

# CRISPR/Cas9 介导的酿酒酵母 *ADH2* 基因中断及反义 RNA 干扰 *GPD1* 的表达

刘奎, 梁丽敏, 李振辉, 叶浩盈, 潘艳飞, 何文锦, 陈由强, 薛婷

(福建师范大学海洋生物医药与制品产业化开发技术公共服务平台, 福建师范大学南方海洋研究院福建省微藻种质改良工程技术研究中心, 福建福州 350117)

**摘要:** CRISPR/Cas9 是一个简单、高效的用于靶向目的基因和无标记的基因组工程的工具。本文通过构建酿酒酵母沉默组件 PGK-SGPD1-CYC1, 使甘油-3-磷酸脱氢酶 I (Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, *GPD1*) 基因在 PGK 强启动子、CYC1 终止子在特定区域内进行干扰和表达。应用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 在中断乙醇脱氢酶 II (alcohol dehydrogenase II, *ADH2*) 基因的同时, 定点敲入 *GPD1* 基因的反义干扰组件, 从而特定地干扰 *GPD1* 的表达。采用高效的酵母化学转化法将反应组件敲入酿酒酵母 Y1H 中, CRISPR/Cas9 介导的同源重组效率达 43.48%, 由此获得了 *ADH2* 基因中断和 *GPD1* 反义干扰的酿酒酵母突变株。发酵实验结果表明, 酿酒酵母突变菌株 SG1-1 与出发菌株 Y1H 相比, 乙醇产率提高了 9.07%, 甘油产率下降了 12.05%, 乙酸产率下降了 12.30%, 结果表明通过中断 *ADH2* 基因及插入 *GPD1* 反义干扰组件, 既能够中断 *ADH2* 基因的功能, 减少乙醇转化为乙醛, 同时也能在一定程度上干扰 *GPD1* 基因的表达, 提高乙醇产率。

**关键词:** 酿酒酵母; 中断乙醇脱氢酶 II 基因中断; 甘油-3-磷酸脱氢酶 I

文章编号: 1673-9078(2018)10-64-71

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.10.010

## CRISPR/Cas9 Mediated *ADH2* Gene Disruption in *Saccharomyces Cerevisiae* and Antisense RNA Interference in *GPD1* Expression

LIU Kui, LIANG Li-min, LI Zhen-hui, YE Hao-ying, PAN Yan-fei, HE Wen-jing, CHEN You-qiang, XUE Ting

(The Public Service Platform for Industrialization Development Technology of Marine Biological Medicine and Product of State Oceanic Administration, Center of Engineering Technology Research for Microalgae Germplasm Improvement of Fujian, Southern Institute of Oceanography Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China)

**Abstract:** CRISPR/Cas9 is a simple and efficient tool for targeted and marker-free genome engineering. Here, we constructed the silencing component PGK-SGPD1-CYC1 of *Saccharomyces cerevisiae* to interfere the glycerol 3-phosphate dehydrogenase I (*GPD1*) gene and express in the specific region of PGK promoter and CYC1 terminator. Using CRISPR/Cas9 technology, while interrupting the alcohol dehydrogenase II (*ADH2*) gene, the target site were knocked into the antisense interference component of the *GPD1* gene, thus interfering with the expression of *GPD1*. Through high-efficiency yeast transformation, the components were transformed into Y1H, CRISPR/Cas9 mediated recombination efficiencies of 43.40% were achieved, thus mutant strains with *ADH2* gene interruption and *GPD1* antisense interference were obtained. Fermentation test shows that the ethanol yield of the mutant strain SG1-1 was 9.07% higher than the wild type, and the yield of glycerol and acetate were decreased by 12.05% and 12.30%, respectively. Results showed that the antisense interference of the *GPD1* and interruption of the *ADH2* can not only interrupt the function of *ADH2* gene, and reduce the conversion of ethanol into acetaldehyde, but also effectively interfere with *GPD1* expression in engineered yeast strains, thus improving the yield of ethanol.

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae*; alcohol dehydrogenase II interruption; glycerol-3-phosphate dehydrogenase I

生物乙醇作为一种清洁的生物燃料, 被认为是化

收稿日期: 2018-05-24

基金项目: 福建省自然科学基金高校联合资助项目(2017J01622); 福建省教育厅 A 类项目(JAT160114); 国家糖料产业技术体系(CARS-170501)

作者简介: 刘奎(1994-), 男, 硕士, 研究方向: 生物化学与分子生物学

通讯作者: 薛婷(1988-), 女, 实验师, 研究方向: 生物化学与分子生物学

石燃料最有希望的替代品, 在能源供应等方面变得越来越重要<sup>[1]</sup>。酿酒酵母在生物乙醇生产中起着重要的作用, 因为它具有很高的乙醇耐受性, 清晰的遗传背景和发酵多种糖的能力等优点<sup>[2]</sup>, 所以成为生产燃料乙醇的理想菌株。但是酿酒酵母在糖发酵生产乙醇过程中会产生较多的副产物, 如甘油、有机酸等<sup>[3]</sup>, 这

些原因可能导致发酵生产乙醇的低转化率和低产量等问题。因此,可以通过调控酿酒酵母代谢途径,降低酵母糖代谢中副产物的生成,从而提高生物乙醇的产率。

乙醇脱氢酶(E.C.1.1.1.1, alcohol dehydrogenase, 简称 ADH)能够可逆的催化乙醛与乙醇的相互转化<sup>[4]</sup>,主要有5种乙醇脱氢酶 I、II、III、IV和V参与乙醇代谢途径<sup>[5]</sup>,其中乙醇脱氢酶 II 催化乙醇氧化为乙醛<sup>[4]</sup>。薛婷等<sup>[5]</sup>通过构建酿酒酵母沉默表达载体 PURH-SADH2, 获得了 ADH2 基因反义干扰菌株 JY01, 发酵液乙醇量比原始菌株乙醇含量提高了 14.33%。因此,通过阻断乙醇脱氢酶 II 所催化的乙醇氧化分解代谢支路,减少乙醇转化为乙醛,理论上可提高酿酒酵母发酵生产乙醇的能力。

研究表明,发酵过程中约有 5%的碳源用于甘油合成,甘油的产生成为乙醇代谢途径一大副产物。如果能尽量降低甘油的产生,可以在不增加碳源总成本的情况下提高酿酒酵母的乙醇产率<sup>[6]</sup>。甘油-3-磷酸脱氢酶具有调节氧化还原力和渗透压双重功能, GPD1 和 GPD2 是其主要的两个同工酶, GPD1 在渗透调节中起主要作用,而 GPD2 在厌氧环境可以诱导其基因的表达。曹罗元等<sup>[7]</sup>应用重叠延伸 PCR 融合甘油-3-磷酸脱氢酶基因和 KanMX 筛选标记基因,构建 pYES2.0-GPD1/KanMX 反义表达载体,获得的突变菌与原始菌株相比,甘油脱氢酶比活力下降了 20.04%,乙醇合成量提高了 9.74%。

CRISPR/Cas9 基因编辑技术在过去的几年中得到了迅速的发展,已被广泛的用于不同物种的基因组改造<sup>[8]</sup>。DiCarlo<sup>[9]</sup>等人首次在酿酒酵母中使用 CRISPR/Cas9 介导的单基因敲除和敲入,通过共转化双链寡核苷酸(dsOligos),可以有效的获得 Cas9 介导的双链断链(DSBs)同源修复。本研究采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,中断 ADH2 基因同时插入反义 RNA 干扰组件 PGK-SGPD1-CYC1, 干扰 GPD1 基因的转录,促进乙醇代谢途径,为 CRISPR/Cas9 技术在酿酒酵母基因组工程的应用提供了积极的理论实践基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及仪器

#### 1.1.1 菌种及质粒

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) Y1H, 大肠杆菌 DH5a (*Escherichia coli*)由本实验室保存;质粒:pMD-19T 克隆载体购自 Takara 公司, CRISPR/Cas9

载体 pML107(#67639)购自 Addgene 公司,其中 pML107 质粒同时含有 Cas9 表达框和 single guide RNA (sgRNA)表达框,带有氨苄及亮氨酸(Leu2)筛选标记。

#### 1.1.2 主要工具酶和试剂

PCR 扩增引物由上海生工生物工程有限公司合成; TransTaq DNA Polymerase High Fidelity 聚合酶、反转录试剂盒(TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix)、荧光定量试剂盒(TransStart Top Green qPCR SuperMix)购自全式金生物技术有限公司;限制性内切酶 SmaI、FbaI, pMD™19-T Vector Cloning Kit 购自 Takara 公司;酿酒酵母基因组提取试剂盒(TIANamp Yeast DNA Kit)、质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司;酿酒酵母 RNA 提取试剂盒(E.Z.N.A.® Yeast RNA Kit)购自 Omega 公司;其他试剂均为国产分析纯试剂。

#### 1.1.3 培养基

LB 液体培养基、LB 固体培养基购自上海生工生物工程有限公司。

YPD 液体培养基: 1%酵母抽提物, 2%蛋白胨, 2%葡萄糖, 自然 pH, 121 °C 灭菌 20 min。

YPD 固体培养基: 1%酵母抽提物, 2%蛋白胨, 2%葡萄糖, 2%琼脂, 自然 pH, 121 °C 灭菌 20 min。

选择培养基(SD-leu): 0.67%酵母无氨基氮源, 2%葡萄糖, 加入 90 mL 蒸馏水, 121 °C 灭菌 20 min, 冷却后加入 1% 100 xAA (leu<sup>-</sup>)。

发酵培养基: 17%葡萄糖, 8%酵母粉, 5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 115 °C 灭菌 20 min。

#### 1.1.4 仪器

Thermal Cycler PCR 仪(型号: 2720), 美国 Applied Biosystems 公司; StepOnePlus™实时荧光定量 PCR 仪(型号: StepOnePlus), 美国 Applied Biosystems 公司; 高速冷冻离心机(型号: D-37520), 美国 Thermo 公司; Waters 高效液相色谱仪(型号: Alliance), 美国 waters 公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 扩增引物的设计

引物设计均采用 Primer5.0 软件设计。依据 GenBank 中酿酒酵母基因组序列,进行相关引物设计,并送上海生工进行引物合成。各引物序列设计见表 1。

### 1.2.2 CRISPR/Cas9 介导的 ADH2 基因中断及反义 RNA 干扰 GPD1

本研究在前期研究基础上,拟采用 CRISPR/Cas9 偶联 5'UTR 反义 RNA 干扰技术,在达到中断 *ADH2* 基因的同时,定点插入反义 RNA 干扰组件沉默 *GPD1* 基因,以期进一步提高乙醇产量。

如图 1 所示,已构建好载体 pML107-ADH2 (包含 Cas9 表达框和靶向 *ADH2* 基因特定位点的 sgRNA 表达盒)与 *ADH2* 左同源臂、*ADH2* 右同源臂及反义干扰组件 PGK-SGPD1-CYC1 共转化至酿酒酵母 Y1H 中,Leu2 为转化后的筛选标记。随后 Cas9 蛋白在 *ADH2*-sgRNA 引导下在 *ADH2* 基因特定位点(切割位点位于 *ADH2* 基因中游 580 bp 处)进行切割,产生 DNA 双链断链(Double strand breaks, DSBs)。转化进入到酿酒酵母细胞中的 *ADH2* 左同源臂、*ADH2* 右同源臂及反义干扰组件 PGK-SGPD1-CYC1 激活酿酒酵母中的同源介导 DNA 修复(homology-directed repair),最终经过同源介导 DNA 修复,会得到在 *ADH2* 基因中插入反义干扰组件突变菌株。注:红色方框 Cas9 代表 Cas9 表达盒,蓝色 gRNA 代表 *ADH2*-sgRNA 表达盒,反义干扰组件 PGK-SGPD1-CYC1 两端含有 50 bp 突出,用于同源重组。

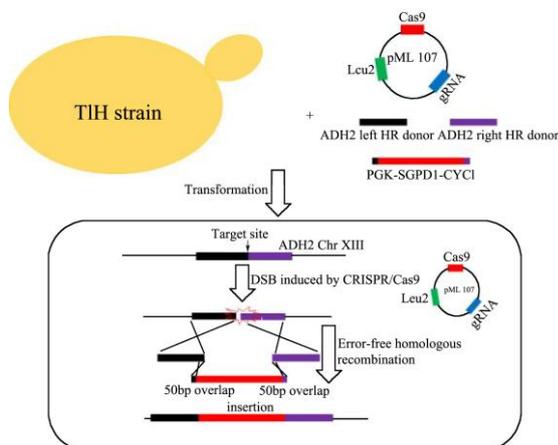


图 1 CRISPR/Cas9 介导的 *ADH2* 基因中断及反义组件的插入

Fig. 1 CRISPR/Cas9 mediated *ADH2* interruption and insertion of antisense components

#### 1.2.2.1 用于同源重组反应相关目的基因的克隆

(1) 反义敲入组件 PGK-SGPD1-CYC1 构建: 采用重叠延伸 PCR 技术,首先用引物 *GPD1*-F、*CYC1*-R 将 *CYC1* 与 *GPD1* 基因反向融合成一个目的片段,然后采用 PGK-F、*CYC1*-R 将 PGK 与 *SGPD1*-*CYC1* 融合成一个完整的反义干扰组件 PGK-SGPD1-CYC1。PCR 扩增条件见表 2。构建的干扰组件两端均带有与 *GPD1* 左、右同源臂相同的 50 bp 重叠序列,用于重组反应,如图 1 所示。

(2) 用于同源重组反应同源臂的扩增: *ADH2* 左 F、R 用于扩增 *ADH2* 左同源臂(left HR donor), *ADH2*

右 F、R 用于扩增 *ADH2* 右同源臂(right HR donor)。

#### 1.2.2.2 酿酒酵母 Y1H *ADH2* 基因 sgRNA 的选择及载体构建

对于 *ADH2* 基因 sgRNA 的设计,采用在线设计工具(CRISPR design tool, <http://CRISPR.dbcls.jp/>)<sup>[10]</sup> 进行 sgRNA 筛选。采用 crispr-cas9 sgRNA 序列克隆的在线工具(<http://wyrickbioinfo2.smb.wsu.edu/crispr.html>),将筛选得到的特异性高的 sgRNA 序列克隆到载体 pML107 sgRNA 表达盒中<sup>[11]</sup>。提取转化质粒送生工测序验证。

#### 1.2.2.3 酿酒酵母转化及 *ADH2* 位点基因编辑突变株的筛选

采用 LiAc/SS carrier DNA/PEG 法<sup>[12]</sup>进行酿酒酵母的转化实验,并涂布于选择培养(SD-Leu-)中,30 °C 培养 3~5 d。对照组为转化未连接 *ADH2* sgRNA 载体,其余转化条件同实验组一致。采用酿酒酵母基因组快捷提法<sup>[13]</sup>进行突变株基因组提取,PCR 扩增 *ADH2* 基因,验证基因插入情况,并将相关的 PCR 进行测序验证。

#### 1.2.3 荧光定量 PCR 验证 *ADH2*、*GPD1* 基因相对表达情况

取 2 mL 处于对数生长期的酿酒酵母原始株及突变菌株,离心收集酵母细胞,采用 OMEGA 酵母 RNA 提取试剂盒进行 RNA 提取,琼脂糖凝胶电泳验证。采用全式金 TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 反转录试剂盒进行反转录,TransStart Top Green qPCR SuperMix 荧光定量试剂盒进行荧光定量实验,通过  $\Delta \Delta C(t)$  值法对目的基因及内参基因  $\beta$ -actin 进行基因表达量的分析,每个反应做 3 次重复。

#### 1.2.4 酿酒酵母突变株发酵性能的测定

接种原始菌株 Y1H 及突变株至 20 mL YPD 液体培养基,30 °C,220 r/min 培养至 OD<sub>600</sub> 1.0 左右,10000 r/min 收集酵母细胞,并接种(1:10)到含有 150 ml 发酵培养基的 250 ml 摇瓶中。30 °C,150 r/min 发酵 80 h,每隔 10 h 取样进行相关数据测定。每次取样 2 管,每管 2 ml,1 管用于菌体 OD<sub>600</sub> 的测定,1 管用于发酵产物的测定。利用分光光度法对细胞生长进行了 OD<sub>600</sub> 的监测,培养基作为空白对照。

对于发酵液 12000 r/min,离心 1 min,取上清进行 0.22  $\mu$ m 滤膜处理。采用高效液相示色谱法(HPLC)测定发酵液中发酵残糖、甘油、乙醇、乙酸含量,色谱柱: Aminex HPX-87H 离子色谱柱,进样量为 20  $\mu$ l,检测条件:柱温 55 °C,流动相 10 mM 硫酸溶液,检测时采用示差折光检测器(RID),每组做三批平行实验取平均值。

表 1 扩增引物

Table 1 Primers for amplification

基因		引物序列 (5'→3')	来源
ADH2	F	ATGTCTATTCCAGAAACTCAA	
	R	TTATTTAGAAGTGTCAACAACGTAT	
ADH2 左	F	ATGTCTATTCCAGAAACTCAAAAAGC	
	R	gagttgaagtcaggaatctaaaata CCGTTGGATTTCGTAGAAGATAATG	
PGK	F	cattatcttctacgaatccaacgg TATTTTAGATTCCCTGACTTCAACTC	
	R	gattggatctgtaactgggtac TGTTTTTATATTTGTTGTAAAAAGTAG	
GPD1	F	ctacttttacaacaaataaaaaaca GTACCCAGTTACCAGATCCAATC	
	R	gcgtgacataactaattacatgat TCCGCACAACAAGTATCAGAATGG	
CYC1	F	ccattctgatactgtgtgcgga ATCATGTAATTAGTTATGTCACGC	Saccharomyces cerevisiae Y1H
	R	cttcttctcgaccacatcaat AAATTAAGCCTTCGAGCGTCCCAA	
ADH2 右	F	ttgggacgctcgaagcttaattt ATTGATGGTGGTCCAGGAAAGGAAG	
	R	TTATTTAGAAGTGTCAACAACGTATC	
qActin	F	TGGATTCTGGTATGTTCTAGCG	
	R	ATTTCAAGCCCCTATTTATTC	
qADH2	F	TAGCGCAGTCGTTAAGGCTACCA	
	R	GACAACAGTACCGTTCGCCCTACA	
qGPD1	F	CTACTATTGCCAAGGTGGTTGCC	
	R	ACCAAATTGTCGGGCAGAGTG	

表 2 PCR 反应条件

Table 2 PCR reaction conditions

扩增基因	预变性	变性	退火	延伸	循环次数	末次延伸
ADH2	94 °C 5 min	94 °C 30 s	60 °C 1 min	72 °C 30 s	30	72 °C 5 min
GPD1	94 °C 5 min	94 °C 30 s	62 °C 30 s	72 °C 30 s	30	72 °C 5 min
PGK	94 °C 5 min	94 °C 30 s	62 °C 30 s	72 °C 30 s	30	72 °C 5 min
CYC1	94 °C 5 min	94 °C 30 s	60 °C 30 s	72 °C 30 s	30	72 °C 5 min
ADH2 左同源臂	94 °C 5 min	94 °C 30 s	60 °C 30 s	72 °C 30 s	30	72 °C 5 min
ADH2 右同源臂	94 °C 5 min	94 °C 30 s	58 °C 30 s	72 °C 30 s	30	72 °C 5 min
荧光 ADH2	94 °C 30 s	94 °C 5 s	60 °C 15 s	72 °C 15 s	40	
荧光 GPD1	94 °C 30 s	94 °C 5 s	60 °C 15 s	72 °C 15 s	40	
荧光 Actin	94 °C 30 s	94 °C 5 s	60 °C 15 s	72 °C 15 s	40	

## 2 结果与分析

### 2.1 相关目的基因的扩增及验证

采用高保真 HiFi DNA 聚合酶，以酿酒酵母 Y1H 基因组 DNA 为模板，利用表 1 中设计的引物进行 PCR，获得目的基因 ADH2 (1047 bp)、ADH2 左同源臂 (600 bp)、ADH2 右同源臂 (450 bp)、PGK-SGPD1-CYC1 反义组件(1900 bp)，质量体积分数 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果如图 2、图 3、图 4 所示。电泳结果表明，目的基因 ADH2、ADH2 左同源臂、

ADH2 右同源臂以及 PGK-SGPD1-CYC1 反义组件大小均与与预期的目的基因大小一致。为了进一步验证所扩增得到的目的基因的准确性，将回收后的片段与 PMD-19T 克隆载体按一定的比例过夜连接，转化大肠杆菌进行菌落 PCR 验证及测序，经 NCBI 在线比对，所得比对结果与目的基因序列一致，由此已扩增得到所需要的目的基因片段。

### 2.2 ADH2 基因编辑载体 pML107-ADH2 构建及验证

提取 pML107-ADH2 重组表达载体, 配制质量体积分数为 0.8% 琼脂糖凝胶进行检测, 电泳结果如图 5 所示, 质粒单酶切大小与预期结果一致。将重组载体送上海生工进行测序验证。经测序比对, ADH2 sgRNA 已正确连入载体。

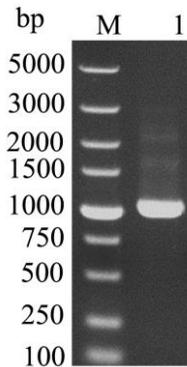


图 2 ADH2 基因扩增

Fig.2 Amplification of ADH2

注: M: 5000 DNA Marker; M: 5000 DNA Marker; 1: ADH2 左同源臂。

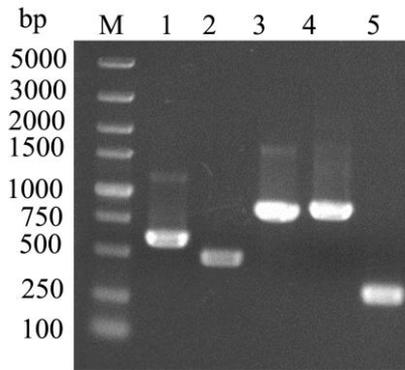


图 3 用于同源重组相关基因的扩增

Fig.3 Amplification of genes related to homologous recombination

注: 1: ADH2 基因 2: ADH2 右同源臂; 3: PGK; 4: SGPD1; 5: CYC1。

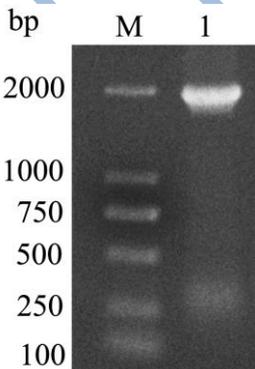


图 4 反义组件的扩增

Fig.4 Amplification of antisense components

注: M: 2000 DNA Marker; M: 15000 DNA Ladder Marker; 1: 未酶切空质粒 pML107。

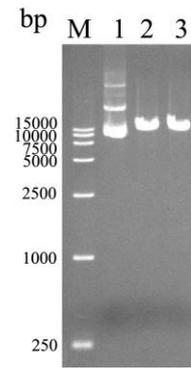


图 5 重组质粒 pML107-ADH2 单酶切验证

Fig.5 Single enzyme digestion of recombinant plasmid pML107-ADH2

注: 1: PGK-SGPD1-CYC12; 空质粒 pML107 单酶切; 3: 重组载体 pML107-ADH2 单酶切。

### 2.3 酿酒酵母突变株的筛选

挑取转化后实验组及对照组平板上重组子各 23 株, 进行基因组快提获取基因组 DNA。采用引物 ADH2-F、ADH2-R 验证反义组件敲入情况。由设计可知, 在 ADH2 位点插入反义组件, 获得的 PCR 产物约为 3kb, 而未插入反义组件, 则只会扩增出 1.1kb 大小的条带。经琼脂糖凝胶电泳检测, 如图 6 所示, 挑取 22 株转化子, 其中 10 株 PCR 产物大小为 3kb, 初步鉴定已成功敲入反义组件, 选取其中 3 株 PCR 产物送测序验证插入情况, 测序结果表明, 在 ADH2 基因中成功插入反义组件 PGK-SGPD1-CYC1。而对对照组挑取的 23 株菌均未在 ADH2 基因中插入反义组件, 如图 7 所示, 通过 CRISPR/Cas9 介导的同源重组效率达 43.48%, 而直接转化同源重组基因插入效率为 0。

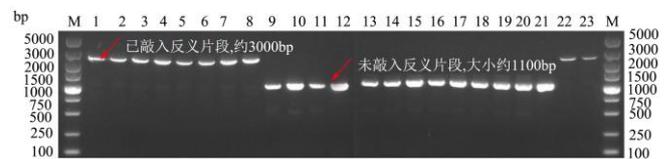


图 6 转化突变株的筛选

Fig.6 Screening of mutant strains

注: M: 5000 DNA Marker; 1-23: 实验组 23 株转化子基因扩增产物。

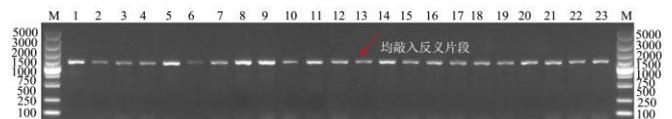


图 7 对照组目的基因扩增

Fig.7 The electrophoresis results of the target genes in the control group

注: M: 5000 DNA Marker; 1-23: 对照组 23 株转化子基因扩增产物。

## 2.4 荧光定量 PCR 测定 *ADH2*、*GPD1* 基因的表达

表达

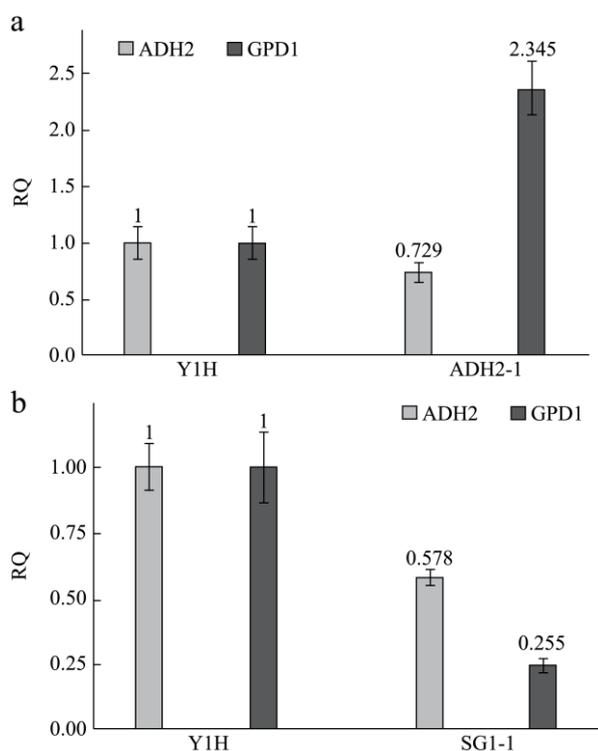


图8 原始株及突变株 *ADH2*、*GPD1* 基因荧光定量结果

Fig.8 Quantitative results of *ADH2* and *GPD1* gene of original strain and mutant strain

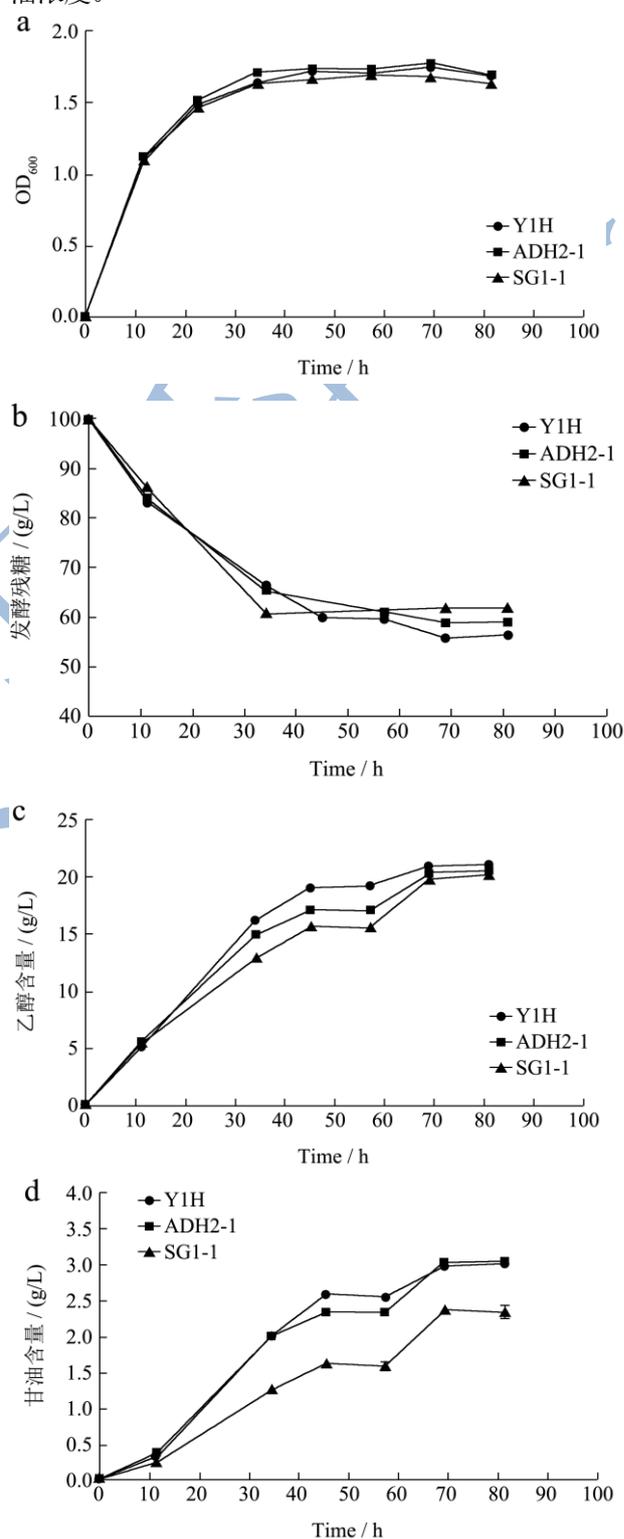
为了验证 *ADH2* 基因中断及反义 RNA 干扰组件对 *GPD1* 基因的影响, 挑取相应突变株及原始菌株进行荧光定量实验, 结果如图8所示。

Y1H 为原始菌株, ADH2-1 为 *ADH2* 基因中断菌株, SG1-1 为 *ADH2* 基因中断并敲入反义片段菌株。相对于原始菌株 Y1H, 突变株 ADH2-1 *ADH2* 基因相对表达量为 0.729, 降低了 27.10%; *GPD1* 基因相对表达量为 2.345, 增高了 1.345 倍; 而突变菌株 SG1-1 中 *ADH2* 基因相对表达量为 0.578, *GPD1* 基因相对表达量为 0.255, 分别降低了 42.20%、74.50%。由此可以说明只中断 *ADH2* 基因虽然可以降低 *ADH2* 基因的表达, 但是 *GPD1* 基因相对表达量明显增高很多, 而我们在 *ADH2* 中断位置插入反义干扰组件进一步降低了 *ADH2* 基因表达, 同时也在一定程度上沉默了 *GPD1* 基因, 干扰了 *GPD1* 基因的表达。

## 2.5 原始菌株及突变菌株发酵性能分析

将原始株 Y1H 和突变株 ADH2-1、SG1-1 分别接

种至 150 mL 的发酵培养基中进行厌氧发酵, 发酵期间定期进行取样检测。每次取发酵液 4 mL, 2 mL 用于检测菌体生长情况, 2 mL 发酵液 4 °C 低温离心保留上清液, 用 0.22 μm 滤膜进行过滤获得发酵预处理液, 采用高效液相检测发酵液中葡萄糖、乙酸、乙醇、甘油浓度。



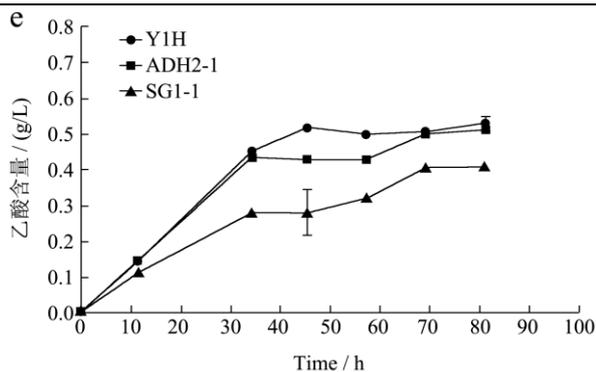


图9 酿酒酵母原始菌株与突变株发酵性能测定

Fig.9 Fermentation properties of original strains and mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*

(1) 通过 82 h 连续监测菌体 OD<sub>600</sub> 值, 以 OD<sub>600</sub> 值为 Y 轴, 时间为 X 轴来绘制发酵期间菌体的生长曲线, 如图 9a 所示。出发菌株 Y1H 与突变株 ADH2-1、SG1-1 在发酵期间测得的 OD<sub>600</sub> 值大致相同( $P>0.05$ , 采用 Turkey's 法多重检验,  $n=2$ ), 说明通过敲入反义干扰组件对菌体生长没有明显影响;

(2) 配制一系列葡萄糖浓度, 建立葡萄糖浓度标准曲线。按葡萄糖标准曲线给出的方程计算出相应的残糖量, 如图 9b 所示。发酵至 30 h 时, 突变株 SG1-1 糖消耗速率略高于原始株 Y1H 及突变株 ADH2-1。随后 30 h~82 h 发酵期间, 原始株 Y1H 残糖消耗速率要高于其他 2 株突变株。

(3) 如图 9c 所示, 发酵至 60 h, 原始菌株 Y1H 发酵液中乙醇含量均高于突变株 ADH2-1、SG1-1, 但随后继续发酵至 82 h 结果表明, 三者最终所得到的乙醇含量大致相同, 如表 3 所示。通过计算 3 株菌的乙醇产率, 突变株 SG1-1 相比于原始菌株 Y1H, 乙醇产率提高了 9.07%; 突变株 ADH2-1 相比于原始菌株

Y1H, 乙醇产率提高了 4.12%; 而突变株 SG1-1 乙醇产率相比于突变菌株 ADH2-1, 乙醇产率进一步提高了 4.75%。实验结果表明, 通过中断 ADH2 基因, 虽然可以提高乙醇产率, 但本文通过中断 ADH2 基因同时插入反义片段, 一方面通过调控甘油代谢支路, 另一方面通过中断 ADH2 基因的功能, 阻断乙醇脱氢酶 II 所催化的乙醇氧化分解代谢支路, 减少乙醇转化为乙醛, 进一步提高了乙醇产率 ( $p<0.05$ , 采用 Turkey's 法多重检验,  $n=2$ )。

(4) 通过计算发酵过程中甘油含量, 绘制如图 9d 所示甘油含量变化图。在发酵期间, 原始菌株 Y1H 与突变菌株 ADH2-1 甘油含量增幅情况趋于一致, 而突变菌株 SG1-1 甘油含量均低于其他 2 株。

如表 3 所示, 通过计算 3 株菌株甘油产率, 突变株 SG1-1 甘油产率相比于其他 2 株, 分别降低了 12.05%、18.05% ( $p<0.05$ , 差异显著), 实验结果表明通过敲入反义干扰组件, 在一定程度上沉默了 GPD1 的表达, 有效地降低了甘油的合成量。这与理论结果一致, Wenjin He 等<sup>[14]</sup>也做过相关报道, 其结论也相同。

(5) 如图 9e 所示, 发酵至 82 h, 突变株 SG1-1 乙酸含量均低于原始菌株 Y1H 及突变菌株 ADH2-1, 乙酸产率分别降低了 12.30%、14.40%, 而突变株 ADH2-1 乙酸产率却升高了 2.40%,  $p<0.05$  差异显著, 表明通过干扰甘油合成途径, 会降低乙酸的生成量, 这一结果与孔庆学等<sup>[7]</sup>研究结果相一致。乙酸在合成过程中会产生 NADH<sup>+</sup>, 由于甘油的生成量下降, 而原来依赖甘油在细胞内合成过程中氧化过剩的 NADH 在细胞内不断地积累, 其结果乙酸的生成量受到抑制, 由此造成了乙酸含量的降低<sup>[7]</sup>。

表 3 发酵相关数据计算及分析

Table 3 Calculation and analysis of related fermentation data

Strain	Relevant genotype	Products/(g/L)			Yield of ethanol (g/g glucose)	Yield of glycerol (g/g glucose)	Yield of acetate (g/g glucose)
		Ethanol	Glycerol	Acetate			
Y1H	ADH2; GPD1; ALD4	21.066±0.011	3.031±0.011	0.530±0.018	0.485±0.000	0.0697±0.0000	0.0122±0.000
ADH2-1	adh2	20.611±0.033	3.051±0.011	0.511±0.006	0.505±0.000	0.0748±0.000	0.0125±0.000
ADH2-GPD1-1	adh2; gpd1	20.171±0.038	2.340±0.081	0.409±0.001	0.529±0.001	0.0613±0.002	0.0107±0.000

### 3 结论

3.1 在过去的几年中, CRISPR/Cas9 技术在基因组编辑方面经历了快速的发展, 并且在不同的生物体中被广泛采用, 以操纵 DNA 序列<sup>[9]</sup>。与锌指核酶技术 (ZFN) 和 TALEN 技术相比, CRISPR/Cas9 系统被

认为更精确, 且更容易编程<sup>[10]</sup>。本实验采用 CRISPR/Cas9 系统, 中断 ADH2 基因同时插入反义组件, 与对照组相比, 基因插入效率达 43.40%, 这也进一步证明了 CRISPR/Cas9 系统介导的基因重组的高效性。

3.2 通过发酵实验, 相比于原始株, 突变菌株 SG1-1

乙醇产率提高了 9.07%，甘油下降了 12.05%，乙酸产率下降了 12.30%，说明反义 RNA 干扰对 *GPD1* 基因起到了一定的作用，与之前的相关报道结论相同<sup>[5][14]</sup>。此外，孔庆学<sup>[6]</sup>通过缺失酵母细胞膜上的甘油通道蛋白 *Fps1p*，抑制了甘油的产生，发酵实验表明，突变株乙酸含量明显下降，与本实验得到的结果相同。本研究在之前的研究基础上，采用 CRISPR/Cas9 介导的基因定点中断及定点插入技术，将 *ADH2* 基因中断及反义 RNA 干扰结合起来，采用一步法转化，从而快速筛选，得到了所需要的突变株。因此相比于传统两步法转化筛选，本实验简化了实验流程，同时也大大缩短了实验所需的时间，具有一定的应用价值。同时，本研究为提高生物乙醇的产量提供了一种新的方法，拓宽了 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在酿酒酵母基因组工程中的应用。

### 参考文献

- [1] Manochio C, Andrade B R, Rodriguez R P, et al. Ethanol from biomass: A comparative overview [J]. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 2017, 80: 743-755
- [2] Demeke M M, Dietz H, Li Y, et al. Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae*, strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 89
- [3] He W, Ye S, Xue T, et al. Silencing the glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene in *Saccharomyces cerevisiae* results in more ethanol being produced and less glycerol.[J]. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(3): 523
- [4] Smidt O D, Preez J C D, Albertyn J. The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: A comprehensive review [J]. *Fems Yeast Research*, 2008, 8(7): 967-978
- [5] 薛婷,陈栋才,柳燕等.酿酒酵母乙醇脱氢酶 II 基因反义干扰及对乙醇发酵的影响[J].*现代食品科技*,2015,31(11): 135-141
- [6] XUE Ting, CHEN Dong-cai, LIU Yan, et al. Anthocyanin antisense interference of ethanol dehydrogenase II in *Saccharomyces cerevisiae* and its influence on ethanol fermentation [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 31(11): 135-141
- [7] 孔庆学. 酿酒酵母遗传操作降低甘油合成提高乙醇产量的研究[D].天津市: 天津大学,2007
- [8] KONG Qing-xue. Improved ethanol production through genetic manipulation resulting in decreasing glycerol formation of *Saccharomyces cerevisiae* [D]. Tianjin: Tianjin University, 2007
- [9] 曹罗元.酿酒酵母 *ALD4* 基因敲除与 *GPD1* 基因沉默研究[D].福建省福州市:福建师范大学,2010
- [10] CAO Luo-yuan. Study on *ALD4* Gene Disruption and *GPD1* silencing in *Saccharomyces cerevisiae* industrial strain Y01 [D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2010
- [11] Jakočiūnas T, Bonde I, Herrgård M, et al. Multiplex metabolic pathway engineering using CRISPR/Cas9 in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 28:213-222
- [12] Bao Z, Xiao H, Liang J, et al. Homology-integrated CRISPR-Cas (HI-CRISPR) System for one-step multigene disruption in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2014, 4(5): 585-594
- [13] Naito Y, Hino K, Bono H, et al. CRISPR direct: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites [J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(7): 1120-3
- [14] Laughery M F, Hunter T, Brown A, et al. New vectors for simple and streamlined CRISPR-Cas9 genome editing in *saccharomyces cerevisiae* [J]. *Yeast*, 2016, 32(12): 711-720
- [15] Gietz R D, Schiestl R H. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method [J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(1): 38-41
- [16] L öke M, Kristjuhan K, Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications [J]. *Biotechniques*, 2011, 50(5): 325-328
- [17] He W, Ye S, Xue T, et al. Silencing the glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene in *Saccharomyces cerevisiae* results in more ethanol being produced and less glycerol [J]. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(3): 523