霉素、卡纳霉素、YNB、色氨酸、尿嘧啶、酵母基因组 DNA 快速抽提试剂盒

(续表 2-4)

表 2-4 主要的实验试剂

Table 2-4 Experiment reagents

生产厂家	试剂
宝日生物	DNA Ligation Kit Ver.2.0、限制性内切酶、PrimeSTAR®HS DNA 高保真聚合酶、ExTaq DNA 聚合酶、pMD™ 19-T Vector Cloning Kit、DNA marker
武汉爱博泰克生物科技	ABclonal MultiF Seamless Assembly Mix
康为世纪生物科技	凝胶回收试剂盒、DNA 片段纯化试剂盒、 <i>E. coli</i> 质粒提取试剂盒
上海国药	氯化钠、葡萄糖、乙醇
翌圣生物科技	Goldview 核酸染料
南京诺唯赞生物科技股份有限公司	AceQ Universal SYBR qPCR Master Mix 和反转录试剂盒
上海阿拉丁生化科技股份有限公司	3-AT

实验中所涉及的剩余相关试剂纯度级别均为分析纯。亦欣生物科技有限公司负责根据实验需求所设计的引物序列完成所需引物合成，天霖生物科技有限公司负责对所送出的样品根据实验要求实施完成测序工作，实验中所设计的引物数据见附表 1。

#### 2.1.4 主要仪器

本研究的主要实验仪器见表 2-5。

表 2-5 主要的实验仪器

Table 2-5 Experiment instruments

试验仪器名称	型号	生产厂家
小型离心机	5418	Eppendorf 公司
PCR 扩增仪	AG 2331 Hamburg	东胜创新公司
DLAB 混匀仪	MX-S	北京大龙兴创实验仪器有限公司
实时荧光定量基因扩增仪	CFX96	美国伯乐公司
超微量分光光度计	K5500	北京凯奥科技发展公司
凝胶成像分析系统	Alpha Imager	美国 Alpha Innotech 公司
pH 计	DELTA 320-s	METTLER TOLEDO 公司
组合式恒温摇床	HYL-C	强乐实验设备有限公司
紫外分光光度计	TU-1810	北京普析通用公司
恒温水浴锅	HH-60 (0)	苏州威尔实验仪器
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州安泰空气技术有限公司
高压蒸汽灭菌锅	YXQ-LS-50A/SZ	上海博讯有限公司
HPLC 色谱仪	JY96-II	美国戴安公司

(续表 2-5)

表 2-5 主要的实验仪器

Table 2-5 Experiment instruments

试验仪器名称	型号	生产厂家
干燥箱	DHG-9075A	上海一恒公司
琼脂糖凝胶电泳仪	DYY-8C	北京六一仪器厂
冷冻离心机	H1850R	湖南湘仪公司
荧光分光光度计	F-2700	日立(中国)有限公司
荧光显微镜	BL-FL4	重庆奥特光学仪器有限公司
隔水式培养箱	BG-80	上海博讯有限公司

## 2.2 方法

### 2.2.1 目的基因扩增

本研究中目的基因 PCR 扩增体系以 10 $\mu$ L 体系为例,其中包含有 5  $\mu$ L DNA 聚合酶,上下游引物各加入 0.2  $\mu$ L 以及 0.2  $\mu$ L 的 DNA 模板,最后用干净的双蒸水补加到 10  $\mu$ L。其他体系按相同比例放大或缩小。

其中,若需要扩增的目的基因碱基数超过 3000 bp 则使用 2  $\times$  PrimeSTAR<sup>®</sup>HS DNA 高保真聚合酶,若需要扩增的目的基因碱基数小于 3000 bp 则使用 2  $\times$  ExTaq DNA 聚合酶进行扩增。

在 PCR 扩增过程中,需要将温度升至 98 $^{\circ}$ C 并保持 10 秒钟,这是为了保证 2  $\times$  PrimeSTAR<sup>®</sup>HS DNA 高保真聚合酶能够有效地进行反应。根据所设计的引物 T<sub>m</sub> 值确定退火温度,经过退火过程,根据片段长度,每分钟延伸 1000 个碱基,设置延伸时间,进行 30 个循环重复,以达到扩增的目的。最终温度为 72 $^{\circ}$ C,完全延伸,保持 5 分钟,执行一次循环。将扩增产物存放在 4 $^{\circ}$ C 条件下以保存。

2  $\times$  ExTaq DNA 聚合酶 PCR 扩增程序:95 $^{\circ}$ C 维持时间设置为 5 min,循环 1 次;95 $^{\circ}$ C 维持时间设置为 30 s;根据引物设计时的 T<sub>m</sub> 值确定程序中退火温度设置,维持时间设置为 30 s;延伸过程温度设置为 72 $^{\circ}$ C,根据片段长度,每分钟延伸 1000 个碱基,设置延伸时间,进行 30 个循环重复,以达到扩增的目的。最终温度为 72 $^{\circ}$ C,完全延伸,保持 5 分钟,执行一次循环。将扩增产物存放在 4 $^{\circ}$ C 条件下以保存。

### 2.2.2 酵母总 DNA 的提取

参照上海生工生物工程有限公司购买的酵母基因组 DNA 快速抽提试剂盒附带说明书实施操作。

### 2.2.3 扩增产物回收

参照康为世纪生物科技有限公司提供的 PCR 纯化试剂盒附带说明书。

## 2.2.4 大肠杆菌质粒提取

参照康为世纪生物科技有限公司提供的质粒小量抽提试剂盒附带说明书。

## 2.2.5 DNA 片段的酶切和连接

酶切体系配制方式见表 2-6。酶切条件：37°C 恒温水浴锅维持 3 h。

表 2-6 酶切验证体系

Table 2-6 Enzyme digestion system

试剂	10 $\mu\text{L}$ 反应体系
10 $\times$ Quic Cut Buffer	1 $\mu\text{L}$
限制性内切酶 1	0.5 $\mu\text{L}$
限制性内切酶 2	0.5 $\mu\text{L}$
质粒 (200 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )	4 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	4 $\mu\text{L}$

同源重组连接体系配制方式见表 2-7。

2-7 同源重组连接体系

Table 2-7 Homologous recombination system

试剂	10 $\mu\text{L}$ 反应体系
2 $\times$ MultiF Seamless Assembly Mix	5 $\mu\text{L}$
目的片段	3.5 $\mu\text{L}$
线性化载体	1.5 $\mu\text{L}$

连接条件：PCR 扩增仪设置条件为 50°C，30 min，随后 4°C 保存 5 min。

## 2.2.6 大肠杆菌感受态细胞的制备

(1) 将保菌管中的 *E. coli* JM109 菌株冰上解冻，随后于无菌环境下在固体 LB 培养基上划线，以活化菌株。

(2) 挑取单菌落接种至 10 mL LB 液体培养基培养 12 h，培养条件为：37°C、150  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

(3) 将经过上一步骤培养得到的菌体悬浮液，以 1% 的接种量转移到 50 mL 的 LB 液体培养基中，然后在 37°C 和 150  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  的条件下培养，当分光光度计测定 600 nm 处的吸光值达到 0.3-0.5 时，收集 50 mL 的菌液，接着将其冷却并放置在冰上冰浴 30 分钟，预先冷却好 50% 的甘油混合液和 0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{CaCl}_2$ 。

(4) 将上步骤中于 50 mL 离心管中预冷的菌体悬浮液以 4°C，4000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  条件，离心 5 分钟，去除上清液。

(5) 将菌体加入预先在冰上冷却的 0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$  中 4 mL，缓慢吸入和吹出，



使菌体重新悬浮，然后再次放在冰上 15 分钟，然后以 4℃、5000 r·min<sup>-1</sup> 离心 4 分钟，去除上清液，这个步骤需要重复 3 次。

(6) 使用 50%甘油和 0.1 mol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> 配制混合液，其中 50%甘油所占体积为总体积三分之一，0.1 mol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> 所占体积为总体积三分之二。加入提前于-20℃ 条件预冷的混合液 3 mL，缓慢吸入吹出，重新悬浮菌体，所得菌体悬浮液即为 *E. coli* JM109 感受态细胞。随后将制备好的 *E. coli* JM109 感受态细胞以每 1.5 mL 离心管装入 100 μL 菌体悬浮液的方式分装感受态细胞，最后存放于-80℃ 条件留待后续使用。

### 2.2.7 大肠杆菌转化

(1) 将 *E. coli* JM109 感受态置于冰上静置解冻，解冻过程避免晃动，降低解冻过程对细胞造成的损伤。

(2) 用移液枪将需转化的 DNA 片段加入已解冻的感受态细胞，缓慢吹吸以使其混合均匀，后至于冰上冰浴 20 min。

(3) 将添加了 DNA 的感受态菌体悬浮液置于温度设置为 42℃ 的恒温水浴锅中，放置 90 s，随即立刻取出转移到冰上，静止放置 2-3 min。

(4) 于无菌环境中向获得的菌体悬浮液中加入少量液体 LB 培养基并使用无菌的移液器混合均匀，紧闭离心管盖，然后将混合物置于温度设置为 37℃，转速设置为 150 r·min<sup>-1</sup> 的恒温摇床中培养 30 min。

(5) 将培养后的菌体悬浮液以 6000 r·min<sup>-1</sup>，室温温度下离心 2 min，弃去上层清液，离心后的菌体与离心管底剩余液体混合均匀后，转移至添加适量抗菌素的 LB 固体培养基，以 37℃ 条件培养约 10-14 h。

(6) 使用 PCR 仪对单菌落进行 PCR 验证，根据验证结果挑取正确的转化子并接种至含有 100 μg·mL<sup>-1</sup> 的氨苄青霉素的 10 mL LB 培养基中，培养 6-8 h，最后按照方法 2.2.4 提取质粒送公司进行测序以进一步验证。

### 2.2.8 目的片段转入酵母细胞

利用化学法将目的 DNA 转入 *S. cerevisiae* 和 *C. glycerinogenes*:

(1) 种子液制备。选择 YPD 平板上划线保存的酵母单菌落接种入 10 mL YPD 液体培养基中，培养条件为 30℃、200 r·min<sup>-1</sup>，然后按照体积比为 5% 的接种量将过夜培养后的菌体再转接入 10 mL YPD 液体培养基培养 4-6 h，恒温式摇床温度设置为 30℃，转速设置为 200 r·min<sup>-1</sup>。

(2) 洗涤菌体。取 1 mL 菌体悬浮液到灭了菌的 1.5 mL 离心管中，以 6000 r·min<sup>-1</sup> 条件离心 2 min，弃去上层清液，加入 1 mL 无菌双蒸水重新悬浮菌体以洗去残留的 YPD 培养基，此操作重复进行 3 次。

(3) 试剂预处理。将适量变性鱼精 DNA (ssDNA) 冰上放置至融化，随后沸水浴 10 min。

(4) 混合液制备。无菌环境下向步骤 (2) 获得的菌体悬浮液中按照以下顺序加入

目的DNA,  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  LiAc  $36 \mu\text{L}$ , ssDNA  $20 \mu\text{L}$ 和50% PEG  $240 \mu\text{L}$ , 目的DNA加入量控制在3-5 ng, 反复吸入吹出以使菌液混合均匀。

(5) 热激转入目的DNA。将步骤(4)所获取的混合液置于温度条件设置 $42^\circ\text{C}$ 的恒温水浴锅中, 放置1 h, 以使目的DNA进入酵母细胞。

(6) 后培养。将热激后的混合液室温条件下于 $6000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件离心2 min, 在无菌环境中倒掉上层清液, 随后加入1 mL YPD液体培养基, 轻缓地吹吸混匀, 盖紧离心管盖后置于 $30^\circ\text{C}$ 、 $200 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件恒温摇床中培养2 h完成后培养, 恢复酵母细胞因热激带来的细胞损伤并增加阳性转化子数量。

(7) 洗涤菌体及筛选平板涂布。离心机使用条件设置为 $6000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 2 min, 室温离心后培养获取的菌液, 将上层清液弃掉, 加入1 mL ddH<sub>2</sub>O并悬浮菌体以去除残留的YPD液体培养基, 反复重复三次清洗的操作。清洗后, 利用离心管底余下的液体, 混匀菌体后涂布MM固体培养基或尿嘧啶缺陷固体培养基,  $30^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养至生长出单菌落。

## 2.2.9 反义 RNA 技术抑制基因表达

参照杨飞<sup>[49]</sup>及王玉芹<sup>[50]</sup>的实验方法实施操作。

## 2.2.10 酵母 RNA 提取和反转录

对于需要处理的酵母细胞, 将其培养在不同胁迫条件下, 具体的处理方法参照杨飞的论文。

(1) 准备实验所需器具。环境中RNA酶大量存在使得RNA易于分解, 因此实验所需器具(研钵、研磨杵、药匙、移液器置换枪头、1.5 mL离心管和PCR管)均需提前进行去RNA酶处理。将所需实验器具置于稀释1000倍的RNA酶清除剂中浸泡15 min后, 放入提前喷洒了稀释100倍RNA酶清除剂的 $60^\circ\text{C}$ 烘箱中烘至水分完全蒸发, 烘干后用未开封的一次性手套和干净的报纸包裹好并于 $121^\circ\text{C}$ 灭菌15 min, 灭菌同时去除RNA酶清除剂毒性。

(2) 将稀释100倍的RNA清除剂喷洒实验所需使用的超净工作台, 并紫外灭菌30 min, 提前预冷高速冷冻离心机到 $4^\circ\text{C}$ 低温条件, 准备实验所需液氮。

(3) 将不同胁迫下生长的酵母细胞在转速设置为 $4000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下离心10 min收集菌体, 并使用液氮进行速冻。在研钵中倒入液氮, 预冷器具, 随后将快速冷冻后变为固体状态的菌体加入留存有一定量液氮的研钵中, 反复研磨以破损菌体, 直至菌体呈粉末状, 用预冷的药匙将破碎至粉末状的菌体转移至去RNA酶处理的1.5 mL离心管中, 加入1 mL TRIZON缓慢充分吹打以混合均匀, 使用漩涡混匀仪震荡15 s后, 室温静止放置3 min。

(4) 冷冻离心机条件设置为 $4^\circ\text{C}$ ,  $12000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、离心时长设置为10 min, 离心所获取的上层清液转移到新的1.5 mL离心管并加入200  $\mu\text{L}$ 三氯甲烷, 剧烈震荡15-20 s, 后室温静止放置3 min。

(5) 冷冻离心机条件设置为 4℃, 12000 r·min<sup>-1</sup> 离心时长设置为 10 min, 离心所获取的上层清液转移到新的 1.5 mL 离心管中, 加入一倍体积的三氯甲烷, 随后使用漩涡混匀仪剧烈震荡 15 s, 室温静止放置 2 min。

(6) 冷冻离心机条件设置为 4℃, 12000 r·min<sup>-1</sup> 离心时长设置为 10 min, 离心所获取的上层清液转移到新的 1.5 mL 离心管中, 随后加入 500 μL 异丙醇, 缓慢吹打混匀上述混合物, 室温静止放置 10 min, 等待 DNA 析出。

(7) 冷冻离心机条件设置为 4℃, 12000 r·min<sup>-1</sup> 离心时长设置为 10 min, 弃去上层清液, 获取少量 RNA 沉淀。

(8) 加入 1 mL 75% 乙醇轻柔颠倒洗涤 RNA 沉淀, 离心去除上层清液并室温放置于超净台中 30 min 至管内处于干燥状态, 残余乙醇完全挥发后可以避免影响后续实验结果, 最后用 50 μL 去 RNA 酶的 ddH<sub>2</sub>O 充分溶解所得 RNA 沉淀。

RNA 的纯化与逆转录方法参照南京诺唯赞公司 RT-PCR 试剂盒。据表 2-8 去除基因组 DNA 反应体系配制反应体系。

表 2-8 基因组 DNA 的去除体系

Table 2-8 The system of removing the genome DNA

试剂	反应体系 (16 μL)
gDNA wiper Mix	4 μL
模板 RNA	Total RNA: 1 pg-500 ng
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	to 16 μL

反应体系配置好并混合为均质后置于 PCR 仪中设置 42℃ 维持 2 min, 随后取出并放置于冰上。据表 2-9 反转录反应体系配制反应体系。

表 2-9 反转录体系

Table 2-9 The system of reverse transcription

试剂	20 μL 反应体系
去除基因组 DNA 反应液	16 μL
5·HiScript II qRT SuperMix II	2 μL

反应体系配置好并混合为均质后放置于 PCR 扩增仪中, 程序设置为 25℃ 条件维持 10 min; 随后在 50℃ 条件维持 30 min; 最后 85℃ 条件维持 5 min, 反转录完成获得 cDNA。

### 2.2.11 RT-qPCR 法分析转录水平

以利用方法 2.2.11 逆转录获得的 cDNA 为模板进行 RT-qPCR, 实验组为进行了高盐处理的样品, 对照组为 30℃ 无压力条件下培养所获得的样品, 实验前需对样本进行琼脂糖凝胶电泳验证以确保样品完整新, 内参基因选择 18S rDNA, 于冰上配置反应体系, 全过程操作均需在昏暗环境中进行以避免 AceQ Universal SYBR qPCR Master Mix 酶在

光亮的环境中分解。反应体系见表 2-10。

表 2-10 RT-qPCR 体系

Table 2-10 The system of RT-qPCR

试剂	10 $\mu$ L 反应体系
Ultra SYBR Mixture ( $\times 2$ )	5 $\mu$ L
上游引物	0.3 $\mu$ L
下游引物	0.3 $\mu$ L
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	4 $\mu$ L
模板	0.4 $\mu$ L

反应程序据 AceQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂附带的说明书进行设置。相对转录强度据公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  进行计算。本研究中计算所得到的相对转录水平（倍数）是由重组菌基因相对转录强度/对照菌基因相对转录强度的比值得到的。

### 2.2.12 细胞膜流动性测定

利用可装入荧光偏振片的荧光分光光度计对细胞膜的流动性进行检测：首先收集 10 mL 菌体，然后用磷酸盐缓冲溶液（PBS）洗涤，洗涤操作重复两次，使用 PBS 悬浮菌体同时根据菌体浓度计算并稀释至相同菌体浓度（600 nm 处吸光值为 1.0），加入疏水荧光染料 1,6-二苯基-1,3,5-己三烯(DPH)，在避光条件下于 30°C 恒温水浴锅中反应 30 min，最后离心收集菌体。荧光分光光度计仪器参数设置参照周云冬的实验条件<sup>[52]</sup>。根据以下公式计算荧光偏振值 ( $P$ )，分析细胞膜流动性。计算公式如下所示：

$$P = (I_{VV} - G \cdot I_{VH}) / (I_{VV} + G \cdot I_{VH}), \quad G = I_{HV} / I_{HH}$$

以式中  $I_{VH}$  为例， $I$  代表荧光强度值，右下角第一位为激发光设置，右下角第二位为发射光设置，其中  $V$  代表 90° 垂直偏振光， $H$  代表 0° 水平偏振光，同一样品需测定四种不同激发光和发射光条件下数值，计算所得  $G$  为光栅矫正因子。计算所得  $P$  值越大，流动性越小， $P$  值越小，流动性越大。

### 2.2.13 细胞膜通透性测定

参照周云冬和李翠丽的实验方法<sup>[52-53]</sup>，在空白及 0.75 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 条件下培养 14 h 后，4°C，6000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min 收集菌体，用 PBS 重复洗涤两次以去除离心管中残余的培养基避免影响实验结果，测定悬浮后菌体浓度，计算并使用 PBS 调节菌液至相同菌体浓度（OD<sub>600</sub> 为 1.0），加入终浓度为 1×10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup> 的 N-苯基-1-萘胺（NPN），再使用荧光分光光度计检测荧光强度并记录。荧光分光光度计激发光波长设置为 350 nm，发射光波长设置为 420 nm，缝隙宽度调整为 5 nm。

### 2.2.14 酵母单杂交

以产甘油假丝酵母基因组作为模板获取 *Cgrad9* 和 *Cgdbp7* 上游之前 1000 bp 作为启动子序列，构建含有启动子序列的质粒 pGBKT7-*P<sub>Cgrad9</sub>-His3* 和 pGBKT7-*P<sub>Cgdbp7</sub>-His3* 作

为诱饵载体，根据 JASPAR<sup>[54]</sup>预测结果获取可能的转录因子序列并将其连接至 pGADT7 质粒。将诱饵载体和含有转录因子的文库质粒共转入 *S cerevisiae* AH109，涂布于 SD-TL 平板获取阳性转化子。将转化子分别点板于 SD-TLH 和含有不同浓度 3-AT 的 SD-TLH+3-AT 平板，筛选 P<sub>Cgrad9</sub> 和 P<sub>Cgdbp7</sub> 转录因子。

### 2.2.15 重组菌发酵实验

高盐发酵：重组 *S. cerevisiae* 和重组 *C. glycerinogenes* 分别将酵母菌接种到 10 mL 尿嘧啶缺陷培养基和 MM 液体培养基中，进行 24 小时的培养，温度为 30°C，转速为 200 r·min<sup>-1</sup>。然后按照 5% 的接种量转移到新的 10 mL 液体培养基中，再进行 14 小时的培养，直到菌体生长至对数生长期后，用其作为种子液。根据 600 nm 处的吸光值来判断酵母菌的生长状态。接种到新鲜的含有 0.75 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 的 50 mL 尿嘧啶缺陷培养基或 1 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 的 50 mL 发酵培养基中培养，30°C 条件下培养，转速设置为 100 r·min<sup>-1</sup>，定时取样分析。

未脱毒纤维素水解液发酵：将重组 *S. cerevisiae* 和重组 *C. glycerinogenes* 分别接种于 10 mL 尿嘧啶缺陷培养基和 MM 液体培养基中培养 24 h，培养条件为：30°C、200 r·min<sup>-1</sup>，以 5% 接种量转接至新的 10 mL 液体培养基中培养 14 h 后作为种子液。调整初始 OD<sub>600</sub> 为 0.2，接种至最终糖浓度为 60 g·L<sup>-1</sup> 的未脱毒纤维素水解液培养基中培养，于 30°C 条件下培养，转速设置为 100 r·min<sup>-1</sup>，定时取样分析。

### 2.2.16 产物测定方法

本实验中生物量使用分光光度计测定波长为 600 nm 时吸光值，使用 OD<sub>600</sub> 代为表示，并根据所得数据绘制生长曲线。使用高效液相色谱（HPLC）法检测发酵液中含有的葡萄糖浓度、甘油及乙醇产量。发酵液需要经过 10000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min 获取上清液以摒除菌体等大体积物质对仪器的影响，采用孔径大小为 0.22 μm 的水系微孔滤膜，过滤处理所得上层清液（约 500 μL），并随后开始进行测试。流动相为 5 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液，流速设定为 0.6 mL·min<sup>-1</sup>，色谱柱为 Aminex HPX-87H（300 mm × 7.8 mm，9 μm），进样体积设置为 20 μL，柱温 60°C，检测器为示差检测器（Shodex RI-101，Dionxe）。

### 2.2.17 酵母菌株耐受性比较

本实验中生物量使用分光光度计测定波长为 600 nm 时吸光值，使用 OD<sub>600</sub> 代为表示。点板生长培养：将重组 *S. cerevisiae* 和重组 *C. glycerinogenes* 分别加入到 10 mL 的尿嘧啶缺陷培养基和 MM 液体培养基中，在 30°C 的条件下以每分钟 200 转的速度进行摇瓶培养 24 小时，然后按照 5% 的接种量转移到新的培养基中，在 30°C 下以每分钟 200 转的条件下摇瓶培养 14 小时，直到酵母菌处于对数生长期，然后使用高速离心（6000 r·min<sup>-1</sup>）收集细菌，最后用生理盐水进行三次反复洗涤。将菌液 OD<sub>600</sub> 值调整至 1 后，进行梯度稀释，每一梯度为 10 倍关系，稀释至最小菌液浓度为 10<sup>-4</sup>。维持菌液均匀状态，利用无菌设备取 1.5 或 2 μL，点板至加有不同抗性压力的尿嘧啶缺陷固体培养基或 MM 固体培养基，根据实验需求放置于不同培养环境中，倒置生长，拍照记录。

液体生长培养：重组菌接种至新鲜的 10 mL MM 培养基或尿嘧啶缺陷培养基中培养分别获得 *C. glycerinogenes* 与 *S. cerevisiae* CEN 种子液，以 2% 接种量转接至新的 10 mL MM 培养基或尿嘧啶缺陷液体培养基中培养 14 h 至对数生长期，转接于 50 mL MM 培养基或尿嘧啶缺陷培养基，计算并控制培养基中加入种子液后培养基初始 OD<sub>600</sub> 值为 0.1，至于培养条件为 30°C，200 r·min<sup>-1</sup> 条件下开始培养，摇瓶培养（胁迫摇瓶生长添加相应浓度的胁迫条件），这一时间段内定时于无菌环境下取一次发酵液，并使用分光光度计测定波长 600 nm 处吸收光值，并据所得 OD<sub>600</sub> 数值绘制生长曲线。

胁迫条件<sup>[50]</sup>中 *C. glycerinogenes* 的胁迫条件为 1 mol·L<sup>-1</sup> NaCl、44°C 高温、120 mmol·L<sup>-1</sup> 乙酸、10 mmol·L<sup>-1</sup> 过氧化氢、3 g·L<sup>-1</sup> 糠醛、500 g·L<sup>-1</sup> 葡萄糖和 400 g·L<sup>-1</sup> 山梨醇；*S. cerevisiae* 中胁迫条件为高温 0.75 mol·L<sup>-1</sup>、37°C、350 g·L<sup>-1</sup> 葡萄糖、90 mmol·L<sup>-1</sup> 乙酸和 2 g·L<sup>-1</sup> 糠醛。

### 2.2.18 未脱毒纤维素水解液制备

未脱毒纤维素水解液制备方法参照赵美琳<sup>[55]</sup>的实验方法进行制备。

## 第三章 结果与讨论

### 3.1 产甘油假丝酵母抗逆基因的筛选

#### 3.1.1 产甘油假丝酵母潜在抗逆基因的克隆

课题组前期研究发现，产甘油假丝酵母具有高盐、高糖、高温和耐乙酸等多重抗逆性能，转录组研究发现，RNA 解旋酶等基因在环境压力下的上调，与模式菌株酿酒酵母相反<sup>[49]</sup>。基于以上结果，选择部分转录上调基因，分别为 RNA 解旋酶基因 *dbp3*、*dbp7*、*ded1*、*irc5*，羟基苯基丙酮酸双加氧酶基因 *hppd*、DNA 损伤检查点蛋白基因 *rad9* 和腺苷酸激酶基因 *adk1* 作为研究对象。以产甘油假丝酵母基因组为模板通过 PCR 获得以上基因，PCR 产物如图 3-1 所示，琼脂糖凝胶电泳结果显示目的基因大小与理论值一致，测序结果与目的基因核酸序列一致。

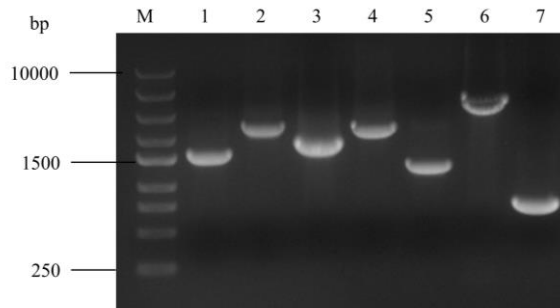


图 3-1 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物

Fig. 3-1 Analysis of PCR products by agarose gel electrophoresis

M: DL10000 DNA marker; 1: PCR product of *Cgdbp3*; 2: PCR product of *Cgdbp7*; 3: PCR product of *Cgded1*; 4: PCR product of *Cgirc5*; 5: PCR product of *Cghppd*; 6: PCR product of *Cgrad9*; 7: PCR product of *Cgadk1*

#### 3.1.2 潜在抗逆基因对 *S. cerevisiae* 胁迫耐受性的影响

为考察上述基因对宿主菌抗逆性能的影响，将克隆获得的基因 *Cgdbp3*、*Cgdbp7*、*Cgded1*、*Cgirc5*、*Cghppd*、*Cgrad9*、*Cgadk1* 连接到质粒 pYX212 中，参照方法 2.2.7 将质粒转化到 *S. cerevisiae* CEN 中构建过表达菌株，琼脂糖凝胶电泳结果表明过表达菌株构建成功（图 3-2）。质粒 pYX212 转入 *S. cerevisiae* CEN 作对照菌。

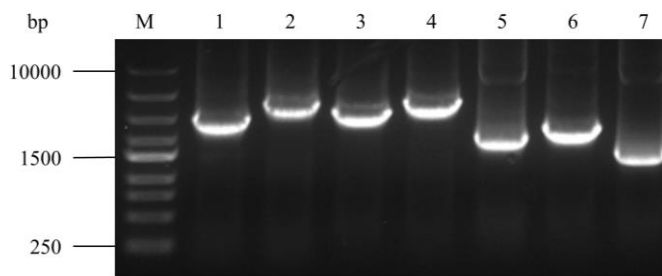
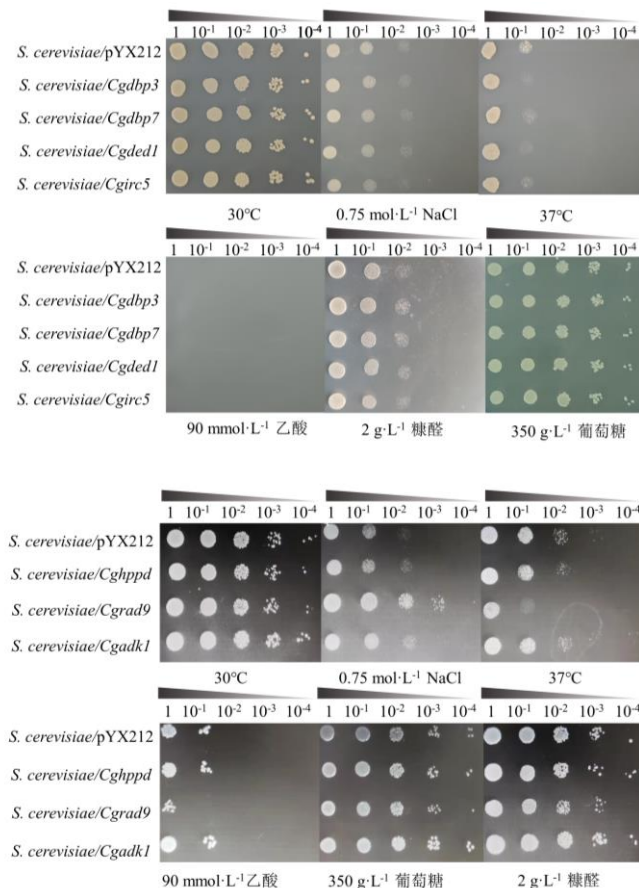


图 3-2 琼脂糖凝胶电泳分析过表达重组菌构建

Fig. 3-2 Agarose gel electrophoresis analysis of recombinant *S. cerevisiae*

M: DL10000 DNA marker; 1: *S. cerevisiae/Cgdbp3*; 2: *S. cerevisiae/Cgdbp7*; 3: *S. cerevisiae/Cgded1*; 4: *S. cerevisiae/Cgirc5*; 5: *S. cerevisiae/Cghppd*; 6: *S. cerevisiae/Cgrad9*; 7: *S. cerevisiae/Cgadk1*

考察重组菌盐胁迫下生长情况，同时考虑高糖、高温等压力条件与高盐压力响应机制存在交叉，将过表达菌株同时点板于高糖、高温、乙酸和糠醛条件培养。点板结果如图 3-3 所示，*S. cerevisiae/Cgrad9* 在  $0.75 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 压力下表现出显著生长优势，而  $37^\circ\text{C}$ 、 $90 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酸和  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  糠醛压力下则表现出显著的生长抑制，对照条件、 $350 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  葡萄糖压力下，重组菌与对照菌生长无明显区别。重组菌 *S. cerevisiae/Cghppd*、*S. cerevisiae/Cgadk1*、*S. cerevisiae/Cgdbp3*、*S. cerevisiae/Cgdbp7*、*S. cerevisiae/Cgded1*、*S. cerevisiae/Cgirc5* 生长较对照未表现出明显区别。

图 3-3 重组 *S. cerevisiae* 不同环境胁迫下点板试验Fig. 3-3 Stress tolerance of the recombinant *S. cerevisiae* on agar plate



据点板结果, 进一步分析 *S. cerevisiae/Cgrad9* 高盐压力下摇瓶培养生长情况。摇瓶培养不同于点板培养, 能够提供更好的溶氧条件, 菌株具有更好的生长条件, 同时摇瓶培养相较于点板培养能够更好地观察到菌株生长差异。摇瓶培养结果如图 3-4 所示, 不同于点板结果, 对照条件下重组菌生长受到抑制, 相较于对照菌生物量下降 8.1%。*Cgrad9* 过表达后可能导致 Rad53 过度磷酸化, 使得细胞 S 期停滞过程增长, 影响菌株无压力条件下生长<sup>[56]</sup>, *S. cerevisiae/Cgrad9* 因此表现为生物量降低。而平板培养下未观察到生长差异, 则可能是因为生长条件变化影响 *Cgrad9* 对于 *S. cerevisiae* 的作用。

高盐下, 过表达菌株生物量提高 22.8%, 与点板结果一致。不同于其他环境压力对细胞的 DNA 损伤, 盐胁迫致使细胞发生的 DNA 损伤会在细胞内持续存在<sup>[57]</sup>, 而 Rad9 参与 DNA 损伤修复<sup>[58]</sup>, 使得过表达菌株中高盐引起的 DNA 损伤减弱以响应高盐环境, 这可能是过表达 *Cgrad9* 后 *S. cerevisiae* 耐盐性提高的原因。以上结果表明, *Cgrad9* 能够显著提高 *S. cerevisiae* 耐盐性, 降低其在平板培养下对高温、乙酸和糠醛的耐受性。

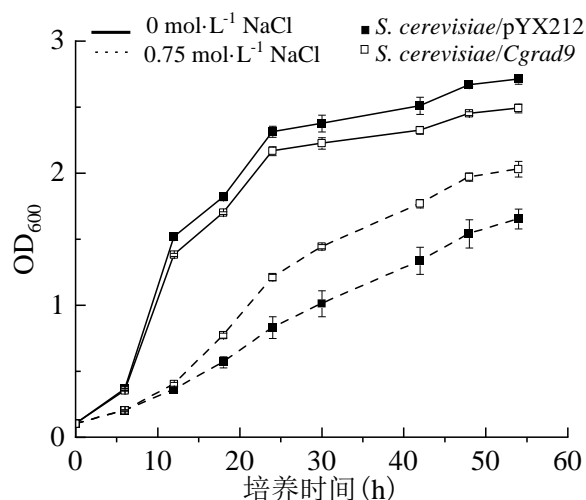
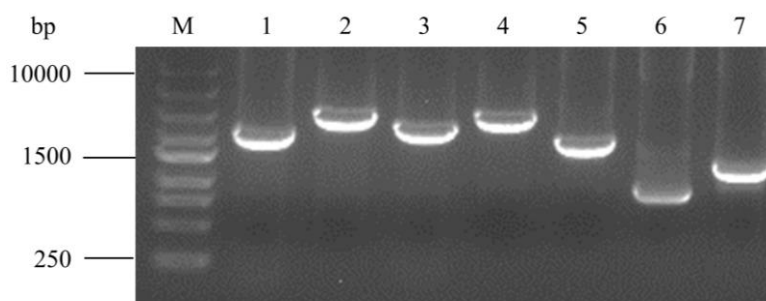


图 3-4 重组 *S. cerevisiae* 盐胁迫下摇瓶培养

Fig. 3-4 Shake culture of recombinant *S. cerevisiae* under salt stress

### 3.1.3 潜在抗逆基因对 *C. glycerinogenes* 胁迫耐受性的影响

课题组前期研究发现, *C. glycerinogenes* 与酿酒酵母的环境压力耐受机制具有明显差异<sup>[49]</sup>。因此, 上述基因可能对不同宿主菌表型的影响具有差异。为探究所选基因对 *C. glycerinogenes* 抗逆性的影响, 利用反义抑制技术在 *C. glycerinogenes* 中抑制基因表达。以基因全长构建反义序列并通过同源重组连接至 pURGAP, 载体酶切线性化后转入 *C. glycerinogenes/ΔUra5* 中表达, 琼脂糖凝胶电泳结果表明重组菌构建成功。pURGAP 同样线性化后转入 *C. glycerinogenes/ΔUra5* 作为对照菌。

图 3-5 琼脂糖凝胶电泳分析重组 *C. glycerinogenes* 构建Fig. 3-5 Agarose gel electrophoresis analysis of recombinant *C. glycerinogenes*

M: DL10000 DNA marker; 1: *C. glycerinogenes/antiCgdbp3*; 2: *C. glycerinogenes/antiCgdbp7*; 3: *C. glycerinogenes/antiCgded1*; 4: *C. glycerinogenes/antiCgirc5*; 5: *C. glycerinogenes/antiCghppd*; 6: *C. glycerinogenes/antiCgrad9*; 7: *C. glycerinogenes/antiCgadk1*

因 *C. glycerinogenes* 与 *S. cerevisiae* 对不同压力耐受性存在很大差异, *C. glycerinogenes* 对多种环境压力的耐受性要优于 *S. cerevisiae*, 因而反义抑制重组菌点板胁迫条件参照课题组前期研究结果<sup>[50]</sup>。考察反义抑制重组菌盐胁迫下生长情况, 确定盐浓度为  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl。同时, 考虑高温、高糖等胁迫条件与盐胁迫压力响应机制存在交叉, 考察  $44^\circ\text{C}$ 、 $120 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酸、 $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  糠醛、 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  过氧化氢、 $400 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  山梨醇、 $500 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  葡萄糖下生长情况。

平板培养结果如图 3-6 所示, *C. glycerinogenes/antiCgdbp3* 在乙酸压力下生长略优于对照菌, 无压力条件下生长与对照菌相似, 高温、糠醛、过氧化氢、山梨醇、葡萄糖和高盐压力条件下生长情况较对照略弱。*C. glycerinogenes/antiCgdbp7* 具有优秀的高渗耐受性, 在高浓度山梨醇压力下生长良好, 具有明显生长优势, 同时在乙酸胁迫下也表现出良好的生长, 无压力、高温、糠醛和葡萄糖压力下与对照菌生长相似, 而高盐和过氧化氢压力下生长弱于对照菌。*C. glycerinogenes/antiCgded1* 和 *C. glycerinogenes/antiCgirc5* 生长情况相似, 无压力条件、高温、葡萄糖下生长与对照一致, 乙酸、糠醛、过氧化氢、山梨醇和高盐下生长受到不同程度的抑制, 其中乙酸和过氧化氢压力下抑制最为明显。*C. glycerinogenes/antiCghppd* 除高盐下生长略弱于对照外, 其他压力下生长情况与对照一致。而 *C. glycerinogenes/antiCgrad9* 和 *C. glycerinogenes/antiCgadk1* 生长情况类似, 各胁迫条件下生长情况与对照相比均无显著区别。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/778064075024006042>