



## *Candida amazonensis* FLP/FRT 基因敲除系统的构建及初步验证

高芝, 张梁\*, 李由然, 顾正华, 丁重阳, 石贵阳

江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

**摘要:**【目的】构建一个适用于 *Candida amazonensis* 抗性标记可重复使用的 FLP/FRT 基因敲除系统, 并通过敲除 *C. amazonensis* 的丙酮酸脱羧酶基因(Pyruvate decarboxylase, *PDC*)对该系统进行初步验证。

【方法】以 *gfpm* (绿色荧光蛋白基因)为报告基因, 通过添加相应诱导剂评估 *Spathaspora passalidarum* 来源启动子(*SpXYLp*、*SpMAL6p*、*SpMAL1p*、*SpGAL1p*)和 *Saccharomyces cerevisiae* 来源 *ScGAL1p* 启动子在 *C. amazonensis* 中的诱导调控性能。选择严格诱导型启动子调控 FLP 重组酶的表达, 并在 FLP 表达盒和潮霉素(Hygromycin B)抗性标记基因(*hphm*)两端添加同向重复的 FRT 位点, 以 *PDC* 基因作为靶基因构建敲除盒 PRFgHRP, 转化宿主菌 *C. amazonensis* CBS 12363, 筛选得到阳性转化子后, 通过添加诱导剂, 表达 FLP 重组酶, 实现 FRT 位点间片段切除。【结果】诱导调控实验表明启动子 *SpGAL1p* (受半乳糖诱导)和 *SpMAL1p* (受麦芽糖诱导)是适用于 *C. amazonensis* 的严格诱导型启动子。以 *SpGAL1p* 调控 FLP 基因表达, 构建的敲除盒 PRFgHRP 成功转化宿主菌, 获得阳性转化子 *C. amazonensis* *PDC01*, 通过添加半乳糖诱导, 成功切除基因组中 FLP 表达盒和抗性标记盒, 获得突变株 *C. amazonensis* *PDC02*。

【结论】首次建立了一个适用于 *C. amazonensis* 抗性标记可重复使用的 FLP/FRT 基因敲除系统, 并利用该系统成功敲除了 *C. amazonensis* 内的 *PDC* 基因, 为进一步利用代谢工程改造 *C. amazonensis* 酵母奠定了良好基础。

**关键词:** *Candida amazonensis*, FLP/FRT, 诱导型启动子, 基因敲除

*Candida amazonensis* 是近年来从亚马逊森林中新分离出的一株能够高效利用木糖的酵母, 该酵母能够代谢多种糖类, 同时具有发酵纤维二糖、海藻糖等的能力<sup>[1-2]</sup>。在研究中发现 *C. amazonensis* 具有快速代谢木糖的能力, 并在木糖醇生产方面表现出一定优势。实验室前期研究注意到该酵母分

别在高木糖浓度(350 g/L)、高温 42 °C、pH 2.5 等胁迫条件下仍能有效发酵木糖并积累较高的生物量, 表现出良好的耐高糖、耐高温以及耐酸性能, 有望成为新型木糖发酵模式菌株<sup>[3]</sup>。

然而, 良好的模式菌株, 除自身具有的优良特性外, 还需要基因表达与敲除等基本的分子生

基金项目: 国家星火计划重点项目(2015GA690004); 江苏省杰出青年基金(BK20140002)

\*通信作者。E-mail: zhangl@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-12-24; 修回日期: 2017-02-16; 网络出版日期: 2017-03-14

物学手段的有效支持,用以充分挖掘相关菌株优良信息。目前, *C. amazonensis* 基因水平上的研究尚处于起步阶段,至今还未有全基因组测序的工作展开。此外,由于该酵母属于利用木糖类酵母,使用特殊的基因编码系统,即密码子 CTG 编码的是丝氨酸而非常见的亮氨酸<sup>[4]</sup>,这使得常规表达系统所对应的一些载体元件包括筛选标记、报告基因等难以有效用于该 CTG 类酵母中。实验室前期利用定点突变后(9 个 CTG 突变为亮氨酸密码子 TTG)的潮霉素抗性基因 *hphm* 和绿色荧光蛋白基因 *gfpm* (1 个 CTG 突变为 TTG)以及来自 *Spathaspora passalidarum* 酵母的启动子、终止子等元件成功构建了一个适用于 *C. amazonensis* 的整合型表达载体 PRACTH-*gfpm*<sup>[5]</sup>,然而,有限的筛选标记很难满足人们对于代谢工程育种的要求。因此,对于新型木糖利用酵母 *C. amazonensis*,目前急需一个筛选标记可重复使用的基因敲除系统来对其在菌种改造方面进行更深入的研究。近年来,在 CTG 类酵母中发展起来的 FLP/*FRT* 位点特异性重组系统<sup>[6-10]</sup>,因重组效率和靶向性高、可快速准确地实现抗性消除而受到众多研究者的青睐。

FLP/*FRT* 系统由 FLP 重组酶和 *FRT* 识别位点两部分组成。FLP 是一个 48 kDa 的多肽单体蛋白,其可以介导 34 bp 的 *FRT* 重复序列位点特异性重组,切除同向重复的 2 个 *FRT* 位点间的 DNA 片段和 1 个 *FRT* 位点,保留另一个 *FRT* 位点。早在 1999 年 Staib 等<sup>[7]</sup>就选择在 *Candida albicans* 中将密码子修饰过后(3 个 CTG 突变为 TTG)的 FLP 重组酶基因置于 *SAP2* (与分泌天门冬酰胺蛋白酶有关)的启动子下进行调控,并在 FLP 表达盒和霉酚酸抗性标记基因 (*IMH3<sup>R</sup>*) 两端添加同向重复的 *FRT* 位点,由此构建的敲除系统在 *SAP2* 启动子对 FLP 酶的调控下,实现 2 个 *FRT* 位点之间片段的

切除。同年, Morschhäuser 等<sup>[8]</sup>在抗性标记被 *URA3* 营养缺陷型标记替代的基础上,使用同样的技术在 *C. albicans* 中进行了连续分别 2 轮敲除 *CDR4* 基因和 *MDR1* 基因,获得突变纯合株,成功实现了 FLP/*FRT* 系统在 *C. albicans* 中抗性重复使用和多基因连续敲除方面的应用。此外, Sánchez-Martínez 等<sup>[9]</sup>和 Reuß 等<sup>[10]</sup>选择用一个 *C. albicans* 自身来源的麦芽糖诱导型启动子 *MAL2* (替换前面的 *SAP2*) 构建的 FLP/*FRT* 系统也成功实现了 *C. albicans* 中同向 *FRT* 位点之间序列的删除,其中 FLP 重组酶的表达受麦芽糖的诱导,因此通过培养基中麦芽糖的有无就可以实现对 FLP 表达的调控,从而可实现对 *FRT* 位点间片段切除在时空顺序上的控制。在这基础上,当 Ding & Butler<sup>[11]</sup>将该敲除系统应用于 *Candida parapsilosis* 中时,发现只有将 *CaMAL2* 启动子替换成宿主自身来源的 *CpMAL2* 时,才能有效行使其功能。而让人意外的是, Gácsér 等<sup>[12]</sup>和 Nguyen 等<sup>[13]</sup>在后来相继报道称不需改变 *CaMAL2* 启动子序列,便可在 *C. parapsilosis* 中成功实现由 FLP 重组酶介导的敲除。

基于以上 FLP/*FRT* 系统在 CTG 类酵母中的研究应用,对于能够在 *C. amazonensis* 中适用的 FLP/*FRT* 敲除系统的获得,其关键在于拥有一个能严格调控 FLP 酶表达的启动子,即只有在诱导条件下启动活性明显而非诱导条件下几乎无活性的严格诱导型启动子。目前,已有不少调控型启动子被克隆及功能鉴定,其中研究频率比较高的诱导型启动子包括:来源于酿酒酵母的由半乳糖诱导而受葡萄糖抑制的 *GALI* 和 *GALI0* 启动子<sup>[14]</sup>;经铜离子激活的 *CUP1* 启动子<sup>[15]</sup>;受葡萄糖抑制、麦芽糖诱导的 *MAL62* (酿酒酵母来源)<sup>[16]</sup>和 *MAL2* (白色假丝酵母来源)<sup>[9-10]</sup>;以及受木糖诱导的 *XYL* 启动子<sup>[17]</sup>。此外还有一些像 *MET3* 和 *MET25* 等受

蛋氨酸抑制的调节型启动子<sup>[18]</sup>; 受无机磷酸盐负调控的 *PHO5* 启动子<sup>[19]</sup>等等。这些启动子的诱导或抑制效果都比较明显, 但大多数启动子在非诱导条件下甚至是抑制的条件下没有办法做到完全关闭其启动活性, 而是仍然有一定量的基础表达, 难以达到严格诱导的标准。此外, 不同来源的启动子或者不同的表达宿主因为其遗传背景不同, 可能导致启动子的行使功能有差异。

本文着重对适用于 *C. amazonensis* 的诱导型启动子进行了筛选, 并利用获得的严格诱导型启动子 *SpGAL1p* (受半乳糖诱导)和定点突变后的 *FLP* 重组酶基因构建了抗性标记可重复利用的 *FLP/FRT* 基因敲除系统, 并通过 *C. amazonensis* 内 *PDC* 基因的敲除得到验证。

## 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。

### 1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母提取物 5,

氯化钠 10。用于固体培养基时添加 1.6%的琼脂粉; 筛选转化子时添加终质量浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$  的氨苄青霉素。

YEPD 培养基(g/L): 蛋白胨 20, 酵母提取物 10, 葡萄糖 20。用于固体培养基时添加 1.6%的琼脂粉; 筛选转化子时添加终质量浓度为 900  $\mu\text{g/mL}$  的潮霉素 B。

木糖诱导培养基 YEPX (g/L): 蛋白胨 20, 酵母提取物 10, 木糖 20。用于固体培养基时添加 1.6%的琼脂粉。

麦芽糖诱导培养基 YEPM (g/L): 蛋白胨 20, 酵母提取物 10, 麦芽糖 20。用于固体培养基时添加 1.6%的琼脂粉。

半乳糖诱导培养基 YEPG (g/L): 蛋白胨 20, 酵母提取物 10, 半乳糖 20。用于固体培养基时添加 1.6%的琼脂粉。

### 1.3 诱导型启动子的筛选

**1.3.1 重组载体的构建:** 采用启动子在线测评软件, 对 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)提供的 *S. passalidarum* NRRL Y-27907 基因组序列 (GenBank: NZ\_AEIK00000000)中的木糖还原酶、 $\alpha$ -麦芽糖苷酶 1、 $\alpha$ -麦芽糖苷酶 6、以及  $\beta$ -半乳糖

表 1. 文中所用主要菌株及质粒

Table 1. Main strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid names	Short names	Sources
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>E. coli</i> JM109	Laboratory
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303-1A	<i>S. cerevisiae</i>	Laboratory
<i>Spathaspora passalidarum</i> NRRL Y-27907	<i>S. passalidarum</i>	Louisiana State University
<i>Candida amazonensis</i> CBS 12363	<i>C. amazonensis</i>	CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures)
pMD19-T simple vector	pMD19-T simple	TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.
PRACTH- <i>gfp</i> m	<i>SpADHp-gfp</i> m	Laboratory
PRXCTH- <i>gfp</i> m	<i>SpXYLp-gfp</i> m	This study
PRM <sub>6</sub> CTH- <i>gfp</i> m	<i>SpMAL6p-gfp</i> m	This study
PRM <sub>1</sub> CTH- <i>gfp</i> m	<i>SpMAL1p-gfp</i> m	This study
PRG <sub>1</sub> CTH- <i>gfp</i> m	<i>SpGAL1p-gfp</i> m	This study
PRG <sub>c1</sub> CTH- <i>gfp</i> m	<i>ScGAL1p-gfp</i> m	This study
PRG <sub>1</sub> CTH- <i>caFLP</i>	<i>SpGAL1p-caFLP</i>	This study
Ts-PDCL-FRT- <i>SpGAL1p-caFLP-hphm-FRT-PDCR</i>	Ts-PRFgHRP	This study

表 2. 文中所用到的引物  
Table 2. Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Restriction sites
<i>SpXYLp</i> -F	GCCGGA <u>AGATCT</u> GTGACATAGTAACTATGGC	<i>Bgl</i> II
<i>SpXYLp</i> -R	ACGCGT <u>CGACTT</u> TATTGTATTGTG	<i>Sal</i> I
<i>SpMAL6p</i> -F	GCCGGA <u>AGATCT</u> GAATATCAATACGTTTTAGATCACCG	<i>Bgl</i> II
<i>SpMAL6p</i> -R	GCCGCACGCGT <u>CGACAT</u> TAAAAAGTATTTATGATTTG	<i>Sal</i> I
<i>SpMAL1p</i> -F	ATCGCGGAT <u>CTCT</u> GTGGGTATTTTTACAGCAGGATG	<i>Bam</i> H I
<i>SpMAL1p</i> -R	CCGCACGCGT <u>CGACAT</u> TCAACTGTTTGTTAATATATG	<i>Sal</i> I
<i>SpGAL1p</i> -F	TGGA <u>AGATCT</u> AGGGGTTGGAAGAAGAAAAATCGG	<i>Bgl</i> II
<i>SpGAL1p</i> -R	ACGCGT <u>CGACAG</u> TAAGAATTTGATAAACTTTGCG	<i>Sal</i> I
<i>ScGAL1p</i> -F	CGGA <u>AGATCT</u> GGAACGTTGTATTGTTGCAT	<i>Bgl</i> II
<i>ScGAL1p</i> -R	ACGCGT <u>CGACTA</u> TAGTTTTTCTCCTTGACGTT	<i>Sal</i> I
<i>FLP</i> -F	GACGCGT <u>CGACAT</u> GCCACAATTTGGTATATTATGT	<i>Sal</i> I
<i>FLP</i> -R	CATAAGAAT <u>GCGGCCG</u> CTTATATGCGTCTATTTATGTAGG	<i>Not</i> I
<i>FLP</i> -1	GTTTCGATATTGTCAATAAATCACTC	
<i>FLP</i> -2	TCAACGAATTGCTTATGATAG	
<i>FLP</i> -3	GAAGCCTCATTAAGAAATTG	
<i>FLP</i> -4	CAAAATTGTTGCTTTTTGCG	
<i>FLP</i> -5	GAGTAATAATCCAGTGTT	
<i>FLP</i> -6	CCAAATACTTATTTGGAC	
<i>PDC</i> -F	ATGTCGGAAATTTCTTTAGGTAGAT	
<i>PDC</i> -R	CATCCATTCTTGGCAACATAACTTC	
<i>PDC</i> -1	GCAAA <u>AGGCCT</u> GTTCGGAAATTTCTTTAGGTAGAT	<i>Stu</i> I
<i>PDC</i> -2	GCACCAACAGAGAAACCAATCGGGGT <u>ACCCCG</u> TATGATGTAATAATAATTG	<i>Kpn</i> I
<i>PDC</i> -3	CAATTATTATTACATCATACCGGGGT <u>ACCCCG</u> ATTGGTTTCTCTGTTGGTGC	<i>Kpn</i> I
<i>PDC</i> -4	AAA <u>AGGCCT</u> CATCCATTCTTGGCAACATAACTTC	<i>Stu</i> I
<i>FRT</i> -1	CGGGGT <u>ACCGAAG</u> TTTCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACCTCAGGGGTTGGAA GAAGAAAAAATCGG	<i>Kpn</i> I
<i>FRT</i> -2	ATAGGGGT <u>ACCGAAG</u> TTTCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACCTCAACTCCTTC CTTTTCGGTTAG	<i>Kpn</i> I

The underlined are restriction enzyme cutting sites.

苷酶基因的 ORF 上游核苷酸序列进行在线预测，并设计引物分别扩增其上游约 1200 bp 左右的序列以保证启动子的启动活性。以 *S. passalidarum* 基因组 DNA 为模板，分别用引物 *SpXYLp*-F/*SpXYLp*-R、*SpMAL6p*-F/*SpMAL6p*-R、*SpMAL1p*-F/*SpMAL1p*-R 和 *SpGAL1p*-F/*SpGAL1p*-R PCR 扩增木糖还原酶基因启动子 *SpXYLp*、 $\alpha$ -麦芽糖苷酶基因启动子 *SpMAL6p*、*SpMAL1p*、 $\beta$ -半乳糖苷酶基因启动子 *SpGAL1p*；以 *S. cerevisiae* 基因组 DNA 为模板，

用引物 *ScGAL1p*-F/*ScGAL1p*-R PCR 扩增其  $\beta$ -半乳糖苷酶基因启动子 *ScGAL1p*。将以上 5 个启动子序列分别克隆至 pMD19-T simple 载体。以实验室前期构建的整合型质粒 PRACTH-*gfpm* (简称为 *SpADHp-gfpm*) 为载体<sup>[5]</sup>，经 *Bgl* II 和 *Sal* I 双酶切后回收大片段并分别与以上克隆至 pMD19-T simple 载体经相同酶切的 5 个启动子序列连接，获得 5 个在不同启动子下调控绿色荧光蛋白基因表达的重组质粒 Promoter-*gfpm*，分别命名为

*SpXYLp-gfp*m、*SpMAL6p-gfp*m、*SpMAL1p-gfp*m、*SpGAL1p-gfp*m、*ScGAL1p-gfp*m。

**1.3.2 醋酸锂转化构建重组菌及转化子验证：**重组质粒 *Promoter-gfp*m 经 *Stu* I 线性化后醋酸锂转化 *C. amazonensis*，醋酸锂转化法参考文献[20]。涂布潮霉素(Hygromycin B) 900 平板筛选得到转化子。在通过更高浓度的 Hyg 抗性平板进行转化子筛选后，提取各转化子基因组进行 PCR 验证，最终获取阳性转化子。

**1.3.3 荧光显微镜检测：**将重组菌 *C. amazonensis/Promoter-gfp*m 接种于 YEPD 培养基，30 °C、200 r/min 过夜培养 18 h 获得种子液后，收集菌体，用生理盐水洗涤 2 次，重悬后分别转接至新的 YEPD 和其启动子对应的诱导培养基中，其中重组菌 *C. amazonensis/SpXYLp-gfp*m 转接至木糖诱导培养基 YEPX；*C. amazonensis/SpMAL6p-gfp*m 和 *C. amazonensis/SpMAL1p-gfp*m 转接至麦芽糖诱导培养基 YEPM；*C. amazonensis/SpGAL1p-gfp*m 和 *C. amazonensis/ScGAL1p-gfp*m 转接至半乳糖诱导培养基 YEPG。每次转接后的初始  $OD_{600}$  保持在 0.5 左右。于 30 °C、200 r/min 培养 18–24 h 后，收集菌体，用生理盐水洗涤 2 次，重悬后吸取少量菌液置于载玻片上，在荧光显微镜下观察菌体细胞并拍照，激发波长  $\lambda=485$  nm。

**1.3.4 荧光分光光度计定量：**分别于 YEPD 和诱导培养基(YEPX/YEPM/YEPG)中收集重组菌 *C. amazonensis/Promoter-gfp*m，用生理盐水洗涤 2 次，重悬后稀释适当倍数至菌液  $OD_{600}$  保持在 0.5 左右。利用日立荧光分光光度计 F-7000 在 480 nm 激发光下激发，测定各重组菌液在 510 nm 处的发射光强度。

#### 1.4 *FLP* 重组酶基因定点突变

以 *S. cerevisiae* 为模板，用引物 *FLP-F* 和

*FLP-R* PCR 扩增得到 *FLP* 基因序列，连接 pMD19-T simple 载体，转化感受态 *E. coli* JM109，获得重组子 *Ts-FLP*。以 *Ts-FLP* 为模板，分别使用引物 *FLP-1* 和 *FLP-2*、*FLP-3* 和 *FLP-4*、*FLP-5* 和 *FLP-6* 经过 3 轮 PCR 定点突变，定点突变参照 Quickchange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit 说明书进行。(1) PCR 反应体系 (25  $\mu$ L)：5  $\mu$ L 5 $\times$ PrimeSTAR Buffer，2  $\mu$ L dNTPs Mixture (2.5 mmol/L each)，0.3  $\mu$ L 各引物(25  $\mu$ mol/L)，0.5  $\mu$ L 模板(10 pg–1 ng)，0.3  $\mu$ L PrimeSTAR Polymerase (2.5 U/ $\mu$ L)，加双蒸水至 25  $\mu$ L；(2) PCR 扩增条件：95 °C 2 min；95 °C 30 s，55 °C 2 min，65 °C 2 min，65 °C 5 min，30 个循环；(3) 将 PCR 产物冰浴 2 min，加入内切酶 *Dpn* I 于 37 °C 消化 30 min；(4) 将消化后的 PCR 产物于 65 °C 反应 10 min 以失活内切酶 *Dpn* I，之后加入 *E. coli* JM109 感受态中进行转化；(5) 随机挑取若干转化子提取质粒测序，比对测序结果，挑选阳性突变子。

#### 1.5 *caPDC* 基因的克隆

*C. amazonensis* 为新近发现的木糖利用酵母，目前还没有经过全基因组测序。通过比对 *S. passalidarum* 和其他多个酵母的 *PDC* 基因序列，发现多个 *PDC* 基因的 ATG 密码子后的一小段序列以及距离终止密码子几十 bp 处的一段序列普遍具有较高的保守性，从而设计上下游引物 *PDC-F* 和 *PDC-R*，以 *C. amazonensis* 基因组为模板，PCR 反应获得一段 1.7 kb 左右的 *PDC* 基因产物 (*caPDC*)，插入 pMD19-T simple 载体中，获得重组质粒 *Ts-caPDC* 后，转化 *E. coli* JM109，挑取阳性转化子，送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序，由测序结果获得 *caPDC* 的基因序列。

## 1.6 PDC 基因敲除突变盒的构建

以 Ts-*caPDC* 质粒为模板, 用引物 *PDC-1/PDC-2* 和 *PDC-3/PDC-4* 分别 PCR 扩增 *caPDC* 基因 5'端 360 bp 的上游序列 *caPDC-L* 和 3'端 390 bp 的下游序列 *caPDC-R*, 用重叠延伸 PCR 法将上下游序列拼接获得 *PDC* 基因同源重组片段 *PDCL-R*。 *PDCL-R* 连接 pMD19-T simple 载体, 转化感受态 *E. coli* JM109, 用含氨苄青霉素的 LB 固体培养基筛选阳性克隆, 命名为 Ts-*PDCLR*。提取质粒 Ts-*PDCLR*, 用 *Kpn* I 酶切, 去磷酸化后备用。将质粒 *SpGAL1p-gfpM* 和 Ts-*caFLP* 分别用 *Sal* I 和 *Not* I 进行双酶切, 酶切产物经 T4 DNA 连接酶过夜连接, 转化感受态 *E. coli* JM109, 获得的阳性克隆重组子命名为 *SpGAL1p-caFLP*。以该重组质粒为模板, 用引物 *FRT-1/FRT-2* 扩增带有 *FRT* 位点的 *SpGAL1p-caFLP-hphM* 片段, 用 *Kpn* I 酶切并纯化后, 与前面备用的 Ts-*PDCLR* 经 T4 DNA 连接酶连接, 转化感受态 *E. coli* JM109, 用含氨苄青霉素的 LB 固体培养基筛选、鉴定并保藏, 命名为 Ts-*PDCL-FRT-SpGAL1p-caFLP-hphM-FRT-PDCR* (简称为 Ts-PRFgHRP), 该同源重组载体通过 *Stu* I 酶切后割胶回收同源重组片段 *PDCL-FRT-SpGAL1p-caFLP-hphM-FRT-PDCR* (PRFgHRP) 备用。

## 1.7 PDC 基因敲除与潮霉素抗性标记基因(*hphM*)的重复利用

将敲除盒 PRFgHRP 醋酸锂转化 *C. amazonensis*, 涂布 Hyg 900 抗性平板, 筛选得到阳性转化子后于 YEPG 固体培养基中分离纯化, 30 °C 培养 2-3 d 后, 将长出的单菌落分别划线于普通的 YEPD 平板和 Hyg 900 抗性平板中培养, 挑取 YEPD 平板上生长而抗性板上不生长的单菌落, 提取其染色体, 用引物 *PDC-1/PDC-4* 和 *FLP-F/FLP-R* 进行 PCR 验证, 验证正确后经测序获得进一步确认。

## 1.8 PDC 比酶活测定

*C. amazonensis* 细胞破碎及 PDC 酶活的测定参考文献[21], 蛋白浓度用考马斯亮蓝染色法测定。

## 2 结果和分析

### 2.1 诱导型启动子的筛选

**2.1.1 启动子研究载体构建:** 分别克隆 *S. passalidarum* 来源的木糖还原酶启动子 *SpXYLp*、 $\alpha$ -麦芽糖苷酶启动子 *SpMAL6p* 和 *SpMAL1p*、 $\beta$ -半乳糖苷酶启动子 *SpGAL1p*, 以及 *S. cerevisiae* 来源的  $\beta$ -半乳糖苷酶启动子 *ScGAL1p*, 分别替换掉原有质粒 PRACTH-*gfpM* 中的乙醇脱氢酶基因启动子 *SpADH1p*, 构建得到 5 个不同启动子诱导的表达质粒 Promoter-*gfpM*, 分别简称为 *SpXYLp-gfpM*、*SpMAL6p-gfpM*、*SpMAL1p-gfpM*、*SpGAL1p-gfpM*、*ScGAL1p-gfpM* (图 1)。其中 *gfpM* 为报告基因, *hphM* 为 Hygromycin B 抗性标记基因。

**2.1.2 备选启动子的诱导调控表达性能:** 分别于 YEPD 和诱导培养基(YEPX/YEPM/YEPG)中收集重组菌 *C. amazonensis*/Promoter-*gfpM*, 用生理盐水洗涤 2 次后, 取样用荧光显微镜观察, 荧光检测结果显示(图 2), 重组菌 *C. amazonensis*/

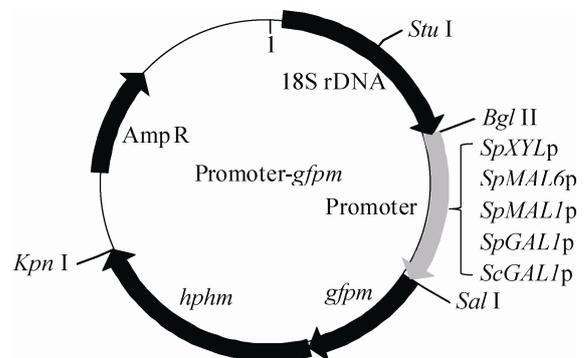


图 1. 不同诱导型质粒 Promoter-*gfpM* 示意图

Figure 1. The plasmids of Promoter-*gfpM* with different inducible promoters.

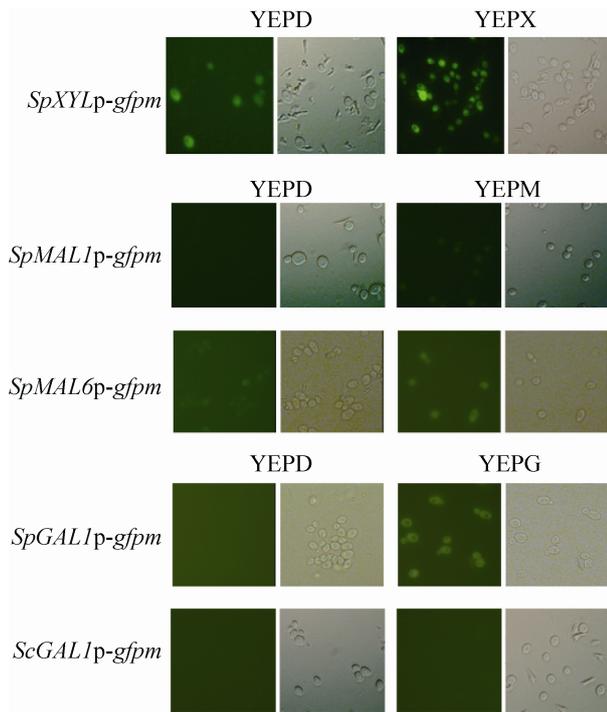


图 2. 荧光显微镜检测非诱导和诱导培养基中重组菌内绿色荧光蛋白

Figure 2. Observation of GFP in recombinant strains by fluorescence microscopy under the conditions with or without induction. YEPA: non-inducing medium; YEPI: xylose-containing medium for *C. amazonensis*/*SpXYLp-gfpM*; YEPM: maltose-containing medium for *C. amazonensis*/*SpMAL1p-gfpM* and *C. amazonensis*/*SpMAL6p-gfpM*; YEPI: galactose-containing medium for *C. amazonensis*/*SpGAL1p-gfpM* and *C. amazonensis*/*ScGAL1p-gfpM*.

*SpXYLp-gfpM* 和 *C. amazonensis*/*SpMAL6p-gfpM* 在 YEPA 和诱导培养基(分别是 YEPI 和 YEPM)中均实现了绿色荧光蛋白的有效表达, 且诱导培养基均较 YEPA 的荧光强度大, 说明 *S. passalidarum* 来源的木糖还原酶基因启动子 *SpXYL1p* 和  $\alpha$ -麦芽糖苷酶启动子 *SpMAL6p* 在 *C. amazonensis* 中均是有效的, 但 *SpXYL1p* 和 *SpMAL6p* 均非严格诱导型启动子, 在以葡萄糖为底物的培养环境中仍有一定量的基础表达; 重组菌 *C. amazonensis*/*ScGAL1p-gfpM* 无

论在 YEPA 培养基还是 YEPI 诱导培养基中均未观察到绿色荧光蛋白的产生, 可见 *S. cerevisiae* 来源的  $\beta$ -半乳糖苷酶启动子 *ScGAL1p* 在 *C. amazonensis* 中并不能有效行使其功能; 重组菌 *C. amazonensis*/*SpMAL1p-gfpM* 和 *C. amazonensis*/*SpGAL1p-gfpM* 在 YEPA 中未观察到绿色荧光蛋白, 但分别在 YEPM 和 YEPI 中明显实现了绿色荧光蛋白 GFP 的表达, 启动子受底物诱导显著, 是严格的诱导型启动子, 其中重组菌 *C. amazonensis*/*SpMAL1p-gfpM* 在 YEPM 下荧光强度较弱, 不及重组菌 *C. amazonensis*/*SpGAL1p-gfpM* 在 YEPI 下的荧光强度。因此, 相较于 *SpMAL1p*, 严格诱导型启动子 *SpGAL1p* 更适合用于调控 *C. amazonensis* 中异源蛋白的表达。

在荧光定量实验中, 分析比较各重组菌在不同培养条件下的 GFP 荧光强度。如图 3 所示, 尽管诱导条件下重组菌 *C. amazonensis*/*SpXYL1p-gfpM* 和 *C. amazonensis*/*SpMAL6p-gfpM* 的 GFP 荧光强度均远远高于其在 YEPA 的荧光强度, 但这 2 株重组菌

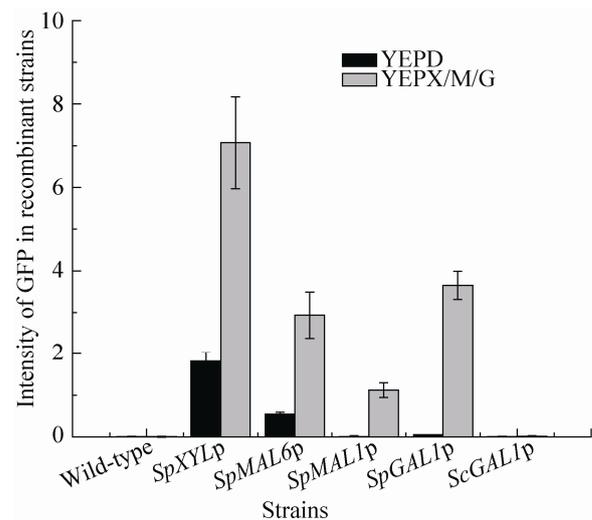


图 3. 重组菌内 GFP 荧光强度定量测定

Figure 3. Quantification of GFP fluorescence intensity in recombinant strains.

在 YEPD 中仍然有较高的 GFP 荧光强度,说明二者在未诱导条件下仍然具有一定量的基础表达,并非严格调控型启动子。重组菌 *C. amazonensis/ScGAL1p-gfp* 无论在 YEPD 还是诱导培养基中均没有检测到高于野生型的荧光强度,进一步确认了 *ScGAL1p* 启动子在 *C. amazonensis* 中的不适用性;重组菌 *C. amazonensis/SpMAL1p-gfp* 和 *C. amazonensis/SpGAL1p-gfp* 在 YEPD 中几乎检测不到 GFP 荧光强度,与野生菌 *C. amazonensis* 一致,而在诱导条件下二者的 GFP 荧光强度明显,尤其是 *C. amazonensis/SpGAL1p-gfp*,说明 *SpMAL1p* 和 *SpGAL1p* 启动子受底物诱导显著,且在葡萄糖条件下几乎无启动活性,是严格的诱导型启动子,

这与前面荧光显微镜的观察结果完全一致。后续基因敲除系统的构建以选用半乳糖诱导型启动子 *SpGAL1p* 为例。

## 2.2 FLP 重组酶基因定点突变

*FLP* 重组酶基因全长 1272 bp,分别在第 202、265、631 bp 处含有 CTG (Ser)密码子,将其突变为 TTG (Leu)。根据测序结果挑选正确的转化子,突变后的重组酶命名为 *caFLP*,其 CDS 序列如图 4 所示。

## 2.3 caPDC 基因的克隆

以 *C. amazonensis* 基因组为模板,设计引物扩增获得一段 1.7 kb 的 PCR 产物(图 5)。对其测序,将该序列置于 NCBI 数据库中进行比对,结果发

```

1      ATGCCACAAT TTGGTATATT ATGTAAAACA CCACCTAAGG TGCTTGTTTCG TCAGTTTGTG
61     GAAAGGTTTG AAAGACCTTC AGGTGAGAAA ATAGCATTAT GTGCTGCTGA ACTAACCTAT
121    TTATGTTGGA TGATTACACA TAACGGAACA GCAATCAAGA GAGCCACATT CATGAGCTAT
181    AATACTATCA TAAGCAATTC GTTGAGTTTC GATATTGTCA ATAAATCACT CCAGTTTAAA
241    TACAAGACGC AAAAAGCAAC AATTTTTGAA GCCTCATTA AGAAATTGAT TCCTGCTTGG
301    GAATTTACAA TTATTCCTTA CTATGGACAA AAACATCAAT CTGATATCAC TGATATTGTA
361    AGTAGTTTGC AATTACAGTT CGAATCATCG GAAGAAGCAG ATAAGGGAAA TAGCCACAGT
421    AAAAAAATGC TTAAAGCACT TCTAAGTGAG GGTGAAAGCA TCTGGGAGAT CACTGAGAAA
481    ATACTAAATT CGTTTGAGTA TACTTCGAGA TTTACAAAAA CAAAACTTT ATACCAATTC
541    CTCTTCCTAG CTACTTTCAT CAATTGTGGA AGATTGAGCG ATATTAAGAA CGTTGATCCG
601    AAATCATTTA AATTAGTCCA AAATAAGTAT TTGGGAGTAA TAATCCAGTG TTTAGTGACA
661    GAGACAAAGA CAAGCGTTAG TAGGCACATA TACTTCTTTA GCGCAAGGGG TAGGATCGAT
721    CCACTTGATAT ATTTGGATGA ATTTTGGAGG AATTCTGAAC CAGTCCTAAA ACGAGTAAAT
781    AGGACCGGCA ATTCTTCAAG CAATAAACAG GAATACCAAT TATTAAGAAG TAACTTAGTC
841    AGATCGTACA ATAAAGCTTT GAAGAAAAAT GCGCCTTATT CAATCTTTGC TATAAAAAAT
901    GGCCCAAAAT CTCACATTGG AAGACATTTG ATGACCTCAT TTCTTCAAT GAAGGGCCTA
961    ACGGAGTTGA CTAATGTTGT GGGAAATTGG AGCGATAAGC GTGCTTCTGC CGTGGCCAGG
1021   ACAACGTATA CTCATCAGAT AACAGCAATA CCTGATCACT ACTTCGCACT AGTTTCTCGG
1081   TACTATGCAT ATGATCCAAT ATCAAAGGAA ATGATAGCAT TGAAGGATGA GACTAATCCA
1141   ATTGAGGAGT GGCAGCATAT AGAACAGCTA AAGGGTAGTG CTGAAGGAAG CATAACGATC
1201   CCCGCATGGA ATGGGATAAT ATCACAGGAG GTACTAGACT ACCTTTCATC CTACATAAAT
1261   AGACGCATAT AA

```

图 4. 定点突变后的 *FLP* 基因 CDS 序列

Figure 4. The CDS sequence of *FLP* gene after site-specific mutagenesis. TTG: the mutated codon.

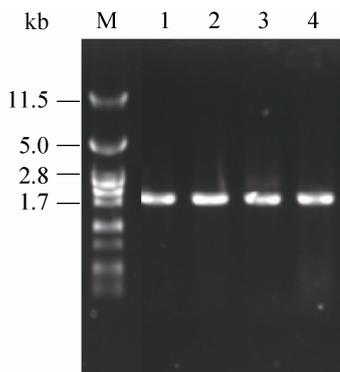


图 5. *caPDC* 基因的 PCR 产物

Figure 5. PCR products of the *PDC* gene in *C. amazonensis*. M:  $\lambda$  DNA/*Pst* I marker; lane 1–4: The PCR products of the *PDC* gene in *C. amazonensis*.

现 *caPDC* 与 *S. passalidarum* 和 *Candida dubliniensis* 等酵母的丙酮酸脱羧酶基因序列的一致性达到 80%，进一步证明该克隆产物即为 *C. amazonensis* 的丙酮酸脱羧酶基因。

#### 2.4 *PDC* 基因敲除突变盒的构建

构建同源重组质粒 Ts-PRFgHRP (图 6), 经 *Kpn* I 单酶切后, 凝胶电泳显示存在 3.4 kb 和 4.6 kb 2 条 DNA 带, 分别与 *PDCL-Ts-PDCR* 片段和 *FRT-SpGAL1p-FLP-hphm-FRT* 片段大小一致(图 7);

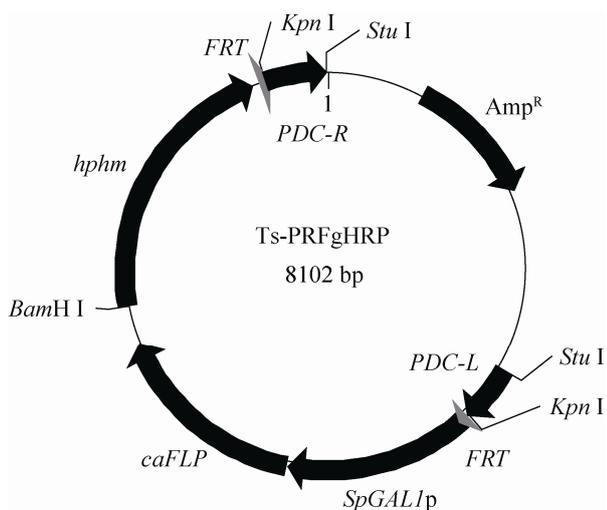


图 6. 重组质粒 Ts-PRFgHRP 示意图

Figure 6. The recombinant plasmid of Ts-PRFgHRP.

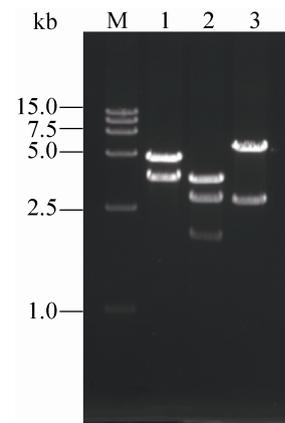


图 7. 重组质粒 Ts-PRFgHRP 的酶切验证

Figure 7. The enzymatic digestion of Ts-PRFgHRP. M: DL 15000 DNA marker; lane 1: recombinant plasmid Ts-PRFgHRP digested by *Kpn* I; lane 2: recombinant plasmid Ts-PRFgHRP digested by *Kpn* I and *Bam*H I; lane 3: recombinant plasmid Ts-PRFgHRP digested by *Stu* I.

对重组质粒 Ts-PRFgHRP 进一步进行 *Kpn* I 和 *Bam*H I 双酶切后, 得到 3.4 kb、2.8 kb 和 1.8 kb 的 3 条 DNA 带, 与预期的 *PDCL-Ts-PDCR*、*FRT-SpGAL1p-caFLP* 和 *hphm-FRT* 片段大小一致(图 7)。结果表明基因敲除盒 PRFgHRP 构建成功。

#### 2.5 *PDC* 基因的敲除与 *hphm* 抗性标记基因的回收

将基因敲除盒 PRFgHRP (DNA 结构示意图如图 8-A 所示)转化入野生型酵母 *C. amazonensis* 中, 涂布 Hyg 900 抗性平板。将长出的单菌落转接培养, 提取其染色体 DNA 作为模板进行 PCR 验证, 结果如图 9 所示。用引物 *PDC-1/PDC-4* 扩增, 获得 5.4 kb 的 DNA 条带, 测序发现这个条带与 PRFgHRP 片段序列完全一致。而原始菌株 *C. amazonensis* 的 PCR 结果为 1.7 kb 的 *PDC* 基因条带, 此外进一步用引物 *FLP-F/FLP-R* 进行 PCR 验证, 获得 1.3 kb 左右的 *FLP* 基因条带。因此, 可以确定基因敲除盒 PRFgHRP 已正确整合到染色

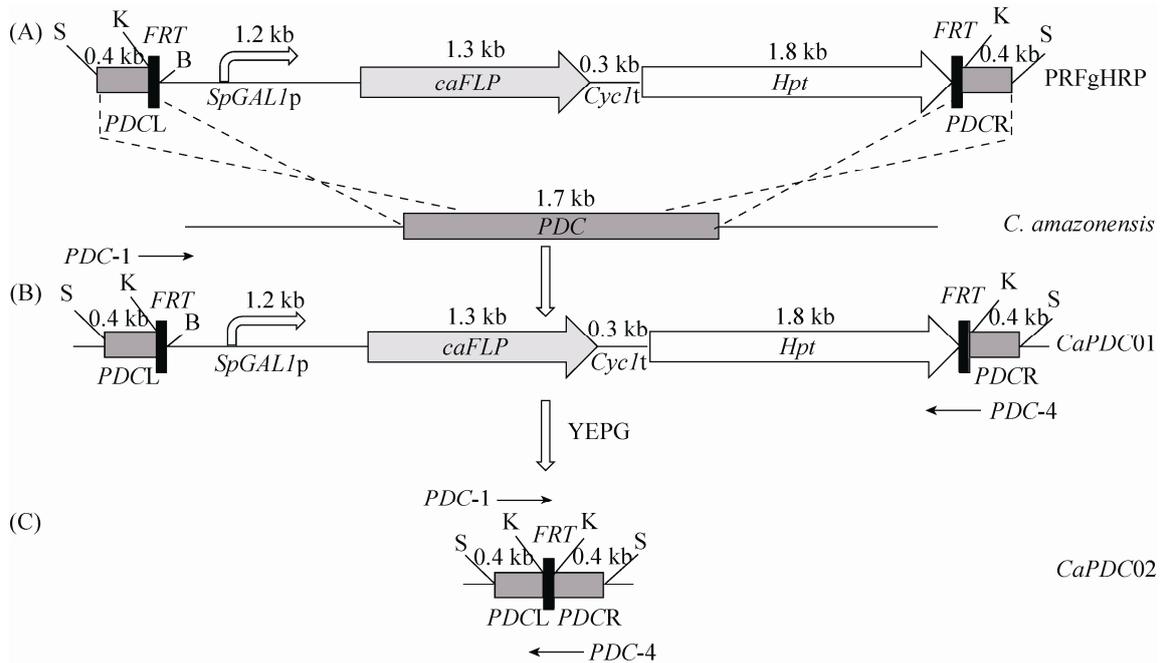


图 8. *PDC* 基因敲除流程图

Figure 8. Disruption of the *PDC* gene in *C. amazonensis*. CaPDC01: *C. amazonensis PDC01*; CaPDC02: *C. amazonensis PDC02*; S: restriction site of *Stu* I; K: restriction site of *Kpn* I; B: restriction site of *Bam*H I.

体的 *PDC* 基因位点, 其整合位点基因结构如图 8-B 所示, 该转化子命名为 *C. amazonensis PDC01*。为将 *PDC* 突变株内的 *hphm* 抗性标记基因删除, 将培养后的 *C. amazonensis PDC01* 划线于含半乳糖的 YEPG 平板中进行分离纯化, 培养数代后, 将长出的单菌落分别接种于普通的 YEPD 平板和含 Hyg 900 的抗性平板中培养, 抗性回收株因 *hphm* 标记基因被切除而无法在抗性平板上生长 (图 10), 因此, 挑取 YEPD 平板上生长而抗性板上不生长的单菌落, 提取其染色体, 用引物 *FLP-F/FLP-R* 进行 PCR 扩增, 结果发现没有条带出现 (图 9); 用引物 *PDC-1/PDC-4* 进行 PCR 扩增获得一段 0.8 kb 左右的条带 (图 9), 经 DNA 测序分析表明其为 *PDCL-FRT-PDCR* 片段序列, 说明插入 *PDC* 基因位点的 *caFLP* 重组酶和抗性标记基因 *hphm* 已成功得到切除。对该抗性回收突变株命名为 *C. amazonensis PDC02*。

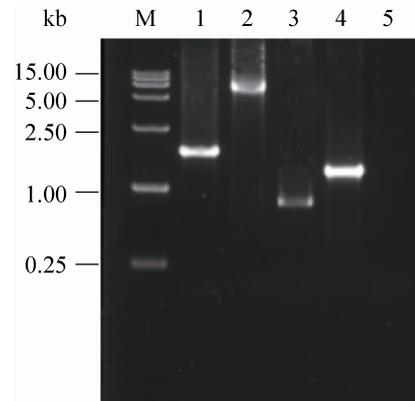


图 9. *PDC* 突变株 *C. amazonensis PDC01* 和 *C. amazonensis PDC02* 的 PCR 验证

Figure 9. Identification of the *PDC* mutants by PCR. M: DL 15000 DNA marker; lane 1: PCR product using primers *PDC-1/PDC-4* of wild type; lane 2: PCR product using primers *PDC-1/PDC-4* of *C. amazonensis PDC01*; lane 3: PCR product using primers *PDC-1/PDC-4* of *C. amazonensis PDC02*; lane 4: PCR product using primers *FLP-F/FLP-R* of *C. amazonensis PDC01*; lane 5: PCR product using primers *FLP-F/FLP-R* of *C. amazonensis PDC02*.

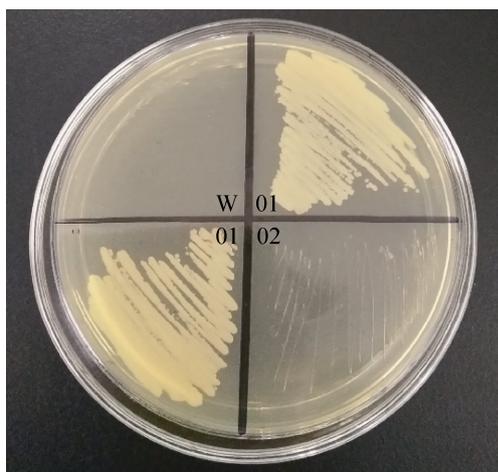


图 10. 原始菌株 *C. amazonensis* CBS 12363 及 *PDC* 敲除株在 Hyg 900 平板上的生长状况

Figure 10. Growth of the parental strain (wild-type) and *PDC* mutants on YEPD plates with 900 µg/mL Hygromycin B. W: wild type; 01: *C. amazonensis* *PDC01*; 02: *C. amazonensis* *PDC02*.

## 2.6 *PDC* 基因缺失的功能鉴定

为了考察 *PDC* 基因的缺失对突变株中酶活力的影响, 对原始野生株 *C. amazonensis* 和 *PDC* 突变株 *C. amazonensis* *PDC02* 分别进行了 *PDC* 酶活的测定, 结果如图 11 所示。突变株较出发菌株

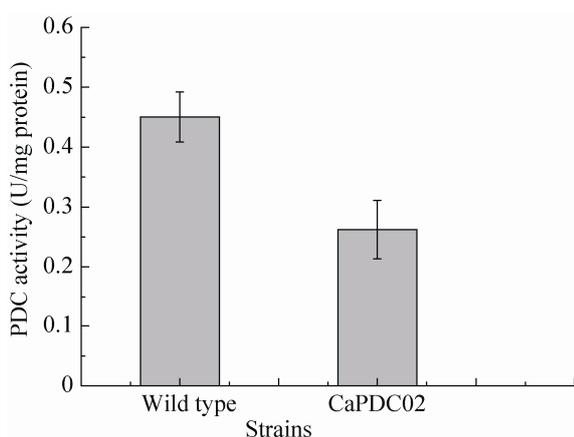


图 11. 野生菌株及 *PDC* 敲除株胞内 *PDC* 比酶活分析  
Figure 11. The specific enzyme activity of *PDC* in wild strain and *PDC* mutant. CaPDC02: *C. amazonensis* *PDC02*.

*C. amazonensis* 的 *PDC* 比酶活下降了 41.73%, 但仍然保留有一定的 *PDC* 酶活。因此, 我们推测突变株中可能存在编码 *PDC* 的同工酶基因, 能够在一定程度上功能互补缺失基因。

## 3 讨论

*C. amazonensis* 作为一株新近发现的可高效利用木糖的酵母菌株, 在代谢木糖和生产木糖醇方面表现出一定优势, 有望成为新型木糖发酵模式菌株。但该酵母由于缺乏可对其进行遗传操作的分子手段而限制了代谢工程育种技术对其的应用, 因此, 建立一个筛选标记可重复利用的基因敲除系统对代谢工程改造 *C. amazonensis* 具有重要意义。本文通过对适用于 *C. amazonensis* 诱导型启动子的筛选, 获得 2 个严格受底物诱导的调控型启动子 *SpGAL1p* (受半乳糖诱导) 和 *SpMAL1p* (受麦芽糖诱导)。选择启动子 *SpGAL1p* 对 *FLP* 重组酶进行调控表达, 并在 *FLP* 表达盒和抗性标记基因 (*hphm*) 两端添加同向重复的 *FRT* 位点, 由此构建的敲除盒待确认整合到 *C. amazonensis* 的染色体上之后, 对阳性转化子添加半乳糖诱导培养, 实现 *FLP* 重组酶的表达, 并作用于 *FRT* 位点, 使 2 个同向 *FRT* 位点之间的片段得到切除, 最后只留下 1 个 *FRT* 位点。利用上述构建的 *FLP/FRT* 基因敲除系统, 选择对 *C. amazonensis* 内的丙酮酸脱羧酶基因 (*PDC*) 进行敲除, 丙酮酸脱羧酶可将丙酮酸催化生成乙醛, 并在乙醛脱氢酶的作用下进一步代谢为乙醇, 是酵母内碳代谢途径上的关键酶。因此, 作为对 *C. amazonensis* *FLP/FRT* 基因敲除系统可行性的初步验证, 本研究对 *C. amazonensis* 的 *PDC* 基因进行了敲除, 并回收了抗性标记, 成功实现了 *FLP/FRT* 系统在 *C. amazonensis* 中的首

次应用。

本研究构建的 FLP/FRT 基因敲除系统在以下方面具有一定的优势: (1) 只需要 1 次同源重组和后续的培养基诱导便可获得重组酶基因和抗性基因一同被切除的靶基因敲除株, 而不需要另外转入 1 个携带重组酶的游离质粒, 如 Cre-Loxp 系统中携带 Cre 酶的 PSH47 质粒<sup>[22]</sup>。(2) 只需要 1 个可用的抗性标记便可完成多个基因连续敲除。(3) 基因敲除株与其出发菌株相比, 除了目的基因的部分或完全缺失及多了 1 个 34 bp 的 FRT 位点外, 无其他基因上的差异。(4) 该敲除系统可以直接以野生型菌株为改造对象, 不需要利用 URA3 或 HIS1、ARG4 等营养缺陷型菌株<sup>[23]</sup>, 一方面省去了营养缺陷型菌株的筛选过程, 也避免了回复突变等问题; 另一方面由于 URA3 等基因的缺失会改变菌株的表型, 这可能会导致其对突变株有其他未知的影响。

另一方面, 该敲除系统也存在一定的不足之处, 如由于构建的敲除盒除了同源臂序列和抗性标记基因外, 还添加有 FLP 重组酶基因的表达盒, 这就使得敲除盒片段过大, 不仅增加了 PCR 扩增敲除盒的难度, 同时还可能造成其同源重组效率的降低。此外, 该敲除系统还存在一个 Cre-Loxp 和 FLP/FRT 系统普遍存在的问题, 即每一次利用该系统敲除基因回收掉抗性后, 都会在基因组上留下 1 个 FRT 识别位点的疤痕, 因此如果对基因组进行多轮操作, 留下的多个识别位点之间可能会发生重组, 降低基因组的稳定性。为了避免这种情况, 后续可参考 Yan 等使用突变型的 FRT 位点, 从而提高遗传稳定性<sup>[24]</sup>。

总的来说, 利用本研究建立的 FLP/FRT 基因敲除系统能够高效地连续敲除 *C. amazonensis* 内目的基因, 为菌株的代谢工程改造提供了强有力

的技术手段, 同时也为其他酵母的遗传转化系统研究提供了借鉴意义。

## 参 考 文 献

- [1] Cadete RM, Melo MA, Lopes MR, Pereira GMD, Zilli JE, Vital MJS, Gomes FCO, Lachance MA, Rosa CA. *Candida amazonensis* sp. nov., an ascomycetous yeast isolated from rotting wood in the Amazonian forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(6): 1438–1440.
- [2] Cadete RM, Melo MA, Dussán KJ, Rodrigues RC, Silva SS, Zilli JE, Vital MJ, Gomes FC, Lachance MA, Rosa CA. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian forest. *PLoS ONE*, 2012, 7(8): e43135.
- [3] Fan HC, Zhang L, Li Y, Li YR, Gu ZH, Ding ZY, Shi GY. Physiological and metabolic characteristics of five xylose utilizing yeasts. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(8): 1026–1035. (in Chinese)  
范贺超, 张梁, 李赢, 李由然, 顾正华, 丁重阳, 石贵阳. 五株木糖利用酵母的生理代谢特性. *微生物学报*, 2015, 55(8): 1026–1035.
- [4] Wohlbach DJ, Kuo A, Sato TK, Potts KM, Salamov AA, LaButti KM, Sun H, Clum A, Pangilinan JL, Lindquist EA, Lucas S, Lapidus A, Jin MJ, Gunawan C, Balan V, Dale BE, Jeffries TW, Zinkel R, Barry KW, Grigoriev IV, Gasch AP. Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(32): 13212–13217.
- [5] Fan HC. Evaluation of physiological and metabolic characteristics of new xylose-utilizing yeasts and the construction of genetic expression system. Master Dissertation of Jiangnan University, 2015. (in Chinese)  
范贺超. 新型木糖利用酵母的评价及其遗传表达系统构建. 江南大学硕士学位论文, 2015.
- [6] Lloyd AM, Davis RW. Functional expression of the yeast FLP/FRT site-specific recombination system in *Nicotiana tabacum*. *Molecular and General Genetics MGG*, 1994, 242(6): 653–657.
- [7] Staib P, Kretschmar M, Nichterlein T, Köhler G, Michel S, Hof H, Hacker J, Morschhäuser J. Host-induced, stage-specific virulence gene activation in *Candida albicans*

- during infection. *Molecular Microbiology*, 1999, 32(3): 533–546.
- [8] Morschhäuser J, Michel S, Staib P. Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination. *Molecular Microbiology*, 1999, 32(3): 547–556.
- [9] Sánchez-Martínez C, Pérez-Martín J. Site-specific targeting of exogenous DNA into the genome of *Candida albicans* using the FLP recombinase. *Molecular Genetics and Genomics*, 2002, 268(3): 418–424.
- [10] Reuß O, Vik Å, Kolter R, Morschhäuser J. The *SAT1* flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene*, 2004, 341: 119–127.
- [11] Ding C, Butler G. Development of a gene knockout system in *Candida parapsilosis* reveals a conserved role for *BCR1* in biofilm formation. *Eukaryotic Cell*, 2007, 6(8): 1310–1319.
- [12] Gácsér A, Trofa D, Schäfer W, Nosanchuk JD. Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *The Journal of Clinical Investigation*, 2007, 117(10): 3049–3058.
- [13] Nguyen LN, Trofa D, Nosanchuk JD. Fatty acid synthase impacts the pathobiology of *Candida parapsilosis* *in vitro* and during mammalian infection. *PLoS One*, 2009, 4(12): e8421.
- [14] Guarente L, Yocum RR, Gifford P. A *GAL10-CYC1* hybrid yeast promoter identifies the *GAL4* regulatory region as an upstream site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1982, 79(23): 7410–7414.
- [15] Karpova TS, Kim MJ, Spriet C, Nalley K, Stasevich TJ, Kherrouche Z, Heliot L, McNally JG. Concurrent fast and slow cycling of a transcriptional activator at an endogenous promoter. *Science*, 2008, 319(5862): 466–469.
- [16] Finley RL Jr, Zhang HM, Zhong JH, Stanyon CA. Regulated expression of proteins in yeast using the *MAL61-62* promoter and a mating scheme to increase dynamic range. *Gene*, 2002, 285(1/2): 49–57.
- [17] Kopke K, Hoff B, Kück U. Application of the *Saccharomyces cerevisiae* FLP/*FRT* recombination system in filamentous fungi for marker recycling and construction of knockout strains devoid of heterologous genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(14): 4664–4674.
- [18] Mumberg D, Müller R, Funk M. Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(25): 5767–5768.
- [19] Rogers DT, Lemire JM, Bostian KA. Acid phosphatase polypeptides in *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by a differentially regulated multigene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1982, 79(7): 2157–2161.
- [20] Ko BS, Kim J, Kim JH. Production of xylitol from D-xylose by a xylitol dehydrogenase gene-disrupted mutant of *Candida tropicalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(6): 4207–4213.
- [21] Gao NF, Deng XH, Wang DP, Li L. Determination of pyruvate decarboxylase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *China Brewing*, 2011, 30(3): 128–130. (in Chinese)  
高年发, 邓旭衡, 王德培, 李磊. 酿酒酵母丙酮酸脱羧酶活性测定的研究. *中国酿造*, 2011, 30(3): 128–130.
- [22] Laplaza JM, Torres BR, Jin YS, Jeffries TW. *Sh ble* and *Cre* adapted for functional genomics and metabolic engineering of *Pichia stipitis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 38(6): 741–747.
- [23] Noble SM, Johnson AD. Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 2005, 4(2): 298–309.
- [24] Yan X, Yu HJ, Hong Q, Li SP. *Cre/lox* system and PCR-based genome engineering in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(17): 5556–5562.

## Development and verification of an FLP/*FRT* system for gene deletion in *Candida amazonensis*

Zhi Gao, Liang Zhang<sup>\*</sup>, Youran Li, Zhenghua Gu, Zhongyang Ding, Guiyang Shi

National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] To develop an FLP/*FRT* system for gene disruption in *Candida amazonensis* that can repeatedly use a single selectable marker, and to verify the effectiveness of this system by deleting the *PDC* gene encoding pyruvate decarboxylase. [Methods] Four promoters (*SpXYLp*, *SpMAL6p*, *SpMAL1p* and *SpGAL1p*) from *Spathaspora passalidarum* and *ScGAL1p* promoter from *Saccharomyces cerevisiae* were amplified and fused to the reporter gene of green fluorescent protein (*gfpm*) to study the regulation under corresponding inducible conditions. A strictly inducible promoter was selected to control the expression of the *C. amazonensis*-adapted *FLP* gene (*caFLP*), encoding the site-specific recombinase FLP. The promoter-*caFLP* fusion fragment was used to ligated with the *hphm* marker gene that conferred resistance to Hygromycin B, and the ligation product was flanked by direct repeats of the FLP recognition target (*FRT*). Then with the addition of the homologous arms, we constructed the *PDC* deletion cassette (PRFgHRP). The cassette was transformed into *C. amazonensis* CBS 12363 and transformants with *hphm* were derived. When the transformants were incubated into inducible medium, FLP-mediated recombination resulted in the deletion of DNA located between the repeats. [Results] *SpMAL1p* (induced by maltose) and *SpGAL1p* (induced by galactose) were identified to be strictly inducible promoters. *SpGAL1p* was used to regulate the expression of the *FLP*, and the *PDC* deletion cassette (PRFgHRP) was constructed and transformed into *C. amazonensis* successfully. After selection of Hyg-resistant transformant (designated as *C. amazonensis PDC01*) in which the deletion cassette was inserted into the *PDC* target gene, FLP expression was induced by growth of the transformant in galactose-containing medium, and Hyg-sensitive transformant in which *hphm* and *caFLP* flippers were excised from the genome was obtained, designated as *C. amazonensis PDC02*. [Conclusion] It is the first time to construct an FLP/*FRT* system for gene disruption in *C. amazonensis*, and we obtained a *PDC* mutant without resistant marker gene successfully through this system. These research results lay a good foundation for further metabolic engineering of *C. amazonensis*.

**Keywords:** *Candida amazonensis*, FLP/*FRT*, inducible promoters, gene disruption

(本文责编: 李磊)

Supported by the China Spark Program (2015GA690004) and by the Jiangsu Science Fund for Distinguished Young Scholars (BK20140002)

<sup>\*</sup>Corresponding author. E-mail: zhangl@jiangnan.edu.cn

Received: 24 December 2016; Revised: 16 February 2017; Published online: 14 March 2017