

技术主题

Technology Feature

野生型工业酿酒酵母 Miseq 测序方法的建立

曹德民^{1*} 张穗生^{2*} 罗贞贞¹ 黄日波^{1,2**}

1 广西大学生命科学与技术学院, 南宁, 530003; 2 广西科学院广西生物炼制重点实验室, 非粮生物质酶解国家重点实验室, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 南宁, 530007

* 共同第一作者

** 通讯作者, rbhuang@gxas.ac.cn

摘要 新一代测序方法在基因组学研究应用日趋广泛, 已经成为工业酿酒酵母菌株基因组学研究的重要技术平台, 但对工业酿酒酵母新一代测序技术方法缺乏详细报道。Miseq 是小型新一代基因组测序仪, 本文报道我们自建的野生型工业酿酒酵母基因组 Miseq 测序方法。该方法包括: 制备分离 a 型和 α 型交配型的单倍体菌株、采用电泳和分光光度法方法监控基因组文库建立、优化上机文库浓度后测序。其中电泳和分光光度法方法为首创的文库质量监控简易方法, 质控检测得到酿酒酵母工业菌株测序条件为: 菌株的基因组文库 DNA 片段大小为 250~850 bp 且主要集中在 350~550 bp, 文库浓度范围为 7~13 ng/ μ L; 上机测序文库的优化浓度为 20 pM。

关键词 酿酒酵母, 野生型工业菌株, Miseq, 基因组测序方法, 文库质量

Development of a Method to Sequence a Wild-type Industrial Strain of *Saccharomyces cerevisiae* with Miseq

Cao Demin^{1*} Zhang Suisheng^{2*} Luo Zhenzhen¹ Huang Ribo^{1,2**}

1 Life Science and Technology College, Guangxi University, Nanning, 530003; 2 Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, State Key Laboratory of Non-food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Academy of Science, Nanning, 530007

* The authors who contribute equally

** Corresponding author, rbhuang@gxas.ac.cn

DOI: 10.13417/j.gab.033.000655

Abstract Next-generation DNA sequencing technology has become one of the most widely used genomics tools and an important tools platform to investigate industrial yeast genome. However, there have not yet been any detail reports concerning how to sequence the genome of industrial *S. cerevisiae* strain. Miseq is a bench-top next-generation sequencer. Here we reported an efficient self-design protocol of sequencing the genome of wild-type industrial *S. cerevisiae* strain with Miseq. The key steps of the method include: Preparation of a and α type haploid of the strain, confirmation of library quality for sequencing with electrophoresis and spectrometric analysis, sequencing the genome with Miseq after the library concentration optimization. Our method first determines the genome library quality by electrophoresis and spectrometric analysis. We have found that DNA fragment of sequencing library should be 250~850 bp, mainly in the 350~550 bp range and the concentration of the library was 7~13 ng/ μ L, and the optimized concentration of library sequenced is 20 pM.

Keywords *Saccharomyces cerevisiae*, Wild-type industrial strain, Miseq, Genome sequencing method, Library quality

基金项目: 本研究由国家 863 课题(2012AA022106, 2013AA050701)、国家国际合作项目(2010DFB63590)、广西科学研究和技术开发项目(桂科重 12118004-2, 桂科重 1348004-1, 桂科重 1348004-3, 桂科合 1346011-4)、广西自然科学基金(2011GNSFA-018113, 2012AA022106)广西八桂学者建设工程专项经费、广西科技创新能力与条件建设计划项目(桂科能 12237022)、广西科学基金项目 13-051-08 和广西科学院基本科研业务费资助项目 12YJ25SW03 共同资助

乙醇发酵所使用的酿酒酵母工业菌株发酵性能仍存在不足(陈英等, 2013; 张水龙等, 2013) 利用基因组的序列信息可以指导菌株基因的改造, 有望获得发酵性能更加优良的酿酒酵母工业菌株。然而由于传统测序方法成本高昂(Kellis et al., 2003) 酿酒酵母工业菌株基因组的报道有限, 对野生型工业酿酒酵母菌株基因组的研究更少, 仅有少数酵母工业菌株如 JAY291 (Argueso et al., 2009)、EC1118 (Novo et al., 2009)、AWR-I1631 (Borneman et al., 2008)、Lalvin QA23、AWR17-96、Vin13、FostersO、FostersB、VL3 (Borneman et al., 2011)、K7 (Akao et al., 2011) 基因组测序有文献公布。新一代测序技术的兴起使得测序的成本大大的降低(秦楠等, 2011) Illumina 公司 MISEQ 是一种小型新一代测序仪, 读长可达到 2×250 bp 约一天时间完成一次高通量测序, 最大数据采集量达 8 Gb, 可应用于小型基因组测序(Loman et al., 2012; Guan et al., 2012)。利用 MISEQ, 已经成功进行了益生菌 *Lactobacillus casei* Zhang (白梅, 2012)、流感病毒 influenza A 和 influenza B (Rutvisuttinunt et al., 2013) 等微生物菌株的测序。目前国内外尚无关于工业酿酒酵母 MISEQ 测序方法的详细报道, 我们开展了野生型工业酿酒酵母菌株 MISEQ 测序方法的研究, 并利用该方法对酿酒酵母野生型工业菌株 MF1002 进行基因组测序, 现报道如下。

1 结果与分析

我们对酿酒酵母野生型工业菌株测序方法的研究从两方面着手, 包括利于测序后的基因组分析和测序条件的优化, 主要研究: 制备分离 a 型和 α 型交配型的单倍体菌株、采用电泳和分光光度法方法监控基因组文库建立、优化上机文库浓度后测序。

1.1 a 型和 α 型交配型单倍体菌株的制备分离

酿酒酵母野生型工业菌株通常为二倍体, 为了简化测序后的数据分析, 必须先制备、分离野生型工业酿酒酵母的单倍体, 利用单倍体测序。我们利用 McClary 产孢培养基培养 MF1002 制备分离单倍体, 待 MF1002 生成孢子后利用酶解从孢子囊中分离得到游离的单个孢子, 将酶解后的细胞稀释涂布平板, 得到单孢子形成的 a 型和 α 型交配型单倍体。采用 PCR 方法对酵母交配型进行鉴定, MAT-F 引物序列位于 MAT 基因座右侧, MAT- α 引物是位于 MAT- α 和 HMR- α 内的一段特异性引物序列, MAT-a 引物是位于 MAT-a 和 HMR-a 内的一段特异性引物序列, 使用这三条引物进行 PCR 扩增酵母基因组

DNA, a 型酵母细胞 PCR 鉴定产物为 544 bp, α 型酵母细胞 PCR 鉴定产物为 404 bp, 二倍体酵母细胞同时具有 544 bp 和 404 bp 两个 PCR 鉴定产物(图 1)。

1.2 采用电泳和分光光度法方法监控基因组文库建立

测序文库建立的主要步骤依次为: 基因组 DNA 的提取和纯化、基因组 DNA 的片段化和纯化、将片段化后的基因组 DNA 加接头和纯化。由于测序试剂盒较为昂贵, 必须对测序文库进行质量监控, 对文库的质量评估的基础上再进行下一步的操作, 通过测序文库的质量监控可以保障测序的成功率, 从而节约试剂。在 Illumina 公司设计的 MISEQ 测序方法中, 对文库质量监控使用 Agilent 公司的 2100 生物分析仪(Illumina, 2013)。我们设计了一个利用实验室常用方法、花费少、简便的文库质量监控方法。具体方法为: 分别对提取基因组 DNA、片段化纯化后的 DNA 产物和添加标签后纯化的 DNA 片段进行琼脂糖凝胶电泳, 并用 NanoDrop 2000C 微量分光光度计测定 DNA 浓度。图 2 是提取纯化后的 MF1002 菌株基因

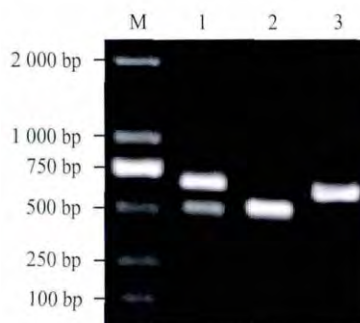


图 1 MF1002 单倍体 PCR 鉴定

注: M: DL2000 DNA Marker; 1: MF1002 二倍体 PCR 验证产物; 2: MF1002 MAT- α 交配型单倍体 PCR 验证产物; 3: MF1002 MAT-a 交配型单倍体 PCR 验证产物

Figure 1 PCR Verification of MF1002 haploid strain

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: PCR verification of MF1002 diploid strain; 2: PCR verification of MF1002 MAT- α haploid strain; 3: PCR verification of MF1002 MAT-a haploid strain

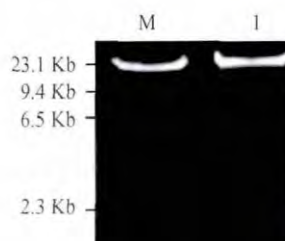


图 2 MF1002 菌株基因组 DNA

注: M: λ /Hind DNA Marker; 1: MF1002 菌株基因组 DNA

Figure 2 Genomic DNA of MF1002

Note: M: λ /Hind DNA Marker; 1: Genomic DNA of MF1002

组 DNA。片段化后纯化产物采用微量紫外分光光度计测定样品浓度在 3.0~4.5 ng/ μ L 之间。

按照实验操作方法(Illumina, 2013)对片段化的 DNA 加接头、扩增和纯化,终产物采用 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测,产物 8~10 μ L 即可明显分辨电泳 DNA 条带大小。经检测,文库终产物 DNA 的大小在 250~850 bp 范围内,主要片段集中在 350~550 bp 长度范围内(图 3),通过 NanoDrop 2000C 微量分光光度计测定样品 DNA 浓度在 7~13 ng/ μ L 范围内。

1.3 优化上机文库浓度后测序

Miseq 上机检测的文库浓度是影响测序结果的主要因素。我们使用 10 pM、20 pM 两种浓度 MF1002 文库进行上机测序,按照 Miseq 测序要求对测序结果进行判断,Miseq 测序数据 \geq Q 30 值必须高于 75%,测序数据应采集 2 Gb 以上(Fernandez-Mercado et al., 2013)。结果如图 4 (MiSeq 测序软件 MiSeq Control Software 的测序监视图),两种不同浓度文库测序的 \geq Q 3 值分别为 91.0%和 90.0% 均高于 75%。而当文库上机浓度为 10 pM 时,测序形成簇的数量为 178 k/mm²,测序采集总数据量为 1 Gb (图 4A),小于 2 Gb;当文库上机浓度为 20 pM 时,测序形成簇的数量为 597 k/mm²,采集数据总量为 3.5 Gb (图 4B),说明 MF1002 测序文库浓度条件 20 pM 优于 10 pM。

2 结论

我们自建了野生型酿酒酵母工业菌株 Miseq 测序方法,经过 MF1002 基因组测序和其它菌株基因组测序(数据未列出)显示,该方法为一个有效的野生型酿酒酵母工业菌株测序方法。酿酒酵母是一种重要的模式生物,其实验室菌株 S288C 在 1996 年成功完成测序(Goffeau et al., 1996)。如将不同性状酿酒酵



图 3 建成文库的电泳检测
注: M: DL2000 DNA Marker; I: 建成文库 DNA 的电泳检测
Figure 3 Electrophoresis detection of the sequencing library
Note: M: DL2000 DNA Marker; I: Electrophoresis detection of the sequencing library

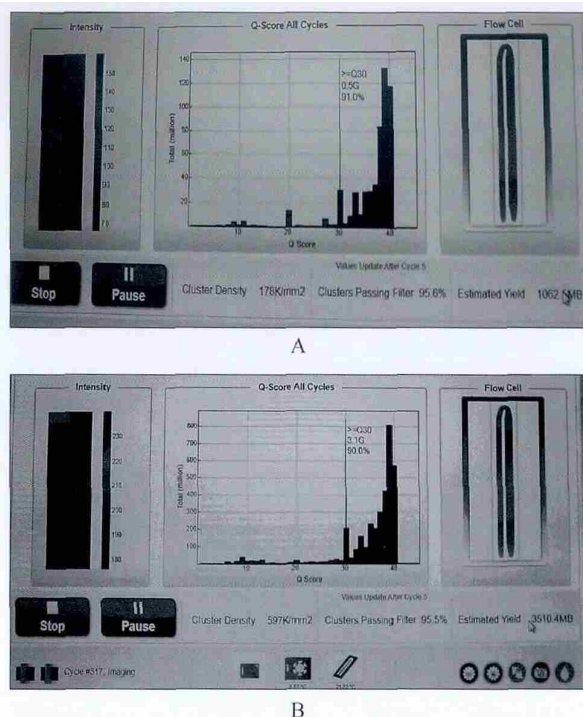


图 4 不同上机文库浓度测序时采集数据比较
注: A: 10 pM 文库 Miseq 测序; B: 20 pM 文库 Miseq 测序
Figure 4 Comparison of the sequencing result of different library concentration
Note: A: Miseq sequencing with 10 pM library; B: Miseq sequencing with 20 pM library

母工业菌株进行测序、分析,可以从全基因组的角度对酿酒酵母的改造提供指导(秦楠等, 2011),然而由于传统的测序方法成本高昂,工业酿酒酵母的基因组测序直到 2008 年后才开始见到报道(Borneman et al., 2008)。Miseq 测序仪是新一代的小型测序仪,可应用于小型基因组测序,规模不大的实验室也能承受其购买和运行费用(Loman et al., 2012; Guan et al., 2012),酿酒酵母工业菌株 Miseq 测序方法缺乏详细报道,我们建立的测序方法将推动酿酒酵母工业菌株基因组研究,进而推动酿酒酵母工业菌株改造,有利于提高乙醇发酵生产。

Miseq 基因组测序平台测序文库的质量控制直接关系到后期的数据质量,因此显得尤为重要。本研究采用琼脂糖凝胶电泳的方法以及浓度测定相结合的方法直接进行质量分析,利用简单、便宜的方法对文库的质量评估的基础上再进行下一步的操作,相对于前人报道使用的 Agilent 公司的 2100 生物分析仪检测法(Quail et al., 2012),既节约试剂、又减少了实验盲目性。经过研究,我们还确定了野生型酿酒酵母工业菌株 Miseq 测序的重要条件:基因组片段化产物的大小一般控制浓度在 3.0~4.5 ng/ μ L 之间;加标签

后文库的回收产物大小控制在 250~850 bp 左右,主要集中于 350~550 bp 范围内,且浓度在 7~13 ng/ μ L 之间,测序文库的浓度为 20 pM,本方法可作为大范围开展酿酒酵母工业菌株基因组测序参考。

3 材料与方法

3.1 实验菌株

用于测序菌株为酿酒酵母(*S. cerevisiae*)甘蔗糖蜜酒精发酵高产野生型工业菌株 MF1002,从甘蔗糖厂的废弃物中筛选得到(陆琦等, 2010; 熊雅兰等, 2014),由国家非粮生物质能源工程技术研究中心提供。

3.2 酶和主要试剂

rTaq 酶购自 TaKaRa 公司,Nextera DNA Sample Preparation Kit、Nextera Index Kit、Phix Control V3、MiSeq Reagent KitV2 (300 cycles) 购自于 Illumina 公司、DNA 纯化与浓缩试剂盒 DNA Clean & Concentrator 购自 Zymo Research 公司,Agencourt AMPure XP Kit 购自 Beckman 公司,PCR 引物由 invitrogen 公司合成。

3.3 培养基

YPD 培养基:酵母提取物含量 1%、蛋白胨含量 2%、葡萄糖含量 2%,固体培养基添加 2%琼脂,自然 pH,121 $^{\circ}$ C、20 min 条件下灭菌,葡萄糖在 115 $^{\circ}$ C、20 min 条件下单独灭菌后加入。

McClary 生孢培养基(Nishida et al., 2004):葡萄糖含量 0.1%、KCl 含量 0.18%、NaAc 含量 0.82%、酵母提取物含量 0.25%、琼脂含量 2%,自然 pH,121 $^{\circ}$ C、20 min 条件下灭菌。

3.4 酿酒酵母菌株生孢

将菌株接种入 YPD 液体培养基,在 220 r/min、30 $^{\circ}$ C 条件下过夜活化两次,再培养 8~12 h 至对数期,取 1.5 mL EP 管,将菌体在 12 000 r/min 30 s 条件下离心收集,用无菌水洗两次,用 1 mL 无菌水重悬菌体,取 300 μ L 涂布 McClary 生孢培养基,在 30 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 3~5 d,每天刮取少量菌体在显微镜下镜检并记录生孢情况(汤二将等, 2012)。

3.5 酵母单倍体的分离

在酵母生孢率达到 95%以上时,用接种环刮取菌体至装有 1 mL 无菌水的 EP 管中,在 12 000 r/min、30 s 条件下离心收集菌体,用 0.1% β - 巯基乙醇在

37 $^{\circ}$ C 条件下处理细胞 45 min,收集菌体,加入蜗牛酶与纤维素酶脱壁酶液[蜗牛酶:纤维素酶(V/V)=1:1,酶浓度均为 4 mg/mL,用 CPB 高渗缓冲液配制,0.22 μ m 滤膜过滤除菌]在 37 $^{\circ}$ C 条件下处理细胞 24 h,每隔 3 h 在显微镜下观察细胞被酶解情况。将细胞培养物梯度稀释后分别涂布 YPD 平板,37 $^{\circ}$ C 条件下培养 1~2 d 至有单菌落生成。

将单菌落分别随机挑取至 McClary 生孢培养基上,30 $^{\circ}$ C 培养 3~5 d,显微镜下观察是否有孢子囊生成,将无孢子囊生成的菌株重新挑取到新的 McClary 生孢培养基平板上,30 $^{\circ}$ C 培养 3~5 d,镜检观察,将无孢子囊生成的菌株确认为酵母单倍体,将分离出的单倍体进行菌种保藏(Akao et al., 2011; Borneman et al., 2011)。

3.6 酵母单倍体交配型的鉴定

根据文献所报道的 PCR 鉴定方法进行酵母单倍体交配型的鉴定(Smith et al., 2009)。PCR 鉴定使用的引物为 MAT-F、MAT- α 、MAT-a 引物, MAT-F: 5'-AGTCACATCAAGATCGTTTATGG-3'; MAT- α : 5'-GCACGGAATATGGGACTACTTCG-3'; MAT-a: 5'-ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG-3'。以筛选出的单倍体菌株为模板,用 MAT-F、MAT- α 、MAT-a 引物进行 PCR 扩增,PCR 条件:94 $^{\circ}$ C、3 min (94 $^{\circ}$ C, 30 s; 58 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 1 min 30 s) 30 个循环,72 $^{\circ}$ C、10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物大小,从而判断菌株的交配型。

3.7 酵母基因组 DNA 的提取

使用 YPD 液体培养基培养酵母单倍体,在 220 r/min、30 $^{\circ}$ C 条件培养过夜,收集菌体,破碎酵母细胞,经苯酚氯仿抽提后,取上清,用乙醇沉淀获得酵母基因组 DNA (Zhang et al., 2012)。

3.8 基因组的片段化

将 Nextera DNA Sample Preparation Kit 中 TD、TDE1、genomic dna 在冰上溶解,在 PCR 管中加入 20 μ L 基因组 DNA (浓度为 2.5 ng/ μ L)、25 μ L TD Buffer、5 μ L TDE Buffer,用枪轻轻吹吸混匀,在 20 $^{\circ}$ C、2 800 r/min 条件下离心 1 min,基因组片段化使用 PCR 仪,片断化条件:55 $^{\circ}$ C、5 min;10 $^{\circ}$ C、60 min。用 DNA Clean & Concentrator 试剂盒进行基因组片段化后的 DNA 纯化、回收(Illumina, 2013)。

3.9 片段化 DNA 产物的标签添加及扩增

用标签引物:5'-GGACTCCT-3'、5'-TATCCTCT

-3' 在 PCR 中配对使用, 以及用标签引物 5'-TAAG GCGA-3'、5'-AGAGTAGA-3' 在 PCR 中配对使用, 分别作为验证酵母单倍体 a 配型菌与 α 配型菌的标签引物, 以 20 μ L 纯化的片段化后基因组 DNA 为模板进行扩增, 在 PCR 管中加入标签引物各 5 μ L、Nextera DNA Sample Preparation Kit 中的 NPM 15 μ L、PPC 5 μ L, 混匀后在 PCR 仪内进行反应。PCR 条件为 :72 $^{\circ}$ C 3 min、98 $^{\circ}$ C 30 s (98 $^{\circ}$ C 10 s; 6 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 3 min) 5 个循环、10 $^{\circ}$ C 60 min。用 Agencourt AMPure XP Kit 磁珠进行 PCR 产物的纯化回收, 使用方法按 Illumina 公司推荐方法(Illumina, 2013)。

3.10 文库样品变性稀释与上机测序

将经以上 3.9 方法处理得到的文库 DNA 样品稀释至 3 nmol/L (按平均大小 500 bp 文库条件计算, 1 ng/ μ L=3 nmol/L文库 DNA), 用 0.1 mol/L 的 NaOH 10 μ L 加入 10 μ L 样品中, 处理 5 min 使文库 DNA 变性, 稀释至上机测序所需浓度即可。将 Phix Control V3 (对照)和稀释后的文库 DNA 加入 MiSeq Reagent KitV2 (300 cycles)中, Phix Control V3 的加入量为终浓度 7 pmol/L, 按照 Miseq 测序仪操作方法进行基因组测序(Illumina, 2014)。

作者贡献

曹德民和张穗生为共同第一作者, 负责实验开展和论文撰写, 黄日波为论文的通讯作者, 对实验进行指导, 罗贞贞负责部分实验数据采集。

致谢

感谢国家 863 课题(2012AA022106, 2013AA05-0701)、国家国际合作项目(2010DFB63590)、广西科学研究和技术开发项目(桂科重 12118004-2, 桂科重 1348004-1, 桂科重 1348004-3 和桂科合 1346011-4)、广西自然科学基金(2011GNSFA018113, 2012AA02-2106)广西八桂学者建设工程专项经费、广西科技创新能力与条件建设计划项目(桂科能 12237022)、广西自然科学基金项目 13-051-08 和广西科学院基本科研业务费资助项目 12YJ25SW03 经费等共同资助。

参考文献

Akao T., Yashiro I., Hosoyama A., Kitagaki H., Horikawa H., Watanabe D., Akada R., Ando Y., Harashima S., Inoue T., Inoue Y., Kajiwarra S., Kitamoto K., Kitamoto N., Kobayashi O., Kuhara S., Masubuchi T., Mizoguchi H.,

Nakao Y., Nakazato A., Namise M., Oba T., Ogata T., Ohta A., Sato M., Shibasaki S., Takatsume Y., Tanimoto S., Tsuboi H., Nishimura A., Yoda K., Ishikawa T., Iwashita K., Fujita N., and Shimoi H., 2011, Whole-genome sequencing of sake yeast *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai No. 7, DNA Research, 18(6): 423-434

Argueso J.L., Carazzolle M.F., Mieczkowski P.A., Duarte F.M., Netto O.V., Missawa S.K., Galzerani F., Costa G.G., Vidal R.O., Noronha M.F., Dominska M., Andrietta M.G., Andrietta S.R., Cunha A.F., Gomes L.H., Tavares F.C., Alcarde A.R., Dietrich F.S., McCusker J.H., Petes T.D., and Pereira G.A., 2009, Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production, Genome Research, 19(12): 2258-2270

Bai M., 2012, Study on genetic stability of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang during long-term continuous subculturing, Dissertation for Ph.D., Inner Mongolia Agricultural University, Supervisor: Zhang H.P., pp.15 (白梅, 2012, 益生菌 *Lactobacillus casei* Zhang 长期连续传代过程中遗传稳定性研究, 博士学位论文, 内蒙古农业大学, 导师: 张和平, pp.15)

Borneman A.R., Forgan A.H., Pretorius I.S., and Chambers P. J., 2008, Comparative genome analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain, FEMS Yeast Research, 8 (7): 1185-1195

Borneman A.R., Desany B.A., Riches D., Affourtit J.P., Forgan A.H., Pretorius I.S., Egholm M., and Chambers P.J., 2011, Whole-genome comparison reveals novel genetic elements that characterize the genome of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*, PLoS Genetics, 7(2): e1001287

Chen Y., Chen D., Lu Q., Lu Z.L., and Huang R.B., 2013, Recombination and expression analysis of α -galactosidase gene recombinants of *Saccharomyces cerevisiae*, Guangxi Kexue (Guangxi Sciences), 20(2): 143-147 (陈英, 陈东, 陆琦, 芦志龙, 黄日波, 2013, 酿酒酵母 α -半乳糖苷酶基因重组菌株的表达分析, 广西科学, 20(2): 143-147)

Fernandez-Mercado M., Burns A., Pellagatti A., Giagounidis A., Germing U., Agirre X., Prosper F., Aul C., Killeck S., Waincoat J.S., Schuh A., and Boulwood J., 2013, Targeted re-sequencing analysis of 25 genes commonly mutated in myeloid disorders in del (5q) myelodysplastic syndromes, Haematologica, 98(12): 1856-1864

Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., and Oliver S.G., 1996, Life with 6000 genes, Science, 274(5287): 546, 563-567

Guan Y.F., Li G.R., Wang R.J., Yi Y.T., Yang L., Jiang D., Zhang X.P., and Peng Y., 2012, Application of next-generation sequencing in clinical oncology to advance personal-

- ized treatment of cancer, Chinese Journal of Cancer, 31 (10): 463-470
- Illumina company, 2013, Nextera DNA sample preparation Guide, pp.3-38
- Illumina company, 2014, MiSeq reagent kit reagent preparation Guide, pp.3-12
- Kellis M., Patterson N., Endrizzi M., Birren B., and Lander E.S., 2003, Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements, Nature, 423(6937): 241-254
- Loman N.J., Misra R.V., Dallman T.J., Constantinidou C., Gharbia S.E., Wain J., and Pallen M.J., 2012, Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms, Nature Biotechnology, 30(5): 434-439
- Lu Q., Zhang S.S., Wu R.Z., Chen D., and Huang R.B., 2010, Screening three high-yield *Saccharomyces cerevisiae* strains for alcohol fermentation of sugarcane molasses, Guangxi Kexue (Guangxi Sciences), 17(4): 368-372, 376 (陆琦, 张穗生, 吴仁智, 陈东, 黄日波, 2010, 三株甘蔗糖蜜酒精发酵高产酵母菌株的筛选, 广西科学, 17(4): 368-372, 376)
- Nishida O., Kuwazaki S., Suzuki C., and Shima J., 2004, Superior molasses assimilation, stress tolerance, and trehalose accumulation of baker's yeast isolated from dried sweet potatoes (hoshi-imo), Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 68(7): 1442-1448
- Novo M., Bigey F., Beyne E., Galeote V., Gavory F., Mallet S., Cambon B., Legras J.L., Wincker P., Casaregola S., and Dequin S., 2009, Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118, Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(38): 16333-16338
- Qin N., Su D.F., and Yang R.F., 2011, Next-generation sequencing technologies and the application in microbiology-A review, Weishengwu Xuebao (Acta Microbiologica Sinica), 51(4): 445-457 (秦楠, 栗东芳, 杨瑞馥, 2011, 高通量测序技术及其在微生物学研究中的应用, 微生物学报, 51(4): 445-457)
- Quail M.A., Smith M., Coupland P., Otto T.D., Harris S.R., Connor T.R., Bertoni A., Swerdlow H.P., and Gu Y., 2012, A tale of three next generation sequencing platforms: Comparison of ion torrent, pacific biosciences and illumina miSeq sequencers, BMC Genomics, 13(1): 341
- Rutvisuttinunt W., Chinnawirotpisan P., Simasathien S., Shrestha S.K., Yoon I.K., Klungthong C., and Fernandez S., 2013, Simultaneous and complete genome sequencing of influenza A and B with high coverage by Illumina MiSeq Platform, Journal of Virological Methods, 193(2): 394-404
- Smith C.E., Lam A.F., and Symington L.S., 2009, Aberrant double-strand break repair resulting in half crossovers in mutants defective for Rad51 or the DNA polymerase δ complex, Molecular and Cellular Biology, 29(6): 1432-1441
- Tang E.J., Deng C.X., Zhang X.M., Huang Z.X., Chen Y.Q., and Chen R.K., 2012, Optimization of *Saccharomyces cerevisiae* sporulation mediums by response surface method and the identification of haploid, Niangjiu Keji (Liquor-making Science & Technology), 6: 36-40 (汤二将, 邓朝霞, 张晓敏, 黄祖新, 陈由强, 陈如凯, 2012, 响应面法优化酿酒酵母产孢培养基及单倍体的鉴定, 酿酒科技, 6: 36-40)
- Zhang S.S., Chen D., and Lu Q., 2012, An improved protocol and a new grinding device for extraction of genomic DNA from microorganisms by a two-step extraction procedure, Genetics and Molecular Research, 11(2): 1532-1543