

毕赤酵母组成型表达脂肪酶及其高通量筛选方法

朱珊珊 喻晓蔚 徐岩*

(江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

摘要: 【目的】获得组成型表达脂肪酶毕赤酵母, 建立利用橄榄油罗丹明 B 平板高通量筛选组成型表达华根霉脂肪酶基因的有效方法。【方法】运用 PCR 技术从 pGAPZ α A 表达载体上扩增得到 GAP 启动子片段, 插入到表达载体 pPIC9K-*proRCL* 中, 构建组成型表达载体 pGAPK-*proRCL*。在保留含有同源双交换重组序列的诱导型启动子 *AOX1* 序列的基础上, 电转化后华根霉 *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 脂肪酶基因 *proRCL* 表达盒在毕赤酵母基因组上发生双交换整合事件, 从而组成型表达单拷贝的华根霉脂肪酶基因。【结果】重组菌发酵 144 h 后, 脂肪酶最高酶活为 130 U/mL。利用橄榄油罗丹明 B 平板高通量筛选组成型表达华根霉脂肪酶基因。【结论】该方法将初筛时间从 12 d 缩短为 3 d, 排除了多拷贝突变株的干扰, 为后续脂肪酶的定向进化及筛选奠定了基础。

关键词: 橄榄油, 罗丹明 B, GAP, 华根霉脂肪酶, 组成型表达

Constitutive expression of lipase in *Pichia pastoris* and the high throughput screening method

ZHU Shan-Shan YU Xiao-Wei XU Yan*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] This study is aimed to constitutive express lipase in *Pichia pastoris* and establish an efficient method for high-throughput screening constitutive expression lipase gene in *P. pastoris* using olive oil-rhodamine B plate. [Methods] The GAP gene promoter was amplified from the plasmid of pGAPZ α A and inserted into the inducible expression vector pPIC9K-*proRCL* resulting in

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 20802027); 国家 863 计划项目(No. 2010AA101501); 国家 973 计划项目(No. 2011CB710800); 中央高校基本科研业务费专项资金(No. JUSRP11014)

*通讯作者: Tel: 86-510-85918201; 邮箱: yxu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2011-10-11; 接受日期: 2011-11-24

constitutive expression of the lipase gene-*proRCL*. Based on the homologous recombinant region of *AOX1* gene, *proRCL* from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 was recombined into chromosome of *P. pastoris* GS115 by double-crossover integration event resulting in constitutive expression of the single-copy lipase gene from *R. chinensis*. [Results] The activity of lipase reached its peak (130 U/mL) after fermentation of 144 h. An efficient method was established for high-throughput screening constitutive expression lipase gene in *P. pastoris* using olive oil-rhodamine B plate. [Conclusion] The method was very convenient with advantages of shortened screening cycle from 12 d to 3 d without the interferences of multi-copy mutants. This method also established the foundation of the screening of library by directed evolution.

Keywords: Olive oil, Rhodamine B, GAP, *Rhizopus chinensis* lipase, Constitutive express

作为真核表达系统,巴斯德毕赤酵母表达系统正以其独特的优势和潜力得到广泛使用^[1]。本实验室在前期研究中,从一株酿造浓香型大曲酒酒曲中筛选获得的华根霉中克隆得到其脂肪酶基因 *proRCL* (GenBank 登录号 No. EF405962),并在毕赤酵母中实现了克隆与高效表达^[2]。研究所用的表达载体 pPIC9K 含有一个来自于乙醇氧化酶 I (AOX1) 基因的严格甲醇诱导型的强启动子 *pAOX1*, 但甲醇易燃,在工业放大过程中存在安全隐患。*pGAP* 是一种糖酵解中的关键酶——三磷酸甘油醛脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAP) 的启动子,在葡萄糖、甘油等基本碳源的存在条件下,能高效地组成型表达外源基因,在培养过程中不需更换碳源,简化了操作步骤,也更适合工业上的应用,因此我们考虑利用 GAP 启动子来构建组成型表达 *proRCL* 的载体。

外源基因整合入毕赤酵母,根据线性化位点位置的不同,将会导致两种整合入基因组事件——单插入与双交换的发生,产生两种不同的表型,即 Mut^+ 和 Mut^S 。单插入事件通常会导致插入不同拷贝数的基因组,而双交换一般是将单拷贝外源基因整合入基因组。多拷贝外源基因的整合可以提高外源蛋白的表达量,但是利用毕赤酵母表达系统进行定向进化的过程中,多拷贝的发生会干扰重组子的筛选,例如筛选酶活提高突变株时,拷贝数的增加也会导致酶活增高,从而干扰了酶活提高突变酶的筛选。

而利用商业化的 pGAP α A 表达质粒无法产生双交换事件,为了同时利用启动子 *pGAP* 进行组成型表达筛选,以及将外源基因双交换整合入基因组产生单拷贝重组子,本文在保留了诱导型表达载体 pPIC9K 上的 5'AOX1 的基础上,将 PCR 得到的 *pGAP* 基因片段插入到 5'AOX1 序列之后,华根霉脂肪酶基因 *proRCL* 之前,通过载体与基因组之间的 5'AOX1 及 3'AOX1 区发生的双交换事件,将构建的组成型表达载体整合到酵母基因组中,产生 Mut^S 表型的菌株。双交换的发生导致基因组中 AOX1 编码区完全被取代,5'AOX1 不能发挥启动子的作用,只作为双交换整合的必需元件。从而导致紧随其后的 GAP 启动子能够顺利的发 挥组成型表达华根霉脂肪酶的作用。该表达体系显著减少毕赤酵母基因多拷贝的产生概率,并能够组成型表达外源基因。以华根霉脂肪酶为研究载体,利用该表达体系组成型表达华根霉脂肪酶,结合橄榄油-罗丹明 B 平板显色法,建立了定向进化突变文库的高通量筛选方法。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 工具酶和试剂: 限制性内切酶、CIAP 碱性磷酸酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、PCR 试剂、pMD19-T simple 载体, TaKaRa 宝生物公司; 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成; DL2000 DNA Ladder Marker、DL5000

DNA Ladder Marker、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、Plasmid Mini Kit I, OMEGA BIO-TEK; 其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.1.2 菌株和质粒: *E. coli* DH5 α 由本实验室保存。重组质粒 pPIC9K-*proRCL* 和重组毕赤酵母 GS115/pPIC9K-*proRCL* Mut^S 由本实验室构建, 巴斯德毕赤酵母 *P. pastoris* GS115、载体 pPIC9K、pGAPZ α A 购自 Invitrogen 公司。

1.1.3 培养基: 大肠杆菌培养基 LB 及 LLB, 酵母培养基 YPD、MD、MM 和 YPD-G418 按“Invitrogen 公司操作手册”方法配制。橄榄油-罗丹明 B 培养基按照 1.34% YNB、 4×10^{-5} % 生物素、1% 橄榄油、2% 琼脂的比例配置后, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min, 灭菌后冷却至 60 °C, 加入 1×10^{-3} % 过滤灭菌的罗丹明 B, 制成平板^[3]。

1.2 方法

1.2.1 GAP 启动子的克隆: 根据 pGAPZ α A 上的 *pGAP* 的序列, 设计一对专一性引物: BF: 5'-CGGATCCGATCTTTTTGTAGAAATGTCTTGGTGTCC-3'(下划线为 *Bam*H I 酶切位点); ER: 5'-GAATTCAGCTTCAGCCTCTTTTCTCGA GAGATAACC-3'(下划线为 *Eco*R I 酶切位点)。以 pGAPZ α A 载体为模板, PCR 扩增 GAP 启动子序列。PCR 扩增条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 62 °C 30 s, 72 °C 50 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物纯化后与 pMD19-T simple 载体连接, 转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 转化子提质粒, 经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切, 胶回收后得到 *pGAP* 片段。

1.2.2 pGAPK-*proRCL* 载体的构建: 将重组质粒 pPIC9K-*proRCL* (本实验室构建) 经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切, 将无用的载体小片段替换成 *pGAP* 片段。利用 T4 DNA 连接酶连接过夜。但是由于 *proRCL* 中也含有 *Eco*R I 酶切位点, 酶切

后得到 3 个片段, 根据 3 个片段的大小情况具体分析, 去除 284 bp 的无用片段, 将剩余片段胶回收后按顺序与 *pGAP* 片段进行连接。将连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞, 提质粒, 获得组成型表达载体 pGAPK-*proRCL*。同时, 将 *pGAP* 片段与酶切后的原始载体 pPIC9K 连接构成 pGAPK, 作为平板筛选法的对照。上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.2.3 酵母的电转化: 将构建的组成型质粒 pGAPK-*proRCL* 经限制性内切酶 *Bgl* II 酶切后, 胶回收得到大片段线性化质粒, 电转化毕赤酵母 GS115 感受态细胞; 取 8 μ L 浓度为 1 g/L 的线性化质粒与 80 μ L 感受态细胞混合均匀, 转至 0.2 cm 冰预冷的电激杯中。冰上放置 5 min, 电压 1 500 V, 电容 25 μ F, 电阻 200 Ω , 进行电击。立刻加入 1 mL 1 mol/L 山梨醇复苏, 30 °C 培养 1 h。将转化液涂布于 MD 平板上, 30 °C 培养 2 d^[4]。pGAPK 的电转化方法同上。

为了比较单插入与双交换整合事件对重组子阳性率和拷贝数等因素的影响, 我们按上述方法将原始载体 pPIC9K-*proRCL* 经 *Sal* I 线性化后在 HIS4 位点单插入到酵母基因组中。

1.2.4 重组子的筛选: 从 MD 平板上挑选 HIS⁺ 转化子接种于 YPD 试管, 培养 16 h, 提取酵母基因组, 利用 pPIC9K 序列引物 5'AOX1、3'AOX1 进行 PCR, 鉴定阳性转化子。5'AOX1: 5'-GACTG GTTCCAATTGACAAG C-3'; 3'AOX1: 5'-GGCAA ATGGCATTCTGACAT-3'。PCR 扩增条件: 94 °C 4 min; 94 °C 1 min, 56 °C 1.5 min, 72 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.2.5 脂肪酶酶活的测定: 将组成型表达菌 GS115/pGAPK-*proRCL* Mut^S 和诱导型表达菌 GS115/pPIC9K-*proRCL* Mut^S 均按照 invitrogen 公司的 pGAPZ α A 操作手册的要求, 在 100 mL YPD 培养基中, 30 °C 振荡培养, 每隔 24 h 取样测酶

活。脂肪酶水解活力的测定方法参见文献[5], 酶活的定义为: 一定反应条件下每分钟产生 1 μmol 对硝基苯酚的酶量为一个脂肪酶水解酶活国际单位。

1.2.6 产脂肪酶菌株高通量筛选方法的建立: 将对照菌 GS115/pGAPK Mut^S 与构建的组成型表达菌株 GS115/pGAPK-*proRCL* Mut^S 点种于橄榄油-罗丹明 B 平板上, 30 °C 培养 3 d, 在紫外光下观察单菌落变色圈情况。

1.2.7 单插入和双交换筛选库的构建: 利用定向进化技术建立的基因突变文库的质量将对后续的实验结果有重大影响。为考察单插入与双交换这两种不同的整合方式对整个建库的影响, 将经 *Sal* I 酶切的线性化对照质粒 pPIC9K-*proRCL* 和经 *Bgl* II 酶切的线性化重组质粒 pGAPK-*proRCL* 分别通过单插入和双交换方式整合进毕赤酵母基因组中, 同时保证这两种线性化质粒的量基本相同, 进行电转化。

将获得的诱导型 Mut⁺ 转化子涂布 MD 平板, 将 MD 平板上的单菌落用灭菌牙签挑至 MM 板上, 诱导 5 d 后, Fast-blue RR 顶层琼脂法染色, 2 min 内能够显出明显棕黑色的菌株为阳性重组菌(脂肪酶可以水解萘酯, 水解产物与染料结合显色)^[6]。阳性重组率 = 所有 MM 板上诱导表达产脂肪酶的单菌落数/MD 板上的单菌落数。

将获得的组成型 Mut^S 转化子涂布橄榄油罗丹明 B 平板, 对平板上的转化子进行计数, 根据平板上具有荧光变色圈的单菌落数与所有转化子的数量比得到阳性重组率。阳性重组率 = 橄榄油罗丹明 B 平板上具有荧光变色圈的单菌落数/橄榄油罗丹明 B 平板所有的单菌落数。

1.2.8 重组子拷贝数的定量: 每个文库随机挑选 10 株阳性转化子, 提取基因组, 利用荧光定量 PCR 技术进行基因拷贝数的定量^[7]。

2 结果与分析

2.1 表达载体 pGAPK-*proRCL* 的构建

以 pGAPZ α A 质粒为模板, 利用 BF 和 ER 引物 PCR 获得 GAP 启动子, 同时在 *pGAP* 中引入 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点。PCR 产物条带约 750 bp (图 1)。连接 pMD19-T simple 载体, 测序, 确认 *pGAP* 被完整的克隆, 再经双酶切获得 *pGAP* 片段。

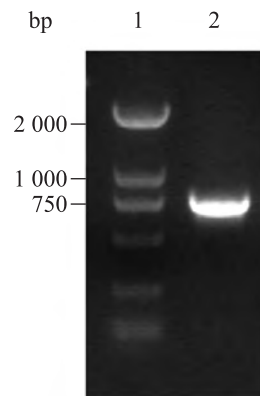


图 1 PCR 扩增 *pGAP* 片段电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of PCR product about *pGAP*

Note: 1: DNA marker; 2: DNA product about *pGAP*.

由于 pPIC9K 载体和 *proRCL* 基因中同时都含有 *Eco*R I 酶切位点, 因此在双酶切质粒 pPIC9K-*proRCL* 时, 大部分的 *proRCL* 基因也被切除, 因此需要将 3 个片段连接起来。如图 2A 所示, 双酶切质粒 pPIC9K-*proRCL* 后将长片段与 *pGAP* 连接, 构建 pGAPK 质粒。再用 *Eco*R I 酶切线性化 pGAPK 质粒, 将 *proRCL* 片段补回表达质粒中。由于线性化的 pGAPK 质粒过长, 酶切位点容易自连, 需要先进行去磷酸化处理, 再连接 *proRCL* 基因, 最终得到含 *pGAP* 的组成型表达载体 pGAPK-*proRCL*。

2.2 组成型表达毕赤酵母的获得和鉴定

本实验选择 pGAPK-*proRCL* 载体中 *Bgl* II 酶切位点进行线性化, 双交换整合到毕赤酵母基因组中。双交换会造成 AOX1 编码区被取代, 形成 Mut^S 表型的突变株, 见图 2B。

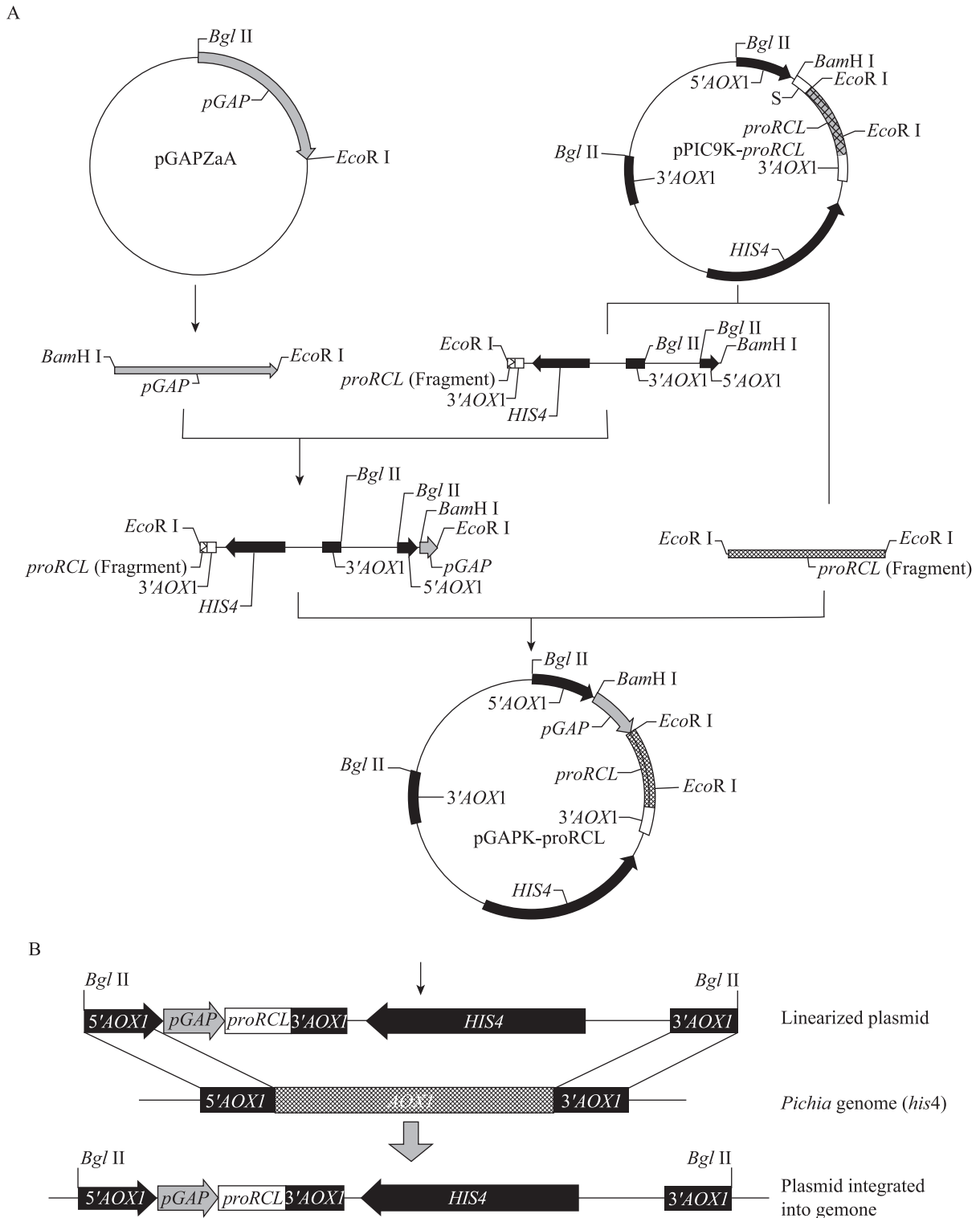


图2 重组质粒 pGAPK-proRCL 的构建与体内双交换整合事件的示意图
Fig. 2 Construction of recombination plasmid pGAPK-proRCL and representation of the double-crossover integration events *in vivo*

提取重组酵母基因组, 利用 pPIC9K 序列引物 5'AOX1、3'AOX1 鉴定阳性转化子^[8]。阴性对照 GS115/pPIC9K-*proRCL* Mut^S 的基因组 PCR 结果如图 3 所示, 产物条带大小为 1 580 bp。而插入了 GAP 启动子的酵母重组子 GS115/pGAPK-*proRCL* Mut^S 的基因组在此基础上将载体上一段 284 bp 的无用序列替换成 750 bp 的 *pGAP* 序列, PCR 扩增结果为 2 046 bp, 图 4 的 PCR 验证结果与预想的一致, 证明组成型表达毕赤酵母 GS115/pGAPK-*proRCL* Mut^S 构建成功, *pGAP* 和 *proRCL* 基因已整合到基因组中。

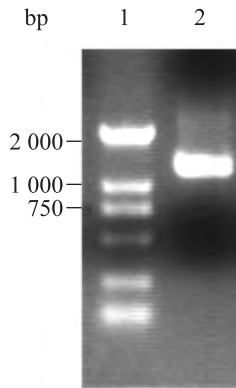


图 3 阴性对照 GS115/pPIC9K-*proRCL* Mut^S PCR 验证
Fig. 3 PCR identification of negative control GS115/pPIC9K-*proRCL* Mut^S

Note: 1: DNA marker; 2: GS115/pPIC9K-*proRCL* Mut^S (1 580 bp).

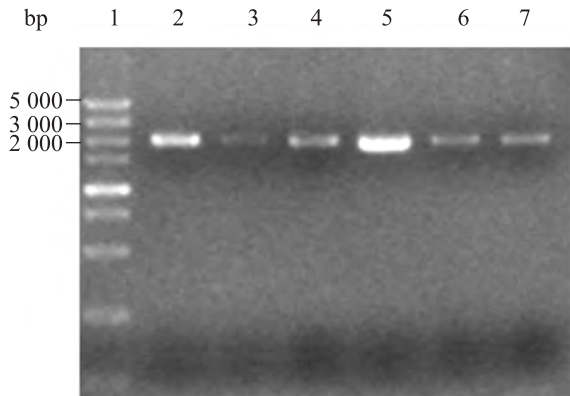


图 4 GS115/pGAPK-*proRCL* Mut^S 重组子 PCR 验证
Fig. 4 PCR identification of recombinants GS115/pGAPK-*proRCL* Mut^S

Note: 1: DNA marker; 2-7: GS115/pGAPK-*proRCL* Mut^S (1 580 bp-284 bp+750 bp=2 046 bp).

2.3 组成型表达毕赤酵母脂肪酶的分泌表达

图 5 是组成型表达毕赤酵母的生长曲线, GS115/pGAPK-*proRCL* Mut^S 在 100 mL YPD 摇瓶中培养 144 h 后达到最大酶活, 为 130 U/mL。而出发菌株 GS115/pPIC9K-*proRCL* Mut^S 在相同条件下培养了 8 d, 由于缺乏甲醇的诱导, 几乎没有表达脂肪酶。结果证明 GAP 启动子在毕赤酵母中发挥了组成型表达脂肪酶的作用。

组成型表达毕赤酵母 GS115/pGAPK-*proRCL* Mut^S 在 0-12 h 处于迟滞期, 细胞生长缓慢; 12-48 h 进入对数生长期, 细胞成指数生长; 48-120 h 处于稳定期, 细胞浓度基本不变; 120 h 以后细胞处于衰亡期, 菌体逐步自溶, 释放胞内蛋白酶使外源蛋白降解, 酶活迅速降低。

2.4 组成型表达脂肪酶的毕赤酵母高通量筛选方法

橄榄油-罗丹明 B 平板变色圈法指利用橄榄油作为底物, 用 Rhodamine B 作为指示剂, 通过脂肪酸与 Rhodamine B 结合在紫外光下进行观察, 平板上产生荧光变色圈来判断脂肪酶活力。如图 6 所示, GS115/pGAPK Mut^S 菌株未插入脂肪酶基因而生长缓慢, 不产生荧光变色圈, 只有 GS115/pGAPK-*proRCL* Mut^S 菌株才能在平板上正常生长, 它能直接以橄榄油作为碳源表达脂肪酶, 因此菌落较大且紫外条件下荧光变色圈大而明显。该结果为进一步利用该筛选系统进行定向进化奠定了基础。

2.5 单插入和双交换对转化效率、拷贝数和筛选时间的影响

对比单插入和双交换这两种不同方法, 分别构建得到 GS115/pPIC9K-*proRCL* Mut^S 和 GS115/pGAPK-*proRCL* Mut^S 菌株。如表 1 所示, 双交换产生的 Mut^S 表型菌株和单插入产生的 Mut^S 表型菌株的转化效率均处于 10⁵ 数量级, 因此 Mut^S 表型菌株的转化效率较 Mut^S 表型菌株的

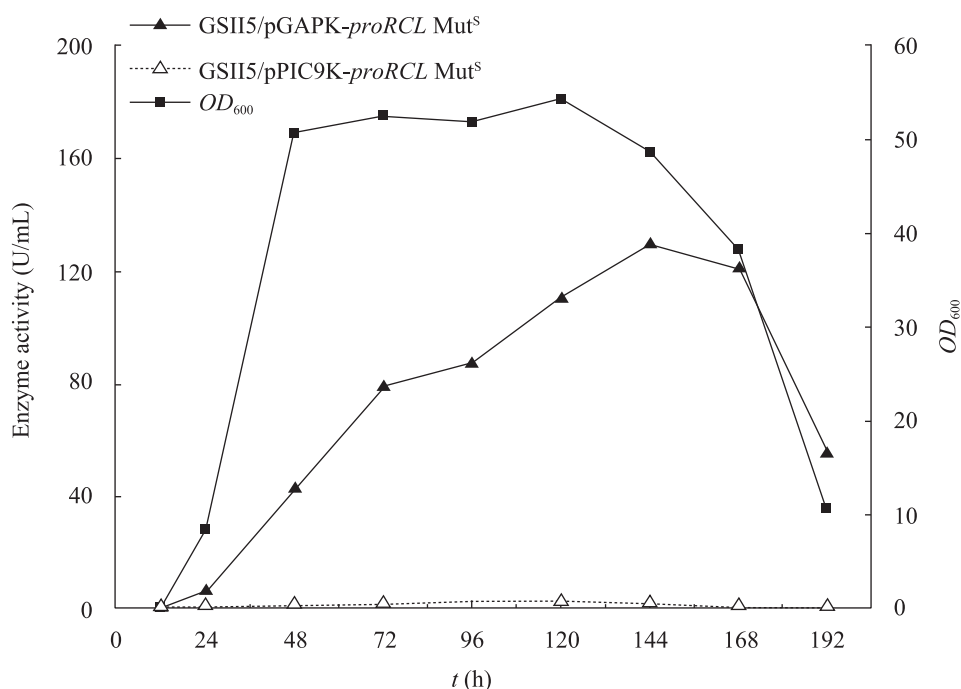


图5 GS115/pGAPK-*proRCL* Mut^S组成型表达脂肪酶活力和细胞生长量
Fig. 5 Lipase activity and cell growth from GS115/pGAPK-*proRCL* Mut^S

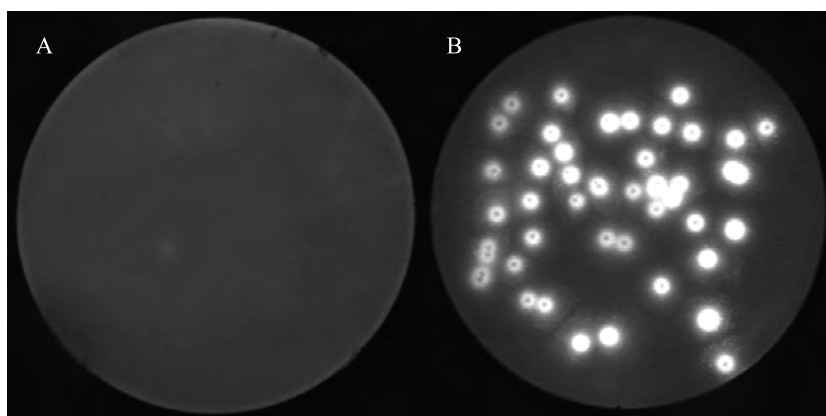


图6 重组毕赤酵母橄榄油-罗丹明 B 平板的检测

Fig. 6 Test the lipase activity of recombinant *P. pastoris* by olive oil-rhodamine B plate

Note: A: GS115/pGAPK Mut^S; B: GS115/pGAPK-*proRCL* Mut^S.

表1 单插入和双交换整合构建的文库比较
Table 1 Comparison of pools built by single-insertion and double-crossover integration events

| 菌株 Stains | 表型 Phenotype | 转化效率 Transformation efficiency (10 ⁵ CFU) | 阳性重组率 Positive recom- binant ratio (%) | 单拷贝菌株率 Single-copy strains ratio (%) | 库的筛选时间 Consumed time for pool screen- ing (d) |
|-----------------------------|------------------|--|--|--|--|
| GS115/pPIC9K- <i>proRCL</i> | Mut ⁺ | 6.8 | 95 | 51 | 12 |
| GS115/pGAPK- <i>proRCL</i> | Mut ^S | 4.2 | 92 | 100 | 3 |

略低并不影响高通量的筛选。两者的阳性重组率相差不大,均达到 90%以上,虽然双交换产生的阳性重组率较单插入略有降低,但鉴于它的高转化效率,双交换对建库效率的影响是极其微弱的。 Mut^S 表型能够保证全部菌株的单拷贝概率,而 Mut^+ 表型菌株却只有 51%的单拷贝菌株的概率。由此得出,双交换整合得到的 Mut^S 表型菌株转化效率和阳性重组率满足了后续建库的容量需求,并且能稳定的保证转化子的单拷贝状态,大大削减了多拷贝基因重组子的数量,更有利于我们利用该筛选方法进行单基因突变菌株的筛选。同时组成型表达脂肪酶的毕赤酵母通过利用橄榄油罗丹明 B 平板进行阳性重组子的筛选,省略了转接培养基、富集培养、诱导和染色的步骤,将原始的培养诱导周期从 12 d 缩短为 3 d,筛选时间缩短为原来的 25%,操作简单快捷,满足了高通量筛选的要求。

3 讨论

本实验通过在 pPIC9K-*proRCL* 载体的 5'AOX1 启动子与 *proRCL* 目的基因之间插入 GAP 启动子,双交换整合到毕赤酵母基因组中,使基因组中 AOX1 编码区完全被取代,阻碍 5'AOX1 诱导启动子使用,发挥了 GAP 启动子组成型表达的功能。组成型表达华根霉脂肪酶的毕赤酵母可以不经甲醇诱导就在橄榄油罗丹明 B 平板上正常生长,操作简便,排除了甲醇作为碳源时对橄榄油的利用率的干扰。载体双交换整合基因组的方式不仅有利于插入的启动子 GAP 成功的发挥组成型表达的作用,而且保证了所有重组子均为单拷贝菌株,排除了多拷贝突变基因的干扰,有利于后续的酶活提高菌株的氨基酸结构与功能的分析。

橄榄油罗丹明 B 平板变色圈法利用脂肪酶水解底物橄榄油,产生的自由脂肪酸与罗丹明 B 结

合,紫外线照射下,根据菌落周围产生的橙色荧光圈的大小来判断酶活的高低^[9-10]。早在 1986 年, Gisela Kouker 等就利用该平板检测细菌产脂肪酶的活力高低^[9]。如今它不仅被普遍用于筛选自然界中产脂肪酶的菌株^[11],牛卫宁等还将诱导型表达少根根霉脂肪酶基因的毕赤酵母点种于橄榄油罗丹明 B 平板,进行诱导筛选^[12]。诱导型表达毕赤酵母的平板筛选需要首先涂布含葡萄糖的 MD 平板进行阳性克隆的筛选和富集,再转移到含有甲醇的 MM 平板进行诱导培养和筛选。而组成型表达毕赤酵母可直接涂布橄榄油罗丹明 B 平板,利用只含有 YNB 的橄榄油罗丹明 B 平板就能得到阳性克隆,再根据脂肪酸与罗丹明 B 结合在紫外光下产生的荧光变色圈大小即能筛选到高产脂肪酶的突变株,筛选时间缩短为原来的 25%。该筛选方法作为定向进化平板初筛脂肪酶的方法,具有操作简便、直观准确、缩短转化子培养时间等的优点。

本研究表明,将双交换构建组成型表达载体和利用橄榄油罗丹明 B 平板变色圈法相结合的方法,成功实现了在 3 d 时间内高通量的筛选组成型表达脂肪酶的毕赤酵母单拷贝重组子的目的,为后续的定向进化提供了简便高效的筛选方法。

参 考 文 献





- [1] Daly R, Hearn MTW. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production[J]. *Journal of Molecular Recognition*, 2005, 18(2): 119-138.
- [2] Yu XY, Wang LL, Xu Y. *Rhizopus chinensis* lipase: gene cloning, expression in *Pichia pastoris* and properties[J]. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 2009, 57(1/4): 304-311.
- [3] 赖红星, 万霞, 张银渡, 等. 异源表达脂肪酶的重组酵母筛选培养基的改良[J]. *生物技术通报*, 2010(2): 189-193.

- [4] 王睿, 喻晓蔚, 沙冲, 等. 定向进化-易错 PCR 方法提高华根霉 *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 脂肪酶的活力[J]. 生物工程学报, 2009, 25(12): 1892-1899.
- [5] Derewenda U, Swenson L, Wei YY, et al. Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*[J]. Journal of Lipid Research, 1994, 35(3): 524-534.
- [6] 王睿, 喻晓蔚, 徐岩, 等. PCR 依赖型方法构建高质量酵母基因突变文库[J]. 生物工程学报, 2011, 27(9): 1326-1336.
- [7] Abad S, Kitz K, Hörmann A, et al. Real-time PCR-based determination of gene copy numbers in *Pichia pastoris*[J]. Biotechnology Journal, 2010, 5(4): 413-420.
- [8] Version E, Carlsbad CA. Multi-copy *Pichia* Expression Kit[M]. USA: Invitrogen, 1999: 70-71.
- [9] Kouker G, Jaeger KE. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53(1): 211-213.
- [10] Mackenzie RD, Blohm TR, Auxier EM, et al. Rapid colorimetric micromethod for free fatty acids[J]. Journal of Lipid Research, 1967, 8(6): 589-597.
- [11] Shu ZY, Lin RF, Jiang H, et al. A rapid and efficient method for directed screening of lipase-producing *Burkholderia cepacia* complex strains with organic solvent tolerance from rhizosphere[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2009, 107(6): 658-661.
- [12] 牛卫宁, 谭天伟. 少根根霉(*Rhizopus arrhizus*)脂肪酶基因在毕赤酵母中的分泌表达[J]. 生物加工过程, 2006, 4(2): 37-41.



征订启事

2012 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订

| | |
|---|---|
|  | 《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。 |
|  | 《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。 |
|  | 《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 58.00 元, 年价 696 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。 |
|  | 《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472; CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。 |
| 订阅 | 欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄。 |
| | 汇款地址: (100101)北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中科院微生物所 B401 |
| | 收信人: 《 》编辑部; 电话: 010-64806142; E-mail: bjb@im.ac.cn |
| | 请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量。 |