

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55(11):1505–1511; 4 November 2015
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20150075

圆红冬孢酵母磷酸盐饥饿诱导表达载体的构建

马斯佳^{1,2}, 王雅南², 焦翔², 张素芳^{2,3*}, 赵宗保^{2,3}

¹大连工业大学生物工程学院, 辽宁 大连 116034

²中国科学院大连化学物理研究所生物技术部, 辽宁 大连 116023

³大连洁净能源国家实验室(筹)生物能源研究部, 辽宁 大连 116023

摘要:【目的】建立一种适用于圆红冬孢酵母代谢工程的磷酸盐饥饿诱导表达系统。【方法】对圆红冬孢酵母 *pho89* 基因 5'侧翼序列进行生物信息学分析,设计相应引物,PCR 扩增 *pho89* 基因启动子(*pPHO89*)和 *hsp70* 基因终止子(*tHSP*),利用 RF 克隆方法置换出发载体上的 *pPGK* 组成型启动子和 *tNOS* 终止子,以潮霉素磷酸转移酶基因 *hyg* 为报告基因,得到响应磷酸盐饥饿诱导的单表达盒载体 *pZPK-pPHO89-hyg-tHSP*,利用 ATMT 方法转化圆红冬孢酵母,通过转化子潮霉素抗性表型鉴定 *pPHO89* 和 *tHSP* 的启动子和终止子活性。在此基础上,构建了适合外源基因表达的双表达盒诱导表达载体 *pZPK-HYG-pPHO89-MCS-tHSP*,并利用该载体构建了苹果酸重组合表达菌株。【结果】成功构建了响应磷酸盐饥饿的圆红冬孢酵母诱导性表达载体,该载体在圆红冬孢酵母中可表现出启动子和终止子活性。【结论】该启动子受磷酸盐浓度的严谨调节,响应度高,操作简单,无需额外诱导剂,经济便捷,为后续圆红冬孢酵母代谢工程研究提供了基本材料。

关键词:圆红冬孢酵母,磷酸盐饥饿,*pPHO89* 启动子,终止子,表达载体

中图分类号:Q933 **文章编号:**0001-6209(2015)11-1505-07

圆红冬孢酵母(*Rhodospiridium toruloides*)是典型产油模式菌株之一,分类地位属担子菌门,是一种非常规酵母。在碳源丰富而氮、硫、磷和氧等营养元素缺乏条件下可积累超过细胞干重的 70% 以上的胞内油脂^[1–3]。同时,还生产磷酸二酯酶等工业用酶和 β -胡萝卜素,受到研究者广泛关注^[4–5]。目前 *R. toruloides* 功能基因研究主要通过基因克隆、异源表达和酿酒酵母功能互补分析来进行^[6–7]。相对于酿酒酵母等常规酵母,*R. toruloides* 分类地位和生化特性特殊并且缺乏遗传操作系统,使得其遗传改良和分子机制研究进展缓慢。

R. toruloides Y4 是本课题组驯化得到的一株抗逆性菌株,能直接利用纤维素水解液进行油脂发酵^[8–9]。前期我们经过产孢分离担孢子获得了其单倍体 *R. toruloides* NP11^[10],这两株菌是研究产油酵母油脂过量积累机制和遗传工程改良的理想菌株。目前我们对两株菌已经进行了多组学的系统研究^[10–11],并建立了基于组成型启动子的圆红冬孢酵母遗传操作方法^[12]。但该方法使用的组成型启动子无法选择性调控某一基因转录,不适合细胞毒性基因的过表达;同时,代谢工程也需要更多可供选择的启动子和终止子元件,以实现某一代谢途径基

基金项目:国家自然科学基金(31370128, 31170060)

* 通信作者。Tel: +86-411-84379066; Fax: +86-411-84379211; E-mail: zsfjxy@dicp.ac.cn

作者简介:马斯佳(1989–),女,陕西西安人,硕士研究生,主要从事产油酵母分子微生物学研究。E-mail: mmasijia@dicp.ac.cn

收稿日期:2015-02-11; **修回日期:**2015-05-21

因表达水平的精确调控。 Na^+/Pi 协同转运蛋白 PHO89,是一种高亲和力磷酸盐转运子,受无机磷阻遏和去阻遏的严格控制,在磷酸盐浓度较低($\leq 0.25\text{ g/L}$)时表达上调^[13]。PHO89 启动子的诱导无需加入诱导剂,只需控制培养基中磷酸盐浓度即可调控目的基因表达,非常适合一些关键限速酶在油脂积累期的表达调控,比如过表达 ME 以增加 NADPH 还原力供应。终止子序列,是给予 RNA 聚合酶转录终止信号的 DNA 序列,同时也决定 mRNA 的稳定性、转录效率和 mRNA 从转录复合体的释放^[14-15]。本研究分离圆红冬孢酵母内源性 pPHO89 启动子和 tHSP 终止子,构建了圆红冬孢酵

母磷酸盐饥饿诱导表达载体 pZPK-pPHO89-hyg-tHSP,以 *hyg* 为报告基因验证了其功能。在此基础上,构建双表达盒诱导表达载体 pZPK-HYG-pPHO89-MCS-tHSP,通过 ME 的表达和 Western blot 分析,证实该双表达盒载体可用于目的基因的可控性表达。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:表 1 为实验所用的菌株和质粒。

表 1. 本实验所用菌株和质粒

Table 1. Strains and plasmids used in this study

| Strains and plasmids | Relevant characteristics | Reference or Source |
|---------------------------------------|---|---------------------|
| Strains | | |
| <i>Rhodosporidium toruloides</i> Y4 | Diploid | [8] |
| <i>Rhodosporidium toruloides</i> NP11 | Haploid, MAT A | [9] |
| <i>Escherichia coli</i> DH5 α | F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169, hsdR17(rK ⁻ mK ⁺), λ^- | TaKaRa |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL1 | AGL0 recA ⁺ ; bla pTiBo542DT Mop + CbR | [18] |
| AGL1-HYG-P1 | AGL1/pZPK-pPHO89-hyg-tNOS | This study |
| AGL1-HYG-P2 | AGL1/pZPK-pPHO89-hyg-tHSP | This study |
| AGL1-HYG-me-P | AGL1/pZPK-HYG-pPHO89-me-tHSP | This study |
| plasmids | | |
| pZPK-pPGK-hyg-tNOS | pPGK-hyg-tNOS cassette in pZPK, Kan ^R , Hyg ^R | [12] |
| pZPK-pPHO89-hyg-tNOS | pPHO89-hyg- tNOS cassette in pZPK, Kan ^R , Hyg ^R | This study |
| pZPK-pPHO89-hyg-tHSP | pPHO89-hyg-tHSP cassette in pZPK, Kan ^R , Hyg ^R | This study |
| pZPK-pPHO89-MCS- tHSP | pPHO89-MCS-tHSP cassette in pZPK, Kan ^R , Hyg ^R | This study |
| pZPK-HYG-pPHO89-MCS- tHSP | pPGK-hyg-tNOS cassette and pPHO89-MCS-tHSP cassette in pZPK, Kan ^R , Hyg ^R | This study |
| pZPK-HYG-pPHO89-me- tHSP | pPGK-hyg-tNOS cassette and pPHO89-me-tHSP cassette in pZPK, Kan ^R , Hyg ^R | This study |

1.1.2 主要试剂和仪器:潮霉素 B、蛋白酶 K、Tris-饱和酚、乙酰丁香酮、4-吗啉乙磺酸购自北京鼎国生物技术有限公司;PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、*rTaq* DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Dpn* I、DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司;质粒 DNA 小量抽提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、PCR 产物回收试剂盒购自上海生工生物工程(上海)有限责任公司;琼脂糖、胰蛋白胨、葡萄糖、琼脂粉、酵母提取物、胰蛋白胨等购自 Oxoid 公司;其它试剂均为分析纯。所用仪器:NanoDrop® ND-1000 分光光度计(美国 NanoDrop 科技有限责任公司),梯度 PCR 仪(宝生物工程(大连)有限公司),和 InGenius LHR 凝胶成像分析系统(英国 Syngene 公司)。

1.1.3 培养基及培养条件:YEPD 培养基、LB 培

养基和 IM 培养基^[8]。限磷培养基(pPHO89 诱导培养基):30 g/L 葡萄糖、5 g/L 硫酸铵、0.64 g/L 硫酸钾、0.08 g/L 十二水合磷酸氢二钠、0.94 g/L 硫酸钠、1.5 g/L 七水硫酸镁,pH6.0。所有固体培养基在上述液体培养基基础上加入 1.5% 的琼脂粉。

根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) AGL1 和大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 使用 LB 培养基培养,培养温度分别为 30℃ 和 37℃,按照实验需要加入终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄霉素,摇床转速 200 r/min。圆红冬孢酵母使用 YEPD 培养,培养温度为 30℃,限磷培养基为诱导培养基。按照实验需要加入终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素 B。

1.2 启动子生物信息学分析

前期的 *R. toruloides* 磷酸盐限制恒化培养物转录组(P0)和磷酸盐丰富恒化培养物转录组(F3)数据(待发表)显示,P0 的 Na⁺/Pi 协同转运蛋白编码基因 *pho89* 转录丰度比 F3 提高了 40 倍。根据 *R. toruloides* NP11 基因组序列信息(Bioproject Accession:PRJNA169538),利用整合性基因组可视化

浏览器(Integrative Genomics Viewer,IGV),对 *pho89* 所在 Scaffold 的基因组序列和注释信息进行可视化操作,获得 *pho89* ORF(gi|410130879,RHTO_01284)上游 590 bp 序列的启动子区。

1.3 引物合成

本文所用 PCR 扩增引物见表 2,均委托北京鼎国生物技术有限责任公司合成,PAGE 级。

表 2. 引物信息

Table 2. Primers used in this study

| Primer names | Primer sequences (5'→3') |
|-------------------|--|
| PHO89-H1 | CCGAATTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGAGGGATCTTCCTCGCTTTGACTTCC |
| PHO89-H2 | GACCGACGTGCGCGTGAGCTCCGGCATCTTGACGACGGTTGGCTGCTGGCAGGA |
| tHSP-H1 | CGAAAGAACACCACCATCACCATCACTAGACGATTCCGCCCCGTCTCACCTCGCAT |
| tHSP-H2 | GCATGCTGCAGGTGCACTCTAGAGATCCCGCGCACTTCTCTGCACTGCATCTTTG |
| PHO89-F | CAGCAGCCAAACCGTCGCTCA |
| PHO89-R | GCAATTTGCGTGCGTCCC |
| HYG-F | CGGTGCGGGAAGCGATGGACGC |
| Histaq-R | CTAGTGATGGTGATGCTGCTG |
| HYG-F1 | TCGGAATCCCTCAGTACTGT |
| tHSP-R | CGGCTTCATCGCTGATTGTCC |
| PHO89-MCS-tHSP-H1 | GCAGCCAACCGTCGTCAAG GATATCCCATTGGACTAGTACGATTCCGCCCCGTCTCA |
| PHO89-MCS-tHSP-H2 | TGAGACGGGGCGGAATCGTACTAGTCCATGGGATATCCTTGACGACGGTTGGCTGC |
| PHO89-tHSP-P1 | AGCTTGAGCTTGATCAGATTGCTGTTTCGAGGATCTTCCTTCGCTTTGAC |
| PHO89-tHSP-P2 | CAAACACTGATAGTTTAAACTGAAGCGGCGCGCACTTCTCTGCATGCATC |
| ME-NcoI-E1 | CGGCCATGGACATGCCCGCACACTTTCCTCCCTCCCAGCCCCCTCCA |
| ME-NcoI-E2 | CCGACTAGTCTAGTGATGCTGATGCTGGTGCTGCGCCTGCTGCT |

1.4 启动子 pPHO89 和终止子 tHSP 的克隆及载体构建

以 *R. toruloides* NP11 基因组 DNA 为模板,以 PHO89-H1 和 PHO89-H2、tHSP-H1 和 tHSP-H2 为引物扩增获得 pPHO89 片段和 tHSP 片段。再利用 RF(Restriction free)克隆策略^[16],置换 pZPK-pPGK-hyg-tNOS^[9]载体上的组成型启动子 pPHO89 和终止子 tNOS(图 1 Step 1 和 Step 2),通过 PCR 技术鉴定重组载体,并送大连 TaKaRa 公司进行测序,获得正确的诱导型载体 pZPK-pPHO89-hyg-tHSP。

1.5 多克隆位点(MCS)的引入和双表达盒诱导型表达载体的构建

以诱导型表达载体 pZPK-pPHO89-hyg-tHSP 为出发质粒,选择载体序列中不含有的 3 个酶切位点 *EcoR* V、*Nco* I、*Spe* I 设计多克隆位点 MCS(Multiple Cloning Site)。参考 RF 克隆原理^[17],设计两条完全反向互补且含 *EcoR* V、*Nco* I、*Spe* I 酶切位点的长链引物作为大引物(Mega-primer),直接进行 RF II 克隆,引入 MCS,构建载体 pZPK-pPHO89-MCS-tHSP,

过程如图 1 中 Step 3 所示。接下来,引入完整的“pPGK-hyg-tNOS”表达盒(简称 HYG),构建双表达盒诱导表达载体 pZPK-HYG-pPHO89-MCS-tHSP,过程如图 1 中 Step 4 所示。然后,利用 PCR 技术扩增圆红冬孢酵母 *me* 基因,并通过引物设计在表达蛋白 C 端引入 6×His Tag,利用 MCS 位点中的 *Nco* I、*Spe* I 酶切位点插入双表达盒表达载体 pZPK-HYG-pPHO89-MCS-tHSP,获得双表达盒载体 pZPK-HYG-pPHO89-me-tHSP(图 1,Step 5)。

1.6 农杆菌介导转化圆红冬孢酵母

所有构建的诱导型表达载体通过电转化农杆菌 AGL1,转化菌液涂布于含 50 μg/mL Kan 和 100 μg/mL Amp 的 LB 固体培养基,30 ℃ 培养 36 h。挑取 Kan 和 Amp 双抗性转化子为阳性重组菌株,用于 ATMT 转化圆红冬孢酵母,步骤简述如下:*R. toruloides* NP11 单菌落接于 5 mL YEPD 液体培养基中,30 ℃、200 r/min 培养 20 h,调节至 OD₆₀₀ = 0.6,备用;农杆菌重组菌株接种于 5 mL Kan-LB 液体培养基(卡那霉素终浓度 100 mg/mL)中,30 ℃,摇床

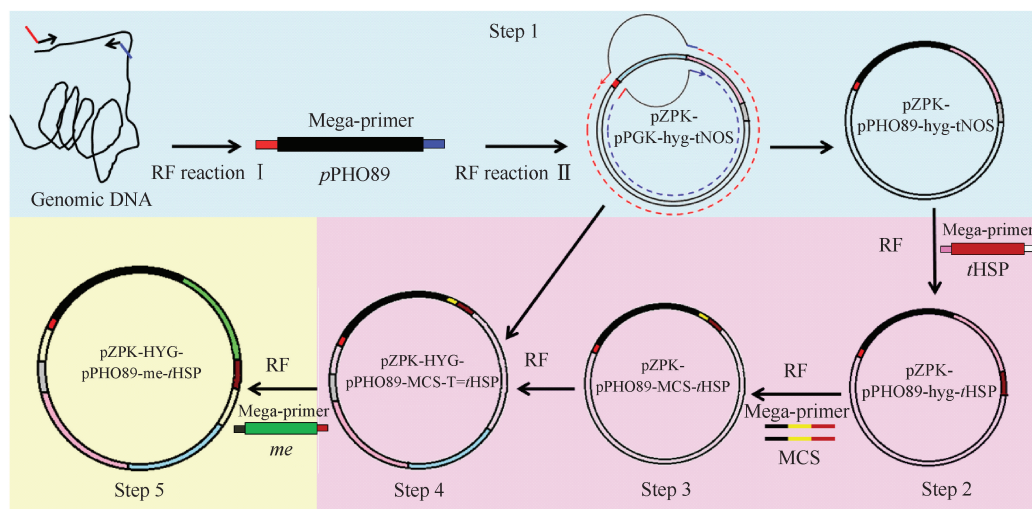


图 1. RF 克隆操作示意图

Figure 1. Schematic representation of RF cloning. pPGK: phosphate glyceric acid kinase promoter; pPHO89, inducible promoter (sodium; inorganic phosphate symporter promoter); tNOS: the NOS terminator from the pBl121 vector; tHSP: terminator of heat shock protein Hsp70 gene; hyg: hygromycin phosphotransferase; MCS: multiple cloning site; me: malic enzyme gene; LB: left border; RB: right border.

转速 200 r/min 培养 20 h, 调节至 $OD_{600} = 0.6$, 备用; 取上述酵母及农杆菌稀释液各 100 μ L, 混匀, 滴于 IM 诱导平板的滤膜上, 涂匀, 24 $^{\circ}$ C 培养 48 h; 用无菌镊子将滤膜从 IM 诱导平板上转移到诱导筛选平板 (含潮霉素的限磷培养基) 上, 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 48 h, 直至转化子出现。

1.7 重组菌株表型和基因型鉴定

R. toruloides 重组菌株表型鉴定采用梯度磷酸盐培养基点板法进行鉴定。梯度平板现用现做, 分两层灌制, 下层为不同 Na_2HPO_4 浓度的培养基, 上层为无磷酸盐的限磷培养基, 均含 50 μ g/mL 潮霉素 (图 2-A)。挑取抗性转化子, 利用含 50 μ g/mL 潮霉素的限磷培养基培养至菌液 $OD_{600} = 0.3$, 收集菌体并用无菌水洗涤, 取适量菌液用无菌水稀释至 $OD_{600} = 3 \times 10^{-4}$ 。每次取 5 μ L 菌液分别在 0 - 0.015、0 - 0.15 和 0 - 1.5 g/L Na_2HPO_4 浓度的限磷培养基上点板, 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 3 d。观察表型并进行磷酸盐诱导浓度分析。

R. toruloides 重组菌株基因型鉴定采用菌落 PCR 方法。重组菌株各挑取 2 个表型验证正确的转化子, 限磷培养基培养后取 2 mL 酵母菌液收集菌株, 加入 200 μ L TES 重悬, 按《精编分子生物学实验指南》上的玻璃珠破壁法提取基因组 DNA^[17], 采用 3 对特异引物进行 PCR 反应。

1.8 重组 ME 的表达和 Western blot 分析

利用引物 ME-NcoI-E1 和 ME-NcoI-E2, 经 RT-PCR 扩增油脂合成途径关键酶——苹果酸酶编码基因 *me*, 基于双表达盒载体 pZPK-HYG-pPHO89-MCS-tHSP, 构建苹果酸酶的磷酸盐饥饿诱导表达载体, 经 ATMT 转化 *R. toruloides* NP11。根据 1.2.6 中分析出的磷酸盐诱导浓度阈值, 在磷酸盐浓度为 0.06 g/L 的磷酸盐培养基中发酵 48 h, 利用玻璃珠破壁法提取样品总蛋白进行 Western blot 分析, 评价重组 ME 蛋白的诱导表达情况。

2 结果和分析

2.1 生物信息学分析

根据本课题组前期在 NCBI 公布的 *R. toruloides* NP11 基因组序列信息 (Bioproject accession: PRJNA169538), 利用 IGV 软件, 对 *pho89* 所在 Scaffold 的基因组序列和注释信息进行可视化操作 (图略), 获 *pho89* 启动子区 (pPHO89)。

2.2 启动子和终止子的克隆及功能分析

分离诱导型启动子 pPHO89 和终止子 tHSP, 利用 RF 克隆依次置换出发载体 pZPK-pPGK-hyg-tNOS 上的启动子 pPGK 和终止子 tNOS, 成功构建了诱导表达载体 pZPK-pPHO89-hyg-tHSP (图 1, Step 1 和

Step 2)。酶切和测序验证正确的 pZPK-pPHO89-hyg-tHSP 的质粒利用 ATMT 方法整合至 *R. toruloides* NP11 基因组,获得潮霉素抗性重组子。

潮霉素抗性转化子进行表型验证,发现随着梯度磷酸盐培养基(图 2-A)中 Na₂HPO₄ 浓度由高到低变化,菌落呈现不生长、少量生长和生长良好的三种趋势(图 2-B),经过观察和计算发现,在 Na₂HPO₄ 浓度为 0.005 – 0.080 g/L 范围内都出现均匀分布的单菌落,而 Na₂HPO₄ 浓度高于 0.15 g/L 时几乎没

有菌落生长,这与 *p*PHO89 启动子能否受到磷饥饿诱导而启动 *hyg* 基因表达密切相关。从图中的菌落分布可以看出,在 Na₂HPO₄ 浓度为 0.005 – 0.080 g/L 范围内,*p*PHO89 启动子发挥作用,而超过其浓度上限 0.15 g/L 时后 *p*PHO89 启动子被阻遏。综上所述,可以确定出圆红冬孢酵母 *p*PHO89 启动子磷酸盐饥饿去阻遏的磷元素有效浓度范围为 (1.19 × 10⁻³ – 1.91 × 10⁻²) mmol/L,其磷酸盐去阻遏的磷浓度上限为 3.59 × 10⁻² mmol/L。

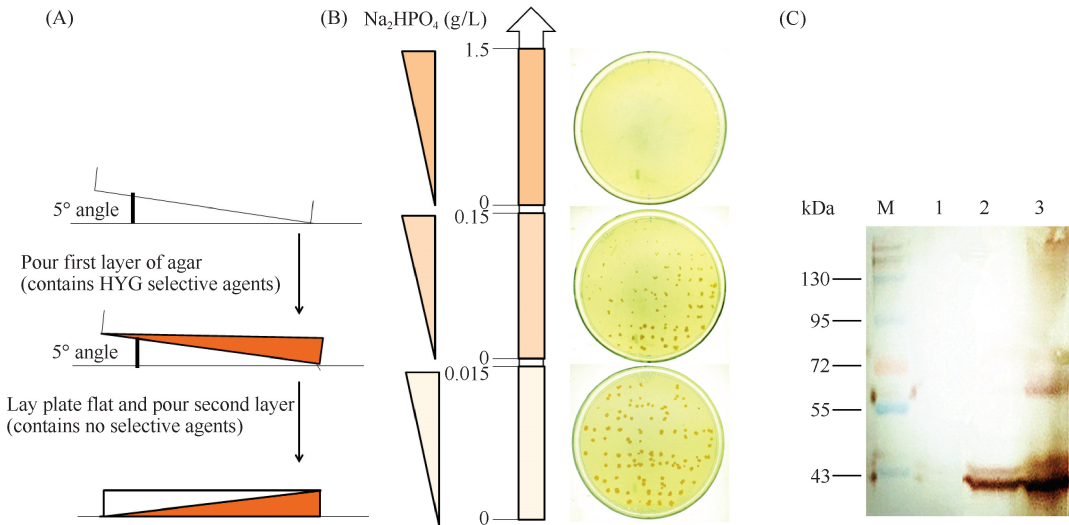


图 2. 磷酸盐梯度平板制备 (A), NP11 重组菌株的表型验证 (B) 和 Western blot 分析 (C)

Figure 2. Method for pouring gradient phosphate plates (A), phenotype confirmation result (B) and western blot result (C) of the recombinant strains. A: Schematic illustrating a method for pouring gradient phosphate plates. Each plate is first tilted at B5 degrees from the horizontal and a first layer of molten agar containing phosphate (Red) is added. After this initial layer hardens, the plate is laid flat and a second layer of molten agar lacking phosphate (Yellow) is poured. B: Phenotype confirmation result. C: The Western blot result of recombination strain NP11/pZPK-HYG-pPHO89-me-tHSP. M: marker; lane 1: negative control *R. toruloides* NP11; lane 2: recombination strain NP11/pZPK-pPHO89-hyg-tHSP; lane 3: recombination strain NP11/pZPK-HYG-pPHO89-me-tHSP. *: Malic enzyme gene with 6 × His tag; **: Hygromycin phosphotransferase (HYG) with 6 × His tag.

2.3 双表达盒诱导表达载体的构建和应用

以 pZPK-pPHO89-hyg-tHSP 为出发质粒,构建了用于外源基因表达的双表达盒诱导型表达载体 pZPK-HYG-pPHO89-MCS-tHSP。其中 MCS 包括 3 个酶切位点 *EcoR* V、*Nco* I 和 *Spe* I。圆红冬孢酵母内源性 *me* 基因利用 *Nco* I 和 *Spe* I 酶切位点插入到 pZPK-HYG-pPHO89-MCS-tHSP,构建成苹果酸酶的磷酸盐饥饿去阻遏诱导表达载体,经 ATMT 转化 *R. toruloides* NP11, 获得重组菌株 NP11/pZPK-HYG-pPHO89-me-tHSP。根据所得出的磷酸盐诱导浓度阈值,选择磷酸盐浓度 0.06 g/L 的诱导培养基进行诱导培养 48 h。收集菌体利用玻璃珠破壁法提取样

品总蛋白进行 Western blot 分析,通过重组苹果酸酶 C 端 6 × His 标签可检测到其高效表达(图 2-C)。从结果可以看出,重组菌株 NP11/pZPK-HYG-pPHO89-me-tHSP 在磷酸盐有效浓度范围内确实能够表达苹果酸酶。证明在磷酸盐饥饿条件下,双表达盒诱导型载体 pZPK-HYG-pPHO89-MCS-tHSP 可实现目的蛋白在圆红冬孢酵母中的过表达。

3 结论和展望

针对圆红冬孢酵母缺少诱导型表达载体的现状,本研究从分离有效诱导型启动子和终止子角度

探索了圆红冬孢酵母磷酸盐饥饿诱导表达载体的构建。启动子的选择,一是从遗传进化和种属特异性角度考虑,选择了自身来源的磷酸盐饥饿去阻遏诱导型启动子 *pPHO89*;二是参考了圆红冬孢酵母基因组和转录组数据,根据基因转录水平和基因结构,直接对响应磷酸盐饥饿去阻遏高效表达的启动子进行筛选,这种筛选方法与传统文库构建筛选启动子的方法相比,目的性和针对性强,而且工作量小,操作便捷,是一种较好的理性设计方法。

从梯度磷酸盐平板实验结果来看, *pho89* 基因启动子的诱导无需加入诱导剂,在培养液中磷酸盐浓度在 (0.005 – 0.080) g/L 时被高效诱导;从苹果酸酶的表达结果来看,在磷酸盐去阻遏的条件下, *pPHO89* 启动子可诱导产生大量重组 ME 蛋白,可以实现细胞生长与目的基因表达两个过程相对耦联,有效促进目的产物的积累,非常适合于限磷油脂发酵时 NADPH 生产酶(比如 ME)的高效表达,从而为油脂积累提供更多的还原力供应。同时, *pPHO89* 启动子还有受磷酸盐浓度的严谨调节、响应度高、操作简单、无需要额外诱导剂、经济便捷等优点。此外,本研究也为深入研究产油酵母的油脂积累代谢途径及特异性菌株基因改造工作提供良好的遗传操作工具。

参考文献

- [1] Wu SG, Hu CM, Jin GJ, Zhao X, Zhao ZK. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*, 2010, 101 (15) : 6124-6129.
- [2] Li YH, Liu B, Zhao ZB, Bai FW. Optimized culture medium and fermentation conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2006, 22(4) : 650-656. (in Chinese).
李永红, 刘波, 赵宗保, 白凤武. 圆红冬孢酵母菌发酵产油脂培养基及发酵条件的优化研究. *生物工程学报*, 2006, 22(4) : 650-656.
- [3] Wu SG, Zhao X, Shen HW, Wang Q, Zhao ZK. Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions. *Bioresource Technology*, 2011, 102(2) : 1803-1807.
- [4] Papanikolaou S, Aggelis G. Lipids of oleaginous yeasts. part I: biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2011, 113(8) : 1031-1051.
- [5] Lee JJL, Chen LW, Shi JH, Trzcinski A, Chen WN. Metabolomic profiling of *Rhodospiridium toruloides* grown on glycerol for carotenoid production during different growth phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(41) : 10203-10209.
- [6] Yang F, Zhang SF, Tang W, Zhao ZK. Identification of the orotidine-5'-monophosphate decarboxylase gene of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Yeast*, 2008, 25(9) : 623-630.
- [7] Yang F, Zhang SF, Jin GJ, Lin XP, Zhao ZK. Purification and characterization of a β -1, 3-glucomannanase expressed in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2011, 49(2) : 223-228.
- [8] Lin XP, Wang Y, Zhang SF, Zhu ZW, Zhou YJ, Yang F, Sun WY, Wang XY, Zhao ZK. Functional integration of multiple genes into the genome of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *FEMS Yeast Research*, 2014, 14(4) : 547-555.
- [9] Hu CM, Zhao X, Zhao J, Wu SG, Zhao ZK. Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*, 2009, 100(20) : 4843-4847.
- [10] Li YH, Zhao ZK, Bai FW. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 41(3) : 312-317.
- [11] Zhu ZW, Zhang SF, Liu HW, Shen HW, Lin XP, Yang F, Zhou YJ, Jin GJ, Ye ML, Zou HF, Zhao ZK. A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Nature Communications*, 2012, 3 : 1112.
- [12] Liu HW, Zhao X, Wang FJ, Li YH, Jiang XN, Ye ML, Zhao ZK, Zou HF. Comparative proteomic analysis of *Rhodospiridium toruloides* during lipid accumulation. *Yeast*, 2009, 26(10) : 553-566.
- [13] Lee KM, DaSilva NA. Evaluation of the *Saccharomyces cerevisiae ADH2* promoter for protein synthesis. *Yeast*, 2005, 22(6) : 431-440.
- [14] Richard P, Manley JL. Transcription termination by nuclear RNA polymerases. *Genes & Development*, 2009, 23(11) : 1247-1269.
- [15] Kuehner JN, Pearson EL, Moore C. Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2011, 12(5) : 283-294.
- [16] Van den Ent F, Löwe J. RF cloning: a restriction-free

- method for inserting target genes into plasmids. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2006, 67(1): 67-74.
- [17] Ausubel FM. 精编分子生物学实验指南. 马学军, 舒跃龙, 颜子颖 王海林 译. 第 4 版. 北京: 科学出版社, 2005: 595-596.
- [18] Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA. A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Nature Biotechnology*, 1991, 9(10): 963-967.

Phosphate starvation derepressed expression vector for engineering oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*

Sijia Ma^{1,2}, Yanan Wang², Xiang Jiao², Sufang Zhang^{2,3*}, Zongbao K. Zhao^{2,3}

¹ School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning Province, China

² Division of Biotechnology, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, Liaoning Province, China

³ Dalian National Laboratory for Clean Energy, Dalian 116023, Liaoning Province, China

Abstract: [**Objective**] To construct a phosphate starvation derepressed expression vector for functional integration and expression of exogenous genes in *Rhodospiridium toruloides*. [**Methods**] Sodium: inorganic phosphate symporter promoter *pPHO89* and heat shock protein terminator *tHSP* were predicted by bioinformatics assay. DNA fragments of the two elements were amplified from the cDNA of the oleaginous yeast *R. toruloides* NP11. Then the lyceric acid kinase promoter *pPGK* and terminator *tNOS* in vector *pZPK-pPGK-hyg-tNOS* were replaced by *pPHO89* and *tHSP*, respectively, using restriction free (RF) cloning method. Hygromycin phosphotransferase gene *hyg* was retained and as a report gene. The resulting vector *pZPK-pPHO89-hyg-tHSP* was transformed into *R. toruloides* using agrobacterium-mediated transformation (ATMT). The function of the *pPHO89* promoter and the *tHSP* terminator can be confirmed by the transformant harboring the hygromycin resistance. Furthermore, we developed new inducible vectors containing two expression cassettes driven by the constitutive *pPGK* promoter and inducible *pPHO89* promoter. [**Results**] *pPHO89* was regulated by phosphate and activated when the recombinant *R. toruloides* strains were grown under phosphate-limited condition. [**Conclusion**] *pPHO89* is an ideal promoter in terms of regulation by phosphate, comparative response strength, simplicity, and cost effectiveness. These ATMT vectors can provide useful tools for rational engineering of oleaginous yeast to produce fatty acid derived biofuels and biochemicals.

Keywords: *Rhodospiridium toruloides*, phosphate starvation derepresses, *pPHO89* promoter, terminator, expression vector

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31370128, 31170060)

* Corresponding author. Tel: +86-411-84379066; Fax: +86-411-84379211; E-mail: zsfjxy@dicp.ac.cn

Received: 11 February 2015/Revised: 21 May 2015