

## • 药材与资源 •

## 药用真菌猪苓菌核无机磷酸盐转运蛋白基因的分子克隆与特性分析

刘蒙蒙<sup>1,2</sup>, 邢咏梅<sup>1</sup>, 王爱荣<sup>1</sup>, 郭顺星<sup>1\*</sup>

1. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100193

2. 江苏理工学院电气信息工程学院生物信息与医药工程研究所, 江苏 常州 213001

**摘要:** 目的 克隆猪苓 *Polyporus umbellatus* 菌核无机磷酸盐转运蛋白基因并进行生物信息学和表达模式分析。方法 采用 RT-PCR 技术从猪苓菌核中克隆得到 1 个无机磷酸盐转运蛋白 (inorganic phosphate transporter) 基因, 利用生物信息学软件预测蛋白的理化性质、结构域、信号肽和跨膜结构等分子特性; 采用 Clustal W2 以及 MEGA 6.0 分别进行氨基酸多序列比对和进化关系分析; 实时荧光定量 PCR 分析基因表达模式。结果 猪苓无机磷酸盐转运蛋白基因命名为 PuPiT (NCBI 登录号: KU179154)。该基因开放读码框全长为 1 590 bp, 编码 530 个氨基酸。PuPiT 蛋白相对分子质量为 57 552, 等电点 6.82。氨基酸序列分析表明, PuPiT 蛋白具有 12 个跨膜区。氨基酸序列多重比对及系统发育树结果显示 PuPiT 与 *Moniliophthora rorer* 亲缘关系最近, 与 *Moniliophthora roreri*、双色蜡蘑 *Laccaria bicolor*、*Heterobasidion irregulare* 有较高的同源性, 荧光定量 PCR 结果表明, PuPiT 在与蜜环菌共生的猪苓菌核及未与蜜环菌共生的菌核中都有表达, 其中共生部分的表达量显著上调, 约是未共生部位的 12 倍, 说明其参与猪苓与蜜环菌共生过程。结论 PuPiT 基因克隆和分子特征为进一步研究揭示其在猪苓菌核磷元素转运及与蜜环菌共生过程中的调控作用奠定基础。

**关键词:** 猪苓菌核; 无机磷酸盐转运蛋白; 基因克隆; 表达分析; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)22-4734-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.22.023

**Molecular cloning and characterization of an inorganic phosphate transporter protein encoding gene in *Polyporus umbellatus***LIU Meng-meng<sup>1,2</sup>, XING Yong-mei<sup>1</sup>, WANG Ai-rong<sup>1</sup>, GUO Shun-xing<sup>1</sup>

1. Key Laboratory of Bioactive Substances and Resource Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

2. Institute of Bioinformatics and Medical Engineering, School of Electrical and Information Engineering, Jiangsu University of Technology, Changzhou 213001, China

**Abstract: Objective** To clone an inorganic phosphate transporter (PiT) gene from *Polyporus umbellatus* and perform the bioinformatics and expression mode analysis. **Methods** Using RT-PCR to clone the full-length cDNA of PiT. The characteristics of physicochemical properties, conserved domains, signal peptide and transmembrane domain of the predicted PiT protein were determined by using bioinformatic tools. **Results** A inorganic phosphate transporter (PiT) gene (NCBI: KU179154), designated as PuPiT, was cloned from *Polyporus umbellatus* sclerotia by RT-PCR. The full open reading frame cDNA sequence of PuPiT was 1 590 bp, encoding a putative PiT protein with 530 amino acids with a molecular weight of 57 552, and a theoretical pI of 6.82. The amino acids possess 12 membrane-spanning domains. Phylogenetic tree analysis indicated that PuPiT had the highest similarity with PiT from *Moniliophthora rorer*, and had high similarity with *Moniliophthora roreri*, *Laccaria bicolor*, and *Heterobasidion irregulare*. Quantitative real-time PCR showed that PuPiT expressed in both the symbiotic part and non-symbiotic part. Meanwhile, the expression of PuPiT in the symbiotic part was significantly up-regulated, about 12 times more than that in the non-symbiotic part. This result showed that PuPiT might play an important role in the Pi accumulating. **Conclusion** Molecular cloning and characterization of the novel PuPiT gene will be useful for further functional determination of the gene involving in phosphorus translocation regulation and symbiotic process.

收稿日期: 2017-04-16

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助 (2017-I2M-3-013); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20170311)

作者简介: 刘蒙蒙, 男, 博士, 研究方向为药用真菌学。E-mail: liuermengmeng@hotmail.com

\*通信作者 郭顺星, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为药用植物菌根生物学。Tel/Fax: (010)57833231 E-mail: sxguo1986@163.com

**Key words:** *Polyporus umbellatus* (Pers) Fr.; inorganic phosphate transporter protein; gene cloning; expression analysis; quantitative real-time PCR

细胞转运系统在生物新陈代谢中扮演着重要角色,细胞所需的营养物质通过转运系统进入细胞质,接着被转运到细胞器,利用这些外部来源的 C、N、S 及 P 元素来构建新的细胞结构<sup>[1]</sup>。对于多细胞生物来讲,外环境的实时监控对于多细胞生物的生存是十分关键的。生物必须适应其内环境以及外环境的变化<sup>[2]</sup>。铁离子和其他有机盐运输蛋白在生物适应环境变化的过程中起着重要的作用。例如营养物质的获得,代谢废物的外排及细胞体积的调节过程都需要运输蛋白的参与<sup>[3]</sup>。

无机磷酸盐是多种生物细胞功能所必需的营养元素。另外,无机磷酸盐参与了多种与磷酸基转移有关的生物化学反应<sup>[4-5]</sup>。通常来说,对外环境的无机磷酸盐利用效率低是限制许多生物生长的主要因素<sup>[6]</sup>。

激活细胞膜对无机磷酸盐的吸收对于维持细胞内的磷稳态是非常重要的一个生理过程<sup>[7]</sup>。由于磷离子带有负电荷,它不能通过简单扩散透过同样带负电荷的细胞膜。因此,磷离子必须通过协同转运通过细胞膜以被细胞进一步利用<sup>[8]</sup>。

在细胞内主要有 2 个重要的磷转运蛋白家族,分别是无机磷酸盐转运蛋白家族(PiT)和 H<sup>+</sup>协同转运蛋白家族。无机磷酸盐转运蛋白家族的成员一般具有 354~681 个氨基酸,有 10~12 个跨膜区域<sup>[1]</sup>。

猪苓是我国重要的中药资源,其与蜜环菌的关系是一种共生关系。蜜环菌腐生在朽木、半朽木上,延生的菌索与猪苓菌核接触,侵入猪苓菌核,猪苓生长的主要营养来源于蜜环菌提供的分泌物。但猪苓转运营养物质过程的分子机制尚属空白。

本研究中应用实时定量 PCR 技术(RT-PCR)克隆猪苓菌核无机磷酸盐转运蛋白基因(PuPiT)的开放读码框全长序列,并就该基因的结构特征、结构和功能进行初步分析,并利用 RT-PCR 技术对其在不同的猪苓菌核部位表达进行了研究,以期为进一步研究该基因的功能及其调控磷离子转运分子机制奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 猪苓菌核

本实验中所用的猪苓菌核于 2014 年 7 月采自山西省古县猪苓场,猪苓 *Polyporus umbellatus* (Pers) Fr. 由中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所郭顺星教授鉴定。

### 1.2 主要试剂及仪器

Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase Mix 购于南京诺唯赞公司;RNeasy 植物 RNA 快速提取试剂盒购于 QIAGEN 公司;TRUEscript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 胶回收试剂盒、2x Sybr Green qPCR Mastermix 试剂盒、Zero Background pTOPO-Blunt Simple Cloning Kit、大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞均购于北京艾德莱公司;NanoDrop<sup>TM</sup> 2000 分光光度计购于 Thermo Fisher 公司。

## 2 方法

### 2.1 总 RNA 提取

猪苓菌核在研钵中加入液氮磨碎,按照 RNeasy 植物 RNA 快速提取试剂盒操作说明提取各样品 RNA,提取后总 RNA 利用微量核酸定量仪(NanoDrop 2000 Spectrophotometer)检测 RNA 的纯度和浓度。并用 1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。用 TRUEscript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录合成 cDNA 第一链并存放于 -20 °C 保存备用。

### 2.2 PuPiT 基因的扩增

根据猪苓菌核转录组文库测序获得的 PuPiT 基因片段的序列信息,利用 Primer 5 软件设计 PuPiT 基因特异的 PuPiTp1 和 PuPiTp2 引物来扩增其全长开放读码框。PuPiTp1: 5'-ATGCCTGGCGCTTCT-AGTGATG-3', PuPiTp2: 5'-TCACTTGGGTGAAT-TCTGTCTTGCC-3',并由北京金唯智公司合成。以猪苓菌核 cDNA 为模板进行 RT-PCR,总反应体积为 50  $\mu$ L,包括 1  $\mu$ L dNTPs (10 mmol/L), 2  $\mu$ L cDNA, 25  $\mu$ L Phanta Max buffer, 1  $\mu$ L Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase, PuPiTp1 及 PuPiTp2 各 2  $\mu$ L (10 mmol/L) 和 17  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。扩增反应条件为 94 °C、5 min; 94 °C、30 s, 60 °C、30 s, 72 °C、1 min, 40 个循环; 72 °C 延伸 10 min。12 °C 保存。PCR 产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳,用胶回收试剂盒纯化目的条带,连接至 pTOPO 载体,转化大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,随机挑选 3 个克隆送北京金唯智公司测序。

### 2.3 PuPiT 序列分析

采用 TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测蛋白的跨膜区域。利用在

线 BLAST 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 寻找并下载 PuPiT 同源序列。使用 ExPasy ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)) 预测蛋白质相对分子质量和等电点分析。SignalP4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽；利用 Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) 进行多重序列比对，使用 MEGA 6.0 软件构建系统进化树。

#### 2.4 PuPiT 基因在猪苓菌核不同部位的表达分析

分别取未与蜜环菌共生的猪苓菌核 (CK) 以及 与蜜环菌共生的猪苓菌核 (CT)，按照 QIAGEN 试剂盒的操作说明提取总 RNA 后反转录成 cDNA 作为模板进行 RT-PCR，检测 PuPiT 基因在猪苓不同部位的表达情况。将 PuPiT 序列提交 Primer3 软件 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) 在线设计实时定量 PCR 引物 qPuPiT-SP (5'-CGACGATATCG-AGCAGATCA-3') 和 qPuPiT-AP (5'-CAAGATGTT-TGGCATGTTGC-3')。同时，设计猪苓  $\beta$ -tubulin 内参基因的 RT-PCR 引物 tub-F (5'-CCTTCCTTGCA-ACTCGACA-3') 和 tub-R (5'-TCGTCCATACCCTC-CTGTGT-3')，以上引物均由北京金唯智公司合成。RT-PCR 反应体系为 20  $\mu$ L，包括 Sybr Green qPCR Mastermix 10  $\mu$ L，10  $\mu$ mol/L 引物各 1  $\mu$ L，cDNA 模板 1  $\mu$ L (20 ng)，灭菌蒸馏水 7  $\mu$ L。每个反应重复 3 次，包括不加模板的对照，实验重复 3 次。RT-PCR 反应程序为 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s；95  $^{\circ}$ C、5 s，60  $^{\circ}$ C、30 s，40 个循环。反应结束绘制熔解曲线。利用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算检测 PuPiT 基因 mRNA 的相对表达量。

### 3 结果

#### 3.1 PuPiT 基因克隆

用 NanoDrop<sup>TM</sup> 2000 分光光度计测定所提取的 RNA 的纯度及浓度，结果显示其质量浓度为 202 ng/ $\mu$ L； $A_{260}/A_{280}$  的值为 2.140， $A_{260}/A_{230}$  的值为 2.345，说明所提取 RNA 的纯度较高，可用于猪苓菌核 cDNA 的合成。

以猪苓菌核 cDNA 为模板，利用引物 PuPiTp1 和 PuPiTp2 通过 RT-PCR 方法得到一个长度约为 1 500 bp 的片段 (图 1)，得到的 PCR 产物片段经胶回收、克隆、测序获得 1 591 bp 的完整开放阅读框 (ORF) 序列，与猪苓转录组文库中的 unigene 序列的 ORF 区一致，进而验证已成功获得 PiT 基因的全长 ORF。BLASTx 分析表明其为 PiT 的同源基因，因此将其命名为 PuPiT，NCBI 登录号为 KU179154。

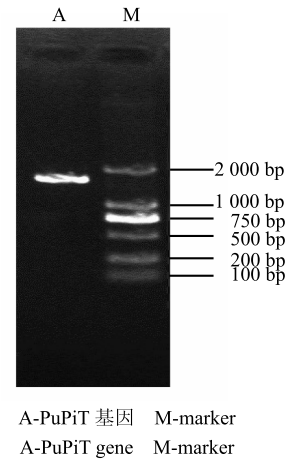


图 1 基因扩增结果

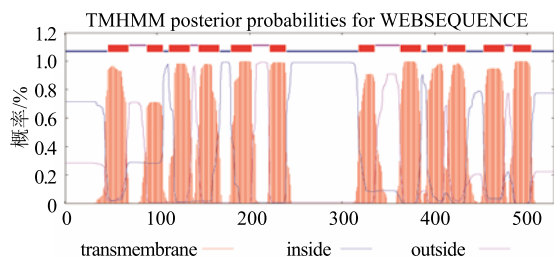
Fig. 1 PCR product of PuPiT gene

#### 3.2 PuPiT 蛋白结构及序列分析

PuPiT 编码 530 个氨基酸，预测的 PuPiT 蛋白相对分子质量为 57 552，等电点 6.82。结构域预测发现 PuPiT 属于协同转运蛋白超家族，结果显示该蛋白序列具有 MFS 蛋白的完整保守结构域，具有主动转运蛋白的主要特征。SignalP 4.0 预测无信号肽。通过 EXPASY 网站的 TMHMM 进行预测该蛋白的跨膜区域，结果如图 2 所示，在 N 端 (47~69、89~106、113~135、145~167、180~202、222~239) 和 C 端 (318~335、363~385、392~409、414~433、453~475、485~504) 分别各具有 6 个跨膜片段，说明 PuPiT 是跨膜蛋白，可能具有协助转运功能。

利用 Clustal W2 (<http://www.Ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) 对 PuPiT 基因推定的氨基酸序列和其他 PiT 蛋白进行多序列比对，结果表明 PuPiT 蛋白与其他来源于担子菌 PiT 蛋白高度同源 (图 3)。PuPiT 与 *Moniliophthora roreri* 相似性最高 (76%)，其次是双色蜡蘑 *Laccaria bicolor* (Maire) Orton、*Heterobasidion irregulare* (Underw.) Garbel 及 *Schizopora paradoxa* (Fr.) Donk 的相似性分别为 73%、73% 和 70% (图 3)。

为了进一步了解 PuPiT 基因蛋白与其他真菌 PiT 蛋白的亲缘关系，从 GenBank 中下载已公布的 *Moniliophthora roreri*、双色蜡蘑、*Heterobasidion irregulare*、*Schizopora paradoxa*、灰盖鬼伞 *Coprinopsis cinerea* 和粉孢革菌 *Coniophora puteana* 等多种物种 PiT 家族基因的同源蛋白序列，通过 MEGA 6.0 软件对 PuPiT 蛋白与其他真菌的 PiT 蛋



方块部分代表跨膜区域  
square indicates the transmembrane region

图 2 TMHMM 软件分析 PuPiT 蛋白的跨膜结构域  
Fig. 2 Transmembrane domain of PuPiT analysis by TMHMM

*Moniliophthora roreri* (ESK86257)  
*Laccaria bicolor* (EDR00276.1)  
*Heterobasidion irregular* (ETW8)  
*Moniliophthora roreri* (ESK88099)  
*Laccaria bicolor* (EDR00261.1)  
*Coprinopsis cinerea* (EAU80994.2)  
*Schizopora paradoxa* (KLO16414.1)  
*Coniophora puteana* (EIW81644.1)  
*Auricularia delicata* (EJD43026)  
PuPiT



*Moniliophthora roreri* (ESK86257)  
*Laccaria bicolor* (EDR00276.1)  
*Heterobasidion irregular* (ETW8)  
*Moniliophthora roreri* (ESK88099)  
*Laccaria bicolor* (EDR00261.1)  
*Coprinopsis cinerea* (EAU80994.2)  
*Schizopora paradoxa* (KLO16414.1)  
*Coniophora puteana* (EIW81644.1)  
*Auricularia delicata* (EJD43026.1)  
PuPiT



相同的颜色代表一致的氨基酸序列  
amino acid sequence in the same color is the same

图 3 PuPiT 与几种其他真菌 PuPiT 序列比对分析  
Fig. 3 Amino acid sequence of septin with some PuPiT of fungus

此 PuPiT 基因在蜜环菌侵染猪苓菌核的部分高表达，蜜环菌的侵染可能诱导了猪苓对外环境中的无机磷的吸收。

#### 4 讨论

本实验成功克隆了猪苓菌核中的无机磷酸盐转运蛋白基因。该无机磷酸盐转运蛋白基因与其真菌因具有较高的同源性，命名为 PuPiT。PuPiT 与 *Moniliophthora roreri* 的相似性最高，达到 76%。无机磷酸盐转运蛋白家族的成员一般具有 354~681

个氨基酸，有 10~12 个跨膜区域<sup>[1]</sup>。高等植物磷转运蛋白对磷素的吸收可以分为 2 个系统：高亲和系统和低亲和系统。Reizer 等<sup>[9]</sup>发现高亲和力磷转运蛋白在第 6 个和第 7 个跨膜区之间 (TM6~TM7) 具有亲水环，氨基酸 N 端和 C 端均朝向细胞内，而 Daram 等<sup>[10]</sup>则报道了低亲和力磷酸盐转运蛋白的亲水环在第 8 个和第 9 个跨膜区之间 (TM8~TM9)，该蛋白编码的氨基酸 C 端朝细胞外，N 端朝细胞内。

#### 3.3 PuPiT 基因在猪苓菌核不同部位的表达分布

采用 RT-PCR 技术，分析 PuPiT 基因在未被蜜环菌侵染的猪苓菌核及被猪侵染的猪苓菌核当中的表达。从图 5 可以看出，PuPiT 基因在不同菌核部位中的表达量存在较大差异，在有蜜环菌共生的部位表达量要明显高于未与蜜环菌共生的部位，该基因的表达量在共生部位约为未共生部位的 12 倍。说明

本研究克隆得到的 PuPiT 编码 530 个氨基酸，

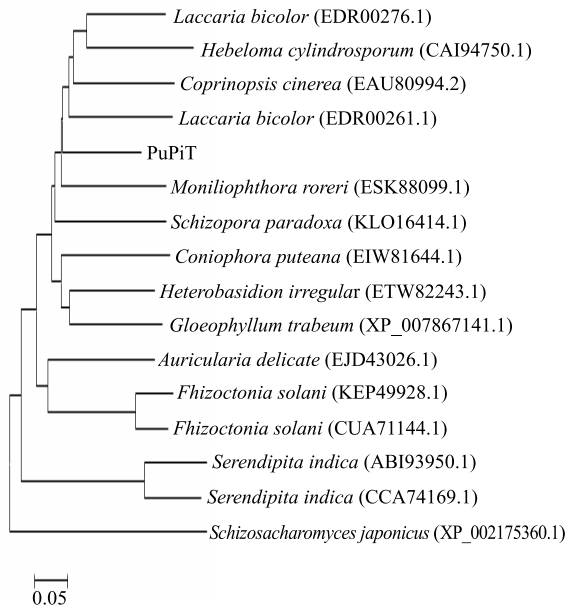
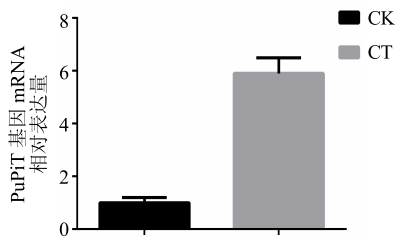


图 4 不同物种 PiT 的系统发育进化树

Fig. 4 Phylogenetic relationship of PuPiT in different species



CK-未被侵染的猪苓菌核 CT-被蜜环菌侵染的猪苓菌核  
CK-controlled medullar tissue CT-treated medullar tissue

图 5 PuPiT 基因的组织特异性表达分析  
Fig. 5 Tissue-specific expression of PuPiT

具有 12 个疏水的跨膜区域，即包括 6 个 N 端的跨膜区以及 6 个 C 端的跨膜区，中央亲水环位于第 6 个和第 7 个跨膜区之间，且氨基酸 N 端和 C 端均朝向细胞内（图 2）。进一步说明该基因是新的无机磷酸盐转运蛋白基因。

至今为止，无机磷酸盐转运蛋白基因的研究主要集中在酿酒酵母中。在酵母细胞存在一个完整的磷酸盐代谢调控体系，通常称之为 PHO 系统。PHO-89 是酵母里的一种无机磷酸盐转运蛋白。这个转运蛋白有 574 个氨基酸，具有 12 个跨膜结构域<sup>[11-12]</sup>。PHO-89 在低磷环境中会被激活。其利用 Na<sup>+</sup>泵与无机磷酸盐载体蛋白协同作用，将磷运输到细胞质内<sup>[13-14]</sup>供细胞进行各种生理生化过程。

本实验于 7 月份采集猪苓菌核，正处于猪苓菌

核的最佳生长时期，其细胞会快速的分裂增殖，对营养的需求俱增。这个时期猪苓菌核需要外环境中的 C、N、S、P 等元素来满足其生长需求。在实践中，猪苓菌核伴蜜环菌的仿野生栽培技术能使猪苓必须靠蜜环菌才能获得营养物质来完成其菌核的生长过程。本实验通过中荧光定量分析未与蜜环菌共生的猪苓菌核及与蜜环菌共生的猪苓菌核部位 PuPiT 的表达情况。发现这个 PuPiT 在 2 个不同的部位都有表达，但表达量存在明显差异。PuPiT 在共生部位的表达量约为未共生部位表达量的 12 倍。这暗示着在猪苓菌核快速生长时期，PuPiT 基因在共生部位的高表达可能与猪苓细胞吸收外环境中的磷元素以完成细胞增殖有关。目前 PiT 介导的糖转运在微生物-微生物共生中的作用机制尚不清楚。在蜜环菌和猪苓菌核共生过程中，PuPiT 基因如何受蜜环菌诱导？该基因编码蛋白如何起作用？这些科学问题仍需要进一步深入的系统研究。

PiT 作为磷酸盐转运蛋白参与微生物体内磷元素的积累与转移，在微生物的各项生命活动过程中起着重要调控作用。然而，由于 PiT 基因研究起步较晚，在模式微生物中的有限研究已经证实了 PiT 家族成员的多样性及功能的复杂性。本研究后续将鉴定 PuPiT 家族其他成员，并阐明其时空表达特性、结构与功能，为揭示猪苓与蜜环菌共生的科学问题提供重要理论支撑。

参考文献

- [1] Saier M H. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters [J]. *Micro Mol Biol Rev*, 2000, 64(2): 354-411.
- [2] Dickman M B, Yarden O. Serine/threonine protein kinases and phosphatases in filamentous fungi [J]. *Fungal Gene Biol*, 1999, 26(2): 99-117.
- [3] Desai S A. Ion and nutrient uptake by malaria parasite-infected erythrocytes [J]. *Cell Micro*, 2012, 14(7): 1003-1009.
- [4] Torriani A. From cell membrane to nucleotides: the phosphate regulon in *Escherichia coli* [J]. *Bioessays*, 1990, 12(8): 371-376.
- [5] Auesukaree C, Homma T, Tochio H, et al. Intracellular phosphate serves as a signal for the regulation of the PHO pathway in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(17): 17289-17294.
- [6] Tasaki Y, Kamiya Y, Azwan A, et al. Gene expression during Pi deficiency in *Pholiota nameko*: Accumulation of mRNAs for two transporters [J]. *Biosci Biotech Bioch*,

- 2002, 66(4): 790-800.
- [7] Persson B L, Lagerstedt J O, Pratt J R, *et al.* Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Curr Genet*, 2003, 43(4): 225-244.
- [8] Werner A, Kinne R K. Evolution of the Na-Pi cotransport systems [J]. *Am J Physiol-Reg I*, 2001, 280(2): R301-R312.
- [9] Reizer J, Saier M H. Families and superfamilies of transport proteins common to prokaryotes and eukaryotes [J]. *Curr Opin Struc Biol*, 1991, 1(3): 362-368.
- [10] Daram P, Brunner S, Persson B L, *et al.* Functional analysis and cell-specific expression of a phosphate transporter from tomato [J]. *Planta*, 1998, 206(2): 225-233.
- [11] Gras D E, Persinoti G F, Peres N T, *et al.* Transcriptional profiling of *Neurospora crassa*  $\Delta$ mak-2 reveals that mitogen-activated protein kinase MAK-2 participates in the phosphate signaling pathway [J]. *Fungal Genet Biol*, 2013, 60(2): 140-149.
- [12] Sengottaiyan P, Petrlova J, Lagerstedt J O, *et al.* Characterization of the biochemical and biophysical properties of the *Saccharomyces cerevisiae* phosphate transporter Pho89 [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2013, 436(3): 551-556.
- [13] Martinez P, Persson B. Identification, cloning and characterization of a derepressible Na<sup>+</sup>-coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Mol Gen Genet*, 1998, 258(6): 628-638.
- [14] Auesukaree C, Homma T, Kaneko Y, *et al.* Transcriptional regulation of phosphate-responsive genes in low-affinity phosphate-transporter-defective mutants in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2003, 306(4): 843-850.