

研究报告

ADH7 启动子精细调控表达 *MSN2* 酿酒酵母菌株对糠醛耐受的研究

赵鲜仙 周场 张思伟 王琳璐 路亚婷 马孟根*

(四川农业大学 资源环境学院 生态环境研究所 四川 温江 611130)

摘要:【目的】构建自我精细调控表达应激转录调控基因 *MSN2* 的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)基因工程菌株,提高其对糠醛的耐受能力。【方法】以酿酒酵母 BY4742 基因组 DNA 为模板,采用 PCR 技术扩增获得 *ADH7* 启动子、*CYC1* 终止子以及 *MSN2* 编码框序列,以 pUG6 质粒为载体构建含 *ADH7p-MSN2-CYC1t* 表达盒的重组表达质粒 pUG6-AM。通过醋酸锂法,将线性化后的质粒 pUG6-AM 转入酿酒酵母 BY4742,筛选阳性转化子,初步分析其对糠醛的耐受能力,采用荧光定量 PCR 技术检测 *MSN2* 基因及其调控代表基因的转录变化。【结果】构建了在 *ADH7* 启动子控制下表达 *MSN2* 的酿酒酵母基因工程菌株 AM01,该菌株对糠醛耐受能力明显增强,*MSN2* 基因的转录得到了自我精细调控,并提高了其调控基因的转录水平。【结论】以糠醛诱导表达基因的启动子精细调控应激转录调控基因 *MSN2* 的转录表达,既可提高酿酒酵母工程菌株对糠醛的耐受能力,又能避免其持续高效表达带来的副作用。

关键词: 酿酒酵母,精细调控表达,糠醛,耐受,木质纤维素,燃料乙醇

Study on furfural tolerance of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain with fine-tune expression of *MSN2* under *ADH7* promoter control

ZHAO Xian-Xian ZHOU Chang ZHANG Si-Wei WANG Lin-Lu
LU Ya-Ting MA Meng-Gen*

(Institute of Ecological and Environmental Sciences, College of Resource and Environmental Sciences,
Sichuan Agricultural University, Wenjiang, Sichuan 611130, China)

Abstract: [Objective] The aim of this study is to improve furfural tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* by constructing its recombinant strain with fine-tune expression of *MSN2* under a self-regulated promoter control. [Methods] The *ADH7* promoter, coding region of *MSN2*, and *CYC1* terminator sequences from genomic DNA of the *S. cerevisiae* strain BY4742 were obtained by PCR amplification, and then were ligated into the pUG6 plasmid resulting in a recombinant plasmid

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31570086); 四川省科技厅项目(No. 2014HH0013); 四川农业大学人才引进项目(No. 01426100)

*通讯作者: ✉: mgen@sicau.edu.cn

收稿日期: 2014-12-27; 接受日期: 2015-03-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-24

pUG6-AM containing the *ADH7p-MSN2-CYC1t* cassette. The recombinant plasmid was transformed into the *S. cerevisiae* BY4742 strain by the LiAc/SS-DNA/PEG transformation method after linearization, and then positive transformants were screened. Tolerability of a selected recombinant yeast strain to furfural was compared to its control, and transcription responses of *MSN2* and its representative regulons between this recombinant strain and its control under both furfural stress and normal conditions were further comparatively studied. **[Results]** A recombinant *S. cerevisiae* strain (named as AM01) with fine-tune expression of *MSN2* under the *ADH7* promoter control was successfully constructed. This recombinant strain showed significantly improved tolerance to furfural, and *MSN2* displayed fine-tune transcription response to furfural stress and then positively affected transcription responses of its regulons. **[Conclusion]** Fine-tune expression of *MSN2* controlled by a self-regulated promoter from a gene induced by furfural not only improved furfural tolerance of the genetically engineered *S. cerevisiae* strain, but also avoided side-effects due to its constitutive overexpression under the strong promoter control.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Fine-tune expression, Furfural, Tolerance, Lignocellulose, Bioethanol

燃料乙醇被公认是最具发展前景的一种可再生清洁能源, 深受世界各国青睐, 将成为化石能源石油的重要代替能源^[1-2]。木质纤维素是生产燃料乙醇的一种最为丰富而廉价的原料, 但它不能直接被微生物发酵生成乙醇, 必须采用弱酸等方式进行预处理^[3]。然而, 在木质纤维素降解成糖的过程中会伴随产生大量的副产物, 其中的许多副产物会抑制发酵微生物(如酿酒酵母)的生长和乙醇发酵, 被称作抑制因子^[4]。在众多的抑制因子中, 糠醛是最为重要的一种醛类抑制因子^[5]。

目前, 国内外学者对酿酒酵母对糠醛的脱毒及耐受机理进行了大量研究, 发现了众多与糠醛脱毒相关的醛还原酶基因^[6]、辅酶再生成基因^[7], 以及与耐受相关的转录调控基因和功能基因^[8]。*MSN2*是酿酒酵母中一种通用应激转录调控基因, 调控大约 200 个与应激耐受相关基因的表达, 如热休克蛋白基因、氧化应激基因、渗透调节基因等^[9-10]。过量表达或删除 *MSN2* 可显著增强或削弱酿酒酵母菌对热应激、乙醇、氧化应激等的耐受能力^[11-13]。Sasano 等^[14]研究发现采用持续表达的强启动子 *ADH1p* 提高 *MSN2* 的表达水平, 可提高酿酒酵母菌对糠醛的耐受能力。然而, *MSN2* 的持续过量表达不但会影响细胞在正常条件下的生长, 而且还会影响应激状态下的耐受表现。采用自我调控的启动子

(如 *SPI1p*)以及适量提高表达水平的方法, 可起到更为明显的效果^[15]。但是, *SPI1* 启动子在正常生长状态下仍会启动较高水平的转录^[8]。研究发现, *ADH7* 是一个重要的糠醛还原酶基因^[16]。在 5-羟甲基糠醛应激条件下, 该基因在遗传进化耐受酿酒酵母菌株中的表达水平显著高于出发菌株^[17]。该基因为正常生长非必需基因, 在正常条件下转录水平极低, 而在有糠醛等抑制因子存在时转录水平可提高上百倍, 使得其转录水平高于 *MSN2*, 但低于 *ADH1p*、*PGK1p*、*TDH1p* 等常用的强启动子^[7-8]。进一步分析发现, *ADH7* 启动子序列区域存在 *MSN2*、*YAP1*、*HSF1* 等转录调控因子的作用位点(图 1)。因此, *ADH7p* 是一个十分理想的转录表达 *MSN2*、*YAP1*、*HSF1* 等的自我调控启动子。

本研究选用酿酒酵母 *ADH7p* 作为启动子, 采

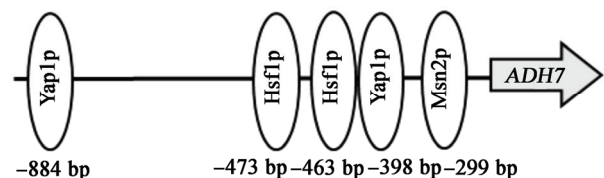


图 1 *ADH7* 启动子上重要转录调控因子的作用位点示意图

Figure 1 Sketch map of transcription-factor binding sites in the promoter region of *ADH7*

用基因克隆、DNA 同源重组等技术, 试图对通用转录调控基因 *MSN2* 进行自我精细调控表达, 并相应地影响其所调控的下游基因的表达。通过构建工程菌株增强对糠醛的耐受能力, 避免 *MSN2* 持续过量表达带来的副作用, 为后续木质纤维素燃料乙醇的工业化生产奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 酿酒酵母单倍体实验室常用菌株 BY4742, 购自美国 Open Biosystems 公司; 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α , 购自 TaKaRa 公司; 克隆载体 pUG6, 购自德国 EUROSCARF 保藏中心。

1.1.2 主要试剂: PCR Mix、T4 DNA Ligase 和限制性内切酶, 购自 TaKaRa 公司; E.Z.N.A.TM Yeast DNA Kit、E.Z.N.A.TM Plasmid Mini Kit、E.Z.N.A.TM Gel Extraction Kit 和 E.Z.N.A.TM PCR Kit, 购自 Omega 公司; 氨苄青霉素(Ampicillin)、卡那霉素(G418)以及 PCR 引物, 购自上海生工生物有限公司; RNA 纯化试剂盒、FastQuant RT Kit、SuperReal PreMix Plus, 购自天根生化科技(北京)有限公司; 荧光定量外参 RNA mix 由美国农业部农业应用研究中心 Liu Z.L. 研究员惠赠; 糠醛, 购自成都贝斯特公司; 其他所用试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基: 常规培养基 LB 参照 Anderson^[18] 配制; YEPD 培养基(g/L)^[12]: 国产蛋白胨 20, 酵母浸出粉 10, 葡萄糖 20, pH 6.0; 固体培养基每升加入琼脂 18 g。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取及纯化: 采用 E.Z.N.A.TM Yeast DNA Kit 提取酿酒酵母 BY4742 全基因组 DNA; 用 E.Z.N.A.TM Plasmid Mini Kit 从 *E. coli* DH5 α 中提取质粒 DNA; 用 E.Z.N.A.TM Gel Extraction Kit 从电泳凝胶中回收目的 DNA 片段; 用 E.Z.N.A.TM PCR Kit 纯化 PCR 及酶切目的 DNA 片段。所有操作均按试剂盒操作说明书进行。

1.2.2 PCR 扩增: 采用 DNASTar 5.0 软件设计 *ADH7*

启动子、*MSN2* 基因及 *CYC1* 终止子扩增引物。引物序列及相关信息见表 1。

以酿酒酵母 BY4742 基因组 DNA 为模板, 用引物对 ADH7p_F 和 ADH7p_R 扩增 *ADH7* 启动子; 用引物对 CYC1t_F 和 CYC1t_R 扩增 *CYC1* 终止子; 用引物对 MSN2_F 和 MSN2_R 扩增 *MSN2* 基因编码序列。PCR 反应体系为: 2 \times PCR mixture 25 μ L, BY4742 基因组 DNA (10 mg/L) 1.0 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μ L, 引物 F (10 μ mol/L) 1.5 μ L, 引物 R (10 μ mol/L) 1.5 μ L, ddH₂O 17 μ L, 反应总体积为 50.0 μ L。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增后的产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收纯化目的片段。

融合 PCR 扩增: 将 *ADH7* 启动子和 *CYC1* 终止子 PCR 扩增产物经胶回收后按等比例混合作为模板 DNA, 以 ADH7p_F 和 CYC1t_R 为引物进行融合 PCR 扩增 ADH7p-CYC1t 片段。PCR 扩增反应程序同上。扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收纯化融合目的片段。

1.2.3 重组酵母表达质粒 pUG6-AM 的构建: 将 pUG6 质粒和 ADH7p-CYC1t 融合片段经 *EcoRV* 和 *Hpa I* 双酶切电泳纯化后, 用 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。转化细胞涂布于含氨苄青霉素(100 mg/L)的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养 18 h, 挑选转化子, 提取质粒, 进行酶切及 PCR 验证。阳性质粒命名为 pUG6-ADH7p。鉴定后的阳性转化子-80 $^{\circ}$ C 甘油冻存备用。

将 *MSN2* 扩增纯化后的 DNA 产物经 *Spe I* 和 *Sac II* 双酶切电泳纯化后, 与经同样处理的 pUG6-ADH7p 质粒混合, 采用 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。转化细胞涂布于含氨苄青霉素(100 mg/L)的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养 18 h, 挑选转化子, 提取质粒, 进行酶切及 PCR 验证。阳性质粒即为重组酵母表达

表 1 PCR 扩增引物
Table 1 Primers used for PCR

引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')	T_m 值 T_m values (°C)	长度 Lengths (bp)	酶切位点 Enzyme sites
ADH7p_F	GCGCGATATCACATTATTAGGTGCATCAACAACGGAA	57.00	800	<i>EcoRV</i>
ADH7p_R	GTGACATAACTAATTACATCCGCGGGACTTTCTGGGTAAA GCATACTAGTTTTGTATT	64.90		<i>Sac II</i> <i>Spe I</i>
CYC1t_F	GTCCCGCGGATGTAATTAGTTATGTCACGCTT	75.70	303	<i>Sac II</i>
CYC1t_R	GGAAGCGTTAACGAGAGCGACGATGAGAGT	70.70		<i>Hpa I</i>
MSN2_F	GCGCACTAGTATGACGGTCGACCATGATTTCAA	57.90	2 135	<i>Spe I</i>
MSN2_R	GCGCCCGCGGTAAATGTCTCCATGTTTTTATGAGTC	53.90		<i>Sac II</i>
qMSN2_F	GATGAAGACCCCAAGAACGA	60.05	119	
qMSN2_R	GTAGTCGCCACTTTCGCAAT	60.28		
qCTT1_F	GCCAAAGGTGGTGGTTGTAG	60.41	122	
qCTT1_R	ACGGTGGAAAAACGAACAAG	60.01		
qHSP26_F	ATGCTGGCGCTCTTTATGAT	59.84	115	
qHSP26_R	TCAACTGGAAGTGCACACT	59.47		
qHSP104_F	AAGGACGACGCTGCTAACAT	59.90	121	
qHSP104_R	TTCTTTCAAAGGCACCATCC	60.05		
qTPS1_F	TGTCTTCCGTGCAAAGAGTG	60.02	124	
qTPS1_R	AACCCATCGGTGAACCTTGTC	59.83		
qTSL1_F	ATTGGCGTAACGATGTAGCC	59.99	121	
qTSL1_R	CGATCTTGATCTTCCGCATT	60.18		
qTPS2_F	CAGCAGTCTACTGCCAACA	60.05	118	
qTPS2_R	CTGGACGGGAGAAAAATTCA	60.04		

质粒 pUG6-AM。鉴定后的阳性转化子-80 °C 甘油冻存备用。

1.2.4 重组质粒转化酿酒酵母菌：用 *Kpn I* 内切酶线性化酶切处理重组质粒 pUG6-AM，采用醋酸锂法^[19]转化酿酒酵母 BY4742 感受态细胞。在含 G418 (200 mg/L) 的 YEPD 固体培养基上 28 °C 培养 3-5 d，挑选转化子，划线纯化培养，并提取重组菌的基因组 DNA，采用引物对 ADH7_F 和 MSN2_R 进行 ADH7p-MSN2 表达盒的 PCR 鉴定。重组酿酒酵母基因工程菌命名为 AM01。

1.2.5 正常生长表现及对糠醛的应答分析：实验参

照 Li 等^[20]报道的方法进行。首先，挑取酿酒酵母重组菌株 AM01 和原始菌株 BY4742 的单菌落，接种到 YEPD 液体培养基，于 28 °C、200 r/min 振荡预培养过夜。使用分光光度计测定菌液 OD_{600} 值，取适量菌液调整 OD_{600} 值到 1.0，以 10% 接种量接种到 50 mL 新鲜 YEPD 液体培养基以及含有 10、20、30 mmol/L 糠醛的 YEPD 液体培养基，28 °C、200 r/min 培养，间隔取样测定样品 OD_{600} 值，绘制生长曲线趋势图，分析在正常生长条件及添加糠醛抑制条件下的生长情况。试验设 3 个重复。同时，在接种 2 h 后，室温下 3 000 r/min 离心 5 min 收集

细胞,用于基因表达 qRT-PCR 分析。

1.2.6 基因表达 qRT-PCR 分析: 基因表达 qRT-PCR 参照 Liu 等^[21-22]报道的方法进行。采用酸性酚(pH 4.5)、氯仿抽提方法从酵母菌中分离总 RNA,经 RNA 纯化试剂盒纯化后,以 FastQuant RT Kit 进行反转录,同时加入外参 RNA mix 作为参照。荧光定量 PCR 采用 SuperReal Premix Plus 试剂盒按说明书进行。qRT-PCR 扩增引物采用引物设计软件 Primer 3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)设计,引物序列及相关信息见表 1。数据处理及分析参照 Liu 等^[22]的报道进行。

2 结果与分析

2.1 目的片段的获得

以酿酒酵母 BY4742 基因组 DNA 为模板,采用 PCR 方法成功扩增获得了 *MSN2* 的编码序列,产物的电泳结果见图 2A。结果显示目的条带略大于 2 000 bp,与预期大小一致。从 BY4742 基因组中成功地扩增出了 *ADH7* 启动子(800 bp)和 *CYC1t* 终止子(303 bp),将获得的 *ADH7p* 和 *CYC1t* 胶回收产物按等比例(1:1)混合作为模板 DNA 进行融合 PCR 扩增,获得了 *ADH7p-CYC1t* 融合 DNA 片段,产物电泳结果见图 2B。结果显示融合片段大小在 1 100 bp 左右,与预期大小一致。

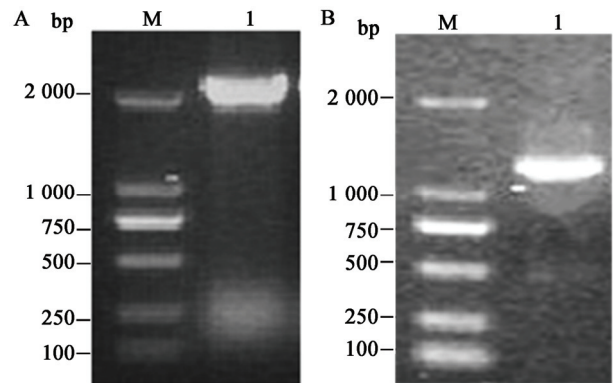


图 2 目的片段的 PCR 扩增电泳图

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of target PCR products

注: M: DNA marker DL2000. A: *MSN2* 基因的扩增电泳图; 1: *MSN2* 基因的扩增片段. B: *ADH7p-CYC1t* 的融合 PCR 扩增电泳图; 1: *ADH7p-CYC1t* 基因融合片段.

Note: M: DNA marker DL2000. A: Agarose gel electrophoresis of *MSN2* by PCR amplification; 1: PCR product of *MSN2* fragment. B: Agarose gel electrophoresis of fused *ADH7p-CYC1t* DNA fragment by PCR; 1: PCR product of *ADH7p-CYC1t* fragment.

2.2 重组表达质粒的构建

重组酵母表达质粒 pUG6-AM 构建过程如图 3 所示。构建得到的酿酒酵母重组表达质粒,经限制性内切酶 *Spe I* 和 *Sac II* 双酶切消化,产生 2 个片段(图 4),分别是约 2.1 kb 的 *MSN2* 基因片段和 5.0 kb 的 pUG6-*ADH7p* 质粒片段,与预期的大小一致,表明成功构建了 pUG6-AM 重组表达质粒。

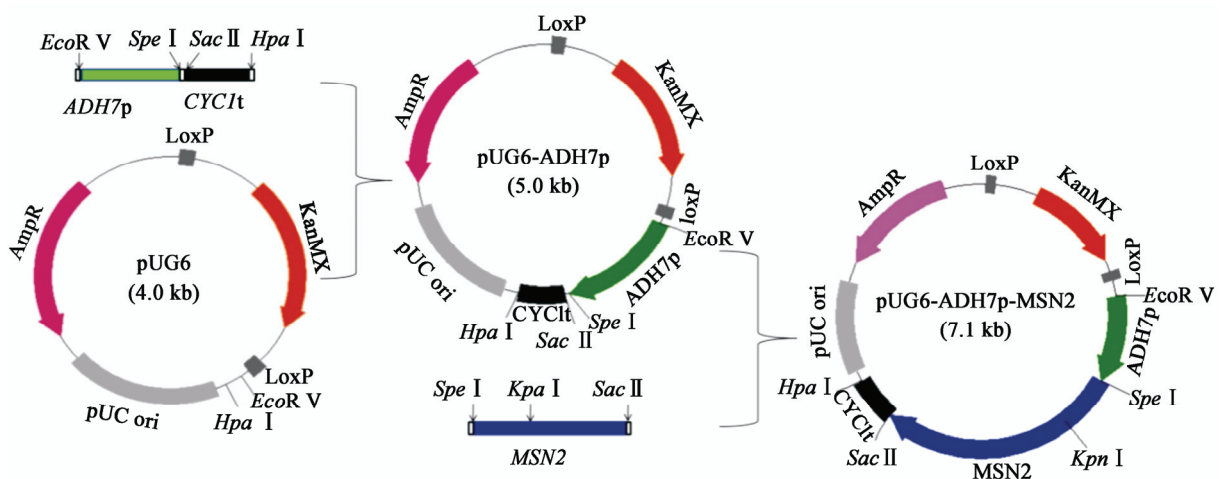


图 3 重组质粒 pUG6-AM 的构建示意图

Figure 3 Construction illustration of recombinant plasmid pUG6-AM

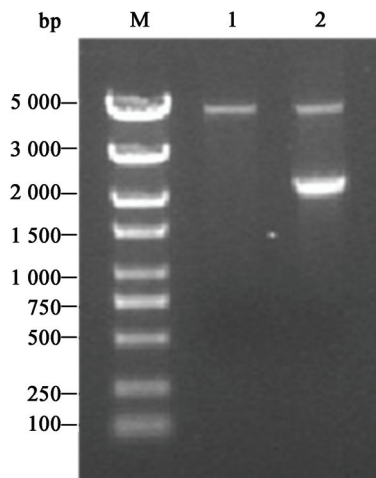


图4 pUG6-AM 的双酶切验证分析

Figure 4 Restriction analysis of plasmid pUG6-AM

Note: M: DNA marker DL5000; 1: Plasmid pUG6-ADH7p (*Sac* II); 2: pUG6-AM (*Spe* I + *Sac* II).

2.3 酿酒酵母重组菌株的构建

线性化后的重组酵母表达质粒 pUG6-AM, 经醋酸锂法转化酿酒酵母 BY4742 后, 在 G418 抗性平板上筛选到了阳性转化子。表达质粒 pUG6-AM 不含酿酒酵母复制起始序列, 因此该质粒不能在酿酒酵母中复制, 而只有成功整合到染色体上后才能表现出 G418 抗性。阳性菌株的 PCR 鉴定结果表明

ADH7p-MSN2-CYC1t 表达盒插入到了染色体中, 成功获得了重组酿酒酵母基因工程菌株 AM01。表达质粒与酿酒酵母染色体 DNA 重组模式图见图 5。

2.4 正常生长表现及对糠醛的应答分析

酿酒酵母重组菌株 AM01 及对照菌株 BY4742 在没有添加糠醛的条件下, 生长情况无明显差异, 均在 60 h 内达到稳定期(图 6A)。该结果表明: 在正常生长状态下, 重组菌株的生长不受整合插入序列的影响。在有糠醛存在时, 两株酵母菌的生长均受到抑制, 进入生长迟滞期, 并且迟滞期的时长随着糠醛浓度的增加而增加(图 6B)。然而, 在相同糠醛浓度下, 酿酒酵母重组菌株 AM01 总是比对照菌株 BY4742 提前恢复生长, 并且随着糠醛浓度的增加优势更为明显(图 6B)。该结果表明: 在糠醛应激状态下, 采用 *ADH7* 启动子调控 *MSN2* 的转录能增强酿酒酵母对糠醛的耐受能力。

2.5 基因表达分析

酿酒酵母重组菌株 AM01 及其对照菌株 BY4742 的基因转录分析表达比较结果见表 2。在无糠醛情况下, 两株菌 *MSN2* 的转录水平无明显差异, 同时其调控的下游 6 个代表基因的转录水平也无明显差异。该结果表明: 在正常生长状态下, *ADH7*

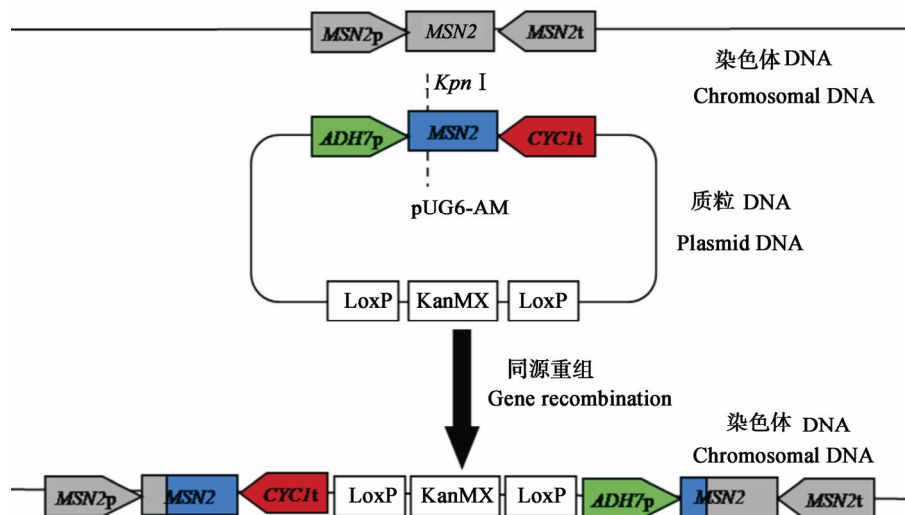


图5 表达质粒与酿酒酵母染色体 DNA 重组模式图

Figure 5 Integration diagram of expression plasmid into chromosome DNA of *S. cerevisiae*

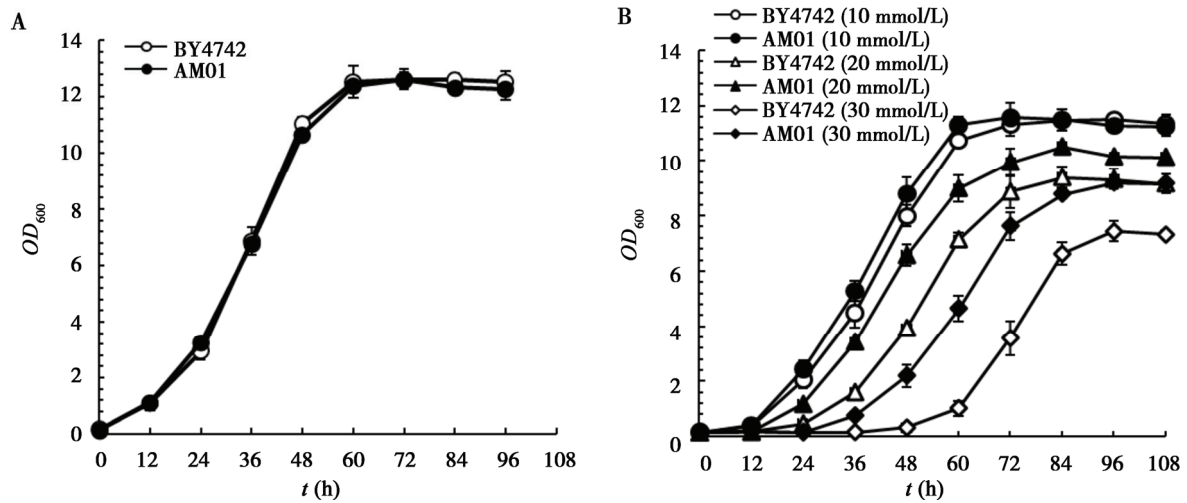


图6 AM01 及对照菌株在不同条件下的生长曲线

Figure 6 The growth curve of AM01 and control strains under different conditions

Note: A: YEPD medium; B: YEPD medium+Furfural.

表2 基因表达结果比较

Table 2 Comparison of gene expression

基因 Genes	比值 Ratio (AM01/BY4742)			
	YEPD+Furfural (0)	YEPD+Furfural (10 mmol/L)	YEPD+Furfural (20 mmol/L)	YEPD+Furfural (30 mmol/L)
<i>MSN2</i>	1.1	2.3	5.4	12.7
<i>CTT1</i>	0.8	2.2	3.6	5.8
<i>HSP26</i>	0.9	5.2	8.7	30.6
<i>HSP104</i>	1.2	3.1	6.6	8.9
<i>TPS1</i>	0.9	1.7	2.8	4.3
<i>TSL1</i>	1.3	2.2	3.3	4.5
<i>TPS2</i>	0.7	2.6	3.9	5.1

注: 比值(AM01/BY4742)大于 2.0 表明差异显著($P < 0.05$).Note: Ratio of AM01 to BY4742 above 2.0 indicates significant difference ($P < 0.05$).

启动子未启动 *MSN2* 的表达, 而只受其自身的启动子调控。在有糠醛存在的情况下, AM01 菌株中 *MSN2* 的转录水平明显高于对照菌株, 二者的比值随着糠醛浓度的增加而增大。同时, 其调控的下游代表基因转录水平的比值也随之相应增大。该结果表明: 在糠醛应激状态下, *ADH7* 启动子开始发挥作用, 并表现出自我精细调控的能力。

3 结论与讨论

通过近年的研究, 人们发现酿酒酵母中有 300

多个基因在糠醛和(或)5-羟甲基糠醛应激作用下得到了诱导表达^[8,23]。对单个醛还原酶基因过量表达, 虽能提高酿酒酵母对糠醛的脱毒及耐受能力, 但远未能达到期望的要求^[16-17,24]。在现有技术条件下, 要对如此众多的基因进行遗传工程的同时改造是难以实现的。转录调控基因, 因其调控众多基因的转录表达, 常被作为此类遗传工程改造的候选基因。*MSN2* 作为一种通用应激转录调控基因, 已经被用来过量表达, 并显著提高了酿酒酵母对糠醛的

耐受能力。然而,该基因的持续表达会造成细胞始终处于应激状态,从而在无糠醛应激状态下浪费培养基中的营养物质及能量,对细胞的正常生长造成影响。因此,迫切需要找到一种启动子来实现该转录调控基因的自我精细调控表达。

本研究以 *ADH7p* 为启动子成功构建了表达 *MSN2* 的酿酒酵母重组菌株 AM01。该菌株在正常生长条件下表现出与出发菌株相似的生长特性,而在糠醛抑制因子作用下表现出显著增强的耐受能力,并且随着糠醛浓度的增加,耐受能力增强更为明显。qRT-PCR 分析发现, *MSN2* 的转录表达得到了自我精细调控,并影响到其调控的下游基因的转录表达。*MSN2* 调控的下游基因 *CTT1* 编码过氧化氢酶,参与氧化应激反应^[25]; *HSP26* 和 *HSP104* 等编码热休克蛋白,作为分子伴侣对其他蛋白加以保护^[26]; *TPS1*、*TSL1* 和 *TPS2* 编码海藻糖合成过程中的酶,维持细胞内正常的渗透压^[27]。因此,通过自我精细调控 *MSN2* 的表达来控制下游基因的转录,可从多个角度发挥功能来提高酿酒酵母对糠醛的耐受能力。*ADH7* 启动子除含有 *Msn2p* 的作用位点可实现 *MSN2* 表达的自我调控外,还含有氧化应激调控因子 *Yap1p* 和热休克蛋白调控因子 *Hsf1p* 的作用位点。因此,我们推测新构建的重组酿酒酵母菌在氧化应激和热应激状态下,可通过 *ADH7* 启动子激活 *MSN2* 的表达来增强其耐受性。同时,本研究采用了基因同源重组整合的方式,将 *ADH7p-MSN2-CYCHt* 整合到酿酒酵母染色体 *MSN2* 所在的位点。该整合方式在插入外源表达盒的同时不会破坏原有 *MNS2* 的转录及表达,从而实现了 *MSN2* 表达的双重调控。

酿酒酵母对木质纤维素水解醛类抑制因子的脱毒及耐受涉及多基因、多层次的复杂的相互作用,至少还有 7 个转录调控基因(*YAP1*、*YAP5*、*YAP6*、*PDR1*、*PDR3*、*RPN4* 和 *HSF1*)参与其中^[8]。因此,采用自我精细调控的启动子来实现这些基因的联

合调控表达,有望获得对木质纤维素水解醛类耐受性更为增加的基因工程菌株。另外,必须更为深入地开展酿酒酵母对木质纤维素水解醛类的脱毒及耐受机理研究,才能为耐受菌株的基因工程改造提供更加科学的理论指导,从而为木质纤维素燃料乙醇的工业化生产奠定基础。

参考文献

- [1] Naik SN, Goud VV, Rout PK, et al. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010, 14(2): 578-597
- [2] Zhao J, Qu YB. Progress in biorefinery technology of lignocellulosic resources[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2014, 26(5): 489-496 (in Chinese)
赵建, 曲音波. 木质纤维素资源生物精炼技术研究进展[J]. 生命科学, 2014, 26(5): 489-496
- [3] Jönsson LJ, Alriksson B, Nilvebrant NO. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification[J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6(1): 16
- [4] Liu ZL, Blaschek HP. Biomass conversion inhibitors and *in situ* detoxification[A]//Vertès AA, Qureshi N, Blaschek HP, et al. Biomass to Biofuels: Strategies for Global Industries[M]. Chichester: Wiley, 2010: 233-259
- [5] Heer D, Sauer U. Identification of furfural as a key toxin in lignocellulosic hydrolysates and evolution of a tolerant yeast strain[J]. Microbial Biotechnology, 2008, 1(6): 497-506
- [6] Liu ZL. Molecular mechanisms of yeast tolerance and *in situ* detoxification of lignocellulose hydrolysates[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90(3): 809-825
- [7] Liu ZL, Ma M, Song M. Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2009, 282(3): 233-244
- [8] Ma M, Liu ZL. Comparative transcriptome profiling analyses during the lag phase uncover *YAP1*, *PDR1*, *PDR3*, *RPN4*, and *HSF1* as key regulatory genes in genomic adaptation to the lignocellulosic derived inhibitor HMF for *Saccharomyces cerevisiae*[J]. BMC Genomics, 2010, 11: 660
- [9] Schmitt AP, McEntee K. *Msn2p*, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(12): 5777-5782
- [10] Boy-Marcotte E, Perrot M, Bussereau F, et al. *Msn2p* and *Msn4p* control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(5): 1044-1052
- [11] Yamamoto N, Maeda Y, Ikeda A, et al. Regulation of thermotolerance by stress-induced transcription factors in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Eukaryotic Cell, 2008, 7(5): 783-790
- [12] Watanabe M, Watanabe D, Akao T, et al. Overexpression of *MSN2* in sake yeast strain promotes ethanol tolerance and increases ethanol production in sake brewing[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2009, 107(5): 516-518
- [13] Hong SK, Cha MK, Choi YS, et al. *Msn2p/Msn4p* act as a key transcriptional activator of yeast cytoplasmic thiol peroxidase II[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(14): 12109-12117
- [14] Sasano Y, Watanabe D, Ukibe K, et al. Overexpression of the

- yeast transcription activator Msn2 confers furfural resistance and increases the initial fermentation rate in ethanol production[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2012, 113(4): 451-455
- [15] Cardona F, Carrasco P, Perez-Ortin JE, et al. A novel approach for the improvement of stress resistance in wine yeasts[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 114(1): 83-91
- [16] Liu ZL, Moon J, Andersh BJ, et al. Multiple gene-mediated NAD(P)H-dependent aldehyde reduction is a mechanism of *in situ* detoxification of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 81(4): 743-753
- [17] Sehnem NT, Machado Ada S, Leite FC, et al. 5-Hydroxymethylfurfural induces *ADH7* and *ARI1* expression in tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain P6H9 during bioethanol production[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 133: 190-196
- [18] Anderson EH. Growth requirements of virus-resistant mutants of *Escherichia coli* strain "B"[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1946, 32(5): 120-128
- [19] Gietz RD, Woods RA. Yeast transformation by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2006, 313: 107-120
- [20] Li X, Yang R, Ma M, et al. A novel aldehyde reductase encoded by *YML131W* from *Saccharomyces cerevisiae* confers tolerance to furfural derived from lignocellulosic biomass conversion[J]. *Bioenergy Research*, 2015(8): 119-129
- [21] Liu ZL, Slininger PJ. Universal external RNA controls for microbial gene expression analysis using microarray and qRT-PCR[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 68(3): 486-496
- [22] Liu ZL, Palmquist DE, Ma M, et al. Application of a master equation for quantitative mRNA analysis using qRT-PCR[J]. *Journal of Biotechnology*, 2009, 143(1): 10-16
- [23] Heer D, Heine D, Sauer U. Resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to high concentrations of furfural is based on NADPH-dependent reduction by at least two oxireductases[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(24): 7631-7638
- [24] Liu ZL, Moon J. A novel NADPH-dependent aldehyde reductase gene from *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 involved in the detoxification of aldehyde inhibitors derived from lignocellulosic biomass conversion[J]. *Gene*, 2009, 446(1): 1-10
- [25] Grant CM, Perrone G, Dawes IW. Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, 253(3): 893-898
- [26] Gong Y, Kakihara Y, Krogan N, et al. An atlas of chaperone-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*: implications to protein folding pathways in the cell[J]. *Molecular Systems Biology*, 2009, 5(1): 275
- [27] Mahmud SA, Hirasawa T, Shimizu H. Differential importance of trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various environmental stresses[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, 109(3): 262-266

征订启事

欢迎订阅 《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于1974年,是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办,国内外公开发行,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:基础微生物学研究,农业微生物学研究,工业微生物学研究,医学微生物学研究,食品微生物学研究,环境微生物学研究,微生物功能基因组研究,微生物蛋白组学研究,微生物模式菌株研究,微生物工程与药物研究,微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国自然科学核心期刊。曾获国家优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,北京优秀科技期刊奖,被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自2008年本刊已经全新改版,由双月刊改为月刊,发表周期缩短,内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买,2015年每册定价58元,全年696元,我们将免邮费寄刊。

邮购地址:(100101)北京朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413