

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017 年 8 月 24 日 (24.08.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/139959 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/01 (2006.01) *C12R 1/645* (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/074067
- (22) 国际申请日: 2016 年 2 月 18 日 (18.02.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 天津大学 (TIANJIN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国天津市南开区卫津路 92 号天津大学邹少兰, Tianjin 300072 (CN)。
- (72) 发明人: 邹少兰 (ZOU, Shaolan); 中国天津市津南区白万路 85 号天津大学北洋园校区 54-208 邹少兰, Tianjin 300072 (CN)。高文萱 (GAO, Wenxuan); 中国天津市津南区白万路 85 号天津大学北洋园校区 54-208 邹少兰, Tianjin 300072 (CN)。胡芸 (HU, Yun); 中国天津市津南区白万路 85 号天津大学北洋园校区 54-208 邹少兰, Tianjin 300072 (CN)。杨顺华 (YANG, Shunhua); 中国天津市津南区白万路

85 号天津大学北洋园校区 54-208 邹少兰, Tianjin 300072 (CN)。马平生 (MA, Pingsheng); 中国天津市津南区白万路 85 号天津大学北洋园校区 54-208 邹少兰, Tianjin 300072 (CN)。

(74) 代理人: 北京中政联科专利代理事务所 (普通合伙) (BEIJING LINKAW PATENT ATTORNEY LAW FIRM); 中国北京市昌平区北清路 1 号珠江摩尔国际大厦 6 号楼 2 单元 309 陈超, Beijing 102206 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

[见续页]

(54) Title: HIGH CAMP YIELDING YEAST STRAIN AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种高产 cAMP 的酵母菌株及其应用

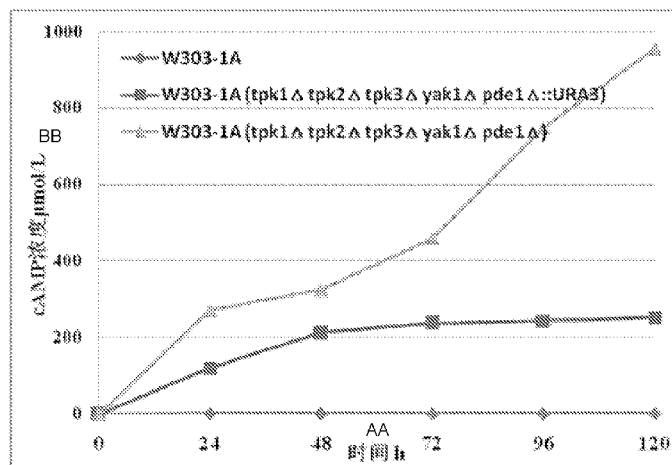


图 2

AA TIME

BB CAMP CONCENTRATION

(57) Abstract: Disclosed are a high cyclic adenosine monophosphate (cAMP) yielding yeast strain and a construction method therefor. The method comprises constructing *Saccharomyces cerevisiae* deficient in both protein kinase A catalytic subunit encoding genes TPK1, TPK2, TPK3 and protein kinase encoding gene YAK1. The method also comprises further deleting phosphodiesterase encoding gene PDE1 and the encoding genes of transcription factors Bas1 and Bas2 in the yeast strain on the basis of the deletion of the four genes mentioned above. The recombinant yeast strain can produce extracellular cAMP more efficiently in relation to a yeast strain without genetic modifications.

(57) 摘要: 一种高产环磷酸腺苷 (cAMP) 的酵母菌株及其构建方法, 所述方法为构建同时缺失蛋白激酶 A 催化亚基编码基因 TPK1、TPK2、TPK3 和蛋白激酶编码基因 YAK1 的酿酒酵母; 还可以在缺失上述 4 种基因的基础上使所述酵母菌株再缺失磷酸二酯酶编码基因 PDE1 及转录因子 Bas1 和 Bas2 的编码基因; 所述重组酵母菌株相对于未经基因修饰的酵母菌株而言, 能更高效地生产胞外 cAMP。



WO 2017/139959 A1



(84) **指定国** (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ,

CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

一种高产 cAMP 的酵母菌株及其应用

技术领域

本发明属于基因工程和微生物发酵技术领域，具体涉及一种能过量合成胞外 cAMP 的酵母菌株及其构建方法、发酵工艺与在医药、畜牧业、食品或化工领域中的应用。

背景技术

环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, 简称 cAMP) 是人体内广泛存在的一种具有生理活性的重要物质，其作为细胞内的第二信使，对糖代谢、脂肪代谢、核酸合成、蛋白质合成等起着重要的调节作用。目前 cAMP 在医药方面用途广泛：临床上 cAMP 用于治疗心绞痛、心肌梗死、心肌炎及心源性休克等；对改善风湿性心脏病的心悸、气急、胸闷等症状有一定的作用；可提高急性白血病结合化疗的疗效，亦可用于急性白血病的诱导缓解；此外，对老年慢性支气管炎、各种肝炎和银屑病也有一定疗效。cAMP 也可作为药物中间体制备二丁酰环磷腺苷和环磷腺苷葡甲胺，提高脂溶性，从而发挥更有效的生理及药理作用。cAMP 还可用作畜禽食品添加剂，在离体条件下模拟生长激素的作用，促进畜禽生长，增加优质禽产品产量。

cAMP 的生产方法有化学合成法、酶促转化法和发酵法三种。目前国内外产业化生产全部采用以腺苷一磷酸 (Adenosine-5'-monophosphate, 简称 AMP) 为原料的化学合成法，其采用高效分离柱进行中间体分离，操作复杂，且所涉及的试剂昂贵，采用大量的吡啶作为溶剂也造成严重的环境污染。酶促转化法即以腺苷酸环化酶 (E. C. 4. 6. 1. 1, Cyr1p) 为酶源催化 ATP 原料一步生产 cAMP，但此法存在底物昂贵、腺苷酸环化酶含量低、纯化困难、稳定性差等限制，故目前还局限于实验室阶段，离产业化还有相当的距离。相比之下，微生物发酵法生产 cAMP 具有如下的一些优点：条件温和、工艺简单、能利用廉价的碳源，副产物少、环境污染小，可实现持续生产等等，是有潜力的、值得大力开发的工艺。

目前利用液化短杆菌、微杆菌、棒状杆菌、节杆菌、大肠杆菌等细菌发酵法生产 cAMP 已有一定的研究，但面临重复性差、产量不稳定、成本高、难以工业化等问题。而酵母尤其是酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 作为最重要的工业微生物之一，不仅具有工业化应用技术成熟、抗逆性强、为食品安全性 GRAS 微生物的优点，同时作为最早实现全基因组测序的微生物菌种，又是分子生物学和遗传学研究的最重要模式生物之一，cAMP 信号通路及其调控相关的基础研究深入，遗传操作技术手段完善。遗憾的是目前国内外的研究都集中于胞内 cAMP 的信号调控功能，还没有将其作为一个产品从而关注胞外生产情况的专门研究。若研究酵母胞外 cAMP 产生规律，并通过基因工程手段改造实现以过量生产胞外 cAMP 酵母为菌种的发酵法生产，将极大地降低成本、简化工艺，从而为微生物发酵生产 cAMP 开辟新的途径，推动高值医药和生化产品的绿色清洁生产，具有重要的经济价值和社会意义。

发明内容

3.1 发明概述 Brief Summary of the Invention

本发明的目的是克服上述现有技术存在的不足，提供一种容易培养、适合大规模发酵生产并易于实现产业化的、经过遗传改造而能过量合成胞外 cAMP 的酵母菌株，构建此菌株的重组方法及应用。具体地，

本发明提供一种酵母菌株，此酵母菌株经过了第一种和第二种基因修饰，其中，所述第一种基因是蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 催化亚基编码基因 *TPK1*，*TPK2* 和 *TPK3*，通过修饰第一种基因使 PKA 活性或表达被完全抑制，从而消除对 cAMP 的反馈抑制，但同时使得酵母的生长被抑制，第二种基因修饰消除了第一种基因修饰导致的生长抑制，从而使得酵母能够正常生长，所述酵母的 cAMP 产量上升，其中，所述 cAMP 产量上升，是相对于未经基因修饰的酵母的 cAMP 产量而言的。

优选的，所述第二种基因包括但不限于蛋白激酶 Rim15 编码基因 *RIM15*、转录因子 Msn1/Msn2 编码基因 *MSN1/MSN2*、蛋白激酶 Yak1 编码基因 *YAK1* 或蛋白激酶 Sch9 编码基因 *SCH9*，优选 *YAK1*。更优选的，所述第二种基因修饰使得所修饰基因编码酶的活性或表达被完全抑制，或者编码酶的活性提高或者过表

达。

优选的，第二种基因修饰使得蛋白激酶 Rim15编码基因 *RIM15*、转录因子 Msn1/Msn2编码基因 *MSN1/MSN2*、蛋白激酶 Yak1编码基因 *YAK1*编码酶的活性或表达被完全抑制；或者使得蛋白激酶 Sch9编码基因 *SCH9*编码酶的活性提高或者过表达。

进一步的，上述酵母还包括第三种基因修饰，以减少 cAMP 的降解，从而提高 cAMP 产量。

优选的，所述第三种基因为 cAMP 磷酸二酯酶编码基因 *PDE1*和/或 *PDE2*，优选 *PDE1*。更优选的，所述第三种基因修饰使得所修饰基因编码酶的活性或表达被完全抑制。

优选的，上述使得编码酶的活性或表达被完全抑制的基因修饰方式包括点突变、缺失、插入、反义 polynucleotides、siRNA、microRNA、CRISPR，更优选缺失和点突变；使得编码酶的活性提高或者过表达的基因修饰方式包括点突变、连接强启动子、连接增强子、提高拷贝数

进一步，上述酵母还包括第四种基因修饰，以增加嘌呤合成途径中 cAMP 前体物的合成的正调控，使 cAMP 前体物的合成上升，从而提高 cAMP 产量。

优选的，所述第四种基因包括但不限于转录因子 Bas1、Bas2编码基因。更优选的，所述基因修饰使 Bas1/Bas2复合物表达上升。

优选的，上述第四种基因的修饰方式包括但不限于点突变、连接强启动子、连接增强子、提高拷贝数、融合共表达，更优选融合共表达。

进一步的，所述基因的修饰方式包含使用选择标记基因。优选的，所述选择标记基因包括但不限于 *URA3*、*LEU2*、*HIS3*、*TRP1*、*LYS2*。更优选使用 *URA3*选择标记基因。更进一步优选的，所述基因的修饰方式是循环使用选择标记基因而不保留选择标记基因。

本发明所描述的酵母菌株，较未经第一和第二种基因修饰的酵母，或未经第一，第二和第三种基因修饰的酵母，或第一，第二，第三和第四种基因修饰的酵母菌株有更高的胞外cAMP产量。例如，本文描述的酵母菌株的胞外cAMP产量高达9721.6 $\mu\text{mol/L}$ 。

本发明所描述的酵母菌株，为酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、巴斯德酵母 (*Saccharomyces pastorianus*)、树干毕赤酵母 (*Pichia stipitis*)、*Saccharomyces Bayanus*和休哈塔假丝酵母 (*Candida shehatae*) 中的任意一种。优选酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。

本发明的一个目的是提供一种构建胞外cAMP产量大幅提高的上述酵母菌株的方法。

首先在酵母中引入第一种基因修饰，消除对cAMP的反馈抑制，但同时使得酵母的生长被抑制，第二种基因修饰消除了第一种基因修饰导致的生长抑制、从而使得酵母能够正常生长。

进一步的，所述方法中还包括对酵母进行第三种基因修饰以减少cAMP的降解，从而进一步提高cAMP产量。

更进一步，所述方法中还包括对酵母进行第四种基因修饰以增加嘌呤合成途径中cAMP前体物的合成的正调控，使cAMP前体物的合成上升，提高cAMP产量。

本发明的一个目的是提供一种使用上述的酵母菌株生产 cAMP 的发酵方法。

进一步，所述发酵方法包括发酵培养基组分，如碳源、氮源、微量元素。还包括温度、转速。

优选的，所述发酵方法中，发酵用培养基的葡萄糖浓度为20-150 g/L，酵母提取物10-20 g/L，蛋白胨20-40 g/L，腺嘌呤添加量为0-1.25 g/L。

本发明的一个目的是提供一种利用上述的酵母发酵生产的发酵液。本发明的一个目的是提供上述任一的酵母菌株或者发酵液在生产 cAMP 中的用途。

本发明的一个目的是提供上述任一的酵母菌株或者发酵液在医药、畜牧业、食品或化工领域的应用。

本发明的一个目的是提供上述任一的酵母菌株或者发酵液在制备医药、畜牧业、食品或化工等领域的产品中的应用。

相应的，本发明还提供包含上述任一的酵母菌株或者发酵液的医药、畜牧业、食品或化工领域的产品，例如药物，饲料，食品等等。

若非特殊说明，本文涉及的所有专业术语、技术概念都是本领域技术人员所熟知的。尽管有多种

类似或等效的方法可以用来构建和测定本发明中涉及的酵母菌株，下文中将描述一种合适的方法和材料。这些材料、方法和例子只是作为举证，它不在任何程度上限制本发明。本文中提到的所有文献、专利和其他参考资料均尊重其完整性。本发明涉及的方法和材料将在下文中与详细说明和图表一同给出。

3.2 发明详述 detailed description

本发明提供的是一种经过遗传改造的、能过量合成胞外cAMP的酵母菌株、构建此菌株的重组方法及应用。更具体地，

如上所述，本发明的酵母包括第一种基因修饰和第二种基因修饰。进一步的，所述酵母还包括第三种和第四种基因修饰。其中，第一种基因修饰消除对cAMP的反馈抑制，但同时使得酵母的生长被抑制；第二种基因修饰消除了第一种基因修饰导致的生长抑制，从而使得酵母能够正常生长；第三种基因修饰减少cAMP的降解，第四种基因修饰增加嘌呤合成途径中cAMP前体物的合成的正调控，使cAMP前体物的合成上升，提高cAMP产量。

更具体地，第一种基因修饰可以通过修饰蛋白激酶A (protein kinase A, PKA) 的催化亚基编码基因 *TPK1*、*TPK2* 和 *TPK3*，使PKA活性或表达被完全抑制，PKA对cAMP的反馈抑制被消除，但同时使得酵母的生长被抑制；第二种基因修饰消除了第一种基因修饰导致的生长抑制，从而使得酵母能够正常生长；第二种基因修饰可以使蛋白激酶Yak1等的活性或表达被完全抑制，从而消除了因PKA活性或表达被完全抑制而导致的抑制细胞生长，因此菌株能够正常生长；第三种基因修饰使水解cAMP的磷酸二酯酶Pde活性或表达被完全抑制；第四种基因修饰使经嘌呤合成途径中合成cAMP前体物AMP的正调控例如转录因子Bas1、Bas2活性或表达上升，使AMP合成上升，最终提高cAMP产量。

本发明描述了通过酵母菌株的第一种和第二种基因修饰消除PKA对cAMP的反馈抑制来提高合成胞外cAMP产量。PKA是酵母中目前唯一已知的cAMP靶标，一般认为cAMP浓度上的波动通过PKA途径来施加效应；换言之，酵母细胞内cAMP信号通路受PKA的严格负反馈调控。酵母PKA是由两个催化亚基和一个二聚体的调节亚基组成的四聚体蛋白，在胞内缺乏cAMP或cAMP水平较低时，PKA以钝化复合体的形式存在。胞内cAMP水平上升时，cAMP与PKA的调节亚基结合，PKA的催化亚基从调节亚基上解离下来，激活一系列蛋白磷酸化级联反应，导致这些蛋白的活性发生变化，进而在不同水平上调控胞内cAMP的水平；其中的首要效应酶是腺苷酸环化酶Cyr1，Cyr1催化ATP合成cAMP。PKA的调节亚基由基因*BCY1*编码，催化亚基由基因*TPK1*、*TPK2*和*TPK3*编码。

当三个催化亚基Tpk1、Tpk2和Tpk3活性或表达同时被完全抑制时，PKA活性也就被完全抑制，PKA对cAMP的反馈抑制被消除。另一方面，当PKA活性被完全抑制时，蛋白激酶Rim15停留在细胞核内，激活转录因子Msn1/Msn2，Msn1/Msn2进而激活对细胞生长起负调控作用的蛋白激酶Yak1，使细胞停留在G1期而无法继续生长，因此PKA活性被完全抑制的酵母菌株需要进一步的基因修饰来确保菌株正常生长。

蛋白激酶Sch9与PKA的催化亚基具有同源性，在正常的生理条件下，Sch9与PKA具有不同的底物；但增加任一种激酶的活性都会补偿由于缺失另一个激酶而引起的生长缺陷。

本发明中的第一种基因修饰消除了PKA对cAMP的反馈抑制，使PKA活性或表达被完全抑制，第二种基因修饰消除了酵母菌株因第一种基因修饰导致的生长抑制、从而能够正常生长。消除PKA对cAMP的反馈抑制作用以及保持PKA活性被完全抑制情况下的菌株正常生长的策略有多种。使PKA活性或表达被完全抑制、消除PKA对cAMP的反馈抑制作用，可以在编码催化亚基Tpk1、Tpk2和Tpk3的核酸序列中进行，此核酸序列可以是调控区、编码区。

Tpk1的核酸序列可以在例如GenBank Accession No. NC_001142.9中找到。

Tpk2的核酸序列可以在例如GenBank Accession No. NC_001148.4中找到。

Tpk3的核酸序列可以在例如GenBank Accession No. NC_001143.9中找到。

保持PKA活性被完全抑制情况下的菌株正常生长的策略包括但不限于对蛋白激酶Rim15编码基因*RIM5*、转录因子Msn1/Msn2编码基因*MSN1/MSN2*或蛋白激酶Yak1编码基因*YAK1*进行基因修饰，修饰的结果使相应酶活性或表达被完全抑制，菌株从而得以正常生长。保持PKA活性被完全抑制情况下的菌株正常生长的策略还包括但不限于对蛋白激酶Sch9编码基因*SCH9*进行基因修饰，修饰的结果使相应酶活性或

表达被提高，菌株从而得以正常生长。

Yak1的核酸序列可以在例如GenBank Accession No. NC_001142.9中找到。

Rim15的核酸序列可以在例如GenBank Accession No. NC_001138.5中找到。

Msn1/Msn2的核酸序列可以在例如GenBank Accession No. NC_001147.6, NC_001145.3中找到。

Sch9的核酸序列可以在例如GenBank Accession No. NC_001140.6中找到。

不论以何种方式进行第一种和第二种基因修饰使酶活性或表达被完全抑制，或使酶活性或表达被提高，酵母菌株中 *TPK1*、*TPK2*、*TPK3* 和第二种基因共四个基因的修饰步骤，除了在单倍体酵母细胞中同时失活 *TPK1*、*TPK2*、*TPK3* 的组合（此组合因生长缺陷而不能存活）以外，上述四个基因可以不分先后、任一组合的被修饰。

本发明描述的经过上述第一种和第二种基因修饰的酵母菌株相对于未经第一种和第二种基因修饰的酵母菌株产生更多的胞外cAMP。

另一方面，cAMP一旦产生，唯一使它失活的方式是在环核苷酸磷酸二酯酶Pde的催化下将其水解为5' -AMP。因此，Pde也影响着胞内cAMP的水平。因此，本发明通过第三种基因修饰使Pde活性或表达被完全抑制，从而减少cAMP的降解、提高cAMP含量水平。酿酒酵母细胞本身包含两个cAMP磷酸二酯酶：Pde1编码一个低亲和力（ $K_m=20-250 \mu M$ ）的、特异性较低的酶，主要介导快速的cAMP信号传导；Pde2编码一个高亲和力（ $K_m=170 nM$ ）的、特异性很强的酶，主要控制cAMP的基础水平。

Pde1 的核酸序列可以在例如GenBank Accession No. NC_001139.9中找到。

Pde2 的核酸序列可以在例如GenBank Accession No. NC_001147.6中找到。

本发明所描述的第一种，第二种和第三种基因修饰可以通过本领域内已知的任意多种方法来实现。使得编码酶的活性或表达被完全抑制的基因修饰方式可以是对基因的核酸序列进行点突变、缺失或插入一个或者多个核苷酸，点突变如单核苷酸的转换（嘌呤到嘌呤或嘧啶到嘧啶）或者颠换（嘌呤到嘧啶或嘧啶到嘌呤）。核酸的突变可以导致在其表达的多肽中一个或者多个保守的或者非保守的氨基酸的置换，这种置换可能会导致多肽的构象发生变化，也可能失去部分或者全部功能，可能发生移码突变将导致整个多肽链从该点处开始编码一个完全不同的多肽，也可能提前形成一个终止密码子使得多肽链残缺，甚至使基因沉默。

缺失或插入用核酸序列可以用 PCR 或者化学合成的方法得到，也可以利用细胞复制扩增得到。使基因酶活性或表达被完全抑制的基因修饰还可以通过提供或表达反义寡核苷酸 antisense polynucleotides、siRNA、microRNA或其它它可以阻止待修饰基因的mRNA翻译为蛋白质的核酸的方法来实现。近年来发展的类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)和CRISPR技术——规律成簇的间隔短回文重复(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)也可以用来失活基因。

本发明中提到的使基因酶活性或表达被完全抑制的基因修饰指的是能够使这种酶/多肽的活性降低（与未经基因修饰的酵母或野生型酵母比较）至少95%（例如至少96%，97%，98%，99%，或者100%）。

使得编码酶的活性提高或者过表达的基因修饰方式包括但不限于点突变、连接强启动子、连接增强子、提高拷贝数。例如，点突变提高多肽活性；提高核酸序列的拷贝数；通过基因修饰使核酸序列与一个可表达的强启动子或增强子连接；改变核酸序列的启动子或者其他调节因子从而提高其表达水平（例如提高启动子序列与转录起始因子的结合强度）；提高该核酸序列转录的 mRNA 的半衰期；抑制对 mRNA 或者多肽链的降解。

本发明中提到的使基因酶活性或表达被提高的基因修饰指的是一个经过基因修饰的核酸序列编码的酶/多肽的活性或对底物的作用效率与野生型相比提高至少20%（例如至少 25%，30%，40%，50%，60%，70%，80%，90%，95%，99%，100% 或者更高）。

本发明描述的经过上述第一种、第二种和第三种基因修饰的酵母菌株，相对于未经第一种、第二种和第三种基因修饰的酵母菌株产生更多的胞外cAMP。甚至相对于第一种和第二种基因修饰的酵母菌株产生更多的胞外cAMP。

提高酵母细胞胞外cAMP水平,对cAMP-PKA信号通路途径的基因进行修饰外,也可以通过调控嘌呤合成途径、增加cAMP合成前体物AMP的合成量来实现。酿酒酵母的嘌呤合成途径中,AMP从头合成途径基因即*ADE*基因的表达受2个转录调控因子Bas1和Bas2间的协同作用正调控。Bas1是Myb族转录调控因子,Bas2又名Pho2,是同源域(Homeodomain)转录调控因子,二者以复合物形式与特定启动子区域结合,协同作用激活10个*ADE*基因的表达。当胞内ADP、ATP浓度过高时,ADP、ATP反馈抑制从头合成途径第一个酶Ade4p(PRPP酰胺转移酶,简称PRPPAT)的活性,使得中间产物SAICAR的合成下降,Bas2p能感知SAICAR的浓度变化,当此浓度降至一定程度时,Bas2p不再与Bas1p形成复合物。当培养基中有相当量的腺嘌呤存在时,腺嘌呤进入胞内,通过补救途径形成AMP,AMP进一步转化为ADP和ATP,也导致整个从头合成途径合成受到抑制。

本发明的第四种基因修饰通过增加嘌呤合成途径中AMP合成的正调控,使AMP合成上升,提高cAMP产量。增加AMP合成的正调控的核心在于促进Bas1/Bas2复合物形成、提高复合物的正调控活性,抑制腺嘌呤、ADP和ATP的反馈抑制。而促进Bas1/Bas2复合物形成、提高复合物正调控活性的策略有多种,可以提高单个正调控转录因子Bas1或Bas2的活性或表达,也可以直接融合共表达Bas1和Bas2,或在融合共表达Bas1和Bas2的基础上进一步提高活性或表达量。有很多种方法能够使核酸编码的多肽活性提高。例如,点突变提高多肽活性;提高核酸序列的拷贝数;通过基因修饰使核酸序列与一个可表达的强启动子或增强子连接;改变核酸序列的启动子或者其他调节因子从而提高其表达水平(例如提高启动子序列与转录起始因子的结合强度);提高该核酸序列转录的mRNA的半衰期;抑制对mRNA或者多肽链的降解。认定一个经过基因修饰的核酸序列编码的多肽活性的提高需要其对底物的作用效率与野生型相比提高至少20%(例如至少25%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,95%,99%,100%或者更高)。单拷贝或者多拷贝的核酸序列的过表达可以通过连接到载体中实现,也可以通过整合到酵母的基因组中实现。适用于核酸序列过表达的载体已经商业化或者可以通过本领域中常用的基因重组技术得到。在本领域中已经有一些在酵母基因组中整合核酸序列的方法。例如,Methods in Enzymology: Guide to Yeast Genetics and Molecular and cell Biology, Vol. 194, 2004, Abelson et al., eds., Academic Press。含有核酸序列的载体可以把一些对表达有必要的元件与目的核酸序列进行可操作的连接:可以带上表达选择标记的核酸序列(如营养缺陷型选择标记基因、抗生素抗性基因);或者带上可用来纯化多肽的基因(例如6xHis tag);还可以带有一个或多个复制起点。对表达有必要的元件包括能够指导或者调控目的核酸序列的核酸序列,例如启动子序列。代表性的启动子包括(不局限于此)PGK启动子,TPI1启动子,ADH1启动子。对表达有必要的元件还包括增强子序列,响应元件,或者调控编码序列表达的诱导因子。

对表达有必要的元件可以来自细菌,酵母,昆虫,植物,哺乳动物,真菌或者病毒,表达载体可以带有不同来源的元件。对表达有必要的元件可以参见in Goeddel, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, 185, Academic Press, San Diego, CA。在某些情况下,可以选择对特定密码子最适宜的核酸序列或对表达有必要的元件以便在酵母中得到最好的表达。参见 Bennetzen & Hall, 1982, J. Biol. Chem., 257:3026-31。

Bas1的核酸序列可以在例如GenBank Accession No. NC_001143.9中找到。

Bas2的核酸序列可以在例如GenBank Accession No. NC_001136.10中找到。

本发明描述的经过上述第一种、第二种、第三种和第四种基因修饰的酵母菌株相对于未经第一种、第二种、第三种和第四种基因修饰的酵母菌株产生更多的胞外cAMP。甚至相对于第一种和第二种基因修饰的酵母菌株或者相对于第一种、第二种和第三种基因修饰的酵母菌株产生更多的胞外cAMP。

在本发明的基因修饰过程中,核酸序列(如表达载体)可以通过多种方法转入酵母细胞或者其他宿主细胞中。这些方法包括(不局限于此)电穿孔法,磷酸钙沉淀法,热激法,脂质转染法,显微注射法,氯化锂法,醋酸锂法,巯基乙醇法和病毒介导基因转移法。

除了酵母细胞,“宿主细胞”还可以是任何可以用于标准分子生物学操作并产生核酸和多肽的细胞。包括但不限于细菌细胞(如*E. coli*),昆虫细胞,植物细胞和哺乳动物细胞(如CHO或COS细胞)。

“酵母细胞”包括本文中描述的重组酵母细胞。本文所指的“宿主细胞”不仅包括对其进行核酸转导的母细胞，还包括其子细胞。

在本发明的基因修饰过程中，供转入酵母细胞筛选使用的选择标记基因包括但不限于酵母可用的任何营养缺陷型基因，如 *URA3*、*LEU2*、*HIS3*、*TRP1*、*LYS2*。为了能进行尽可能多的基因修饰，同时避免营养缺陷型基因表达本身带来的可能干扰，优选能方便地被反复、循环使用的 *URA3* 基因。更进一步优选的，*URA3* 基因被循环使用而不保留在被基因修饰的菌株中。

虽然本发明所应用的策略针对 *S. cerevisiae* 菌株的基因和多肽，但是相同的策略同样适用于其它可发酵的酵母，优选能够进行工业发酵的酵母菌株。除了 *S. cerevisiae* 菌株外，合适的菌株还包括巴斯德酵母 (*Saccharomyces pastorianus*)、树干毕赤酵母 (*Pichia stipitis*)、*Saccharomyces Bayanus* 和休哈塔假丝酵母 (*Candida shehatae*)。在这些菌株中通路或者基因名称或许稍有不同，但是可以应用同样的策略和技术来修饰相应的通路和同源基因。此处描述的基因工程酵母菌株是本领域的人员所熟知的。

本发明还描述了上述经过基因修饰的酵母菌株生产 cAMP 的发酵方法。

优选的，所述发酵方法中，发酵用培养基的葡萄糖浓度为 20–150 g/L，酵母提取物 10–20 g/L，蛋白胨 20–40 g/L，腺嘌呤添加量为 0–1.25 g/L。

本发明还描述了上述经过基因修饰的酵母菌株的用途，其可用于发酵代谢碳水化合物产生胞外 cAMP。进一步，上述经过基因修饰的酵母菌株细胞，和/或经发酵得到的包含胞外 cAMP 的发酵液，可直接作为 cAMP 的替代品。并如同 cAMP 一般应用到各个领域，例如，医药、畜牧业、食品或化工领域等等。更进一步，所述应用包括在制备上述领域的产品中的应用，例如药物、食品和饲料等。相应的，本发明还提供包含上述经过基因修饰的酵母菌株细胞，和/或经发酵得到的包含胞外 cAMP 的发酵液的医药、畜牧业、食品或化工等领域的产品，例如药物、食品、饲料等。

3.3 发明的优点和益处

本发明所得重组酵母菌株具有低营养需求、容易培养、适合大规模发酵生产并易于实现产业化的性能；通过基因工程手段进行相关基因修饰，在消除 cAMP 通路反馈抑制、减少 cAMP 降解的同时，增加通向 cAMP 前体物 AMP 的代谢流，使所得重组酵母菌株能稳定、持续、高效生产胞外 cAMP；通过提高碳源浓度、优化碳/氮比、添加前体物等措施，使代谢流更有效地流向目的产物，得到优化的、高产胞外 cAMP 的发酵工艺，cAMP 浓度可达到 9721.6 μ mol/L。本发明克服了传统化学合成法工艺复杂、原料昂贵、副产物多、环境污染严重的缺点，也克服了酶促转化法底物昂贵、腺苷酸环化酶稳定性差等不足，具有工艺操作简单、产物容易分离提取、原料成本低、安全环保、可工业化生产的优点，为微生物发酵生产 cAMP 开辟了新的途径，将推动高值医药和生化产品的绿色清洁生产，能广泛应用于医药、畜牧业、食品或化工领域，具有重要的经济价值和社会意义。

附图说明

图 1 为实施例 1 质粒示意图，其中图 1A 为质粒 pUC18-*URA3*，图 1B 为质粒 pUC18-TPK2p-TPK2t-*URA3*-TPK2t。

图 2 为实施例 5 五个基因缺失菌株 cAMP 生产初步评价。

图 3 为实施例 6 质粒 pUC18-H1 Δ YNRC9-BAS1-BAS2-H2 Δ YNRC9-*URA3*-H2 Δ YNRC9 示意图。

具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明所述技术方案作进一步的说明。可以理解的是，在此描述的特定实施方式通过举例的方式来表示，其并不作为对本发明的限制。若非特别指明，实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。在不偏离于本发明范围的情况下，本发明的主要特征可以用于各种实施方式。本领域的技术人员将会意识到或能够确认，仅仅使用常规实验，许多等同物都能应用于本文所描述的特定步骤中。这些等同物被认为处在本发明的范围之内，并且被权利要求所覆盖。

实施例中所涉及的几种培养基如下：

1) 酵母菌株活化及种子液培养用培养基 YPAD

酵母提取物(Yeast extracts) 10 g/L, 蛋白胨(Peptone) 20 g/L, 葡萄糖(Glucose) 20 g/L, 腺嘌呤(Adenine) 0.05 g/L, 自然 pH 值；固体培养时另加琼脂粉15 g/L。

2) 使用尿嘧啶 (URA) 营养缺陷型选择标记时的转化筛选培养基 CMG^{URA}

使用缺省了尿嘧啶的基本培养基 CMG 平板简称 CMG^{URA} 平板进行筛选。组分如下：氨基酸碱基混合物，0.83 g/L；不含氨基酸的酵母氮源 Yeast Nitrogen Base，简称 YNB，6.7 g/L；葡萄糖，20 g/L；琼脂粉，15 g/L。其中的氨基酸碱基混合物见表1。

表 1. 氨基酸碱基混合物成分

腺嘌呤 50 mg/L	亮氨酸 100 mg/L	精氨酸 20 mg/L	赖氨酸 30 mg/L
天冬氨酸 100 mg/L	甲硫氨酸 20 mg/L	谷氨酸 100 mg/L	苯丙氨酸 50 mg/L
组氨酸 100 mg/L	丝氨酸 150 mg/L	异亮氨酸 30 mg/L	苏氨酸 15 0mg/L
色氨酸 100 mg/L	酪氨酸 30 mg/L	尿嘧啶 50 mg/L	缬氨酸 150 mg/L

注：省却特定的氨基酸成分，即可做成选择培养基。调 pH 值5.6, 葡萄糖110℃灭菌15min, 其它成分121℃灭菌21min, 使用前混合。

3) 5' - FOA 平板 (5' - 乳清酸平板)

制备方法如下：

a、制备 100 ml 5' - FOA 溶液，包括：

YNB w/o AA: 1.4 g dropout powder: 0.17 g 5' -FOA: 0.2 g
尿嘧啶: 20 mg 腺嘌呤: 10 mg 亮氨酸: 40 mg
组氨酸: 30 mg 色氨酸: 20 mg 葡萄糖: 4 g

用磁力搅拌器于 45℃ 下不停搅拌，使其各个组分全部溶解，之后过滤除菌；

b、制备 100 ml 琼脂粉 Agar 溶液，使其最终浓度达到 3.0%，121℃灭菌 15 min 后，将其冷却至 45℃；

c、将 100 ml 5' -FOA 与 100 ml Agar 溶液混匀，防止出现气泡，倒入无菌培养皿中，冷却成型。

4) 大肠杆菌培养用 LB 培养基

酵母提取物(Yeast extracts) 5 g/L, 蛋白胨(Peptone) 10 g/L, 氯化钠(NaCl) 10 g/L, 调 pH 值至 7.0；固体培养时另加琼脂粉 15 g/L。需要时添加抗生素，氨苄青霉素的添加终浓度 100 μ g/mL。

实施例中所涉及的引物序列见表 2。

表 2 实施例中用到的引物序列

序列号	名称	序列 (5' → 3') 及添加的酶切位点
SEQ ID No. 1	P1	CCCGGGGATCCTTGATTCGGTAATCTCCGAA (BamHI)
SEQ ID No. 2	P2	CCCGGGGTCGACCTGATATAATTAAATTGAAGCT (SalI)
SEQ ID No. 3	P3	CCCGGGGTCGACGGTACCACTAACGGATGCCTATTT (SalI KpnI)
SEQ ID No. 4	P4	CCCGGGTGCAGGGATCGGGGATTTTGGACCTTAGACT (PstI BamHI)
SEQ ID No. 5	P5	CCCGGGGAGCTCTCAATTTGGTTGTAAGCAAC (SacI)
SEQ ID No. 6	P6	CCCGGGGTACCCGACAATTTTCAACAGTATG (KpnI)
SEQ ID No. 7	P7	CCTCAAGATAAACCAGCTGG
SEQ ID No. 8	P8	ATAATGGTGATATCAGCACC

SEQ ID No. 9	P9	CCCGGGGTCGACGGTACCGTTACTACGGAGATGGAACG (<i>Sa</i> II <i>Kpn</i> I)
SEQ ID No. 10	P10	CCCGGGGTCGACGGATCCATCCCTGAAGGCTTAAATAG (<i>Pst</i> I <i>Bam</i> HI)
SEQ ID No. 11	P11	CCCGGGGAGCTCCTCCGTTAATCCTAGTCTGT (<i>Sac</i> I)
SEQ ID No. 12	P12	CCCGGGGGTACCTTCTGTGCTACCTTTGAAGC (<i>Kpn</i> I)
SEQ ID No. 13	P13	ATCCCTCCCATCCTCCTTAA
SEQ ID No. 14	P14	GAAGGAGCCGAGCATTATT
SEQ ID No. 15	P15	CCCGGGGTCGACGGTACCGATTCTTGGTGAGTCTAACA (<i>Sa</i> II <i>Kpn</i> I)
SEQ ID No. 16	P16	CCCGGGGTCGACGGATCCATGGAACGCTTTTTTGCTTGT (<i>Pst</i> I <i>Bam</i> HI)
SEQ ID No. 17	P17	CCCGGGGAGCTCGTCAACGTTTCAGATACTCT (<i>Sac</i> I)
SEQ ID No. 18	P18	CCCGGGGGTACCTTTGTGCAGGCTCGCTCTTT (<i>Kpn</i> I)
SEQ ID No. 19	P19	GCGACTATGCATTTTGC AAAA
SEQ ID No. 20	P20	CGGAGCCTTCATGAGATAAA
SEQ ID No. 21	P21	CCCGGGGTCGACGGTACCGAAAGTTTCTGCACTAGCTTT (<i>Sa</i> II <i>Kpn</i> I)
SEQ ID No. 22	P22	CCCGGGGTCGACGGATCCAGAGAGAGGACCCATGGAAT (<i>Pst</i> I <i>Bam</i> HI)
SEQ ID No. 23	P23	CCCGGGGAGCTCCTTTCGCCCTCAAACCTCAAC (<i>Sac</i> I)
SEQ ID No. 24	P24	CCCGGGGGTACCATGTTCCCTTGACAATGGC (<i>Kpn</i> I)
SEQ ID No. 25	P25	CAATACGGATGAATATTTGTG
SEQ ID No. 26	P26	ACTTTTGATTGCGCTGTGAA
SEQ ID No. 27	P27	CCCGGGGTCGACGGTACCGAAATTCATTACCCGGGAGCA (<i>Sa</i> II <i>Kpn</i> I)
SEQ ID No. 28	P28	CCCGGGGTCGACGGATCCATGCTGGAACCCATCATATGA (<i>Pst</i> I <i>Bam</i> HI)
SEQ ID No. 29	P29	CCCGGGGAGCTCCAGACATATAGTCTCGAAGA (<i>Sac</i> I)
SEQ ID No. 30	P30	CCCGGGGGTACCCCTCGTTAAAAGCCACTTTC (<i>Kpn</i> I)
SEQ ID No. 31	P31	AATCTTACTTTGGCGAATG
SEQ ID No. 32	P32	ACACTATTCCTTGTTTCATAC
SEQ ID No. 33	P33	GCGCGCGAATTCCGTATTGACCATTCCTAA (<i>Eco</i> RI)
SEQ ID No. 34	P34	TCGACTCCCGGGTACCGAGCTCTATCGTATCGCAGCCTA (<i>Sac</i> I)
SEQ ID No. 35	P35	GCTCGGTACCCGGGAGTCGACTGTAGACCTAAGTTCAT (<i>Sa</i> II)
SEQ ID No. 36	P36	ATATTAGGATCCGCCTTGCTTACCTAGATG (<i>Bam</i> HI)
SEQ ID No. 37	P37	GCGTTAGGATCCGATTCGGTAATCTCCG (<i>Bam</i> HI)
SEQ ID No. 38	P38	AGGTCTACAGGGGTAATAACTGATAT
SEQ ID No. 39	P39	GTTATTACCCCTGTAGACCTAAGTTCAT
SEQ ID No. 40	P40	CGTACGAAGCTTGCCCTTGCTTACCTAGATG (<i>Hind</i> III)
SEQ ID No. 41	P41	GGGCCCGAGCTCTCTTTAGCCGTAATTGCGAA (<i>Sac</i> I)
SEQ ID No. 42	P42	GTACGAGAATTCTTCCATCATGGATGTAGTCCTTGATATCTC

SEQ ID No. 43	P43	ATGATGGAAGAATTCTCGTAC
SEQ ID No. 44	P44	GGGCCCCGTCGACTCATATCCATCTATGCTCGTC (<i>Sa</i> II)
SEQ ID No. 45	P45	TCAACTTTGGGATTACTGC
SEQ ID No. 46	P46	CTCATCATTTGCGTCATCT

实施例中,酿酒酵母菌株 W303-1A(=ATCC208352)可以从美国 ATCC 购得。YCplac33 可从 Invitrogen 公司买到。pUC18 可从 Invitrogen 公司、Promega 公司等多家公司买到。

实施例 1: 构建缺失 *TPK2* 基因的酵母菌株

利用同源重组双交换机制缺失酵母染色体上的 *TPK2* 基因, 首先构建缺失用质粒 pUC18-TPK2p-TPK2t-*URA3*-TPK2t, 此质粒经酶切线性化后转化酵母感受态细胞, 以 *URA3* 为筛选标记基因筛选得到以 TPK2p 和 *URA3* 下游的 TPK2t 为左、右同源臂发生双交换得到的酵母菌株 *tpk2*Δ::*URA3*; 再以 5' -FOA 平板筛选得到菌株 *tpk2*Δ::*URA3* 染色体上 *URA3* 左、右两侧 TPK2t 之间发生重组而弹出 *URA3* 基因的酵母目的菌株 *tpk2*Δ。

构建和鉴定用引物见表 2, 示意图见图 1。

一、pUC18-TPK2p-TPK2t-*URA3*-TPK2t 构建

此质粒的构建涉及四个连接:

(1) pUC18- *URA3* 构建

以质粒 YCplac33 为模板进行 PCR 扩增 *URA3* 基因, 使用表 2 中的 SEQ ID No. 1、SEQ ID No. 2 所示序列为上、下游引物 P1、P2, 全式金公司生产的 Fast Pfu 聚合酶, 50℃退火 1min, 72℃延伸 1.5min, 共 32 个循环。得到 1055bp 的 PCR 片段, 使用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Sa*II 双酶酶切此片段和载体质粒 pUC18, T4 DNA 连接酶连接后转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞, 提取转化子质粒进行酶切鉴定, 得到质粒 pUC18-*Bam*HI-*URA3*-*Sa*II (简称 pUC18-*URA3*, 见图 1A)。

(2) pUC18-TPK2t-*URA3* 构建

提取酿酒酵母菌株 W303-1A 染色体, 以 W303-1A 染色体为模板进行 PCR, 扩增 *TPK2* 基因的终止子区 (简称为 TPK2t), 使用表 2 中的 SEQ ID No. 3、SEQ ID No. 4 所示序列为上、下游引物 P3、P4, 全式金公司生产的 Fast Pfu 聚合酶, 50℃退火 1min, 72℃延伸 0.5min, 共 32 个循环。得到 526 bp 的 PCR 片段, 使用限制性内切酶 *Kpn*I 和 *Bam*HI 双酶酶切此片段和载体质粒 pUC18-*URA3*, T4 DNA 连接酶连接后转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞, 提取转化子质粒进行酶切鉴定, 得到质粒 pUC18-TPK2t-*URA3*。

(3) pUC18-TPK2p-TPK2t-*URA3* 构建

提取 W303-1A 染色体, 以 W303-1A 染色体为模板进行 PCR, 扩增 *TPK2* 基因的启动子区 (简称为 TPK2p), 使用表 2 中的 SEQ ID No. 5、SEQ ID No. 6 所示序列为上、下游引物 P5、P6, 全式金公司生产的 Fast Pfu 聚合酶, 50℃退火 1min, 72℃延伸 0.5min, 共 32 个循环。得到 532 bp 的 PCR 片段, 使用限制性内切酶 *Sac*I 和 *Kpn*I 双酶酶切此片段和载体质粒 pUC18-TPK2t-*URA3*, T4 DNA 连接酶连接后转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞, 提取转化子质粒进行酶切鉴定, 得到质粒 pUC18-TPK2p-TPK2t-*URA3*。

(4) pUC18-TPK2p-TPK2t-*URA3*-TPK2t 构建

将上述 (2) 中扩增的含 TPK2t 序列的 PCR 产物用 *Sa*I 和 *Pst*I 双酶酶切, 与同样双酶酶切的 pUC18-TPK2p-TPK2t-*URA3* 大片段连接, 得到质粒 pUC18-TPK2p-TPK2t-*URA3*-TPK2t (见图 1B)。

二、W303-1A (*tpk2*Δ) 菌株构建

将质粒 pUC18-TPK2p-TPK2t-*URA3*-TPK2t 用 *Sac*I 和 *Pst*I 双酶酶切, 得到线性化 DNA 片段 TPK2p-TPK2t-*URA3*-TPK2t; 然后利用醋酸锂法转化酿酒酵母 W303-1A 菌株感受态细胞, 使用尿嘧啶营养缺陷型选择标记 (*URA*) 进行筛选, 即使用 CMG^{URA} 平板进行筛选, 对得到的转化子菌株进行 YPAD 液体培

养,提取染色体 DNA,以其为模板进行 PCR 法验证,引物对为表 2 中的 SEQ ID No.7、SEQ ID No.8 所示序列为上、下游引物 P7、P8,整合成功、含有 *URA3* 基因的转化子 PCR 产物为 2592 bp,对照菌株 PCR 产物为 2299 bp。阳性转化子菌株命名为 W303-1A (*tpk2*Δ::*URA3*)。

进一步将菌株 W303-1A (*tpk2*Δ::*URA3*)平板生长菌体涂布于 5'-FOA 平板上,从而筛选出通过整合在染色体上的两个相同序列 (TPK2t) 之间同源重组而弹出 *URA3* 片段的菌落。用同上的引物对 P7、P8 验证,成功弹出 *URA3* 的目的菌株的 PCR 产物长 1053 bp,没有弹出 *URA3* 的宿主菌株 W303-1A (*tpk2*Δ::*URA3*)的 PCR 片段长 2592 bp。对 1053 bp PCR 产物进行了测序,测序结果证明发生了预期的变化:*TPK2* 基因的起始密码子前的 2 个碱基、整个 ORF 区和终止密码子之后的 107 个碱基被完全缺失。这样,最终得到 *TPK2* 基因缺失、*URA3* 基因弹出的阳性转化子菌株 W303-1A(*tpk2*Δ)。

实施例 2: 构建缺失 *TPK1* 或 *TPK3* 基因的酵母菌株

一、W303-1A (*tpk1*Δ)构建

TPK1 基因缺失用质粒 pUC18-TPK1p-TPK1t-*URA3*-TPK1t 的构建:以实施例 1 中 (1) pUC18-*URA3* 质粒为基础构建质粒 pUC18-TPK1p-TPK1t-*URA3*-TPK1t,过程与实施例 1 中经过 (2)、(3) 和 (4) 步骤最终得到 pUC18-TPK2p-TPK2t-*URA3*-TPK2t 的过程一样,使用的引物对:扩增 TPK1t 为表 2 中的 SEQ ID No.9、SEQ ID No.10 所示序列为上、下游引物 P9、P10,产物 516bp;扩增 TPK1p 为表 2 中的 SEQ ID No.11、SEQ ID No.12 所示序列为上、下游引物 P11、P12,产物 572bp。

将质粒 pUC18-TPK1p-TPK1t-*URA3*-TPK1t 用 *Sac* I 和 *Pst* I 双酶酶切,得到线性化 DNA 片段 TPK1p-TPK1t-*URA3*-TPK1t;然后转化酿酒酵母 W303-1A 菌株感受态细胞,使用尿嘧啶 (URA) 营养缺陷型选择标记进行筛选,即使用 CMG^{URA} 平板进行筛选,对得到的转化子菌株进一步用 PCR 法验证,引物对为表 2 中的 SEQ ID No.13、SEQ ID No.14 所示序列为上、下游引物 P13、P14,整合成功的转化子 PCR 产物为 2631 bp,对照菌株 PCR 产物为 2476 bp。阳性转化子菌株命名为 W303-1A(*tpk1*Δ::*URA3*)。

进一步将菌株 W303-1A(*tpk1*Δ::*URA3*)平板生长菌体涂布于 5'-FOA (5'-乳清酸) 平板上,从而筛选出通过整合在染色体上的两个相同序列 (TPK1t) 之间同源重组而弹出 *URA3* 片段的菌落。用同上的引物对 P13、P14 验证,成功弹出 *URA3* 的目的菌株的 PCR 产物长 1102bp,没有弹出 *URA3* 的对照 PCR 片段长 2631bp。对 1102 bp PCR 产物进行了测序,测序结果证明发生了预期的变化:*TPK1* 基因的起始密码子前的 70 个碱基、整个 ORF 区和终止密码子之后的 116 个碱基被完全缺失。这样,最终得到 *TPK1* 基因缺失、*URA3* 基因弹出的阳性转化子菌株 W303-1A (*tpk1*Δ)。

二、W303-1A (*tpk3*Δ)构建

TPK3 基因缺失用质粒的构建:以实施例 1 中 (1) pUC18-*URA3* 质粒为基础构建质粒 pUC18-TPK3p-TPK3t-*URA3*-TPK3t 的过程与实施例 1 中经过 (2)、(3) 和 (4) 步骤最终得到 pUC18-TPK2p-TPK2t-*URA3*-TPK2t 的过程一样,使用的引物对:扩增 TPK3t 为表 2 中的 SEQ ID No.15、SEQ ID No.16 所示序列为上、下游引物 P15、P16,产物 566 bp;扩增 TPK3p 为表 2 中的 SEQ ID No.17、SEQ ID No.18 所示序列为上、下游引物 P17、P18,产物 545 bp。

将质粒 pUC18-TPK3p-TPK3t-*URA3*-TPK3t 用 *Sac* I 和 *Pst* I 双酶酶切,得到线性化 DNA 片段 TPK3p-TPK3t-*URA3*-TPK3t;然后转化酿酒酵母 W303-1A 菌株感受态细胞,同实施例 1 中“W303-1A (*tpk2*Δ)菌株构建”方法筛选、鉴定得到 W303-1A (*tpk3*Δ::*URA3*)菌株和 W303-1A (*tpk3*Δ)菌株。PCR 方法验证用引物对为表 2 中的 SEQ ID No.19、SEQ ID No.20 所示序列为上、下游引物 P19、P20,整合成功、含有 *URA3* 基因的转化子 PCR 产物为 2695 bp,整合成功、*URA3* 基因弹出的转化子 PCR 产物为 1116 bp,对照菌株 PCR 产物为 2400 bp。对 1116 bp PCR 产物进行了测序,测序结果证明发生了预期的变化:*TPK3* 基因的整个 ORF 区和终止密码子之后的 93 个碱基被完全缺失。这样,最终得到 *TPK3* 基因缺失、*URA3* 基因弹出的阳性转化子菌株 W303-1A (*tpk3*Δ)。

实施例 3：构建缺失 *YAK1* 基因的酵母菌株

YAK1 基因缺失用质粒的构建：以实施例 1 中 (1) pUC18-*URA3* 质粒为基础构建质粒 pUC18-*YAK1p-YAK1t-URA3-YAK1t* 的过程与实施例 1 中经过 (2)、(3) 和 (4) 步骤最终得到 pUC18-*TPK1p-TPK1t-URA3-TPK1t* 的过程一样，使用的引物对：扩增 *YAK1t* 为表 2 中的 SEQ ID No. 21、SEQ ID No. 22 所示序列为上、下游引物 P21、P22，产物 506 bp；扩增 *YAK1p* 为表 2 中的 SEQ ID No. 23、SEQ ID No. 24 所示序列为上、下游引物 P23、P24，产物 504 bp。

YAK1 基因缺失菌株的构建：将质粒 pUC18-*YAK1p-YAK1t-URA3-YAK1t* 用 *Sac* I 和 *Pst* I 双酶酶切，得到线性化 DNA 片段 *YAK1p-YAK1t-URA3-YAK1t*；然后转化酿酒酵母 W303-1A 菌株感受态细胞，同实施例 1 中“W303-1A (*tpk2*Δ) 菌株构建”方法筛选、鉴定得到 W303-1A (*yak1*Δ::*URA3*) 菌株和 W303-1A (*yak1*Δ) 菌株。PCR 方法验证用引物对为表 2 中的 SEQ ID No. 25、SEQ ID No. 26 所示序列为上、下游引物 P25、P26，整合成功、含有 *URA3* 基因的转化子 PCR 产物为 2529 bp，整合成功、*URA3* 基因弹出的转化子 PCR 产物为 1010 bp，对照菌株 PCR 产物为 3614 bp。对 1010 bp PCR 产物进行了测序，测序结果证明发生了预期的变化：*YAK1* 基因的起始密码子之前 40 个碱基、整个 ORF 区和终止密码子之后的 146 个碱基被完全缺失。这样，最终得到 *YAK1* 基因缺失、*URA3* 基因弹出的阳性转化子菌株 W303-1A (*yak1*Δ)。

实施例 4：构建同时缺失 *TPK1*、*TPK2*、*TPK3*、*YAK1* 基因的酵母菌株

下面分四个步骤构建得到同时缺失四个基因的菌株。事实上本领域的技术人员知道，除了在单倍体酵母细胞中同时失活 *TPK1*、*TPK2*、*TPK3* 的组合（此组合因生长缺陷而不能存活）以外，上述四个基因可以不分先后、任一组合的被修饰。

一、缺失 *YAK1* 基因

同实施例 3 方法构建得到 W303-1A (*yak1*Δ) 菌株。

二、缺失 *YAK1* 和 *TPK1* 基因

将实施例 2 中构建的缺失用质粒 pUC18-*TPK1p-TPK1t-URA3-TPK1t* 用 *Sac* I 和 *Pst* I 双酶酶切，得到线性化 DNA 片段 *TPK1p-TPK1t-URA3-TPK1t*；然后转化步骤一中的 W303-1A (*yak1*Δ) 菌株感受态细胞，使用尿嘧啶 (URA) 营养缺陷型选择标记进行筛选，即使用 CMG^{URA} 平板进行筛选，对得到的转化子菌株用同实施例 2 中相同的方法鉴定得到 *TPK1* 缺失菌株 W303-1A (*yak1*Δ) (*tpk1*Δ::*URA3*)，并进一步反选得到 W303-1A (*yak1*Δ) (*tpk1*Δ) 菌株。

三、缺失 *TPK2* 和 *TPK3* 基因

从 W303-1A 经过交配型转换获得与 W303-1A 菌株除交配型外基因型完全相同的 W303-1B 菌株 (*MATα leu2-3, 112 ura3-1 trp1-92 his3-11, 15 ade2-1 can1-100*)，以 W303-1B 为宿主，顺次敲除 *TPK2*、*TPK3* 两个基因。

将实施例 1 中构建的质粒 pUC18-*TPK2p-TPK2t-URA3-TPK2t* 用 *Sac* I 和 *Pst* I 双酶酶切，得到线性化 DNA 片段 *TPK2p-TPK2t-URA3-TPK2t*；然后转化酿酒酵母 W303-1B 菌株感受态细胞，同实施例 1 中“W303-1A (*tpk2*Δ) 菌株构建”方法筛选、鉴定得到 W303-1B (*tpk2*Δ::*URA3*) 菌株和 W303-1B (*tpk2*Δ) 菌株。

将实施例 2 中构建的质粒 pUC18-*TPK3p-TPK3t-URA3-TPK3t* 用 *Sac* I 和 *Pst* I 双酶酶切，得到线性化 DNA 片段 *TPK3p-TPK3t-URA3-TPK3t*；然后转化酿酒酵母 W303-1B (*tpk2*Δ) 菌株感受态细胞，同实施例 1 中“W303-1A (*tpk2*Δ) 菌株构建”方法筛选、鉴定得到 W303-1B (*tpk2*Δ *tpk3*Δ::*URA3*) 菌株和 W303-1B (*tpk2*Δ *tpk3*Δ) 菌株。

四、同时缺失 *TPK1*、*TPK2*、*TPK3*、*YAK1* 基因

将 W303-1A (*tpk1*Δ *yak1*Δ) 菌株与 W303-1B (*tpk2*Δ *tpk3*Δ) 菌株进行杂交，得到二倍体菌株，然后通过产孢、拆孢使等位基因分离，筛选、鉴定得到 W303-1A (*tpk1*Δ *tpk2*Δ *tpk3*Δ *yak1*Δ) 和

W303-1B (*tpk1*Δ *tpk2*Δ *tpk3*Δ *yak1*Δ)。鉴定四个基因敲除的验证引物同前。对鉴定所得 PCR 产物的测序结果证明两个菌株中染色体上的四个基因核酸序列均发生了预期的变化,全部被缺失了 ORF 区。

五、四个基因缺失菌株的生长和发酵生产胞外 cAMP 评价

对上述四个基因缺失菌株进行了生长和发酵生产胞外 cAMP 评价,操作如下:

1、种子液培养:挑取 YPAD 固体培养基平板上生长的菌落,接入装有 5 mL YPAD 培养液的试管中,30 °C、220 rpm 过夜培养,必要时进行二次扩大培养;

2、发酵:发酵用培养基:酵母提取物 10 g/L,蛋白胨 20 g/L,葡萄糖 20 g/L,自然 pH 值;将新鲜种子液接种到装有 25 ml 发酵培养基的 100 ml 容量瓶中,控制初始 OD₆₀₀ 值在 0.1 左右,30 °C、220 rpm 下发酵;

3、发酵液的 OD₆₀₀ 测定:将发酵样品适当稀释后测定 OD₆₀₀,检测生长情况;

4、HPLC 分析发酵上清液 cAMP 浓度即胞外 cAMP 浓度:HPLC 分析 cAMP 的方法参照《中华人民共和国药典:2010 年版》(国家药典委员会编)第 419 页的方法而有调整。具体操作如下:1)将发酵样品在 13000 rpm、1 min 条件下离心,取上清进行适当稀释,用孔径 0.22 μm 的滤膜过滤,滤液用于色谱检测:检测波长 258 nm, Thermo Synchronis C18 色谱柱,流动相为(5.78 g/L KH₂PO₄, 2.72 g/L 四丁基溴化铵):乙腈=85:15 (φ),用磷酸调节 pH 至 4.3,流速 1 mL/min,柱温 35 °C;2) cAMP 标准样品的配置及标准曲线的测定:先将 cAMP 标准品用灭菌后的去离子水配置成浓度为 50 mmol/L 的标准溶液,再用去离子水对其进行稀释,得到终浓度分别为 1、3、5、7.5 和 10 μmol/L 的标准样品,用 0.2 μm 滤膜过滤标准样品后进行 HPLC 分析,以峰面积对 cAMP 浓度做标准曲线;3)利用标准曲线由外标定量法计算出发酵液样品中 cAMP 的浓度。

96 h 内的生长和发酵生产胞外 cAMP 评价结果见表 3。

表 3、四个基因缺失菌株的生长和 cAMP 生产评价

菌株名称	最大 OD ₆₀₀	最高胞外 cAMP 浓度(μmol/L)
W303-1A	21.1 (48 h)	1.39 (60 h)
W303-1A(<i>tpk1</i> Δ <i>tpk2</i> Δ <i>tpk3</i> Δ <i>yak1</i> Δ)	35.0 (48 h)	200.2 (24 h)
W303-1B(<i>tpk1</i> Δ <i>tpk2</i> Δ <i>tpk3</i> Δ <i>yak1</i> Δ)	33.5 (48 h)	215.6 (24 h)

由表 3 可知:两个缺失菌株的最大胞外 cAMP 浓度分别是对照菌株 W303-1A 最大胞外 cAMP 浓度的 144.0 和 155.1 倍。需要说明的是:两个缺失菌株在 0-24 h 内 cAMP 浓度迅速升高,24 h 达到最高值以后,cAMP 浓度略有下降,但一直到 96 h 时仍然保持在 180 μmol/L 以上。

实施例 5:构建同时缺失 *TPK1*、*TPK2*、*TPK3*、*YAK1*、*PDE1* 基因的酵母菌株

一、缺失 *PDE1* 基因

以 W303-1A 染色体为模板进行 PCR,扩增 *PDE1* 基因的终止子区(简称为 PDE1t),使用表 2 中的 SEQ ID No. 27、SEQ ID No. 28 所示序列为上、下游引物 P27、P28,全式金公司生产的 Fast Pfu 聚合酶,50 °C 退火 1min,72 °C 延伸 0.5min,共 32 个循环。得到 500 bp 的 PCR 片段,使用限制性内切酶 *Kpn*I 和 *Bam*HI 双酶酶切此片段和载体质粒 pUC18-*URA3*,T4 DNA 连接酶连接后转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞,提取转化子质粒进行酶切鉴定,得到质粒 pUC18-PDE1t-*URA3*。

以 W303-1A 染色体为模板进行 PCR,扩增 *PDE1* 基因的启动子区(简称为 PDE1p),使用表 2 中的 SEQ ID No. 29、SEQ ID No. 30 所示序列为上、下游引物 P29、P30,全式金公司生产的 Fast Pfu 聚合酶,50 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 0.5 min,共 32 个循环。得到 544 bp 的 PCR 片段,使用限制性内切酶 *Sac* I 和 *Kpn* I 双酶酶切此片段和载体质粒 pUC18-PDE1t-*URA3*,T4 DNA 连接酶连接后转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞,提取转化子质粒进行酶切鉴定,得到质粒 pUC18-PDE1p-PDE1t-*URA3*。

将上述扩增的含 PDE1t 序列的 PCR 产物用 *Sal* I 和 *Pst* I 双酶酶切,与同样双酶酶切的 pUC18-PDE1p-PDE1t-*URA3* 大片段连接,得到质粒 pUC18-PDE1p-PDE1t-*URA3*-PDE1t。

将质粒 pUC18-*PDE1p*-*PDE1t*-*UR43*-*PDE1t* 用 *Sac* I 和 *Pst* I 双酶酶切, 用与实施例 1 中“W303-1A (*tpk2*Δ) 菌株构建”中相同的方法, 以实施例 4 中构建的 W303-1A (*tpk1*Δ *tpk2*Δ *tpk3*Δ *yak1*Δ) 为宿主, 构建得到 W303-1A (*tpk1*Δ *tpk2*Δ *tpk3*Δ *yak1*Δ *pde1*Δ::*UR43*) 和 W303-1A (*tpk1*Δ *tpk2*Δ *tpk3*Δ *yak1*Δ *pde1*Δ)。PCR 方法验证用引物对为表 2 中的 SEQ ID No. 31、SEQ ID No. 32 所示序列为上、下游引物 P31、P32, 整合成功、含有 *UR43* 基因的转化子 PCR 产物为 2958 bp, 整合成功、*UR43* 基因弹出的转化子 PCR 产物为 1445 bp, 对照菌株 PCR 产物为 2635 bp。对 1445 bp PCR 产物进行了测序, 测序结果证明发生了预期的变化:*PDE1* 基因的起始密码子之前 40 个碱基、整个 ORF 区和终止密码子之后的 46 个碱基被完全缺失。这样, 最终得到 *PDE1* 基因缺失、*UR43* 基因弹出的阳性转化子菌株。

二、W303-1A (*tpk1*Δ *tpk2*Δ *tpk3*Δ *yak1*Δ *pde1*Δ::*UR43*) 和 W303-1A (*tpk1*Δ *tpk2*Δ *tpk3*Δ *yak1*Δ *pde1*Δ) 的 cAMP 生产对比

为对比考察一下选择标记基因 *UR43* 存在对 cAMP 生产可能的影响, 进行了两个菌株的 cAMP 生产初步评价。1、种子液培养同实施例 4; 2、发酵: 1) 发酵用培养基: 酵母提取物 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 自然 pH 值; 2) 发酵条件为: 新鲜种子液接种到装有 25 ml 发酵培养基的 100 ml 容量瓶中, 控制初始 OD₆₀₀ 值在 0.1 左右, 30 °C、220 rpm 下发酵。发酵液分析同实施例 4 中的 HPLC 分析方法。120 h 内的胞外 cAMP 生产结果见图 2。图 2 结果显示: 1、两个缺失菌株 120 h 内的最大胞外 cAMP 浓度分别为 252.0、953.8 μmol/L, 分别为对照菌株 W303-1A 最大胞外 cAMP 浓度 (1.45 μmol/L) 的 173.8、657.8 倍, 为实施例 4 里 W303-1B (*tpk1*Δ *tpk2*Δ *tpk3*Δ *yak1*Δ) 菌株最大胞外 cAMP 浓度的 1.17、4.42 倍; 2、W303-1A (*tpk1*Δ *tpk2*Δ *tpk3*Δ *yak1*Δ *pde1*Δ::*UR43*) 的 cAMP 浓度 48 h 起基本稳定, 而 W303-1A (*tpk1*Δ *tpk2*Δ *tpk3*Δ *yak1*Δ *pde1*Δ) 的 cAMP 浓度则一直上升; 3、不保留选择标记 *UR43* 可以明显提高 cAMP 产量。

三、W303-1A (*tpk1*Δ *tpk2*Δ *tpk3*Δ *yak1*Δ *pde1*Δ) 的生长和 cAMP 生产评价

进行了不带 *UR43* 的五个基因缺失菌株的生长和发酵生产胞外 cAMP 评价: 1、种子液培养同实施例 4; 2、发酵: 1) 发酵用培养基: 酵母提取物 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 葡萄糖 20~150 g/L, 自然 pH 值; 2) 发酵条件为: 新鲜种子液接种到装有 25 ml 发酵培养基的 100 ml 容量瓶中, 控制初始 OD₆₀₀ 值在 1 左右, 30 °C、220 rpm 下发酵。发酵液分析同实施例 4 中的 HPLC 分析方法。120 h 内的生长和发酵生产胞外 cAMP 评价结果见表 4。

表 4、五个基因缺失菌株的生长和 cAMP 生产评价

葡萄糖浓度(g/L)	最大 OD ₆₀₀	最高胞外 cAMP 浓度(μmol/L)
20	31.1 (24 h)	981.0 (48 h)
50	35.0 (48 h)	2223.7 (72 h)
100	63.7 (72 h)	3596.6 (96 h)
150	69.5 (72 h)	3925.6 (96 h)

实施例 6: *BAS1*-*BAS2* 融合共表达

将 *BAS1* 和 *BAS2* 基因进行融合共表达, 并整合到酵母细胞的染色体上。为此首先需要构建带有左、右同源臂的融合共表达整合载体。这里选择的整合位点是被文献报道 (Bai Flagfeldt D, Siewers V, Huang L, et al. Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 2009, 26(10): 545-551) 有较高基因表达效率的 YNRCΔ 9, 位于染色体 XIV 上。

一、*BAS1*-*BAS2* 融合共表达质粒构建

共 4 个连接得到 *BAS1*-*BAS2* 融合共表达质粒 pUC18-H1_{YNRCΔ 9}-*BAS1*-*BAS2*-H2_{YNRCΔ 9}-*UR43*-H2_{YNRCΔ 9} (示意图见图 3)。

1、pUC18-H1_{YNRCΔ 9}-*Sac*I-*Sa*II-H2_{YNRCΔ 9} 质粒构建

以 W303-1A 的染色体 DNA 为模板进行 PCR 扩增 YNRCΔ 9 的部分序列作为整合的左、右同源臂。使用表 2 中的 SEQ ID No. 33、SEQ ID No. 34 所示序列为上、下游引物 P33、P34，全式金公司生产的 Fast Pfu 聚合酶，50℃退火 1 min，72℃延伸 45 sec，共 32 个循环，得到 521 bp 的 PCR1 片段（对应序列用作整合的左同源臂 H1YNRCΔ 9）。使用表 2 中的 SEQ ID No. 35、SEQ ID No. 36 所示序列为上、下游引物 P35、P36，同法扩增得到 448 bp 的 PCR2 片段（对应序列用作整合的右同源臂 H2YNRCΔ 9）。再以 PCR1、PCR2 产物为模板，以 P33、P36 为引物对，交叉重叠延伸 PCR 反应扩增得到 949 bp 的 PCR12 片段。此片段的 5' 端添加有酶切位点 *EcoRI*，3' 端添加有酶切位点 *BamHI*，中间添加有酶切位点 *SacI*、*SalI*。将 PCR 产物用 *EcoRI* 和 *BamHI* 双酶酶切，与同样双酶酶切的 pUC18 大片段连接，转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞，提取转化子质粒进行酶切鉴定，得到质粒 pUC18-H1YNRCΔ 9- *SacI*-*SalI*-H2 YNRCΔ 9。测序证明克隆片段没有突变。

2、pUC18-H1YNRCΔ 9- *SacI*-*SalI*-H2 YNRCΔ 9- *URA3*-H2 YNRCΔ 9 质粒构建

以 YCplac33 为模板进行 PCR 扩增 *URA3* 基因用作整合时的选择标记基因。使用表 2 中的 SEQ ID No. 37、SEQ ID No. 38 所示序列为上、下游引物 P37、P38，全式金公司生产的 Fast Pfu 聚合酶，50℃退火 1 min，72℃延伸 1 min，共 32 个循环，得到 1060 bp 的 PCR1 片段。仍以 W303-1A 的染色体 DNA 为模板进行 PCR 扩增 H2 YNRCΔ 9 片段，但上、下游引物对换成表 2 中的 SEQ ID No. 39、SEQ ID No. 40 所示序列为 P39、P40，扩增得到 438 bp 的 PCR2 片段。再以 PCR1、PCR2 产物为模板，以 P37、P40 为引物对，交叉重叠延伸 PCR 反应扩增得到 1478 bp 的 PCR12 片段。此片段的 5' 端添加有酶切位点 *BamHI*，3' 端添加有酶切位点 *HindIII*。将 PCR 产物用 *BamHI* 和 *HindIII* 双酶酶切，与同样双酶酶切的 pUC18-H1YNRCΔ 9- *SacI*-*SalI*-H2 YNRCΔ 9 大片段连接，转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞，提取转化子质粒进行酶切鉴定，得到质粒 pUC18-H1YNRCΔ 9- *SacI*-*SalI*-H2 YNRCΔ 9- *URA3*-H2 YNRCΔ 9。测序证明克隆片段没有突变。

3、pGEM-T easy-*BAS1*-*BAS2* 质粒构建

以 W303-1A 的染色体 DNA 为模板进行 PCR 扩增基因 *BAS1*，使用表 2 中的 SEQ ID No. 41、SEQ ID No. 42 所示序列为上、下游引物 P41、P42，全式金公司生产的 Fast Pfu 聚合酶，50℃退火 1 min，72℃延伸 2.5 min，共 32 个循环。得到 2907bp 的 PCR1 片段，此片段 5' 端添加有酶切位点 *SacI*，包含 *BAS1* 基因起始密码子 ATG 上游 762 bp 序列和包括 ATG 在内的 2112 bp ORF 序列，删除了 ORF 的 3' 端 324 bp（含终止密码子）序列。

以 W303-1A 的染色体 DNA 为模板进行 PCR 扩增基因 *BAS2*，使用表 2 中的 SEQ ID No. 43、SEQ ID No. 44 所示序列为上、下游引物 P43、P44，全式金公司生产的 Fast Pfu 聚合酶，50℃退火 1 min，72℃延伸 1.5 min，共 32 个循环。得到 1692 bp 的 PCR2 片段，其 3' 端添加有酶切位点 *SalI*；包含 *BAS2* 基因 ORF 全部序列（含终止密码子）。

以 PCR1、PCR2 产物为模板，以 P41、P44 为引物对，交叉重叠延伸 PCR 反应扩增得到 4578 bp 的 PCR12 片段。将此 PCR 片段进行加 A 尾反应后，琼脂糖凝胶电泳分离，切胶回收，按说明书操作要求与购自 Promega 公司的 pGEM-T easy 载体连接，转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞，提取转化子质粒进行酶切鉴定，得到质粒 pGEM-T easy-*BAS1*-*BAS2*。测序证明克隆片段没有突变。

4、pUC18-H1YNRCΔ 9- *BAS1*-*BAS2*- H2 YNRCΔ 9- *URA3*-H2 YNRCΔ 9 质粒构建

用 *SacI*、*SalI* 双酶酶切质粒 pGEM-T easy-*BAS1*-*BAS2*，回收大片段 *SacI*-*BAS1*-*BAS2*-*SalI*，与同样双酶酶切的 pUC18-H1YNRCΔ 9- *SacI*-*SalI*-H2 YNRCΔ 9- *URA3*-H2 YNRCΔ 9 大片段连接，得到整合质粒 pUC18-H1YNRCΔ 9- *BAS1*-*BAS2*- H2 YNRCΔ 9- *URA3*-H2 YNRCΔ 9。

二、菌株 W303-1A(*tpk1*Δ *tpk2*Δ *tpk3*Δ *yak1*Δ *pde1*Δ*BAS1BAS2*)构建

将质粒 pUC18-H1YNRCΔ 9- *BAS1*-*BAS2*- H2 YNRCΔ 9- *URA3*-H2 YNRCΔ 9 用 *PvuII* 酶切，得到线性化 DNA 片段 H1YNRCΔ 9- *BAS1*-*BAS2*- H2 YNRCΔ 9- *URA3*-H2 YNRCΔ 9；然后转化 W303-1A (*tpk1*Δ *tpk2*Δ *tpk3*Δ *yak1*Δ *pde1*Δ) 菌株感受态细胞，同实施例 1 中“W303-1A (*tpk2*Δ) 菌株构建”方法筛选、鉴定得到 W303-1A (*tpk1*Δ *tpk2*Δ *tpk3*Δ *yak1*Δ *pde1*Δ *BAS1BAS2*-*URA3*) 菌株和 W303-1A (*tpk1*Δ *tpk2*Δ *tpk3*Δ *yak1*Δ

pde1Δ BAS1BAS2)菌株。PCR 方法验证用引物对为表 2 中的 SEQ ID No. 45、SEQ ID No. 46 所示序列为上、下游引物 P45、P46，整合成功、含有 *URA3* 基因的转化子 PCR 产物为 7389 bp，整合成功、*URA3* 基因弹出的转化子 PCR 产物为 5929 bp，对照菌株 PCR 产物为 1687 bp。对 5929 bp PCR 产物的测序结果证明染色体上发生了预期的变化：*YNRCΔ* 9 位点有 321 bp 序列被敲除，替代插入的是 *BAS1BAS2* 融合片段，此片段没有发生突变；不含 *URA3* 基因。

三、菌株 W303-1A(*tpk1Δ tpk2Δ tpk3Δ yak1Δ pde1ΔBAS1BAS2*)的生长和 cAMP 生产评价

实施例 5 已经证明了葡萄糖浓度显著影响 cAMP 的生产。鉴于 cAMP 合成所需组分（分子式为 $C_{10}H_{12}N_5O_6P$ ），在葡萄糖浓度提高的同时，推测培养基中氮、磷的含量尤其是氮的含量可能成为 cAMP 合成的首要制约因素。另外，作为 cAMP 合成的前提物，胞外腺嘌呤的状况也极大地影响嘌呤合成途径各基因的表达水平，进而影响 cAMP 生产。因此，这里对比考察了上述菌株在两个酵母提取物/蛋白胨含量水平（1*YP、2*YP）、添加腺嘌呤下的 cAMP 生产情况。具体操作如下：1、种子液培养同实施例 4；2、发酵：1）发酵用培养基：酵母提取物 10 g/L、蛋白胨 20 g/L，简记为 1*YP，葡萄糖 150 g/L，自然 pH 值；酵母提取物 20 g/L，蛋白胨 40 g/L，简记为 2*YP，葡萄糖 150 g/L，自然 pH 值；腺嘌呤的添加量为 0.625、1.25 g/L，简称为 A0.625、A1.25；2）发酵条件为：新鲜种子液接种到装有 25 ml 发酵培养基的 100 ml 容量瓶中，控制初始 OD₆₀₀ 值在 1 左右，30 °C、220 rpm 下发酵；3）发酵液分析：同实施例 4 中的 HPLC 分析方法，同时补充腺嘌呤的 HPLC 分析：a、样品处理和 HPLC 分析与 cAMP 分析的样品处理和 HPLC 分析相同；b、腺嘌呤标准曲线制作：将腺嘌呤标准品用灭菌后的去离子水配置成浓度为 5 mg/mL 的标准溶液，再用去离子水对其进行稀释，得到终浓度分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL 的标准样，过滤除菌后进行色谱分析，做标准曲线；c、利用标准曲线由外标定量法计算出发酵液样品中腺嘌呤的浓度。

发酵结果见表 5。表 5 结果表明：1、同为 1*YP、葡萄糖 15%的发酵条件下，融合共表达 *BAS1-BAS2* 菌株最大胞外 cAMP 浓度较实施例 5 里的 W303-1A(*tpk1Δ tpk2Δ tpk3Δ yak1Δ pde1Δ*)菌株最大胞外 cAMP 浓度（3925.6μ mol/L）有所提高，前者为后者的 1.108 倍；2、提高酵母粉和蛋白胨浓度效果极为显著；3、添加腺嘌呤能进一步提高胞外 cAMP 产量。

表 5、W303-1A(*tpk1Δ tpk2Δ tpk3Δ yak1Δ pde1ΔBAS1-BAS2*)
菌株的 cAMP 生产评价

组分	最大 OD ₆₀₀	最高 cAMP 浓度(μ mol/L)	比例	比例
1*YP, 葡萄糖 150g/L	70.1 (72 h)	4348.8 (120 h)	1	—
2*YP, 葡萄糖 150g/L	71.6 (96 h)	8291.5 (168 h)	1.907	1
2*YP, 葡萄糖 150g/L, A0.625	68.4 (120 h)	9265.3 (168 h)	2.131	1.117
2*YP, 葡萄糖 150g/L, A1.25	64.4 (120 h)	9721.6 (168 h)	2.235	1.172

权 利 要 求 书

- 1、一种酵母，其特征在于，所述酵母包括第一种和第二种基因修饰，其中，所述第一种基因是蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 催化亚基编码基因 *TPK1*, *TPK2* 和 *TPK3*, 通过修饰第一种基因使 PKA 活性或表达被完全抑制，从而消除对环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 的反馈抑制，但同时使得酵母的生长被抑制，第二种基因修饰消除了第一种基因修饰导致的生长抑制，从而使得酵母能够正常生长，所述酵母的 cAMP 产量上升，其中，所述 cAMP 产量上升，是相对于未经基因修饰的酵母的 cAMP 产量而言。
2. 根据权利要求1所述的酵母，其特征在于，所述第二种基因包括蛋白激酶 Rim15 编码基因 *RIM15*、转录因子 Msn1/Msn2 编码基因 *MSN1/MSN2*、蛋白激酶 Yak1 编码基因 *YAK1* 或蛋白激酶 Sch9 编码基因 *SCH9*，优选 *YAK1*。
3. 根据权利要求1-2任一所述的酵母，其特征在于，所述第二种基因修饰使得所修饰基因编码酶的活性或表达被完全抑制或者编码酶的活性提高或者过表达。
4. 根据权利要求1-3任一所述的酵母，其特征在于，所述酵母还包括第三种基因修饰，以减少 cAMP 的降解，从而提高 cAMP 产量。
5. 根据权利要求4所述的酵母，其特征在于，所述第三种基因为 cAMP 磷酸二酯酶编码基因 *PDE1* 和/或 *PDE2*，优选 *PDE1*。
6. 根据权利要求4-5任一所述的酵母，其特征在于，所述第三种基因修饰使得所修饰基因编码酶的活性或表达被完全抑制。
7. 根据权利要求1-6任一所述的酵母，其特征在于，所述使得编码酶的活性或表达被完全抑制的基因修饰方式包括点突变、缺失、插入、反义 polynucleotides、siRNA、microRNA、CRISPR；使得编码酶的活性提高或者过表达的基因修饰方式包括点突变、连接强启动子、连接增强子、提高拷贝数。
8. 根据权利要求1-7任一所述的酵母，其特征在于，所述酵母还包括第四种基因修饰，以增加嘌呤合成途径中 cAMP 前体物的合成的正调控，使 cAMP 前体物的合成上升，从而提高 cAMP 产量。
9. 根据权利要求8所述的酵母，其特征在于，所述第四种基因包括转录因子 Bas1 和 Bas2 编码基因。
10. 根据权利要求9所述的酵母，其特征在于，所述基因修饰使 Bas1/Bas2 复合物表达上升。
11. 根据权利要求8-10任一所述的酵母，其特征在于，所述第四种基因的基因修饰方式包括点突变、连接强启动子、连接增强子、提高拷贝数、融合共表达，优选融合共表达。
12. 根据权利要求1-11任一中的酵母，其特征在于，所述酵母为酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、巴斯德酵母 (*Saccharomyces pastorianus*)、树干毕赤酵母 (*Pichia stipitis*)、*Saccharomyces Bayanus* 和 依哈塔假丝酵母 (*Candida shehatae*) 中的任意一种，优选酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。
13. 一种构建权利要求1-12任一所述的酵母的方法。
14. 一种利用权利要求1-12任一的酵母生产 cAMP 的发酵方法。
15. 一种利用权利要求1-12任一的酵母发酵生产的发酵液。
16. 权利要求1-12任一所述的酵母或者权利要求15所述的发酵液在生产 cAMP 中的用途。
17. 权利要求1-12任一所述的酵母或者权利要求15所述的发酵液在医药、畜牧业、食品或化工领域的应用。

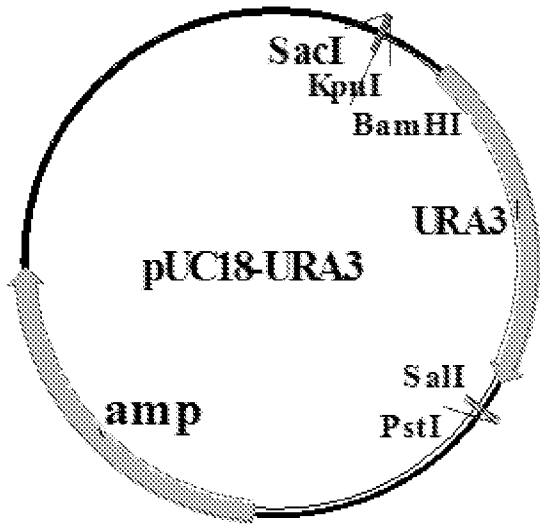


图 1A

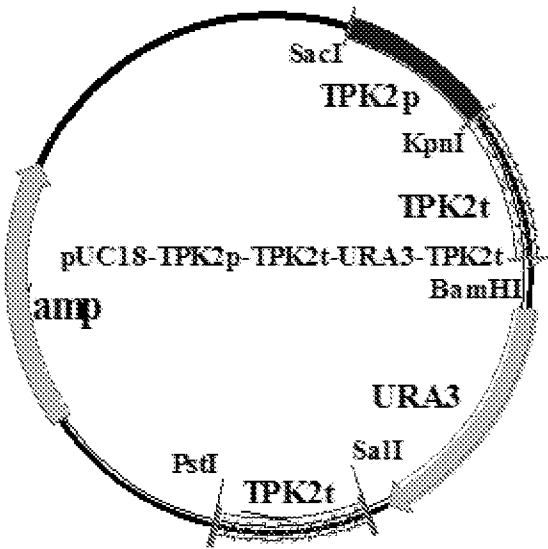


图 1B

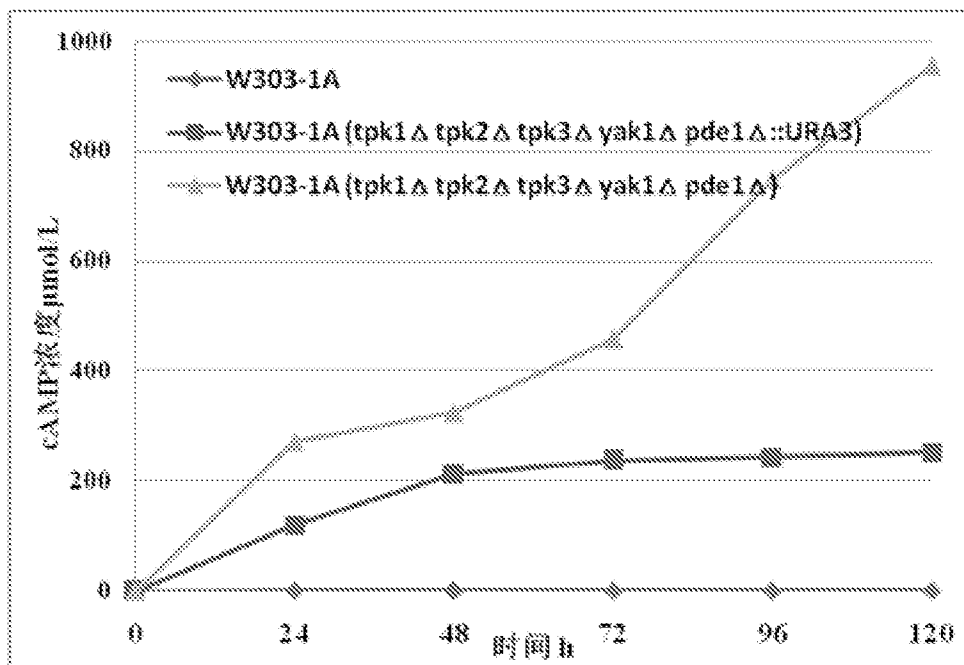


图 2

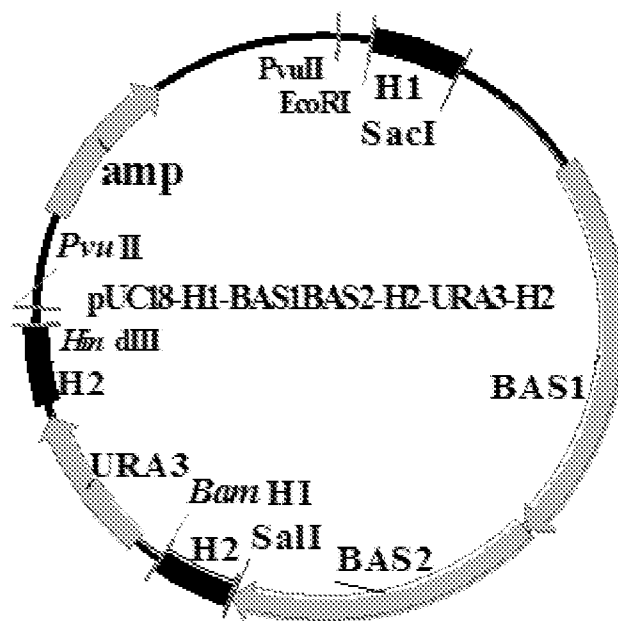


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/074067

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/01 (2006.01) i; C12N 1/16 (2006.01) i; C12R 1/645 (2006.01) n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Data Base: CPRSABS, CNABS, SIPOABS, CATXT, USTXT, CNTXT, EPTXT, WOTXT, KRTXT, JPTXT, CNKI, DWPI, ISI WEB OF KNOWLEDGE, PUBMED, GOOGLE;

Search Terms: yeast, protein kinase, phosphodiesterase, transcription factor, marker gene, Saccharomyces, cyclic adenosine monophosphate, cAMP, protein kinase A, PKA, TPK1, TPK2, TPK3, Rim15, Msn1, Msn2, Yak1, Sch9, Pde1, Pde2, Bas1, Bas2, URA3

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Ji, Xiaobing "Several Ways to Make Saccharomyces Cerevisiae Produce High Yield of cAMP (Registration of Postgraduate Academic Report)" TIANJIN UNIVERSITY E-LEARNING PLATFORM (gleaming.tju.edu.cn/mod/data/view.php?d=15&rid=1884&filter=1), 31 October 2012 (31.10.2012), summary	1-7, 12-17
A	Ji, Xiaobing "Several Ways to Make Saccharomyces Cerevisiae Produce High Yield of cAMP (Registration of Postgraduate Academic Report)" TIANJIN UNIVERSITY E-LEARNING PLATFORM (gleaming.tju.edu.cn/mod/data/view.php?d=15&rid=1884&filter=1), 31 October 2012 (31.10.2012), summary	8-11
X	LIVASE, D. et al. "Transcriptional Responses to Glucose in Saccharomyces Cerevisiae Strains Lacking A Functional Protein Kinase A" BMC GENOMICS, vol. 12, no. 405, 09 August 2011 (09.08.2011), abstract	1-7, 12-17
A	LIVASE, D. et al. "Transcriptional Responses to Glucose in Saccharomyces Cerevisiae Strains Lacking A Functional Protein Kinase A" BMC GENOMICS, vol. 12, no. 405, 09 August 2011 (09.08.2011), abstract	8-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 12 November 2016 (12.11.2016)	Date of mailing of the international search report 23 November 2016 (23.11.2016)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer LUO, Xiao Telephone No.: (86-10) 62089158

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/074067**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHAO, Huansheng "Comparison of the Activity of the PKA Catalytic Subunits in <i>S.cerevisiae</i> " BASIC SCIENCES, CHINA MASTER'S THESES FULL-TEXT DATABASE, no. 8, 15 August 2009 (15.08.2009), the whole document	1-17
A	PAN, Xuewen et al. "Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase Regulates Pseudohyphal Differentiation in <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> " MOL CELL BIOL., vol. 19, no. 7, 31 July 1999 (31.07.1999), the whole document	1-17
A	ZURITA-MARTINEZ, S.A. et al. "Tor and Cyclic AMP-Protein Kinase A: Two Parallel Pathways Regulating Expression of Genes Required for Cell Growth" EUKARYOTIC CELL, vol. 4, no. 1, 31 January 2005 (31.01.2005), the whole document	1-17
A	SOM, I. et al. "DNA-Bound Bas1 Recruits Pho2 to Activate ADE Genes in <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> " EUKARYOTIC CELL, vol. 4, no. 1, 31 October 2005 (31.10.2005), the whole document	1-17

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/074067

A. 主题的分类

C12N 15/01(2006.01)i; C12N 1/16(2006.01)i; C12R 1/645(2006.01)n

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

数据库: CPRABS, CNABS, SIPOABS, CATXT, USTXT, CNTXT, EPTXT, WOTXT, KRTXT, JPTXT, CNKI, DWPI, ISI WEB OF KNOWLEDGE, PUBMED, GOOGLE; 检索词: 酵母, 环磷酸腺苷, 蛋白激酶, 磷酸二酯酶, 转录因子, 标记基因, Saccharomyces, cyclic adenosine monophosphate, cAMP, protein kinase A, PKA, TPK1, TPK2, TPK3, Rim15, Msn1, Msn2, Yak1, Sch9, Pde1, Pde2, Bas1, Bas2, URA3

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	姬晓兵. "使酿酒酵母高产cAMP的几条途径(研究生学术报告预告登记)" 天津大学研究生e-Learning平台 (glearning.tju.edu.cn/mod/data/view.php?d=15&rid=1884&filter=1), 2012年 10月 31日 (2012 - 10 - 31), "内容提要"部分	1-7, 12-17
A	姬晓兵. "使酿酒酵母高产cAMP的几条途径(研究生学术报告预告登记)" 天津大学研究生e-Learning平台 (glearning.tju.edu.cn/mod/data/view.php?d=15&rid=1884&filter=1), 2012年 10月 31日 (2012 - 10 - 31), "内容提要"部分	8-11
X	Daniela Livase 等. "Transcriptional responses to glucose in Saccharomyces cerevisiae strains lacking a functional protein kinase A" BMC Genomics, 第12卷, 第405期, 2011年 8月 9日 (2011 - 08 - 09), 摘要	1-7, 12-17
A	Daniela Livase 等. "Transcriptional responses to glucose in Saccharomyces cerevisiae strains lacking a functional protein kinase A" BMC Genomics, 第12卷, 第405期, 2011年 8月 9日 (2011 - 08 - 09), 摘要	8-11

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☐ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2016年 11月 12日

国际检索报告邮寄日期

2016年 11月 23日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

罗霄

电话号码 (86-10)62089158

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	赵焕生. “酿酒酵母PKA催化亚基的活性比较研究” 中国优秀硕士学位论文全文数据库（基础科学辑），第8期，2009年 8月 15日（2009 - 08 - 15）， 全文	1-17
A	XueWen Pan 等. “Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase Regulates Pseudohyphal Differentiation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ” Mol Cell Biol., 第19卷，第7期，1999年 7月 31日（1999 - 07 - 31）， 全文	1-17
A	Sara A. Zurita-Martinez 等. “Tor and Cyclic AMP-Protein Kinase A: Two Parallel Pathways Regulating Expression of Genes Required for Cell Growth” Eukaryotic Cell, 第4卷，第1期，2005年 1月 31日（2005 - 01 - 31）， 全文	1-17
A	Indrani Som 等. “DNA-Bound Bas1 Recruits Pho2 to Activate ADE Genes in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ” Eukaryotic Cell, 第4卷，第10期，2005年 10月 31日（2005 - 10 - 31）， 全文	1-17