

在酿酒酵母中重构棉子糖生物合成途径的基础研究

周英彪^{1,2}, 田朝玉², 朱玥明², 张娟琨¹, 孙媛霞²

(1. 教育部发酵工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

(2. 工业酶国家工程实验室, 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308)

摘要: 研究了在酿酒酵母中重构棉子糖生物合成途径, 为后续高效生物合成棉子糖细胞工厂的构建奠定基础。敲除酿酒酵母中能降解棉子糖的蔗糖酶与 α -半乳糖苷酶的基因构建出E1(Δ suc2:: Δ mell); 在此基础上, 构建单基因表达拟南芥肌醇半乳糖合成酶基因gols1与gols3及棉子糖合成酶基因sip1与sip5的工程菌株, 及构建双基因组合表达(gols1::sip1、gols1::sip5、gols3::sip1与gols3::sip5)工程菌株; 比较工程菌株代谢产物如肌醇、UDP-半乳糖、肌醇半乳糖、蔗糖及棉子糖等生成情况, 验证在酿酒酵母中重构棉子糖生物合成途径的可行性。研究表明, 通过共表达外源肌醇半乳糖合成酶及棉子糖合成酶基因, 并敲除能降解棉子糖的蔗糖酶与 α -半乳糖苷酶的基因, 在酿酒酵母中实现了棉子糖生物合成途径的重构; 肌醇半乳糖合成酶与棉子糖合成酶基因的不同共表达组合, 棉子糖生成量有差异; 重构的棉子糖生物合成途径改变了酿酒酵母原始菌株的代谢流量。

关键词: 生物合成; 棉子糖; 酿酒酵母; 肌醇半乳糖合成酶; 棉子糖合成酶

文章篇号: 1673-9078(2017)5-121-128

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.5.020

A Basic Study on a Raffinose Biosynthetic Pathway Constructed in *Saccharomyces cerevisiae*

ZHOU Ying-biao^{1,2}, TIAN Chao-yu², ZHU Yue-ming², ZHANG Juan-kun¹, SUN Yuan-xia²

(1. Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China) (2. National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China)

Abstract: A raffinose biosynthetic pathway constructed in *Saccharomyces cerevisiae* was investigated, and the results form the basis for creation of cell factories for highly efficient biosynthesis of raffinose in the future. First, genes *suc2* and *mell1* encoding invertase and α -galactosidase were deleted in *S. cerevisiae* (BY4741) to construct E1(Δ suc2:: Δ mell1) as a base strain. Single-gene-expressing strains expressing *Arabidopsis thaliana* galactinol synthetase genes *gols1* and *gols3* and raffinose synthase genes *sip1* and *sip5* [E2(Δ suc2:: Δ mell1::gols1), E3(Δ suc2:: Δ mell1::gols3), E4(Δ suc2:: Δ mell1::sip1), and E5(Δ suc2:: Δ mell1::sip5)], and double-gene-coexpressing strains E6(Δ suc2:: Δ mell1::gols1::sip1), E7(Δ suc2:: Δ mell1::gols1::sip5), E8(Δ suc2:: Δ mell1::gols3::sip1), and E9(Δ suc2:: Δ mell1::gols3::sip5) were constructed. Finally, production of raffinose and the intermediate metabolites-uridine diphosphate (UDP)-galactose, galactinol, and sucrose-in the fermentation broth of these engineered strains was analyzed after induced expression and fermentation to verify the feasibility of construction of the raffinose biosynthetic pathway in *S. cerevisiae*. The results indicated that construction of the raffinose biosynthetic pathway in *S. cerevisiae* was achieved via coexpression of heterologous genes encoding exogenous galactinol synthase and raffinose synthase and deletion of genes encoding invertase and α -galactosidase in *S. cerevisiae*. Different coexpression combinations of the galactinol synthase gene and raffinose synthase gene caused a difference in the raffinose yield. Metabolic flux in the original strain of *S. cerevisiae* changed after the construction of the raffinose biosynthetic pathway.

Key words: biosynthesis; raffinose; *Saccharomyces cerevisiae*; galactinol synthetase; raffinose synthase

收稿日期: 2016-07-22

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2013AA102102); 国家自然科学基金资助项目(31571793)

作者简介: 周英彪(1976-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 发酵工程, 生物技术

通讯作者: 孙媛霞(1963-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 酶工程, 生物技术

棉子糖 (Raffinose, Raf) 的组成是 α -D-吡喃半乳糖 (1 \rightarrow 6) α -D-吡喃葡萄糖 (1 \rightarrow 2) β -D-呋喃果糖, 是一种重要的植物抗低温胁迫生理因子^[1]。在应用上, 棉子糖具有益生、保湿及免疫调节等作用, 可作为功能食品、饲料添加剂、美容化妆品保湿美白剂、某些重大疾病的辅助治疗药物等, 有着广泛的多领域应用前景^[2,3]。目前商品化棉子糖的来源是植物提取法, 如从鹰嘴豆及棉籽或豆粕中提取纯化得到^[4]。植物提取法的提取得率较低致使生产成本较高, 微生物法合成是良好的替代方法。

在微生物细胞中重构棉子糖生物合成途径的关键, 在于理清棉子糖生物合成途径所涉及的步骤与关键酶。目前关于棉子糖合成途径的研究仅局限于植物生理领域, 通常认为其在植物中的理论合成途径如图 1 所示^[5]。主要步骤为: (1) 葡萄糖经① \rightarrow ② \rightarrow ③ \rightarrow ④后生成 UDP 半乳糖; (2) 葡萄糖经① \rightarrow ⑤ \rightarrow ⑥ \rightarrow ⑦后生成蔗糖; (3) 葡萄糖经① \rightarrow ⑧ \rightarrow ⑨后生成肌醇; (4) UDP 半乳糖与肌醇在⑩肌醇半乳糖合成酶的催化下合成肌醇半乳糖; (5) 肌醇半乳糖的半乳糖基在⑪棉子糖合成酶的催化下转移于蔗糖上合成棉子糖。

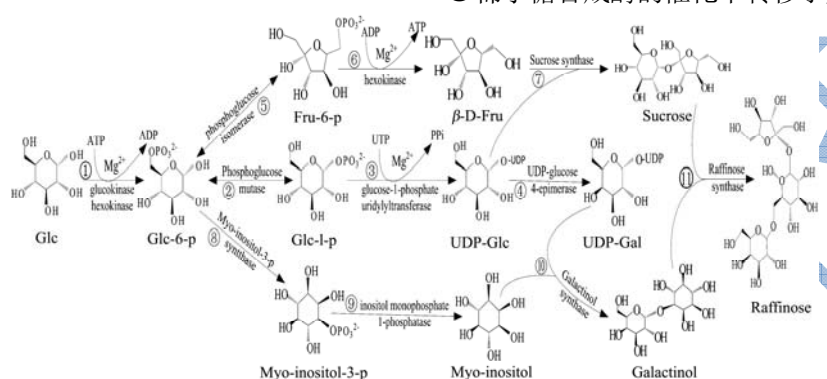


图 1 植物中棉子糖合成的理论途径

Fig.1 A theoretical outline of the raffinose biosynthesis pathway in plants

注: (1) 葡萄糖 (Glc) 经①葡萄糖激酶 (glucokinase) 或己糖激酶 (hexokinase) 磷酸化生成 6-磷酸葡萄糖 (Glc-6-P), 再经②磷酸葡萄糖变位酶 (phosphoglucose mutase) 转化为 1-磷酸葡萄糖 (Glc-1-P), 再经③1-磷酸葡萄糖尿苷酰转移酶 (glucose-1-phosphate uridylyltransferase) 催化生成 UDP-葡萄糖 (UDP-Glc), 然后经④UDP-葡萄糖-4-差向异构酶 (UDP-glucose-4-epimerase) 异构化后生成 UDP 半乳糖 (UDP-Gal); (2) 葡萄糖 (Glc) 经葡萄糖激酶 (glucokinase) 或己糖激酶 (hexokinase) 磷酸化生成 6-磷酸葡萄糖 (Glc-6-P), 再经⑤6-磷酸葡萄糖异构酶 (phosphoglucose isomerase) 催化生成 6-磷酸果糖 (Fru-6-P), 然后在己糖激酶 (hexokinase) 催化后生成 β -D-果糖 (β -D-Fru), 然后在⑦蔗糖合成酶 (Sucrose synthase) 催化下结合 UDP 半乳糖 (UDP-Gal) 上半乳糖基合成蔗糖 (Sucrose); (3) 葡萄糖 (Glc) 经①葡萄糖激酶 (glucokinase) 或己糖激酶 (hexokinase) 磷酸化生成 6-磷酸葡萄糖 (Glc-6-P), 经⑧3-磷酸肌醇合成酶 (Myo-inositol-3-phosphate synthase) 催化后生成 3-磷酸肌醇 (Myo-inositol-3-P), 再经⑨肌醇-1-磷酸激酶 (inositol monophosphate 1-phosphatase) 催化生成肌醇 (Myo-inositol); (4) UDP 半乳糖 (UDP-Gal) 与肌醇 (Myo-inositol) 在⑩肌醇半乳糖合成酶 (Galactinol synthetase) 的催化下合成肌醇半乳糖 (Galactinol); (5) 肌醇半乳糖 (Galactinol) 上半乳糖基在⑪棉子糖合成酶 (Raffinose synthetase) 催化下转移于蔗糖上最终合成棉子糖。

酿酒酵母为重要的食品工业菌种, 有几千年的安全应用历史, 可食用安全性好。在食源性代谢产品的生产上, 酿酒酵母比其它常用的代谢工程底盘微生物 (如大肠杆菌及枯草芽孢杆菌等) 更具安全性, 因此更适宜作为重构棉子糖生物合成途径的底盘菌种, 更有利于在工业化生产时通过食品安全性评估。分析酿酒酵母的基因组、酶及代谢途径数据库, 比较于上述棉子糖生物合成途径后发现, 酿酒酵母缺乏棉子糖合成途径中的肌醇半乳糖合成酶与棉子糖合成酶。在拟南芥、番茄、玉米等多种植物中均发现了肌醇半乳糖合成酶或棉子糖合成酶基因^[6]。其中以拟南芥的肌醇半乳糖合成酶基因 *gols1* 与 *gols3*^[7]及棉子糖合成酶基因 *sip1* 与 *sip5*^[8,9]研究最为透彻, 因此本研究选择它们

作为异源表达基因以实现棉子糖生物合成途径于酿酒酵母胞内重构。同时发现酿酒酵母中存在编码能降解棉子糖的蔗糖酶与 α -半乳糖苷酶的基因 *suc2*^[10]及 *mell*^[11], 为了积累目标产物棉子糖必须将它们敲除。

本研究首先敲除酿酒酵母中编码能降解棉子糖的蔗糖酶与 α -半乳糖苷酶的基因构建出 E1(Δ *suc2*:: Δ *mell*); 在此基础上, 构建单基因表达拟南芥肌醇半乳糖合成酶基因 *gols1* 与 *gols3* 及棉子糖合成酶基因 *sip1* 与 *sip5* 工程菌株, 及构建双基因组合表达 (*gols1*::*sip1*、*gols1*::*sip5*、*gols3*::*sip1* 与 *gols3*::*sip5*) 工程菌株; 分析比较工程菌株代谢产物如肌醇、UDP-半乳糖、肌醇半乳糖、蔗糖及棉子糖等生成情况, 验证在酿酒酵母中重构棉子糖生物合成途径的可行性。本研究首次

尝试在酿酒酵母中重构棉子糖生物合成途径，为后续高效生物合成棉子糖细胞工厂构建奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株及培养基

所用及与所构建的菌株与质粒如表 1 所示。pESC_{-LEU} 为真核表达基础质粒；在此基础上构建了单基因真核表达载体 *gols1::pESC_{-LEU}*、*gols3::pESC_{-LEU}*、*sip1::pESC_{-LEU}* 与 *sip5::pESC_{-LEU}*，用于构建相应的单基因真核表达工程菌；*gols1::sip1::pESC_{-LEU}*、*gols1::sip5::pESC_{-LEU}*、*gols3::sip1::pESC_{-LEU}* 与 *gols3::sip5::pESC_{-LEU}* 为所构建的双基因真核表达载体，用于构建相应的双基因真核共表达工程菌。pPICZαA::Cre 质

粒用于去除 Kan^R 筛选标记。具体质粒描述见表 1。

E. coli DH5α 用于质粒扩增与载体构建筛选；酿酒酵母 BY4741 (*his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) 为底盘菌株；E1 为所构建的酿酒酵母 BY4741 敲除 *suc2* 与 *mell1* 基因后的菌株；E2~E5 为以 E1 为宿主菌，分别转化所构建的 *gols1::pESC_{-LEU}*、*gols3::pESC_{-LEU}*、*sip1::pESC_{-LEU}* 与 *sip5::pESC_{-LEU}* 质粒载体后得到 *gols1*、*gols3*、*sip1* 与 *sip5* 单基因表达菌株；E6~E9 为本研究以 E1 为宿主菌，分别转化所构建的 *gols1::sip1::pESC_{-LEU}*、*gols1::sip5::pESC_{-LEU}*、*gols3::sip1::pESC_{-LEU}* 与 *gols3::sip5::pESC_{-LEU}* 双基因共表达质粒载体后得到的双基因真核表达工程菌；E6~E8 为本研究所构建的双基因真核共表达工程菌。具体菌株描述见表 1。

表 1 本研究所用及与所构建的菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Plasmids and strains	Description	Source
plasmids		
pESC _{-LEU}	Amp ^R , contains an auxotrophic selectable marker gene LEU2, contains the <i>S. cerevisiae</i> GAL1 and GAL10 promoters in opposing orientation.	Agilent
<i>gols1::pESC_{-LEU}</i>	inserting <i>gols1</i> gene from <i>Arabidopsis thaliana</i> into pESC _{-LEU}	This study
<i>gols3::pESC_{-LEU}</i>	inserting <i>gols3</i> gene from <i>Arabidopsis thaliana</i> into pESC _{-LEU}	This study
<i>sip1::pESC_{-LEU}</i>	inserting <i>sip1</i> gene from <i>Arabidopsis thaliana</i> into pESC _{-LEU}	This study
<i>sip5::pESC_{-LEU}</i>	inserting <i>sip5</i> gene from <i>Arabidopsis thaliana</i> into pESC _{-LEU}	This study
<i>gols1::sip1::pESC_{-LEU}</i>	inserting <i>gols1</i> and <i>sip1</i> genes from <i>Arabidopsis thaliana</i> into pESC _{-LEU}	This study
<i>gols1::sip5::pESC_{-LEU}</i>	inserting <i>gols1</i> and <i>sip5</i> genes from <i>Arabidopsis thaliana</i> into pESC _{-LEU}	This study
<i>gols3::sip1::pESC_{-LEU}</i>	inserting <i>gols3</i> and <i>sip1</i> genes from <i>Arabidopsis thaliana</i> into pESC _{-LEU}	This study
<i>gols3::sip5::pESC_{-LEU}</i>	inserting <i>gols3</i> and <i>sip5</i> genes from <i>Arabidopsis thaliana</i> into pESC _{-LEU}	This study
pUG6	as template for PCR amplify of loxP-Kan ^R MX-loxP sequence	novagen
pPICZαA::Cre	Zeo ^R , Cre recombinase, for removal of the selective marker Kan ^R	novagen
strains		
<i>E. coli</i>		
<i>E. coli</i> DH5α	F-φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (rK ⁻ mK ⁺) <i>deoR thi-1 phoA supE44λ- gyrA96 relA1</i>	Stratagene
<i>S. cerevisiae</i>		
BY4741	<i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	ATCC4003229
E1	BY4741 derivate, Δ <i>suc2::Δmell1</i>	This study
E2	E1 derivate, Δ <i>suc2::Δmell1, gols1::pESC_{-LEU}</i>	This study
E3	E1 derivate, Δ <i>suc2::Δmell1, gols3::pESC_{-LEU}</i>	This study
E4	E1 derivate, Δ <i>suc2::Δmell1, sip1::pESC_{-LEU}</i>	This study
E5	E1 derivate, Δ <i>suc2::Δmell1, sip5::pESC_{-LEU}</i>	This study
E6	E1 derivate, Δ <i>suc2::Δmell1, gols1::sip1::pESC_{-LEU}</i>	This study
E7	E1 derivate, Δ <i>suc2::Δmell1, gols1::sip5::pESC_{-LEU}</i>	This study
E8	E1 derivate, Δ <i>suc2::Δmell1, gols3::sip1::pESC_{-LEU}</i>	This study
E9	E1 derivate, Δ <i>suc2::Δmell1, gols3::sip5::pESC_{-LEU}</i>	This study

培养基: LB 培养基(酵母粉 0.5%, 蛋白胨 1%, NaCl 1%)用于 *E. coli* DH5 α 培养; LB(Amp)培养基(LB 培养基中添加 100 μ g/mL ampicillin)用于质粒扩增及质粒载体构建筛选; YPD 培养基(酵母粉 1%, 蛋白胨 2%, 葡萄糖 2%)用于酿酒酵母 BY4741 培养; YPD (G418)培养基(YPD, 400 μ g/mL G418)用于 E1 工程菌的阳性克隆筛选; YPD (Zeo+Gal)培养基(YPD, 20 μ g/mL zeocin 及 1%半乳糖), 用于 E1 工程菌的 Kan^R 基因(筛选标记)的去除时转化工具质粒 pPICZ α A::Cre 后阳性克隆的筛选; SD(Δ Leu)培养基(YNB 6.7%, 葡萄糖 2%, 补充除亮氨酸外其它氨基酸)用于工程菌株 E2-E9 的阳性克隆筛选。半乳糖诱导培养基(酵母粉 1%, 蛋白胨 2%, 半乳糖 2%)用于诱导工程菌株 E2-E9 的基因表达。

1.2 基因克隆

表 2 *gols1*、*gols3*、*sip1* 及 *sip5* 基因扩增引物

Table 2 Primers used for the RT-PCR amplification of genes

<i>gols1</i> , <i>gols3</i> , <i>sip1</i> , and <i>sip5</i>	
编码	引物序列 (5' to 3')
<i>gols1</i> -P1	atggctccggggcttactcaa
<i>gols1</i> -P2	tcaagcagcggagcgggtgcggt
<i>gols3</i> -P1	atggcactgagatgaacaac
<i>gols3</i> -P2	ctaagccgcggatggagctttg
<i>sip1</i> -P1	atgaccgttggtgccggaatc
<i>sip1</i> -P2	ttattgatgaccacgtccca
<i>sip5</i> -P1	atggcttcgccgtgtttg
<i>sip5</i> -P2	ctaaaacaaataactgaatagaag

依据 GENE BANK 上公布的拟南芥肌醇半乳糖合成酶 1 的基因序列 (*gols1*: NM_130286.2)、肌醇半乳糖合成酶 3 的基因序列 (*gols3*: NM_100805.1)、棉子糖合成酶 1 的基因序列 (*sip1*: NM_104450.3) 及棉子糖合成酶 5 的基因序列 (*sip5*: NM_123403.3), 分别设计基因扩增引物(如表 2 所示)。以拟南芥总 RNA 为模板, 用表 2 中相应的引物及 RT-PCR 试剂盒, RT-PCR 扩增出 *gols1*、*gols3*、*sip1* 及 *sip5* 基因。

1.3 单基因及双基因表达载体构建

带双酶切位点的基因扩增: 分别以 *gols1*、*gols3*、*sip1* 及 *sip5* 基因为模板, 用表 3 中相应的引物对常规 PCR 扩增出带双酶切位点的 *gols1*、*gols3*、*sip1* 及 *sip5* 基因片段。

单基因表达载体构建: 用 Not I 与 Spe I 分别双酶切上述 *gols1* 与 *gols3* 基因片段, 然后用 T4 连接酶分别与经相应双酶切的 pESC-LEU 质粒连接, 分别转化于

感受态 *E. coli* DH5 α 中, 用 LB(Amp)平板筛选阳性克隆, 经质粒扩增、质粒抽提、Not I 与 Spe I 双酶切鉴定及测序验证后得到 *gols1*::pESC-LEU 与 *gols3*::pESC-LEU 单基因表达载体。同理, 分别用 Xho I 与 Nhe I 双酶切上述 *sip1*、*sip5* 基因后, 分别与相应双酶切的 pESC-LEU 质粒连接, 经转化、筛选阳性克隆、质粒扩增、质粒抽提、双酶切鉴定及测序验证等常规分子生物学操作后, 得到 *sip1*::pESC-LEU 与 *sip5*::pESC-LEU 单基因表达载体。

表 3 单基因及双基因表达载体构建所用的引物

Table 3 Primers used for the construction of single-gene and double-gene expression vectors

编号	引物序列 (5' to 3')
P1- <i>gols1</i> (Not I)	cgcggccgcatggctccgggcttactcaa
P1- <i>gols1</i> (Spe I)	cgcactagtccaagcagcggagcgggtgcggtca
P1- <i>gols3</i> (Not I)	cgcggccgcatggcactgagatgaacaacaag
P2- <i>gols3</i> (Spe I)	cgcactagtccaagccgcggatggagcttt
P1- <i>sip1</i> (Xho I)	cgctcagatgaccgttggtgccggaatca
P2- <i>sip1</i> (Nhe I)	cgcgtagcctattattgatgaccacgctc
P1- <i>sip5</i> (Xho I)	cgctcagatgaccttcgccgtgtttgacc
P2- <i>sip5</i> (Nhe I)	cgcgtagcctaaaacaaataactgaatagaag

双基因表达载体构建: 将构建得到的 *gols1*::pESC-LEU 质粒用 Xho I 与 Nhe I 双酶切后, 分别与经 Xho I 与 Nhe I 双酶的 *sip1* 及 *sip5* 基因连接, 经转化、阳性克隆、质粒扩增、质粒抽提、双酶切鉴定及测序验证等常规分子生物技术操作后, 得到 *gols1*::*sip1*::pESC-LEU 与 *gols1*::*sip5*::pESC-LEU 双基因共表达质粒载体。同理, 以 *gols3*::pESC-LEU 质粒为基础, 参考上述方法, 用酶切连接方法得到 *gols3*::*sip1*::pESC-LEU 与 *gols3*::*sip5*::pESC-LEU。

1.4 构建 E1(Δ suc2:: Δ mell)工程菌

融合 PCR 构建基因敲除工具 DNA 片段: 依据 GENE BANK 上公布的酿酒酵母基因组序列 (*S. cerevisiae* S288c)、蔗糖酶 *suc2* 基因序列 (ID 854644) 及 α -半乳糖苷酶 *mell* 基因序列 (FR 750554.1), 设计出融合 PCR 构建 *suc2* 基因及 *mell* 基因敲除工具 DNA 片段所用及的引物, 见表 4。融合 PCR 构建 *suc2* 基因及 *mell* 基因敲除工具 DNA 片段策略如图 2 所示。第一轮 PCR: 以酿酒酵母 BY4741 基因组 DNA 为模板, 用相应引物对, 分别 PCR 扩增 *suc2* 基因上下游序列 (1:UP_{suc2-5'} 及 3:DW_{suc2-3'}) 及 *mell* 基因上下游序 (5:UP_{mell-5'} 及 7:DW_{mell-3'}); 以质粒 PUG6 为模板, 用相应引物对, 分别 PCR 扩增两端带 loxP 位点及相应同源序列的 Kan^R 表达盒 (2:loxP-Kan^RMX-loxP 及

6:loxP-Kan^RMX-loxP); 常规 50 μL PCR 体系, PCR 程序为: 98 °C, 5 min; (98 °C, 30 s; 58 °C, 45 s; 72 °C, 1 min), 30 个循环; 72 °C, 10 min。第二轮 PCR: 以 1:UP_{suc2-5'}、2:loxP-Kan^RMX-loxP 及 3:DW_{suc2-3'} 各 1 μL 混合后作为模板, 用引物 P1 与 P6, 扩增出融合 DNA 片段 4:UP_{suc2-5'}-loxP-Kan^RMX-loxP-DW_{suc2-3'}, 用于 *suc2* 基因敲除; 同理, 以 5:UP_{mell-5'}、6:loxP-

Kan^RMX-loxP 及 7:DW_{mell-3'} 各 1 μL 混合后作为模板, 用引物 P7 与 P12, 扩增出融合 DNA 片段 8:UP_{mell-5'}-loxP-Kan^RMX-loxP-DW_{mell-3'}, 用于 *mell* 基因敲除; 常规 50 μL PCR 体系, PCR 程序为: 98 °C, 5 min; (98 °C, 30 s; 58 °C, 45 s; 72 °C, 3 min 30 s), 30 个循环; 72 °C, 10 min。

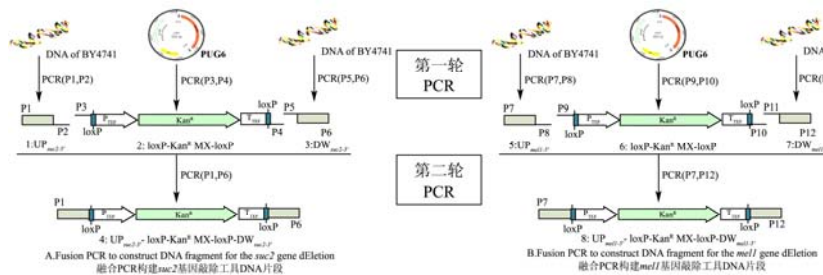


图 2 融合 PCR 构建 *suc2* 基因及 *mell* 基因敲除工具 DNA 片段

Fig.2 Fusion PCR to construct DNA fragment for deletion of *suc2* gene and *mell* genes

表 4 融合 PCR 构建 *mell* 基因敲除 DNA 片段所用的引物
Table 4 Primers used for fusion PCR to construct the DNA fragment for deletion of genes *suc2* and *mell*

编号	引物序列 (5'-3')
P1	tacgttagaagccacag
P2	aagcttcagctggcgccgccatatactagtgaaaga
P3	tctttcactaacgtatattgcccgcagctgaagctt
P4	ctgtggccttctaactagtagcggccgcatagccactag
P5	ctagtgccatgcccgcctactgtagaaagccacag
P6	catatacttagtgaaaga
P7	gtcagcttctaagtaaacac
P8	ttcagctggcggcggcttcaagaaattatcgaaaacctt
P9	aaggtttcagataatttctgaacgcggccgccagctgaa
P10	gcaaaaaacaattgttcgacctacatgttcttctcg
P11	cgcaggaaagaacatgtgaggtcgaacaattgtttttgc
P12	ggatcccagatttctcag

同源重组与阳性克隆筛选及鉴定: 将 *suc2* 基因敲除敲除工具 DNA 片段 (4:UP_{suc2-5'}-loxP-Kan^RMX-loxP-DW_{suc2-3'}) 及 *mell* 基因敲除敲除工具 DNA 片段 (8:UP_{mell-5'}-loxP-Kan^RMX-loxP-DW_{mell-3'}) 1:1 混合, 用 LiAc 转化方法转化于感受态 BY4741 中, 用 YPD (G418) 平板筛选阳性克隆; 挑取阳性克隆于 YPD (G418) 培养基中扩大培养后, 提取 DNA 作为模板, 分别用 *suc2* 基因检测引物对 (P1_{suc2}: 5'-atgctttt gcaagctttc-3' 及 P2_{suc2}: 5'-ctattttactcccttac-3') 及 *mell* 基因检测引物对 (P1_{mell}: 5'-atgtttgctttctacttttca-3' 及 P2_{mell}: 5'-tcaagaagagggtctcaac-3') 进行 PCR 验证, PCR 检测双阴性为正确的 Δ*suc2*::Δ*mell* 克隆。

Kan^R 筛选标记去除: 将工具质粒 pPICZaA::Cre

用 LiAc 转化方法转化于感受态 Δ*suc2*::Δ*mell* 菌株中, 用 YPD (Zeo+Gal) 平板筛选阳性克隆, 用 YPD 培养基传代 3-5 代使 pPICZaA::Cre 工具质粒丢失, 涂布 YPD (G418) 平板验证为阴性证实 Kan^R 筛选标记已经去除, 得到 E1(Δ*suc2*::Δ*mell*) 工程菌。

1.5 单基因及双基因表达工程菌株构建与鉴定

将所构建的单基因表达载体 (*gols1*::pESC_{LEU}、*gols3*::pESC_{LEU}、*sip1*::pESC_{LEU} 与 *sip5*::pESC_{LEU}) 及双基因共表达载体 (*gols1*::*sip1*::pESC_{LEU}、*gols1*::*sip5*::pESC_{LEU}、*gols3*::*sip1*::pESC_{LEU} 与 *gols3*::*sip5*::pESC_{LEU}) 用 LiAc 转化方法分别转化于感受态 E1(Δ*suc2*::Δ*mell*) 中, 用 SD(ΔLeu) 培养基筛选阳性克隆。分别挑取阳性克隆, 于 YPD 培养基中, 30 °C、150 r/min 培养 48 h 后, 离心收集菌体转接于半乳糖诱导培养基中 30 °C、150 r/min 培养 12 h 诱导基因表达。离心收集菌体, 提取诱导表达后菌体中的总 RNA, RT-PCR 检测基因转录情况, RT-PCR 检测为阳性, 则表明单基因及双基因表达工程菌株构建成功。其中, 诱导表达后菌株基因转录的 RT-PCR 检测所用引物及具体方法参考 1.1; 特别是对双基因工程菌株 (E6-E9) 诱导表达后的基因转录检测, 用相应的两个基因克隆引物对混合后, 进行混合引物 RT-PCR 对两个相应基因转录情况实施同管检测。

1.6 工程菌诱导表达与发酵及棉子糖合成途径代谢产物检测

分别挑取平板上 E2-E8 工程菌株单克隆, 于 5 mL YPD 培养基中 30 °C、150 r/min 培养 48 h; 然后按 10% 接种量转接于 50 mL YPD 培养基中, 30 °C、150 r/min 培养 48 h; 离心收集菌体转接于半乳糖诱导培养基中, 30 °C、150 r/min 培养 12 h 诱导基因表达; 然后补充增加 20% 葡萄糖 5 mL, 30 °C、150 r/min 继续培养 24 h 后, 取样离心去菌体, 预处理上清后上 HPCL 检测棉子糖合成途径相关代谢产物生成情况。BY4741 及 E1($\Delta suc2::\Delta mel1$) 菌株按同样条件发酵及预处理后, 上 HPCL 检测棉子糖合成途径相关代谢产物生成情况作为对照。

1.7 HPLC 分析

HPLC 分析标准品 (肌醇、UDP-半乳糖、肌醇半乳糖、蔗糖及棉子糖) 购自中国国药集团 (北京) 及

Sigma 公司 (北京)。HPLC 系统为 Agilent technologies 1200 series。检测条件与参数为: sugar-ParTM 色谱柱 (6.5×300 mm), 柱温 80 °C, 流动相为去离子水, 流速 0.4 mL/min, 折光示差检测器。

2 结果与讨论

2.1 基因克隆结果

以拟南芥的总 RNA 为模板, 肌醇半乳糖合成酶 1 基因 (*gols1*)、肌醇半乳糖合成酶 3 基因 (*gols3*)、棉子糖合成酶 1 基因 (*sip1*) 及棉子糖合成酶 5 的基因 (*sip5*) RT-PCR 结果如图 3 所示。其中, *gols1* 基因为 1035 bp, *gols3* 基因为 1005 bp, *sip1* 基因为 2265 bp, *sip5* 基因为 2352 bp, 电泳结果符合预期。

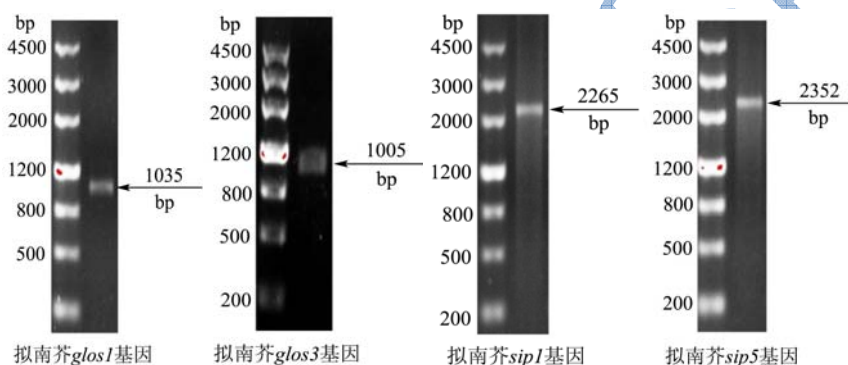


图 3 拟南芥肌醇半乳糖合成酶 (1 与 3) 及棉子糖合成酶 (1 与 5) 基因的 RT-PCR 结果

Fig.3 RT-PCR results on genes *gols1*, *gols3*, *sip1*, and *sip5* from *A. thaliana*

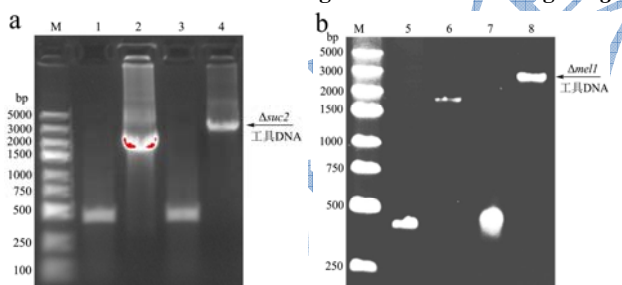


图 4 融合 PCR 构建 *suc2* 基因及 *mel1* 基因敲除工具 DNA 片段的

结果

Fig.4 Construction of the DNA fragment (by fusion PCR) for the deletion of genes *suc2* and *mel1*

注: a, 融合 PCR 构建 *suc2* 基因敲除工具 DNA 片段; M: Maker; 1: UP_{*suc2-5'*}; 2: loxP-Kan^RMX-loxP; 3: DW_{*suc2-3'*}; 4: UP_{*suc2-5'*}-loxP-Kan^RMX-loxP-DW_{*suc2-3'*}。 b, 融合 PCR 构建 *mel1* 基因敲除工具 DNA 片段; M: Maker; 5: UP_{*mel1-5'*}; 6: loxP-Kan^RMX-loxP; 7: DW_{*mel1-3'*}; 8: UP_{*mel1-5'*}-loxP-Kan^RMX-loxP-DW_{*mel1-3'*}。

2.2 E1($\Delta suc2::\Delta mel1$) 工程菌的构建结果

图 4a 为酿酒酵母蔗糖酶 *suc2* 基因敲除工具 DNA 片段构建的琼脂糖电泳图, 其中 1:UP_{*suc2-5'*}、2:loxP-Kan^RMX-loxP 与 3:DW_{*suc2-3'*} 为第一轮 PCR 结果, 片段大小符合预期; 4:UP_{*suc2-5'*}-loxP-Kan^RMX-loxP-DW_{*suc2-3'*} 为第二轮 PCR 融合 1:UP_{*suc2-5'*}、2:loxP-Kan^RMX-loxP 与 3:DW_{*suc2-3'*} 所得到的最终片段, 电泳结果表明大小符合预期。图 4b 为酿酒酵母 α -半乳糖苷酶 *mel1* 基因敲除工具 DNA 片段构建的琼脂糖电泳图, 其中 5:UP_{*mel1-5'*}、6:loxP-Kan^RMX-loxP 与 7:DW_{*mel1-3'*} 为第一轮 PCR 结果, 片段大小符合预期; 8:UP_{*mel1-5'*}-loxP-Kan^RMX-loxP-DW_{*mel1-3'*} 为第二轮 PCR 融合 5:UP_{*mel1-5'*}、6:loxP-Kan^RMX-loxP 与 7:DW_{*mel1-3'*} 所得到的最终片段, 电泳结果表明大小符合预期。

suc2 基因敲除工具 DNA 片段 (4:UP_{*suc2-5'*}-loxP-Kan^RMX-loxP-DW_{*suc2-3'*}) 及 *mel1* 基因敲除工具 DNA 片段 (8:UP_{*mel1-5'*}-loxP-Kan^RMX-loxP-DW_{*mel1-3'*}) 1:1 混合, 用 LiAc 转化方法转化于感受态 BY4741 中进行同源重组, 用 YPD (G418) 平板筛选阳性克隆; 将阳性克隆扩大培养后提取 DNA 用为模板, 分别用

suc2 基因检测引物对及 *mell1* 基因检测引物对进行 PCR 验证, PCR 检测结果如图 5 所示。检测结果表明, 克隆 1 只敲除了 *suc2* 基因, 克隆 2 只敲除了 *mell1* 基因, 克隆 3 为 *suc2* 与 *mell1* 基因双敲除。因为本研究中同时将 *suc2* 基因敲除工具 DNA 片段 (4:UP_{*suc2*}-5'-loxP-Kan^RMX-loxP-DW_{*suc2*}-3') 及 *mell1* 基因敲除工具 DNA 片段 (8:UP_{*mell1*}-5'-loxP-Kan^RMX-loxP-DW_{*mell1*}-3') 1:1 混合转化进行同源重组, 以达到 *suc2* 与 *mell1* 基因双敲除目的, 所以会存在筛选的阳性克隆可能只实现 *suc2* 或 *mell1* 基因被单敲除的情况。本研究中随机检测三个克隆, 获得一个 *suc2* 与 *mell1* 基因双敲除的克隆 (克隆 3)。

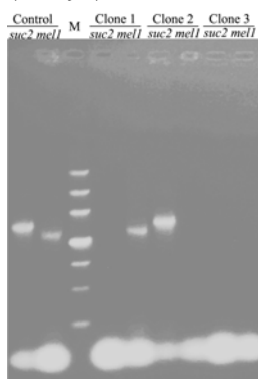


图 5 *suc2* 基因及 *mell1* 基因敲除检测结果

Fig.5 Results on detection of deletion of genes *suc2* and *mell1*

注: 以基因组 DNA 为模板, PCR 检测 *suc2* 及 *mell1* 基因敲除。Control 为出发菌株对照, *suc2* 及 *mell1* 基因均能检出; 筛选得到的克隆 1 检出了 *mell1* 基因没有检出 *suc2* 基因, 说明克隆 1 只敲除了 *suc2* 基因; 克隆 2 检出了 *suc2* 基因没有检出 *mell1* 基因, 说明克隆 2 只敲除了 *mell1* 基因; 克隆 3 没有检出 *suc2* 基因及 *mell1* 基因, 说明克隆 3 实现了 *suc2* 基因及 *mell1* 基因的敲除, 为目标阳性克隆。

将工具质粒 pPICZαA::Cre 用 LiAc 转化方法转化于感受态 Δ*suc2*::Δ*mell1* 菌株 (克隆 3) 中, 用 YPD (Zeo+Gal) 平板筛选阳性克隆, 用 YPD 培养基传代 3-5 代使 pPICZαA::Cre 工具质粒丢失, 涂布 YPD (G418) 平板验证为阴性, 证实 Kan^R 筛选标记已经去除, 得到 E1(Δ*suc2*::Δ*mell1*) 工程菌。

2.3 单基因及双基因表达工程菌的构建结果

表达载体的双酶切及测序验证: 所构建得到的单基因真核表达载体 *gols1*::pESC_{LEU}、*gols3*::pESC_{LEU}、*sip1*::pESC_{LEU} 与 *sip5*::pESC_{LEU}, 及双基因真核表达载体 *gols1*::*sip1*::pESC_{LEU}、*gols1*::*sip5*::pESC_{LEU}、*gols3*::*sip1*::pESC_{LEU} 与 *gols3*::*sip5*::pESC_{LEU} 的双酶切检测电泳结果如图 6 所示。结果表明, 酶切得到的相应片段大小符合预期, 表明所构建的单基因及双基因

真核表达载体上相应基因插入正确。同时所构建得到的单基因及双基因真核表达载体的测序结果也表明, 所构建的载体正确。

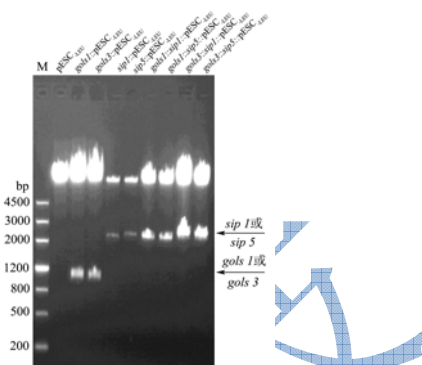


图 6 所构建的基因表达载体的双酶切检测结果

Fig.6 Results on double-enzyme digestion of the constructed gene expression vectors

注: 空载体 pESC_{LEU}、*gols1*::pESC_{LEU} 及 *gols3*::pESC_{LEU} 用 Not I 与 Spe I 双酶切; *sip1*::pESC_{LEU} 与 *sip5*::pESC_{LEU} 用 Xho I 与 Nhe I 双酶切; 在 *gols1*::pESC_{LEU} 及 *gols3*::pESC_{LEU} 基础上构建的双基因真核表达载体 *gols1*::*sip1*::pESC_{LEU}、*gols1*::*sip5*::pESC_{LEU}、*gols3*::*sip1*::pESC_{LEU} 与 *gols3*::*sip5*::pESC_{LEU} 用 Xho I 与 Nhe I 双酶切。双酶切检测后送测序结果亦表明所构建表达载体正确。

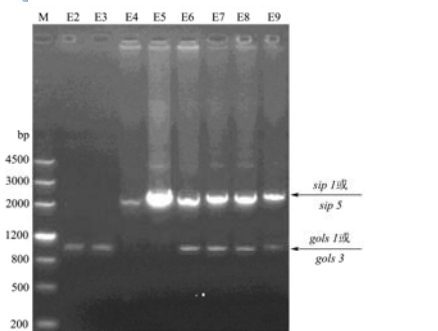


图 7 诱导表达后工程菌株的基因转录 RT-PCR 检测结果

Fig.7 RT-PCR analysis of gene transcription in the engineered strains after induced gene expression

注: E2~E5 为拟南芥肌醇半乳糖合成酶或棉子糖合成酶单基因表达菌株, 其中 E2(Δ*suc2*::Δ*mell1*::*gols1*), E3(Δ*suc2*::Δ*mell1*::*gols3*), E4(Δ*suc2*::Δ*mell1*::*sip1*), E5(Δ*suc2*::Δ*mell1*::*sip5*); E6-E9 为拟南芥肌醇半乳糖合成酶及棉子糖合成酶双基因共表达菌株, 其中 E6(Δ*suc2*::Δ*mell1*::*gols1*::*sip1*), E7(Δ*suc2*::Δ*mell1*::*gols1*::*sip5*), E8(Δ*suc2*::Δ*mell1*::*gols3*::*sip1*), E9(Δ*suc2*::Δ*mell1*::*gols3*::*sip5*)。

转化筛选及诱导表达后 RT-PCR 检测基因转录: 将所构建得到的单基因及双基因真核表达载体分别转化于 E1(Δ*suc2*::Δ*mell1*) 菌株中, 经 SD(ΔLeu) 培养基筛选得到相应的单基因及双基因表达工程菌; 诱导基因表达后, 分别提取单基因及双基因表达工程菌的总

RNA, RT-PCR 检测工程菌株的基因转录情况, 结果如图 7 所示。结果表明, 单基因及双基因表达工程菌的相应基因均得到了有效的转录。

2.4 棉子糖及中间代谢产物分析结果

工程菌诱导表达与发酵后棉子糖合成途径代谢产物检测结果如表 5 所示。原始菌株 BY4741 及敲除蔗糖酶基因与 α -半乳糖苷酶基因的 E1(Δ suc2:: Δ mell)菌株均无肌醇半乳糖与棉子糖生成, 证实了原始酿酒酵母中缺乏肌醇半乳糖及棉子糖合成通路; 异源表达肌醇半乳糖合成酶基因 (来源于拟南芥) 的 E2(Δ suc2:: Δ mell::gols1) 与 E3(Δ suc2:: Δ mell::gols3) 均

有肌醇半乳糖生成而且无棉子糖生成, 说明可通过引入外源肌醇半乳糖合成酶基因在酿酒酵母中构建肌醇半乳糖合成通路; 异源表达棉子糖合成酶基因 (来源于拟南芥) 的菌株 E4(Δ suc2:: Δ mell::sip1) 与 E5(Δ suc2:: Δ mell::sip5) 均无肌醇半乳糖与棉子糖生成, 说明只引入外源棉子糖合成酶基因, 无法重构棉子糖合成通路; 共表达外源肌醇半乳糖合成酶基因与棉子糖合成酶基因的菌株 E6(Δ suc2:: Δ mell::gols1::sip1)、E6(Δ suc2:: Δ mell::gols1::sip1)、E8(Δ suc2:: Δ mell::gols3::sip1) 及 E9(Δ suc2:: Δ mell::gols3::sip5) 则均检测到肌醇半乳糖及棉子糖的生成, 证实了在酿酒酵母中重构棉子糖生物途径的可行性。

表 5 诱导表达及发酵后棉子糖及中间代谢产物分析结果

Table 5 Results of the analysis of raffinose and the intermediate metabolites after induced expression and fermentation

菌株	UDP-半乳糖/(g/L)	肌醇/(g/L)	蔗糖/(g/L)	肌醇半乳糖/(g/L)	棉子糖/(g/L)
BY4741	2.14±0.36	1.18±0.54	0.89±0.38	0	0
E1(Δ suc2:: Δ mell)	3.16±0.42	2.21±0.38	1.57±0.52	0	0
E2(Δ suc2:: Δ mell::gols1)	2.26±0.21	2.54±0.35	2.05±0.42	2.15±0.29	0
E3(Δ suc2:: Δ mell::gols3)	2.98±0.16	2.75±0.24	1.69±0.27	1.73±0.21	0
E4(Δ suc2:: Δ mell::sip1)	2.65±0.42	2.06±0.38	1.87±0.28	0	0
E5(Δ suc2:: Δ mell::sip5)	2.92±0.16	1.78±0.26	1.95±0.17	0	0
E6(Δ suc2:: Δ mell::gols1::sip1)	2.32±0.17	1.24±0.22	1.67±0.16	1.30±0.13	1.28±0.16
E7(Δ suc2:: Δ mell::gols1::sip5)	2.82±0.32	1.67±0.15	1.27±0.18	1.65±0.28	1.02±0.19
E8(Δ suc2:: Δ mell::gols3::sip1)	2.37±0.26	1.57±0.26	1.54±0.20	1.28±0.32	0.98±0.15
E9(Δ suc2:: Δ mell::gols3::sip5)	2.35±0.27	1.43±0.18	1.85±0.25	1.15±0.16	0.86±0.18

注: 数据为三次诱导表达及发酵试验的均值。

同时也发现, 敲除蔗糖酶基因与 α -半乳糖苷酶基因的 E1(Δ suc2:: Δ mell)菌株比较于原始菌株 BY4741, UDP-半乳糖 (由 2.14 g/L 提高到 3.16 g/L)、肌醇 (由 1.18 g/L 提高到 2.21 g/L) 与蔗糖 (由 0.89 g/L 提高到 1.57 g/L) 等中间代谢产物的积累量均有提高; 单独异源表达 2 种不同的肌醇半乳糖合成酶基因 (拟南芥 *gols1* 及 *gols3*), 除了肌醇半乳糖生成量有差异外 (*gols1*: 2.15 g/L; *gols3*: 1.73 g/L), 各种检测的中间代谢产物积累量也有差异; 2 种肌醇半乳糖合成酶基因与 2 种棉子糖合成酶基因不同组合共表达, 除了中间代谢产物积累量存在差异外, 目标产物棉子糖的生成量也存在差异 (以 *gols1*::*sip1* 组合为最高, 棉子糖生成量达 1.28 g/L)。上述结果说明, 重构的棉子糖生物合成途径改变了酿酒酵母原始菌株的代谢流量; 并且外源肌醇半乳糖合成酶及棉子糖合成酶基因的表达及合适组合是高效积累棉子糖的关键。

3 结论

3.1 通过共表达外源肌醇半乳糖合成酶及棉子糖合

成酶基因 (来源于拟南芥), 并敲除能降解棉子糖的蔗糖酶与 α -半乳糖苷酶的基因, 在酿酒酵母中实现了棉子糖生物合成途径的重构。

3.2 共表达不同的肌醇半乳糖合成酶及棉子糖合成酶基因组合, 棉子糖生成量有差异。因此在后续构建高效生物合成棉子糖细胞工厂的研究工作中, 要特别注意研究它们的共表达组合与配比, 以达到棉子糖更高积累。

3.3 重构的棉子糖生物合成途径改变了酿酒酵母原始菌株的代谢流量。因此在后续构建高效生物合成棉子糖细胞工厂的研究工作中, 要重点研究重构的棉子糖生物合成途径代谢流量的系统性调控机制, 以达到棉子糖更高效生物合成。

参考文献

- [1] ElSayed A I, Rafudeen M S, Gollack D. Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress [J]. Plant Biology, 2014, 16(1): 1-8

- [2] Pacifici S, Song J, Zhang C K, et al. Evaluating the effect of plant origin prebiotics (raffinose and stachyose) on iron status, intestinal functionality and intestinal bacterial populations *in vivo* [J]. The FASEB Journal, 2016, 30(1 Supplement): 692.17
- [3] Van den Ende W. Multifunctional fructans and raffinose family oligosaccharides [J]. Frontiers in Plant Science, 2013, 4(4): 247
- [4] 朱庆莉,兰宏兵,云志.双液相溶剂浸出棉籽中棉子糖和棉酚的工艺[J].南京工业大学学报(自然科学版),2014,36(4): 114-117
ZHU Qing-li, LAN Hong-bing, YUN Zhi. Cogeneration of raffinose and gossypol from cottonseeds with two-phase solvent [J]. Journal of Nanjing Tech University (natural science edition), 2014, 36(4): 114-117
- [5] 李芳,汪晓峰.植物中棉子糖系列寡糖代谢及其调控关键酶研究进展[J].西北植物学报,2008,28(4):852-859
LI Fang, WANG Xiao-feng. Advance in raffinose family oligosaccharides metabolism and key enzymes in plant and its regulation [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2008, 28(4): 852-859
- [6] Sengupta S, Mukherjee S, Basak P, et al. Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants [J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 656
- [7] Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, et al. Important roles of drought and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Journal, 2002, 29(4): 417-426
- [8] *Arabidopsis* interactome mapping consortium: evidence for network evolution in an *Arabidopsis* interactome map [J]. Science, 2011, 333(6042): 601-607
- [9] Egert A, Keller F, Peters S. Abiotic stress-induced accumulation of raffinose in *Arabidopsis* leaves is mediated by a single raffinose synthase (RS5, At5g40390) [J]. BMC Plant Biology, 2013, 13(1): 285-288
- [10] Wang S A, Li F L. Invertase SUC2 is the key hydrolase for inulin degradation in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(1): 403-406
- [11] Naumova E S, Sadykova A Z, Martynenko N N, et al. Molecular genetic characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* distillers' yeasts [J]. Microbiology, 2013, 82(2): 175-185