

二步法黑曲霉脂肪酶基因 *lipA* 的全基因合成及其在毕赤酵母中的高效表达

杨江科, 严翔翔, 张正平, 江雪青, 闫云君

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

摘要: 黑曲霉脂肪酶是重要的工业用酶, 在食品、制药等领域具有广泛的用途。获得黑曲霉脂肪酶高效表达的基因工程菌是该脂肪酶规模化应用的前提。通过全基因合成对目的基因进行分子改造和人工组建是实现基因高效表达和体外分子进化的有效手段。本研究主要针对一步法长片段基因合成中复杂结构的非特异性配对和过多的 PCR 引入碱基错配等问题, 采用二步法(组装 PCR 和酶切-酶连)合成了黑曲霉脂肪酶基因 *lipA*。首先在 DNA2.0 和 Gene2Oliga 软件辅助下对 *lipA* 基因密码子及 RNA 二级结构进行优化并引入 *Cla* I(237 位)和 *Pst* I(475 位)酶切位点; 通过组装 PCR 分别合成 *lipA* 基因的各片段 F1(237 bp)、F2(238 bp)和 F3(422 bp); 通过该基因内的 *Cla* I 和 *Pst* I 限制性酶切位点连接成完整的全长 *lipA* 基因。本方法有效地降低了长片段合成过程中寡核苷酸片段的非特异性配对、复杂的二级结构以及碱基突变对 DNA 合成的影响, 提高了长片段合成的成功率。经密码子优化后的脂肪酶基因(*lipA*-syn)在毕赤酵母 GS115 中经诱导表达 72 h 后, 发酵液酶活达 176.0 U/mL, 蛋白质含量为 143.7 mg/L, 较出发基因分别提高了 10.8 倍和 5.6 倍。实现了该基因的高效表达, 并为产酶参数的优化和酶的规模化制备奠定了基础。

关键词: 黑曲霉脂肪酶基因 *lipA*, 全基因合成, 二步法, 毕赤酵母, 高效表达

Two-step synthesis of the full length *Aspergillus niger* lipase gene *lipA* leads to high-level expression in *Pichia pastoris*

Jiangke Yang, Xiangxiang Yan, Zhengping Zhang, Xueqing Jiang, and Yunjun Yan

Key Laboratory of Molecular Bio-physics of Ministry of Education, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China

Abstract: *Aspergillus niger* lipases are important biocatalysis widely used in industries for food processing and pharmaceutical preparation. High-level expression recombinants can lead to cost effective lipase large scale production. Full length gene synthesis is an efficient measure to enhance the expression level of the gene. In order to reduce the non-specific binding between oligonucleotides and bases mutation caused by the complicate secondary structure of DNA and excessive PCR amplification, a frequently phenomenon in one-step gene synthesis, we used a two-step method including assembly PCR (A-PCR) and digestion-ligation step to synthesis *Aspergillus niger* lipase gene *lipA*. Assisted by DNA2.0 and Gene2Oliga software, we optimized the codon usage and secondary structure of RNA and induced enzyme sites *Cla* I (237 site) and *Pst* I (475 site) into the gene. In the first step, fragments F1 (237 bp), F2 (238 bp) and F3 (422 bp) were separately synthesized by assembly PCR. In the second step, fragments F1, F2 and F3 were separately digested by *Cla* I and *Pst* I, and then ligated into a full length *lipA* gene. Two-step method efficiently enhanced

Received: September 22, 2008; **Accepted:** December 22, 2008

Supported by: National High-tech Research and Development Program of China (863 Program) (Nos. 2007AA05Z417, 2006AA020203).

Corresponding author: Jiangke Yang. Tel: +86-27-87792214; E-mail: jiangke_yang@hotmail.com

国家高技术研究发展计划(863 计划)(Nos. 2007AA05Z417, 2006AA020203)资助。

successful ratio for full-length gene synthesis and dispersed the risk for gene redesign. The synthesized gene was cloned into pPIC9K vector and transferred into *Pichia pastoris*. After methanol inducement, the expression level of the codon optimized *lipA*-syn gene reached 176.0 U/mL, 10.8-fold of the original *lipA* gene (16.3 U/mL) in *Pichia pastoris* GS115. The recombinant offers the possibility for lipase large-scale production.

Keywords: *Aspergillus niger*, *lipA*, two-step gene synthesis, *Pichia pastoris*, overexpression

脂肪酶是重要的工业用酶, 广泛应用于食品、油脂化工、洗涤以及医药等行业。与其他微生物源的脂肪酶相比, 黑曲霉脂肪酶在最适 pH(<7)、底物特异性等酶学性质上均具有特殊性。黑曲霉被美国食品药品监督管理局认定为 GRAS (Generally regarded as safe), 具有良好的生物安全性。因此, 黑曲霉脂肪酶是食品工业中首选的脂肪酶品种。同时, 该类脂肪酶在前体药物的合成及手性化合物的拆分等领域也具有广阔的应用前景^[1]。构建高效的基因工程菌是脂肪酶规模化生产的重要前提。甲醇营养型巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达体系是一套优良的系统。它具有外源蛋白表达量高、营养要求低、生长快、适于高密度发酵等诸多优点, 已广泛用于工业化生产。但由于毕赤酵母和黑曲霉在密码子使用频率上的巨大差异, 其原有密码子在毕赤酵母中整体表达频率均较低。

由于对密码子使用频率、RNA 二级结构、基因组件及功能区的高度可控性, 人工合成基因不仅能够实现目的基因的高效表达, 而且可实现对基因的功能改造和体外分子进化。基因合成的方法主要有组装 PCR(Assembly PCR)^[2,3]、寡核苷酸连接法^[4]、重叠延伸 PCR^[5]以及 TBIO 法 (Thermodynamically balanced inside-out)^[6]等。组装 PCR 及其改良技术是目前广泛采用的长 DNA 序列的合成方法^[2,3,7], 通过组装 PCR 以及随后的二次 PCR 将人工合成的一系列长度不等且相互重叠的寡核苷酸组装成全长的基因。但由于不同基因在核苷酸序列、GC 含量和二级结构等方面的差异, 组装 PCR 方法在基因合成中存在较严重的碱基错配。且随着基因长度和二级结构复杂程度的增加, 寡核苷酸间的错配率和基因合成提前终止的机率大幅增长^[3]。

本室成功地从黑曲霉 F044 中克隆了首个脂肪酶基因 *lipA*, 实现了其在 *E. coli* 中的表达和酶学性质分析^[8]。本研究主要针对一步法(组装 PCR)长片段基因合成中复杂结构的非特异性配对和过多的 PCR

引入碱基错配等问题, 拟建立适于长片段基因合成的二步法(组装 PCR 和酶切-酶连法)。在此基础上, 根据毕赤酵母的密码子偏爱性合成黑曲霉脂肪酶基因 *lipA*, 并实现其在毕赤酵母中的高效表达, 为该脂肪酶的工业化生产奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5 α 、毕赤酵母 GS115、质粒 pPIC9K 为本实验室保存。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Pfu* 聚合酶等购自宝生物工程(大连)有限公司。质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒等购自 Tiangen 公司。

1.2 方法

1.2.1 *lipA* 基因遗传密码的优化、寡核苷酸片段的设计与合成

根据黑曲霉脂肪酶 *lipA* 基因的核苷酸序列 (GenBank Accession No. DQ647700), 在 Bioedit 软件的辅助下推导出该基因的氨基酸序列; 在 DNA2.0 软件的辅助下, 以毕赤酵母密码子使用频率表为基准, 对 *lipA* 的密码子进行优化, 并根据密码子的内在分布情况, 在优化后的 *lipA* 基因序列中引入 *Cla* I (237 位)和 *Pst* I(475 位)酶切位点。根据引入的酶切位点将全基因分成了 F1、F2 和 F3 三个片段; 在 Gene2Oliga 软件^[7]的辅助下分别设计用于合成 F1、F2 和 F3 片段的寡核苷酸。各寡核苷酸序列及组装见图 1。

各寡核苷酸片段由上海生物工程有限公司在 Applied Biosystem 公司 381A 型 DNA 合成仪上采用固相亚硝酸胺法合成寡核苷酸片段。合成片段经过脱盐, PAGE 纯化后备用。

1.2.2 寡核苷酸片段的组装与全基因的拼接

各大片段由寡核苷酸分别组装。在组装 PCR 体系中, 每 50 μ L 体系含有 200 mmol/L dNTP、0.1 mmol/L 寡核苷酸片段和 0.5 U *Pfu*。反应条件为:

94°C 变性 2 min; 94°C 30 s, 50°C 30 s, 72°C 1 min, 共 30 循环; 72°C 5 min。

片段 F1、F2 和 F3 的 PCR 产物经相应的酶切, 即 F1 用 *Cla* I 酶切、F2 用 *Cla* I 和 *Pst* I 酶切、F3 用 *Pst* I 酶切。F1、F2 和 F3 片段酶切产物经纯化后于 16°C 连接过夜; 以连接产物为模板, 以 *lipA* 基因上下游寡核苷酸片段为引物通过 PCR 扩增全长 *lipA* 基因。每 50 μL 体系含有 200 mmol/L dNTP、上游引物 P1 (5'-CTTGAATTCGCTCCAGCT-CCAGCACCTATGCAA-3') 和下游引物 P2 (5'-CACATTAATTCG AAGAGGG-3') 0.1 mmol/L、0.5 U *Pfu*。反应条件为: 94°C 变性 2 min; 94°C 30 s, 50°C min, 72°C 1 min, 共

30 个循环; 72°C 5 min。

拼接后的 PCR 产物克隆入 pMD18T 载体, 连接产物转化 *E. coli* DH5α 后、筛选并获得阳性克隆子; 插入片段经 PCR 检测后, 由上海英骏生物技术有限公司进行序列分析。

1.2.3 表达质粒构建

以 PS1(5'-CTT GAATTC GCT CCA GCT CCA GCA CCT ATG CAA A-3', 下划线处为 *EcoR* I 位点) 和 PA1(5'-CT GCGGCCGC TTA AGA ACA CTC AGA GAT G-3', 下划线处为 *Not* I 位点) 为引物扩增全长脂肪酶基因。PCR 产物经 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切后, 插入到经 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切的 pPIC9K 相应的位点上, 构

F1 Fragment

CTTGAATTCGCTCCAGCT-CCAGCACCTATGCAA GAAGAGACATCTCTCCAC-TGTTCTGGATAACATTGATCT GT GAACTTAAACGAGGTCGA GGTCTGGATACGTTT-CTTCTGTAGAGAAGGTG ACAAGACCTATTGTAAGTACA-CA TTGCTCAGTACTCAGC-AGCTGCTTACTGTTCTT CAACATTGAGTCTACTGGA-ACTACCTGACTTGTA CGTTGG AACGAGTCATGAGTCG TCGACGAATGACAAGAAG-GTTGTAAGTCAAGTACCT TGATGGGACTGAACACT-GCAACC TAACTGTCCAC-TGGTCGAAGCAGCTGG AGCTACTACCATCGATgt-caatagttgaattcatttgcg ATTGACAGGTG ACCAGCTTCGTCGACC-TCGATGATGGTAGTACA gttatcaacttaagtaaacgc

F2 Fragment

gagctctcaattcaCTTATCG-ATGAGTTTGATGACTCTTCA TCCTATGGTGATCCTACT-GGATTCATTGCTGTGCA ctcgagagtttaagtGAA TAGC TACTCAAAGTACTGAGAAAGT-AGGATACCACTAGGATGA CCTAAGTAAACGACAGCT-TCCAACTAACGAACTGAT-CGTTTTGTCTTTCAGAGG TTCTTCCGATTTGTCTAATTG-GATTGCTGATCTGGACT TT AGGTTGATTGCTTGACTA GCAAACAGAAAGTCTCC-AAGAAGGCTAAACAGATTAAC CTAACGACTAGACCTGA-AA GGATTGACATCCGTT-TCTTCCATCTGTGATGG TTGTGAGATGCATAAGGG-ATTTTACGAAGCCTGGGA GGTATTG CCTAAGTGTAGGCAA AGAAGGTAGACTACTACC-AACACTCTACGTATTCCC TAAATGCTTCGGACCCT-CCAATAAC CTGACACTATTA-CCTCTAAAGTTGAGGCTG CAGcgcgtagtgtgt GACTGTGATAAT GGAGATTTCAACTCCGAC-GTCgcccacacaca

F3 Fragment

CTTCTGCAATTTCTTCTATC-CTGATTACACCTTGGTTTTT ACTGGTCATTCTTATGGTG-CTGCTTTGGCTGCTGT GAAACGCTCAAAGAAGGATAG GACTAATGTGGAACCAAAAG-TGACCAGTAAAGTAAACAC GACGAAACCGACGACA-CGCTGCCACTGTTTTG-AGAAATGCTGGATACACT CTGGACTGTACAACCTTG-GTCAACCAAGAATTGGTAAT CTG GCGACGGTGACAAAAC TCTTTACGACCTATGTGA-GACCTGAACATGTTGAAAC CAGTTGGTTCTTAACCATTA-GAC GCTTTGGCTGATTA-CATCACTGACCAGAACA TGGGATCTAACTACAGAGT-CACTCATAAGATGACATCG TTCCAA CGAAACCGACTAAT GTAGTACTGGTCTTGT-ACCCTAGATTGATGTCTCA GTGAGTATGTCTACTGTAGC-AAGGTT AGCTGCCACC-TGAGTTGCTGGTTACC ATCATTCTCTCCAGAGTAC-TGGATTACCTCTGGTAATG ACGTTACAGT TCGACGGTGG ACTCAACGACCAATGG-TAGTAAAGAGAGGTCTCATG ACCTAATGGAGACCATTAC-TGCAATGTCA TACCATT-CCGATGTCACTGAAGTG GTTGGTGTGATTCTACCG-ATGGTAAACGATGGTACTC TGTGGACTCCACT ATGGTGAA GGCTACAGTACTTAC-CAACCACAAGTAAAGTGGC TACCATTGCTACCATGAG-ACAACCTGAGGTGA ACA-GCTCATAGATGGTACACC ATTTACATCTCTGAGTGTCTT-cctctctgaattaatgtg TGT CGAGTATCTACCATGTGG-TAAATGTAGAGACTCACAAGA gggagaagcttaattacac

图 1 用于合成脂肪酶基因的各寡核苷酸片段及组装后的形式

Fig. 1 Oligonucleotides for the synthesis of F1, F2 and F3 fragments. Notes: italic letters indicate the restriction sites *Cla* I and *Pst* I; lowercase letter indicate the nucleotides added by Gene2Oligo software to keep the temperature consistency between oligonucleotides.

建成 pPIC9K-*lipA* 重组质粒。

1.2.4 毕赤酵母的转化和重组子的筛选

用质粒制备试剂盒提取 pPIC9K-*lipA* 约 5 μg, 并用 *Sac* I 将其线性化。酶切产物经沉淀、洗涤、干燥后, 用 10 μL 水溶解备用。线性化 pPIC9K-*lipA* 质粒通过氯化锂介导的转化法导入毕赤酵母 GS115。由于受体细胞 GS115 为组氨酸营养缺陷型(His⁻), 当转化后的酵母细胞在最小葡萄糖培养基 (MD) 平板上长成单菌落后 (His⁺), 经 PCR 鉴定并获得阳性克隆子。方法参照文献[9]。

1.2.5 重组子培养和诱导表达

将重组子分别接种于装有 40 mL BMGY 增殖培养基的 250 mL 摇瓶中, 30°C 下进行增殖培养。当吸光度 *OD*₆₀₀=3~6 时, 离心收集菌体, 加入 20 mL 诱导培养基 BMMY, 30°C 下继续诱导培养至 72 h, 并定期检测发酵液的酶活和蛋白质含量。

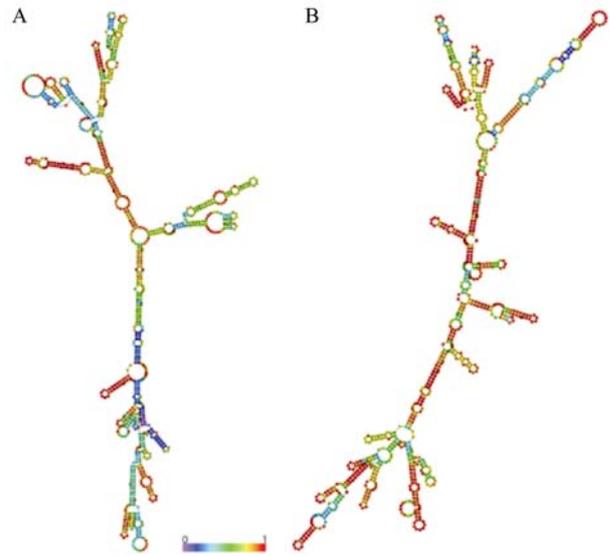


图 2 黑曲霉脂肪酶 RNA 二级结构及经密码子优化后的二级结构

Fig. 2 Secondary structure of the original mRNA and the codon optimized.

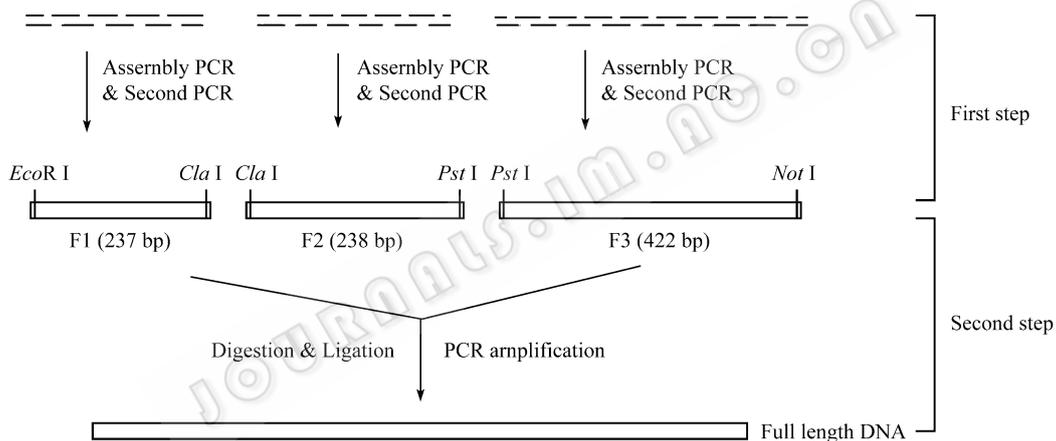


图 3 二步法脂肪酶基因 *lipA* 的全基因合成过程

Fig. 3 Flowchart of the two-step *lipA* gene synthesis.

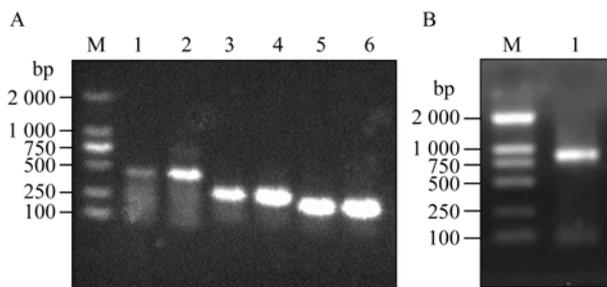


图 4 长片段的合成及全基因的拼接

Fig. 4 PCR products of the fragments F1, F2, F3 and the full length *lipA* gene. (A) PCR products of the fragments. M: marker; 1, 2: F3 fragment; 3, 4: F2 fragment; 5, 6: F1 fragment. (B) PCR products of the full length *lipA* gene after assembly.

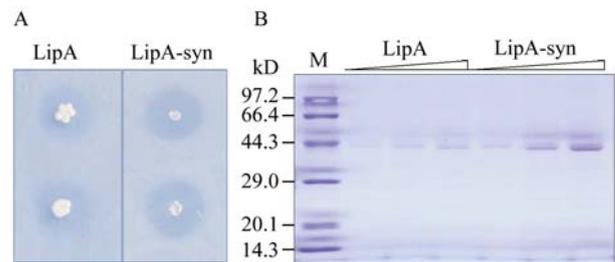


图 5 酵母重组子在三油酸甘油酯平板上的表型及发酵液中产脂肪酶 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 Phenotypes of yeast recombinants carrying *lipA* and *lipA*-syn and SDS-PAGE checking of the proteins in fermentation broth. (A) Phenotypes of yeast recombinants carrying *lipA* and *lipA*-syn. (B) PAGE detection of the fermentation of the recombinants containing the original *lipA* gene and the synthesized *lipA*-syn. The fermentation was aliquoted at 24 h, 48 h and 72 h, and loaded into every well for 10 μL.

1.2.6 脂肪酶酶活蛋白质含量测定

脂肪酶活性的测定采用以橄榄油为反应底物的 NaOH 滴定法。脂肪酶水解活力以在 40°C、pH 7.4 的条件下, 每分钟水解橄榄油产生 1 μmol 游离脂肪酸所需的酶量定义为一个单位(U)。

蛋白质含量测定采用 Bradford 法。具体参照文献[10]。

2 结果与分析

2.1 密码子优化及二级结构预测

由于黑曲霉与毕赤酵母在密码子使用偏好性存在显著的区别, 黑曲霉脂肪酶基因 *lipA* 中的多数密码子在毕赤酵母中的使用频率偏低。因此, 为实现 *lipA* 在毕赤酵母中的高效表达, 本研究对 *lipA* 基因进行了密码子优化。优化原则为: 1) 选用在毕赤酵母中使用频率较高的密码子; 2) 为防止 tRNA 衰竭, 在酵母中频率最高的 4 种氨基酸(Lys、Asp、Glu、Asn) 未进行优化; 3) 由于毕赤酵母糖基化程度较低, *lipA* 基因中的糖基化位点保持不变; 4) 为降低 RNA 二级结构的最小自由能(MFE), 在碱基编排过程中去除了富含 GC 区和富含 AT 区域; 5) *lipA* 基因中引入了 *Cla* I(237 位)和 *Pst* I(475 位)酶切位点。

为进一步确立该基因与其被转录后 mRNA 的关系, 在 RNAfold 软件^[11]的辅助下, 检测了出发基因与优化后基因的 RNA 二级结构的最小自由能和结构的多样性(图 2)。优化后基因的二级结构组装的多样性由原有的 245.57 降为 153.71, 自由能从 -363.86 kcal/mol 降为 -304.06 kcal/mol, 有利于合成

基因的表达。

2.2 二步法脂肪酶基因 *lipA* 的合成

二步法脂肪酶基因 *lipA* 的全基因合成过程如图 3 所示。第 1 阶段为寡核苷酸片段的合成与组装。在该阶段, 通过组装 PCR 和二次 PCR 将所合成的寡核苷酸片段组装成长片段 F1(237 bp)、F2(238 bp)和 F3(422 bp)(图 4A)。该过程与目前广泛应用的一步法合成长 DNA 片的程序相一致^[7, 12]。在第 2 阶段, 由第 1 阶段组装的长片段 F1 经 *Cla* I 酶切、F2 经 *Cla* I 和 *Pst* I 酶切、F3 经 *Pst* I 酶切后, 再经酶切连接及 PCR 扩增, 获得全长的基因(图 4B)。

合成的全长基因在 *Taq* DNA 聚合酶的作用下进行末端加 dA 处理后, 将其连接到载体 pMD18T 上, 并对阳性克隆子的插入片段进行序列分析。序列分析表明, 所获得的插入片段序列与预期设计的相一致(合成基因的序列见图 1)。

2.3 *lipA* 向毕赤酵母的克隆及重组子产脂肪酶能力分析

脂肪酶基因 *lipA* 经 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切后连入载体 pPIC9K, 构建表达质粒 pPIC9K-*lipA*。表达载体经 *Sca* I 线性化后转入毕赤酵母 GS115, 筛选并获得有表达 LipA 能力的酵母重组子。通过三油酸甘油酯平板检测了携带出发基因(*lipA*)和合成基因(*lipA-syn*)的酵母重组子的表型。如图 5A 所示, 携带 *lipA-syn* 基因的酵母所产生的水解油脂透明圈比携带 *lipA* 的酵母更加清晰、明显。

重组子的产酶能力分析在摇瓶发酵条件下进行。试验以 0.5% 的甲醇为诱导剂, 并定期检测发酵液酶活及发酵上清液中蛋白质的含量(图 5B)。由图 6

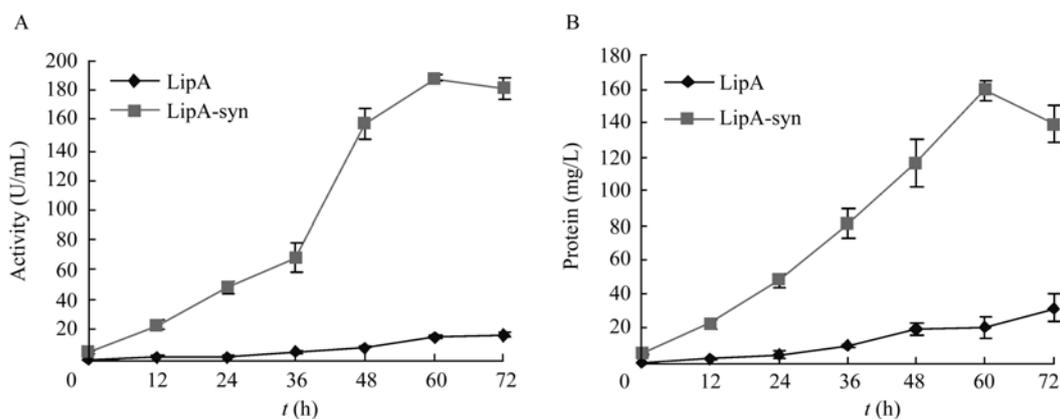


图 6 携带 *lipA* 和 *lipA-syn* 基因的毕赤酵母重组菌经甲醇诱导后发酵液的酶活及蛋白质含量

Fig. 6 Activity and protein content of the fermentation broth of yeast recombinants carrying *lipA* and *lipA-syn*. (A) Enzymatic activity of fermentation broth. (B) Protein content of fermentation broth.

可见,与出发基因(*lipA*)相比,经密码子优化后的脂肪酶基因(*lipA-syn*)表达能力显著提高。发酵上清液中蛋白质的 SDS-PAGE 分析也表明两者间存在着显著的区别,且随着发酵时间的增加总蛋白含量逐渐上升。当甲醇诱导表达时间为 72 h 时,含出发基因克隆子的发酵液酶活达 16.3 U/mL, 蛋白质含量为 25.6 mg/L, 而经密码子优化后基因的发酵液为 176.0 U/mL, 蛋白质含量为 143.7 mg/L, 较出发基因分别提高了 10.8 倍和 5.6 倍。

3 讨论

通过组装 PCR(一步法)将一系列化学合成的寡核苷酸片段组装成全基因的方案由于基因二级结构的复杂性、寡核苷酸片段非特异性配对等因素的影响,随着基因序列长度的增加反应条件(如 T_m)的控制难度增加,碱基错配率显著升高,全基因合成的风险急剧增大^[13]。为了实现全基因合成的稳定、高效且风险可控,本研究将组装 PCR 技术与酶切/连接法相结合,开发出全基因合成的二步法工艺。该技术通过将全基因片段化,使得通过组装 PCR 合成的 DNA 片段长度大幅缩短,显著地降低了碱基错配率,并有效地分散了全基因合成失败的风险。在本研究中, F1、F2 和 F3 片段的序列分析表明均无碱基错配、缺失和突变等现象出现;随后的小片段酶切/酶连步骤可有效地将各片段连接成全长的基因,而且大幅地减少了 PCR 反应的次数,排除了拼接中引发的差错。因此,该方法在全基因合成法中具有良好的应用和推广价值。

不同宿主间密码子使用频率的差异是影响基因在异源宿主中表达效率的主要因素。由于黑曲霉脂肪酶基因 *lipA* 中编码部分氨基酸(Arg、Pro、Cys 和 Ala 等)的密码子在毕赤酵母中的使用频率很低。因此,天然序列的基因在毕赤酵母中难以高效表达(图 5B)。故本研究以提高该基因密码子使用频率为主要目的,采用高度或中度使用频率的密码子对 *lipA* 基因进行了密码子优化。同时, mRNA 的二级结构会影响 30S 亚基与 mRNA 的结合,进而影响基因的表达。在 SD 序列和 AUG 位置不变的条件下, mRNA 的 5'端形成的二级结构自由能越大越不利于翻译的起始^[14]。本研究在基因设计过程中,通过控制 GC 含量和 GC 在基因中的分布,避免出现富含 GC 或

AT 的区域,成功地降低了该基因的最小自由能(图 2)。

经过密码子的优化,脂肪酶基因的表达效率显著提高。在摇瓶发酵条件下,当甲醇诱导表达时间为 72 h 时,发酵液酶活为 176.0 U/mL, 蛋白质含量为 143.7 mg/L, 分别较出发基因分别提高了 10.8 倍和 5.6 倍。该发酵水平明显高于 Ramchuran 和 Yao 等^[15,16]的研究。尽管该水平低于 Quyen 等^[17]的报道(309 000 U/L),但其酶活是在 5 L 的反应器中获得的。可以预见,在严格控制溶氧、温度、pH、C/N 比、甲醇浓度等参数的反应器条件下,毕赤酵母重组菌(*lipA-syn*)的产脂肪酶能力将会有较大幅度的提高。

本研究通过二步法(组装 PCR 和酶切-酶连)全基因合成了黑曲霉脂肪酶基因 *lipA*,进行了密码子和 mRNA 二级结构的优化,并实现了该基因在毕赤酵母中的高效表达。所获得的基因工程菌可进行产酶条件的优化及进一步的放大工艺研究,并为该脂肪酶的规模化生产奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Carrea G, Corcelli A, Palmisano G, *et al.* Preparation of 3-deacetyl cephalosporins by *Aspergillus niger* lipase. *Biotechnol Bioengin*, 2000, **52**(6), 648-652.
- [2] Stemmer WP, Cramer A, Ha KD, *et al.* Single step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene*, 1995, **164**(1): 49-53.
- [3] Young L, Dong Q. Two-step total gene synthesis method. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32**(7): 59.
- [4] Goeddel DV, Kleid DG, Bolivar F, *et al.* Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**(1): 106-110.
- [5] Mehta RK, Singh J. Bridge overlap-extension PCR method for constructing chimeric genes. *Biotechniques*, 1999, **26**(6): 1082-1086.
- [6] Gao XX, Yo P, Keith A, *et al.* Thermodynamically balanced inside-out (TBIO PCR)-based gene synthesis: A novel method of primer design for high fidelity assembly of longer gene sequences. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31**(22): 143.
- [7] Rouillard JM, Lee W, Truan G, *et al.* Gene2Oligo: Oligonucleotide design for *in vitro* gene synthesis. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32**, W176-W180.
- [8] Shu Z, Yan Y, Yang J, *et al.* *Aspergillus niger* F044 lipase: Gene cloning, overexpression in *Escherichia coli* BL21 (De3) and *in vitro* refolding. *Biotechnol Lett*, 2007, **29**(12):

- 1875-1879.
- [9] Yan J, Yang J, Xu L, *et al.* Gene cloning, overexpression and characterization of a novel organic solvent tolerant and thermostable lipase from *Galactomyces geotrichum* Y05. *J Mol Catal B: Enzym*, 2007, **49**(4), 28-35.
- [10] Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies. *Anal Biochem*, 1995, **236**(2): 302-308.
- [11] Gruber AR, Lorenz R, Bernhart SH, *et al.* The vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Res*, 2008, **36**(2): W70-74.
- [12] Niu DD, Wang ZX. Methodological studies on total gene synthesis. *Chin J Appl Environ Biol*, 2007, **13**(4): 515-518.
牛丹丹, 王正祥. 全基因合成方法学研究. 应用与环境生物学报, 2007, **13** (4): 515-518.
- [13] Hoover DM, Lubkowski J. DNAWorks: An automated method for designing oligonucleotides for PCR-based gene synthesis. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**(10): 43.
- [14] Ganoza MC, Kofoid EC, Marlière P, *et al.* Potential secondary structure at translation-initiation sites. *Nucleic Acids Res*, 1987, **15**(1): 345-360.
- [15] Ramchuran SO, Vargas VA, Hatti-Kaul R. Production of a lipolytic enzyme originating from *Bacillus halodurans* LBB2 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **71**(4): 463-472.
- [16] Yao H, Yu S, Zhang L, *et al.* Isolation of a novel lipase gene from *Serratia liquefaciens* S33 DB-1, functional expression in *Pichia pastoris* and its properties. *Mol Biotechnol*, 2008, **38**(2): 99-107.
- [17] Quyen DT, Schmidt-Dannert C, Schmid RD. High-level expression of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* BTL2 in *Pichia pastoris* and some properties of the recombinant lipase. *Protein Expr Purif*, 2003, **28**(1): 102-110.

《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要: 基本要素包括研究目的、方法、结果和结论(不用单列标题书写)。目的(Purpose): 主要说明作者写此文章的目的, 或说明本文主要要解决的问题; 方法(Methods): 重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要, 可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果(Results): 本文最后得出的结果(实验数据部分)。结论(Conclusions): 如系基础研究, 应写明本文的创新之处, 及文章在讨论部分表述的观点; 如系应用性研究, 应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要: 包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望, 尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点: 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但比中文摘要更详尽。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返回编辑部。

凡不符合要求的, 即使学术上可以达到刊出的水平, 本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称, 尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊尽量不用, 这样可以避免好多长句, 以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句, 避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态, 语法正确, 句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语, 除非是人人皆知的(如DNA、ATP等), 或者确实是非常长, 而且出现多次的短语才允许用缩写语, 并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中, 不要使用任何汉字字符, 包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。