

答辩委员会决议

答辩委员会对论文的学术评语（论文选题意义，论文创新性成果及学术水平；论文写作规范化和逻辑性；论文存在的主要不足之处，答辩情况。）：

论文题目： 圆红冬孢酵母基因组编辑系统构建与应用初探

学生姓名： 焦翔

圆红冬孢酵母是具有抗逆性强、底物利用谱广和高产油脂等优良性能的担子菌纲产油酵母。理性改造圆红冬孢酵母的研究因缺少有效的基因组编辑方法而进展缓慢。论文致力于构建基于 CRISPR/Cas9 技术的圆红冬孢酵母基因组编辑系统，并尝试应用于构建工程菌株，取得如下结果：

(1) 通过生物信息学分析，获得两个内源的 U6 启动子 (U6a 与 U6b) 用于胞内转录 sgRNA，其中 U6b 转录 sgRNA 效率较高。

(2) 构建圆红冬孢酵母 2A 序列介导多基因切割表达系统。尝试不同强度的组成型启动子 (PLDP1 > PGPD > PTPI)、诱导型启动子 (PADH2、PNAR1) 以及 2A 系统介导表达不同来源的 Cas9 基因，成功筛选到表达 Cas9 蛋白的工程菌株。

(3) 选择 β -胡萝卜素途径控制颜色表型的基因 CRT1、CAR2 作为靶基因，以分别表达 SpCas9、SaCas9 的菌株作为一级出发菌，通过农杆菌介导转化导入特异性 sgRNA。发现表达 SpCas9 的系统介导靶基因转录下调，而表达 SaCas9 的系统介导基因组编辑，效率可达 60%。通过电转化导入特异性 sgRNA，基因组编辑效率约 15%

(4) 通过 CRISPR/SaCas9 系统敲除与油脂代谢相关的靶基因 CLYBL、ACL、FASII、LDP1、CALs，工程菌株的油脂含量有不同程度下降，且在 LDP1 基因失活的菌株中脂滴呈小而散的状态。

上述结果具有创新性，成功在担子菌纲产油酵母中建立了基于 CRISPR/Cas9 技术的基因组编辑方法，为理性改造圆红冬孢酵母的性状，构建先进脂质代谢细胞工厂奠定了基础，对推动产油酵母基础研究具有重要意义。

论文综述全面，思路清晰，实验设计严谨，数据翔实，工作量大，逻辑性强，写作规范，并为后续工作提出了具体可行的建议，表明作者具有扎实的基础理论知识和实验技能，具备独立从事科研工作的能力。答辩过程中表述清楚，能正确回答问题。答辩委员会全票通过论文答辩，建议授予工学博士学位。

答辩委员会主席（签字）：



2019年5月8日

乙

答辩委员会决议

答辩委员会对论文的学术评语（论文选题意义，论文创新性成果及学术水平；论文写作规范化和逻辑性；论文存在的主要不足之处，答辩情况。）：

论文题目：酿酒酵母途径选择性能量传递体系构建

学生姓名：刘玉雪

为实现途径选择性能量传递，本论文通过半理性设计和高通量筛选，获得新的非天然辅酶烟酰胺胞嘧啶二核苷酸（NCD）偏好型元件，研究了辅酶偏好性改变的分子机制；以酿酒酵母为宿主，构建 NCD 自给型菌株及 NCD 介导途径选择性能量传递体系，取得如下成果：

(1) 通过理性设计和高通量筛选，获得 NCD 依赖型亚磷酸脱氢酶突变体 I151R/P176R/M207A 和 I151R/P176E/M207A，其 NCD 偏好性分别提高 770 倍和 630 倍，将突变体的 NAD 活性与菌株生长偶联，证明突变体在胞内具有生物正交特性；


(2) 通过解析 NCD 偏好型亚磷酸脱氢酶突变体及其与 NCD 复合物的晶体结构，阐明辅因子偏好性改变的机制：突变体辅因子结合空腔缩小为 NAD 的结合提供空间位阻，关键带电氨基酸残基与 NCD 形成强相互作用，保证突变蛋白与 NCD 的结合；

(3) 通过理性设计，获得 NCD 依赖型 D-乳酸脱氢酶突变体 V152R/N213E 和 V152R/I177K/N213I，NCD 偏好性均提高约 900 倍，工程菌中 D-乳酸积累能力与酶活性相关联实验表明突变体具有生物正交特性；

(4) 通过加强前体供给的策略整合和优化 NCD 合成代谢途径，构建了 NCD 自给型的酿酒酵母平台菌株，胞内 NCD 浓度达到 22 μM ；利用 NCD 依赖型氧化还原酶元件，在 NCD 自给型平台菌株中构建 NCD 介导的代谢回路，携带 NCD 偏好型 PDH 突变体的代谢回路能以亚磷酸为唯一磷源调控工程菌生长，初步实现胞内选择性能量传递调控工程菌生长。

上述研究结果具有创新性，为理性设计人工代谢系统、构建更高效的微生物细胞工厂和合成生物学研究，提供了新思路、新元件和重要参考信息。

论文综述全面，思路清晰，实验设计严谨，数据翔实，工作量大，结论可信，逻辑性强，写作规范，并为后续工作提出了具体可行的建议。答辩过程中表述清楚，回答问题正确，表明作者具有扎实的基础理论知识和实验技能，具备独立从事科研工作的能力。答辩委员会全票通过论文答辩，建议授予博士学位。

答辩委员会主席（签字）：

2018年5月8日

答辩委员会决议

答辩委员会对论文的学术评语（论文选题意义，论文创新性成果及学术水平；论文写作规范化和逻辑性；论文存在的主要不足之处，答辩情况。）：

论文题目：基于转录组学的湛江等鞭金藻储能过程与光照节律的响应机制研究

学生姓名：范旭冉

论文以湛江等鞭金藻为研究对象，基于转录水平信息，研究不同光照条件下氮胁迫环境中微藻的响应机制，选题具有重要的科学意义，取得的主要研究结果如下：

1、湛江等鞭金藻在缺氮环境或连续光照环境胁迫下均会快速积累储能物质，其中缺氮引起的 TAG 富集是连续光照的 2.5 倍。缺氮与连续光照两种胁迫条件的叠加不能进一步提升 TAG 的产率；

2、湛江等鞭金藻培养过程中，暗阶段是藻细胞修复其在光照下所受到的光损伤的必需阶段；

3、初步结果表明，当湛江等鞭金藻处于缺氮胁迫早期阶段时，转录水平的响应先从叶绿体中的光能利用及固碳通路开始，再到叶绿体中的脂类合成及细胞质中的糖类合成通路；

4、ACC 是湛江等鞭金藻缺氮胁迫早期的重要响应节点；CEPT 与 *plc* 受到昼夜节律的影响，调控 DAG 合成 PC 与 PE 的过程；*desΔ4* 与 *desΔ12* 会在湛江等鞭金藻细胞受到环境胁迫时分别呈现出上调与下调，是调节脂肪酸组分变化潜在的重要节点。

上述结果具有一定创新性。

论文实验思路清晰、设计合理、结果可信，反映了作者具有较扎实的专业基础知识和独立从事科学研究的能力，达到博士学位水平。

答辩过程中表述清楚，能够正确回答问题，答辩委员会全票通过论文答辩，建议授予博士学位。

答辩委员会主席（签字）：

2019年5月17日

答辩委员会决议

答辩委员会对论文的学术评语（论文选题意义，论文创新性成果及学术水平；论文写作规范化和逻辑性；论文存在的主要不足之处，答辩情况。）：

论文题目： 圆红冬孢酵母脂滴区室化代谢调控甘油二酯合成

学生姓名： 张琦

甘油二酯（DAG）是一种具有重要价值的中性脂，但在天然油脂中含量很低，主要通过化学或酶催化法制备。本论文以圆红冬孢酵母为宿主，尝试通过脂滴区室化方法调控胞内 DAG 合成，选题具有重要意义。论文取得如下成果：

1) 采用分子克隆技术将圆红冬孢酵母 DAG 代谢节点的酰基转移酶 Dga1 和脂肪酶 Tgl5 的编码基因分别克隆到 pZPK 载体上，经农杆菌介导转化的方法转化圆红冬孢酵母单倍体 NP11，获得了单独和同时过表达 Dga1 和 Tgl5 的工程菌株；

2) 构建分别与脂滴结构蛋白 Ldp1 的 C-端和 N-端融合方式表达 Dga1 和 Tgl5 融合蛋白的圆红冬孢酵母工程菌株，得到同时过表达 Dga1-Ldp1 和 Tgl5-Ldp1 的工程菌株 ZQ09，在限氮条件下培养所得油脂中 DAG 含量提高至 10%；

3) 蛋白质印迹法实验表明 Ldp1 融合在目标蛋白 C-端时靶定脂滴效果好于 N-端。

上述研究结果具有创新性和潜在的应用价值，为圆红冬孢酵母脂滴区室化的代谢工程研究提供了理论依据。

论文综述全面，思路清晰，实验安排合理，数据可靠，工作量大，撰写规范，逻辑性强，并为后续工作提出了具有见地的建议，表明作者具有扎实的基础理论知识和实验技能。答辩过程中表述清楚，能正确回答问题。答辩委员会全票通过论文答辩，建议授予工程硕士学位。

答辩委员会主席（签字）：

2019 年 5 月 8 日