

# 一种适用于产朊假丝酵母的基因敲除系统及其在 *gsh1* 基因敲除中的应用

张君丽<sup>1</sup> 卫功元<sup>1\*</sup> 董红军<sup>2</sup> 朱泰承<sup>2</sup> 李寅<sup>2</sup>

(1. 苏州大学医学部基础医学与生物科学学院 江苏 苏州 215123)

(2. 中国科学院微生物研究所 北京 100101)

**摘要:** 报道一种适用于产朊假丝酵母 *Candida utilis* 的基因敲除系统, 利用该敲除系统获得 *gsh1* 基因敲除杂合突变株。根据不同种属酵母菌  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶( $\gamma$ -GCS)蛋白质的保守序列, 克隆 *C. utilis* SZU 07-01 的 *gsh1* 基因; 以商品化质粒 pPICZalpha A 为基础, 构建 *gsh1* 基因的敲除载体 pPICZalpha A-kan 3, 其中, *kan* 基因的启动子 *TEF* 被替换为来自于 *C. utilis* SZU 07-01 的 *GAP* 启动子(*pGAP: kan*)。质粒电转化 *C. utilis*, 获得 *gsh1* 基因敲除杂合突变株 *C. utilis* GSH-6。结合发酵培养得到的数据进行分析, 突变株的  $\gamma$ -GCS 酶活比出发菌株降低 17.5%, GSH 合成量降低 61%, 细胞干重降低 18.5%。所构建敲除组件 *pGAP: kan* 的成功应用为从分子水平研究 *C. utilis* 中谷胱甘肽(GSH)的生理功能提供了一种新借鉴。

**关键词:** 基因敲除, *gsh1* 基因, 产朊假丝酵母, 谷胱甘肽,  $\gamma$ -GCS 酶活

## A new knocking-out system in *Candida utilis* and its application on disrupting the *gsh1* gene

ZHANG Jun-Li<sup>1</sup> WEI Gong-Yuan<sup>1\*</sup> DONG Hong-Jun<sup>2</sup> ZHU Tai-Cheng<sup>2</sup> LI Yin<sup>2</sup>

(1. School of Basic Medicine and Biological Science, College of Medicine, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China)

(2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** In this study, we report a novel system of gene knocking-out in *C. utilis* SZU 07-01 by successfully disrupting the gene of *gsh1*. First of all, the *gsh1* (encoding  $\gamma$ -GCS protein) gene was cloned by genome walking method from *C. utilis* SZU 07-01 according to  $\gamma$ -GCS protein conservative sequences among several different yeasts. Then, the disrupting vector, pPICZalpha A-kan 3 was constructed on the basis of plasmid pPICZalpha A, whose original *TEF* promoter responding for kanamycin

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 20906065); 江苏省属高校自然科学基金项目(No. 09KJB530009)

\* 通讯作者: Tel: 86-512-65880421; Fax: 86-512-65880103; ✉: weigy@suda.edu.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>  
收稿日期: 2010-10-09; 接受日期: 2010-12-15

cin resistance gene (*kan*) transcription was replaced by *GAP* promoter (*pGAP*) isolated from *C. utilis* SZU 07-01. pPICZalpha A-kan 3 was linearized and then transformed into *C. utilis*, resulting in a *gsh1* deleted heterozygotic mutant strain designated as GSH-6. After cultured in the same condition, the mutant deficient in glutathione biosynthesis showed decreases of 17.5%, 61%, 18.5% in  $\gamma$ -GCS activity, glutathione content and dry cell weight, respectively. The disruption element (*pGAP: kan*) used in this study supplies a new gene genetic manipulation approach to research the physiological function of GSH in *C. utilis* at a molecular level.

**Keywords:** Gene knockout, *gsh1* gene, *Candida utilis*, Glutathione,  $\gamma$ -GCS activity

产朊假丝酵母 *C. utilis* 是一种重要的工业微生物,能够同时利用来源于生物质中的己糖和戊糖生产重要发酵产品,如有机酸(丙酮酸、 $\alpha$ -酮戊二酸等)、氨基酸、功能性多肽(谷胱甘肽)、重要酶制剂和木糖醇等<sup>[1]</sup>,已被美国 FDA 认证为可作为食品添加剂的酵母<sup>[2]</sup>。*C. utilis* 作为工业领域的重要生产菌种,与酿酒酵母和毕赤酵母相比具有明显的优势,它作为一种 Crabtree 效应(醇解抑制有氧氧化)阴性微生物,在利用葡萄糖进行严格好氧代谢时不产生或很少产生乙醇;它生长速度快、容易实现高密度培养;同时具有利用更为广泛底物糖类的能力,且代谢阻遏效应不明显<sup>[1]</sup>,因而成为合成生物活性产品理想的细胞工厂<sup>[1]</sup>。但是,对于 *C. utilis* 的研究,一直以来主要集中在如何优化发酵条件促进菌体生长以获得最大的细胞得率上<sup>[1]</sup>,以及如何控制细胞代谢以实现目的产物的高效生产上<sup>[2]</sup>,而针对 *C. utilis* 菌株的遗传改造、代谢工程改造等工作才刚刚起步。

从基因水平对 *C. utilis* 菌株进行改造,需要一整套有效的分子操作体系,包括关键基因的过表达、敲除等。目前,对于基因过表达的研究有很多,如利用 *Candida utilis* 作为基因工程宿主菌,已经成功地表达了许多功能蛋白,如木聚糖酶<sup>[3]</sup>、莫内林(Monellin)、 $\alpha$ -淀粉酶( $\alpha$ -Amylase)、番茄红素(Lycopene)等<sup>[4-7]</sup>。与之相比,目前对于 *C. utilis* 进行基因敲除的报道很少,Ikushima 等<sup>[8]</sup>利用 Cre-*loxP* 系统对 *C. utilis* 中 *CuURA3* 基因进行了敲除,该敲除系统对多倍体的敲除,尤其是对于食品酵母基因的无痕敲除会有很重要的应用价值,但是 Cre-*loxP* 构建

较为复杂,且受到构建原件的限制。因此,有必要探索一种用于 *C. utilis* 基因敲除的简单、有效的方法,用实验室或者商品化的质粒可以构建的敲除系统,以满足对于 *C. utilis* 基础研究和菌株改造的需求。

$\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶( $\gamma$ -GCS)是谷胱甘肽(GSH)生物合成过程中的限速酶<sup>[9-11]</sup>,对 *gsh1* 的敲除将有利于进一步研究 GSH 的保护机制。本研究以  $\gamma$ -GCS 基因(*gsh1*)的敲除为例,以商品化质粒 pPICZalpha A 为基础,用 *C. utilis* 本身的 *GAP* 启动子代替载体 *TEF* 启动子,构建了 *gsh1* 基因敲除载体 pPICZalpha A-kan 3,对 *C. utilis* 中 *gsh1* 基因进行敲除。该基因敲除方法的建立为 *C. utilis* 的遗传学操作提供了一种新的可行的方法,同时也为分子水平 GSH 保护机制的进一步研究提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种和培养基

产朊假丝酵母 *C. utilis* SZU07-01,大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,质粒 pPICZalpha A、ppic9k 为本实验室保存。YPD 培养基:酵母粉 1%,蛋白胨 2%,葡萄糖 2%。若为筛选培养基,加入 G418 (Geneticin),使其在培养基中的终浓度为 100 mg/L。LB 培养基:蛋白胨 1%,酵母粉 0.5%,NaCl 1%。发酵培养基:葡萄糖 3%,硫酸铵 0.8%,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3%,MgSO<sub>4</sub> 0.025%,pH 5.5。

### 1.2 试剂和重组 DNA 技术

各种限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、Primer star、T4 DNA 连接酶、牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)和 Genome walking 试剂盒均购自大连 TaKaRa 公司。

质粒提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司。研究中使用的引物(表 1)全部由生工生物工程(上海)有限公司合成。基因测序由 Invitrogen 公司完成。

表 1 PCR 引物序列	
Table 1 The sequences of PCR primers used in plasmid construction	
引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')
gsh1 772	GGTCATATTTATATGGATTCTATGGGTTY GGNATGGG
gsh1 1338	TCAAAGTTTGCCAATTAGTAGATTGAADR TTYTCRAA
gsh1 1105	GCTCTAGACTCCATTCTGCCTGTCTT
gsh1 1288	CGCGGATCCTCTCCACGTACAAGTAGTTC
gsh1 46	GAAGATCTGACTTATCGCCAAAGGGTA
gsh1 3231	ATTTGCGGCCGCTGGCTTGAGCTGTCTTG GT
gap1	CGCGGATCCAAGCTTACAGCGAGCACTCA AATC
gap2	CATGCCATGGTATGTTGTTTGTAAAGTGTG TTTG
kan 1	AATTCATGGATGAGCCATATCAACGGGA AACGCTTGCTCAAGG
kan 2	CTCCGAGGCTGGGACCCGTGGGCCCGCT CGGACGTGTTAGAAAACTCATCGAGCAT
1075	CACCACGCTCATTGCCCCCA
kan 195	TCATTGGCAACGCTACCT
kan 706	ATGGAAGTGCCTCGGTGAG
2996	GTTTTTGGTCTTTGGGGTT

### 1.3 *gsh1* 基因敲除组件的构建

**1.3.1 *gsh1* 基因的克隆:** 对酵母菌属不同物种的  $\gamma$ -GCS 蛋白质序列进行比对, 找到相对保守的氨基酸序列, 设计引物, 获得 *gsh1* 部分基因片段, 然后根据染色体步移获得 *gsh1* 基因全序列。

**1.3.2 酵母 *GAP* 启动子的克隆:** 以 *C. utilis* 基因组为模板, 用引物 gap1/gap2 进行 PCR, 获得酵母 *GAP* 启动子基因片段。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。回收目的片段连接至载体 pMD18-T simple vector 进行测序分析。

**1.3.3 *kan* 和 *Amp* 基因的克隆:** 以质粒 ppic9k 为模板, 用引物 kan 1/kan 2, 获得 *kan* 基因片段。用 *Bgl* II

酶切质粒 ppic9k, 获得含有 *Amp* 基因片段。

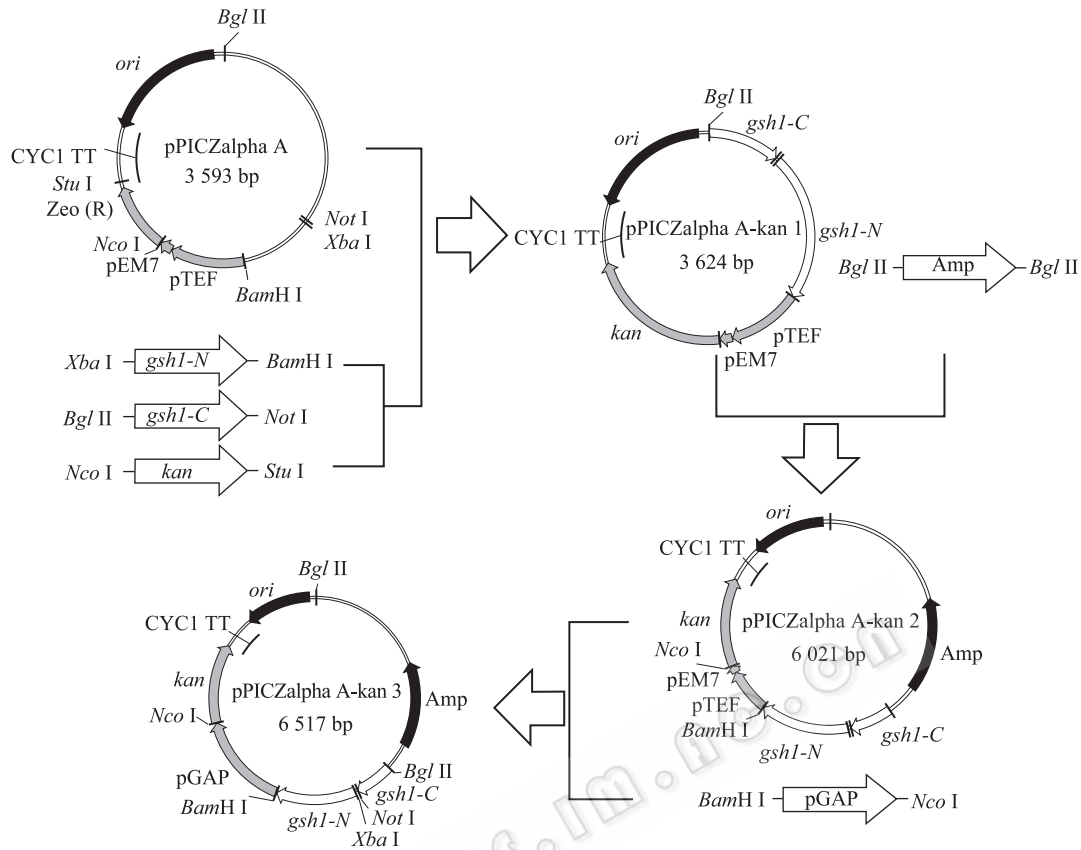
**1.3.4 *gsh1* 基因敲除组件的构建:** 以 *C. utilis* 基因组为模板, 分别用引物 gsh1 1105/gsh1 1288、gsh1 46/gsh1 3231 获得与 *gsh1* 基因 N 端和 C 端同源的序列 800 bp (gsh1-N, 其中含编码框 300 bp) 和 400 bp (gsh1-C)。用引物 kan 1/kan 2 从载体 ppic9k 中获得 *kan* 基因, 通过酶切连接连入质粒 pPICZalpha A (3 593 bp), 获得质粒 pPICZalpha A-kan 1 (3 624 bp)。质粒 pPICZalpha A-kan 1 和含有 *Amp* 基因的片段分别用 *Bgl* II 酶切, 连接获得质粒 pPICZalpha A-kan 2 (6 021 bp), pPICZalpha A-kan 2 和 *GAP* 基因片段分别用 *Bam*H I 和 *Nco* I 酶切, 连接获得质粒 pPICZalpha A-kan 3 (6 517 bp) (图 1)。质粒 pPICZalpha A-kan 3 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 提取质粒经测序分析验证后保存备用。

### 1.4 酵母电转方法<sup>[12-13]</sup>转化 *C. utilis*

将酵母细胞接种到 200 mL YPD 培养基中, 培养至对数期(约 10<sup>8</sup> 个细胞/mL) 时回收细胞, 用无菌水洗涤 2 次, 然后再用 1 mol/L 山梨醇溶液洗涤 1 次(约 10<sup>10</sup> 个细胞/mL)。将 50  $\mu$ L 酵母细胞(包含 5  $\mu$ L 线性化的质粒 DNA) 转移至 0.2 cm 的电转杯用于电转化。转化条件: 电压 750 V, 电阻 800  $\Omega$ , 电容 25  $\mu$ F (Bio-Rad Gene Pulser)。电转化后, 在电转杯中加入 1 mL YPD 培养基, 将混合物转移至离心管中, 在 30 °C 摇床中振荡培养 6 h。再涂布于 YPD 平板中(G418, 100 mg/L), 30 °C 培养 3 d。

### 1.5 GSH 测定和 $\gamma$ -GCS 酶活检测

将 *gsh1* 基因敲除突变株和出发菌株分别接种至发酵培养基中, 于摇瓶中 30 °C 振荡培养 30 h。取 10 mL 发酵液, 3 500 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 湿细胞用 40% (V/V) 乙醇萃取 2 h (30 °C), 离心后得到的上清液用于 GSH 测定。同时, 取 15 mL 发酵液, 3 500 r/min 离心 10 min 后, 湿细胞用 0.05 mol/L 的 Tris-HCl (pH 7.0) 缓冲溶液洗涤 2 遍, 然后对湿细胞进行超声波破碎, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用于  $\gamma$ -GCS 酶活检测。 $\gamma$ -GCS 酶活检测方法见文献[14]。1 个  $\gamma$ -GCS 酶活单位定义为: 每小时每毫克蛋白生成 1  $\mu$ mol 磷酸所需要的酶量。

图1 *gsh1* 基因敲除组件的构建Fig. 1 Construction of *gsh1* gene replacement cassette

## 2 结果

### 2.1 *gsh1* 基因的克隆

*C. utilis* 中 *gsh1* 基因序列到目前为止还没有公布, 因此如果要敲除 *C. utilis* 中的 *gsh1* 基因, 首先必须要搞清 *gsh1* 全基因的序列。为此, 通过对不同属和种的各种酵母菌的  $\gamma$ -GCS 蛋白质同源序列进行比对 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), 获得了保守氨基酸序列 MGFMG 和 QSTNWQ (图 2)。在此基础上, 设计引物 *gsh1* 772/*gsh1* 1338 (表 1, 由 CODEHOP 软件在线设计<sup>[15]</sup>, [http://blocks.fhcr.org/blockmkr/make\\_blocks.html](http://blocks.fhcr.org/blockmkr/make_blocks.html)), 以 *C. utilis* 基因组为模板, 获得部分 *gsh1* 片段(614 bp, 图 3A), 然后用获得的片段设计特异性引物, 使用 Genome walking 试剂盒半巢式 PCR 获得含有 *gsh1* 5'序列(2.5 kb, 图 3B)和 *gsh1* 3'序列(2.1 kb, 3.2 kb, 图 3C), 通过测序拼接,

最后得到含有 *gsh1* 基因的全序列(2 744 bp, 图 3D), 其中 ORF 有 1 995 bp 且通过测序验证, GenBank 接收号为 HQ 171204。

### 2.2 *C. utilis* 中 *gsh1* 基因敲除

为了敲除 *C. utilis* SZU 07-01 中的 *gsh1* 基因, 我们以原始质粒 pPICZalpha A 为基础构建了 *gsh1* 基因敲除组件 pPICZalpha A-kan 3 (图 1)。待敲除载体 pPICZalpha A-kan 3 用限制性内切酶 *Xba* I 线性化后, 电击转化 *C. utilis* SZU 07-01, 转化产物涂布于 G418 (100 mg/L) 抗性 YPD 平板上, 置于 30 °C, 培养 3 d, 可见单菌落。

提取酵母基因组, 分别用引物 1075/kan 195、kan 706/2996 进行 PCR (其中引物 1075、2996 的位置如图 4 所示), 以出发菌株的基因组 PCR 作为对照进行 PCR 验证。这 2 对引物将在突变株中分别获得 2 kb 和 4 kb 片段, 而在对照中没有特异性条带。

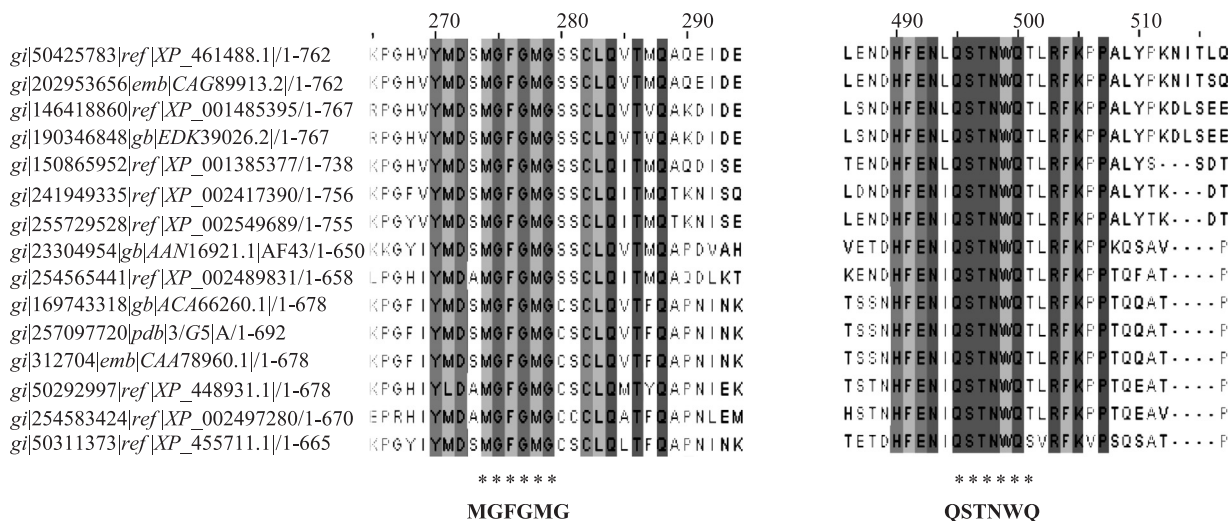


图 2  $\gamma$ -GCS 蛋白质序列比对  
Fig. 2  $\gamma$ -GCS protein sequences alignment

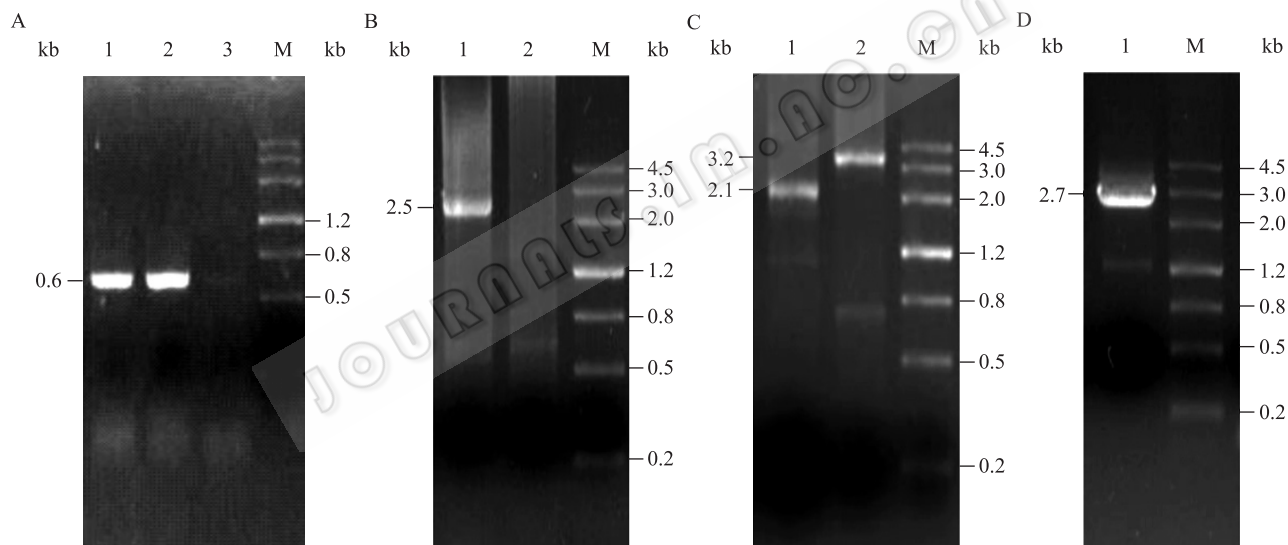


图 3 *gsh1* 基因的克隆  
Fig. 3 Amplification of *gsh1* gene by PCR

注: A: 1、2: *gsh1* 部分基因片段(614 bp); 3: 阴性对照。B: 1、2: *gsh1* 基因 5'端序列。C: 1、2: *gsh1* 基因 3'端序列的克隆。D: 1: *gsh1* 基因全序列的克隆。M: Marker III。

Note: A: 1, 2: Part of *gsh1* sequence (614 bp); 3: Negative control. B: 1, 2: Amplification of *gsh1* 5' sequence. C: 1, 2: Amplification of *gsh1* 3' sequence. D: 1: The sequence of *gsh1* with primer 1075/2996 (2 744 bp). M: Marker III.

PCR 验证结果(图 5)验证了以上的预测结果, 其中引物 1075/kan 195 获得 2 kb 片段(Lane 4), 引物 kan 706/2996 获得 4 kb 片段(Lane 2)。我们将得到的突变株(*gsh1* 阻断菌株)命名为 *C. utilis* GSH-6。

### 2.3 *gsh1* 基因敲除对 GSH 生物合成的影响

将突变株 *C. utilis* GSH-6 和出发菌株 *C. utilis*

SZU07-01 在相同的条件下进行发酵培养, 通过对  $\gamma$ -GCS 酶活和 GSH 合成量进行比较, 结果发现突变株无论是在细胞生长还是 GSH 合成上都不及出发菌株。其中, 突变株的细胞干重(DCW)比出发菌株降低了 18.5%,  $\gamma$ -GCS 酶活降低 17.5%, GSH 合成量降低 61% (表 2)。

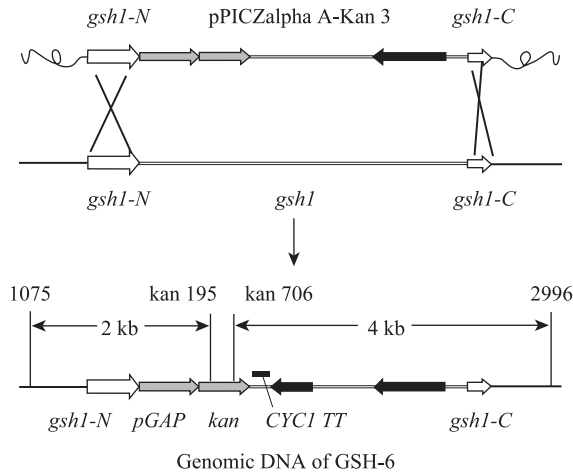


图4 *gsh1* 基因取代图谱  
Fig. 4 Schematic representation of *gsh1* gene disruption

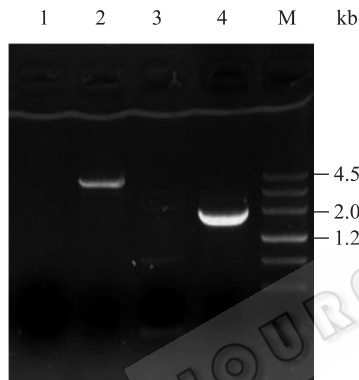


图5 突变菌株 PCR 验证电泳图  
Fig. 5 Verification of *gsh1* disruption by PCR

注: 突变菌株 PCR 验证. 1、2: 引物为 kan 706/2996; 3、4: 引物为 1075/kan 195. 1、3: 野生型; 2、4: 突变菌株.

Note: Verification of *gsh1* disruption by PCR using two primer pairs: kan 706/kan 2996 (lane 1 and 2) and 1075/kan 2996 (lane 3 and 4). 1,3: Wide control; 2,4: Mutant strain.

表2 突变菌株和出发菌株各发酵参数比较  
Table 2 Comparison on parameters between the mutant GSH-6 and the original strain SZU07-01

参数 Parameters	野生株 <i>C. utilis</i> SZU 07-01 Wide	突变株 <i>C. utilis</i> GSH-6 Mutant
	<i>C. utilis</i> SZU 07-01	<i>C. utilis</i> GSH-6
$\gamma$ -GCS activity (U)	52.48 $\pm$ 3.09	43.31 $\pm$ 0.80
Total GSH (mg/L)	108.49 $\pm$ 3.16	34.47 $\pm$ 0.54
GSH content (%)	1.20 $\pm$ 0.05	0.47 $\pm$ 0.10
DCW (g/L)	8.99 $\pm$ 0.10	7.33 $\pm$ 0.05

### 3 讨论

*C. utilis* 作为一种重要的工业微生物,除了可以用来合成许多有用的生理活性物质之外,在基因工程菌的遗传改造过程中也具有很大的应用潜力<sup>[16-17]</sup>。然而,*C. utilis* 是多倍体菌株,且无有性世代,通过常规遗传操作很难获得营养缺陷型菌株,因此使用合适的抗性标记显得十分必要。在针对 *C. utilis* 的遗传操作中,曾使用过 G418 (*kan*)、潮霉素 B (*HPT*)<sup>[8]</sup>、放线菌酮<sup>[18]</sup>等细菌抗性标记。相对于酿酒酵母、毕赤酵母等遗传学研究技术和方法比较成熟的酵母菌,基于多倍体的特性,有限的筛选标记使 *C. utilis* 在分子水平的研究十分困难,因此有必要探索一种快速的、切实可行的方法。为此,作者曾经采用毕赤酵母常用的基因敲除元件 [*pTEF-Zeo(R)-CYC1TT*]<sup>[19]</sup>,构建基因敲除载体 *pPICZalpha A-kan 1* 并转化 *C. utilis*,却始终未获得阳性转化子。可能的原因在于外源基因作为筛选标记在宿主细胞中无法翻译成有功能的蛋白质,或者宿主细胞无法提供该抗性基因发挥功能的环境,以致于该抗性基因在该酵母中无法正常表达。接着,在质粒 *pPICZalpha A-kan 1* 的基础上,采用 *HPT* 基因替换了 *kan* 基因,同样无法获得阳性克隆。基于此,在排除了抗性基因本身的问题之后,我们采用更换启动子的方法,换上 *C. utilis* 自身的启动子 (*GAP* 启动子)<sup>[3]</sup>,构建了新的敲除组件 *pPICZalpha A-kan 3 (pGAP-kan-CYC1TT)*,再次对 *gsh1* 基因实施敲除操作,最终获得了 *gsh1* 基因敲除杂合突变菌株 *C. utilis* GSH-6。通过对该突变株和出发菌株进行发酵培养并对发酵参数进行分析, $\gamma$ -GCS 酶活和 GSH 合成量的对比结果也从另一方面说明了 *gsh1* 基因一个拷贝被成功敲除。因此,对于一个用现有的遗传操作元件难以完成转化的菌株,换用宿主菌自身启动子表达抗性基因将是解决遗传操作困难的策略和方法之一。

随着 *gsh1* 基因的敲除,突变株  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶酶活比出发菌株降低了 17.5%,而 GSH 合成量却降低了 61%,这一方面说明  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸

酸合成酶( $\gamma$ -GCS)是谷胱甘肽(GSH)生物合成过程中的主要限速酶, 其表达量的降低会对最终 GSH 产量水平产生重要影响; 另一方面, *gsh1* 的敲除使得细胞干重比出发菌株降低了 18.5%。故酵母菌干重的降低也是 GSH 的显著减少的重要原因。*gsh1* 的敲除实验表明了 GSH 可能对于 *C. utilis* 具有重要的生理功能。GSH 在生物体内有着重要的生理功能, 特别是维持生物体内适宜的氧化还原环境起着至关重要的作用, 其抗氧化功能为人们所熟知<sup>[20]</sup>。依赖于 GSH 还原系统已被证实在大肠杆菌和酿酒酵母抵抗氧应力过程中扮演着重要角色<sup>[21]</sup>。张娟等人<sup>[22]</sup>研究发现, GSH 在乳酸球菌遭受酸胁迫时能够通过自杀式消耗而发挥对菌体的保护作用, 同时通过硫酸化作用对 GAPDH 进行保护。在本文中由于 *gsh1* 基因的敲除, 谷胱甘肽(GSH)合成量减少, 从而使细胞代谢和抗氧化胁迫能力下降, 最终使得细胞生长受到抑制。GSH 对 *C. utilis* 中的生理功能及保护机制, 我们将进一步研究证实。

## 参 考 文 献

- [1] Tobajas M, Garcia-Calvo E. Determination of biomass yield for growth of *Candida utilis* on glucose: black box and metabolic descriptions[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1999, 15(4): 431-438.
- [2] Liang G, Liao X, Du G, et al. Elevated glutathione production by adding precursor amino acids coupled with ATP in high cell density cultivation of *Candida utilis*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 105(5): 1432-1440.
- [3] 杨红兰, 王炜, 包慧芳, 等. 产朊假丝酵母整合表达载体的构建[J]. *微生物学报*, 2009, 49(3): 317-323.
- [4] Kondo K, Miura Y, Sone H, et al. High-level expression of a sweet protein, monellin, in the food yeast *Candida utilis*[J]. *Nature Biotechnology*, 1997, 15(5): 453-457.
- [5] Miura Y, Kondo K, Saito T, et al. Production of the carotenoids lycopene,  $\beta$ -carotene, and astaxanthin in the food yeast *Candida utilis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(4): 1226-1229.
- [6] Miura Y, Kondo K, Shimada H, et al. Production of lycopene by the food yeast, *Candida utilis* that does not naturally synthesize carotenoid[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, 58(2): 306-308.
- [7] Miura Y, Kettoku M, Kato M, et al. High level production of thermostable  $\alpha$ -Amylase from *Sulfolobus solfataricus* in high-cell density culture of the food yeast *Candida utilis*[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1999, 1(1): 129-134.
- [8] Ikushima S, Fujii T, Kobayashi O. Efficient gene disruption in the high-ploidy yeast *Candida utilis* using the Cre-*loxP* system[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2009, 73(4): 879-884.
- [9] Ohtake Y, Watanabe K, Tezuka H, et al. Expression of the glutathione synthetase gene of *Escherichia coli* B in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1989, 68(6): 390-394.
- [10] Ohtake Y, Watanabe K, Tezuka H, et al. The expression of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase gene of *Escherichia coli* B in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1988, 52(11): 2753-2762.
- [11] 饶志明, 艾丽静, 沈微, 等. *gsh1* 基因的克隆及其在巴斯德毕赤氏酵母中的表达[J]. *应用与环境微生物学报*, 2007, 13(2): 257-260.
- [12] Kondo K, Saito T, Kajiwara S, et al. A transformation system for the yeast *Candida utilis*: use of a modified endogenous ribosomal-protein gene as a drug-resistant marker and ribosomal DNA as an integration target for vector DNA[J]. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(24): 7171-7177.
- [13] Kondo K, Kajiwara S, Misawa N. Transformation systems for the yeast *Candida utilis* and the expression of heterologous genes therewith: US, 5849524 [P]. 1998-12-15.
- [14] Kenchappa RS, Ravindranath V.  $\gamma$ -Glutamyl cysteine synthetase is up-regulated during recovery of brain mitochondrial complex I following neurotoxic insult in mice[J]. *Neuroscience Letters*, 2003, 350(1): 51-55.
- [15] Rose TM, Henikoff JG, Henikoff S. CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(13): 3763-3766.
- [16] Hsu WH, Magee PT, Magee BB, et al. Construction of a new yeast cloning vector containing autonomous replication sequences from *Candida utilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1983, 154(3): 1033-1039.
- [17] Shimada H, Kondo K, Fraser PD, et al. Increased carotenoid production by the food yeast *Candida utilis* through metabolic engineering of the isoprenoid pathway[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(7): 2676-2680.
- [18] Wang W, Yang HL, Bao HF, et al. The effective expression of xylanase gene in *Candida utilis* by 18S rDNA targeted homologous recombination in pGLR9K[J]. *Molecular*

- Biology Reports, 2010, 37(6): 2615–2620.
- [19] Yao XQ, Zhao HL, Xue C, et al. Degradation of HSA-AX15(R13K) when expressed in *Pichia pastoris* can be reduced via the disruption of YPS1 gene in this yeast[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 139(2): 131–136.
- [20] Pócsi I, Prade RA, Penninckx MJ. Glutathione, altruistic metabolite in fungi[J]. Advances Microbial Physiology, 2004, 49: 1–76.
- [21] Grant CM. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions[J]. Molecular Microbiology, 2001, 39(3): 533–541.
- [22] Zhang J, Fu RY, Hugenholtz J, et al. Glutathione protects *Lactococcus lactis* against acid stress[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5268–5275.

## 征 稿 简 则

### 1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果,产业化新技术和新进展,以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、名课讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

### 2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区,第一次投稿请先注册,获得用户名和密码,然后依照提示提交稿件,详见主页“投稿、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子版,图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的文稿,本部恕不接受。

### 3 写作要求

来稿要求论点明确,数据可靠,简明通顺,重点突出。

#### 3.1 篇幅

以 A4 纸 5 号字计算,综述、教学和方法类文章最好在 6 页以内,研究报告 4–8 页(以上均包括图表)。

#### 3.2 图表

文中的图表须清晰简明,文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm (占半栏),大图的宽度应小于 17 cm (通栏)。

#### 3.3 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码,未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出,多于 3 人时列出前 3 人,后加“等”或“et al.”,作者姓前、名后,名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外刊名可以缩写,但必须标准,不加缩写点,不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘杰,成子强,史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达[J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 1–3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, et al. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase[J]. J Biol Chem, 2001, 276(39): 36514–36519.

图书: [3] 钱存柔,黄仪秀. 微生物实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 2000: 4.

[4] 董志扬,张树政,方宣钧,等. 海藻的生物合成及抗逆机理//华路等. 核农学进展[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 115–120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No. )

\*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2011-00-00; 接受日期: 2011-00-00

(下转 p.824)