

酿酒酵母 *Mbp1* 缺陷型菌株的构建及其乙醇发酵特性

罗贞贞¹ 陈小玲² 练梅华¹ 张穗生² 吴仁智² 黄日波^{1*}

(1. 广西大学 生命科学与技术学院 广西 南宁 530004)

(2. 广西科学院 非粮生物质酶解国家重点实验室 国家非粮生物质能源工程技术研究中心
广西生物质产业化工程院 广西生物炼制重点实验室 广西 南宁 530007)

摘要:【目的】研究酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)工业菌株 *Mbp1* 基因的功能,探讨 *Mbp1* 基因对酿酒酵母乙醇发酵性能的影响。【方法】以酿酒酵母 MF1015 为出发菌株,用 PCR 方法构建 *Mbp1* 基因敲除组件 *Loxp-KanMX-Loxp*,将敲除组件转化两种配型的酿酒酵母单倍体,通过单倍体复倍获得敲除 *Mbp1* 基因的二倍体突变菌株,研究突变菌株形态变化及乙醇发酵特性。【结果】敲除 *Mbp1* 基因后突变菌株生长曲线无显著变化,出芽率降低,细胞体积增大 19.2%,对饥饿更敏感,较早出现假菌丝。甘蔗糖蜜在静置条件下发酵,突变菌株的乙醇产量明显低于野生型;在 130 r/min 的条件下发酵,突变菌株和野生型发酵液中的乙醇产量基本相同。【结论】*Mbp1* 基因缺失使酿酒酵母的乙醇发酵能力下降并影响细胞的形态分化。

关键词: *Mbp1* 基因, 基因敲除, 乙醇发酵, 酿酒酵母, 形态

Construction of *Saccharomyces cerevisiae* $\Delta Mbp1$ and its alcohol fermentation characteristics

LUO Zhen-Zhen¹ CHEN Xiao-Ling² LIAN Mei-Hua¹ ZHANG Sui-Sheng²
WU Ren-Zhi² HUANG Ri-Bo^{1*}

(1. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China)

(2. Guangxi Academy of Sciences, State Key Laboratory of Non-food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Biomass Industrialization Engineering Institute, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Nanning, Guangxi 530007, China)

Abstract: [Objective] To study the function of *Mbp1* gene, including the effects of *Mbp1* gene mutation on ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. [Methods] The *Loxp-KanMX-Loxp* was constructed and transformed into haploid *Saccharomyces cerevisiae* *MATa* and *MAT α* . After haploid mating test, the diploid mutant was selected. Ethanol fermentation and physiological studies of the mutant were performed and compared with those of the wild type strain. [Results] The growth rate of the mutant was similar to that of the wild strain; the budding rate of mutant strain is lower than that

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA022106, 2013AA050701); 广西科学研究和技术开发项目(No. 桂科重 12118004-2, 桂科重 1348004-1, 桂科重 1348004-3, 桂科合 1346011-4, 桂科重 14122004-1, 14122004-3, 桂科合 14123001-6); 广西自然科学基金项目(No. 2014GXNSFAA118103)

*通讯作者: ✉: rbhuang@gxas.cn

收稿日期: 2014-09-25; 接受日期: 2015-02-05; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-04

of the parent strain during the fermentation before 48 h; the mutant is approximately 19.2% bigger than the parent strain in cell volume and was more sensitive to nutrient starvation; in addition, pseudomycelium was also observed in the mutant. The ethanol production and sugar utilization ability of the mutant is slightly lower than that of the parent strain. The ethanol production level of mutant strain is lower than that of the wild strain in static culture, while there is no different between the mutant strain and the wild strain in agitated culture at 130 r/min. **[Conclusion]** *Mbp1* is involved in fermentability and morphogenesis of *Saccharomyces cerevisia*.

Keywords: *Mbp1* gene, Gene-knockout, Ethanol-fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, Appearance

甘蔗糖蜜是蔗糖生产中主要的副产物, 可被酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)作为碳源发酵生产燃料乙醇。用甘蔗糖蜜生产燃料乙醇存在的问题是发酵效率低, 对酿酒酵母乙醇发酵相关基因和代谢途径进行改造, 可以提高发酵效果。但是, 在进行改造前, 需要了解酿酒酵母的乙醇发酵相关基因和代谢途径。

研究发现, 酿酒酵母细胞从 G1 期到 S 期的转变过程主要受到转录复合物 MBF 和 SBF 的调控^[1]。MBF 由 *Mbp1p* 和 *Swi6p* 组成, SBF 由 *Swi4p* 和 *Swi6p* 组成。其中, MBF 通过 *Mbp1p* 蛋白结合至其所调控基因的 ACGCG 序列后起始调控^[2], SBF 通过 *Swi4p* 结合所调控基因的 CACGAAAA 序列^[3]。Horak 等^[4]的研究发现 MBF 和 SBF 还会结合到与 G1/S 期有关基因的启动子区域, 从而影响到 G1/S 期这一转变过程中的 DNA 复制、出芽过程、蛋白合成、纺锤极体复合物的形成、线粒体功能活性以及转录等; 此外这两种转录因子还会结合到其他转录因子的启动子区域, 影响细胞周期的其他过程。Bean 等^[5]通过分别敲除 *Mbp1* 和 *Swi4*, 以及同时敲除 *Mbp1* 和 *Swi4* 来研究 MBF 和 SBF 之间的重叠功能, 但他们的研究仅仅是从检测其他基因的表达量是否有所改变入手, 对于生理方面的研究也仅仅是对比敲除前后细胞体积的变化。Hussein 等^[6]以白色假丝酵母(*Canidia albicans*)为研究对象, 通过同样的敲除方式从基因表达量、菌株细胞大小及假菌丝形成等方面入手, 探究两种转录因子对菌株的作用。已有的文献中, 尚未见有关于 *Mbp1* 基因 (ORF 编号为 *YDL056W*) 缺失对酿酒酵母工业菌株

发酵生产乙醇是否产生影响的报道, 酿酒酵母工业菌株 *Mbp1* 基因在发酵生产乙醇方面的功能有待于研究。本研究以酿酒酵母 MF1015 为出发菌株, 敲除 *Mbp1* 基因后, 通过研究 *Mbp1* 基因缺失菌株发酵甘蔗糖蜜生产乙醇的性能及生长形态的变化来探讨酿酒酵母工业菌株 *Mbp1* 基因的功能。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 培养基: YEPD 液体培养基(g/L): 酵母粉 10.0, 蛋白胨 20.0, 葡萄糖 20.0 (固体培养基加琼脂粉 20.0); McClary 产孢培养基(g/L): 葡萄糖 1.0, NaAc 8.2, KCl 1.8, 酵母粉 2.5, 琼脂粉 20.0; 蔗糖发酵培养基(g/L): 酵母提取物 10.0, 蛋白胨 20.0, 蔗糖 230.0, 蔗糖与其他组分分开灭菌; 糖蜜发酵培养基: 12.74 °Be (或 29.9 °Be) 糖蜜, 尿素 0.2% (质量比), 磷酸 0.02% (质量比), 用 72% 的硫酸调节 pH 至 3.8–3.9。

1.1.2 药品和试剂: *rTaq* 酶及其相关试剂购自 TaKaRa 公司; G418 购自 Sigma 公司; 氯化三苯基四氮唑(TTC)购自上海晶纯试剂有限公司; 博莱霉素(Zeocin)购自于 Invitrogen; 蜗牛酶和 SDS 购自生工生物工程有限公司。细胞裂解液: TritonX-100 2% (体积比), SDS 1% (质量体积比), NaCl 100 mmol/L, Tris-HCl (pH 8.0) 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L。

1.1.3 菌种和质粒: 酿酒酵母菌种 MF1015 由广西科学院生物科学与技术研究中心筛选获得; 质粒 PSH65 和 pUG6 为广西科学院生物科学与技术研究中心保存。

1.1.4 引物: 引物由 Invitrogen 公司合成(表 1)。其

中: *Mbp1* 基因敲除组件 *Loxp-KanMX-Loxp* 扩增引物为 R 和 F, *MAT* 基因座确认引物为 MATF、MATa 及 MAT α , *Loxp-KanMX-Loxp* 完整性验证引物为 Ka、Kb、Kc 及 Kd, *Mbp1* 基因开放阅读框(*YDL056W*)完整性验证引物为 056wa、056wb、056wc 及 056wd。

1.2 实验方法

1.2.1 *Mbp1* 基因敲除: 酿酒酵母 MF1015 基因组的提取按照文献[7]; MF1015 单倍体的制备参照文献[8-9]; 单倍体细胞筛选参照文献[10-11]; 利用 TIANprep Mini Plasmid Kit 试剂盒提取 pUG6 质粒; 利用 *Nco* I 对 pUG6 进行单酶切并通过琼脂糖凝胶电泳验证, 酶切体系参照说明书。

利用 R/F 引物对扩增 *Mbp1* 敲除组件 *Loxp-KanMX-Loxp*, 具体方法参照文献[12-13]。用敲除组件分别转化两种配型单倍体酵母(*MATa* 型和 *MAT α* 型), 具体方法参照文献[14]。转化子的筛选及验证参考文献[15]。

1.2.2 *MATa* 型和 *MAT α* 型杂交复倍: *MATa* 型和 *MAT α* 型杂交复倍参考文献[16]并稍作修改, 具体步

骤为: 过夜活化菌种, 取约 2×10^6 个 *MATa* 型转化子细胞和 1×10^7 个 *MAT α* 型转化子细胞充分混匀, 8 000 r/min 离心 3 min, 去上清; 取适当 YEPD 液体培养基重悬细胞, 30 °C 静置培养 3-4 h 后, 用灭菌的 0.45 μ m 硝酸纤维素膜过滤, 5 mL YEPD 过滤冲洗滤膜; 将滤膜贴在含 8%葡萄糖的 YEPD 平板上, 30 °C 培养 3-5 h, 用 5 mL YEPD 液体培养基洗脱菌体, 8 000 r/min 离心 3 min, 稀释涂板, 30 °C 培养 2-3 d 后观察菌落生长情况; 随机挑取单菌落进行 PCR 或产孢验证。

1.2.3 G418 抗性标记去除: 去除 G418 抗性标记的具体方法参考文献[15]。

1.2.4 生长曲线以及出芽率测定: 接种量为 1×10^6 个/mL 的野生型菌株与突变菌株于 2%葡萄糖的 YEPD 培养基中, 每隔 8 h 取样, 于显微镜下用血球计数板对细胞总数和出芽细胞数进行计数, 绘制生长曲线并计算出芽率。出芽率=出芽细胞数/细胞总数。

1.2.5 发酵实验: 蔗糖发酵、甘蔗糖蜜发酵及残糖

表 1 引物序列表

Table 1 The list of primers

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	注释 Notes
R	gtgcttaacattccgagacacaacgtaaatcccagaacacaagc GCAGGTCGACAACCCCTTAAT	Upstream of <i>YDL056W</i> Upstream <i>Loxp</i>
F	cagtatatggatacatgtaaagtctctctattatgtatattta GCCACTAGTGGATCTGATATCACC	Downstream of <i>YDL056W</i> Downstream of <i>Loxp</i>
MATF	AGTCACATCAAGATCGTTTATGG	Downstream of <i>MATF</i>
MATa	ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG	Within of <i>MATa</i>
MAT α	GCACGGAATATGGGACTACTTTCG	Within of <i>MATα</i>
Ka	CAGCATCCATTAGCCGTTAG	Upstream of <i>YDL056W</i>
Kb	ATTCCGACTCGTCCAACATC	Within of <i>kanmx</i>
Kc	AGGTCTAGAGATCTGTTTAGCTTGC	Within of <i>kanmx</i>
Kd	CACAGAAAAAGCACTGCTTACTG	Downstream of <i>YDL056W</i>
056wa	ATGGAATACCTGCAAGATAC	Upstream of <i>YDL056W</i>
056wb	TGCAATAACACTTGTGGTAG	Within of <i>YDL056W</i>
056wc	GGATCTACGAGGGGAAGCAG	Within of <i>YDL056W</i>
056wd	CACTGTCTTGGGTGACGACG	Downstream of <i>YDL056W</i>

注: 小写字母表示与 *Mbp1* 基因同源的部分, 大写表示扩增筛选标记的引物。

Note: The lowercase indicate homology with gene, while the capital letters indicate homology with the resistance marker.

含量测定的具体方法参考文献[17-18];呼吸强度测定参考文献[19],呼吸强度以 OD_{490} 值表示。

1.2.6 细胞体积及假菌丝的检测: 细胞体积检测参考文献[20-21]。假菌丝检测: 将过夜活化的 MF1015-*WT* 和 MF1015- $\Delta YDL056W$ 稀释后涂布于 YEPD 平板上, 在 30 °C 培养箱中连续倒置培养 3-4 d 后观察菌落形态, 并挑取菌体进行镜检。

2 结果与分析

2.1 *Mbp1* 突变菌株验证结果

挑取 G418 筛选平板上的阳性克隆, 扩大培养并提取基因组 DNA, 进行 PCR 扩增, 结果(图 1)显示: 引物对 Ka-Kb, Kc-Kd 增产物的大小分别为 1.4 kb 和 1.7 kb; 用引物对 056wa-056wb, 056wc-056wd 扩增, 无条带显示。由此说明敲除了 *Mbp1* 基因。

对单倍体进行复倍, 挑单菌落, 利用 PCR 验证。交配型, 获得二倍体突变菌株后利用半乳糖诱导

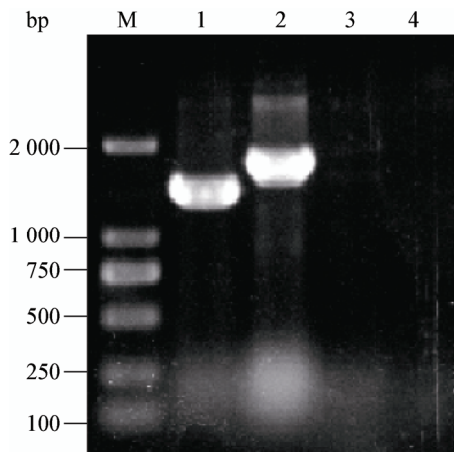


图 1 单倍体转化子的琼脂糖凝胶电泳验证

Figure 1 Agarose gel electrophoresis verification of haploid transformants

注: M: DL2000 分子量标准; 1: Ka-Kb 引物 PCR 产物; 2: Kc-Kd 引物 PCR 产物; 3: 056wa-056wb 引物扩增结果; 4: 056wc-056wd 引物扩增结果。

Note: M: DL2000 marker; 1: Ka-Kb primers PCR amplification products; 2: Kc-Kd primers PCR amplification products; 3: 056wa-056wb primers PCR amplification result; 4: 056wc-056wd primers PCR amplification result.

消除 G418 抗性标记并且进行产孢验证, 其产孢结果为正常产孢(图 2)。

2.2 *Mbp1* 基因缺失对生长形态的影响

2.2.1 生长曲线及出芽率: 通过测定生长曲线发现, 突变菌株和野生型菌株菌液浓度均在 32 h 左右达到最大值(约为 1.7×10^8 个/mL), 之后便进入稳定期。

野生型和突变菌株的出芽率结果(图 3)显示, 在各个检测时间点突变菌株的出芽率皆低于野生型菌株。

2.2.2 细胞体积: 细胞流通过流式细胞仪时, 流式细胞仪发出的激光照射细胞而发生散射, 前向角散射(FSC)光的强度与细胞大小成正比。流式细胞仪

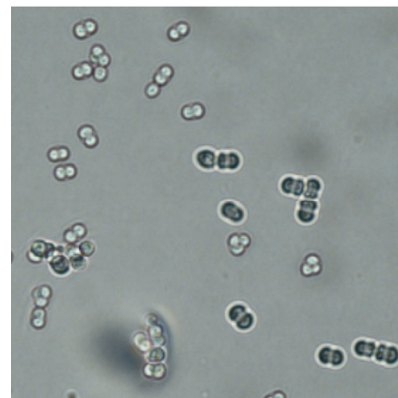


图 2 突变菌株二倍体产孢培养

Figure 2 Diploid of mutants spore culture

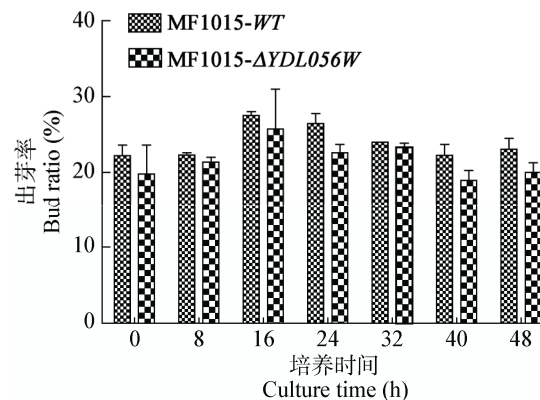


图 3 野生型和突变菌株的出芽率

Figure 3 Bud ratio of wild-type and mutant strains

显示 10 000 个细胞中野生菌株和突变菌株的平均 FSC 分别为 988 261.955 和 1 177 935.460, 以平均 FSC 信号强度表示细胞体积, 通过计算发现突变菌株的平均体积比野生菌株大 19.2%。

2.2.3 假菌丝形成: 野生型菌株和突变菌株在 YPD 平板上培养 3–5 d 后, 单菌落形态会发生明显的差别: 野生型菌株菌落形态光亮圆滑(图 4A); 而突变菌株单菌落从菌落周边开始出现褶皱形态, 最终布满整个菌落(图 4B)。分别挑取菌落周边少量菌体进行镜检, 发现野生型菌株仍然为单细胞状态, 没有假菌丝形成(图 4C); 而大部分突变菌株细胞出现了假菌丝, 菌体呈杆状(图 4D)。

2.3 *Mbp1* 基因缺失对乙醇发酵的影响

2.3.1 乙醇产量和可发酵总糖的利用: 用蔗糖发酵或用糖蜜发酵时, 突变菌株乙醇产量均比野生型菌株有所降低(图片未显示)。在以蔗糖作为碳源发酵时, 野生型菌株和突变菌株的总糖变化趋势接近一致, 且都在 40 h 后趋于稳定。野生型菌株和突变菌株的蔗糖培养基初始总糖分别为约 26.30%±0.76% 和 25.90%±0.33%, 发酵终点时(56 h) 总糖分别为 0.110%±0.001% 和 0.110%±0.004%, 两菌株糖利用率基本相同, 均为 99.6% (图 5)。

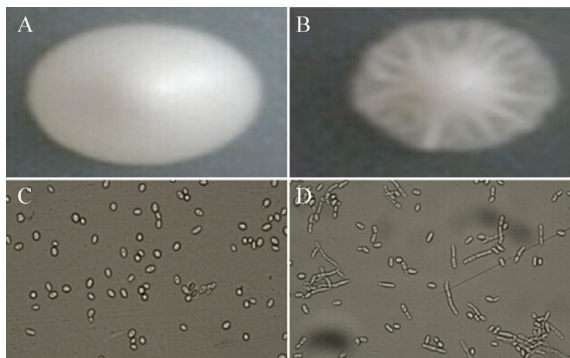


图 4 野生型和突变菌株的单菌落和单细胞形态
Figure 4 Single colony and single cell morphology of wild-type and mutant strains

注: A: 野生菌株单菌落形态; B: 突变菌株单菌落形态; C: 野生菌株单细胞形态; D: 突变菌株单细胞形态。

Note: A: Wild-type colony single morphology; B: Mutant strains single colony morphology; C: Wild-type single cell morphology; D: Mutant strains single cell morphology.

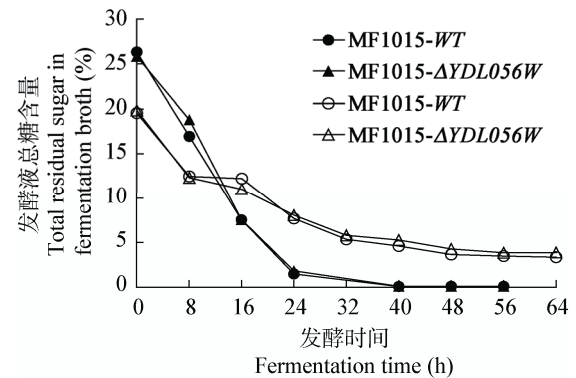


图 5 30 °C 野生型和突变菌株蔗糖和糖蜜发酵总糖曲线

Figure 5 Total sugars curves for sucrose fermentation of wild-type and mutant strain at 30 °C

注: ●, ▲: 蔗糖乙醇发酵; ○, △: 糖蜜乙醇发酵。

Note: ●, ▲: Sucrose fermentation; ○, △: Molasses fermentation.

在以甘蔗糖蜜作为碳源发酵时, 野生型菌株和突变菌株的初始可发酵性总糖分别为 19.55%±0.26% 和 19.87%±0.14%, 当到达发酵终点时(64 h) 发酵液中的可发酵性总糖分别为 3.37%±0.07% 和 3.88%±0.15% (图 5)。野生型菌株对糖的利用率约为 82.8%, 而突变菌株对糖的利用率为 80.5%。

2.3.2 呼吸强度及其对乙醇产量的影响: 呼吸强度测定结果(表 2)显示 130 r/min 条件下野生型菌株的呼吸强度是突变菌株的 6.06 倍; 静置条件下为 1.53 倍。以甘蔗糖蜜发酵培养基进行发酵, 检测发酵液乙醇浓度, 发酵 71 h 后, 摇床转速为 0 时, 突变菌株发酵液中乙醇浓度比野生型菌株的低 4%; 摇床转速为 130 r/min 时, 野生型菌株及突变菌株的乙醇产量基本相同(图 6)。

表 2 呼吸强度测定结果		
Table 2 Respiration intensity measurement results		
菌株 Strains	转速 Rotate speed (r/min)	
	130	0
Wild type	1.31±0.34	0.616±0.04
Mutant	0.21±0.02	0.403±0.02

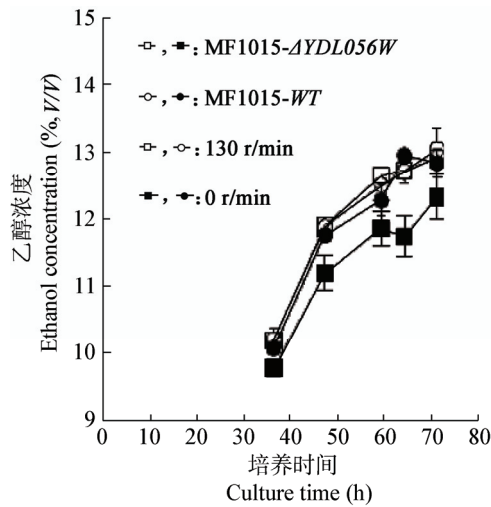


图6 糖蜜乙醇发酵曲线

Figure 6 Molasses fermentation curves of wild-type and mutant

3 讨论

酿酒酵母细胞从 G1 期到 S 期的转变过程会受到转录复合物 MBF 调控^[1]。酵母假菌丝的形成是与 MAPK 调控途径相关的,是菌株对饥饿环境的一种反应^[22]。Hussein 等^[6]研究发现,以白色念珠菌为出发菌株在敲除 *Swi4*、*Swi6* 后发现有假菌丝形成,单独敲除 *Mbp1* 后没出现假菌丝,而本研究单独敲除 *Mbp1* 后,突变菌株出现了假菌丝,这一结果可能是菌株不同造成的。Bean 等^[5]通过敲除 *Mbp1* 后发现突变菌株体积比野生型体积大 20%,并且认为体积的增大是与出芽率提高相一致的。本研究检测细胞体积和出芽率的差别,发现突变菌株体积比野生型大 19.2%,但出芽率比原始菌小,表明细胞体积的增大与出芽率并无直接关系。

Horak 等^[4]和 Pham 等^[23]研究发现 MBF 与线粒体功能有很大的关系,MBF 会结合到与线粒体功能相关基因的启动子上,从而影响线粒体的功能。此外,Kuyper 等^[24]的研究显示在木糖发酵试验中氧含量过于丰富时,酵母会在线粒体呼吸和乙醇发酵之间竞争糖分解产生的 NADH,从而降低乙醇产量。本研究结果显示在摇床转速为 0 和 130 r/min 的条件

下突变菌株的呼吸强度均受到不同程度影响,在摇床转速为 0 时突变菌株乙醇产量比野生型的低,由此可以推测 *Mbp1* 的缺失突变影响线粒体的呼吸功能进而影响突变菌株的发酵性能。

本研究以酿酒酵母 MF1015 为出发菌株,将 *Mbp1* 基因敲除组件转化两种不同配型的单倍体细胞,利用同源重组的方法实现目的基因 *Mbp1* 的敲除,最终通过单倍体杂交复倍,转化质粒 pSH65,经半乳糖诱导后消除筛选标记,最后通过传代丢失 pSH65。本研究只需转化 1 次 pSH65 质粒便可实现酵母基因组内同源染色体上筛选标记的去除,与一般直接利用二倍体酵母敲除基因相比,既节约了时间,又大大提高了敲除的成功率。

参考文献

- [1] Koch C, Nasmyth K. Cell cycle regulated transcription in yeast[J]. Current Opinion in Cell Biology, 1994, 6(3): 451-459
- [2] Koch C, Moll T, Neuberg M, et al. A role for the transcription factors Mbp1 and Swi4 in progression from G1 to S phase[J]. Science, 1993, 261(5128): 1551-1557
- [3] Breeden L, Nasmyth K. Cell cycle control of the yeast HO gene: Cis and Trans-acting regulators[J]. Cell, 1987, 48(3): 389-397
- [4] Horak CE, Luscombe NM, Qian J, et al. Complex transcriptional circuitry at the G1/S transition in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Genes & Development, 2002, 16(23): 3017-3033
- [5] Bean JM, Siggia ED, Cross FR. High functional overlap between Mlul cell-cycle box binding factor and Swi4/6 cell-cycle box binding factor in the G1/S transcriptional program in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Genetics, 2005, 171(1): 49-61
- [6] Hussein B, Huang H, Glory A, et al. G1/S transcription factor orthologues Swi4p and Swi6p are important but not essential for cell proliferation and influence hyphal development in the fungal pathogen *Candida albicans*[J]. Eukaryotic Cell, 2011, 10(3): 384-397
- [7] Zhao HY, Li J, Zhao Y, et al. Comparison of four methods for genomic DNA extraction from yeasts[J]. Food Science, 2011, 32(9): 170-173 (in Chinese)
- [8] 赵宏宇, 李珺, 赵玥, 等. 4种酵母基因组提取方法的比较[J]. 食品科学, 2011, 32(9): 170-173
- [9] Xiao DG, Liu Q, Li J, et al. Optimization of sporulation and haploidization of *S. cerevisiae* BY-6[J]. Liquor-making Science & Technology, 2004(4): 21-22 (in Chinese)
- [10] 肖冬光, 刘青, 李静, 等. 酿酒酵母单倍体制备方法的优化[J]. 酿酒科技, 2004(4): 21-22
- [11] McClary DO, Nulty WL, Miller GR. Effect of potassium versus sodium in the sporulation of *Saccharomyces*[J]. Journal of Bacteriology, 1959, 78(3): 362
- [12] Illuxley C, Green ED, Dunbam I. Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR[J]. Trends in Genetics, 1990, 6: 236
- [13] Mirhendi H, Diba K, Rezaei A, et al. Colony PCR is a rapid and sensitive method for DNA amplification in yeasts[J]. Iranian Journal of Public Health, 2007, 36(1): 40-44
- [14] Huang YY, Guo L, Chen D, et al. Reseach on *Saccharomyces*

- cerevisiae* mutant deficient in YBR-019C[J]. Guangxi Science, 2014, 21(2): 108-114 (in Chinese)
黄艳燕, 郭铃, 陈东, 等. 酿酒酵母 YBR019C 基因缺失突变株的分析[J]. 广西科学, 2014, 21(2): 108-114
- [13] Gueldener U, Heinisch J, Koehler GJ, et al. A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(6): 1-8
- [14] Gietz RD, Schiestl RH. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method[J]. Nature Protocols, 2007, 2(1): 31-34
- [15] Wang YZ, Lei JJ, Jiang XZ, et al. Construction of *Saccharomyces cerevisiae* mutant deficient in *adh2* and *ald6* genes[J]. Microbiology China, 2009, 36(2): 211-216 (in Chinese)
王艳尊, 雷娟娟, 江贤章, 等. 酿酒酵母 *adh2* 和 *ald6* 双基因缺失突变株的构建[J]. 微生物学通报, 2009, 36(2): 211-216
- [16] Sprague GF Jr. Assay of yeast mating reaction[J]. Methods in Enzymology, 1991, 194(1): 77-93
- [17] Wei Y. Breeding of two respiration-impaired mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with enhanced sugar metabolism capacity[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2012 (in Chinese)
韦缘. 糖分利用能力提高的酿酒酵母突变体的选育[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2012
- [18] Zhang SS, LU Q, Chen D, et al. Studies on alcohol fermentation features of a high-yield *Saccharomyces cerevisiae* using sugarcane molasses as feedstock[J]. Guangxi Science, 2010, 17(4): 363-367 (in Chinese)
张穗生, 陆琦, 陈东, 等. 甘蔗糖蜜酒精高产酵母的发酵特性研究[J]. 广西科学, 2010, 17(4): 363-367
- [19] Burmølle M, Webb JS, Rao D, et al. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(6): 3916-3923
- [20] Wen GL, Xiang XL, He JL, et al. Study on the behavior in capillary electrophoresis of the programmed cell death process in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2004, 32(9): 1189-1192 (in Chinese)
温桂兰, 项小兰, 何金兰, 等. 酿酒酵母凋亡细胞的毛细管电泳行为研究[J]. 分析化学, 2004, 32(9): 1189-1192
- [21] Liu D, Liu ZH. Detection of the cell volume and the ratio of RNA/DNA by flow cytometry[J]. Chinese Journal of Nephrology, Dialysis & Transplantation, 1999, 8(3): 295-296 (in Chinese)
刘栋, 刘志红. 流式细胞仪检测细胞体积及 RNA/DNA 比值[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 1999, 8(3): 295-296
- [22] Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA, et al. Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS[J]. Cell, 1992, 68(6): 1077-1090
- [23] Pham TH, Clemente JC, Satou K, et al. Computational discovery of transcriptional regulatory rules[J]. Bioinformatics, 2005, 21(Suppl 2): ii101-ii107
- [24] Kuyper M, Winkler AA, Dijken JP, et al. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle[J]. FEMS Yeast Research, 2004, 4(6): 655-664

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, 月刊, 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。刊登内容丰富详实, 主要包括: 工业微生物学研究, 环境微生物学研究, 农业微生物学研究, 基础微生物学研究, 食品微生物学研究, 医学微生物学研究, 兽医微生物学研究, 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。

本刊为中文核心期刊。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。从 2013 年起, 连年荣获中国科学技术信息研究所颁发的“百种中国杰出学术期刊”奖。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2016 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/swxxtbcn>
国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413