

高渗工业菌株 *Candida glycerinogenes* 整合型表达载体的构建及验证

徐 丹^{1,2}, 陆信曜^{1,2}, 诸葛斌^{*1,2}, 张 成^{1,2}, 宗 红^{1,2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 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: 构建应用于工业用产甘油假丝酵母(*Candida glycerinogenes*) CGMCC NO. 6830 的整合型表达载体, 建立一种可利用底物形成的渗透压调控表达外源基因的体系。以 pUC19 质粒为基本骨架, *C. glycerinogenes* CGMCC NO. 6830 的 18S rDNA 为整合位点, 运用其 3-磷酸甘油脱氢酶基因启动子 *PCggpd* 启动外源基因表达, 腐草霉素抗性基因 *ble* 作为重组酵母转化子筛选标记, 获得应用于产甘油假丝酵母的稳定的表达型整合载体; 以绿色荧光蛋白基因 *gfp* 作为报告基因考察该表达质粒的性能, 实现了外源基因 *gfp* 的渗透压调控表达。

关键词: 产甘油假丝酵母; 3-磷酸甘油脱氢酶基因启动子; 绿色荧光蛋白; 整合型载体; 高渗表达
中图分类号: Q 786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)08—0842—07

Development and Verification of an Integrative Vector for the Industrial Osmotolerant Yeast *Candida glycerinogenes*

XU Dan^{1,2}, LU Xinyao^{1,2}, ZHUGE Bin^{*1,2}, ZHANG Cheng^{1,2}, ZONG Hong^{1,2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: To express heterogeneous genes under the regulation of osmotic pressure in *Candida glycerinogenes* CGMCC NO. 6830, an integrative vector was constructed in this study. The constructed integrative vector harbored the backbone of plasmid pUC19, 18S rDNA sequence of *C. glycerinogenes* CGMCC NO. 6830 as the integration site, phleomycin-resistant gene (*ble*) as a selectable marker, the osmolarity regulated promoter (*PCggpd*) and green fluorescent protein gene *gfp* as a reporter. The target gene was integrated into chromosomes of *C. glycerinogenes* CGMCC NO. 6830 and the expression level of *gfp* was regulated by osmotic pressure.

Keywords: *Candida glycerinogenes* CGMCC NO. 6830, glycerol-3-phosphate dehydrogenase promoter, green fluorescent protein, integrative vector, high osmotic pressure expression

收稿日期: 2014-04-16

基金项目: 国家 863 计划项目(2011AA02A207, 2012AA021201); 国家自然科学基金项目(31270080)。

* 通信作者: 诸葛斌(1969—)男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事工业微生物分子生物学方面的研究。

E-mail: bzhuge@163.com

产甘油假丝酵母 (*Candida glycerinogenes* CGMCC NO. 6830) 是从自然界中分离出来的一种耐高渗工业菌株,能够在超高渗透压(55 g/dL 葡萄糖)下快速生长,该菌能够适应不同的逆境,转化率及耗糖率极高,目前应用于工业甘油的生产^[1]。与其他酵母相比,它具有生长速度快、耐高渗透压、甘油产率高等诸多优势^[2],在生物合成 1,3 丙二醇、二羟基丙酮、3-羟基丙酸等重要化合物方面有广泛的应用前景^[3],是基因工程领域潜在的优良宿主。而目前对该菌分子水平的研究较少,适用于该菌的转化载体非常缺乏,致使该工业菌株的应用潜力没有充分发挥,因此急需构建适用于该菌的转化载体,创建适用于该菌的转化体系。

目前没有从该菌中提取到游离质粒,也没有发现适用于该菌株的游离载体,因此需要找到合适的整合位点及适用于该菌的强启动子来构建整合型载体。有研究表明,在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 基因组中 rDNA 有 100~200 个重复单元,以此为整合位点的策略已在酿酒酵母、产朊假丝酵母 (*Candida utilis*) 和乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*) 等多种微生物中展开研究应用^[4-5]。作者所在实验室前期研究表明,产甘油假丝酵母 *C. glycerinogenes* CGMCC NO. 6830 的胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶基因 *CgGPD* 是其高产甘油的关键基因^[6-8],*CgGPD* 受渗透压应激后酶活大幅度提高,且比已有广泛研究的不耐高渗压的 *S. cerevisiae* 和耐高渗压的 *Debaryomyces hansenii* 以及 *Zygosaccharomyces rouxii* 都要高^[9],关键因素之一是其高效的受渗透压调控启动子 *PCggpd*,并且高渗条件可大幅度提高其酶活表达,该启动子在高渗条件下表达外源基因具有极大的应用前景^[10],已经广泛

应用于外源基因的表达,例如:荧光蛋白、漆酶、 β -葡糖醛酸糖苷酶^[11-13]。绿色荧光蛋白(GFP)最初是从维多利亚发光水母 (*Aequorea victoria*) 中分离得到,是应用最多的发光蛋白,其作为报告基因具有荧光稳定、检测方便、表达无种族特异性等优点,近年被广泛应用于生命科学领域^[14-15]。

作者以低相对分子质量的 pUC19 质粒为骨架, *C. glycerinogenes* 18S rDNA 为整合位点、胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶基因启动子 *PCggpd* 为启动基因,构建应用于产甘油假丝酵母 *C. glycerinogenes* CGMCC NO. 6830 的整合型表达载体,并以绿色荧光蛋白基因 *gfp* 为报告基因,使用葡萄糖、NaCl、KCl 和山梨醇等渗透压调节剂,考察该表达体系的渗透压调控表达性能,研究结果为该酵母遗传学研究及工业化分子水平改造应用提供了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 菌株、质粒及引物见表 1-2。

1.1.2 主要试剂 质粒提取试剂盒、DNA 片段回收试剂盒: 购自上海捷瑞生物技术有限公司; 各种 DNA 限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNA 酶、反转录试剂盒和琼脂糖等: 大连 TaKaRa 公司产品; 腐霉菌素 Zeocin: 购自上海生工生物技术有限公司; 蛋白胨和酵母提取物: 购自英国 Oxoid 公司; qRT-PCR UltraSYBR Mixture: 购自康为世纪生物科技有限公司; 其余试剂均购自国药集团。

1.1.3 培养基及培养条件 LB 培养基: 酵母提取物 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.0; YEPD 培养基: 酵母提取物 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 葡萄糖 20

表 1 文中所涉及的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this paper

菌株(质粒)名称	简称(相关特性)	来源
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>E. coli</i> JM109	作者所在研究中心保藏
<i>Candida glycerinogenes</i> CGMCC NO. 6830	<i>C. glycerinogenes</i>	作者所在研究中心保藏
<i>Candida glycerinogenes</i> CGMCC NO. 6830- <i>gfp</i>	<i>C. glycerinogenes</i> - <i>gfp</i>	作者所在研究构建
pCambia1302	提供 <i>gfp</i> ; <i>Kan</i> ^r	作者所在研究中心保藏
pGAPZ b	提供 <i>ble</i>	作者所在研究中心保藏
pMD18 T-Vector	用于基因亚克隆及序列测定	购自 TaKaRa 公司
pUC-18S rDNA- <i>PCggpd</i> - <i>ble</i>	<i>PCggpd</i> 启动子; Zeocin ^r ; Amp ^r	本研究构建
pUC-18S rDNA- <i>PCggpd</i> - <i>ble</i> - <i>gfp</i>	<i>PCggpd</i> 启动子; Zeocin ^r ; Amp ^r	本研究构建

表 2 文中所用到的引物

Table 2 Primers used in this paper

引物名称	引物序列(下划线部分为酶切位点)	酶切位点
18SrDNA1	5'-ACTAGAAGCTTGCCTGAGAAACGGCTACC-3'	<i>Hind</i> III
18SrDNA2	5'-ACTAGAATTCTCTGTTGAAGAGCG-3'	<i>Eco</i> R I
PCgcpdN	5'-ACCTCGCTAGCCAGTTCCCGTTTCCATTTC-3'	<i>Nhe</i> I
PCgcpdS	5'-ACCCGAGGCCTTTTAATGTTTGATCTATTTC-3'	<i>Stu</i> I
bleS	5'-ATTAGGCCTCTGCAGGCATGCTCTAGAGAGCTCGGATCCGGTACCATGGCCAAGTTGACCACT-3'	MCS
bleB	5'-TTAAGGCCTTCAGTCTGCTCCTCGG-3'	<i>Stu</i> I
gfpS	5'-GGAGCATGCATGCTAGATCTGACTAG-3'	<i>Sph</i> I
gfpB	5'-ATCAGGATCCCCGATCTAGTAACATAG-3'	<i>Bam</i> H I
18S140	5'-CTTAACGAGGAACAATTGGAGG-3'	
gfp140	5'-GCAACATACGGAAACTTACCC-3'	

g/L, pH 6.0; YEPD 高渗培养基: YEPD 培养基分别额外添加葡萄糖、NaCl、KCl 和山梨醇等渗透压缓冲剂, pH 7.0。 *E. coli* JM109 采用 LB 培养基, 37 °C 条件下培养 12 h; *C. glycerinogenes* CGMCC NO. 6830 采用 YEPD 培养基, 于 30 °C 条件下培养 18 h; 产甘油假丝酵母转化子 *C. glycerinogenes* -*gfp* 分别用 YEPD 和高渗培养基于 30 °C 培养。抗生素使用浓度: 氨苄青霉素 100 mg/L, Zeocin 150 mg/L。

1.2 方法

1.2.1 整合载体 pUC-18S rDNA-PCgcpd-ble 的构建 以产甘油假丝酵母基因组 DNA 为模板, 18S rDNA1/18S rDNA2、PCgcpdN/PCgcpdS 为引物, PCR 扩增得到 18S rDNA (GenBank 登录号为 No. AY584809.1) 与 *CgGPD* 启动子 *PCgcpd* (GenBank 登录号为 No. EU186536); 同时以质粒 pGAPZ b 为模版, 以 bleS/bleB 为引物 PCR 扩增得到 Zeocin 抗性基因 *ble*, 并外加了插入外源基因的多克隆位点 MCS。纯化后的 PCR 产物分别连入 pMD18-T vector。重组质粒 T-18S rDNA、T-*PCgcpd* 和 T-*ble* 经酶切后, 依次插入到质粒 pUC19 中, 按常规方法转化 *E. coli* JM109, 得到重组质粒 pUC-18S rDNA-*PCgcpd-ble*, 并进行酶切验证。

1.2.2 电转化构建重组菌 *C. glycerinogenes*-*gfp* 以 pCambia1302 为模板, 以 *gfpS*/*gfpB* 为引物, PCR 扩增得到绿色荧光蛋白基因 *gfp*, 酶切后插入载体 pUC-18S rDNA-*PCgcpd-ble* 多克隆位点, 得到重组载体 pUC-18S rDNA-*PCgcpd-ble-gfp*。经 *Hind* III 线性化处理后, 采用电转化法转入产甘油假丝酵母, 利用选择培养基 SM 平板 (YEPD+150 mg/L

zeocin) 筛选稳定阳性转化子。电转化方法及条件详见文献[16]。

1.2.3 荧光显微镜检测 挑取重组产甘油假丝酵母单菌落, 30 °C、200 r/min 振荡过夜, 分别接种于 50 mL YEPD 和高渗培养基中, 摇瓶培养至 OD₆₀₀ 值约为 1, 室温下离心收集菌体沉淀, 用 PBS 缓冲液洗涤 2 次后重悬。取适当菌液涂片, 在荧光显微镜下观察并拍照。出发菌按上述方法处理作为对照。

1.2.4 整合效率及阳性率计算方法 电转化构建重组菌株时做三组平行实验, 测量线性化质粒浓度, 将 10 μL 该线性化质粒电转化到出发菌株, 涂布含 Zeocin 选择性平板, 计数转化子个数。

整合效率=转化子数/质粒量

计算得到整合效率, 单位为 CFU/μg 质粒。挑取转化子接种于 YEPD 液体培养基, 经过荧光检测, 计算得到阳性重组菌比例。

1.2.5 实时定量 PCR (qRT-PCR) 重组酵母培养方法同 1.2.3。酵母总 RNA 提取方法参见文献[17]。反转录及实时定量 PCR 方法与条件参见试剂盒说明书。内参基因选用产甘油假丝酵母 18S rDNA 基因, 18SrDNA1/18S140、*gfpS*/*gfpB* 作为 18S rDNA 与 *gfp* 定量 PCR 时的引物。相对转录强度是以该重组酵母 55 g/dL 葡萄糖质量浓度下转录水平作为对照值 1, 在不同种类渗透压及不同浓度渗透压下的转录水平与之作为对比。

1.2.6 重组菌稳定性检验 产甘油假丝酵母重组菌 *C. glycerinogenes*-*gfp* 在 YEPD 选择性培养基中培养过夜, 以 10⁻³ 稀释度接种于 YEPD 非选择性培养基中, 在 30 °C 下培养 15 h, 计 10 代。菌液适当涂布

于 YEPD 非选择性培养基中,3 d 后将平板复制到选择性培养基进行培养,计数得 Zeocin 抗性的酵母转化子所占比例,每次计数的总酵母菌落在 300 个以上^[3],同时对子代转化子进行荧光观察。

2 结果与分析

2.1 渗透压调控整合表达载体的构建及含 *gfp* 重组菌的构建

该载体以 18S rDNA 为整合位点,以受渗透压调控的甘油合成关键酶 *CgGPD* 启动子 *PCggpd* 启动外源基因表达。作者所在研究室已对产甘油假丝酵母的基因组进行了测序,结果显示 *CgGPD* 基因与 18S rDNA 基因并不在相同的染色体上,因此不

会存在以 *PCggpd* 和 18S rDNA2 之间的 DNA 序列被替换的情况发生。该载体在大肠杆菌中以氨苄青霉素抗性基因为筛选标记,重组酵母以腐草霉素(商品名 Zeocin)抗性基因 *ble* 为筛选标记,Zeocin 是已知的对产甘油假丝酵母 *C. glycerinogenes* CGMCC NO. 6830 最有效的抗生素^[18],该载体还含有供外源基因插入的多克隆位点 MCS (酶切位点包括 *Pst* I、*Sph* I、*Xba* I、*Eac* I、*Bam* H I 和 *Kpn* I)。该整合型表达载体 pUC-18S rDNA-*PCggpd*-*ble* 构建过程见图 1。重组载体经过 *Nhe* I、*Stu* I 双酶切后释放出约 0.45、1.0、3.7 kb 的条带,见图 2,与理论值相符,说明载体构建成功。

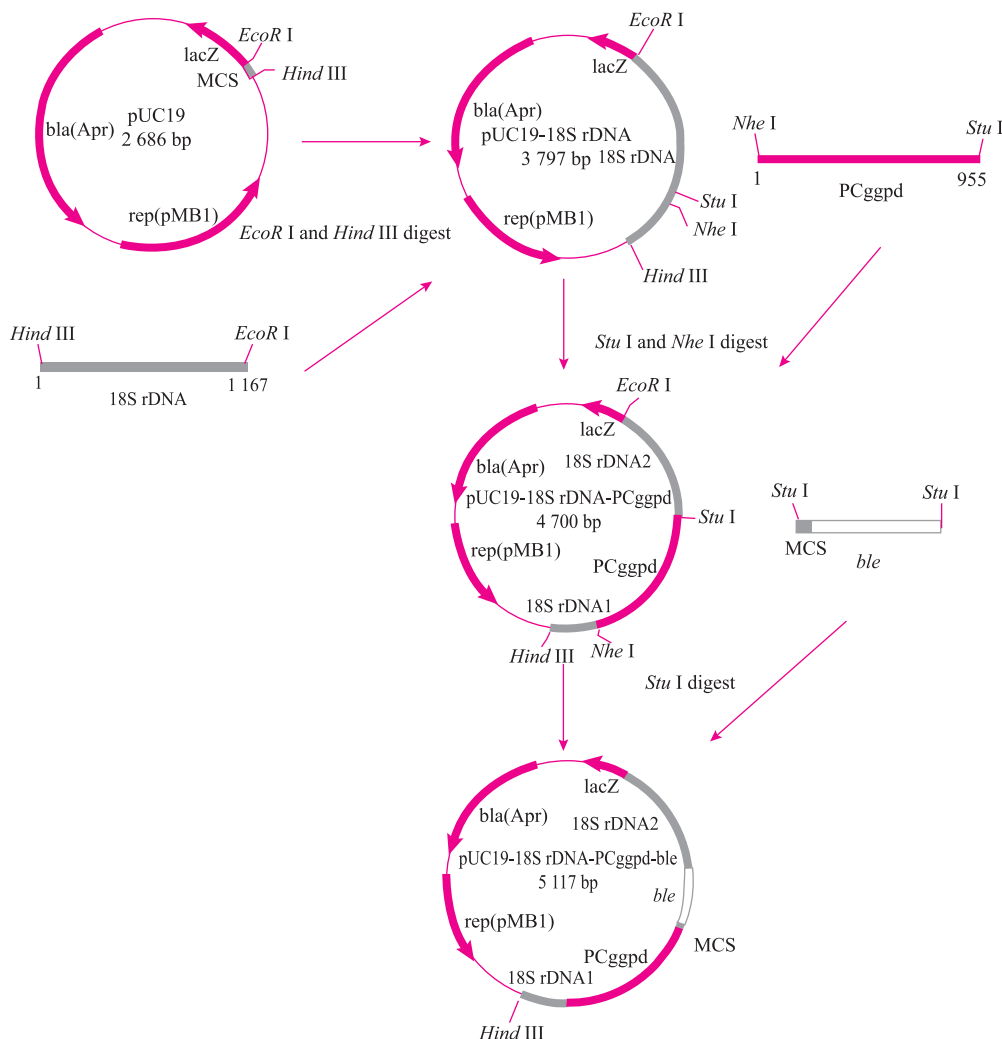
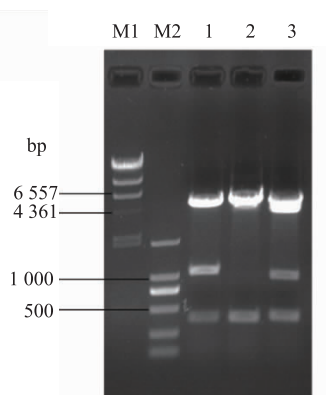


图 1 整合载体 pUC-18S rDNA-*PCggpd*-*ble* 的构建

Fig. 1 Construction of pUC-18S rDNA-*PCggpd*-*ble*



M1: λ -Hind III DNA Marker. M2: DL2000 DNA Marker; 1: pUC-18S rDNA-PCgpd-ble-gfp 经 BamH I 和 Stu I 酶切后条带; 2: pUC-18S rDNA-PCgpd-ble 经 BamH I 和 Stu I 酶切后条带; 3: pUC-18S rDNA-PCgpd-ble 经 Nhe I 和 Stu I 酶切后条带。

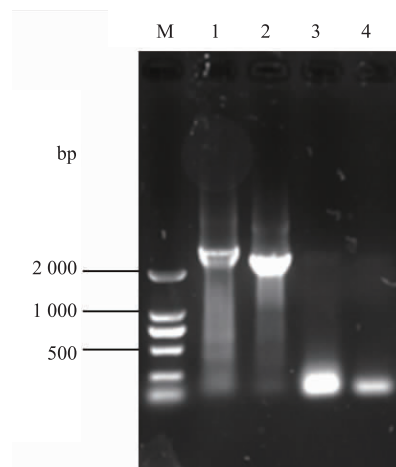
图2 重组质粒 pUC-18S rDNA-PCgpd-ble 和 pUC-18S rDNA-PCgpd-ble-gfp 的酶切验证

Fig. 2 Enzymatic digestion of pUC-18S rDNA-PCgpd-ble and pUC-18S rDNA-PCgpd-ble-gfp

为考察所构建载体的表达特性,引入绿色荧光蛋白基因 *gfp* 作为报告基因。扩增得到的 *gfp* 插入载体 pUC-18S rDNA-PCgpd-ble 多克隆位点,得到重组载体 pUC-18S rDNA-PCgpd-ble-gfp, 经 BamH I 和 Stu I 双酶切后释放出 0.45、1.0、4.7 kb 的条带,与理论值相符。该载体克隆后经过线性化处理,采用电转化法转入产甘油假丝酵母,利用添加 Zeocin 的选择培养基平板筛选得到稳定阳性转化子。提取重组菌及出发菌株染色体 DNA,以染色体 DNA 为模版,18SrDNA1/bleB、18S rDNA/gfpB 为引物,扩增得到约为 2.7 kb 及 2.3 kb 条带,见图 3。与理论值相符合,说明目的基因已经成功整合到产甘油假丝酵母 18S rDNA。经过计算,该整合载体整合效率约为 93 CFU/ μ g 质粒;经过荧光检测,得到阳性转化率约为 50%~60%。

2.2 整合表达体系外源基因 *gfp* 渗透压调控转录和表达分析

将重组菌 *C. glycerinogenes*-*gfp* 与出发菌株分别用 YEPD 和高渗培养基培养后取样,用荧光显微镜观察。结果发现 *gfp* 在重组菌中得到表达,整个菌体发出稳定明亮的绿色荧光,而对照菌则无荧光,见图 4。说明所构建的载体已经成功在产甘油假丝酵母中整合并表达外源蛋白。



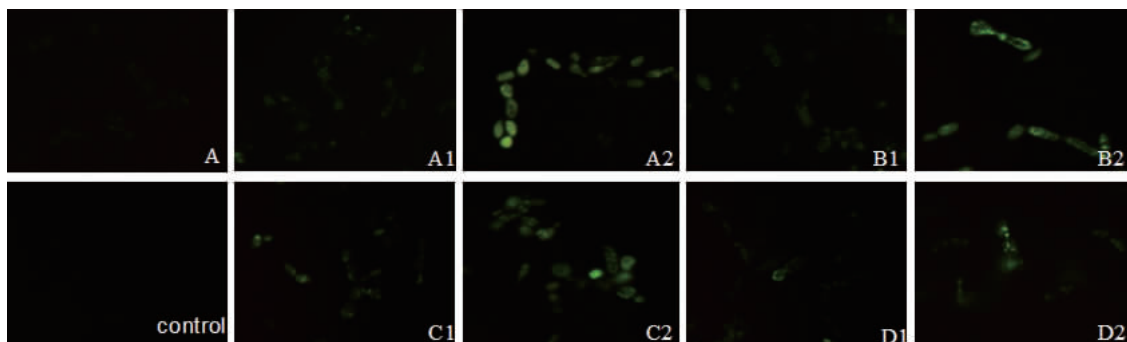
M: DL2000 DNA 标记; 1-2: 重组菌染色体 DNA 为模版, 18SrDNA1/bleB、18SrDNA1/gfpB 分别为引物; 3-4: 出发菌染色体 DNA 为模版, 18SrDNA1/bleB、18SrDNA1/gfpB 分别为引物。

图3 以重组菌及出发菌株染色体 DNA 为模版的诊断 PCR 分析

Fig. 3 Diagnostic PCR analysis on recombinant strain and the wild-type strain

重组菌在 YEPD 培养基中荧光较弱,见图 4。当葡萄糖、NaCl、KCl 和山梨醇等渗透压稳定剂质量浓度分别达到 10、7、10、10 g/dL 时,荧光强度有了明显增强。产甘油假丝酵母最高耐受 55 g/dL 葡萄糖、10 g/dL NaCl、16 g/dL KCl 和 25 g/dL 山梨醇,而在分别添加最高耐受浓度的高渗培养基中荧光强度达到最大。这表明该整合载体所携带的外源基因能在高渗条件下得以表达,且表达强度受产甘油假丝酵母甘油合成关键酶胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶基因启动子 *PCgpd* 调控。随着渗透压的升高启动强度增大,可实现可控表达。

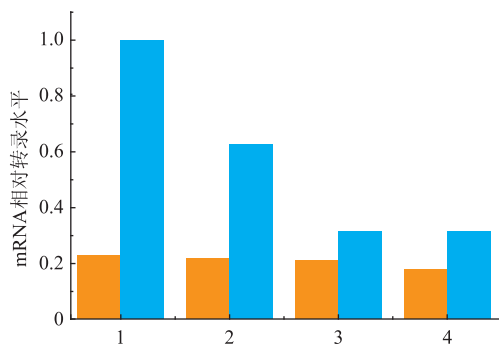
运用实时定量 PCR 技术 (qRT-PCR) 对不同条件下的 *gfp* 进行在转录水平上的相对定量测定,以产甘油假丝酵母基因组 18S rDNA 为内参基因,55 g/dL 葡萄糖质量浓度下 *gfp* 转录水平作为对照,结果见图 5。高浓度的渗透压缓冲剂对 *gfp* 的转录起到正调控的作用,且葡萄糖与 NaCl 对其诱导效果最为明显,同时工业级葡萄糖不仅廉价易得,而且可以作为发酵底物直接转化生成甘油及甘油衍生物。进一步验证了产甘油假丝酵母甘油合成关键酶胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶基因启动子 *PCgpd* 受渗透压诱导,为产甘油假丝酵母遗传背景的研究及高产甘油机理提供了研究基础。



Control:出发菌株在 YEPD 培养基中培养;A:YEPD 培养基;A1:10 g/dL 葡萄糖;A2:55 g/dL葡萄糖;B1:7 g/dL NaCl;B2:10 g/dL NaCl;C1:10 g/dL KCl;C2:16 g/dL KCl;D1:10 g/dL山梨醇;D2:25 g/dL山梨醇。

图 4 重组产甘油假丝酵母在不同渗透压稳定剂条件下培养后 GFP 的荧光表达检测(15×40)

Fig. 4 Observation of GFP in recombinant *C. glycerinogenes* CGMCC NO. 6830 cultivated in YEPD supplemented with various osmotic pressure stabilizers(15×40)



1:分别在 10、55 g/dL 葡萄糖溶液中培养;2:分别在 7、10 g/dL NaCl 溶液中培养;3:分别在 10、16 g/dL KCl 溶液中培养;4:分别在 10、25 g/dL山梨醇溶液中培养。

图 5 不同渗透压稳定剂质量浓度下重组菌 *gfp* 转录水平测定

Fig. 5 Relative gene transcription levels of *gfp* in the recombinant strain

2.3 产甘油假丝酵母整合表达体系稳定性

一般外源基因整合到宿主染色体 DNA 中比游离于细胞中更能稳定复制和维持,作者构建重组酵母 *C. glyceringenes-gfp* 传代 100 次后,仍有 96%以上细胞对 Zeocin 具有抗性,说明子代中抗性转化子比例相对较高,见表 3。同时对子代转化子进行荧光观察,绿色荧光表达稳定。由于 Zeocin 价格比较昂贵,在重组酵母培养过程中可以考虑不必添加腐草霉素。

表 3 重组菌 *C. glycerinogenes-gfp* 传代稳定性测定

Table 3 Stability of the recombinant *C. glycerinogenesgfp*

传代次数	抗性平板上菌落数(+)	非抗性平板上菌落数(-)	抗性菌落百分比/%
20	300	300	100
40	298	300	99.33
60	295	300	98.33
80	293	300	97.67
100	289	300	96.33

3 结 语

产甘油假丝酵母 *C. glycerinogenes* CGMCC NO. 6830 具有生长速度快、耐高渗透压、甘油产率高等诸多优势。作者构建了适用于该酵母的低相对分子质量的整合型表达载体 pUC-18S rDNA-*PCggpd-ble*,并实现了外源绿色荧光蛋白基因在宿主体内的成功整合与表达。实验表明,外源基因的表达受启动子 *PCggpd* 的正调控,在其可生长质量浓度范围内,表达强度随着渗透压的升高而增强,能在额外添加 55 g/dL 葡萄糖、10 g/dL NaCl、16 g/dL KCl、25 g/dL 山梨醇等高渗条件下正常表达,且强度达到最大;该载体整合到酵母基因组后非常稳定,基因丢失率很低,且生长状况基本不受外源基因表达影响,这为该工业酵母的遗传学研究及以该酵母为宿主的生物转化平台的建立提供了重要工具。

参考文献:

[1] Zhuge J,Fang H Y,Wang Z X,et al. Glycerol production by a novel osmotolerant yeast *Candida glycerinogenes* [J]. *Applied*

- microbiology and biotechnology**, 2001, 55(6):686-692.
- [2] 王正祥, 诸葛健, 方慧英. 耐高渗透压高产甘油的一个假丝酵母新种——产甘油假丝酵母[J]. 微生物学报, 1999, 39(1):68-74.
WANG Zhengxiang, ZHUGE Jian, FANG Huiying. A new osmotolerant and glycerol-highly-producing species-*Candida glycerolgenesis*[J]. **Acta microbiologica Sinica**, 1999, 39(1):68-74. (in Chinese)
- [3] 高晓娜. 产甘油假丝酵母 WL2002-5 整合载体的构建研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012.
- [4] 支晓慧, 王丽娜, 朱平, 等. 基于 rDNA 序列的酵母整合载体的构建及应用[J]. 中国医药生物技术, 2011, 6(5):330-335.
ZHI Xiaohui, WANG Lina, ZHU Ping, et al. Construction and application of *Saccharomyces cerevisiae* integration vector based on rDNA sequence[J]. **Chin Med Biotechnol**, 2011, 6(5):330-335. (in Chinese)
- [5] Klabunde J, Kunze G, Gellissen G, et al. Integration of heterologous genes in several yeast species using vectors containing a Hansenula polymorpha-derived rDNA-targeting element[J]. **FEMS Yeast Research**, 2003(4):185-193.
- [6] 陈献忠, 方慧英, 饶志明, 等. 产甘油假丝酵母胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶基因(CgGPD)功能分析[J]. 微生物学报, 2008, 48(12):1602-1608.
CHEN Xianzhong, FANG Huiying, RAO Zhiming, et al. Characterization of glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene (CgGPD) from the glycerol producing *Candida glycerolgenesis*[J]. **Acta microbiologica Sinica**, 2008, 48(12):1602-1608. (in Chinese)
- [7] 陈献忠, 方慧英, 饶志明, 等. 产甘油假丝酵母与酿酒酵母胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶基因的功能比较[J]. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36(2):198-205.
CHEN Xianzhong, FANG Huiying, RAO Zhiming, et al. Comparative characterization of genes encoding glycerol-3-phosphate Dehydrogenase from *Candida glycerolgenesis* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **Prog Biochem Biophys**, 2009, 36(2):198-205. (in Chinese)
- [8] 王正祥, 诸葛健. 产甘油假丝酵母胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶编码基因的克隆[J]. 微生物学报, 1999, 39(4):321-326.
WANG Zhengxiang, ZHUGE Jian. Cloning of a gene encoding cytoplasmic glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Candida glycerolgenesis*[J]. **Acta microbiologica Sinica**, 1999, 39(4):321-326. (in Chinese)
- [9] 陈珺, 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 Zhengxiang, 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)
- [10] 丁春生, 饶志明, 诸葛斌, 等. 利用荧光蛋白研究产甘油假丝酵母胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶基因 *CgGPD* 启动子[J]. 微生物学报, 2008, 48(8):1013-1018.
DING Chunsheng, RAO Zhiming, ZHUGE Bin, et al. Analysis of *CgGPD* gene promoter from *Candida glycerinogenes* by fluorescent protein[J]. **Acta microbiologica Sinica**, 2008, 48(8):1013-1018. (in Chinese)
- [11] Maggi RG, Govind NS. Regulated expression of green fluorescent protein in *Debaryomyces hansenii* [J]. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2004, 31(7):301-310.
- [12] Alves A M, Record E, Lomascolo A, et al. Highly efficient production of laccase by the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2004, 70(11):6379-6384.
- [13] Kuo C Y, Huang C T. A reliable transformation method and heterologous expression of β -glucuronidase in *Lentinula edodes*[J]. **Journal of Microbiological Methods**, 2008, 72(2):111-115.
- [14] Zhang C, Zhuge B, Zhan X B, et al. Cloning and characterization of a novel NAD⁺ dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Candida glycerinogenes* and use of its promoter[J]. **Yeast**, 2013(30):157-163.
- [15] Jeffrey D P, Richard N D, Gina M D, et al. Green fluorescent protein and its derivatives as versatile markers for gene expression in living *Drosophila melanogaster*, plant and mammalian cells[J]. **Gene**, 1996(173):83-87.
- [16] Chen X Z, Fang H Y, Rao Z M, et al. An efficient genetic transformation method for glycerol producer *Candida glycerinogenes*[J]. **Microbiol Research**, 2008, 163(5):531-537.
- [17] 王晨莹. 产甘油假丝酵母高渗透压甘油应答途径关键基因 *CgHOG1* 的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- [18] 陈献忠, 饶志明, 沈微, 等. 以 Zeocin 抗性基因为选择标记的 *Candida glycerinogenes* 遗传转化[J]. 激光生物学报, 2008, 17(2):176-180.
CHEN Xianzhong, RAO Zhiming, SHEN Wei, et al. A transformation system for *Candida glycerinogenes* based on zeocin resistance[J]. **Acta Laser Biology Sinica**, 2008, 17(2):176-180. (in Chinese)