

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55(11):1385-1391; 4 November 2015  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20150030

## 新型渗透压调控的工业酵母启动子

朱佳莉<sup>1,2</sup>, 诸葛斌<sup>1,2\*</sup>, 方慧英<sup>1,2</sup>, 宗红<sup>1,2</sup>, 陆信曜<sup>1,2</sup>, 张成<sup>1,2</sup>, 张炜极<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 工业微生物研究室, 无锡 江苏 214122

<sup>2</sup>江南大学糖化学与生物技术教育部重点实验室, 无锡 江苏 214122

**摘要:**【目的】筛选工业酵母 *Candida glycerinogenes* 渗透压调控性能优越的启动子, 为工业酵母改造及转基因研究提供新途径。【方法】PCR 扩增 *C. glycerinogenes* 新型系列启动子 PCgPGI、PCgTPI、PCgZWF、PCgSTL1、PCgSTL2、PCgSTL3, 利用生物信息学技术解析启动子序列中渗透压胁迫应答元件, 构建包含 *gfp* 荧光蛋白报告基因和 PCgPGI、PCgTPI、PCgZWF、PCgSTL1、PCgSTL2、PCgSTL3 启动子的 5.8S rDNA 整合表达载体, 通过荧光强度及 mRNA 转录的 qRT-PCR 测定结果检验各启动子活性强度及其受渗透压调控情况。【结果】启动子 PCgSTL3 包含多个 STRE 渗透压胁迫应答元件, 在工业酵母中受渗透压调控更敏感, 启动强烈, 转录水平高, *gfp* 表达量大。【结论】PCgSTL3 是受渗透压调控能够实现外源基因可控表达的优良工业酵母启动子。

**关键词:**产甘油假丝酵母, 绿色荧光蛋白, 耐渗关键基因启动子

**中图分类号:**Q935      **文章编号:**0001-6209(2015)11-1385-07

启动子是基因表达调控的顺式元件, 其活性高低在很大程度上影响基因表达水平, 所以筛选转录启动功能较好的启动子, 对于外源蛋白高效表达及菌株改造具有重要意义<sup>[1]</sup>。目前, 已有不少启动子被克隆及功能鉴定, 但常用酵母启动子中组成型启动子启动强度较弱, 诱导型启动子虽启动强烈但诱导剂价格昂贵或有毒性(甲醇), 严重制约了启动子在工业中广泛使用。

产甘油假丝酵母 (*Candida glycerinogenes* CGMCC NO. 6830) 是从自然界分离出来的一种耐高渗工业菌株, 能适应不同逆境, 实现在高渗透压 (55% 葡萄糖, W/V) 下快速生长并高产甘油 (137 g/L)<sup>[2]</sup>。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* W303)

HOG1 蛋白是高渗透压甘油信号途径 (High osmolarity glycerol response, HOG 途径) 中的核心分子。DNA 微阵列研究表明, 高渗应激下 HOG1 调节大约 600 个基因表达<sup>[3]</sup>。王晨莹等已证实 *C. glycerinogenes* 中存在丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen activated protein kinase, MAPK) 信号途径中编码 HOG1 的同源基因 *CgHOG1*<sup>[3-4]</sup>。由于酵母的基因表达调控主要发生在转录水平上, 而启动子在转录水平调控中居于关键的地位<sup>[5]</sup>。本研究针对 *C. glycerinogenes* 高产甘油及耐高渗特性, 利用绿色荧光蛋白基因 *gfp* 作为报告基因<sup>[6]</sup>, 考察甘油合成关键节点<sup>[7]</sup>及甘油运输蛋白<sup>[8]</sup>: (1) HMP 途径的限速酶 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 ZWF, (2) EMP 途径催化 6-

**基金项目:**国家“863 计划”(2012AA021201); 国家自然科学基金(31270080); 江苏省自然科学基金(BK20140138, BK20140134)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-510-85918150; E-mail: bzhuge@163.com

**作者简介:**朱佳莉(1990-), 女, 江苏无锡人, 硕士研究生, 主要研究方向为分子生物学。E-mail: krystalzhu@sina.com

**收稿日期:**2015-01-16; **修回日期:**2015-03-11

磷酸葡萄糖和 6-磷酸果糖转化的磷酸葡萄糖异构酶 PGI, (3) 催化 3-磷酸甘油醛和磷酸二羟基丙酮转换的磷酸丙糖异构酶 TPI, (4) 协助 H<sup>+</sup>/甘油的主动运输的 STL 蛋白<sup>[8]</sup>, 表达受渗透压调控情况, 筛选性能优越的渗透压调控启动子, 为工业酵母遗传学研究及转基因改造、应用提供基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株与质粒

本研究中所使用的菌株、质粒如表 1 所示, 引物序列如表 2 所示。

表 1. 文中所用主要菌株及质粒

Table 1. Main strains and plasmids used in this paper

Strain (Pasmid) name	Short name	Sources
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>E. coli</i> JM109	Laboratory
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303	<i>S. cerevisiae</i>	Laboratory
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -pYX212-PCgSTL3-gfp-2A-ble-Tzeocin	SPS3-gfp	This study
<i>Candida glycerinogenes</i> CGMCC NO. 6830	<i>C. glycerinogenes</i>	Laboratory
<i>Candida glycerinogenes</i> -PCgPGI-gfp-2A-ble-Tzeocin	CgPG-gfp	This study
<i>Candida glycerinogenes</i> -PCgTPI-gfp-2A-ble-Tzeocin	CgPT-gfp	This study
<i>Candida glycerinogenes</i> -PCgZWF-gfp-2A-ble-Tzeocin	CgPZ-gfp	This study
<i>Candida glycerinogenes</i> -PCgSTL1-gfp-2A-ble-Tzeocin	CgPS1-gfp	This study
<i>Candida glycerinogenes</i> -PCgSTL2-gfp-2A-ble-Tzeocin	CgPS2-gfp	This study
<i>Candida glycerinogenes</i> -PCgSTL3-gfp-2A-ble-Tzeocin	CgPS3-gfp	This study
pYX212-PCgSTL3-gfp-2A-ble-Tzeocin		This study
pUC-5. 8S rDNA-gfp-2A-ble-Tzeocin		Laboratory
pUC-5. 8S rDNA-PCgPGI-gfp-2A-ble-Tzeocin	PG-gfp	This study
pUC-5. 8S rDNA-PCgTPI-gfp-2A-ble-Tzeocin	PT-gfp	This study
pUC-5. 8S rDNA-PCgZWF-gfp-2A-ble-Tzeocin	PZ-gfp	This study
pUC-5. 8S rDNA-PCgSTL1-gfp-2A-ble-Tzeocin	PS1-gfp	This study
pUC-5. 8S rDNA-PCgSTL2-gfp-2A-ble-Tzeocin	PS2-gfp	This study
pUC-5. 8S rDNA-PCgSTL3-gfp-2A-ble-Tzeocin	PS3-gfp	This study

表 2. 文中所用到的引物

Table 2. Primers used in this paper

Primers	Sequence(5'→3')	Restriction sites
PS1-F	GGGGAATTCCTCCAGTTCCTCAGC	<i>EcoR</i> I
PS1-R	ACGCCGCGGTCTAAATGTTTTGAGAGACTTAT	<i>Sac</i> II
PS2-F	ACGGAATTCAGAGGTTCTAGTCCAGTCCCG	<i>EcoR</i> I
PS2-R	AGGCCGCGGCTTCTATAGGTTATTCTAAAG	<i>Sac</i> II
PS3-F	ATGGAATTCGCAGTTGACAATTTG	<i>EcoR</i> I
PS3-R	TTTCCGCGGTTCCGCCCAATG	<i>Sac</i> II
PG-F	ACACCGCGGCTATCTGTTTTCCCAGACT	<i>Sac</i> II
PG-R	CAGACGCCATGGCTATTTGTAGTGAGTG	<i>Nco</i> I
PT-F	TATCCGCGGTCCTTTTGTGTTT	<i>Sac</i> II
PT-R	CCGCCATGGTGTAAGAGTTATA	<i>Nco</i> I
PZ-F	AATCCGCGGATGGTGAGGTGAGGAG	<i>Sac</i> II
PZ-R	CGCCCATGGATTGTATTTGTAGAC	<i>Nco</i> I
RT-Cggap-F	ACGACCCAAAAGACTGTTCGATG	
RT-Cggap-R	ACGATGGACATACCAGTCAAC	
RT-gfp-F	ACGATCTTCTTCAAGGACG	
RT-gfp-R	ACGTGTGGGACTTGTAGTTG	
RT-18S-F	CATCTGCTCGGTGCTCTT	
RT-18S-R	ACTTGCTGGCTCCGCTCAGT	

## 1.2 重组载体的构建

*C. glycerinogenes* 基因组 DNA<sup>[9]</sup> 为模板, PCR 扩增启动子 PCgSTL1、PCgSTL2、PCgSTL3、PCgPGI、PCgTPI、PCgZWF。构建整合载体 pUC-5.8S rDNA-Promoter-gfp-2A-ble-Tzeocin (简称 pUC-Promoter-gfp-ble)。pUC-5.8S rDNA-PCgSTL3-gfp-2A-ble-Tzeocin 经 EcoR I 和 Hind III 双酶切后连接 pYX212 载体, 构建重组质粒 pYX212-PCgSTL3-gfp-2A-ble-Tzeocin。

## 1.3 电转化构建重组菌

重组质粒 pUC-5.8S rDNA-Promoter-gfp-2A-ble-Tzeocin 线性化后电击转化 *C. glycerinogenes*<sup>[10]</sup>, Zeocin 抗性标记筛选得到重组菌 CgPS1-gfp、CgPS2-gfp、CgPS3-gfp、CgPG-gfp、CgPT-gfp、CgPZ-gfp。

重组质粒 pYX212-PCgSTL3-gfp-ble 电击转化 *S. cerevisiae*, Zeocin 抗性标记筛选得到重组菌 SPS3-gfp。

## 1.4 重组菌 gfp 整合拷贝数检测

整合拷贝数检测方法参见文献[11]。

## 1.5 荧光显微镜检测

YEPD 和高渗培养基 (YEPD + 10%、20%、30% 葡萄糖) 培养重组菌, 收集菌体, 磷酸盐缓冲液洗涤 2 次, 重悬后取适当菌液涂片, 荧光显微镜观察。使用 Image-Pro Plus 软件对荧光图片进行光密度值 (IOD 值) 定量分析。

## 1.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

摇瓶培养重组菌, YEPD 及高渗培养基 (YEPD + 10%、30% 葡萄糖) 处理 20 min。酵母总 RNA 提取方法参见文献[4]。反转录及实时定量 qRT-PCR 方法与条件参见试剂盒说明书。内参基因选用 *C. glycerinogenes* 的 18S rDNA, 以 YEPD 处理下转录水平作为对照值设为 1, 不同浓度渗透压下的转录水平与之对比。

# 2 结果

## 2.1 启动子研究载体构建

克隆甘油合成关键节点磷酸葡萄糖异构酶、磷酸丙糖异构酶、葡萄糖 6-磷酸脱氢酶基因启动子 PCgPGI、PCgTPI、PCgZWF, 以及甘油转运蛋白基因启动子 PCgSTL1、PCgSTL2、PCgSTL3, 构建工业酵母 *C. glycerinogenes* 整合表达载体 pUC-5.8S rDNA-Promoter-gfp-2A-ble-Tzeocin (图 1-A), gfp 为报告基

因, Zeocin 为筛选标记。重组质粒 pYX212-PCgSTL3-2A-ble-Tzeocin (图 1-B) 用于 *S. cerevisiae* 中游离表达。

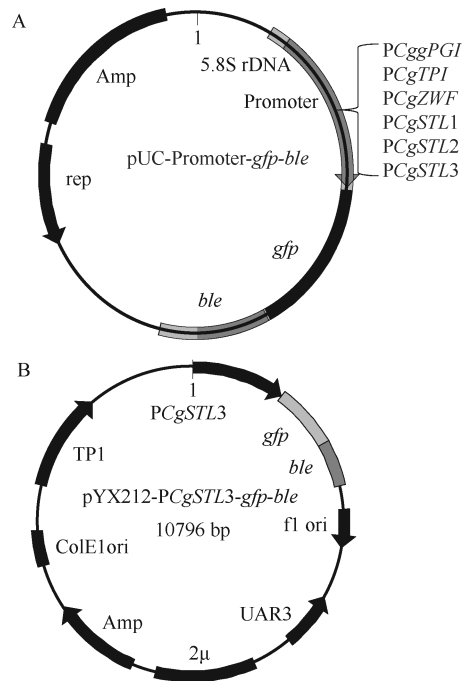


图 1. 重组载体示意图

Figure 1. The recombinant plasmids.

## 2.2 *C. glycerinogenes* 系列备选渗透压调控启动子生物信息学解析

通过软件 NNPP ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)) 在线预测转录起始位点, 搜索上游编码序列发现 TATA 盒及 CAAT 顺式调控元件<sup>[12]</sup> (图 2), 此外, 通过软件分析, PCgPGI 与 PCgTPI 中 TATA box 距转录起始位点仅为 4 bp 和 14 bp, 启动子启动强度大; PCgPGI、PCgTPI、PCgSTL2 中均仅有一个渗透压胁迫应答元件<sup>[13]</sup> (Stress response element, 简称 STRE), PCgSTL1、PCgSTL3、PCgZWF 中则含有多个 STREs; PCgSTL3 中 STRE 含量高达 7 个, 占启动子总碱基的 2.76%, PCgSTL1 中 STRE 含量次之。预测 PCgSTL1、PCgSTL3 为性能优越的渗透压调控启动子。

## 2.3 重组菌 gfp 整合拷贝数检测

根据标准品拷贝数与对应  $C_t$  值得标准曲线  $y_{CgGAP} = -4.0323x + 46.813 (R^2 = 0.9982)$ ,  $y_{gfp} = -3.89653x + 47.986 (R^2 = 0.9989)$ 。计算出不同重组菌中报告基因 gfp、CgGAP 拷贝数, 全基因组测序结果表示 CgGAP 在 *C. glycerinogenes* 为单拷贝, gfp 与

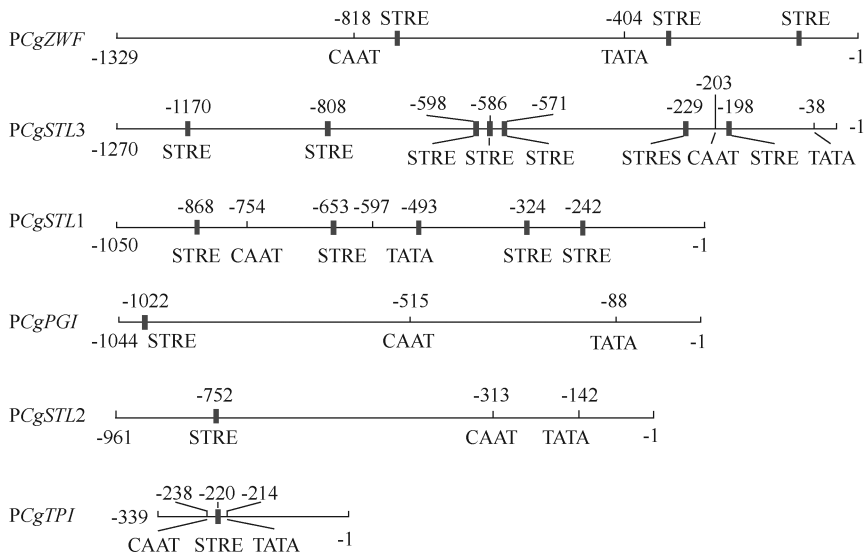
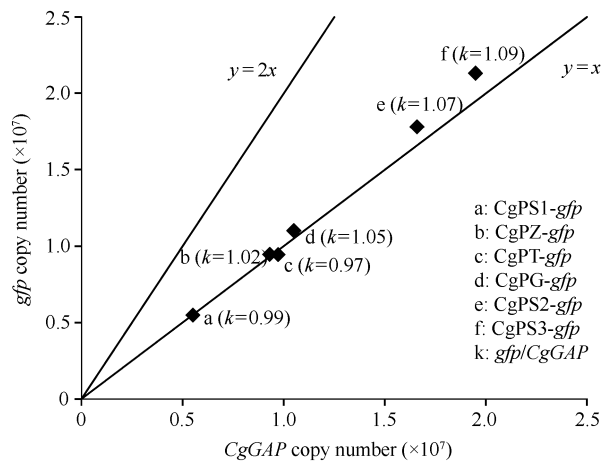


图 2. 启动子结构分析

Figure 2. Analysis of promoters.

图 3. 重组菌 *gfp* 及 *CgGAP* 拷贝数Figure 3. Copies of *CgGAP* and *gfp* in the recombinant strains.

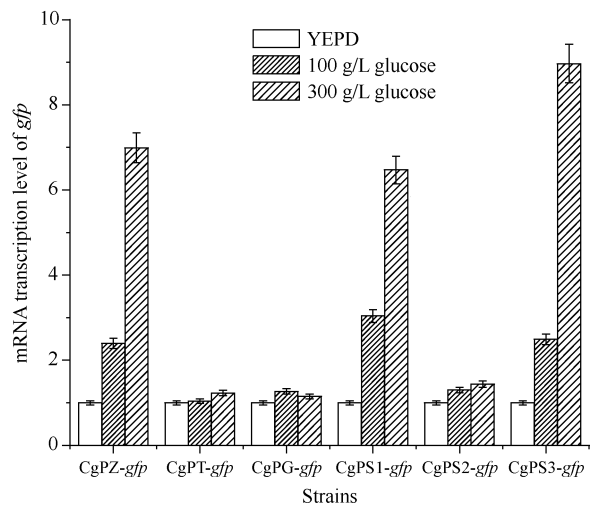
*CgGAP* 拷贝总量的比值即为单细胞内 *gfp* 拷贝数。图 3 结果显示, 各重组菌中整合基因均为单拷贝。

## 2.4 备选启动子胞外渗透压的应答转录

利用 qRT-PCR 考察重组菌中 *gfp* 在不同渗透压下的相对转录水平 (图 4), 发现启动子 *PCgPGI*、*PCgTPI*、*PCgSTL2* 受渗透压调控不显著, 启动子 *PCgZWF*、*PCgSTL1*、*PCgSTL3* 活性随渗透压增加而增强, 30% 葡萄糖浓度下 *PCgSTL3* 活性显著增强且其活性强度明显大于 *PCgZWF*、*PCgSTL1* 测定值。研究表明 *PCgSTL3* 调控外源基因转录水平高、受渗透压调控敏感、启动强烈。

## 2.5 备选启动子的渗透压调控表达性能

荧光检测结果 (图 5-A) 显示, 重组菌中启动子

图 4. 重组菌 *gfp* 相对转录强度测定结果Figure 4. Relative gene transcription levels of *gfp* in the recombinant strains.

有效启动 *gfp* 基因表达; *PCgSTL2* 启动子启动强度弱, *gfp* 表达极弱, 即使在高渗培养基下活性也没有增强; *PCgPGI*、*PCgTPI* 是强启动子, 启动强度受渗透压影响不明显; *PCgZWF*、*PCgSTL1*、*PCgSTL3* 明显受渗透压调控, 启动子活性随渗透压增加而增强。图 5-B 显示, 30% 葡萄糖培养基中 *PCgSTL1* 启动强度较 YEPD 中提高了 8 倍, 但其启动强度仍远低于同条件下 *PCgSTL3*。 *PCgSTL3* 启动子在高渗培养基中启动外源基因表达最强, 且 GFP 蛋白荧光强度成梯度上升。研究结果与 2.2 的预测和 2.3 转录强度测定结果一致。

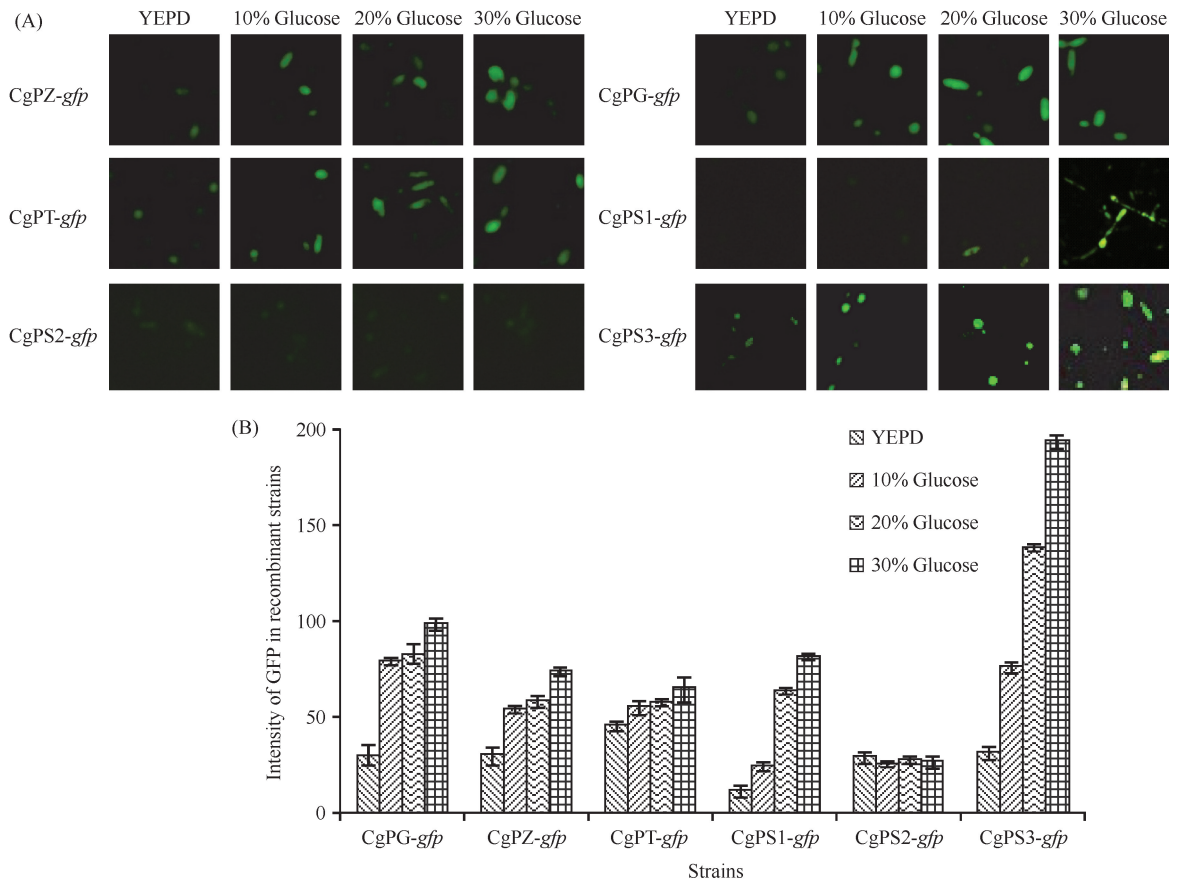


图 5. 重组菌在不同渗透压稳定剂条件下培养后 GFP 蛋白的荧光强度检测 (15 × 40)

Figure 5. Observation and analysis of GFP in recombinant strains cultivated in YEPD supplemented with glucose (15 × 40). A: Observation of GFP in recombinant strains cultivated in YEPD supplemented with glucose; B: Intensity of GFP in recombinant strains cultivated in YEPD supplemented with glucose.

## 2.6 酿酒酵母中 PCgSTL3 启动子表达性能

为进一步考察 PCgSTL3 启动子通用性,以 *S. cerevisiae* 模式菌为宿主细胞,构建重组菌 SPS3-*gfp* 分别用不同浓度葡萄糖诱导培养基培养后,取样观察荧光强度(图 6)。结果显示 PCgSTL3

在 *S. cerevisiae* 同样有效启动外源基因 *gfp* 表达,产生稳定荧光;且随着葡萄糖浓度的提高,启动子 PCgSTL3 活性增强。PCgSTL3 是一种可用于工业 *S. cerevisiae* 菌株改造的渗透压诱导启动子。

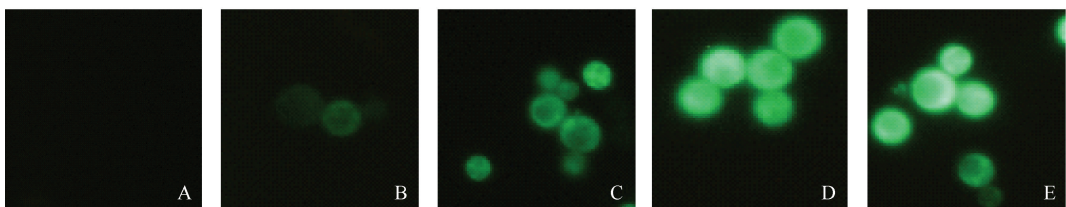


图 6. *S. cerevisiae* 中葡萄糖对 PCgSTL3 启动子诱导作用 (15 × 40)

Figure 6. Induction of glucose to PCgSTL3 in *S. cerevisiae*. (15 × 40). A: *S. cerevisiae*/YEPD, B: SPS3-*gfp*/YEPD, C: SPS3-*gfp*/YEPD + 10% glucose, D: SPS3-*gfp*/YEPD + 20% glucose, E: SPS3-*gfp*/YEPD + 30% glucose.

### 3 讨论

目前,由于浓醪发酵具有高细胞密度、高产物浓度和高生产速率等特点,已成为工业酵母发展目标 and 方向<sup>[14]</sup>。底物耐受性是工业酵母浓醪发酵生产的主要限制性因素,影响菌体生长与产物合成。而工业酵母 *C. glycerinogenes* 能克服 *S. cerevisiae* 生长速度缓慢和发酵密度不高的缺陷,实现耐高渗(55% 葡萄糖以上, W/V), 作为宿主细胞具有广阔市场应用前景<sup>[2]</sup>。

酶表达受渗透压调控主要通过启动子,高渗环境中,渗透压信号经 HOG MAPK 级联系统传递至 HOG1 蛋白。*S. cerevisiae* HOG1 经渗透压激活磷酸化后进入细胞核,可通过转录因子与启动子中 STRE 元件结合,调控基因转录<sup>[15]</sup>。本文对 *C. glycerinogenes* 甘油积累关键基因启动子研究发现:(1) 随葡萄糖浓度增加,含有 STRE 序列启动子的重组菌 CgPS1-*gfp*、CgPS3-*gfp*、CgPZ-*gfp* 中 GFP 蛋白表达量及基因转录水平提高, STRE 元件个数与渗透压对启动子活性调控呈正相关,(2) PCgSTL1、PCgSTL3 的 STRE 元件大多集中于靠近转录起始点的区域,受渗透压调控强烈,推测渗透压对启动子的调控受 STRE 位置的影响;(3) PCgSTL3 启动子在工业模式菌株 *S. cerevisiae* 中的有效性表明该启动子具有一定通用性。此外,根据实验结果得出 PCgSTL3 渗透压启动子具有如下优点:(1) 在低渗透压条件下,启动子活性低或暂时处于失活状态,不影响宿主繁殖;(2) 不需要化学诱导剂,只需加葡萄糖即可激活转录,无污染、无毒副作用。(3) 启动子活性受渗透压调控,能实现基因的可控表达,比已报道的强启动子 *PGPD* 对渗透压响应强度更大<sup>[16]</sup>。PCgSTL3 是一种新型具有工业应用价值的启动子,将为工业酵母改造及转基因研究提供新途径。

### 参考文献

[ 1 ] Jiang HH, Li FG, Lu Y, Rao ZM. Functional analysis of three promoters from yeast in *Pichia pastoris*. *China Biotechnology*, 2011, 31(5): 60-68. (in Chinese)  
蒋慧慧, 李丰功, 陆毅, 饶志明. 三种酵母启动子在毕赤酵母中的功能比较. *中国生物工程杂志*, 2011, 31(5): 60-68.

[ 2 ] Zhuge J, Fang HY, Wang ZX, Chen DZ, Jin HR, Gu HL. Glycerol production by a novel osmotolerant yeast *Candida glycerinogenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 55(6): 686-692.

[ 3 ] Posas F, Chambers JR, Heyman JA, Hoeffler JP, de Nadal E, Ariño J. The transcriptional response of yeast to saline stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(23): 17249-17255.

[ 4 ] 王晨莹. 产甘油假丝酵母高渗甘油应答途径关键基因 *CgHOG1* 的研究. 江南大学硕士学位论文, 2013.

[ 5 ] Keasling JD. Synthetic biology for synthetic chemistry. *ACS Chemical Biology*, 2008, 3(1): 64-76.

[ 6 ] Plautz JD, Day RN, Dailey GM, Welsh SB, Hall JC, Halpain S, Kay SA. Green fluorescent protein and its derivatives as versatile markers for gene expression in living *Drosophila melanogaster*, plant and mammalian cells. *Gene*, 1996, 173(1): 83-87.

[ 7 ] 张永光. 磷酸丙糖异构酶基因(*TPI*)和葡萄糖 6-磷酸脱氢酶基因(*ZWF*)的克隆及功能鉴定. 江南大学博士学位论文, 2007.

[ 8 ] Sauday S. The role of Stl1p in glycerol accumulation in osmotically stressed icewine yeast *Saccharomyces cerevisiae* K1 V1116. Dissertation of Brock University, 2010.

[ 9 ] L ö oke M, Kristjuhan K, Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques*, 2011, 50(5): 325-328.

[ 10 ] Zemanova J, Nosek J, Tomaska L. High-efficiency transformation of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Current Genetics*, 2004, 45(3): 183-186.

[ 11 ] Chen GQ, Lin JT. Use of quantitative polymerase chain reaction for determining copy numbers of transgenes in *Lesquerella fendleri*. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 2010, 5(3): 415-421.

[ 12 ] Ruth C, Glieder A. Perspectives on synthetic promoters for biocatalysis and biotransformation. *ChemBioChem*, 2010, 11(6): 761-765.

[ 13 ] Gibson BR, Lawrence SJ, Leclaire JPR, Powell CD, Smart KA. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiology Reviews*, 2007, 31(5): 535-569.

[ 14 ] Zhang Q, Han DM, Li MT. Research progress of high-concentration mash ethanol fermentation techniques. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2014, 33(3): 724-729. (in Chinese)  
张强, 韩德明, 李明堂. 乙醇浓醪发酵技术研究进展. *化工进展*, 2014, 33(3): 724-729.

- [15] Edmunds JW, Mahadevan LC. MAP kinases as structural adaptors and enzymatic activators in transcription complexes. *Journal of Cell Science*, 2004, 117 (17): 3715-3723.
- [16] Ji H, Lu XY, Wang CY, Zong H, Fang HY, Sun J, Zhuge J, Zhuge B. Identification of a novel *HOG1* homologue from an industrial glycerol producer *Candida glycerinogenes*. *Current Microbiology*, 2014, 69(6): 909-914.

## New osmo-regulatory promoters in the industrial yeast

Jiali Zhu<sup>1,2</sup>, Bin Zhuge<sup>1,2\*</sup>, Huiying Fang<sup>1,2</sup>, Hong Zong<sup>1,2</sup>, Xinyao Lu<sup>1,2</sup>,  
Cheng Zhang<sup>1,2</sup>, Weiji Zhang<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Laboratory of Industrial Microorganisms, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

<sup>2</sup> The Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] The work was aimed at selecting osmo-regulated promoters possessing excellent performance for further research of the industrial yeast *Candida glycerinogenes*. [Methods] Promoters *PCgPGI*, *PCgTPI*, *PCgZWF*, *PCgSTL1*, *PCgSTL2* and *PCgSTL3* were amplified by PCR and their bioinformatics analysis of stress response elements (STREs) were conducted. We constructed integrative plasmids containing 5.8S rDNA, a fluorescence protein gene *gfp* and a promoter *PCgPGI*, *PCgTPI*, *PCgZWF*, *PCgSTL1*, *PCgSTL2* or *PCgSTL3*. The promoters' activities and osmo-regulations were compared according to the results of fluorescence and qRT-PCR. [Results] *PCgSTL3* had more STREs, higher transcription level, larger *gfp* expression and it was more sensitive to stress. [Conclusion] *PCgSTL3* is an excellent induced promoter responding to hyperosmotic stress. Controlled expression of target genes can be realized using *PCgSTL3* in the industrial yeast.

**Keywords:** *Candida glycerinogenes*, green fluorescent protein, key promoters of osmo-adaptation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2012AA021201), by the National Natural Science Foundation of China (31270080) and by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20140138, BK20140134)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85918150; E-mail: bzhuge@163.com

Received: 16 January 2015/Revised: 11 March 2015