

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
53 (10) :1103 – 1110; 4 October 2013
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

产甘油假丝酵母 *HOG1* MAPK 同源基因 *CgHOG1* 的克隆及特征分析

王晨莹¹, 诸葛斌^{1*}, 方慧英¹, 宗红¹, 宋健², 诸葛健¹

¹江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

²江南大学化学与材料工程学院, 无锡 214122

摘要: 【目的】获得产甘油假丝酵母 (*Candida glycerinogenes*) 耐高渗和过量合成甘油的关键调控基因—丝裂原活化蛋白激酶基因 (*CgHOG1*), 并考察其渗透压调节功能。【方法】运用简并 PCR 结合 Self-Formed Adaptor PCR 技术从产甘油假丝酵母基因组中克隆 *CgHOG1* 基因并进行生物信息学相关分析, 将 *CgHOG1* 基因在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* W303-4A) *hog1Δ* 缺失突变株中互补表达, 考察菌株耐渗透压能力变化。【结果】所获得 *CgHOG1* 基因全长 1164 bp, 编码 387 个氨基酸序列 (GenBank No. KC480066); 氨基酸序列与来源于 *Ogataea parapolymorpha* 的 Hog1p 同源性最高, 为 86%; 该基因在酿酒酵母 *hog1Δ* 缺失突变株中异源表达能够显著提高菌株的抗盐耐高渗和甘油合成能力。【结论】本文所获得的基因 *CgHOG1* 是一个具有耐高渗和过量合成甘油调控功能的新基因, 研究结果为产甘油假丝酵母超高渗应答机制的研究及抗盐耐旱作物改造提供了新的基因。

关键词: 丝裂原活化蛋白激酶, 产甘油假丝酵母, *HOG1*, 高渗胁迫调节

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 09-1103-08

生物在长期的进化过程中形成了精确而敏感的适应机制, 对外界环境刺激作出应答反应^[1]。丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen activated protein kinase, MAPK) 是一类普遍存在于真核生物且在进化上保守的蛋白激酶, 主要参与传导胞外信号, 调节细胞的多种生物反应过程^[2]。MAPK 通常由 MAPKK 激活, 而 MAPKK 又受到 MAPKKK 的活化^[2]。在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中至少有五条 MAPK 信号途径, 这些信号途径分别接受不同的胞外刺激,

其中高渗透压甘油信号途径 (Highosmolarity glycerol response, HOG 途径) 对渗透压胁迫进行调节^[3]。HOG 途径中的核心分子 Hog1p 在酿酒酵母中起到了必不可少的作用。酿酒酵母 Hog1p 一旦进入细胞核就调控基因转录, DNA 微阵列研究表明, 高渗应激下 Hog1p 调节大约 600 个基因表达^[4], 因此 Hog1p 是目前研究的热点。近年来, HOG 途径的重要蛋白激酶 Hog1p 的编码基因已在多种真核生物中被分离和研究。

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

* 通信作者。Tel/Fax: +86-510-85918150; E-mail: bzhuge@yahoo.com.cn

作者简介: 王晨莹 (1988-), 女, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要研究方向为分子生物学。E-mail: chenying071776@163.com

收稿日期: 2013-01-29; 修回日期: 2013-04-07

产甘油假丝酵母 (*Candida glycerinogenes* WL2002-5) 是从自然界中分离出来的一种能够在超高渗透压 (55% 葡萄糖, W/V) 下快速生长的高产甘油工业生产菌株, 该菌能够适应不同的逆境^[5]。然而, 在产甘油假丝酵母中有关 HOG 信号途径与其环境适应性尤其是耐高渗性能之间的关系研究较少。为进一步明确 HOG 信号途径在该菌中的作用, 有必要先获得相关的丝裂原活化蛋白激酶 *HOG1* 基因并研究其功能。为此, 本文从产甘油假丝酵母的基因组中分离得到了 *CgHOG1* 基因, 并对其功能进行研究, 这为阐明高渗透压丝裂原活化激酶 Hog1p 在产甘油假丝酵母中的功能奠定了基础, 并为工业上浓醪发酵菌株的分子改造和抗盐耐旱农作物的选育提供了新的基因材料。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒及培养条件

C. glycerinogenes WL2002-5, *S. cerevisiae* W303-1A, *S. cerevisiae* W303 *hog1Δ* 缺失突变株, *Escherichia coli* JM109, 质粒 pYX212 均由本实验室

保藏; pMD18 T-Vector, 购自 TaKaRa 公司。pYX212 用于基因在酵母的表达, pMD18 T-Vector 用于基因的亚克隆和序列测定。添加了蛋氨酸和尿嘧啶的 SC 培养基用于 *S. cerevisiae* W303 *hog1Δ* 缺失突变株转化子的筛选。

1.2 产甘油假丝酵母基因组 DNA 的提取

DNA 提取参照文献^[6]。

1.3 简并引物 PCR

NCBI 数据库中搜索已报道的包括酵母在内的真核生物 Hog1 MAPK 氨基酸序列, 用 Clustal X 软件进行序列比对。根据部分氨基酸序列保守区设计一对简并引物 DHU 和 DHR (表 1)。以 *C. glycerinogenes* 基因组 DNA 为模板, 利用 *Ex Taq* Hot start version 聚合酶进行 PCR 反应。PCR 产物经电泳验证后, 切胶回收、测序。

1.4 SEFA-PCR (Self-formed Adaptor PCR)

根据简并引物 PCR 扩增片段得到的保守序列设计引物, 利用 SEFA-PCR 法扩增 *CgHOG1* 基因侧翼序列。具体引物设计如表 1, PCR 条件参见文献^[7]。

表 1. 本研究所用的引物
Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequence (5'→3')	Description
DHU	AAGATATCARATHTTYGGNAC	Degenerate PCR
DHR	CAGGATYTCNSWRTACATCAT	
H-U	CGCGAATTCATGCTCTACCGACCAA	Clone the complete <i>HOG1</i> gene
H-R	CGGAAGCTTTTATTGCTGTGTGTTG	
5SP1	ACATAGCCTGTCAATTTGAGGGTCTCG	5'-flanking SEFA PCR
5SP2	GGTCAGCAATCTATGTAAATCC	
5SP3	TTTTTTAATTNNNNNNNNNTGATTGTTAG	
3SP1	GGGATGGCGCATTTGGACTAGTTTGTCTCG	3'-flanking SEFA PCR
3SP2	GGATTACATAGATTGCTGACC	
3SP3	AGATTATGCTAANNNNNNNNAATACGATA	

1.5 *CgHOG1* 基因的序列测定与生物信息学分析

测序工作由华大基因上海鼎安生物技术有限公司完成。利用 Blast 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 进行核苷酸和蛋白质序列的搜索; 通过 DNAMAN 和 DNASTAR 软件进行开放阅读框预测和多序列的对比。

1.6 *CgHOG1* 基因功能鉴定

根据获得的编码框序列信息, 设计一对引物 H-U 和 H-R, 并在上下游引物的 5' 端分别引入

EcoR I 和 *Hind* III 限制性酶切位点, 用于扩增 *CgHOG1* 完整的编码框。按常规的分子操作技术将 PCR 产物克隆到 pYX212, 获得重组质粒命名为 pYX212-*CgHOG1*, 按参考文献^[8] 利用醋酸锂转化方法将重组质粒导入酿酒酵母 *hog1Δ* 缺失突变株后获得转化子。在含不同浓度 NaCl 的 SC 培养基中分别接种相同细胞量的重组转化子和对照宿主菌株, 考察重组菌株的生长、菌落形态和甘油合成。

1.7 分析方法

甘油含量用 HPLC 测定（色谱柱：Bio-Rad Aminex HPX-87H；柱温 60℃；流动相：5 mmol/L 硫酸；流速：0.6 mL/min；检测器：RI）。

2 结果

2.1 *CgHOG1* 基因的克隆

利用简并 PCR 结合 SEFA-PCR 方法克隆 *CgHOG1* 基因，具体的克隆策略如图 1。简并 PCR 获得 0.57 kb 的产物，将产物克隆到 pMD-18T 载体

上测序。序列分析发现其推测的编码产物与其他酵母丝裂原活化蛋白激酶 *Hog1p* 基因相似性较高，初步确认所获得的 DNA 片段是产甘油假丝酵母 *HOG1* 基因的部分序列。根据 0.57 kb 的序列信息，以引物 5SP1、5SP2、5SP3 和 3SP1、3SP2、3SP3 分别 SEFA-PCR 扩增 *CgHOG1* 基因 3'和 5'端基因片段。经两轮 PCR 扩增后，5'端获得 2.5 kb 左右的特异性产物，3'端获得 1.5 kb 左右的特异性产物。结合简并 PCR 方法获得的 0.57 kb 的 DNA 片段，经拼接后获得 1.164 kb 全长 DNA 序列（图 2）。

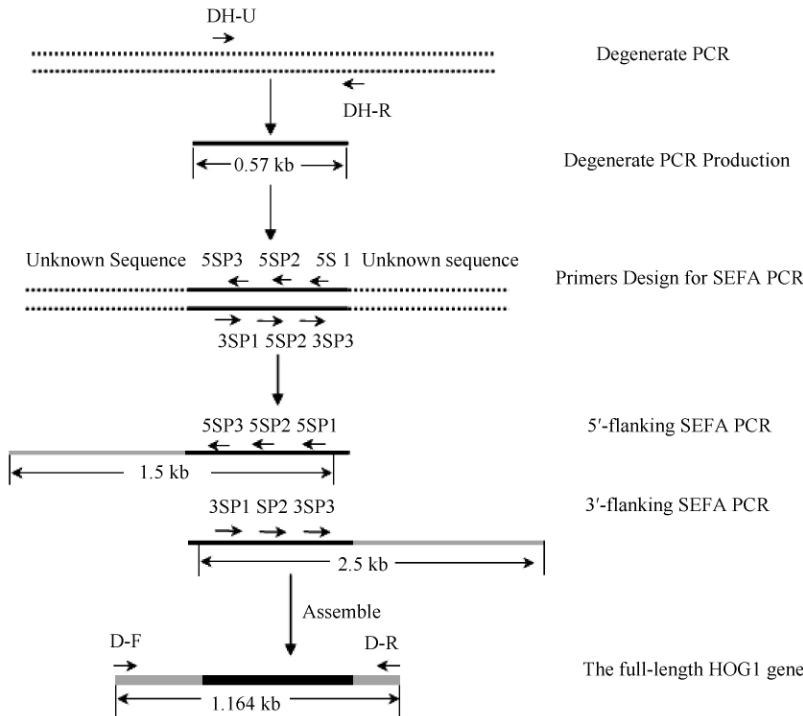


图 1. *CgHOG1* 基因的 PCR 克隆策略
Figure 1. Strategy of cloning for *CgHOG1*.

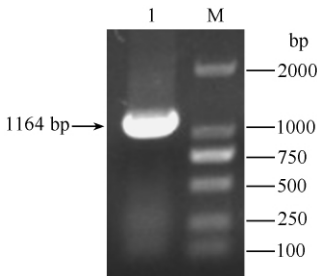


图 2. PCR 扩增 *HOG1* 全序列
Figure 2. Whole sequence of *CgHOG1* amplified by PCR. M: DL2000 DNA Marker; lane 1: PCR production.

2.2 *CgHOG1* 在 *S. cerevisiae hog1Δ* 缺失突变株的互补表达

利用 H-U 和 H-R 引物进行 PCR 扩增获得 *CgHOG1* 基因的完整表达框（图 2），经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后，与经相同酶酶切的质粒 pYX212 连接，获得阳性重组质粒命名为 pYX212-*CgHOG1*（图 3）。利用醋酸锂转化方法将外源重组质粒导入酿酒酵母 *hog1Δ* 缺失突变株，在 SC 培养基选择性平板上挑取单菌落进行验证。将阳性转化子和对照菌株（酿酒酵母 *hog1Δ* 缺失突变株和酿酒酵母 *hog1*

野生型菌株) 进行渗透性试验分析。如图 5 和图 6 所示,当 SC 培养基中不含 NaCl 时,重组菌和对照菌株的生长速度和甘油产量没有明显差别。但是在 0.5、1.0 和 1.5 mol/L NaCl 培养条件下,重组菌的生长速度、盐的耐受性与酿酒酵母 (*hog1* 野生型菌株) 基本接近,但显著高于酿酒酵母 *hog1Δ* 缺失突变株。在 0.5 mol/L NaCl 培养条件下发酵 48 h 时重组菌和酿酒酵母单位菌体的胞内甘油含量显著高

于酿酒酵母 *hog1Δ* 缺失突变株的胞内甘油含量。平板分析 (图 4) 表明,酿酒酵母 *hog1Δ* 缺失突变株在 0.5 和 1.0 mol/L NaCl 平板上的生长几乎停止,而重组菌与酿酒酵母仍可快速生长。结果表明, *CgHOG1* 基因的表达能够显著提高酿酒酵母 *hog1Δ* 缺失突变株的抗盐耐高渗和甘油合成能力, *CgHOG1* 基因能够互补酿酒酵母 *HOG1* 基因功能。

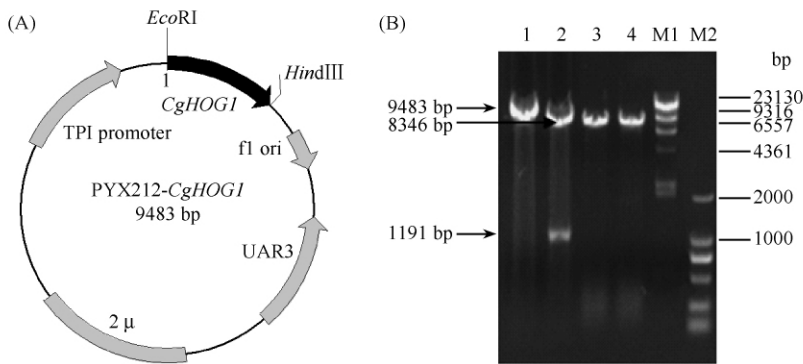


图 3. 重组质粒 pYX212-*CgHOG1* (A) 及 pYX212-*CgHOG1* 酶切验证图 (B)

Figure 3. Recombinant plasmid pYX212-*CgHOG1* (A) and restriction analysis of pYX212-*CgHOG1* (B). M1, λ -Hind III DNA Marker; M2, DL2000 DNA Marker; lane 1, pYX212-*CgHOG1*/EcoR I; lane 2, pYX212-*CgHOG1*/EcoR I and Hind III; lane 3, pYX212/EcoR I; lane 4, pYX212/EcoR I and Hind III.

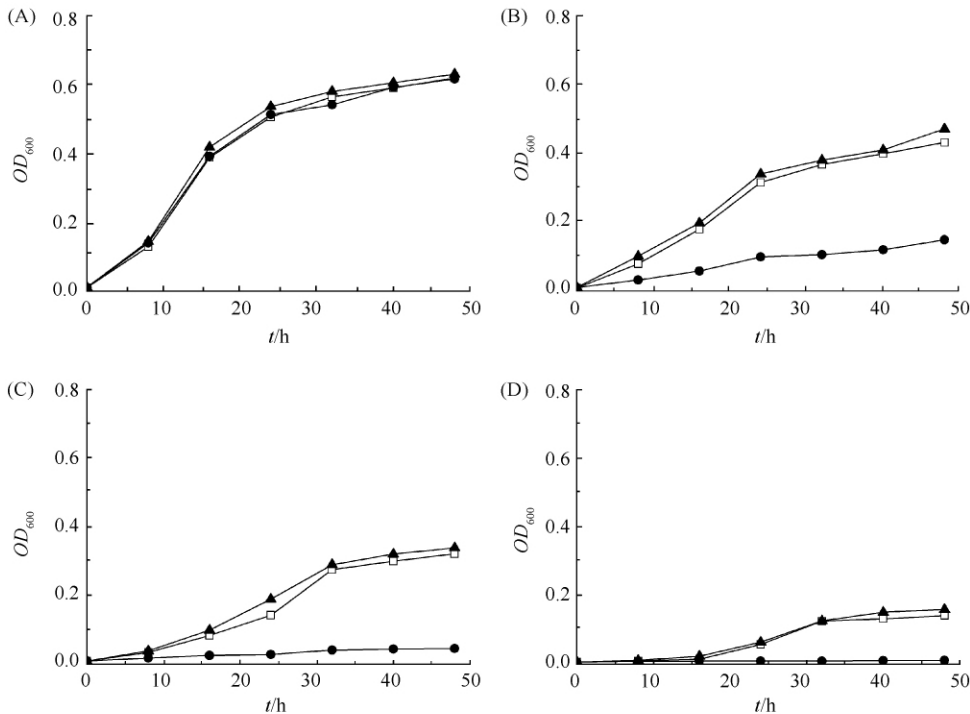


图 4. NaCl 渗透压胁迫条件下酿酒酵母、酿酒酵母 *hog1Δ* 缺陷株和酿酒酵母 *hog1Δ-CgHOG1* 重组菌细胞生长的变化

Figure 4. The changes on the growth of *S. cerevisiae* W303-1A, *S. cerevisiae* W303-1A *hog1Δ* null mutant and *S. cerevisiae* W303-1A *hog1Δ-CgHOG1* in the presence of NaCl. filled triangle: *S. cerevisiae* W303-1A (*hog1* wild type), open square: the engineered strains *S. cerevisiae* W303-1A *hog1Δ-CgHOG1*, filled circle: *S. cerevisiae* W303-1A *hog1Δ* null mutant; A: 0 mol/L NaCl, B: 0.5 mol/L NaCl, C: 1.0 mol/L NaCl, D: 1.5 mol/L NaCl.

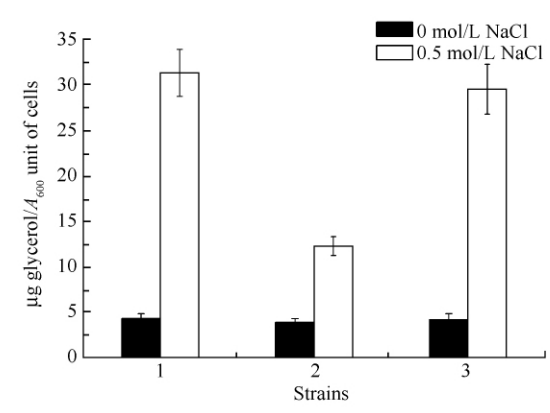


图 5. 酿酒酵母、酿酒酵母 *hog1Δ* 缺失突变株和酿酒酵母 *hog1Δ-CgHOG1* 胞内甘油含量的变化

Figure 5. Changes in intracellular content of glycerol in *S. cerevisiae* W303-1A, *S. cerevisiae* W303-1A *hog1Δ* null mutant and *S. cerevisiae* W303-1A *hog1Δ-CgHOG1*. 1: *S. cerevisiae* W303-1A (*hog1* wild type), 2: *S. cerevisiae* W303-1A *hog1Δ* null mutant and 3: *S. cerevisiae* W303-1A *hog1Δ-CgHOG1*.

2.3 *CgHOG1* 基因的序列分析和遗传密码子分析

CgHOG1 基因包含 1164 bp 的完整阅读框, 不含内含子, 编码一个分子量为 44.6 kDa、包含 387 个氨基酸的蛋白, 理论等电点为 5.31。分别用核苷酸序列和编码的氨基酸序列进行比对, 发现与其他酵母的丝裂原活化蛋白激酶 Hog1p 相似性较高。其编码的蛋白与 *Ogataea parapolyomorpha*、*Wickerhamomyces ciferrii* 和 *Saccharomyces cerevisiae* 的 Hog1p 高度同源, 同源性分别为 86%、85% 和 82%。结果表明, 所获得的基因是来源于耐高渗产甘油假丝酵母的一个新的 *HOG1* 基因。

由于进化的差异, 不同生物对密码子的使用呈现很大的差异, 并且具有一定的偏爱性。一般来说, 在细胞内高表达基因的遗传密码使用偏爱性要高于低表达的基因。为此, 我们分析了 *CgHOG1* 基因的

密码子使用情况 (表 2), 并且与产甘油假丝酵母胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶 *CgGPD* 基因^[9] 及酿酒酵母 484 个编码蛋白基因的密码子使用频率^[10] 作了比较。*CgHOG1* 基因利用了 61 个有义密码子中的 58 个, 其中有 49 个密码子利用了 2 次以上, *CgGPD* 利用了 61 个有义密码子中的 54 个, 其中有 44 个密码子利用了 2 次以上。而 *CgHOG1* 和 *CgGPD* 均未发现 AGC 和 CGC 密码子 (表 2), 这与酿酒酵母中 AGC 和 CGC 的利用非常低相似。*CgHOG1* 基因在密码子第三位碱基的选择上稍微偏向于嘧啶碱基 (52%), 当第三位属于嘌呤碱基时, A 碱基所占比例比 G 碱基稍大一些, 分别为 60% 和 40%, 但是当第三位是嘧啶时, T 具有较高的偏爱性, 达到了 73%, 而 C 仅占有 27%。在酿酒酵母中终止密码子常用 TAA, 在 *CgHOG1* 和 *CgGPD* 基因中也是以 TAA 作为终止密码子的。*CgHOG1* 密码子分析表明产甘油假丝酵母对 A 和 T 密码子的选择具有明显的偏好性。

2.4 *CgHOG1* 基因的结构分析

如图 7 所示, Tyr-24 到 Leu-302 所组成的结构域与其他 Hog1p MAP 激酶相似。在催化域也存在与其他 Hog1p MAP 激酶相似的活性位点 (Asp-144) 和 “TGY” 超二级结构 (Thr-174 到 Tyr-177), TGY 超二级结构是 Hog1p MAP 激酶的特征结构^[11], 同时 *CgHOG1* 包含有 Hog1p MAP 激酶中保守的 ATP 结合信号 (Gly-30 到 Lys-54)。“CD” 超二级结构域 (Asp-299 到 Glu-316)^[12] 包含酸性和疏水残基。Asp-307 和 Asp-310 能连同疏水残基 Tyr-305 和 His-306, 与上下游效应因子的正电荷残基产生关键的静电反应。结构分析说明所获得的 *CgHOG1* 编码的蛋白具有 Hog1p 的基本功能结构域。

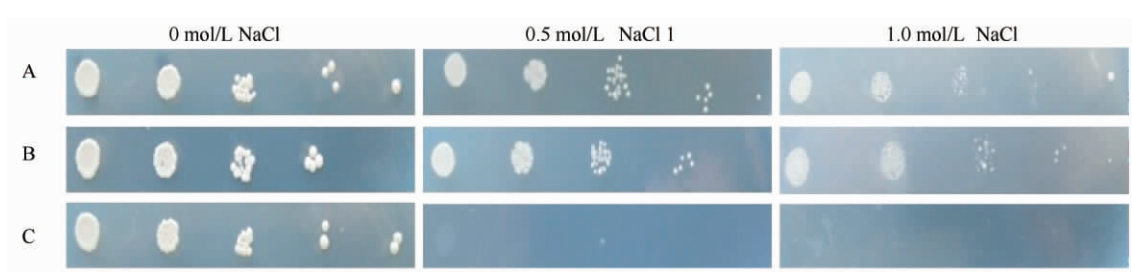


图 6. 不同 NaCl 浓度下酿酒酵母、酿酒酵母 *hog1Δ-CgHOG1* 和酿酒酵母 *hog1Δ* 缺失突变株的菌落形态

Figure 6. Colony morphology of the *S. cerevisiae* W303-1A (A), *S. cerevisiae* W303-1A *hog1Δ-CgHOG1* (B) and *S. cerevisiae* W303-1A *hog1Δ* (C) in the presence of NaCl.

表 2. *CgHOG1* 基因的密码子利用分析

Table 2. Analysis of codon usage in *CgHOG1*

Codon	<i>HOG1</i>		Codon	<i>HOG1</i>		Codon	<i>HOG1</i>		Codon	<i>HOG1</i>	
	a	b		a	b		a	b		a	b
GGG	1	0.06	AGG	2	0.13	TGG	4	1.00	CGG	0	0
GGA	2	0.12	AGA	8	0.53	TGA	0	0	CGA	2	0.13
GGT	10	0.59	AGT	2	0.10	TGT	4	0.80	CGT	3	0.20
GGC	4	0.24	AGC	0	0	TGC	1	0.20	CGC	0	0
GAG	12	0.46	AAG	8	0.38	TAG	0	0	CAG	9	0.38
GAA	14	0.54	AAA	13	0.62	TAA	1	1.00	CAA	15	0.63
GAT	19	0.70	AAT	11	0.58	TAT	10	0.71	CAT	9	0.60
GAC	8	0.30	AAC	8	0.42	TAC	4	0.29	CAC	6	0.40
GTG	4	0.18	ATG	9	0.69	TTG	14	0.45	CTG	1	0.03
GTA	0	0	ATA	4	0.31	TTA	17	0.55	CTA	5	0.17
GTT	13	0.59	ATT	17	0.74	TTT	16	0.76	CTT	1	0.03
GTC	5	0.23	ATC	6	0.26	TTC	5	0.24	CTC	1	0.03
GCG	4	0.22	ACG	3	0.10	TCG	1	0.05	CCG	3	0.14
GCA	5	0.28	ACA	7	0.24	TCA	6	0.29	CCA	12	0.55
GCT	8	0.44	ACT	7	0.24	TCT	10	0.48	CCT	6	0.27
GCC	1	0.06	ACC	4	0.14	TCC	2	0.10	CCC	1	0.05

Notes: Fraction of synonymous codon usage in the mitogen-activated protein kinase *HOG1* gene from *C. glycerinogenes*. a: Total number of specific codons in the gene analyzed. b: Fraction of synonymous codon. For example, the amino acids of *HOG1* gene had 17 Gly codons. Of these, 10 were GGT: thus 10:17 = 0.59.

利用 DANSTAR 软件对 *CgHog1p* 和来源于酿酒酵母的 *Hog1p* 进行氨基酸残基的多序列对比,如图 7 所示,该蛋白与酿酒酵母的 *Hog1p* 存在较高同源性。但可以看出二者之间还是存在较大差别的。因

此,产甘油假丝酵母中 *CgHOG1* 基因是如何调控下游基因来维持细胞渗透压和高产甘油以及 *CgHOG1* 基因与酿酒酵母 *HOG1* 的调控机制之间的差异均值得进一步研究。

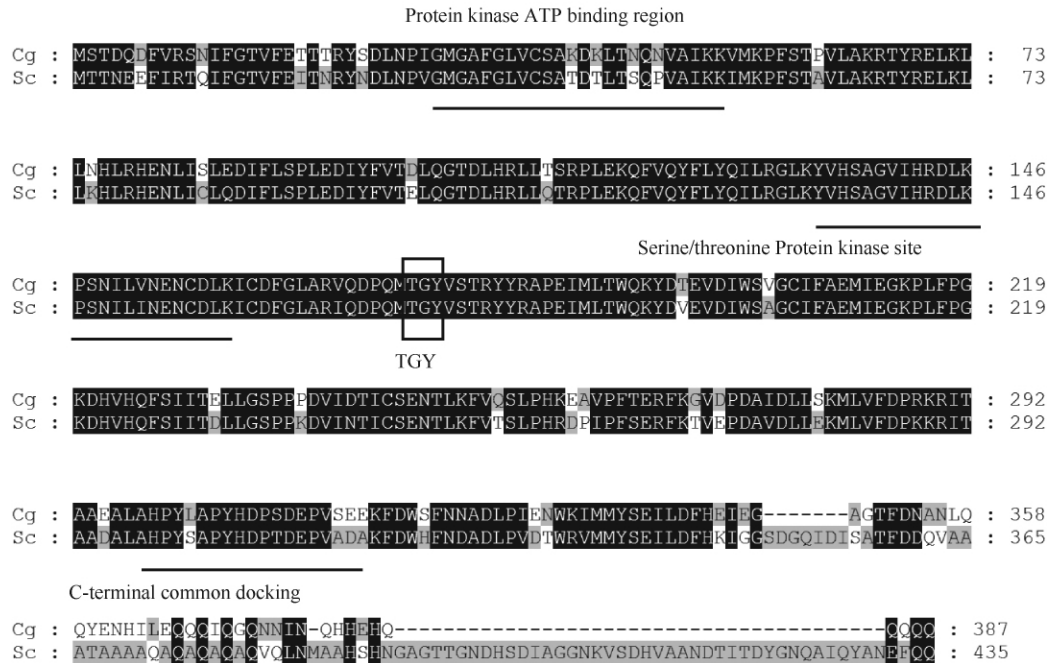


图 7. *CgHog1p* 与酿酒酵母 *Hog1* MAPK 的氨基酸序列相似性分析

Figure 7. Putative amino sequence alignment of *CgHog1p* with homologs of *Hog1p* from *S. cerevisiae*. The identical amino acids are highlighted on a black background, conserved amino acids are shown on a dark gray background, and similar amino acids are shown on a light gray background. Dashes indicate gaps in the alignments. The sequence TGY required for kinase activation is marked by box. Sc indicate the putative amino sequences of homologs of *Hog1p* from *S. cerevisiae* (NP013214.1).

3 讨论

HOG 信号途径首先发现于酿酒酵母^[13], 该信号途径受到外界高渗条件的诱导, 激活甘油合成相关酶基因(如 *GPD1*) 的转录, 使胞内积累高浓度的甘油, 维持细胞较高的渗透压^[3]。由于近年来的研究表明, 该信号途径广泛存在于其它真核生物, 与真核生物细胞内的渗透压调节密切相关。

与酿酒酵母相比, 产甘油假丝酵母能够耐超高渗透压并过量合成甘油, 但其调控机理却不甚明了。因此, 本研究运用简并引物 PCR 结合 SEFA-PCR 技术对产甘油假丝酵母 *HOG1* 基因进行了成功的克隆和序列测定, 并将该基因在酿酒酵母 *hog1Δ* 缺失突变株中互补表达, 显著提高了酿酒酵母 *hog1Δ* 缺失突变株细胞对渗透压耐受性和甘油合成能力。虽然 *CgHOG1* 基因能够互补酿酒酵母 *HOG1* 基因功能, 但是无论在核苷酸序列还是氨基酸水平上该基因与酿酒酵母的相关基因存在着一定的差异, 如图 7 所示, ATP 结合区 K、K 和 N、N 代替了酿酒酵母的 T、T 和 S、P, CD (common docking) 超二级结构域最后 3 个氨基酸产甘油假丝酵母为 SEE 而酿酒酵母为 ADA, 特别是 Ala-349 序列之后差别很大, 表明该基因中可能存在未知的 DNA 功能元件赋予该基因独特生理功能, 这或许能够解释产甘油假丝酵母能够耐受超高葡萄糖浓度并高产甘油的原因。针对产甘油假丝酵母能够过量合成甘油的这一特殊现象, 我们的前期研究表明了胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶 (*CgGPD*) 在产甘油假丝酵母发酵甘油过程中起着决定作用并且是受外界渗透压调控表达的, 在酿酒酵母中 *GPD* 是 HOG-MAPK 途径响应渗透压的重要靶基因之一, 但 *CgGPD* 在产甘油假丝酵母是如何受到 HOG 信号转导途径调控的目前还不清楚。研究产甘油假丝酵母中 *CgHOG1* 基因是如何调控上下游 600 个基因(包括 *CgGPD* 基因)的表达调控尤其是高渗下 *CgHOG1* 的强调控机理显得很有必要, 这也是本文后续研究的重点。

参考文献

[1] Ruan H, Li X, Lan P, Jiang L. High osmolarity glycerol MAP kinase signal transduction pathway. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2006, 28: 651-655. (in Chinese)

阮海华, 李西川, 兰蓓, 蒋伶活. 高渗透压甘油信号转导途径. *细胞生物学杂志*, 2006, 28: 651-655.

[2] Xu JR. MAP kinases in fungal pathogens *Fungal. Genetics and Biology*, 2000, 31(9): 137-152.

[3] Gustin MC, Albertyn J, Alexander M, Davenport K. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(4): 1264-1300.

[4] Edmunds JW, Mahadevan LC. MAP kinases as structural adaptors and enzymatic activators in transcription complexes. *Journal of Cell Science*, 2004, 117(17): 3715-3723.

[5] Zhuge J, Fang HY, Wang ZX, Chen DZ, Jin HR, Gu HL. Glycerol production by a novel osmotolerant yeast *Candida glycerinogenes*. *Applied Microbiololgy Biotechnology*, 2001, 55: 686-692.

[6] Wang P, Li R, Dong Q. A method of DNA extraction from *Saccharomyces albicans*. *Journal of Tropical Medicine*, 2008, 12(8): 1222-1224. (in Chinese)
王萍, 厉荣玉, 董群. 白假丝酵母菌 DNA 提取方法的研究. *热带医学杂志*, 2008, 12(8): 1222-1224.

[7] Wang SM, He J, Cui ZL, Li SP. Self-formed adaptor PCR: a simple and efficient method for chromosome walking. *Applied Environmental Microbiology*, 2007, 73(15): 5048-5051.

[8] Otto J, Argos P, Rossmann MG. Prediction of secondary structural elements in glycerol-3-phosphate dehydrogenase by comparison with other dehydrogenases. *European Journal of Biochemistry*, 1980, 109(2): 325-330.

[9] Chen X, Fang H, Shen W, Rao Z, Zhuge B, Wang Z, Zhuge J. Cloning of the gene encoding a key enzyme involved in production of glycerol in *Candida glycerinogenes*. *Hereditas*, 2008: 30(4): 508-514. (in Chinese)
陈献忠, 方慧英, 沈微, 饶志明, 诸葛斌, 王正祥, 诸葛健. 产甘油假丝酵母甘油合成关键酶编码基因的克隆. *遗传*, 2008, 30(4): 508-514.

[10] Zhang SP, Zubay G, Goldman E. Low-usage codons in *Escherichia coli*, yeast, fruit fly and primates. *Gene*, 1991, 105(1): 61-72.

[11] Cano E, Mahadevan LC. Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends in Biochemical Sciences*, 1995, 20(3): 117-122.

[12] Enslen H, Davis RJ. Regulation of MAP kinases by

docking domains. *Biology of the Cell*, 2001, 93: 5-44.

[13] Brewster JL, de Valoir T, Dwyer ND, Winter E, Gustin

MC. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*, 1993, 259 (5102): 1760-1763.

Cloning and characterization of an *HOG1* MAPK homologous gene *CgHOG1* from *Candida glycerinogenes*

Chenyang Wang¹, Bin Zhuge^{1*}, Huiying Fang¹, Hong Zong¹, Jian Song²,
Jian Zhuge¹

¹ The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

² School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: [Objective] This study was aimed to obtain a key gene of osmo-adaptation and glycerol synthesis regulation in *Candida glycerinogenes*, namely mitogen-activated protein kinase *HOG1* gene (*CgHOG1*), and to verify its function of osmo-regulation. [Methods] The gene *CgHOG1* was amplified by Degenerate PCR and Self-Formed Adaptor PCR from the *C. glycerinogenes* genome and the bioinformatic analysis of *CgHOG1* gene was conducted. The *CgHOG1* gene was transformed in *Saccharomyces cerevisiae* *hog1Δ* null mutant and its salt tolerance characteristics was investigated. [Results] The gene *CgHOG1* encoded a protein of 387 amino acids with an open reading frame of 1164 bp and the amino acid sequence showed 86% identity to Hog1p of *Ogataea parapolymorpha*. Heterologous expression of *CgHOG1* gene in *S. cerevisiae* W303 *hog1Δ* null mutant showed an increase in salt tolerance and glycerol production compared to *S. cerevisiae* W303 *hog1Δ* null mutant. [Conclusion] The *CgHOG1* obtained in this study is a novel *HOG1* gene from *C. glycerinogenes*, which plays an essential role in the yeast hyperosmotic response and glycerol synthesis. We supplied a new gene for the osmo-adaptation mechanism in *C. glycerinogenes* and molecular modification of the salt-tolerant and drought-resistant crops.

Keywords: Mitogen activated protein kinase, *Candida glycerinogenes*, *HOG1*, Osmo-regulation

(本文责编:张晓丽)