

木酮糖激酶基因整合表达载体构建及在酿酒酵母中的过表达

葛菁萍, 曹喜生, 宋刚, 凌宏志, 平文祥*

(微生物黑龙江省高校重点实验室, 黑龙江大学生命科学学院, 哈尔滨 150080)

摘要:【目的】以载体 p406ADH1 为构建骨架, 构建一个酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 工业菌株的整合表达载体。【方法】通过酶切连接的方式, 将 4 个元件片段: 作为筛选标记的 G418 抗性基因 KanR, 用于基因表达的 ADH1 终止子片段, 酿酒酵母 W5 自身木酮糖激酶基因, 18S rDNA 介导的同源整合区, 插入到骨架质粒 p406ADH1 中, 得到多拷贝整合表达载体 pCXS-RKTr。将该载体线性转化酿酒酵母后, 对转化子中木酮糖激酶酶活进行测定, 检测其表达情况。【结果】重组质粒在酿酒酵母体内实现了木酮糖激酶的高水平稳定表达, 其酶活力是初始菌株的 2.87 倍。【结论】本实验构建了一个酿酒酵母工业菌株整合表达载体, 并用此载体过表达了其自身的木酮糖激酶基因。该重组质粒载体的构建可以有效解决酿酒酵母中自身木酮糖激酶酶活较低的情况, 这为利用木糖高产乙醇酿酒酵母基因工程菌株的构建和其它酵母重组质粒载体的构建奠定基础。

关键词: 酿酒酵母; 同源整合; 载体构建; 整合表达; 木酮糖激酶

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 06-0762-06

秸秆等可再生资源水解液中主要含有木糖, 以其为底物发酵生产乙醇, 是目前解决能源危机的有效途径之一。作为乙醇工业生产菌株, 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 虽然具有许多优良特性^[1]。但其缺乏将木糖转化的关键酶系, 而不能利用木糖。虽然目前很多研究中, 已经将木糖代谢关键基因——木糖还原酶基因 *XYL1* 和木糖醇脱氢酶基因 *XYL2* 转入酿酒酵母并得到功能展示, 但经这种代谢工程改造后的重组酿酒酵母的木糖利用率低且发酵副产物木糖醇产生量较高^[3], 导致不能很好地发酵木糖生产乙醇。

木酮糖激酶 (xylulokinase, XK) 是酵母木糖代谢的第 3 个关键酶。它将木糖醇生成的木酮糖转变成 5-磷酸木酮糖, 进而进入磷酸戊糖途径 (PPP 途径)。酿酒酵母本身具有木酮糖激酶, 但活性较低, 这就限制了木糖代谢流向磷酸戊糖途径的速度, 进而影响

乙醇的产生。因此, 超表达酿酒酵母自身的木酮糖激酶基因 *XKS1*, 有利于加快酿酒酵母重组菌中木酮糖向 5-磷酸木酮糖的转化, 提高酿酒酵母的木糖利用率和乙醇得率^[5-6]。

本研究以质粒 p406ADH1 为骨架, 在其中引入显性选择标记 G418 抗性基因 KanR 及用于质粒载体多拷贝同源整合的特定 18S rDNA 片段, 同时利用 ADH1 强启动子和终止子, 构建可表达 *XKS1* 的表达盒, 形成适合酿酒酵母工业菌株的多拷贝整合表达载体, 提高 *XKS1* 基因在工业酿酒酵母中的稳定性和表达量。该项工作为进一步利用酿酒酵母发酵木糖产醇奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和载体: 酿酒酵母菌株 W5、大肠杆菌

基金项目: 国家“863 计划” (2007AA100702-6); 黑龙江省教育厅重点项目 (1151z011)

* 通信作者。E-mail: wshw512@gmail.com

作者简介: 葛菁萍 (1972-), 女, 黑龙江省齐齐哈尔人, 主要研究方向微生物学。E-mail: gejingping512@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-01-04; **修回日期:** 2010-03-13

(*Escherichia coli*)DH5 α 由本实验室保存。载体构建骨架 p406ADH1 和质粒 pKT0150 购买自 Addgene 公司。

1.1.2 培养基: YEPD 培养基: 蛋白胨 20 g, 酵母粉 10 g, 葡萄糖 20 g, 定容至 1 L, pH 自然, 121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 15 min。培养酿酒酵母及转化子为 YEPD 培养基, 固体培养基添加 2% 琼脂, 筛选转化子时加入终浓度至 200、300、400、500、600、800、1000 ng/L 的 G418, 在 30 $^{\circ}$ C 下静止培养。

1.1.3 酶和主要试剂: 限制性核酸内切酶 *Nde* I、*Aat* II、*Spe* I、*Sal* I、*Eco*52 I (*Eag* I), *Hpa* I 购买自 TaKaRa 公司或 NEB 公司。*EasyPfu* DNA 聚合酶、*Taq* DNA 聚合酶购买自北京全式金生物技术有限公司。T4 DNA 连接酶购自宝生物工程有公司。YeastBusterTM 酵母蛋白抽提试剂盒购买自

Novagen 公司。磷酸烯醇式丙酮酸钾 (PEP-K)、ATP、NADH、D-木酮糖、丙酮酸激酶 (PK)、L-乳酸脱氢酶 (LDH) 购自 Sigma 公司。

1.2 引物设计

根据质粒 pKT0150 上 G418 抗性基因 KanR 及 ADH1 终止子片段的基因序列和 GenBank 中已登陆的酿酒酵母 *XKS1* 基因的全序列并参考相关文献^[9,11], 设计 4 对引物分别用于扩增 G418 抗性基因 KanR、ADH1 终止子片段、酿酒酵母 *XKS1* 基因及 2.2 kb rDNA 片段, 在各上下游引物中分别加入用于质粒构建所需的酶切位点并在 5' 端加入保护碱基, 各限制性内切酶位点为构建元件定向克隆到构建骨架质粒载体 p406ADH1 而设计。各引物序列见表 1。

表 1 引物序列及所加入的酶切位点

Table 1 Primer sequences, templates and their restriction endonuclease sites

Gene	Primer sequences (5'→3')	Oriteiation	Templates	Restriction endonuclease sites
KanR	TTCATATGCTCTGTTTAGCTTGCCTC	+	pKT0150	<i>Nde</i> I
	CTGGACGTCTATCATCGATGAATTCGA	-	pKT0150	<i>Aat</i> II
<i>XKS1</i>	CGGACTAGTACTACTTTAATGTTGTGTTTCAGTAA	+	W5 genome	<i>Spe</i> I
	CGCGTCGAC TTTAGATGAGAGTCTTTTCCAG	-	W5 genome	<i>Sal</i> I
ADH1 terminator	CGCGTCGACATTTGTTACTGCTGCTGGTATT	+	pKT0150	<i>Sal</i> I
	TATCGGCCGCCCTGTATCCCTAGCGG	-	pKT0150	<i>Eag</i> I
2.2 kb rDNA	TTCATATGGGAACCTCTAATCATTCGGCT	+	W5 genome	<i>Nde</i> I
	TCTCGGCCGAACGAACGAGACCTTAACCT	-	W5 genome	<i>Eag</i> I

“+” indicated the upstream primers, “-” indicated the downstream primers, letters with underlined indicated the restriction endonuclease sites.

1.3 各构建元件的克隆

利用设计的 4 对引物及 *EasyPfu* DNA 聚合酶,

按以下各反应程序 PCR 扩增重组质粒载体构建所需的 4 个元件片段(表 2)。

表 2 4 个克隆元件的 PCR 反应程序及相关参数

Table 2 The PCR systems used in cloning of four components

Cloning components	Pre-denaturation	PCR systems	Reaction cycles
KanR		94 $^{\circ}$ C 1 min, 45 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min	
<i>XKS1</i>		94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min	
ADH1 terminator	94 $^{\circ}$ C, 5 min	94 $^{\circ}$ C 1 min, 50 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min	30
2.2 kb rDNA fragment		94 $^{\circ}$ C 1 min, 53 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2.5 min	

由于 *EasyPfu* DNA 聚合酶是高保真的 DNA 聚合酶, 因此, 首先对该酶扩增出的 DNA 片段进行加“A”尾处理。具体方法是: 向 50 μ L *EasyPfu* DNA 聚合酶的 PCR 反应液中加 0.25 μ L *Taq* (5 U/mL) DNA 聚合酶, 72 $^{\circ}$ C 水浴 10 min。即可在平末端片断的 3' 端加上“A”尾, 经胶回收后再与 T 克隆载体进行连接。

各基因片段与载体 pMD18-T 连接后的产物分别命名为 pCXS-T-KanR、pCXS-T-*XKS1*、pCXS-T-ADH1T、pCXS-T-rDNA。

1.4 高拷贝整合表达载体 pCXS-RKTr 的构建

质粒 p406ADH1 和质粒 pCXS-T-KanR 分别用

限制性内切酶 *Nde* I 和 *Aat* II 分别进行双酶切, 回收目的片段, 用 T4 DNA 连接酶将两片段连接得到质粒 pCXS-R。将质粒 pCXS-R 和质粒 pCXS-T-*XKS1* 分别用限制性内切酶 *Spe* I 和 *Sal* I 分别进行双酶切, 回收 2 目的酶切片段, 将 *XKS1* 基因片段作为插入片段连接到 pCXS-R 双酶切得到的较大片段上, 得到重组质粒 pCXS-RK。质粒 pCXS-RK 和质粒 pCXS-T-ADH1T 分别用限制性内切酶 *Sal* I 和 *Eag* I 进行双酶切, 回收两目的酶切片段。将 ADH1 终止子片段连接到 pCXS-RK 双酶切得到的较大片段上, 得到重组质粒载体 pCXS-RKT。对质粒 pCXS-

RKT 和质粒 pCXS-T-rDNA 分别用限制性内切酶 *Nde* I、*Eag* I 进行双酶切,回收两目的酶切片段。2.2 kb rDNA 片段连接到 pCXS-RKT 双酶切得到的较大片段上,得到最终的目的重组质粒载体 pCXS-RKTr。

将以上构建得到的质粒载体转化大肠杆菌 DH5 α ,提取质粒 pCXS-RKTr 采用酶切和 PCR 方法鉴定阳性克隆并保存备用。

1.5 重组质粒载体转化酿酒酵母

重组质粒载体 pCXS-RKTr 用 *Hpa* I 酶切线性化后,利用醋酸锂转化法对工业酿酒酵母 W5 进行转化^[12]。*Hpa* I 的单酶切位点位于特定 2.2 kb rDNA 片段的中部,重组质粒载体经该酶线性化后可以特异整合到酿酒酵母染色体的特定部位,以实现多拷贝同源重组。

1.6 重组酿酒酵母的筛选与鉴定

用含 200 ng/L G418 的 YEPD 平板筛选阳性重组菌,当筛选平板上长出阳性重组菌后,挑选出长势较好的菌落,接种在更高浓度的 G418 平板上,通过提高 G418 浓度以筛选高拷贝的整合转化子。

同时对经筛选得到的高拷贝转化子提取基因组 DNA,通过 PCR 验证确定重组质粒载体是否已经整合到酿酒酵母的染色体上。由于酿酒酵母的基因组中原本含有 *XKS1* 的基因序列,所以不能通过 PCR 扩增该段基因进行验证,为此通过 PCR 扩增质粒载体上存在的 G418 抗性基因 *KanR*,以验证载体是否已整合。

1.7 木酮糖激酶酶活测定

用 Novagen 公司的 YeastBusterTM 酵母专用蛋白抽提试剂盒对重组酵母菌株的活性蛋白进行提取,提取液作为粗酶液进行木酮糖激酶酶活测定。酶活测定方法参见文献^[13]。

1.8 重组菌的稳定性测定

将筛选得到的高拷贝阳性酵母转化子接种于 YEPD 液体培养基中,每隔 12 h 取样,系列稀释,以能在平板上长出单菌落为宜,分别在 YEPD 和含 G418 的 YEPD 平板上菌落计数,分别计为总菌数和带有整合质粒的菌落数,计算质粒载体稳定性^[9]:

$$\text{稳定性}(\%) = (\text{带有整合质粒的菌落数} \div \text{总菌数}) \times 100\%$$

2 结果

2.1 高拷贝同源整合表达载体 pCXS-RKTr 的构建

将所得 G418 抗性基因、*XKS1* 基因、*ADH1* 终止

子片段进行测序分析。结果表明,实验成功克隆到各基因片段(图略)。

依次将克隆得到的 G418 抗性基因(1477 bp)、*XKS1* 基因(1831 bp)、*ADH1* 终止子片段(301 bp)和特定 2.2 kb rDNA 片段(2.2 kb)构建至质粒 p406*ADH1* 上。成功构建得到整合表达载体 pCXS-RKTr,其片段大小为 9516 bp。重组质粒载体 pCXS-RKTr 的 PCR 验证结果和单酶切验证结果都与理论相符。整个构建过程如图 1。

2.2 重组酿酒酵母的筛选与鉴定

选取最高 G418 浓度(1000 ng/L)平板上长势较好的 5 个单菌落,以此做为重组菌株,分别命名为 *XKS1*-1、*XKS1*-2、*XKS1*-3、*XKS1*-4、*XKS1*-5。

对筛选得到的 5 个高拷贝转化子提取基因组 DNA,通过 PCR 扩增重组质粒载体上存在的 G418 抗性基因 *KanR*,以确定质粒载体是否已经整合到酿酒酵母的染色体上,并以初始菌株 W5 作为阴性对照。结果见图 2。

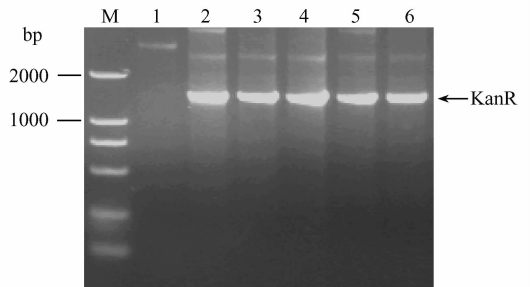


图 2 阳性转化子的 PCR 鉴定结果

Fig.2 The detection of positive transformants by PCR.

M; DNA Marker DL2000; Lane 1, PCR result of W5 genome; Lane 2, PCR result of the transformant *XKS1*-1; Lane 3, PCR result of the transformant *XKS1*-2; Lane 4, PCR result of the transformant *XKS1*-3; Lane 5, PCR result of the transformant *XKS1*-4; Lane 6, PCR result of the transformant *XKS1*-5.

凝胶电泳检测发现筛选到的 5 个转化子的基因组均扩增出 *KanR* 基因特异性条带,而初始菌株 W5 无此条带,这证明构建的重组质粒载体 pCXS-RKTr 已整合于 W5 的染色体基因组中。

2.3 重组酿酒酵母的木酮糖激酶酶活

测得的初始菌株 W5 及筛选得到的 5 个高拷贝转化子粗酶液中的木酮糖激酶酶活结果见表 3。

从酶活的测定结果可以看出,筛选得到的 5 个高拷贝转化子的 *XK* 活力均高于出发菌株 W5。其中 *XKS1*-1、*XKS1*-2 重组转化菌株 *XK* 活力略高于出发菌株,而 *XKS1*-3、*XKS1*-4、*XKS1*-5 重组转化菌株较出发菌株有较大幅度提高,分别是出发菌株 *XK*

活力的 2.66 倍、2.61 倍和 2.87 倍,这证明所构建的质粒载体 pCXS-RKTr 转化酿酒酵母细胞 W5 后

成功地实现了木酮糖激酶的高水平表达,达到了本文研究的预期目的。

表 3 不同菌株中木酮糖激酶的比活力(U/mg)

Table 3 The XK activities in different cell extracts(U/mg)

Strains	W5	XKS1-1	XKS1-2	XKS1-3	XKS1-4	XKS1-5
XK activities/(U/mg)	130.60 ± 0.02	141.20 ± 0.05	134.70 ± 0.04	346.76 ± 0.03	341.00 ± 0.06	374.40 ± 0.01
XK activities in transformant/XK activities in W5	-	1.08	1.03	2.66	2.61	2.87
Increment	-	8%	3%	166%	161%	187%

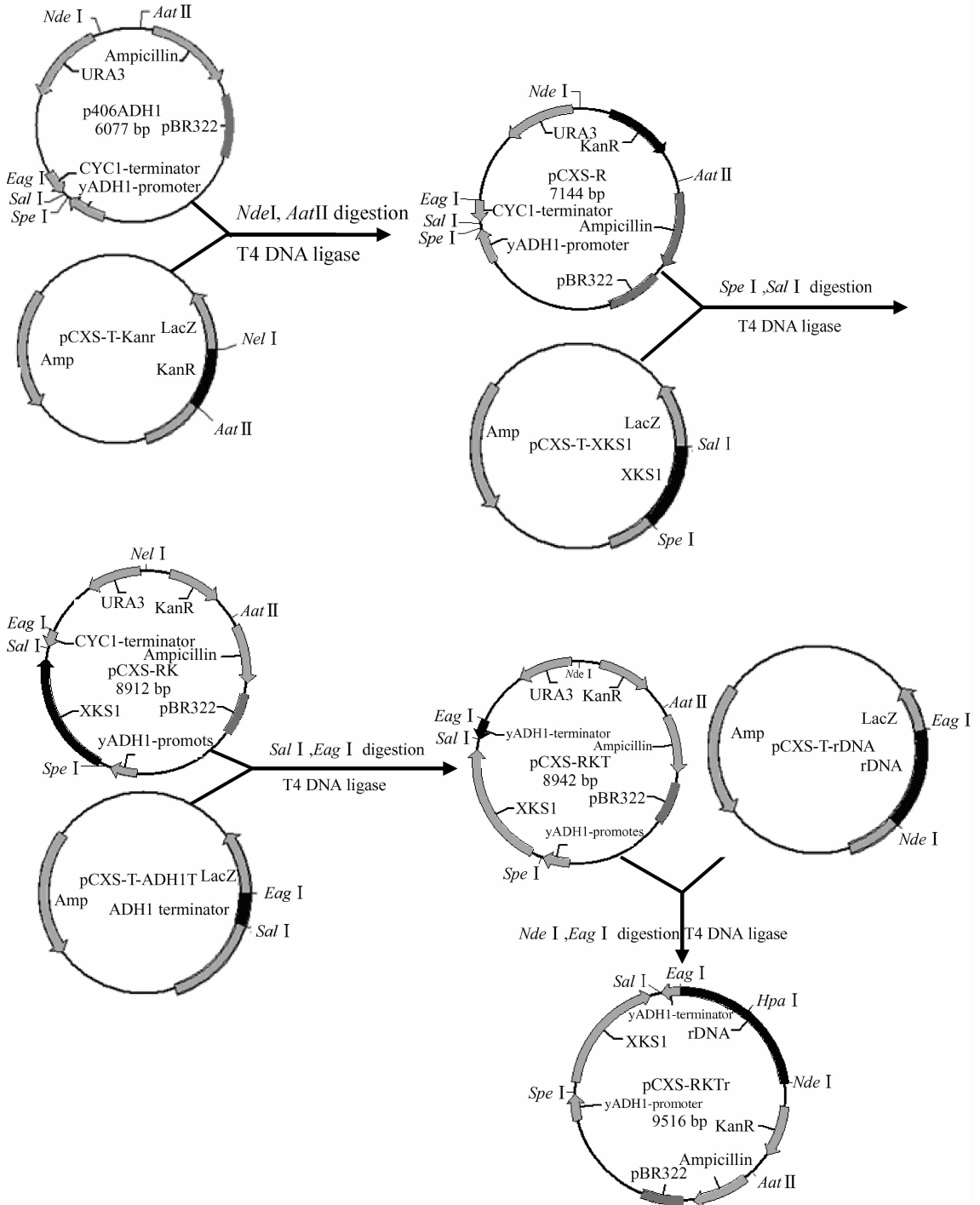


图 1 重组质粒 pCXS-RKTr 的构建策略

Fig. 1 The construction strategy of recombinant plasmid of pCXS-RKTr.

2.4 重组菌的稳定性

转化子 XKS1-5 连续传代 60 世代后的稳定性为 99.6% (图 3), 这表明所构建的高拷贝整合表达载体已稳定地整合到了工业酿酒酵母 W5 的染色体上, 成为其基因组的一部分, 使目的基因具有良好的遗传稳定性。重组菌株适合在非选择性压力培养条件下长时间稳定连续传代培养。

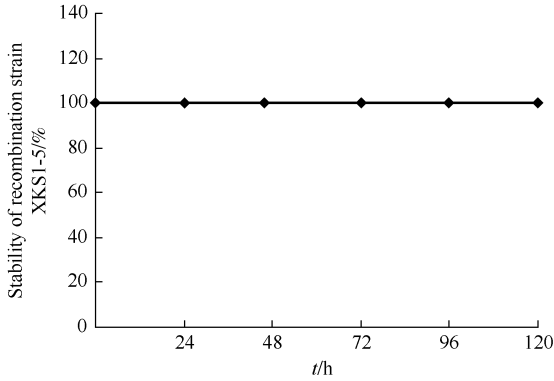


图 3 重组菌株 XKS1-5 的稳定性

Fig. 3 The Stability of recombination strain XKS1-5.

3 讨论

本文所构建的重组表达载体 pCXS-RKTr 是整合型质粒载体, 不含酵母自主复制序列, 因此将其线性导入酵母体内后, 只有和酵母染色体上的同源区发生重组, 并整合到染色体上, 外源基因才能够稳定存在和表达。为此, 本文利用 2.2 kb 长度的 18S rDNA 作为同源整合位点, 在不同浓度梯度的 G148 抗性选择培养基中筛选, 结果表明各个浓度梯度都可见转化子的生长。转化子 XKS1-5 连续传代 60 世代后的稳定性为 99.6%。从而证明重组酿酒酵母工程菌获得了稳定的 G418 抗性。

将所构建的重组质粒载体 pCXS-RKTr 转化酿酒酵母 W5 后, 经筛选得到 5 个耐 G418 抗性的重组菌株 XKS1-1、XKS1-2、XKS1-3、XKS1-4 和 XKS1-5, 其酶活分别为 141.20、134.70、346.76、341.00、374.40 U/mg。对 5 个重组菌株以及出发菌株 W5 进行 XK 酶活测定后发现, 重组菌株的 XK 酶活较 W5 都有所提高, 其中 XKS1-3、XKS1-4 和 XKS1-5 重组菌的酶活分别是 W5 的 2.66 倍、2.61 倍和 2.87 倍, 证明利用所构建的质粒载体成功地实现了 XKS1 在酿酒酵母细胞内的过量表达。由于表达的是酿酒酵母本身所具有的木酮糖激酶基因, 从酶活表达情况来看, 重组质粒在染色体上的整合, 并没有破坏或干扰原有基因的正常表达。

在本研究中, W5 菌株及筛选得到的 5 株重组

菌株的 XK 酶活较已有报道高出很多。Johansson (2001)^[5] 在其对木酮糖激酶过表达研究中, 发现其重组菌株 H158-pXks 的 XK 酶活仅为 20 U/mg; 沈煜 (2005) 所构建的转化子 HSXY-251 的 XK 酶活也只达到了 112 U/mg^[11]。而在本研究中, 转化菌株中 XK 酶活最高可达到 374.40 U/mg。这样高酶活的表达, 使该酿酒酵母菌株成为转化木糖生产乙醇的良好出发菌株。

如此高酶活表达的原因, 一是由于出发菌株本身的 XK 活性好; 二是细胞蛋白的获得方法的改进。本研究使用了 YeastBuster™ 酵母专用蛋白抽提试剂盒, 该试剂盒不同于传统的酵母细胞破碎方法, 如超声破碎或液氮研磨^[11-12], 这种方法得到的粗提物中目的蛋白 XK 产量大, 活性蛋白比例较高, 所以 XK 的活力得以充分发挥。比较 XKS1-5 转化菌株的 XK 酶活, 用破碎法获得的酶活为 326.54 U/mg, 用试剂盒法获得的酶活为 374.40 U/mg。由此可见, 利用试剂盒抽提法, 可以使 XK 酶活更接近于其真实值。同时也可看出, 本研究所获得的转化菌株, 其 XK 酶活确实高于以往文献报道。高酶活表达的第 3 个原因是启动子对 XK 表达的影响。在酿酒酵母外源 XK 表达研究中, 使用较多的是 PKG 启动子^[11,5], 而本研究中使用的是 ADH 启动子, 这种启动子的差别可能是造成 XK 酶活表达差别的原因, 具体问题还需进一步研究加以明确。

参考文献

- [1] Tang YQ, An MZ, Liu K, Nagai S, Shigematsu T, Morimura S, Kida K. Ethanol production from acid hydrolysate of wood biomass using the flocculating yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain KF-7. *Process Biochemistry*, 2006, 41(4): 909-914.
- [2] Hahn-Hägerdal B, Karhumaa K, Fonseca C, Spencer-Martins I, Gorwa-Grauslund MF. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74(5): 937-953.
- [3] Byron CH, Hung Lee. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. *Biotechnology Advances*, 2007, 25: 425 - 441.
- [4] Jin YS, Jeffries TW. Changing flux of xylose metabolites by altering expression of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2003, 105: 277-286.
- [5] Johansson B, Christensson C, Høbley T, HAHN-HÄGERDAL B. Xylulokinase over expression in two strains of *Saccharomyces cerevisiae* also expressing xylose

- reductase and xylitol dehydrogenase and its effect on fermentation of xylose and lignocellulosic hydrolysate. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67: 4249-4255.
- [6] Pitkanen JP, Aristidou A, Salusjärvi L, Ruohonen L, Penttilä M. Metabolic flux analysis of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using continuous culture. *Metabolic Engineering*, 2003, 5: 16-31.
- [7] Carla O, José AT, Nelson L, Nancy ADS, Lucilia D. Development of stable flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain for continuous *Aspergillus niger* β -galactosidase production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2007, 103: 318-324.
- [8] Wang X, Wang Z, Da Silva NA. G418 selection and stability of cloned genes integrated at chromosomal δ sequences of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, 49: 45-51.
- [9] 刘向勇, 沈煜, 郭亭, 鲍晓明. rDNA 介导的多拷贝整合表达载体的构建及其在酿酒酵母工业菌株中的应用. 山东大学学报(理学版) (*Journal of Shandong University*) (*Natural Science*), 2005, 4: 105-109.
- [10] Jiang K, Li Q, Gu GX. Improvement in the anti-staling capability of beer by genetically modifying industrial brewing yeast with high glutathione content. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2007, 23: 1071-1076.
- [11] 沈煜. 木酮糖激酶对酿酒酵母代谢工程菌木糖利用的影响及木糖异构酶基因的胞外表达. “山东大学”+“博士学位论文”. 2005.
- [12] 宋刚. α -乙酰乳酸脱羧酶基因在酿酒酵母中的表达. “齐齐哈尔大学”+“硕士学位论文”. 2004.
- [13] 郭蔚. *E. coli* K12 木糖异构酶及木酮糖激酶基因的克隆及其在 *Z. mobilis* CP4 中的表达. 天津大学硕士学位论文. 2006.
- [14] 刘巍峰, 张晓梅, 陈冠军, 刘春朝. 木糖发酵酒精代谢工程的研究进展. 过程工程学报 (*The Chinese Journal of Process Engineering*), 2006, 6(1): 138-142.
- [15] Jin YS, Ni H, Laplaza JM, Jeffries TW. Optimal growth and ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* require moderate D-xylulokinase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(1): 495-503.

Construction of integrative vector for xylulokinase gene and its overexpression in *Saccharomyces cerevisiae*

Jingping Ge, Xisheng Cao, Gang Song, Hongzhi Ling, Wenxiang Ping*

(Key laboratory of Microbiology, College of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin 150080, China)

Abstract: [**Objective**] An integrative vector of *Saccharomyces cerevisiae* for xylulokinase gene expression was constructed to overexpress xylulokinase activity. [**Methods**] On the basis of plasmid p406ADH1, 4 components were integrated, which were KanR gene as G418 resistant marker, ADH1 terminator fragment, xylulokinase gene from *Saccharomyces cerevisiae* W5 and 18S rDNA sequence for homologous recombination. After enzyme digestion and ligation, high copy recombinant expression vector pCXS-RKTr was constructed. pCXS-RKTr was linearized and transferred into *Saccharomyces cerevisiae* W5, then xylulokinase activity was detected to determine the expression of pCXS-RKTr. [**Results**] Xylulokinase gene located on pCXS-RKTr was highly expressed in W5. The xylulokinase activity was 2.87 times of the original strain. [**Conclusion**] An integrative vector of industry strain *Saccharomyces cerevisiae* is successfully constructed and xylulokinase gene of *Saccharomyces cerevisiae* itself was over expressed by this vector. This integrative vector can efficiently raise the xylulokinase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. This system laid a foundation for the construction of gene engineering *Saccharomyces cerevisiae* strain which can ferment xylose to ethanol.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; Homologous recombination; Vector construction; Integrative expression; Xylulokinase

(本文责编:张晓丽)