

# 牛凝乳酶原基因的合成及其在乳酸克鲁维酵母中的表达

袁伟<sup>1,2\*</sup>, 柯涛<sup>1\*</sup>, 杜敏华<sup>1</sup>, 褚学英<sup>1</sup>, 胡凡<sup>3</sup>, 惠丰立<sup>1</sup>

1 南阳师范学院生命科学与技术学院, 南阳 473061

2 河南师范大学生命科学学院, 新乡 453007

3 湖北大学生命科学学院, 武汉 430062

**摘要:** 凝乳酶在奶酪加工中应用广泛, 为获得高活性的凝乳酶制剂, 采用乳酸克鲁维酵母为宿主, 首次对经密码子优化的牛凝乳酶原基因进行表达。利用 DNAWorks3.0 软件辅助设计, 用两步 PCR 法合成了小牛凝乳酶原基因(GenBank Accession No. AA30448)。将该基因插入酵母表达载体 pKLAC1, 构建了重组载体 pKLAC1-Prochy, 并用电脉冲法将线性化的重组质粒转化到乳酸克鲁维酵母 GG799 中。通过含 1% 酪蛋白的 YEPD 平板活性筛选, PCR 鉴定, 最后获得了一株多拷贝整合的基因工程菌 chy1。该菌株可分泌表达牛凝乳酶原, 经 SDS-PAGE 分析, 证明重组牛凝乳酶原的分子量约为 41 kDa, 符合预期大小, 酸化处理后为 36 kDa, 证明可以正确自我剪切。液体培养 96 h 后, 酶活最高达到 99.67 SU/mL。分别以半乳糖和葡萄糖为碳源的条件表达, 其酶活性差异不大, 说明在发酵期间, 可以不经半乳糖诱导即可产生高水平的牛凝乳酶原产物。该工程菌的获得为进一步优化产酶条件及放大工艺提供了条件, 并为凝乳酶的工业化生产奠定了基础。

**关键词:** 牛凝乳酶原, 乳酸克鲁维酵母, 基因合成, 密码子优化

## Gene synthesis of the bovine prochymosin gene and high-level expression in *Kluyveromyces lactis*

Wei Yuan<sup>1,2\*</sup>, Tao Ke<sup>1\*</sup>, Minhua Du<sup>1</sup>, Xueying Chu<sup>1</sup>, Fan Hu<sup>3</sup>, and Fengli Hui<sup>1</sup>

1 College of Life Science and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, China

2 College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China

3 College of Life Science, Hubei University, Wuhan 430062, China

**Abstract:** Chymosin is an important industrial enzyme widely used in cheese manufacture. To improve expression efficiency of recombinant bovine chymosin in *Kluyveromyces lactis* strain GG799, we designed and synthesized a DNA sequence encoding bovine prochymosin gene (GenBank Accession No. AA30448) by using optimized codons. The synthesized prochymosin gene was amplified by two-step PCR method, and then cloned into the expression vector pKLAC1, resulting in pKLAC1-Prochy. pKLAC1-Prochy was linearized and transformed into *K. lactis* GG799 by electrotransformation. Positive clones were screened by YEPD plates containing 1% casein. A recombinant strain chy1 with highest activities and multi-copy integration which was detected by using specific integration primers was chosen and fermented in flask. Prochymosin was expressed in *K. lactis* successfully. SDS-PAGE analysis revealed that the purified recombinant bovine prochymosin had a molecular mass of 41 kDa. After acid

**Received:** May 5, 2010; **Accepted:** August 2, 2010

**Supported by:** Research Planning Project of Basic and Advanced Technology of Henan Province (No. 102300410146), Natural Science Foundation of Henan Educational Committee (No. 2010A180017).

**Corresponding author:** Fengli Hui. Tel/Fax: +86-377-63525086; E-mail: huifl@126.com

\*These authors contributed equally to this work.

河南省基础与前沿技术研究计划 (No. 102300410146), 河南省教育厅自然科学基金项目 (No. 2010A180017) 资助。

treatment, molecular weight of chymosin is about 36 kDa, the same as native bovine chymosin. Activity tests showed that the chymosin activity of the culture supernatant was 99.67 SU/mL after 96 h cultivation. The activities of chymosin were not prominent increased when galactose was used as carbon source instead of glucose, which proved that the fermentation of recombinant strain does not need galactose inducing. The recombinant *K. lactis* strain obtained in this study could be further used to produce recombinant chymosin for cheese making.

**Keywords:** bovine prochymosin, *Kluyveromyces lactis*, gene synthesis, codon optimization

牛凝乳酶原 (Bovine prochymosin, bPC) 含有 365 个氨基酸, 分子量为 40.8 kDa, 存在于未断奶小牛的皱胃中, 属于天冬氨酸蛋白酶家族成员, 在酸性条件下 N 末端的 42 个氨基酸能够进行自我剪切, 形成分子量为 35.6 kDa 有活性的凝乳酶<sup>[1,2]</sup>。该酶能专一性特异性裂解  $\kappa$ -酪蛋白 Phe105-Met106 之间肽键, 引起蛋白质凝聚, 因此在乳制品尤其是在奶酪加工中应用广泛<sup>[3-4]</sup>。传统的凝乳酶是通过宰杀未断奶小牛, 从其皱胃中提取。随着小牛数量的逐年减少, 这种传统而昂贵的制法已无法满足世界干酪需求量不断增长的需要。

利用 DNA 重组技术生产重组小牛凝乳酶是解决凝乳酶需求量增加与来源受限的有效途径。目前全世界用于干酪生产的凝乳酶约 50% 以上是生物工程酶制剂, 重组凝乳酶的加工特性与天然凝乳酶没有差别。我国尚无凝乳酶生物工程产品的生产, 除少量从小牛皱胃中提取的凝乳酶外, 干酪生产所用凝乳酶主要依赖进口, 凝乳酶匮乏已成为制约我国干酪生产的重要因素。

国内外学者对生物工程凝乳酶已经进行了多年的研究, 而且应用不同的表达系统表达了凝乳酶基因, 如大肠杆菌<sup>[5-6]</sup>、酿酒酵母<sup>[7-8]</sup>、毕赤酵母<sup>[9]</sup>、乳酸克鲁维酵母<sup>[10]</sup>、丝状真菌<sup>[11-12]</sup>等。在大肠杆菌中重组凝乳酶是以包涵体的形式存在于细胞内, 它需要复杂的变性和重折叠过程才能恢复蛋白质的活性, 为了提高产量还需加入 IPTG 等诱导剂。霉菌可以有效地执行翻译后的修饰并以正确折叠的形式表达具有生物活性的异源真核蛋白, 但其对于凝乳酶的表达也存在诸如相对较低的转化率、潜在的形态学缺陷及低 pH 造成的蛋白修改等自身的缺陷。在酿酒酵母中表达所产生的凝乳酶原和凝乳酶主要以不溶形式合成, 积累在细胞中难以激活。毕赤酵母虽然能表达产生有活性的凝乳酶, 但表达量较低。乳

酸克鲁维酵母 *Kluyveromyces lactis* 表达体系是一套优良的系统<sup>[13]</sup>, 具有许多优于其他酵母表达系统的诸多优点, 已广泛用于工业化生产<sup>[14-15]</sup>。

构建高效的基因工程菌是凝乳酶规模化生产的重要前提。为克服由于乳酸克鲁维酵母和牛在基因密码子使用频率上的差异所带来的天然序列基因低水平表达的问题<sup>[16]</sup>, 本研究根据酵母的密码子偏爱性合成牛凝乳酶原基因, 并实现其在乳酸克鲁维酵母中的高效表达, 为凝乳酶的工业化生产奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与质粒

乳酸克鲁维酵母 *K. lactis* 表达载体 pKLAC1 和乳酸克鲁维酵母 GG799 购自 England Biolabs 公司; pUCm-T 载体购自 Bio Basic Inc 公司; 大肠杆菌 JM109 本实验室保存。

### 1.2 酶与试剂

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。酵母提取物和蛋白胨购自 Oxoid 公司, 其他常规试剂均为进口分装或国产分析纯。

### 1.3 培养基及培养条件

大肠杆菌生长于 37°C 的 LB 培养基中 (胰蛋白胨 1%、酵母浸提物 0.5%、NaCl 1%)。乳酸克鲁维酵母 GG799 生长于 30°C 的 YEPD 培养基中 (酵母浸提物 1%、蛋白胨 2%、葡萄糖 2%), 当用于筛选转化菌株时用含 5 mmol/L 乙酰胺的 YCB 固体培养基进行筛选。

### 1.4 基因遗传密码的优化及合成

根据小牛凝乳酶原基因序列 (GenBank Accession No. AA30448), 去除自身信号肽序列, 对基因成

熟肽核苷酸序列进行密码子优化设计。全序列全长 1 095 bp, 编码 365 个氨基酸, 根据设计的序列长度, 利用 DNAWorks3.0 软件<sup>[17]</sup>, 优化 PCR 引物参数, 设计了 34 条寡聚核苷酸用于 PCR 合成小牛凝乳酶原基因, 其中分别在引物 1 和引物 34 的 5'端增加 *Xho* I 和 *Bgl* II 限制性酶切位点和保护碱基。

采用两步 PCR 法合成小牛凝乳酶原基因<sup>[18]</sup>。第 1 步先将该基因分成约 400 bp 大小的 4 个小片段, 用 PCR 的方法分别合成。分别取寡聚核苷酸混合, 首尾引物的浓度为 10  $\mu$ mol/L, 中间引物浓度为 1  $\mu$ mol/L。PCR 条件为: 90 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 20 个循环; 72 $^{\circ}$ C 8 min。第 2 步将 4 个 PCR 产物回收纯化, 等量混匀, 加两端引物 1 和引物 34 进行第 2 次 PCR, 引物浓度 10  $\mu$ mol/L。PCR 条件为: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 20 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。获得的 PCR 产物纯化回收后连接到 pUCm-T 载体上进行测序分析。

### 1.5 重组质粒 pKLAC1-Prochy 的构建

以 Prochy-F (5'-GATCTCGAGAAAAGAGCTGAAATCACTCGTATT-3', 下划线处为 *Xho* I 位点) 和 Prochy-R (5'-TACCCCTAGGAGATCTTAGATAGCTTTAGCCAAAC-3', 下划线处为 *Bgl* II 位点) 为引物扩增全长凝乳酶原基因。回收 PCR 产物, 用 *Xho* I 和 *Bgl* II 对回收 PCR 产物和质粒 pKLAC1 分别进行双酶切。凝胶电泳回收目的条带, 按照分子克隆手册进行连接、转化和阳性克隆的筛选<sup>[19]</sup>。选择阳性克隆, 提取质粒 DNA, 用 *Xho* I 和 *Bgl* II 双酶切验证后送上海生工生物工程有限公司测序。

### 1.6 重组质粒 pKLAC1-Prochy 的酵母电转化

用 *Sac* II 酶切重组质粒 pKLAC1-Prochy 使其线性化。制备乳酸克鲁维酵母 GG799 感受态细胞, 通过电脉冲法将线性化的质粒转化到乳酸克鲁维酵母 GG799 中。电击后的酵母细胞铺在含有 5 mmol/L 乙酰胺的 YCB 平板上。

### 1.7 重组子的鉴定

当转化后的酵母细胞在含有 5 mmol/L 乙酰胺的 YCB 平板上长成单菌落后, 挑选阳性克隆点接在含 1% 酪蛋白的 YEPD 平板上, 筛选沉淀圈较大的凝乳酶重组菌株, 用 PCR 方法验证目的基因与染色体整

合的情况。挑取重组菌株单菌落于 YEPD 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床培养 20 h。室温下 3 000 $\times$ g 离心 5 min, 收集菌体提取基因组作为 PCR 反应的模板, 以 Chym-inter 1 和 Chym-inter 2 为引物用于单拷贝整合子的筛选, 以 Chym-inter 2 和 Chym-inter 3 为引物用于多拷贝整合子的筛选。PCR 条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

### 1.8 重组菌株表达条件的优化及表达产物的 SDS-PAGE 分析

将筛选出来的重组菌株接种到 10 mL YEPD 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, 取 2 mL 过夜培养物分别接种到以半乳糖或葡萄糖为碳源的 100 mL YEPD 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养, 每隔 24 h 取样测定菌液上清凝乳酶活力。用 SDS-PAGE (12%) 电泳检测表达产物<sup>[19]</sup>。

### 1.9 重组凝乳酶活性检测

将重组酵母培养液以 3 000 r/min 离心 5 min, 上清液的 pH 用 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 调整至 pH 2.0, 室温条件下放置 2 h, 然后用 2 mol/L Tris 缓冲液将上清液的 pH 调至 pH 6.0, 用于凝乳酶活性的检测。

采用 Arima K 的方法进行凝乳酶活性的测定<sup>[20]</sup>。用 0.01 mol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液配制 10% 脱脂乳。此溶液配制后在室温下放置 40 min 后使用, 取 5 mL 10% 脱脂乳于 35 $^{\circ}$ C 保温 10 min, 加入适量稀释的酶液, 振荡均匀并开始计时, 观察管壁上开始出现凝乳颗粒为终点, 记录凝乳时间 (*t*)。在上述条件下, 40 min 凝结 1 mL 10% 脱脂乳的酶量定义为一个 Soxhlet 单位 (SU)。

## 2 结果与分析

### 2.1 凝乳酶原基因的合成

第 1 步 PCR 合成的 4 个小片段电泳分析结果如图 1A 所示, 4 个小片段回收纯化后用于第 2 步 PCR 反应。第 2 步 PCR 获得的产物大小约为 1.1 kb, 与理论值大小相符 (图 1B)。回收纯化 PCR 产物将其连接到载体 pUCm-T 上, 获得质粒 pUCm-T-Prochy, 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一致。

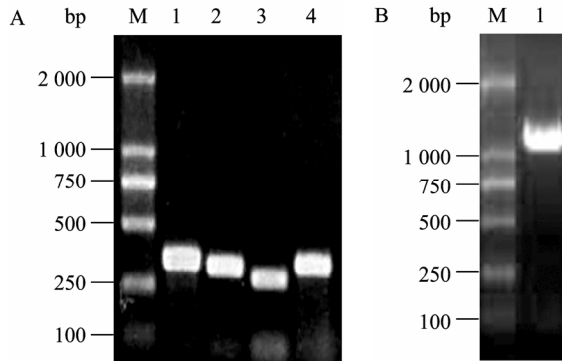


图1 bPC 基因的 PCR 产物

Fig. 1 PCR products of bovine prochymosin gene. (A) M: DNA marker DL2000; 1: PCR fragment 1; 2: PCR fragment 2; 3: PCR fragment 3; 4: PCR fragment 4; (B) M: DNA marker DL2000; 1: PCR product of full bovine prochymosin gene.

## 2.2 酵母表达载体的构建

以含有凝乳酶原基因的 pUCm-T-Prochy 质粒为模板, 以 Prochy-F 和 Prochy-R 为引物经 PCR 扩增得到 1 100 bp 左右的片段, 经 *Xho* I 和 *Bgl* II 双酶切后与经过相同酶切的乳酸克鲁维酵母表达载体 pKLAC1 连接, 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 获得转化子, 挑取重组子, 提取质粒。经 *Xho* I 和 *Bgl* II 双酶切检测和测序结果验证, 重组质粒中确实含有目的基因片段, 且读码框正确, 表明表达载体 pKLAC1-Prochy 构建成功 (图 2)。

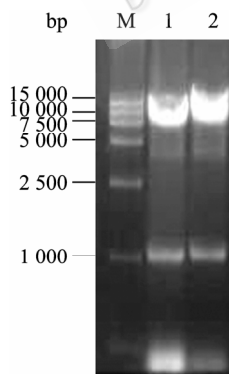


图2 重组表达质粒 pKLAC1-Prochy 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmid by enzyme digestion. M: DNA marker DL15000; 1: recombinant plasmid pKLAC1-Prochy-1 digested with *Xho* I and *Bgl* II; 2: recombinant plasmid pKLAC1-Prochy-9 digested with *Xho* I and *Bgl* II.

## 2.3 重组菌株的构建和多拷贝整合重组菌株的鉴定

用 *Sac* II 对表达载体 pKLAC1-Prochy 进行线性化处理, 用电转化的方式将质粒转入乳酸克鲁维酵

母 GG799, 利用含有 5 mmol/L 乙酰胺的 YCB 培养基富集筛选整合有表达框的阳性转化子。挑选阳性克隆点接在含 1% 酪蛋白的 YEPD 平板上进行表型鉴定, 结果如图 3 所示。重组乳酸克鲁维酵母在含 1% 酪蛋白的 YEPD 平板上均能形成大小不同的沉淀圈, 说明挑选的克隆均为凝乳酶表型阳性重组菌株。

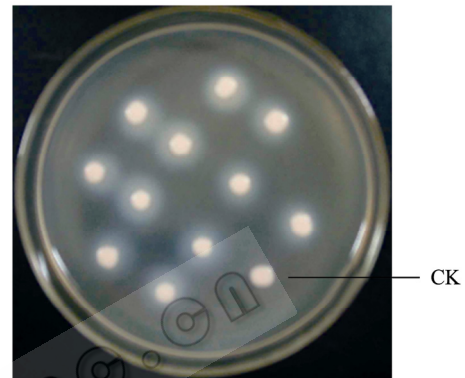


图3 重组酵母菌株表型鉴定结果

Fig. 3 Phenotypes of recombinant yeasts on YEPD-Casein plate. CK: the control yeast strain of GG799.

提取 YEPD 平板 (含 1% 酪蛋白) 上沉淀圈最大的凝乳酶表型阳性重组菌株 chy1 的基因组 DNA 作为模板, 利用多个表达框插入鉴定整合引物进行 PCR 鉴定<sup>[21]</sup>。电泳结果显示分别产生 2.3 kb 和 1.9 kb 条带大小的 PCR 产物, 证明该菌株为多拷贝整合表达框的重组菌株 (图 4)。

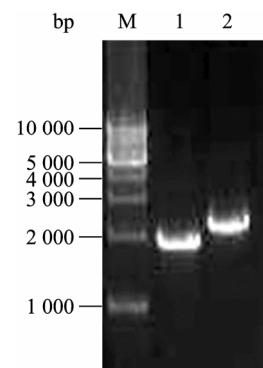


图4 重组菌株多拷贝整合表达框的 PCR 鉴定

Fig. 4 Identification of multi-copy transformants by PCR. M: 1 kb DNA ladder marker; 1: PCR products of recombinant strain chy1 with single-copy primer; 2: PCR products of recombinant strain chy1 with multi-copy primer.

## 2.4 重组菌株表达条件的优化

分别以半乳糖和葡萄糖为碳源检测重组菌株 *chy1* 的最适表达条件, 每隔 24 h 取样, 测酶活, 重复 3 次, 取平均值。结果表明, 在以半乳糖为碳源的培养基中, 重组菌株 *chy1* 在 24 h 内产酶活性低于葡萄糖, 但是在 24 h 后产酶活性明显高于后者, 96 h 时酶活均达到最大值, 分别为 99.67 SU/mL 和 94.49 SU/mL (图 5)。

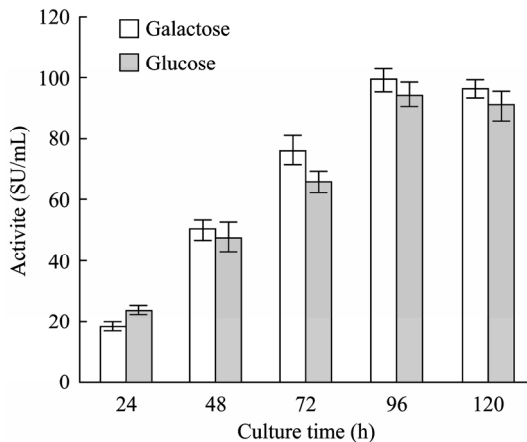


图 5 重组酵母菌株 *chy1* 不同碳源产酶曲线

Fig. 5 Chymosin activity curve of recombinant yeast strain *chy1*.

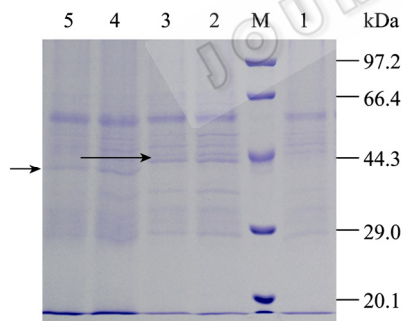


图 6 重组乳酸克鲁维酵母 *chy1* 表达产物的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of recombinant *K. lactis* strain *chy1*. M: protein marker; 1: supernatant from 96 h culture of *K. lactis* strain GG799; 2-3: supernatant from 96 h culture of recombinant strain *chy1*; 4-5: acid-treated supernatant from 96 h culture of recombinant strain *chy1*.

## 2.5 重组菌株表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

将 *K. lactis* GG799 和重组菌株 *chy1* 在 YEPD 培养基中分别培养 96 h, 离心去除酵母细胞取上清液, 部分样品在 pH 2.0 进行酸化处理。全部样品在沸水浴加热 5 min 后进行 SDS-PAGE 电泳检测, 结果如

图 6 所示。与对照相比, 重组菌株 *chy1* 在分子量约 41 kDa 处有明显的特征性条带, 经过酸化处理后, 41 kDa 处条带消失, 而在 36 kDa 处也出现了 1 条特征性条带, 为凝乳酶原自我剪切后的凝乳酶条带。

## 3 讨论

由于全球性的小牛短缺使得凝乳酶的产量受到限制, 而且价格昂贵。植物性凝乳酶来源广泛, 但其蛋白水解能力强, 并且受时间、地域等条件影响, 限制了它的应用; 微生物生长周期短、产量大、不受气候与时间的限制, 但微生物来源的凝乳酶也存在蛋白水解能力高、特异性不强等缺点。随着基因工程技术的发展, 以微生物为宿主利用重组 DNA 技术生产重组小牛皱胃酶是解决凝乳酶需求量增加与来源受限的有效途径。本实验以非营养缺陷型乳酸克鲁维酵母 GG799 为宿主, 以携带有真菌乙酰胺酶基因的乳酸克鲁维酵母表达载体 pKLAC1 为载体来富集含有多个拷贝表达框的转化子, 获得了能高效分泌表达牛凝乳酶原的乳酸克鲁维酵母重组菌株。乳酸克鲁维酵母表达系统具有超强的外源蛋白分泌能力、营养要求低、生长快、适于高密度发酵, 获得包括美国 FDA 认证的 GRAS 地位, 允许在多种食品和饲料中应用<sup>[22-24]</sup>。本研究获得的乳酸克鲁维重组酵母为我国干酪工业提供了新型及优良的凝乳酶来源。

本研究成功构建了牛凝乳酶原乳酸克鲁维酵母表达载体 pKLAC1-Prochy, 在酵母上清液中表达有活性的重组牛凝乳酶, SDS-PAGE 检测表明在分子量约 41 kDa 处有明显的特征性条带, 符合预期大小。经酸化处理后在 36 kDa 处也出现了 1 条特征性条带, 为凝乳酶原自我剪切后的凝乳酶条带, 96 h 时活性最高可达到 99.67 SU/mL。通过酶学实验证明了上清液的活性来源为重组牛凝乳酶原。

实验证明乳酸克鲁维酵母具有较好的外源蛋白的分泌能力。经过转化子筛选, 获得了具有多拷贝整合表达框的重组菌株。重组菌株在不同碳源条件下表达, 均可在第 4 天获得最高表达量, 在半乳糖存在条件下, 表达量仅比葡萄糖为碳源条件下提高 5%, 因此该工程菌株表达时可不需要诱导, 非常适

宜扩大为工业规模。

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。由于凝乳酶基因中编码部分氨基酸的密码子在乳酸克鲁维酵母中的使用频率很低。因此,天然序列的基因在乳酸克鲁维酵母中难以高效表达。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牛凝乳酶原基因进行了密码子优化。通过二步法基因合成可在两轮 PCR 过程中获得完整基因,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,并为该酶的规模化生产奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] Pedersen VB, Christensen KA, Foltmann B. Investigations on the activation of bovine prochymosin. *Eur J Biochem*, 1979, **94**(2): 573–580.
- [2] Newman M, Safro M, Frazao C, *et al.* X-ray analyses of aspartic proteinases. IV. Structure and refinement at 2.2 Å resolution of bovine chymosin. *J Mol Biol*, 1991, **221**(4): 1295–1309.
- [3] Williams MG, Wilsher J, Nugent P, *et al.* Mutagenesis, biochemical characterization and X-ray structural analysis of point mutants of bovine chymosin. *Protein Eng*, 1997, **10**(9): 991–997.
- [4] Mohanty AK, Mukhopadhyay UK, Grover S, *et al.* Bovine chymosin: production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnol Adv*, 1999, **17**(2/3): 205–217.
- [5] Beppu T. The cloning and expression of chymosin (rennin) genes in microorganisms. *Trends Biotechnol*, 1983, **1**(3): 85–89.
- [6] Emtage JS, Angal S, Doel MT, *et al.* Synthesis of calf prochymosin (prorennin) in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, **80**(12): 3671–3675.
- [7] Mellor J, Dobson MJ, Roberts NA, *et al.* Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 1983, **24**(1): 1–14.
- [8] Goff CG, Moir DT, Kohno T, *et al.* Expression of calf prochymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 1984, **27**(1): 35–46.
- [9] Zhang L, Jiang YY, Zhang J, *et al.* Recombinant expression of bovine chymosin in *Pichia pastoris*. *Chin J Biotech*, 2009, **25**(8): 1160–1165.  
张莉, 姜媛媛, 张健, 等. 牛凝乳酶基因在毕赤酵母中的重组表达. *生物工程学报*, 2009, **25**(8): 1160–1165.
- [10] van den Berg JA, van der Laken J, van Ooyen AJ, *et al.* *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. *Biotechnology (NY)*, 1990, **8**(2): 135–139.
- [11] Cullen D, Gray GL, Wilson LJ, *et al.* Controlled expression and secretion of bovine chymosin in *Aspergillus nidulans*. *Analysis*, 1987, **17**: 369–376.
- [12] Ward M, Wilson LJ, Kodama KH, *et al.* Improved production of chymosin in *Aspergillus* by expression as a glucoamylase-chymosin fusion. *Nat Biotechnol*, 1990, **8**(5): 435–440.
- [13] Fleer R, Yeh P, Amellal N, *et al.* Stable multicopy vectors for high-level secretion of recombinant human serum albumin by *Kluyveromyces* yeasts. *Biotechnology (NY)*, 1991, **9**(10): 968–975.
- [14] van Ooyen AJ, Dekker P, Huang M, *et al.* Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res*, 2006, **6**(3): 381–392.
- [15] Rubio-Teixeira M. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. *Biotechnol Adv*, 2006, **24**(2): 212–225.
- [16] Zhen F, Lanwei Z, Xue H, *et al.* Codon optimization of the calf prochymosin gene and its expression in *Kluyveromyces lactis*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2009, **26**(5): 895–901.
- [17] Hoover DM, Lubkowski J. DNAWorks: an automated method for designing oligonucleotides for PCR-based gene synthesis. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**(10): e43.
- [18] Young L, Dong Q. Two-step total gene synthesis method. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32**(7): e59.
- [19] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [20] Arima K, Yu J, Iwasaki S. Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. *Lindt*/Perlman GE, Lorand L. *Methods in Enzymology: Vol 19*. New York and London: Academic Press, 1970: 446–459.
- [21] Ipswich: NE BioLabs, Instruction manual of *K. lactis* protein expression kit. *New England Biolabs*, 2005: 26–28.
- [22] Walsh DJ, Bergquist PL. Expression and secretion of a thermostable bacterial xylanase in *Kluyveromyces lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(8): 3297–3300.
- [23] Tokunaga M, Ishibashi M, Tatsuda D, *et al.* Secretion of mouse alpha-amylase from *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, 1997, **13**(8): 699–706.
- [24] Raimondi S, Uccelletti D, Amaretti A, *et al.* Secretion of *Kluyveromyces lactis* Cu/Zn SOD: strategies for enhanced production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, **86**(3): 871–878.