

文章编号:1673-1689(2008)04-0091-06

优化简并引物 PCR 克隆 *Candida glycerinogenes* 3-磷酸甘油脱氢酶基因片段

陈献忠, 饶志明, 沈微, 诸葛斌, 方慧英, 王正祥, 诸葛健*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 为了从工业生产菌株耐高渗产甘油假丝酵母(*Candida glycerinogenes*)克隆甘油合成的限速酶编码基因胞浆 NAD⁺-3-磷酸甘油脱氢酶基因(ctGPD), 对不同酵母和其他真核生物的 NAD⁺-3-磷酸甘油脱氢酶进行比对, 分析氨基酸和核苷酸的保守序列, 设计了 4 对简并引物用于扩增 *C. glycerinogenes* 的 NAD⁺-3-磷酸甘油脱氢酶(GPD)基因片段, 经过优化 PCR 反应条件, 利用其中一对中等简并度的引物扩增出 CgGPD 基因中约 600 bp 的保守核心片段。DNA 序列及推绎的氨基酸序列进行比对分析表明, 该基因片段与其他酵母的胞浆 NAD⁺-3-磷酸甘油脱氢酶基因的对应区域具有典型的保守区域, 并且与安格斯毕赤酵母的 GPD 基因相似性较高。

关键词: PCR; NAD⁺ 依赖 3-磷酸甘油脱氢酶; 产甘油假丝酵母; 克隆; 简并引物

中图分类号: Q 785

文献标识码: A

Cloning of NAD⁺-Dependent Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase Gene Fragment from *Candida glycerinogenes* with Degenerate Oligonucleotide Primers

CHEN Xian-Zhong, RAO Zhi-Ming, SHEN Wei, ZHUGE Bin,

FANG Hui-Ying, WANG Zheng-Xiang, ZHUGE Jian*

(Key Lab of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In *Saccharomyces cerevisiae*, glycerol is synthesized in cytosol by reduction of the glycolytic intermediate dihydroxyacetone phosphate (DHAP) to glycerol 3-phosphate (G3P) followed by dephosphorylation of G3P to glycerol. Further studies had revealed that cytol NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase (ctGPD) is the rate-limiting enzymes for glycerol synthesis. However, it is unclear whether GPD has similar role in *Candida glycerinogenes* WL2002-5, a novel osmotolerant yeast species used in glycerol production. So, it is essential to clone GPD gene from *C. glycerinogenes*, for investigation of glycerol biosynthesis in molecular level. After comparison of the amino acid sequence of the GPDH proteins in several species, degenerate oligonucleotide primers were designed for PCR based on conservative regions in the amino acid sequence. PCR was performed on the genomic DNA of *C. glycerinogenes* and

收稿日期:2007-10-25.

基金项目:国家自然科学基金项目(30570142).

作者简介:陈献忠(1980-),男,安徽界首人,工业微生物博士研究生。

* 通讯作者:诸葛健(1939-),男,浙江金华人,教授,博士生导师,主要从事发酵工程和工业微生物学方面的研究。

Email: jianzhuge@hotmail.com

parameters involved in amplification efficiency were optimized. Using one moderate degeneracy pair of primers, a degenerate PCR product of ca. 0.6 kb was amplified and sequenced. Which homologous to GPD1 of *Saccharomyces cerevisiae*. This provides a threshold of studying glycerol production pathway and osmotic stress response mechanism at genetic and molecular level in this yeast.

Key words: PCR; NAD^+ -dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase; *Candida glycerinogenes*; clone; degenerate oligonucleotide primers

当细胞处于高渗透压环境中时,为了保持胞内的水分和小分子物质向环境中外泄,就需要通过自身合成一些生物相容性物质来提高胞内的渗透压来平衡胞内和胞外的压力差,从而起到保护和防御的作用。对于酵母细胞而言,在渗透压胁迫作用下产生的生物相容性物质主要是甘油,还有少量的其他多元醇^[1]。 NAD^+ 依赖性3-磷酸甘油脱氢酶是酵母细胞以葡萄糖为碳源合成甘油过程的限速酶^[2],编码该酶的基因存在两个异构形式:GPD1和GPD2,前者受渗透压诱导表达,而后者在厌氧环境中起着平衡氧化还原力的作用^[3]。一些酵母中的GPD基因已克隆并进行了功能鉴定,包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)^[4-5],*Zygosaccharomyces rouxii*^[6-7]和汉逊得巴利 *Debaryomyces hansenii*^[8-9]。产甘油假丝酵母(*Candida glycerinogenes*)是一种优良的甘油生产菌株,已经应用于甘油发酵的工业化生产^[10-11],然而与酿酒酵母相比,其相关的分子知识和遗传背景非常缺乏,为从基因表达水平上深入研究 *C. glycerinogenes* 高产甘油的代谢机制,有必要首先要克隆甘油合成的关键酶基因。

PCR技术即DNA的体外扩增,自该方法建立起来,在20多年的时间里得到飞速发展,已有一系列PCR方法设计出来,是目前分子生物学领域最常用的技术之一,它不仅可对已知序列进行扩增,而且对未知序列或仅知道蛋白质的部分氨基酸序列,通过设计简并引物也能扩增出目的片段。这对于寻找和分离一些未知功能的基因或蛋白质家族的新成员提供了一种非常有用的工具^[12]。

作者利用简并引物PCR技术并通过条件优化,成功地克隆了 *C. glycerinogenes* 的 NAD^+ -3-磷酸甘油脱氢酶基因片段。

1 材料与方法

1.1 材料

产甘油假丝酵母 *C. glycerinogenes* WL2002-

5, *E. coli* JM109 由作者所在实验室保藏;T/A 克隆试剂盒 pGEM-T-Easy vector 购自 Promega 公司,用于PCR扩增的酶 rTaq, Pyrobest DNA Polymerase 和 Hotstar version Taq 均购自大连宝生物公司。质粒抽提试剂盒和胶回收试剂盒均购自博大泰克生物基因技术公司。PCR仪 PCR-200 为 MJ Research 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 产甘油假丝酵母 WL2002-5 染色体 DNA 制备 产甘油假丝酵母 WL2002-5 染色体 DNA 制备按文献[13]进行。将提取的DNA用DU640核酸蛋白质分析仪进行测定,根据A260/A280的比值判断所提取的DNA纯度;利用260 nm下的OD值计算所提取的DNA浓度;同时通过琼脂糖凝胶电泳判定模板的质量。

1.2.2 简并引物的设计 从NCBI的Genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)等数据库,搜索3-磷酸甘油脱氢酶基因的相关核酸序列和蛋白质序列的数据,通过DNAMAN等软件进行多序列对比,以相关酵母的GPD为主要参照物,分别确定其核苷酸和氨基酸的保守序列,根据这些保守区域,设计并合成4对简并引物,以供PCR用。

1.2.3 PCR 扩增 主要考察了简并引物的简并度,复性温度和酶的选用等因素对扩增CgGPD基因部分片段的影响。取扩增产物上样至0.8 g/dL的琼脂糖凝胶,电泳结束后紫外灯下观察、拍照。

1.2.4 PCR 产物克隆及测序 将预期大小的扩增片段切下,用PCR产物纯化试剂盒纯化后,按照试剂盒说明书操作步骤,将PCR产物连接到pEGM-T-Easy载体上,转化 *Escherichia coli* JM109 感受态细胞,在含有Amp/IPTG/X-Gal的平板上进行蓝白斑鉴定,挑取白斑,验证后扩大培养,用质粒提取试剂盒提取质粒后,送华大基因上海鼎安生物技术有限公司进行测序。

1.2.5 DNA 的序列测定和同源性比较 通过Blastn 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

blast)在 GenBank 比较 NAD⁺ 依赖 3-磷酸甘油脱氢酶基因的 DNA 序列及推测的氨基酸序列的序列相似性或同源性。用 DNAMAN 软件进行氨基酸多序列比对分析。

2 结果与分析

2.1 简并引物的设计

从 GeneBank 数据库中查询已公布的 NAD⁺- 依赖 3-磷酸甘油脱氢酶的序列,用 DNAMAN 软件进行序列比对和分析发现,在氨基酸序列和核苷酸序列存在保守的序列,见图 1。根据保守序列设计了 4 对简并引物,其中 CD1-U 和 CD1-D 引物是根据核苷酸比对结果而设计,其余引物根据氨基酸序列的比对结果,并参考了酿酒酵母的密码子偏好性进行合成。为了不使引物的简并度过高,用次黄嘌呤碱基替代高简并位点的碱基,结果见表 1。

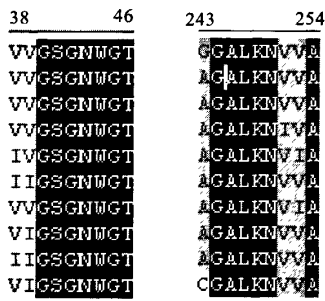


图 1 不同物种中 3-磷酸甘油脱氢酶基因氨基酸的保守区部分
Fig. 1 Conserved portion of the amino acid sequence of GPDH utilized for the degenerate PCR primers

2.2 DNA 聚合酶和退火温度对 PCR 扩增效率的影响

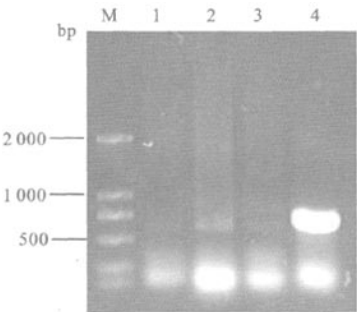
在设计简并引物时,主要考虑序列的保守性,

表 1 PCR 所用的简并引物列表
Tab. 1 Primers used for this study

引物名称	核苷酸 (5'-3')	长度	简并度	退火温度 <i>T_m</i> /℃	序列来源
CD1-U	GGATCCGTAAGTGGGGTAC	20	1	65.4	DNA Sequence
CD1-D	GATTAAGTCAGCGACACCGGCAGA	24	1	74.8	DNA Sequence
CD2-U	TYGGHTCYGGTAACTGGGGAC	21	12	66.1 to 75.1	AA Sequence
CD2-D	YTVACRTGGAAGTAWGRTCTGT	22	48	56.4 to 63.3	AA Sequence
CD3-U	GGHTTYGGTAACTGGGGKAC	20	12	61.0 to 70.3	AA Sequence
CD3-D	AYVACRTTCTTCAADGCACC	20	36	56.7 to 66.9	AA Sequence
CD4-U	TBRTBGGITCHGGYAAITGGG	21	216	64.5 to 78.9	AA Sequence
CD4-D	RGCVAIVAY R TTYTTYARIGC	21	576	56.3 to 71.4	AA Sequence

注: I, inosine; R, A or G; K, G or T; Y, C or T; H, A or C or T; V, A or C or G; B, C or G or T; D, A or G or T

对碱基含量和退火温度等参数考虑次之。由表 1 可知,不同引物之间的 *T_m* 值相差很大,这为 PCR 的有效扩增带来了困难。另外,为了降低非特异性片段的产生,我们选择了不同的聚合酶来优化反应。首先用 Pyrobest DNA Polymerase 在 95 ℃ 50 s, 50 ℃ 60 s, 72 ℃ 90 s 的条件下进行 PCR 扩增,结果见图 2。4 对引物均有强弱不同的电泳条带,其中用 CD1 引物对的产物最亮,然而,测序结果表明,尽管产物大小与理论相符,但所测出的序列均是非特异性的。而用其它引物对的扩增即使改变退火温度,扩增效果亦较差。改用 Taq polymerase 在不同的退火条件下进行 PCR 反应,结果见图 3,退火温度的改变显著影响到 PCR 的扩增效率,对于 CD4 引物对而言,无论在何种退火温度下,在预期位置均有条带产生,当温度提高到 55 ℃ 时,尽管有较弱的非特异性条带产生,但是特异性产物提高更为显著。对 CD2 和 CD3 两对简并引物,或者无扩增产物,或者不同的退火温度下产生大小不同的扩增片段,测序结果也说明该 PCR 产物是非目的基因片段。



M, Marker DL2000; 1, CD4; 2, CD3; 3, CD2; 4, CD1
图 2 不同引物对的 PCR 扩增结果
Fig. 2 PCR results of different primers

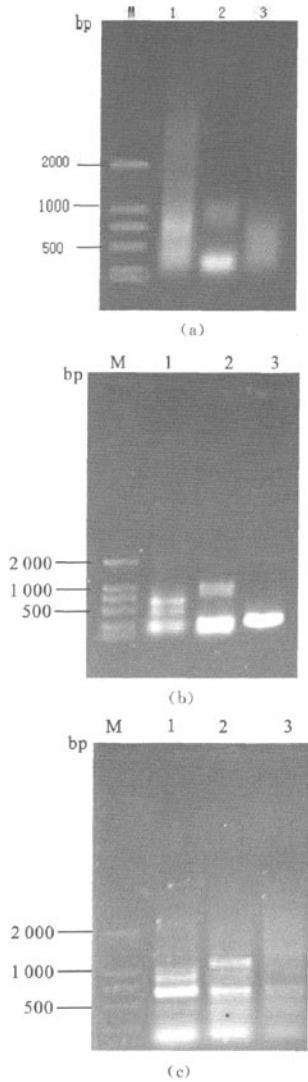


图 3 不同复性温度下的 PCR 产物电泳

Fig. 3 Results of PCR with various primers for different annealing temperature

2.3 PCR 启动方式对扩增效率的影响

简并 PCR 中用的是由多条不同核苷酸序列组成的混合引物库,差别只是在特定的碱基位置,因此,在 PCR 反应中,引物之间和引物与模板之间均存在着竞争性,要想获得目的产物,必须有效的降低非特异性条带产生,热启动 PCR 是行之有效的方法之一。作者以 CD4 引物对,在模板通过 95 ℃ 4 min 变性后再加入 *Ex Taq* Hotstart version 聚合酶进行 PCR 反应后,与以上的扩增结果相比,发现利用这种方式能明显地改善 PCR 的扩增效果,结果见图 4。

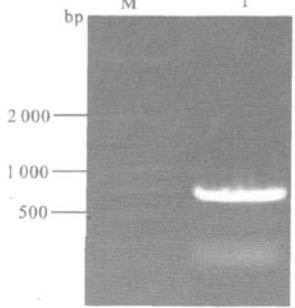


图 4 CD4 引物对热启动 PCR 扩增结果

Fig. 4. PCR results of CD4 primers with hot start method

2.4 产甘油假丝酵母 3-磷酸甘油脱氢酶基因片段的克隆及序列分析

将获得 0.63 kb 长的片段连接到克隆载体 pGEM-T 上,转化到 *Escherichia coli* JM109 感受态细胞,在含有 Amp/IPTG/X-Gal 的平板上进行蓝白斑鉴定,挑取白斑,培养后提取质粒后用 *EcoRI* 酶切鉴定,结果见图 5。阳性克隆测序,DNA 序列分析发现,与其它酵母的胞浆 NAD⁺-3-磷酸甘油脱氢酶基因的核苷酸序列相似性比较高。氨基酸序列的比对见图 6,结果表明,其推测的氨基酸序列具有 GPD 基因的典型保守区域,并且与安格斯毕赤酵母的 GPD 基因相似性较高,可以基本确认所获得的 DNA 片段是 *C. glycerinogenes* 的胞浆 NAD⁺-3-磷酸甘油脱氢酶基因的部分序列。

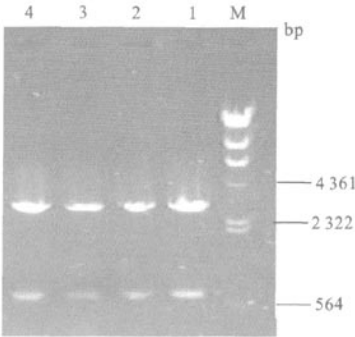


图 5 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 5 Identification of recombinant plasmid with restriction enzyme

3 结 语

简并 PCR 技术是克隆新基因的方法之一,其突出的优点就是工作量较小,周期短,效率高。特别克隆那些基因组规模较小,蛋白质进化相对保守的

ZrGPD1	VSGSNWCTTIAKVVVAENTKEKPELQEREDMWVFEQIDETPLACIINTHQNKYLPNID
ZrGPD2	VSGSNWCTTIAKVVVAENTKEKPELQGRVDMWVFEQIDGTPLCIINTHQNKYLPNID
CaGPD1	VSGSNWCTTIAKVVVAENALARPHELSHYVMWVFEKINGENLTCIINTPHENKYLPVVK
CaGPD2	VSGSNWCTTIAKVVVAENCAEKPNIFQPDVNMWVFEKIEGPKLTEIINTPHENKYLPVVK
DhGPD1	IGSGNWCTTIAKVVVAENTAEKPEVEKQNMWVFEKIEGPKLTEIINTPHENKYLPVVK
KtGPD1	VSGSNWCTTIAKVVVAENCAEPNLFVNPDVNMWVFEKIEGPKLTEIINTPHENKYLPVVK
KtGPD2	IGSGNWCTTIAKVVVAENALARPHELVKPDVNMWVFEKIEGPKLTEIINTHQNKYLPNID
PaGPD1	IGSGNWCTTIAKVVVAENTAEKPEVEKQNMWVFEKIEGPKLTEIINTPHENKYLPVVK
ScGPD1	IGSGNWCTTIAKVVVAENCKGVPEVTAPIVQNMWVFEKIEGPKLTEIINTPHENKYLPVVK
CgGPD	VSGSNWCTTIAKVVVAENTVPRPCQPDVNMWVFEKIEGPKLTEIINTPHENKYLPVVK
YlGPD1	VSGSNWCTTIAKVVVAENCTAHPFLPEPEKVVVFEKIEGPKLTEIINTPHENKYLPVVK
Consensus	gsgnwg k en p f v wv ee g l i n h n ylp
ZrGPD1	VQLLSDYVTQELGICCGALSGANLAPVAKHEHSETTVAYHIHEDDFRCKGCKDIDHVRVLRQ
ZrGPD2	VQLLSDYVTQELGICCGALSGANLAPVAKHEHSETTVAYQVPEDDFRCKGCKDIDHVRVLRQ
CaGPD1	CKLLSTYITEELGIVCGALLGANLAPETAPGKMSETTVAYKLPNDYRCKGCKDIDKLVLRQ
CaGPD2	CKLLSTYITEELGIVCGALLGANLAPETAPGKMSETTVAYKLPNDYRCKGCKDIDKLVLRQ
DhGPD1	CKLLSQSINDTLGVKCGVLSGANIANEVAREPWESETTIAYNIPEDFRCKGCKDVDEYVLRQ
KtGPD1	VKLLSTYITEELGIVCGALLGANLAPVAKHEHSETTVAYQVPEDDFRCKGCKDVDEYVLRQ
KtGPD2	VKLLSTYITEELGIVCGALLGANLAPVAKHEHSETTVAYQVPEDDFRCKGCKDVDEYVLRQ
PaGPD1	CKLLSQSINDTLGVKCGVLSGANIANEVAREPWESETTIAYNIPEDFRCKGCKDVDEYVLRQ
ScGPD1	VQLLSYITEELGICCGALSGANIANEVAREPWESETTIAYNIPEDFRCKGCKDVDEYVLRQ
CgGPD	CKLLFTVITEELGICCGALSGANIANEVAREPWESETTIAYNIPEDFRCKGCKDVDEYVLRQ
YlGPD1	VYLLSDVIENTELGICCGALSGANIANEVAREPWESETTIAYNIPEDFRCKGCKDVDEYVLRQ
Consensus	ll cg l gan a e a set ay p d g g lk
ZrGPD1	LFEDNLVANPDLIATTKDQVIVFNMVPHOFLGRIVACMKQCIKPTARATSCCLKGFVUGPKK
ZrGPD2	LFEDNLVANPDLISTTKDQVIVFNMVPHOFLGRIVSCHKQCIKPTARATSCCLKGFVUGPKK
CaGPD1	LPNNLITAPDPIVTAVKGADLIIFNMVPHOFLPKILKQKGNVPKTRATSCCLKGLEVSKDK
CaGPD2	LPNNLITAPDPIVTAVKGADLIIFNMVPHOFLGRIVACMKQCIKPTARATSCCLKGLEVSKDK
DhGPD1	LPENLVANPDLVDVTKDADLLIFNMVPHOFLPRVCKQLVGHVVKPSARATSCCLKGLEVGPKE
KtGPD1	LPENLVANPDLVDVTKDADLLIFNMVPHOFLPRVCKQLVGHVVKPSARATSCCLKGLEVGPKE
KtGPD2	LPENLVANPDLVDVTKDADLLIFNMVPHOFLPRVCKQLVGHVVKPSARATSCCLKGLEVGPKE
PaGPD1	LPENLVANPDLVDVTKDADLLIFNMVPHOFLPRVCKQLVGHVVKPSARATSCCLKGLEVGPKE
ScGPD1	LPEDNLVANPDLIDSVKDVDIIVFNMVPHOFLPRVCKQLVGHVVKPSARATSCCLKGLEVGPKE
CgGPD	LPNNLVANPDLVDVTKDADLLIFNMVPHOFLPRVCKQLVGHVVKPSARATSCCLKGLEVGPKE
YlGPD1	LPNNLITAPDPIVTAVKGADLIIFNMVPHOFLGRIVACMKQCIKPTARATSCCLKGLEVSKDK
Consensus	lp n a pd fn phqfl d g ra sclkg v g
ZrGPD1	LFHRPYYFHVNVVIDVAGISVAGALKNV
ZrGPD2	LFHRPYYFHVNVVIDVAGISVAGALKNV
CaGPD1	CFHRPYYFHVNVVIDVAGISVAGALKNI
CaGPD2	AFHRPYYFHVNVVIDVAGISVAGALKNV
DhGPD1	LFHRPYYFHVNVVIDVAGISVAGALKNV
KtGPD1	LFHRPYYFHVNVVIDVAGISVAGALKNV
KtGPD2	LFHRPYYFHVNVVIDVAGISVAGALKNV
PaGPD1	LFHRPYYFHVNVVIDVAGISVAGALKNV
ScGPD1	LFHRPYYFHVNVVIDVAGISVAGALKNV
CgGPD	LFHRPYYFHVNVVIDVAGISVAGALKNI
YlGPD1	LFHRPYYFHVNVVIDVAGISVAGALKNV
Consensus	fhr yf v d g s galkn

图6 产甘油假丝酵母 NAD^+ -3-磷酸甘油脱氢酶基因片段的氨基酸序列比对

Fig. 6 Alignment of the part of the amino acid sequence of GPDH protein.

基因时,首先可以考虑通过简并引物 PCR 法克隆目的基因。简并 PCR 方法成功的关键之一在于引物设计的合理性,我们要注意的几点是^[14]:1)选择高度保守但简并性低的氨基酸区域;2)考虑物种的密码子使用偏好性;3)次黄嘌呤是 tRNAs 中自发产生的可以与胞嘧啶、胸腺嘧啶核腺嘌呤形成碱基对的嘌呤碱基,在引物的多义位点通过掺入脱氧次黄嘌呤碱基以降低简并度。作者在 CD4 引物对中掺入 4 个脱氧次黄嘌呤后,扩增效果明显提高。

在简并引物 PCR 扩增过程,反应条件的优化是非常关键的一步。聚合酶的不同导致扩增效率的差异,研究结果表明,Taq polymerase 的 PCR 反应的特异性要优于 Pyrobest 聚合酶的扩增效果,而用热启动的 *Ex Taq* Hotstart version 聚合酶则进一步

步降低了非目的条带的产生。尽管有研究表明,PCR 扩增条件先在非严谨性退火温度下进行 5~10 个循环,随后在较严谨的退火温度下进行 20~30 个循环后可以获得简并 PCR 的成功率^[15],但本研究表明这种方法不适用产甘油假丝 GPD 的扩增。

尽管 *C. glycerinogenes* 产甘油能力明显高于酿酒酵母等,但甘油合成的分子机制还不清楚,因此,克隆该酵母甘油代谢相关基因十分必要。在一些耐高渗酵母如 *D. hansenii*, *Z. rouxii* 中已经通过简并 PCR 或遗传功能互补的方法克隆出了胞浆 NAD^+ -3-磷酸甘油脱氢酶基因^[6,8],并且发现 ZrGPD1 的表达并不受外界渗透压的诱导,而是组成型表达的,而 DhGPD 的表达在一定程度上受到环境渗透压的诱导^[7,9]。这是有别于 *Saccharomyces*

cerevisiae 的 *GPD* 基因的渗透压诱导表达模式的。通过优化简并引物 PCR 方法成功扩增出 *C. glycerinogenes* 的 NAD^+ -3-磷酸甘油脱氢酶基

因的部分片段,下一步就是通过染色体步行方法获得该基因的全长和进一步的功能验证。

参考文献(References):

- [1] Gancedo C, Gancedo J M, Sols A. Glycerol metabolism in yeasts, pathways of utilization and production[J]. *Eur J Biochem*, 1968, 5(2): 165—172.
- [2] Remize F, Barnavon L, Dequin S. Glycerol export and glycerol-3-phosphate dehydrogenase, but not glycerol phosphatase, are rate limiting for glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metab Eng*, 2001, 3(4): 301—312.
- [3] Valadi A, Granath K, Gustafsson L, et al. Distinct intracellular localization of Gpd1p and Gpd2p, the two yeast isoforms of NAD^+ -dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase, explains their different contributions to redox-driven glycerol production[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(38): 39677—39685.
- [4] Albertyn J, Hohmann S, Thevelein J M, et al. *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway[J]. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(6): 4135—4144.
- [5] Eriksson P, Andre L, Ansell R, et al. Cloning and characterization of *GPD2*, a second gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD^+) in *Saccharomyces cerevisiae*, and its comparison with *GPD1*[J]. *Mol Microbiol*, 1995, 17: 95—107.
- [6] Thome P E. Isolation of a *GPD* gene from *Debaryomyces hansenii* encoding a glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD^+)[J]. *Yeast*, 2004, 21: 119—126.
- [7] Thome P E. Heterologous expression of glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene (*DhGPD1*) from the osmotolerant yeast *Debaryomyces hansenii* in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Curr Microbiol*, 2005, 51(2): 87—90.
- [8] Iwaki T, Kuroso S, Yokose Y, et al. Cloning of glycerol-3-phosphate dehydrogenase genes (*ZrGPD1* and *ZrGPD2*) and glycerol dehydrogenase genes (*ZrGCY1* and *ZrGCY2*) from the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. *Yeast*, 2001, 18: 737—744.
- [9] Watanabe Y, Tsuchimoto S, Tamai Y. Heterologous expression of *Zygosaccharomyces rouxii* glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene (*ZrGPD1*) and glycerol dehydrogenase gene (*ZrGCY1*) in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *FEMS Yeast Res*, 2004, 4(5): 505—510.
- [10] Wang Z X, Zhuge J, Fang H, et al. Glycerol production by microbial fermentation; a review[J]. *Biotechnol Adv*, 2001, 19(3): 201—223.
- [11] 陈琨, 王正祥, 诸葛健. 产甘油假丝酵母胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶在甘油形成中的作用[J]. 无锡轻工大学学报, 1999, 18(3): 1—6.
CHEN Jun, WANG Zhen-xiang, ZHUGE Jian. The role of cytoplasmic glycerol 3 phosphate dehydrogenase of *Candida glycerolgenesis* on its glycerol over producing[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 1999, 18(3): 1—6. (in Chinese)
- [12] Aarts M G, Hekkert Bte Lintel, Holub E B, et al. Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 1998, 11(4): 251—258.
- [13] Rose M D, Hieter P W F. Methods in Yeast Genetics; A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual[M]. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000: 205.
- [14] Kampke T, Kieninger M, Mecklenburg M. Efficient primer design algorithms[J]. *Bioinformatics*, 2001, 17(3): 214—225.
- [15] Carl W Dieffenbach, Gabriela S Bveksler. PCR Primer; A Laboratory Manual[M]. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.

(责任编辑:李春丽)