

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(7):969–974; 4 July 2010
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

解脂耶氏酵母脂肪酶基因 *lip1* 的克隆、密码子优化及功能表达

张黎, 赵鹤云, 徐莉, 刘云, 闫云君*

(分子生物物理教育部重点实验室, 华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074)

摘要:【目的】克隆解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 脂肪酶基因 *lip1*, 并通过密码子优化, 首次实现其在毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中的诱导型和组成型表达。【方法】通过 PCR 扩增 *Y. lipolytica* 脂肪酶基因 *lip1*, 根据 *P. pastoris* 密码子偏爱性, 运用重叠延伸 PCR 合成改造后基因 MLip1, 将其分别克隆至诱导型分泌载体 pPIC9K 和新构建的组成型分泌载体 pGAP9K 上, 电转至 *P. pastoris* GS115 中, G418 抗性筛选得到高拷贝转化重组子, 摇瓶发酵, 以对硝基苯酚酯为底物检测脂肪酶水解活力, 并对表达产物进行酶学性质分析。【结果】从 *Y. lipolytica* 中成功克隆了脂肪酶基因 *lip1* (GenBank: Z50020), 全长 1461 bp, 编码 486 个氨基酸残基, 无内含子, 无信号肽; 密码子优化后基因表达水平相对于出发基因有较大提高, 且组成型表达优于诱导型; Lip1 酶学性质分析表明, 其最适底物为 pNPB (C4), 45℃ 下 Tris-HCl 缓冲液 pH8.5 时最大水解酶活为 8.07 U/mL。【结论】*Y. lipolytica* 脂肪酶基因 *lip1* 的克隆丰富了脂肪酶基因资源, 其高效基因工程菌的构建为将来实现规模化生产奠定了技术基础。

关键词: 解脂耶氏酵母脂肪酶基因 *lip1*; 克隆; 密码子优化; GAP 启动子; 功能表达

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 07-0969-06

脂肪酶 (Lipase, EC 3.1.1.3) 即三酰甘油酯酰基水解酶, 广泛存在于动植物和微生物中, 是一类具有多种催化能力的酶类, 可催化三酰甘油酯及其他一些水不溶性酯类的水解、醇解、酯化、转酯化及酯类的逆向合成反应等^[1]。广泛应用于油脂加工、食品、医药、日化、纺织、造纸、洗涤、皮革脱脂, 以及生物传感器等行业^[2]。解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 脂肪酶是一种重要的工业用酶, 具有许多优良特性^[3]。据报道, *Y. lipolytica* 共有 8 个脂肪酶基因, 目前的研究主要集中于对 Lip2、Lip7 和 Lip8 的表达纯化^[4]、催化特性^[5]及表面展示上^[6], 而有关其它几个脂肪酶的研究鲜见报道。

根据宿主表达系统的密码子偏爱性, 对外源基因进行密码子优化是提高外源蛋白表达量的一种重

要策略。利用该技术对褶皱假丝酵母脂肪酶基因^[7-9]、黑曲霉 N25 (*Aspergillus niger*) 的植酸酶基因 *phyA*^[10] 进行密码子优化获得了显著效果。而使用密码子优化手段对 *Y. lipolytica* 脂肪酶基因进行改造从而提高其产量国内外尚未见有报道。

P. pastoris 表达系统由于其表达水平稳定, 发酵工艺成熟, 产物表达量高, 易于纯化等优点, 被作为一种广泛的表达系统^[11]。目前, 应用较多的是以 AOX1 启动子为代表的诱导型表达系统, 其特点是发酵过程中需要用有毒挥发性的甲醇作为诱导剂, 需要碳源的转换, 因而操作不方便, 且外源蛋白的生产周期较长。GAP 启动子是 *P. pastoris* 的组成型强启动子^[12], P_{GAP} 组成型表达系统具有 P_{AOX1} 诱导型表达系统不可比拟的优点: 无需诱导, 操作方便, 无需

基金项目: 国家“863 计划” (2006AA020203, 2007AA05Z417, 2007AA100703, 2009AA03Z232); 教育部新世纪人才基金 (NCET 07 0336); 湖北省自然科学基金 (2008CDB359, 2009CDA046)

* 通信作者。Tel: +86-27-87792214; Fax: +86-27-87792213; E-mail: yanyunjun@tom.com

作者简介: 张黎 (1986–), 女, 河南人, 硕士研究生, 从事微生物脂肪酶分子生物学研究。E-mail: ymw537@163.com;

收稿日期: 2009-12-30; **修回日期:** 2010-02-06

碳源转换等,越来越受到关注^[13]。

为此,本研究根据 NCBI 中发布的基因序列 (GenBank:Z50020),克隆了 *Y. lipolytica* 脂肪酶基因 *lip1*,并选用 *P. pastoris* 偏爱性密码子,运用重叠延伸 PCR 技术,首次对其 8 个氨基酸密码子进行了优化改造,以期提高其表达水平。同时,克隆了 GAP 启动子,构建了组成型表达载体 pGAP9K,实现了脂肪酶基因 Lip1 及其改造型在 *P. pastoris* 中组成型和诱导型表达,为其规模化生产制备奠定技术基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:*Y. lipolytica* 菌株为中科院微生物研究所馈赠,大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Top10、*P. pastoris* GS115 菌株和载体 pPIC9K 均为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器:*Taq* DNA 聚合酶、dNTP Mixture、T4 DNA Ligase、限制性内切酶、pMD18-T 试剂盒、DNA Marker 和 Protein Marker 均购自 TaKaRa 公司,pNP 酯购于 Sigma 公司,Plasmid Mini Kit I、Gel Extraction Kit 购自 Omega 公司,酵母基因组提取试剂盒购自 Tiangene 公司,其它试剂均为进口或国产分析纯产品。PCR 仪 53333 (Eppendorf AG 22331 Hamburg),电泳仪 DYY-5 (北京市六一仪器厂),凝胶成像系统 GeL Logic 200 (Eastman Kodak Company USA),电转仪 (Bio-Rad pulse Xcell)。

1.1.3 培养基:LB、YPD、BMGY、BMMY 培养基见 Invitrodgen 公司毕赤酵母操作手册。

1.2 *Y. lipolytica* 基因组 DNA 的提取及脂肪酶基因 *lip1* 的克隆

基因组 DNA 的提取按照酵母基因组提取试剂盒说明书进行。根据 GenBank 上发布的 *Y. lipolytica lip1* 基因序列,设计引物 P: 5'-GAATTCATGTCTGTCACATCAACTTCTC-3' (*EcoR* I), F: 5'-GCGGCCGCCTACAACGTGTAGTGACCCTC-3' (*Not* I),扩增全长脂肪酶基因。PCR 反应采用 100 μL 体系,反应程序: 94℃ 5 min, 94℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 1 min 40 s, 30 cycles, 72℃ 10 min, 4℃ 保温。PCR 扩增产物与载体 pMD18-T 连接,转化 *E. coli* Top10。抽质粒验证后阳性转化子 pMD18T- *lip1* 由北京利嘉生物技术有限公司测序。

1.3 重叠延伸 PCR 合成改造后基因 MLip1

通过 <http://gcua.schoedl.de/index> 分析,选用 *P. pastoris* 偏爱性密码子,利用软件 Primer Premier 5.0 设计 6 对引物 (表 1),对 Lip1 的第 34、36、258、289、294、314、316 和 455 位氨基酸密码子进行改造,引物均由上海生物工程技术服务有限公司合成。以质粒 pMD18T-*lip1* 为模板,运用重叠延伸 PCR 技术二步重叠法^[14-15]合成改造后的基因 MLip1,其过程如图 1 所示。密码子优化过程中合成的各片段以及改造后基因 MLip1-1、MLip1 均与 T 载体连接,转化 *E. coli* Top10,筛选阳性克隆子进行测序验证。

表 1 Lip1 密码子优化所用引物

Table 1 Primers used for the multiple site-directed mutagenesis of Lip1			
Primers	Sequences(5'→3')	Size /bp	Restriction sites
1-N	CT GAATTC ATGTCTGTCACATCAACTTCTCTC	32	<i>EcoR</i> I
P1	CATTCCGTATAGATGGGCTTATGCCGA	27	
F1	TCGGCATAAGCCCATCTATACGGAATG	27	
P2	CAACACCTGTTCTGCTGACGAGC	23	
F2	GCTCGTCAGCAGAACAGGTGTTG	23	
P3	CGTGAGATTCAAAGTCTCTAGAGTTTACTCTCGG	35	
F3	CCGAGAGTAAAACTCTAGAGACTTTGAATCTCACC	35	
P4	GATCAATCCAGCTGTAAGAGTAACTCC	27	
F4	GGAGTTACTCTTACAGCTGGATTGATC	27	
P5	GTTTGGCGACTTCAGAAACGTTCCAGC	27	
F5	GCTGGAACGTTTCTGAAGTCGCCAAAC	27	
1-C	CT GCGGCCGC CTACAACGTGTAGTGACCCTCTCC	34	<i>Not</i> I

* boxed sequences indicate restriction sites *EcoR* I and *Not* I , underlined sequences show optimized codon sites, P1/F1, P2/F2, P3/F3, P4/F4 and P5/F5 are complement reverse primers.

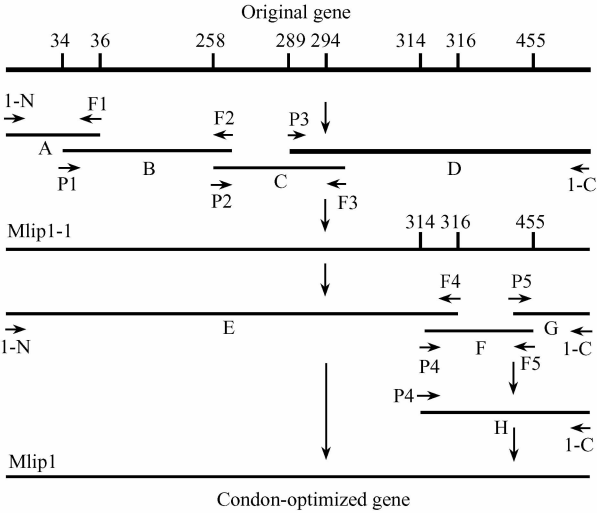


图 1 Lip1 密码子优化过程示意图

Fig.1 The procedure of the multiple site-directed mutagenesis of Lip1.

1.4 GAP 启动子克隆及载体 pGAP9K 构建

根据 NCBI 中 GAP 启动子基因序列 (GenBank: U62648) 设计上、下游引物: P1: 5'-GCAGCGAGCTCGATCCTTTTTTGTAT-3' (Sac I); P2: 5'-GGCCCGATCCTGTGTTTTGATAGTTGTTTC-3' (BamH I)

以 *P. pastoris* GS115 基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 GAP 启动子,反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 30 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。PCR 产物连接 T 载体转化 *E. coli* Top10, 阳性克隆子测序正确。Sac I、BamH I 双酶切质粒 pMD18T-P_{GAP}和载体 pPIC9K, 目的片段经 T4 DNA Ligase 连接,构建组成型分泌载体 pGAP9K。

1.5 表达载体构建

用限制性内切酶 EcoR I、Not I 双酶切质粒 pMD18T-*lip1*、pMD18T-MLip1 和载体 pPIC9K、pGAP9K。胶回收目的产物后经 T4 DNA Ligase 连接,构建表达载体 pPIC9K-*lip1*、pPIC9K-MLip1、pGAP9K-*lip1* 和 pGAP9K-MLip1,转化 *E. coli* Top10, 筛选阳性克隆子经酶切验证后送北京利嘉生物技术有限公司测序。

1.6 重组质粒在 P. pastoris 中的诱导型及组成型表达

表达载体经线性化后电转化至 *P. pastoris* GS115 中,经 MD、MM 和三丁酸甘油酯平板筛选,阳性转化子进行菌落 PCR 鉴定,并利用不同浓度梯度 (0.25 - 4.0 mg/mL) 的 YPD-G418 平板筛选高拷贝转化重组子。将最佳重组子 GS115/pPIC9K-*lip1*、

GS115/pPIC9K-MLip1 接种到培养基 BMGY 中,培养 16 - 20 h 至 A₆₀₀ = 4,转接至 BMMY 中进行甲醇诱导表达,每隔 24 h 补加 0.5% (终浓度) 的甲醇。将 GS115/pGAP9K-*lip1*、GS115/pGAP9K-MLip1 接种到 YPD 培养基中活化, A₆₀₀ = 2 时接种 1 mL 至 100 mL YPD 培养基中, 28℃, 250 r/min 进行摇瓶发酵。分别在 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h、168 h、192 h 取样测定脂肪酶水解酶活,确定脂肪酶最佳表达时间,并取上清进行 SDS-PAGE 电泳。

1.7 脂肪酶活力测定

pNPP 比色法^[16] 在 410 nm 测定脂肪酶水解酶活。在 45℃, 0.05 mol/L, pH8.5 的 Tris-HCl 缓冲液中,每毫升酶液每分钟催化 10 mmol/L 底物释放出 1 μmol 的对硝基苯酚定义为一个活力单位 (U)。

1.8 脂肪酶酶学性质分析

1.8.1 底物特异性对酶活力的影响:分别以对硝基苯酚酯 C2、C4、C6、C8、C10、C12、C14 和 C16 作为底物,以 pNPP 比色法测定脂肪酶活力,以确定脂肪酶的底物特异性。

1.8.2 温度对酶活力的影响:分别在 30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃ 和 65℃ 下,以 pNPP 比色法测定脂肪酶水解酶活,各温度下测 3 次,取其平均值。

1.8.3 pH 对酶活力的影响:分别在 0.05 mol/L, pH 范围在 6.5 - 10 的 Tris-HCl 缓冲液中,以 pNPP 比色法测定脂肪酶活力,每 pH 值下测 3 次,取平均值,以确定酶的最适 pH 值。

2 结果

2.1 Y. lipolytica 脂肪酶基因 lip1 的克隆

以 *Y. lipolytica* 基因组 DNA 为模板,P、F 分别为上、下游引物,扩增全长脂肪酶基因 *lip1*。测序结果表明,*lip1* 全长 1461 bp,编码 486 个氨基酸,与 NCBI 中所报道序列一致。运用生物信息学分析,Lip1 含有脂肪酶活性中心-G-E-S-A-G-保守五肽序列区,催化三联体 Ser¹⁹³-Asp³⁰³-His³⁹²,糖基化位点 Asn³³²,并在-Cys⁵⁸-Cys⁸²-之间形成二硫键。

2.2 重叠延伸 PCR 技术优化 lip1 基因

运用二步重叠法合成改造后的基因 MLip1。以质粒 pMD18T-*lip1* 为模板,1-N/F1, P1/F2, P2/F3, P3/1-C 为引物,分别合成片段 A116 bp、B692 bp、C137 bp 和 D601 bp,胶回收各片段后混匀,作为模板,合成第一轮改造后基因 MLip1-1。再以 MLip1-1 为模板,1-N/F4、P4/F5、P5/1-C 和 P4/1-C 为引物,

分别合成片段 E956 bp、F447 bp、G112 bp 和 H559 bp, 以上述相同策略合成第二轮改造后基因的 MLip1。测序结果表明, 成功实现对 Lip1 基因 8 个氨基酸位点的密码子进行了同义密码子改造, 且出发基因的其它位点没有发生突变。

2.3 GAP 启动子克隆及载体 pGAP9K 构建

以 *P. pastoris* GS115 基因组 DNA 为模板, P1、P2 为引物, PCR 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 500 bp 处出现一扩增条带, 与 NCBI 报道的 GAP 启动子大小一致。表达载体 pGAP9K 经 *Sac* I、*Bam*H I 双酶切验证, 获得两条 DNA 条带, 8.6 kb 处的条带为 pPIC9K, 500 bp 处的条带为 GAP 启动子, 上述结果表明, GAP 启动子已成功克隆到 pPIC9K 中, 并将重组表达载体命名为 pGAP9K (图 2)。

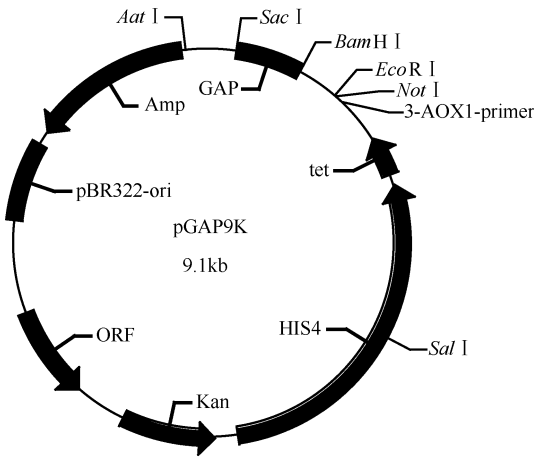


图 2 组成型载体 pGAP9K
Fig. 2 Constitutive vector pGAP9K.

2.4 酵母重组子的转化和鉴定

线性化的表达载体电转化至 *P. pastoris* GS115 中, 从 YPD 平板上挑取单菌落, 进行菌落 PCR 鉴定。重组菌株能扩增得到 1500 bp 的 DNA 片段, 表明重组表达载体 pPIC9K-*lip1*、pPIC9K-MLip1、pGAP9K-*lip1* 和 pGAP9K- MLip1 成功整合到 *P. pastoris* 基因组 DNA 中。

2.5 Lip1 在 *P. pastoris* 中的诱导型和组成型表达

发酵结果分析表明 (图 3), 诱导表达过程中 Lip1 表达水平 6 d 达到高峰, 优化后 Lip1 酶活可达 6.84 U/mL, 比优化前酶活 (4.08 U/mL) 提高约 70%。组成型表达过程中, Lip1 发酵 5 d 即达最高酶活, 优化后脂肪酶活可达 8.07 U/mL, 比出发基因诱导表达酶活提高了近 1 倍, 且发酵周期有所缩短。这表明 Lip1 经密码子优化后, 在 *P. pastoris* GS115 中实现了高效组成型表达。上述两种策略的发酵上清液经 SDS-PAGE 分析, 在 53 kDa 处有一特异条

带, 与 Lip1 的分子量 53.46 kDa 大小一致, 说明脂肪酶基因 *lip1* 以及改造后的基因 MLip1 成功实现了在 *P. pastoris* 中诱导型和组成型分泌表达。

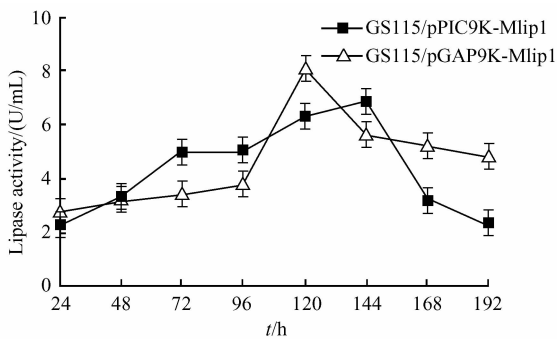


图 3 经密码子优化的酵母工程菌产酶曲线
Fig. 3 Lipase production curves of codon optimized engineering yeast strain.

2.6 Lip1 酶学性质分析

如图 4 所示, 酶学性质初步研究表明, Lip1 最适底物为短链对硝基苯酚丁酸酯 (C4), 而对于长链 pNP 酯几乎不表现出水解活力, 与文献报道的 *Y. lipolytica* 脂肪酶家族中 Lip2 最适底物为长链脂肪酸甲酯 C12 - C16^[17], Lip7、Lip8 最适底物分别为 pNPC (C8) 和 pNPC (C10)^[18] 不同, 这一结果也印证了 NCBI 中预测的 *Y. lipolytica* 脂肪酶家族同源性极低的报道; Lip1 最适温度为 45℃, 最适 pH 为 8.5, 作为一种碱性中温水解酶, Lip1 应具有良好的工业应用潜质。

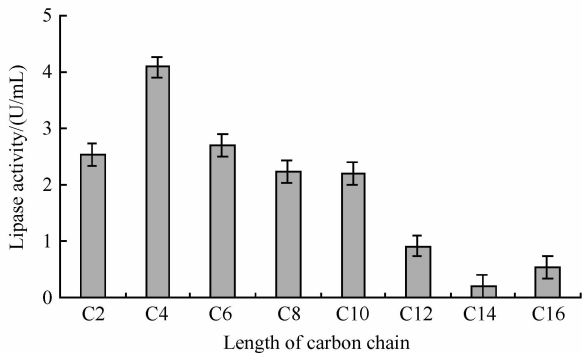


图 4 Lip1 的最适底物
Fig. 4 The optimum substrate of *Y. lipolytica* Lip1.

3 讨论

Y. lipolytica 是目前研究极为广泛的一种非常规性酵母, 它既可生产胞外蛋白酶、有机酸, 又可作为研究蛋白质分泌途径的模式生物^[19]。据 NCBI 报道, *Y. lipolytica* 中共有 8 个脂肪酶基因, 但目前主要集中在 Lip2, Lip7 和 Lip8 的研究上, 对其它几个

脂肪酶则了解甚少。本研究克隆并表达了 *Y. lipolytica* 脂肪酶基因 *lip1*, 不但丰富了 *Y. lipolytica* 脂肪酶家族基因资源, 为进一步研究其它几个脂肪酶奠定了技术基础, 同时也为基于脂肪酶进化信息研究其在子囊菌纲中的独特地位提供了素材。

外源蛋白的表达水平和诸多因素有关, 如启动子、信号肽、表达载体的拷贝数、表达系统种类、外源基因密码子本身性质以及发酵条件等。Destain^[20] 等通过改变表达系统种类, 使用 *Y. lipolytica* 突变菌株表达脂肪酶 Lip2, 将其产量由 28 U/mL 提高到 1000 U/mL。Fickers^[21] 等研究不同碳源对 *Y. lipolytica* 脂肪酶 Lip2 发酵酶活的影响, 最终确定在用低浓度的油酸甲酯 (0.3% - 0.5%) 作为主要碳源和诱导剂的条件下, Lip2 发酵 70 h 左右可达最大酶活 1500 U/mL。Kar^[22] 等通过对 *Y. lipolytica* 脂肪酶 Lip2 在 20 L 发酵罐中发酵条件的研究, 确定溶氧量是影响脂肪酶分泌的主要因素, 并通过发酵条件的优化提高其表达量, 在发酵 50 h 时酶活可达 2000 U/mL。而使用密码子优化技术或选择组成型表达替代诱导表达策略也可显著提高 *Y. lipolytica* 脂肪酶产量, 本研究是首次报道。同时, 实现了密码子优化后的基因 MLip1 在 *P. pastoris* GS115 中的高效组成型表达, 为 Lip1 进行高密度发酵及规模化生产奠定了技术基础; 酶学性质的初步研究表明 Lip1 是一种碱性中温脂肪酶, 在食品、油脂加工、生物催化等领域具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Knez Z, Laudani CG, Habulin M. Exploiting the Pressure Effect on Lipase-Catalyzed Wax Ester Synthesis in Dense Carbon Dioxide. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 97(6): 1366-1375.
- [2] Gandhi NN. Applications of Lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1997, 74(6): 621-634.
- [3] Ito H, Inouh M, Joho M, Tohyama H. Characteristics of copper tolerance in *Yarrowia lipolytica*. *BioMetals*, 2007, 20: 773-780.
- [4] Aloulou A, Rodriguez JA, Carrière F, Puccinelli D, Mouz N, Leclaire J, Leblond Y. Purification and biochemical characterization of the *lip2* lipase from *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Bacteriology*, 2007, 1771: 228-237.
- [5] Nicaud JM, Seman M, Fudalej F, Wang HJ, Gaillardin C. Characterization of an extracellular lipase encoded by *lip2* in *Yarrowia lipolytica*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 182(10): 2802-2810.
- [6] 闫云君, 刘文山, 徐莉, 赵鹤云, 杨江科. 利用 a 凝集素在酿酒酵母表面展示解脂耶氏酵母脂肪酶 Lip2. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48(11): 1543-1548.
- [7] Chang SW, Shieh CJ, Lee GC, Shaw JF. Multiple mutagenesis of the *Candida rugosa lip1* gene and optimum production of recombinant Lip1 expressed in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 67: 215-224.
- [8] Lee GC, Lee LC, Sava V. Multiple mutagenesis of non-universal serine codons of the *Candida rugosa lip2* gene and biochemical characterization of purified recombinant Lip2 lipase overexpressed in *Pichia pastoris*. *Biochemistry*. 2002, 366: 603-611.
- [9] Chang SW, Lee GC, Shaw JF. Efficient Production of Active Recombinant *Candida rugosa* Lip3 Lipase in *Pichia Pastoris* and Biochemical Characterization of the Purified Enzyme. *Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54: 5831-5838.
- [10] 陈惠, 赵海霞, 王红宁, 杨婉身, 吴琦, 倪燕. 植酸酶基因中稀有密码子的改造提高其在毕赤酵母中的表达量. *中国生物化学与分子生物学报 (Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology)*, 2005, 21(2): 171-175.
- [11] Hearn MTW, Rachel D. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, 2005(18): 119-138.
- [12] Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, Lair SV, Cregg JM. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene*, 1997, 186(1): 37-44.
- [13] Goodrick JC, Xu M, Finnegan R. High level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, 74(6): 492-497.
- [14] Horton RM, Pullen JK, Pease LR. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 1989, 77(1): 51-59.
- [15] Mergulhao FJ, Kelly AG, Monteiro GA. Troubleshooting in gene splicing by overlap extension: a step-wise method. *Molecular Biotechnology*, 1999, 12(3): 285-287.
- [16] Kordel M, Hofmann B, Schomburg D, Schmid RD. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(15): 4836-4841.

- [17] Yu MG, Qin SW, Tan TW. Purification and characterization of the extracellular lipase *lip2* from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*, 2007, 42 (3): 384-391.
- [18] Fickers P, Fudalej F, Nicaud JM, Dall L, Casaregola S, Gaillardin C, Thonart P. Identification and characterisation of *lip7* and *lip8* genes encoding two extracellular triacylglycerol lipases in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Fungal Genetics and Biology*, 2005, 42: 264-274.
- [19] Beckerich JM, Anita BB, Gaillardin C. *Yarrowia lipolytica*: a model organism for protein secretion studies. *International Microbiology*, 1998, 1: 123-130.
- [20] Destain J, Roblain D, Thonart P. Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*, 1997, 19(2): 105-107.
- [21] Fickers P, Thonart P, Destain J. Methyl oleate modulates LIP2 expression in the lipolytic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*, 2005, 27: 1751-1754.
- [22] Kar T, Delvigne F, Masson M, Destain J, Thonart P. Investigation of the effect of different extracellular factors on the lipase production by *Yarrowia lipolytica* on the basis of a scale-down approach. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2008, 35: 1053-1059.

Gene cloning, codon optimization and functional expression of *Yarrowia lipolytica* lipase Lip1

Li Zhang, Heyun Zhao, Li Xu, Yun Liu, Yunjun Yan *

(Key Laboratory of Molecular Bio-physics, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: [**Objective**] To implement inducible and constitutive over-expression of *Yarrowia lipolytica* lipase gene *lip1* in *Pichia pastoris* using codon optimization. [**Methods**] We cloned *Y. lipolytica* lipase gene *lip1* according to codon bias of *P. pastoris*, and optimized *lip1* using overlap extension PCR synthesis. Then, we cloned the original and optimized genes into the induced vector pPIC9K and newly built constitutive carrier pGAP9K, and electrotransformed the resultant expression plasmids into *P. pastoris* GS115. Through G418 resistance screening, high copy transformants were selected and fermented in shake flasks. P-nitrophenyl palmitate (pNPP) was used as substrates for assay the activities of the expressed lipase, and the characteristics of the lipase were further examined. [**Results**] We successfully cloned lipase gene *lip1* from *Y. lipolytica*, nucleotide sequence revealed that the open reading frame (ORF) had 1461 nucleotides, encoding 486 amino acids, without any intron or any signal peptide. SDS-PAGE analysis and fermentation result showed that the optimized gene had a higher expression level than the original one, and the constitutive expression was superior to the inducible expression. Preliminary analysis showed that the optimal substrate of Lip1 was p-nitrophenyl butyrate (C4), the optimum temperature and pH was 45°C and 8.5, respectively. [**Conclusion**] *Y. lipolytica* lipase gene *lip1* can be over-expressed through both inducible and constitutive expressions using codon optimization, which lays a solid foundation to further study *Y. lipolytica* lipase family, and also provides an important prerequisite for scale production and industrial application of the lipase.

Keywords: *Yarrowia lipolytica* lipase gene *lip1*; clone; codon optimization; GAP promoter; functional expression

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA020203, 2007AA05Z417, 2007AA100703, 2009AA03Z232), the Program for New Century Excellent Talent in University (NCET 07 0336) and the Hubei Province Natural Science Foundation (2008CDB359, 2009CDA046)

* Corresponding author. Tel: +86-27-87792214; Fax: +86-27-87792213; E-mail: yanyunjun@tom.com

Received: 30 December 2009 / Revised: 6 February 2010

Acta Microbiologica Sinica

The Ninth Editorial Board

2006 - 2011

CONSULTANT

Jilun Li (Academician)
College of Biology, Chinese Agricultural University, China

EDITOR-IN-CHIEF

Huarong Tan (Professor)
Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, China

VICE-EDITOR-IN-CHIEF

(alphabetically)

Xiuzhu Dong (Professor)
Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, China

Fuquan Hu (Professor)
Department of Microbiology, Third Military Medical University, China

Li Huang (Professor)
Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, China

Chengping Lu (Professor)
College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, China

Hang Min (Professor)
College of Life Sciences, Zhejiang University, China

Yinbo Qu (Professor)
College of Life Sciences, Shandong University, China

Ben Shen (Professor)
Division of Pharmaceutical Sciences and Department of Chemistry, University of Wisconsin-Madison, USA

Ping Shen (Professor)
College of Life Sciences, Wuhan University, China

Aoquan Wang (Professor)
Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, China

Huaming Wang (Senior Scientist)
Genencor, a Danisco Division, USA

Jianguo Xu (Professor)
National Institute of Communicable Diseases Prevention and Control, China CDC

BOARD MEMBERS

(alphabetically)

Fengyan Bai (Professor)
Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, China

Guanjun Chen (Professor)
State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, China

Yongqing Chen (Professor)
College of Life Sciences, Fudan University, China

Yunliu Fan (Academician)
Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, China

Baishan Fang (Professor)
Department of Chemical and Biochemical Engineering, Xiamen University, China

Weihuan Fang (Professor)
Institute of Preventive Veterinary Medicine, Zhejiang University, China

Jun Guo (Professor)
Guangdong Institute of Microbiology, China

Zhiru Guo (Professor)
School of Animal Science and Technology, Shihezi University, China

Ning Jiang (Professor)
Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, China

Xiangang Kong (Professor)
Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, China

Wenjun Li (Professor)
Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, China

Xiang Li (Professor)
South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, China

Yuezhong Li (Professor)
College of Life Science, Shandong University, China

Zhengxi Li (Associate professor)
College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, China

Rulin Liu (Professor)
College of Life Sciences, Nankai University, China

Shuangjiang Liu (Professor)
Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, China

Xiufan Liu (Academician)
School of Veterinary Medicine, Yangzhou University, China

Zhiheng Liu (Professor)
Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, China

Wenbo Ma (Assistant Professor)
Department of Plant Pathology and Microbiology, University of California at Riverside, USA

Shijun Qian (Professor)
Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, China

Yiming Shao (Professor)
National Center for AIDS/STD Control Prevention, China CDC

Jianhe Sun (Professor)
School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, China

Ming Sun (Professor)
College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, China

Tien Po (Academician)
Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, China

Bin Wang (Professor)
College of Biology, Chinese Agricultural University, China

Ping Wang (Professor)
College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, USA

Chungu Xia (Professor)
Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, China

Xianzhu Xia (Academician)
Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medical Sciences, China

Hua Xiang (Professor)
Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, China

Yan Xu (Professor)
School of Biotechnology, Southern Yangtze University, China

Ruifu Yang (Professor)
Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, China

Susheng Yang (Professor)
College of Biology, Chinese Agricultural University, China

Bin Yao (Professor)
Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, China

Yingnian Yu (Professor)
School of Medicine, Zhejiang University, China

Zhiming Yuan (Professor)
Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, China

Zhonghe Zhai (Academician)
College of Life Sciences, Peking University, China

Chuanxi Zhang (Professor)
Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, China

Jianzhong Zhang (Professor)
National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, China CDC

Jie Zhang (Professor)
Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, China

Huizhan Zhang (Professor)
State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, China

Yaoping Zhang (Senior Scientist)
Department of Bacteriology, University of Wisconsin-Madison, USA

Zhaoshan Zhang (Professor)
Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, China

Liping Zhao (Professor)
School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, China

Tianling Zheng (Professor)
School of Life Sciences, Xiamen University, China

Yang Zhong (Professor)
College of Life Sciences, Fudan University, China

Xudong Zhu (Professor)
College of Life Sciences, Nankai University, China

Yang Zhu (Senior Scientist)
Netherlands Organization for Applied Scientific Research (TNO)

Jian Zhuge (Professor)
School of Biotechnology, Southern Yangtze University, China

《微生物学报》征稿简则

(2010 年 1 月修订)

一、刊物简介和栏目设置

《微生物学报》由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办,国内外公开发行人。主要报道国内外微生物学研究领域的最新科研成果和研究动态,内容涵盖工业、农业、医学、兽医微生物学、病毒学、免疫学等现代生物技术的各个领域。本刊是我国微生物学领域最具影响力的综合性学报级期刊和国家自然科学核心期刊。已被多家文献数据库收录。设有研究报告、研究简报和小型综述 3 个栏目。

二、投稿要求

1. 投稿方式:从 2006 年起,本刊已采用“稿件远程处理系统”进行网上投稿、网上审稿、网上查询等。请登录本刊网站 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>,点击“作者投稿”。如果是首次采用远程方式投稿本刊,请先点击“注册”,注册成功后,即可用注册的用户名和口令在线投稿。详见本刊网站中具体投稿要求。
2. 介绍信:作者投稿时应声明专投本刊,非一稿两投,一旦发生一稿两投,责任由作者承担。登陆本刊网站进入“下载专区”下载“介绍信模板”,认真填写各项内容,随 1 份纸稿(单面打印,A4 纸输出)一同邮寄到编辑部。
3. 稿件受理费:投稿时请通过邮局汇款 100 元,切忌将 100 元夹在纸样中一起邮寄!款到后编辑部会及时以挂号信寄回正式发票。[注:务请在汇款单上注明“第一作者姓名”和“稿件编号”。]
4. 联系方式:为了及时准确地联系,务必请在投稿时注明文章的通信作者、详细邮寄地址、电话及 E-mail(E-mail 最好同时提供第一作者和通信作者的)。

三、写作要求

1. 文题:要求简短、醒目、准确反映主题。中文题名一般不超过 30 个汉字,英文题名应与中文一致。
2. 中英文摘要:研究论文摘要包括目的、方法、结果和讨论;综述摘要包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望。英文摘要完成后,务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再投来。
3. 图和表:文中的图表需清晰简明,应避免图与表内容重复。图内字号为 8P,所有小图的宽度应小于 8cm(占半栏),大图的宽度应小于 17cm(通栏)。图、表题应中英文对照,图上、表内文字及图、表注释一律用英文。
4. 参考文献:参考文献按文内引用的先后排序,必须是作者在论文中直接引用的。未正式发表的文献(包括私人通讯、产品说明书等,学位论文除外)一般不作为文献引用,必要时可作为脚注处理。格式如下:

期刊:[序号] 全部作者. 文章题目. 刊名, 年, 卷(期): 页码.

图书:[序号] 作者. 书名. 版次. 出版地:出版社,出版年,页码.

[序号] 文章作者. 文章题目//书的作者. 书名. 版次. 出版地:出版社,出版年,页码.

译著:[序号] 外国作者的原姓名. 中文书名. 译者的中国人名. 等译. 版次. 出版地:出版社,出版年,页码.

专利:[序号] 专利所有者. 专利题名. 专利国别:专利号. 日期. 学位论文:[序号] 作者. 论文题目. 学校名,博士/硕士论文,年.

四、特别说明

1. 所有实验材料和方法都要符合相关的法律。
2. 关于版权:①本刊只接受未公开发表的文章,请勿一稿两投。②凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章,专有出版权和网络传播权等所有版权均属本刊所有。文章发表后,作者仍享有非专有使用权,可以使用文章进行展览、汇编或展示在自己的网站上。作者如有异议,请事先声明。③对录用的稿件编辑部有权进行文字加工,如有大的改动将请作者同意。④作者必须保证论文的真实性,因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果,由作者自负。
3. 审稿程序:来稿刊登与否由编委会最后审定,通常在收到来稿 2 个月内致作者审稿结果。凡被录用的稿件将及时发出录用通知,对不录用的稿件会致函说明原因。印刷稿不退,请作者自留底稿及原图。
4. 关于综述:本刊只刊登微型综述(mini review),来稿字数应控制在 5000 字(不含参考文献),综述文章一定要结合作者自己的工作,要求文献新,观点明,有评论,有展望,切忌堆砌资料只述不评。
5. 关于测序:凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的内容,请先通过计算机网络进入国际基因库 EMBL(欧洲)或 GenBank(美国)或 DDBJ(日本),申请得到国际基因库接受号(Accession No.)后再投来,文中只列出序列号即可。

五、发表费和稿费

论文一经录用,将在发表前根据版面收取一定的发表费(200 元/面,彩图另加 1000 元,不计数量),并酌付稿酬(50 元/黑白,200 元/彩色)。期刊出版后给每篇文章的作者寄送 2 本样刊和 20 个单行本。编辑部会及时开具发票、并以挂号信邮寄给作者。编辑部会留有发票的复印件、并保留 3 个月,逾期编辑部将不再负责提供任何收据。

六、联系方式

地址:(100101)北京市朝阳区北辰西路 1 号中科院微生物所内

收信(款)人:《微生物学报》编辑部

电话:(010)64807516;传真:(010)64807327

E-mail:actamicro@im.ac.cn

<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>