

角毛壳菌几丁质酶基因 *chi58* 多点突变及在毕赤酵母中的高效表达

王艳君 杨 谦*

(哈尔滨工业大学生命科学与工程系 哈尔滨 150001)

摘 要: 应用重叠延伸 PCR 技术(gene splicing by overlap extension PCR, gene SOEing), 简称 SOE-PCR 对角毛壳菌(*Chaetomium cupreum*)的几丁质酶基因 *chi58* 进行多点突变。依据毕赤酵母密码子偏爱性, 将毕赤酵母中编码 Arg 使用频率几乎为 0 的密码子 CGC 突变为使用频率高的 AGA, 构建了含有正确突变的酵母表达载体 pPIC9K-*chi58A*, 电转化毕赤酵母 GS115, 获得的重组酵母株在诱导 120 h 酶活力最高, 平均可达 101.71 U/mL \pm 3.33 U/mL; 其活力比未优化重组酵母株(31.83 U/mL \pm 4.85 U/mL)提高了约 3 倍, 且经 10 代传代培养后遗传稳定性良好。表达产物的 SDS-PAGE 分析表明, 酶蛋白分子大小为 58 kD。

关键词: 角毛壳菌, 几丁质酶, 多点突变, 毕赤酵母, 高效表达

Chitinase Gene Overexpression of *Chaetomium cupreum* in *Pichia pastoris* by Multi-site Mutations

WANG Yan-Jun YANG Qian*

(Department of Life Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001)

Abstract: By using gene SOEing PCR, Arg (CGC) in the expression fragment of chitinase gene (*chi58*) from *Chaetomium cupreum* was mutated synonymously to Arg (AGA), which is a bias code of *Pichia pastoris* yeast. The expression plasmid pPIC9K-*chi58A* was constructed and transformed into GS115 strain through electroporation. The chitinase activity reached 101.71 U/mL \pm 3.33 U/mL after induced with 120 h, which was the 3 fold of the original strain (31.83 U/mL \pm 4.85 U/mL). Additionally, recombinant yeast showed good genetic stability after 10 cycle. SDS-PAGE analysis suggested that the weight of protein was 58 kD.

Keywords: *Chaetomium cupreum*, Chitinase, Multi-site mutations, *Pichia pastoris*, Overexpression

角毛壳菌(*Chaetomium cupreum*)是一种重要的生物防治真菌, 对多种植物病原菌如: 立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium ox-*

ysparum)、稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*)、玉米黄斑病菌(*Curvularia lunata*)等都有很好的防治作用^[1,2]。几丁质酶(EC3.2.1.14)是催化降解几丁质的一类糖

基金项目: 国家高技术研究发展计划资助项目(No. 2003AA241140); 黑龙江省自然科学基金重点项目(No. ZJN03-04); 黑龙江省科技合作项目(No.WC05B04)

* 通讯作者: Tel: 0451-86412952; 邮箱: yangq@hit.edu.cn

收稿日期: 2008-03-12; 接受日期: 2008-05-14

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

基水解酶, 它可将由 β -1,4-N-乙酰-D-葡糖胺(NAG)残基组成的几丁质降解为低分子量的聚NAG及其几丁寡糖。角毛壳菌在与病原菌对峙过程中能够产生多种类型的抗生素和甾醇类物质; 除此之外, 产生大量的细胞壁降解酶类, 其中包括几丁质酶^[3]。几丁质酶对病原菌细胞壁的主要组成成分 几丁质具有很强的降解作用, 从而达到抑制病原菌生长的目的。

几丁质酶及其几丁寡糖已成为新型生物农药研究和开发的靶点, 也广泛应用于医药、化工、食品、纺织、印染、造纸等领域。用酸碱法提取制备几丁质相关产品易造成严重的环境污染, 生物酶法是替代酸碱法制备几丁寡糖且无污染的新方法; 但由于几丁质酶的生产菌株表达量低、生产成本昂贵, 因此, 难以获得大量产品。以天然菌株进行改良或通过基因工程及蛋白质工程技术获得基因工程菌, 是目前获得高产几丁质酶的主要手段。本研究使用的巴斯德毕赤酵母表达系统(*Pichia pastoris*)已成功表达了多种来源于原核及真核生物的蛋白质^[4], 其外源蛋白的表达量可达 g/L 的水平; 密码子偏爱性改造是提高目的蛋白在宿主细胞中表达量的有效方法, 能够提高目的蛋白表达量 10 倍~50 倍; 将这一基因工程手段应用到生产几丁质酶领域具有重要意义。目前, 有关生物防治真菌几丁质酶的密码子偏爱性改造未见报道。实现 *chi58* 在毕赤酵母中的高效表达将大幅度提高几丁质酶的发酵效价, 进一步降低几丁质酶的生产成本。

本课题组已将来源于角毛壳菌的几丁质酶基因 *chi58* 构建到毕赤酵母表达载体中并获得了高表达几丁质酶的基因工程菌(另文报道)。为进一步提高几丁质酶在毕赤酵母中的表达量, 依据毕赤酵母的密码子偏爱性, 在不改变氨基酸组成的情况下, 优化了 *chi58* 基因在酵母中高效表达起关键作用的 5 个 Arg 密码子, 构建了酵母表达载体并电击转化毕赤酵母, 获得了高效表达的转化子。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109、毕赤酵母 GS115、角毛壳菌(*C. cupreum*)由

本实验室保存。质粒 pMD18-T-*chi58*、pPIC9K-*chi58* 为本实验室构建。

1.1.2 工具酶和试剂: DNA 分子量标准、限制性内切酶、T4 DNA ligase、PyrobestTM DNA Polymerase、TaKaRa DNA Kination Kit、pSIMPLE18-T 均购自宝生物工程(大连)有限公司。蛋白质分子量标准购自上海生物工程技术服务有限公司。胶回收试剂盒购自上海华舜公司。引物由北京英俊基因技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 *chi58* 基因改造及突变体构建: 根据 *C. cupreum* 的几丁质酶 *chi58* 成熟蛋白基因的核苷酸序列, 参考赵翔等^[5]对 *P. pastoris* 密码子用法分析结果, 在不改变其氨基酸序列组成的前提下进行序列的分子改造。将全基因分为 A(779 bp)、B(246 bp)、C(484 bp) 分别扩增, 全基因合成采用重叠区扩增基因拼接法^[6]。利用 DNAMAN5.2.2 软件分析 *chi58* 基因密码子组成, 发现有 5 处相距很近的 Arg, 含有在 *P. pastoris* 中使用频率几乎为 0 的密码子 CGC, 产生的瓶颈效应可能影响其在 *P. pastoris* 中的高效表达。本实验拟突变第 290 位、292 位、294 位、370 位和 377 位 Arg 的稀有密码子, 突变结果为: CGC→AGA。根据 *chi58* 序列和目的突变位点设计 3 对引物(表 1), 分成 A、B、C 片段, 最终合成优化后的基因, 命名为 *chi58A*。斜体为突变位点, 下划线处为引入的限制性内切酶 *EcoR* 和 *Not* 识别位点。以本实验室构建的 pMD18-T-*chi58* 为模板(表 2), 分别扩增 A、B、C 片段。将扩增得到的 3 个突变片段分别用琼脂糖凝胶电泳纯化回收后等体积混合, 加入 dNTP、10×Pyrobest buffer、PyrobestTM DNA 聚合酶, 按以下条件进行循环: 94°C 30 s; 60°C 2 min; 72°C 3 min, 8 个循环后, 向体系中加入 Pn1 和 Pn6 引物, 按以下条件扩增: 94°C 30 s; 60°C 30 s; 72°C 5 min, 20 个循环。扩增结束后, 琼脂糖凝胶电泳纯化回收 *chi58A* 片段, 送交测序公司, 比较验证突变结果正确后继续后续试验。按照 TaKaRa DNA Kination Kit 操作步骤, 5'末端磷酸化后将其克隆到 pSIMPLE-18*EcoR* /BAP 载体上, 转化 *E. coli* JM109 得到阳性重组克隆, 命名为 pSIMPLE18T-*chi58A*。

表 1 目的片段扩增所用引物
Table 1 Primers for fragments amplification

引物名称(Primer)	序列(Sequence) (5'-3')	退火温度(Tm)
Pn1(Left arm)	GACCGGAATTCAGCACGAGGCAAAAGCTCT	57.6
Pn2(Right arm)	TTGAGTCTCGCTCTTAGTCTCTTGAGCAGGTTGACG	56.9
Pn3(Left arm)	GCTCAAGAGACTAAGAGCGAGACTCAACAGCATC	58.8
Pn4(Right arm)	ACTCTCTCGGGGTTGATGTTGTTTCTCCAAAGCAGC	57.2
Pn5(Left arm)	GGAGAAACAACATCAACCCGAGAGAGTCAACC	59.1
Pn6(Right arm)	CCAGCGGCCGCTTAAGTCTCTGAAATCGATGT	58.7

表 2 待融合片段扩增的反应条件及扩增产物长度
Table 2 Cycling parameters of PCR amplification and the length of starting materials

待融合片段 Fusion fragments	上游引物 Up-primer	下游引物 Down-primer	模板 Template	反应条件 Parameters of PCR amplification
A-779 bp	Pn1	Pn2	pMD18-T- <i>chi58</i>	94°C 30 s, 56.8°C 30 s, 72°C 1 min
B-246 bp	Pn3	Pn4	pMD18-T- <i>chi58</i>	94°C 30 s, 57.2°C 30 s, 72°C 1 min
C-484 bp	Pn5	Pn6	pMD18-T- <i>chi58</i>	94°C 30 s, 58.5°C 30 s, 72°C 1 min

1.2.2 酵母表达质粒 pPIC9K-*chi58A* 的构建: 将重组质粒 pSIMPLE18T-*chi58A* 与 pPIC9K 载体分别经 *EcoR*、*Not* 双酶切后, 回收目的片段, 连接、转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 筛选阳性转化子, 双酶切鉴定, 命名为 pPIC9K-*chi58A*。

1.2.3 酵母细胞的转化、表型鉴定: 将 *Sal* 线性化的 pPIC9K-*chi58A* 质粒电击法转化毕赤酵母 GS115, 转化物涂布于 MD 平板, 28°C~30°C 培养 2 d~3 d。将 MD 平板上生长的转化菌落分别点种到 MM 和 MD 平板上的相应位置, 28°C~30°C 培养 2 d~3 d, 根据菌落在 MM 平板上的生长情况, 鉴定转化子的表型。在 MM 平板上生长正常的转化子是 Mut⁺型转化子, 而在 MM 平板上生长迟缓的转化子是 Mut^s型转化子。用含有不同浓度 G418 的 YPD 平板筛选多拷贝整合的转化子。

1.2.4 酵母基因组提取及 PCR 鉴定: 挑取生长良好的阳性菌落, 按照 Invitrogen 操作手册提取酵母基因组, 设计合成一对引物 F₁: CACCTCGTCGTGCGACTACAAG; F₂: GGCAAATGGCATTCTGACATCC TC。用于重组载体及重组酵母菌的鉴定。其中, F₁ 位于插入片段 *chi58A* 基因区, F₂ 为 3'AOX 基因区, 扩增片段长度约为 1600 bp。

1.2.5 外源基因在酵母中的诱导表达: 将含有 *chi58A* 的重组酵母菌接入 BMGY 培养液中, 250 r/min, 28°C~30°C 培养至 OD₆₀₀ 达 2~6, 室温 3000 × g 离心收集菌体, 重悬于 BMMY 培养基, 继

续振荡培养, 每 24 h 补加 100%甲醇至终浓度 0.5%, 并取出 1 mL 培养液用于 SDS-PAGE 电泳检测蛋白表达情况。

1.2.6 几丁质酶活性及其蛋白含量测定: 几丁质酶活性测定方法采用改良的 Schales 法^[7], 根据绿色的铁氰酸离子能被还原糖还原成无色的亚铁氰酸离子, 使还原糖含量与反应液的颜色强度成比例关系。以每小时产 1 μg 的 N-乙酰氨基葡萄糖的量定义为一个酶活性单位; 蛋白含量测定采用 Bradford 法^[8]。

1.2.7 重组酵母的遗传稳定性: 转化子生长、诱导表达一个周期之后, 取 1 mL 发酵液作为下一次诱导表达的种子液继续培养, 共进行 10 次传代培养, 分别测定每次的几丁质酶活性。

2 结果

2.1 *chi58* 基因改造及突变体构建

SOE-PCR 扩增的 PCR 产物片段大小约为 1500 bp(图 1), 在含有 Amp 的 LB 平板上筛选得到阳性克隆 pSIMPLE18T-*chi58A*, 送上海博亚生物公司测序, 将突变前后序列进行比对证实, *chi58* 基因氨基酸序列中第 290 位、292 位、294 位、370 位和 377 位编码 Arg 的密码子 CGC 都突变为 AGA; 而氨基酸的序列无变化, 且没有引入其他突变, 与实验设计结果完全一致。

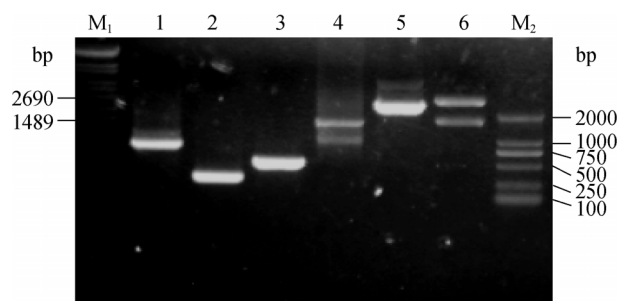


图1 SOE-PCR 扩增与 pSIMPLE18T-*chi58A* 的酶切分析

Fig. 1 SOE-PCR amplification and enzyme restriction analysis of pSIMPLE18T-*chi58A*

M₁: DNA Marker λ -EcoT14 I; 1: 扩增片段 A-779 bp; 2: 扩增片段 B-246 bp; 3: 扩增片段 C-484 bp; 4: SOE-PCR 产物 *chi58A*-1509 bp; 5: pSIMPLE18T-*chi58A*; 6: pSIMPLE18T-*chi58A* 经 *EcoR* I / *Not* I 双酶切结果; M₂: DNA Marker DL2000

M₁: DNA Marker λ -EcoT14 I; 1: 779 bp product A amplified by primer pair pn1 and pn2; 2: 246 bp product B amplified by primer pair pn3 and pn4; 3: 484 bp product C amplified by primer pair pn5 and pn6; 4: 1509 bp product *chi58A* amplified by SOE-PCR; 5: Vector pSIMPLE18T-*chi58A*; 6: pSIMPLE18T-*chi58A* digested by *EcoR* and *Not*; M₂: DNA Marker DL2000

2.2 酵母重组表达质粒的构建

pSIMPLE18T-*chi58A* 重组质粒和 pPIC9K 载体经 *EcoR*、*Not* 双酶切后, 经过回收、连接、转化, 在含有 Amp 的 LB 平板上筛选抗性菌落, 经 *EcoR*、*Not* 双酶切鉴定, 证实重组表达质粒 pPIC9K-*chi58A* 的构建是正确的(图 2)。

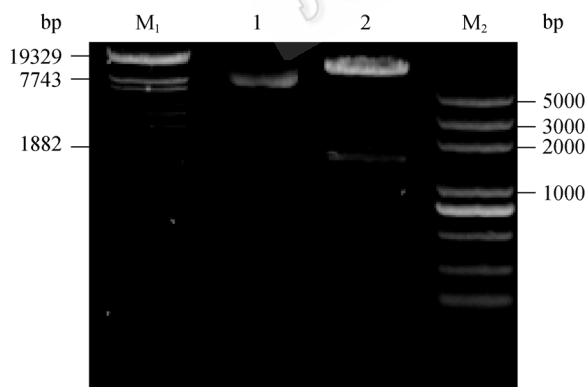


图2 pPIC9K-*chi58A* 质粒的酶切分析

Fig. 2 Enzyme restriction analysis of pPIC9K-*chi58A*

M₁: DNA Marker λ -EcoT14; 1: pPIC9K-*chi58A* 质粒; 2: pPIC9K-*chi58A* 经 *EcoR* I / *Not* I 双酶切结果; M₂: DNA Marker DL2000

M₁: DNA Marker λ -EcoT14; 1: Plasmid pPIC9K-*chi58A*; 2: pPIC9K-*chi58A* digested by *EcoR* and *Not*; M₂: DNA Marker DL2000

2.3 酵母转化子 His⁺Mut⁺型鉴定及 G418 筛选

通过电转化法将 *Sal* 线性化的 pPIC9K-*chi58A* 质粒转化入毕赤酵母 GS115, 转化物涂布 MD 平板。GS115 为组氨酸缺陷型, 只有 pPIC9K 整合到染色体上的酵母重组子才能在不含有组氨酸的 MD 培养基上生长。本实验获得了 300 多个克隆, 挑选其中 100 个克隆进行表型鉴定, 63 个为 His⁺Mut⁺转化子。在含有不同浓度 G418 的 YPD 平板筛选多拷贝整合的转化子, 最高抗性为 3.0 mg/mL。

2.4 酵母转化子的鉴定

任意选取 7 个在 3.0 mg/mL G418 平板上生长良好的酵母转化子进行 PCR 鉴定, 分析表明: 7 个转化子 pp-chiA-39、pp-chiA-38、pp-chiA-35、pp-chiA-7、pp-chiA-17、pp-chiA-22、pp-chiA-16 均扩增出约 1600 bp 片段(图 3), 与目的基因大小相符, 证明目的基因整合到酵母基因组中。

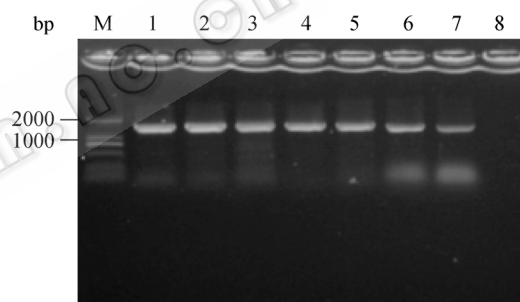


图3 重组酵母的 PCR 分析

Fig. 3 PCR analysis of recombination yeast

M: DNA Marker DL2000; 1: 重组酵母株 pp-chiA-39; 2: 重组酵母株 pp-chiA-38; 3: 重组酵母株 pp-chiA-35; 4: 重组酵母株 pp-chiA-7; 5: 重组酵母株 pp-chiA-17; 6: 重组酵母株 pp-chiA-22; 7: 重组酵母株 pp-chiA-16; 8: 原始酵母菌株 GS115

M: DNA Marker DL2000; 1: Recombinant yeast pp-chiA-39; 2: Recombinant yeast pp-chiA-38; 3: Recombinant yeast pp-chiA-35; 4: Recombinant yeast pp-chiA-7; 5: Recombinant yeast pp-chiA-17; 6: Recombinant yeast pp-chiA-22; 7: Recombinant yeast pp-chiA-16; 8: GS115

2.5 重组酵母表达产物的 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 分析结果表明, 重组酵母分泌了 58 kD 左右的重组蛋白进入培养液中(图 4), 与天然蛋白质大小一致。而阴性对照无此条带, 说明 *chi58* 基因在毕赤酵母 GS115 中得到了正确表达和修饰。

2.6 几丁质酶活性检测及蛋白含量分析

任意选取优化改造前、后的酵母转化子各 6 株

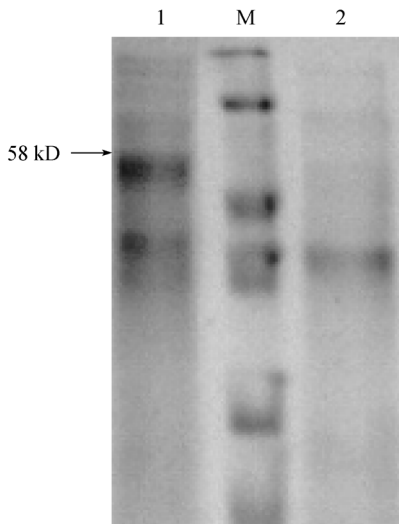


图 4 毕赤酵母转化子 SDS-PAGE 分析结果

Fig. 4 SDA-PAGE analysis of *P. pastoris* transformants

1 : 重组酵母株 pp-chi58A-39; M : 蛋白质分子量标准(116 kD, 66 kD, 45 kD, 31 kD, 20.1 kD, 14.4 kD); 2 : 含 pPIC9K 空载体的毕赤酵母 GS115 转化子

1: Recombinant yeast pp-chi58A-39; M: Protein marker (116 kD, 66 kD, 45 kD, 31 kD, 20.1 kD, 14.4 kD); 2: Transformed GS115 strain of empty vector

进行酶活性测定, 产酶高峰出现在诱导后的第 120 h, 以下数据均在第 120 h 测定。优化后的酵母株平均酶活性为 101.71 U/mL±3.33 U/mL, 平均蛋白表达量为 492.76 μg/mL±3.57 μg/mL; 未优化重组酵母株平均酶活性为 31.83 U/mL±4.85 U/mL, 平均蛋白表达量为 194.26 μg/mL±3.15 μg/mL。从中可以看出, 酶活性提高约 3 倍。通过 12 株转化子发酵上清液中重组蛋白含量的比较表明, 优化后的重组酵母株比未优化的酵母株发酵液中蛋白含量相应提高了 2 倍~3 倍(表 3)。综合分析, 密码子优化后的酵母株分泌到胞外的几丁质酶活性及其蛋白含量均获得了明显提高。

2.7 重组酵母的遗传稳定性分析:

任意选取优化前、后的重组株进行 10 代代后的酶活性分析(表 4), 两种基因工程菌株的遗传稳定性良好, 对工业化生产中进行大规模发酵及其菌株连续培养具有重要意义。

表 3 优化前后转化子的几丁质酶活性及蛋白含量比较					
重组酵母株		蛋白含量		几丁质酶活性	
Recombinant yeast		Protein content (μg/mL)		Chitinase activity (U/mL)	
pp-chiA-39	pp-chi-8	500.12±3.12	181.77±1.88	105±2.73	31±7.22
pp-chiA-38	pp-chi-46	491.75±4.32	207.23±3.56	103.5±3.26	35±5.36
pp-chiA-35	pp-chi-122	494.22±2.85	180.22±3.74	102.8±5.22	29±6.23
pp-chiA-13	pp-chi-116	500.78±2.71	200.15±4.23	104±2.36	33±2.51
pp-chiA-19	pp-chi-11	487.57±4.26	219.18±2.15	100±2.31	39±3.26
pp-chiA-21	pp-chi-12	482.14±4.15	177.03±3.32	95±4.12	24±4.53
平均值(Average)		492.76±3.57	194.26±3.15	101.71±3.33	31.83±4.85

表 4 转化子 pp-chiA-39 和 pp-chi-11 不同传代后的酶活性比较		
Table 4 Comparison of chitinase activities between different generation of pp-chiA-39 and pp-chi-11		
重组酵母株	几丁质酶活性	
	Chitinase activity (U/mL)	
Recombinant yeast	第 1 代转化子 1 st generation	第 10 代转化子 10 th generation
pp-chiA-39	105±2.73	101±3.41
pp-chi-11	39±3.26	37±1.45

3 讨论

本研究通过改进引物设计和使用高保真酶等方

法, 应用重叠延伸 PCR 原理实现了对 *chi58* 基因的多点突变并构建了突变体。实验证明了此种方法简便、快捷、经济且突变准确。首先, 引物设计是该方法成功的关键, 每对突变引物的重叠碱基均在 25 bp 以上, 保证了上、下游片段突变重叠区域的长度, 提高了突变的成功率; 其次, 突变引物的退火温度也是重叠延伸 PCR 反应成功的重要因素, 一般在同一反应体系中使用的一对引物之间的退火温度应尽量接近, 从而降低了引入非特异性片段的可能性; 最后, 采用高可信度的 Pyrobest DNA 聚合酶, 在多点突变成功的基础上, 保证了除突变碱基以外的核苷酸组成的准确性, 为后续试验奠定了可靠的

基础。

赵翔^[5]等分析了毕赤酵母的优势密码子, 外源蛋白在毕赤酵母中表达时, 如果外源基因中含有稀有密码子则在翻译过程中会产生瓶颈效应从而影响外源基因的表达。在毕赤酵母众多的密码子中, Arg 在其同义密码子的选择上偏爱性最大, 编码 Arg 的 6 个密码子中有 3 个(CGC、CGA、CGG)使用频率为 0, 而其偏爱的密码子 AGA 的相对使用频率很高, 为 4.88, 是毕赤酵母氨基酸同义密码子使用频率最高的一个; 当 2 个稀有密码子相距很近时, 严重影响翻译的速度^[9]。酵母中表达量较高的基因往往采用的都是酵母所偏爱的密码子, 在所有的 61 个密码子中, 有 19 个~25 个是酵母所偏爱的密码子, 高表达的基因几乎毫无例外地使用这 25 个偏爱的密码子^[5,10]。例如, *P. pastoris* 表达植酸酶时, 把酵母使用频率低的精氨酸密码子突变为使用频率较高的密码子, 可使表达量提高 37 倍^[11]。张素芳等^[12]也选用毕赤酵母偏爱密码子, 设计合成了新型抗菌肽基因, 建立了高效表达的体系。本研究通过改造编码精氨酸的密码子明显提高了几丁质酶的活性, 在编码 *chi58* 基因中尚存在毕赤酵母稀有使用的密码子; 例如, 编码 Pro 的密码子 CCG、Gly 的密码子 GGG 等在毕赤酵母高表达基因中的使用频率为零, 有可能影响该酶在毕赤酵母中的表达量。因此, 将编码几丁质酶的 *chi58* 基因全序列中稀有密码子进行改造, 可能大幅度提高几丁质酶在毕赤酵母中的表达量。

阎瑞香等在毕赤酵母中成功表达了来源于植物的几丁质酶基因, 在与本研究相同的酶活性测定条件下, 通过优化发酵条件获得了最高几丁质酶活性为 49.58 U/mL^[13], 本研究构建的基因工程菌株仅在粗酶液中就获得了很高的几丁质酶活性, 表达几丁质酶活性为 31.83 U/mL \pm 4.85 U/mL, 经密码子改造优化后的几丁质酶活性为 101.71 U/mL \pm 3.33 U/mL, 后期将通过发酵条件优化及其蛋白质纯化等方法提高酶活性。另外, 通过前期构建 *chi58* 酿酒酵母表达系统, 对比几丁质酶活性及其蛋白表达量发现, 毕赤酵母表达系统明显优越于酿酒酵母表达系统, 为工业化生产几丁质酶提供了良好的候选菌株。

本实验通过 SOE-PCR 方法快速、准确地实现了

几丁质酶基因 *chi58* 的密码子偏爱性改造, 提高了该基因在毕赤酵母中的表达量, 构建了高效表达几丁质酶的基因工程菌, 为几丁质酶的大规模发酵及工业应用奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Soyong K. Biological control and biotechnology. 1st. Harbin: Heilongjiang Science and Technology Press, 2003, pp. 70–85.
- [2] Yang Q. Biological control and biotechnology. 1st. Harbin: Heilongjiang Science and Technology Press, 2003, pp. 25–36.
- [3] Inglis GD, Kawchuk LM. Comparative degradation of oomycete, ascomycete, and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. *Can J Microbiol*, 2002, **48**: 60–70.
- [4] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, **24**: 45–66.
- [5] 赵翔, 霍克, 李育阳. 毕赤酵母的密码子用法分析. *生物工程学报*, 2000, **16**(3): 308–311.
- [6] Aiyar A, Xiang Y, Leis J. Site-directed mutagenesis using overlap extension PCR. *Methods Mol Biol*, 1996, **57**: 177–191.
- [7] Imoto T, Yagishita K. A simple activity measurement of lysozyme. *Agric Biol Chem*, 1971, **35**: 1154–1156.
- [8] Ausubel FM. 精编分子生物学实验指南(第四版). 北京: 科学出版社, 2005, pp. 377–378.
- [9] 时成波, 吕安国, 吴文芳, 等. 改造稀有密码子提高 SEA 蛋白表达量. *生物工程学报*, 2002, **18**(4): 477–480.
- [10] Hoekema A, Kastelein RA, Vasser M, et al. Codon replacement in the PGK1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: experimental approach to study the role of biased codon usage in gene expression. *Mol Cell Biol*, 1987, **7**: 2914–2924.
- [11] 姚斌, 张春义, 王建华, 等. 高效表达具有生物学活性的植酸酶的毕赤酵母. *中国科学(C 辑)*, 1998, **28**(3): 237–243.
- [12] 张素芳, 贾赟, 蔡梅红, 等. Magainin 和 cecA-mil 抗菌肽基因的密码子优化及在毕赤酵母中的高效表达. *中国生物工程杂志*, 2004, **24**(7): 93–97.
- [13] 阎瑞香, 吴仲, 侯建华, 等. 重组巴斯德毕赤酵母发酵生产几丁质酶的条件优化研究. *微生物学通报*, 2007, **34**(3): 468–471.