

# 紫穗槐-4,11-二烯合酶基因在酵母工程菌中具有协同作用

孔建强, 支晓慧, 王伟, 程克棣, 朱平

中国医学科学院&北京协和医学院药物研究所 卫生部天然药物生物合成重点实验室&中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100050

**摘要:** 为了构建高产的紫穗槐-4,11-二烯酵母工程菌, 主要探究了含紫穗槐-4,11-二烯合酶基因的不同表达载体在酵母工程菌中是否存在协同效应。首先构建了含紫穗槐-4,11-二烯合酶基因的酵母表达载体 pGADADS, 分别将 pGADADS 和 pYeDP60/G/ADS 转入酿酒酵母 W303-1B 和 WK1 中, 获得 6 种能产生紫穗槐-4,11-二烯的酵母工程菌: W303B[pGADADS]、W303B[pYGADS]、W303B[pYGADS+pGADADS]、WK1[pGADADS]、WK1[pYGADS]和 WK1[pYGADS+pGADADS]。对上述 6 种酵母工程菌进行发酵培养, 通过 GC-MS 对发酵产物进行检测。结果显示, 这 6 种酵母工程菌均能产生紫穗槐-4,11-二烯, 其产率随着紫穗槐-4,11-二烯合酶基因拷贝数的增加而上升, 且产生的紫穗槐-4,11-二烯对酵母工程菌没有产生毒性。导入多种 ADS 重组质粒后酵母工程菌的紫穗槐-4,11-二烯产率显著高于多个单质粒工程菌产生的紫穗槐-4,11-二烯之和。上述结果表明, 同一宿主细胞中多种含紫穗槐-4,11-二烯合酶基因的表达载体之间存在明显的协同效应, 这为构建青蒿素前体高产工程菌提供了一种思路。

**关键词:** 酵母工程菌, 紫穗槐-4,11-二烯, 紫穗槐-4,11-二烯合酶, 协同作用, 青蒿素

## Synergistic effect of amorpha-4,11-diene synthase gene in engineered *Saccharomyces cerevisiae*

Jianqiang Kong, Xiaohui Zhi, Wei Wang, Kedi Cheng, and Ping Zhu

Key Laboratory of Biosynthesis of Natural Products, Ministry of Health of PRC & Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education of PRC, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

**Abstract:** To construct an engineered *Saccharomyces cerevisiae* producing high titres of amorpha-4,11-diene, we investigated the

**Received:** June 21, 2010; **Accepted:** August 6, 2010

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 30701061), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA021501), Beijing Natural Science Foundation (No. 7082063), Doctoral Fund (New Teacher) of Ministry of Education of China (No. 20070023077).

**Corresponding author:** Jianqiang Kong. Tel: +86-10-63165169; Fax: +86-10-63017757; E-mail: jianqiangk@imm.ac.cn  
Ping Zhu. Tel: +86-10-63165197; Fax: +86-10-63017757; E-mail: Zhuping@imm.ac.cn

国家自然科学基金 (No. 30701061), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2007AA021501), 北京市自然科学基金 (No. 7082063), 教育部博士点新教师基金 (No. 20070023077) 资助。

possible synergistic effect of different vectors containing amorph-4,11-diene synthase(ADS) gene within one yeast cell. We constructed the ADS recombinant plasmid pGADADS. This plasmid and another ADS recombinant plasmid pYeDP60/G/ADS were alone, or co-transformed into yeast *Saccharomyces cerevisiae* W303-1B and WK1, respectively, resulting in the following engineered yeasts, W303B[pGADADS], W303B[pYGADS], W303B[pYGADS+pGADADS], WK1[pGADADS], WK1[pYGADS] and WK1[pYGADS+pGADADS]. All of the six strains were cultured for GC-MS analysis of amorph-4,11-diene. The results showed that all of the engineered yeasts could produce amorph-4,11-diene. The yield of the product was improved with increasing ADS gene copies while no deleterious effect on the strain growth was found. Moreover, the product yield of the engineered yeast co-transformed with multiple plasmids was much higher than the total yield of the different engineered yeasts with only one plasmid, respectively. In conclusion, there was a distinct synergistic effect between different recombinant ADS plasmids within one cell. Our results facilitate the construction of the engineered yeast with high yield of amorph-4,11-diene, the precursor of artemisinin.

**Keywords:** engineered yeast, amorph-4,11-diene, amorph-4,11-diene synthase, synergistic effect, artemisinin

近几年,随着青蒿素生物合成途径的逐渐明晰<sup>[1]</sup>,以及青蒿素生物合成相关基因的成功克隆<sup>[2-7]</sup>,极大地促进了青蒿素合成生物学的发展<sup>[6,8]</sup>。青蒿素生物合成相关基因被导入包括大肠杆菌 *Escherichia coli*<sup>[8-11]</sup>和酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*<sup>[6,12-17]</sup>在内的微生物体内,在微生物中重构青蒿素中间体生物合成途径,由于微生物生长繁殖快,因此可以利用“微生物工厂”大量生产青蒿素及其中间体。这种方法不同于简单的基因插入或敲除,它使不同基因在微生物中重建一条青蒿素代谢途径成为可能。迄今为止,科研人员利用微生物,获得了各种青蒿素中间体,如紫穗槐-4,11-二烯 (Amorph-4,11-diene, AD)<sup>[2-6]</sup>、青蒿醇<sup>[6]</sup>、青蒿醛<sup>[6]</sup>、青蒿酸<sup>[6-7]</sup>和二氢青蒿酸<sup>[7]</sup>等。这些目的产物的获得,表明在微生物中重构一条青蒿素生物合成途径是完全可能的。然而,要想使青蒿素工程菌产生的青蒿素中间体具有工业价值,必须对工程菌进行优化,获得产率更高的微生物。

在青蒿素的生物合成途径中,由法尼基二磷酸 (Farnesyl diphosphate, FPP) 通过紫穗槐-4,11-二烯合酶 (Amorph-4,11-diene synthase, ADS) 的作用,形成 AD 是青蒿素生物合成途径中的限速步骤,AD 的产量直接影响到代谢终产物青蒿素在生物体中的含量<sup>[9]</sup>。因此,提高 AD 的产量成为了青蒿素合成生物学中必须重点解决的关键问题。美国 Keasling 实验室通过增加 FPP 的供应<sup>[8]</sup>、改善发酵条件<sup>[10]</sup>、增加基因拷贝数<sup>[11]</sup>等优化措施,使大肠杆菌工程菌中

的紫穗槐-4,11-二烯的产量达到了 293 mg/(L·OD<sub>600</sub>)<sup>[9]</sup>,在 *S. cerevisiae* 工程菌中 AD 的产量达到了 (781±34) mg/L<sup>[14]</sup>。我们实验室也通过基因突变<sup>[16]</sup>、增加基因拷贝数<sup>[17]</sup>以及调控萜类生物合成途径<sup>[15]</sup>等优化措施,使 AD 的产量提高了 20 000 倍,达到了 123.192 mg/L<sup>[16]</sup>。

本研究构建了一系列紫穗槐-4,11-二烯酵母工程菌,GC-MS 检测发现这些酵母工程菌均能产生紫穗槐-4,11-二烯,而且部分菌株的紫穗槐-4,11-二烯的产量达到了 (128.75±21.65) mg/L。更为重要的是,通过这些工程菌,我们证实了同一工程菌中,含 ADS 基因的不同质粒之间存在协同作用,从而为构建高产紫穗槐-4,11-二烯酵母工程菌提供了一种思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 工具酶和试剂

KOD Plus 高保真 DNA 聚合酶购自 Toyobo 公司;EZ-T 载体购自康润生物公司;DNA 胶回收试剂盒购自百泰克公司;鲑鱼精 DNA 购自 Wako 公司;PEG4000 购自欣经科公司;醋酸锂购自 Sigma 公司;酵母质粒提取试剂盒购自 TIANGEN 公司;朱栾倍半萜标准品 (Valencene) 和正十二烷购自 Fluka 公司;其他试剂均为分析纯。

### 1.2 质粒、菌种和培养基

宿主菌 *E. coli* TG1 和酿酒酵母 W303-1B

(*MATa*; *ade2-1*; *his -11,-15*; *leu2-3, -112*; *ura3-1*; *trp1-1*) 为本实验室保存。本实验室构建的紫穗槐-4,11-二烯生产菌 WK1, 是将紫穗槐-4,11-二烯合酶基因整合到 W303-1B 基因组中而成<sup>[17]</sup>; 酵母表达载体 pYeDP60/G/ADS 为本实验室构建, 含有紫穗槐-4,11-二烯合酶基因, 该基因受 GAPDH3 启动子调控<sup>[15-16]</sup>; 该载体含有 *URA3* 和 *ADE2* 营养标记; 在高密度培养时, 该载体能稳定存在于细胞中。

LB 培养基用于大肠杆菌的培养 (10 g/L 胰蛋白胨; 5 g/L 酵母提取物; 10 g/L NaCl, 固体培养基添加 1.5% 琼脂粉); YPD 培养基 (10 g/L 酵母提取物; 20 g/L 细菌蛋白胨; 20 g/L 葡萄糖; 固体培养基添加 2% 的琼脂粉) 用于酵母的培养; SC drop out 培养基 (7 g/L 无氨基酵母氮源; 2 g/L drop-out 混合物, 20 g/L 葡萄糖, 固体培养基添加 2% 的琼脂粉) 用于酵母的胁迫培养。

### 1.3 酵母表达载体 pGADADS 的构建

以 FGBT(5'-agcatgcggccgctagctgcagagctcatatgaa ttcCTCGAGTTTATCATTATCAATA-3')和 RGBT(5'-agccggcctaggatagatcccggtaccgctaccatggAGCTATGAC CATGATTACGCC-3')为引物, pYeDP60/G/ADS 质粒为模板, 扩增得到 ADS 表达盒序列 (GAPDH3 启动子-ADS 基因-PGK 终止子), 克隆至 EZ-T 载体得到重组质粒 pEZADS。分别用 *Sph* I/*Nco* I 酶切 pGADT7, 得到 908 bp、1 078 bp 和 6 kb 的条带, 回收长为 6 kb 的条带; 用 *Sph* I/*Nco* I/*Pvu* I 酶切 pEZADS, 得到 219 bp、1 045 bp、1 752 bp 和 2 788 bp 四条带, 回收长为 2 788 bp 的条带, 连接 6 kb 的 pGADT7 酶切回收片段和 2 788 bp 的 pEZADS 酶切回收片段, 得到 pGADADS。

### 1.4 附加体型酵母工程菌的构建

提取 pGADADS 和 pYeDP60/G/ADS 质粒, 通过 LiAc 法<sup>[18]</sup>将其导入酿酒酵母 W303-1B 和 WK1, 转化产物涂布在相应的 SC drop-out 筛选培养基上, 28 °C 倒置培养 5~7 d, 直到长出重组克隆。挑取克隆接种到相应的液体 SC drop-out 培养基上, 28 °C

培养 3~5 d。12 000 r/min, 离心 2 min, 弃上清, 收集菌体, 提取质粒, 通过 PCR 检测目的质粒的存在, 从而确定阳性克隆。

### 1.5 工程菌发酵

将筛选正确的工程菌菌株接种到 10 mL 相应的 SC drop out 液体培养基中, 30 °C 培养到  $OD_{600}$  达到 1.0。然后取 1 mL 转接到 50 mL 新鲜的 YPD 液体培养基中, 同时加入 3 mL 正十二烷覆盖培养, 28 °C 培养 5 d, 静置 30 min, 吸取 10  $\mu$ L 正十二烷进行 GC-MS 定性定量检测。同时吸取 200  $\mu$ L 菌液, 检测  $OD_{600}$  值。

### 1.6 GC-MS 检测发酵产物

仪器为 Agilent6890-5975 气-质联用仪, GC-MS 检测条件如下。

色谱条件: DB-5ms 毛细管色谱柱 (30 m $\times$  0.25  $\mu$ m $\times$  0.25 m); 升温程序: 初始温度 100 °C, 保持 2 min, 以 5 °C/min 升至 200 °C, 立即以 25 °C/min 升至 250 °C, 保持 10 min; 进样口温度 250 °C, 分流进样 (分流比 10:1), 进样 1  $\mu$ L; 载气 (氦气) 流量 2 mL/min, 恒流模式; 色谱-质谱接口温度 300 °C。

质谱条件: EI 电离源; 电子能量 70 eV; 离子源温度 230 °C; 四极杆温度 150 °C; 溶剂延迟时间 5 min; 质量扫描方式: 全离子扫描; 定量离子: m/z 204, 189 和 119。

## 2 结果与分析

### 2.1 构建酵母表达载体 pGADADS

分别用 *Nco* I 和 *Nco* I/*Sph* I 对 pGADADS 进行单酶切和双酶切鉴定, 结果如图 1 所示。从图中可以看出, 经过 *Nco* I 单酶切, 得到一条长为 8.8 kb 左右大小的片段, 与 pGADADS 的理论大小接近; 用 *Nco* I/*Sph* I 对重组克隆进行双酶切, 结果表明, 酶切得到的 2 条片段大小分别为 2.8 kb 和 6 kb, 与理论的大小相当, 上述酶切结果说明, pGADADS 构建成功。pGADADS 含有 *LEU2* 选择标记。

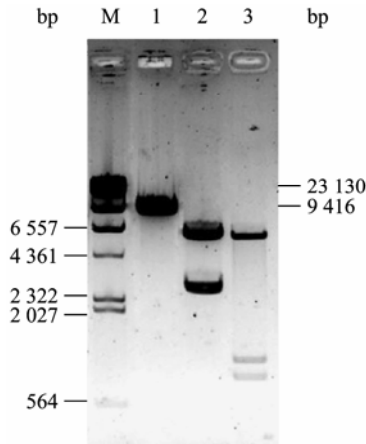


图 1 pGADADS 酶切分析

Fig. 1 Restriction analysis of pGADADS. 1: *Nco* I analysis of pGADADS; M: DNA molecular marker:  $\lambda$ DNA/*Hind* III; 2: *Nco* I + *Sph* I analysis of pGADADS; 3: *Nco* I + *Sph* I analysis of pGADT7.

2.2 酵母工程菌的构建

分别将 pGADADS 和 pYeDP60/G/ADS 导入酿酒酵母 W303-1B 和 WK1, 获得 6 种酵母工程菌, 分别是只导入了 pGADADS 的酵母工程菌 W303B[pGADADS]和 WK1[pGADADS]; 只导入了 pYeDP60/G/ADS 的酵母工程菌 W303B[pYGADS]和 WK1[pYGADS]; 共转了质粒 pGADADS 和 pYeDP60/G/ADS 的酵母工程菌 W303B[pYGADS+pGADADS]和 WK1[pYGADS+pGADADS]。其中, 在酵母工程菌 WK1[pYGADS+pGADADS]中, ADS 基因存在 3 种形态, 一种是整合到酵母基因组上, 另外 2 种分别克隆在质粒 pGADADS 和 pYeDP60/G/ADS 上。

2.3 GC-MS 检测紫穗槐-4,11-二烯

6 种工程菌各挑取 5 个克隆, 对这些克隆的发酵产物进行 GC-MS 检测, 均检测到了紫穗槐-4,11-二烯 (图 2)。根据朱乐倍半萜标准曲线, 对上述 6 种酵母工程菌中的紫穗槐-4,11-二烯进行了定量测定 (表 1)。从结果可以看出, 以 W303-1B 和 WK1 为宿主菌的酵母工程菌中, 紫穗槐-4,11-二烯的产量都是随着 ADS 基因拷贝数的增加而上升的 (图 3、4)。通过对以 W303-1B 为宿主菌的酵母工程菌的菌

体干重进行检测, 发现菌体干重没有显著性差异, 表明产生的紫穗槐-4,11-二烯对酵母工程菌没有产生毒性, 不影响酵母工程菌生长 (图 5)。

从结果进一步看出, W303B[pYGADS+pGADADS]产生的紫穗槐-4,11-二烯总量要超过 W303B[pGADADS]和 W303B[pYGADS]产生的紫穗槐-4,11-二烯之和。同样, WK1[pYGADS+pGADADS]产生的紫穗槐-4,11-二烯总量远超 W303B[pYGADS]和 WK1[pGADADS]或 W303B[pGADADS]和 WK1[pYGADS]产生的紫穗槐-4,11-二烯之和。

表 1 酵母工程菌中紫穗槐-4,11-二烯的产量

Table 1 Amorpha-4,11-diene production of the engineered yeasts

Yeast strains	Production of amorpha-4,11-diene (mg/L)
W303B	0
W303B[pGADADS]	0.65±0.31
W303B[pYGADS]	50.68±3.75
W303B[pYGADS+pGADADS]	122.71±14.68
WK1	10.95±0.42
WK1[pGADADS]	34.17±7.44
WK1[pYGADS]	54.36±7.09
WK1[pYGADS+pGADADS]	128.75±21.65

3 讨论

在酵母工程菌中, 提高 AD 产量的方法有很多, 如提高 ADS 基因在微生物中的拷贝数<sup>[12,17]</sup>, 或改善 ADS 的作用效果<sup>[16]</sup>, 或增加 AD 生物合成途径中底物的供应<sup>[8-9,11,13]</sup>等。通过提高 ADS 基因在微生物中的拷贝数来提高工程菌中 AD 的产量存在着很大的风险: 首先, 过多的 AD 可能会对微生物产生毒害; 其次, 过多外源质粒的导入会增加微生物的负荷, 影响其正常功能; 最后, 随着整合的外源基因拷贝数的增加, 基因同源序列之间的相互作用会导致外源基因“反式失活”。为了解决上述问题, 本实验设计了 6 个酵母工程菌, 期望通过对这 6 种酵母工程菌产生的紫穗槐-4,11-二烯进行分析, 得出一些有利的结论。

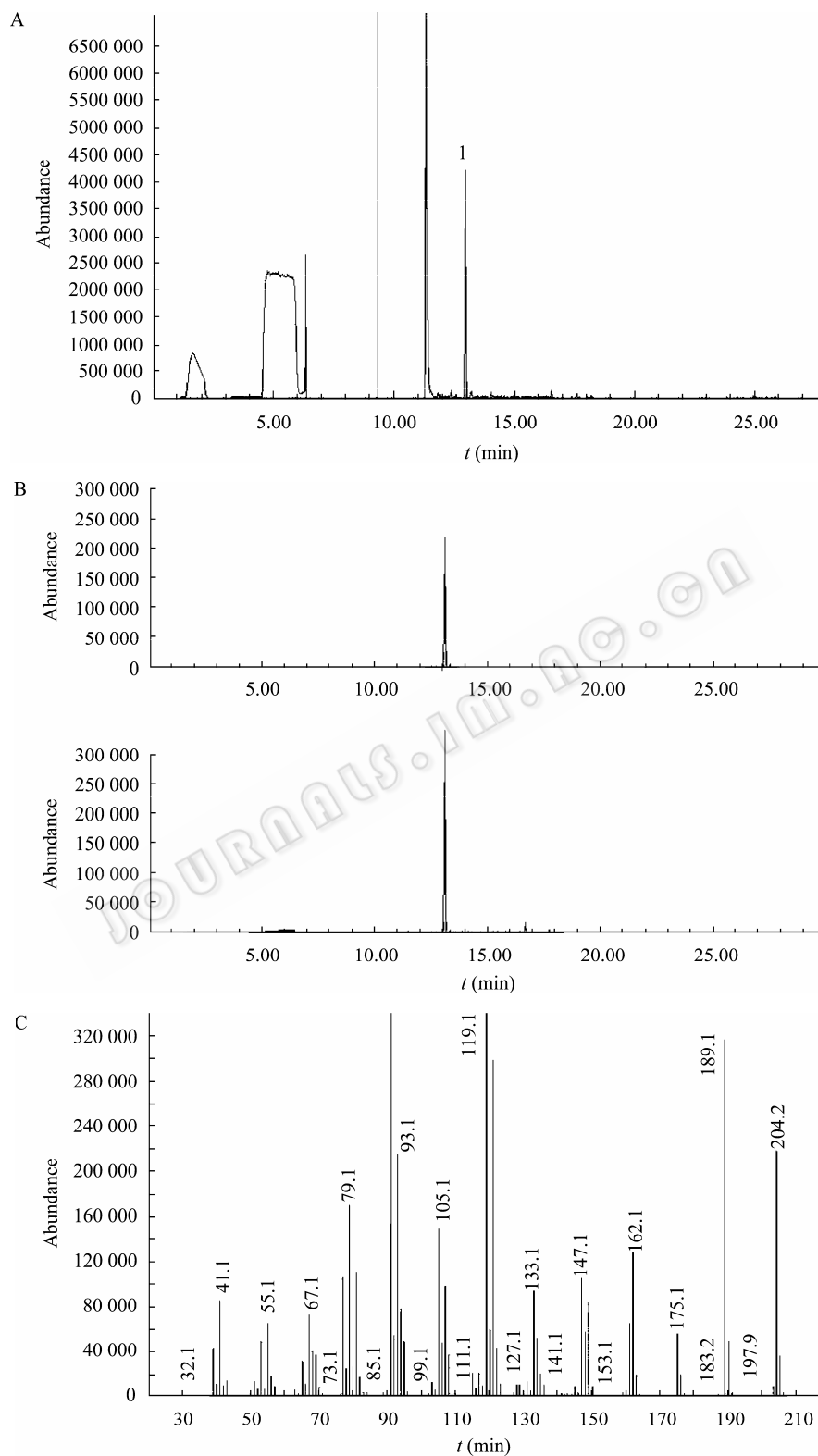


图2 紫穗槐-4,11-二烯酵母工程菌的 GC-MS 结果

Fig. 2 GC-MS analysis of engineered yeasts producing amorpho-4,11-diene. (A) The total ion chromatogram of engineered yeasts producing amorpho-4,11-diene. (B) Selected ion  $m/z$  204 and  $m/z$  119, 189. (C) MS spectrum of the peak of retention time 13.121 min.

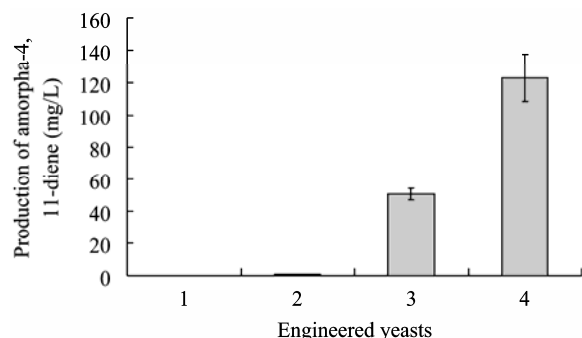


图3 以 W303-1B 为宿主菌的工程菌中紫穗槐-4,11-二烯的产量

Fig. 3 Amorph-4,11-diene production in engineered yeasts derived from W303-1B. 1: W303B; 2: W303B[pGADADS]; 3: W303B[pYGADS]; 4: W303B[pYGADS+pGADADS].

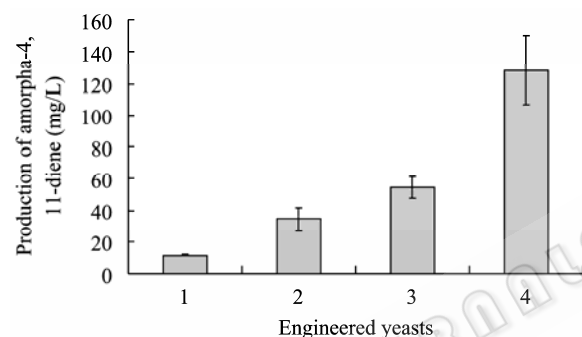


图4 以 WK1 为宿主菌的工程菌中紫穗槐-4,11-二烯的产量

Fig. 4 Amorph-4,11-diene production in engineered yeasts derived from WK1. 1: WK1; 2: WK1[pGADADS]; 3: WK1[pYGADS]; 4: WK1[pYGADS+pGADADS].

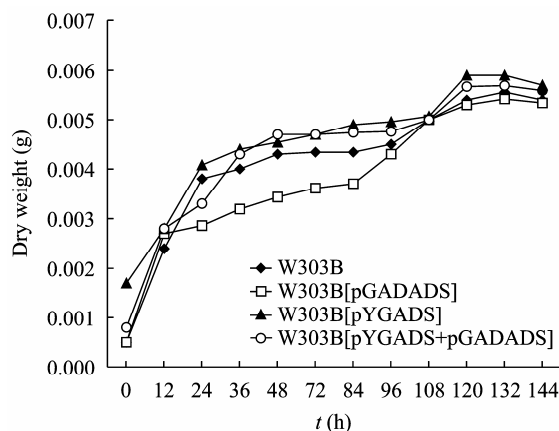


图5 酵母工程菌中菌体干重比较

Fig. 5 Dry weight analysis of engineered yeasts derived from W303-1B.

结果表明,随着 *ADS* 基因拷贝数的增加,AD 的产量确实迅猛增加,然而,这种增加并不会对酿酒酵母产生毒害。估计是由于 AD 具有挥发性<sup>[10]</sup>,使得酿酒酵母产生的紫穗槐-4,11-二烯绝大部分都已经进入到正十二烷相中,酿酒酵母体内的紫穗槐-4,11-二烯含量已经很少,不足以对酿酒酵母产生毒性。

在酿酒酵母 WK1[pYGADS+pGADADS]中, *ADS* 基因通过 3 种方式导入酿酒酵母,一种是通过基因重组的方式导入了酿酒酵母,另外分别通过质粒 pYeDP60/G/ADS 和 pGADADS 的形式导入酿酒酵母。在这 3 种方式中, *ADS* 基因都是受酿酒酵母 GAPDH3 启动子调控,这样在这个酵母工程菌,具有多个拷贝数的除了 *ADS* 基因之外,还有 GAPDH3 启动子。然而,在这样的酵母工程菌中并没有出现反式失活的现象,相反,AD 的产量进一步上升。这个实验的成功为下一步采用多个质粒,同一个启动子的导入方式构建青蒿素酵母工程菌奠定了基础。

从结果可以看出,共转多个质粒的酵母工程菌产生的紫穗槐-4,11-二烯的产量要高于转单个质粒的多个酵母工程菌的产量总和,这就表明共转入同一酵母工程菌中的多个质粒的 *ADS* 基因之间存在协同作用。这样就为解决青蒿酸或二氢青蒿酸酵母工程菌中紫穗槐-4,11-二烯供应问题提供了思路:可以将 *ADS* 基因通过诸如整合,或与青蒿素代谢途径中的其他酶基因串联在不同质粒上等形式导入酵母工程菌中,利用 *ADS* 基因之间的协同作用,增加 AD 的供应,提高青蒿酸或二氢青蒿酸的产量,从而为获得高产青蒿酸或二氢青蒿酸酵母工程菌奠定基础。

## REFERENCES

- [1] Kong JQ, Wang W, Zhu P, et al. Recent advance of artemisinin biosynthesis. Chin Pharmaceut J, 2008, 43(11): 804-808.
- 孔建强, 王伟, 朱平, 等. 青蒿素生物合成研究进展.

- 中国药学杂志, 2008, 43(11): 804–808.
- [2] Mercke P, Bengtsson M, Bouwmeester HJ, et al. Molecular cloning, expression, and characterization of amorpha-4,11-diene synthase, a key enzyme of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. Arch Biochem Biophys, 2000, 381(2): 173–180.
- [3] Chang YJ, Song SH, Park SH, et al. Amorpha-4,11-diene synthase of *Artemisia annua*: cDNA isolation and bacterial expression of a terpene synthase involved in artemisinin biosynthesis. Arch Biochem Biophys, 2000, 383(2): 178–184.
- [4] Wallaart TE, Bouwmeester HJ, Hille J, et al. Amorpha-4,11-diene synthase: cloning and functional expression of a key enzyme in the biosynthetic pathway of the novel antimalarial drug artemisinin. Planta, 2001, 212(3): 460–465.
- [5] Li ZQ, Liu Y, Liu BY, et al. Cloning, *E. coli* expression and molecular analysis of amorpha-4,11-diene synthase from a high-yield strain of *Artemisia annua* L. J Integr Plant Biol, 2006, 48(12): 1486–1492.
- [6] Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. Nature, 2006, 440(7086): 940–943.
- [7] Zhang YS, Teoh KH, Reed DW, et al. The molecular cloning of artemisinic aldehyde  $\Delta 11(13)$  reductase and its role in glandular trichome-dependent biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua*. J Biol Chem, 2008, 283(31): 21501–21508.
- [8] Martin VJJ, Pitera DJ, Withers ST, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. Nat Biotechnol, 2003, 21(7): 796–803.
- [9] Anthony JR, Anthony LC, Nowroozi F, et al. Optimization of the mevalonate-based isoprenoid biosynthetic pathway in *Escherichia coli* for production of the anti-malarial drug precursor amorpha-4,11-diene Metab Eng, 2009, 11(1): 13–19.
- [10] Newman JD, Marshall J, Chang M, et al. High-level production amorpha-4,11-diene in a two-phase partitioning bioreactor of metabolically engineered *Escherichia coli*. Biotechnol Bioeng, 2006, 95(4): 684–691.
- [11] Pitera DJ, Paddon CJ, Newman JD, et al. Balancing a heterologous mevalonate pathway for improved isoprenoid production in *Escherichia coli*. Metab Eng, 2007, 9(2): 193–207.
- [12] Lindahl AL, Olsson ME, Mercke P, et al. Production of the artemisinin precursor amorpha-4,11-diene by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol Lett, 2006, 28(8): 571–580.
- [13] Paradise EM, Kirby J, Chan R, et al. Redirection of flux through the FPP branch-point in *Saccharomyces cerevisiae* by down-regulating squalene synthase. Biotechnol Bioeng, 2008, 100(2): 371–378.
- [14] Ro DK, Ouellet M, Paradise EM, et al. Induction of multiple pleiotropic drug resistance genes in yeast engineered to produce an increased level of anti-malarial drug precursor, artemisinic acid. BMC Biotechnol, 2008, 8: 83.
- [15] Kong JQ, Cheng KD, Wang LN, et al. Increase of copy number of HMG-CoA reductase and FPP synthase genes improves the amorpha-4,11-diene production in engineered yeast. Acta Pharmaceut Sin, 2007, 42(12): 1314–1319.
- 孔建强, 程克棣, 王丽娜, 等. HMG-CoA 还原酶和 FPP 合酶基因拷贝数对紫穗槐-4,11-二烯酵母工程菌产量的影响. 药学报, 2007, 42(12): 1314–1319.
- [16] Kong JQ, Wang W, Wang LN, et al. The improvement of amorpha-4,11-diene production by a yeast-conform variant. J Appl Microbiol, 2009, 106(3): 941–951.
- [17] Kong JQ, Shen JH, Huang Y, et al. Production of amorpha-4,11-diene in engineered yeasts. Acta Pharmaceut Sin, 2009, 44(11): 1297–1303.
- 孔建强, 沈君豪, 黄勇, 等. 酵母工程菌制备紫穗槐-4,11-二烯的研究. 药学报, 2009, 44(11): 1297–1303.
- [18] Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, et al. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. Yeast, 1995, 11(4): 355–360.