

产朊假丝酵母整合表达载体的构建

杨红兰^{1,2}, 王炜^{1,3*}, 包慧芳¹, 崔春生¹, 胡爽^{1,2}

(¹ 新疆农业科学院微生物所, 乌鲁木齐 830091)

(² 石河子大学, 农业技术重点实验室, 石河子 832003)

(³ 新疆特殊环境微生物工程技术研究中心, 乌鲁木齐 830091)

摘要 【目的】构建一个产朊假丝酵母(*Candida utilis*, *C. utilis*)整合表达载体。【方法】该载体以质粒 pBR322 为骨架, 包括 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAP)启动子和终止子、放线菌酮(CYH)抗性基因和 18S rDNA 介导的同源整合区。再以木聚糖酶基因为目标基因, 插入 pGLR9K 载体上, 构建重组表达载体, 电击转化 *C. utilis*。对阳性转化子进行酶活测定, 检测其表达情况。【结果】转化子的胞内外都可检测到木聚糖酶酶活, 酶活可达 60 U/mL。【结论】本实验构建了一个 *C. utilis* 载体, 并用此载体表达了木聚糖酶基因, 本研究将为产朊假丝酵母工程菌在饲料添加剂及食品行业中的应用提供又一个新的实验平台。

关键词: 产朊假丝酵母; 同源整合; 载体构建; 整合表达; 木聚糖酶

中图分类号: Q933 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2009)03-0316-08

产朊假丝酵母是一种极其重要的工业微生物, 常被用于生产多种生物物质, 如谷胱甘肽及一些氨基酸和酶类^[1]。它和啤酒酵母、克鲁维酵母被美国 FDA 认证为可作为食品添加剂的酵母, 能运用于食品、制药业以及畜禽的饲料中^[2]。目前使用较多的酿酒酵母和甲醇酵母与产朊假丝酵母相比均存在着不同的缺陷, 如大量表达时酿酒酵母常常会发质粒丢失现象, 在有些实验中, 分泌性的蛋白滞留于壁膜间隙中, 使分离纯化十分困难, 而且在发酵中通常有乙醇产生, 难以对其进行高密度发酵。现阶段广泛使用的甲醇酵母尽管具有高表达、高稳定、高分泌的特点^[3-6], 但它们不是食品酵母, 诱导中需要添加甲醇, 在部分行业不能被广泛接受^[7-9]。与之相比, 产朊假丝酵母具有以下优点: ①不具有醇解抑制有氧化效应(crabtree-negative), 因而在严格好气的条件下生长不会产生乙醇; ②产朊假丝酵母属多倍体,

其基因组中 rDNA 属高度重复单元, 使用此重复序列作为整合载体的同源重组位点可使外源基因与宿主染色体之间发生多拷贝同源重组; ③发酵密度高, 在高密度发酵中细胞干重可达到 92 g/L; ④在廉价的糖蜜中就能生长; ⑤作为添加剂可直接使用。因而产朊假丝酵母作为基因工程表达宿主具有很大的潜力^[10-11, 24]。

产朊假丝酵母是多倍体无性世代, 没有稳定的附加质粒, 因此采用整合型载体将外源基因整合到染色体中是产朊假丝酵母引入外源基因的主要方式。产朊假丝酵母基因组中存在一段 L41 基因属放线菌酮(CYH)敏感性基因, 研究表明^[12], 对 L41 基因第 56 位氨基酸密码子的一个碱基进行突变即可获得 CYH 抗性基因, 为构建产朊假丝酵母整合型表达载体提供便利。

木聚糖是一种半纤维素, 广泛存在于自然界中,

基金项目: 国家 973 项目(2004CB719704); 新疆自治区高技术研究与发展计划项目(200511107); 国家农业科技成果转化资金项目(2006GB2G400336)

* 通信作者。 Fax: +86-991-4534829; E-mail: whangwei0718@126.com

作者简介: 杨红兰(1982-), 女, 重庆人, 硕士, 研究方向为微生物发酵工程。 E-mail: YHLan-163@163.com

收稿日期: 2008-03-07; 修回日期: 2008-11-28

尤其是禾本科植物秸秆中含量很高^[13-14]。然而,由于其不易降解,很难被动物消化吸收。研究表明,木聚糖酶(Xylanase)能降解饲草植物中的木聚糖,有效提高饲草的利用率。目前研究最多的是内切木聚糖酶A(xynA),它是一类可将木聚糖降解为低聚木糖和木糖的水解酶类,在饲料、制浆造纸、食品医药等行业中有广阔的应用前景^[15-17]。因此,本研究选用此酶基因作为目标基因,旨在验证pGLR9K载体的可行性及初步研究产朊假丝酵母对木聚糖酶的表达情况。

本研究以pBR322载体作为基本骨架,以产朊假丝酵母基因组DNA为模板,采用定点突变法获得放线菌酮抗性基因,同样以产朊假丝酵母基因组DNA为模板,采用PCR方法获得其18S rDNA片段^[18]和GAP启动子-终止子片段^[19-20],构建具有放线菌酮抗性和18S rDNA同源整合区域的产朊假丝酵母表达载体。克隆来自链霉菌(*Streptomyces olivaceoviridis*)的木聚糖酶基因,连接到质粒pUC19上,命名为pUC19-XA,由本室保存。本文将木聚糖酶基因插入产朊假丝酵母表达载体中,获得重组表达载体,将重组表达载体线性化后采用电击法转化产朊假丝酵母,通过抗性平板筛选出阳性转化子,采用PCR等方法对阳性转化子进行鉴定;采用SDS-PAGE和相应酶活测定的方法对目的基因表达产物进行检测,从而对产朊假丝酵母表达载体的构建及

携带有外源基因的产朊假丝酵母的遗传特性进行初步探索,为食品及新型饲料添加剂的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和载体:大肠杆菌(*E. coli*)DH5a、质粒pUC19-XA、产朊假丝酵母由本室保存。质粒pBR322及克隆载体pMD19-T simple vector均购自大连TaKaRa公司。

1.1.2 仪器和试剂:各种限制性内切酶、Taq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶和牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)均购自大连TaKaRa公司。DNA凝胶回收试剂盒购自上海华舜生物公司。Southern blotting试剂盒(DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I)购自德国罗氏公司。其它产品购自上海生物工程公司,试剂均为分析纯。PCR仪和电转仪Gene Pusler II为美国Bio-Rad公司产品。本文中涉及的DNA测序均由大连TaKaRa公司完成。

1.2 引物设计

根据GenBank中公布的*C. utilis*各基因序列结合pBR322质粒序列特征设计引物并引入合适的酶切位点,引物均由上海生物工程技术服务有限公司合成。其中引物P5和R5是根据文献^[12]设计的一对反向互补引物。各引物序列见表1。

表1 PCR引物序列

Table 1 The sequences of PCR primers used in plasmid construction

Gene	Fragment size/bp	Primer sequence (5'→3')	Source
GAP-p	970	P1: GGATATCTTACAGCGAGCACTCAA <i>EcoRV</i>	<i>C. utilis</i>
		R1: AGGTACCGCTAGCTCTAGAATGTTGTTTGT <i>KpnI NheI Xba</i>	
GAP-t	802	P2: TTCTAGAGCTAGCGGTACCTATGACTTTTAT <i>XbaI NheI KpnI</i>	<i>C. utilis</i>
		R2: GGGATCCACGTGTAATACCAGG <i>BamHI</i>	
18S rDNA	1700	P3: CGATATCTGCCAGTACTCATATGC <i>EcoRV</i>	<i>C. utilis</i>
		R3: CGATATCTGACTTGCCTTACTAG <i>EcoRV</i>	
L41	1970	P4: CGTCGACAGTAAGTATGAAAAGAGC <i>SalI</i>	<i>C. utilis</i>
		R4: GGGATCCGG GTTGGTCTATGTTGCT <i>BamHI</i>	
mL41	(caa code Gln)	P5: AACCAAGCAAGTTTTCCAC R5: GTGGAAAACCTTGCTTGCTT	<i>C. utilis</i>
xynA	1300	P6: TATCTAGAATGGCCGAGAGCACGCT <i>XbaI</i>	<i>S. oviridis</i>
		R6: GGTACCTCAGTGGGGTCC <i>KpnI</i>	
xynA-2	1200	P7: ACATGGTGACGGCCGAGAACCAGAT	<i>S. oviridis</i>
		R7: TTGGAGCAGGACTAGAGCTGGATCA	

1.3 同源整合表达载体 pGLR9K 的构建

1.3.1 CYH 抗性基因的克隆 :以 *C. utilis* 基因组为模板,分别以 P4/R5、P5/R4 为引物进行 PCR,获得 L41 基因上游片段、下游片段,这 2 片段的一端具有碱基重叠区。分别回收这 2 片段。以这两片段等量混合为模板, P4/R4 为引物进行套叠 PCR,即可获得 CYH 抗性基因。PCR 反应条件:94℃ 5 min;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 2 min,30 个循环,72℃ 10 min。回收目的片段连接至载体 pMD19-T simple vector 上(命名为 pT-CYH)进行测序分析。

1.3.2 酵母 GAP 启动子(GAP-p)和终止子(GAP-t)基因的克隆 :以 *C. utilis* 基因组为模板,分别以 P1/R1、P2/R2 为引物进行 PCR,获得酵母 GAP 启动子(GAP-p)基因片段、GAP 终止子(GAP-t)基因片段。PCR 条件同上。回收这两片段分别连接至载体 pMD19-T simple vector 上(分别命名为 pT-GP、pT-GT)进行测序分析。

1.3.3 18S rDNA 基因的克隆 :以 *C. utilis* 基因组为模板,以 P3/R3 为引物进行 PCR,获得 18S rDNA 片段。PCR 条件同上。回收目的片段构建至载体 pMD19-T simple vector 上(命名为 pT-rD)进行测序分析。

1.3.4 整合表达载体 pGLR9K 的构建 :提取 pT-GP、pT-GT 和 pBR322 质粒,分别采用 *Eco* RV/*Xba* I、*Xba* I/*Bam* HI 和 *Eco* RV/*Bam* HI 进行酶切,回收目的片段。采用 3 片段连接法,用 T4 DNA 连接酶将这 3 片段同时连接,获得质粒 pBR-GAP。

提取 pT-CYH 和 pBR-GAP 质粒,分别采用 *Bam* HI/*Sal* I 进行酶切。回收目的片段,用 T4 DNA 连接酶进行连接,获得质粒 pBR-G-L。

提取 pT-rD 和 pBR-G-L 质粒,分别采用 *Eco* RV 进行酶切。回收目的片段,用 T4 DNA 连接酶进行连接,获得载体 pGLR9k。转化大肠杆菌 DH5a,提取质粒后采用酶切和 PCR 方法鉴定阳性克隆并保存备用。

1.4 含 *xynA* 基因的酵母表达载体 pGLXR 的构建

1.4.1 *xynA* 基因的克隆 :以质粒 pUC19-XA 为模板,P6/R6 为引物进行 PCR,获得 *xynA* 目的基因片段^[2,9]。PCR 条件为:94℃ 5 min;94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 1.5 min,30 循环,72℃ 10 min。回收目的基因克隆至载体 pMD19-T simple vector 上(命名为 pT-XA)进行测序分析。

1.4.2 重组表达载体 pGLXR 的构建 :提取 pT-XA 质粒,采用 *Xba* I/*Kpn* I 进行酶切,回收目的片段构建至载体 pGLR9K 相应位点上,获得质粒 pGLXR。转化大肠杆菌 DH5 α ,筛选鉴定阳性克隆并保存备用。

1.5 电转化 *C. utilis*

提取质粒 pGLXR,分别采用 *Eco* RI、*Hpa* I 线性化,回收目的片段保存待用。

电击转化方法参照文献[12,23]。

1.6 转化子的筛选及稳定实验

转化子在含有 CYH(50 μ g/mL)的 YPD 液体培养基中连续继代 3 次,挑选数个转化子,提取基因组,用外源基因中的特异引物 P6/R6 扩增,PCR 结果为阳性的转化子转入无抗性 YPD 培养基中连续培养数代后,继续在不同浓度梯度(50、60、75、100 μ g/mL)的 CYH 选择培养基中筛选。复筛采用 PCR 方法,挑取数个电转化后的酵母单菌落,增菌培养后分别提取基因组,用外源基因两侧特异引物(P7/R7)扩增筛选。其中,引物 P7/R7 位于外源基因的中间序列上,可以扩增出 1.2 kb 的目标基因,是为了进一步验证外源基因是否整合到染色体上而设计的。

1.7 *xynA* 的表达检测

从平板上挑取经过 PCR 复筛后的阳性菌落至液体 YPD 选择培养基中,30℃ 培养过夜,按 1:100 的比例接种到 20 mL 新鲜的 YPD 选择培养基中,30℃ 培养 70 h 和 85 h 后,分别收集菌体和发酵液,菌体用超声波破壁。采用 DNS 法测定其胞内外每 mL 发酵培养物中 *xynA* 的酶活(U/mL)^[21-22]。

酶活定义为 50℃,pH5.6 条件下 1min 产生 1 μ mol 的木糖所需的酶量为一个酶活单位(U)。

1.8 基因片段的 PCR 扩增和 probe 制备

以质粒 pGLXR 为模板,P7/R7 为引物进行 PCR,反应体系和反应程序同 1.4.1。扩增的木聚糖酶产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离,回收目的片段。探针采用 DIG-dUTP 随机引物标记法标记 PCR 产物,探针标定方法参照罗氏试剂盒说明书。

1.9 Southern blot 分析

本研究以 Southern 杂交试验验证外源 *xynA* 基因是否整合到酵母基因组中。以 *xynA* 基因为探针,挑选 PCR 验证为阳性酵母转化子基因组 DNA 进行 0.8% 琼脂糖胶电泳,同时以未经转化的酵母基因组为对照。基因组转移到尼龙膜,UV 交联仪固定,用

含有 $0.5 \times \text{SSC}$ 0.1% SDS 溶液洗涤滤膜进行预杂交和杂交。用 DIG-dUTP 标定的探针杂交 酶联免疫反应显色。

2 结果

2.1 同源整合表达载体 pGLR9K 的构建

将所得 CYH 抗性基因、酵母 GAP 启动子(GAP-

p) 终止子(GAP-t)基因和 18S rDNA 片段进行测序分析。结果表明,成功克隆到各基因片段。

依次将 GAP-p、GAP-t、CYH 基因和 18S rDNA 基因片段构建至质粒 pBR322 上。提取质粒,采用酶切和 PCR 进行验证,结果表明:所有片段都正确连接至载体上,得到的同源整合表达载体命名为 pGLR9K(图 1)。

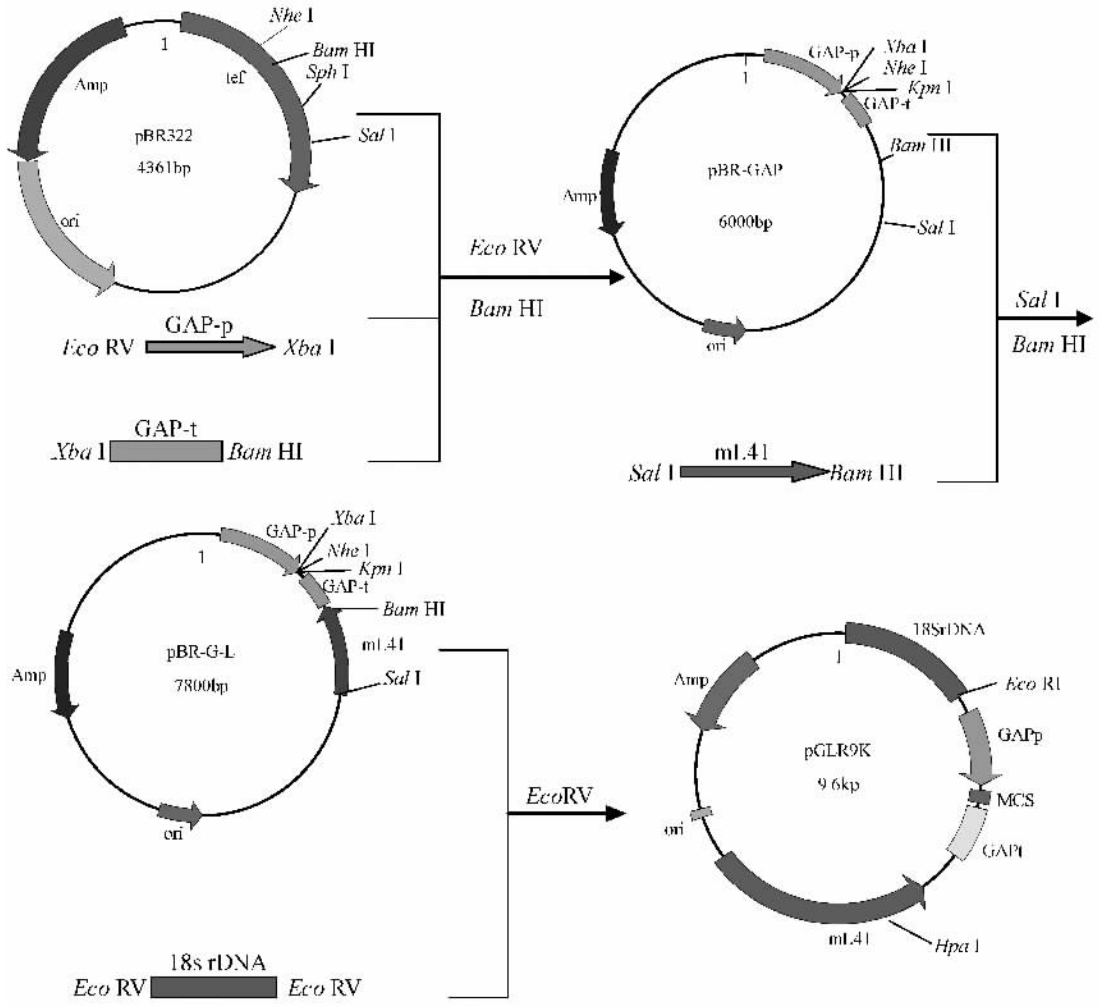


图 1 质粒 pGLR9K 的构建

Fig.1 Construction of the plasmid pGLR9K.

2.2 重组表达载体 pGLXR 的构建

以质粒 pUC19-XA 为模板通过 PCR 获得 xynA 目的基因片段,对此基因进行测序分析,结果表明该基因片段具有完整的开放阅读框(ORF),基因大小为 1.3 kb,不带有原基因的分泌信号肽。

提取 pT-XA 质粒,采用 Xba I/Kpn I 进行酶切,回收目的基因构建至载体 pGLR9K 多克隆位点上,获得质粒 pGLXR(图 2)。转化大肠杆菌 DH5 α ,提取质粒采用酶切和 PCR 方法进行鉴定。鉴定结果表

明,目的基因成功构建至表达载体上。用 Nco I 线性化载体 pGLXR 后,琼脂糖凝胶电泳条带大小为 10.8 kb,与理论相符(图 3)。至此,成功获得重组表达载体 pGLXR。

2.3 酵母转化子的稳定及验证分析

将整合表达载体 pGLXR 线性化后,采用电击法转化 *C. utilis*。转化产物涂布于 CYH 抗性平板上,置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养,直至长出菌落。

选取若干阳性转化子在含有 CYH(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的

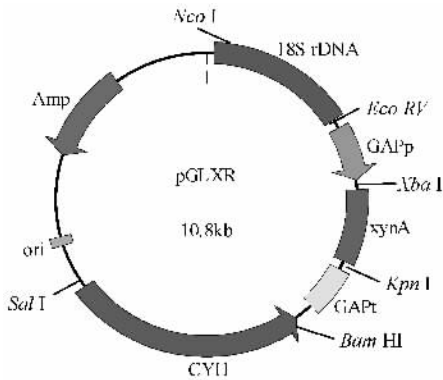


Fig.2 pGLXR 酵母表达载体结构图

Fig.2 The Structure of vector pGLXR.

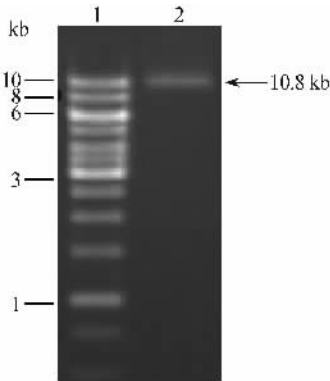


Fig.3 载体 pGLXR 线性化酶切产物电泳图

Fig.3 The linearized production of pGLXR(digested by NotI): 1.1kb Marker; 2. The linearized production of pGLXR.

YPD 液体培养基中连续继代多次,发现转化子均能很好地生长,通过 PCR 检测,挑选出 7 个 PCR 结果为阳性的转化子,在无抗性培养基中连续培养多次后,在不同浓度梯度(50、60、75、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 CYH 选择培养基中筛选。结果表明在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CYH 抗性培养基中可见转化子的生长,而未经转化的 *C. utilis* 在 CYH 抗性培养基中不能生长,从而获得具有稳定 CYH 抗性的 *C. utilis* 工程菌株。PCR 方法复筛,挑取上述 7 个转化子的单菌落,提取转化子基因组,以未经转化的原始菌株 *C. utilis* 基因组为模板的 PCR 结果为阴性对照,用外源基因 *xynA* 两侧特异引物(P7/R7)扩增,PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳,结果显示在 1.0~1.5 kb 之间有明显的特异条带,大小与理论值(1.2 kb)相吻合,未经质粒转化的原始酵母菌株未出现特征条带(图 4),经过多次转化子的筛选实验表明 PCR 检测的阳性率在 85.7% 左右,阳性转化子摇瓶发酵后,经过 PCR 验证,质粒也无丢失现象,表明 *xynA* 基因成功连接至

pGLR9K 载体上。

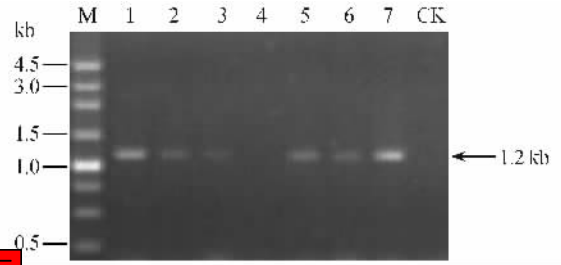


Fig.4 PCR 产物电泳图

Fig.4 PCR Identification of xylanase gene incorporation (PCR amplification by using primers P7 and R7). 1-7: The yeasts transformed with pGLXR; M: 250bp Marker; CK: *C. utilis*.

2.4 重组木聚糖酶的酶活检测

木聚糖酶活测定是以未经转化的 *C. utilis* 为对照。测定结果表明,相同条件下,不同转化子的木聚糖酶酶活差异很大,所测定的酵母转化子的酶活最高可达 60 U/mL(图 5)。EcoRI 酶线性化载体后的转化子比用 HpaI 酶线性化载体后转化子的酶活高。

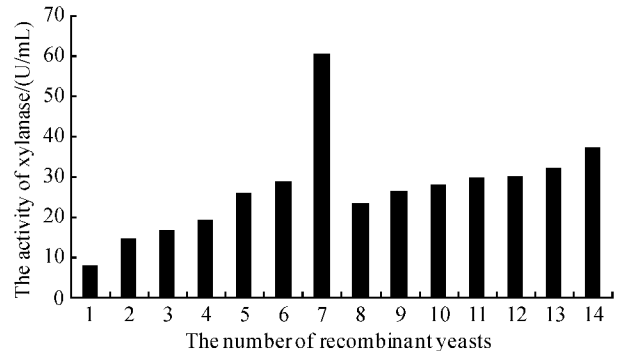


图 5 不同酵母转化子的木聚糖酶酶活比较

Fig.5 The comparison of xylanase activity in different recombinant *C. utilis*.

酶活实验表明:发酵 70 h 时胞内酶活比发酵 85 h 时胞内酶活高;发酵 85 h 时胞外酶活比发酵 70 h 时的胞外酶活高。但总体来说,胞外酶活普遍比胞内酶活高(数据略)。酵母转化子发酵实验表明:重组 *C. utilis* 工程菌能表达木聚糖酶。

2.5 Southern blot 结果

Southern 杂交是以未经转化的 *C. utilis* 酵母基因组为对照的,用 Southern 杂交验证 PCR 为阳性的 *C. utilis* 酵母转化子基因组中质粒 pGLXR 的整合情况(图 6)。图 A 为 EB 染色后的电泳图,B 为 Southern 杂交图。从图中可以看出:未经转化的 *C.*

utilis 基因组的杂交结果为阴性,而经质粒 pGLXR 转化后的酵母基因组与 1.2 kb 的木聚糖酶基因探针杂交后,可见清晰的杂交条带,杂交结果为阳性。表明木聚糖酶基因整合到 *C. utilis* 酵母基因组中。

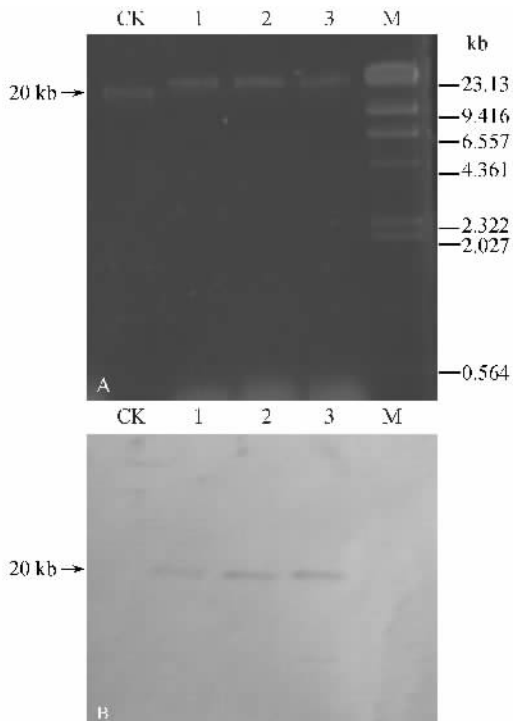


图6 *C. utilis* 转化子基因组与探针的 Southern 杂交

Fig.6 Southern hybridization with DIG-Labeled 1.2 kb fragment. A: the agarose dyed by EB; B: the nylon member film with southern hybridization. Lane M: λ Hind III Marker; Lane CK: the *C. utilis* with non-transformed; Lane 1, 2, 3: the transformed *C. utilis* with pGLXR.

3 讨论

由于表达载体不含酵母自主复制序列 (ARS)^[11],导入酵母体内的重组表达载体只有和酵母染色体上的同源区发生重组,整合到染色体上,外源基因才能够稳定存在,才能得到稳定表达,这种整合型转化子一旦形成整合就非常稳定。如果转化后的重组表达载体未能整合到染色体上,而是以游离质粒形式存在,这种转化子就不稳定,重组表达载体极易丢失。本文是以 18S rDNA 作为同源整合序列介导的转化实验,在不同浓度梯度的 CYH 选择培养基中筛选,结果表明各个浓度梯度都可见转化子的生长。继代过程中也未发现抗性的不稳定,从而证明重组 *C. utilis* 工程菌获得了稳定的 CYH 抗性。酵母转化子的基因组 PCR 结果表明重组 *C. utilis* 的染色体中获得木聚糖酶基因,通过酶活测定实验,证

明木聚糖酶基因插入到 *C. utilis* 的染色体上,且能表达有活性的木聚糖酶。

表达载体与酵母染色体有单交换和双交换 2 种整合方式,线性化的质粒载体与宿主菌染色体的交换方式及整合频率与载体的线性化位点有关。在本研究中, *Eco* RI 酶线性化载体的转化效率比 *Hpa* I 酶线性化后转化效率高。推测主要原因是整合位点不同导致的: *Eco* RI 酶位于同源整合序列中,且同源整合序列(18S rDNA)是多拷贝序列^[18],用此酶线性化后,载体可以以两种方式整合到酵母染色体中;而 *Hpa* I 酶位于抗性基因序列中(CYH),它线性化载体后,整合位点可能在抗性基因上,减弱了抗性,不利于转化子的生长。通过 Southern blot 技术证明 pGLR9K 载体携带的 *xynA* 基因整合到酵母基因组中,在 *C. utilis* 基因组中成功整合了外源 *xynA* 基因。

木聚糖酶是最重要,也是研究最多的一种半纤维素酶。木聚糖酶一般为胞外酶,被分泌到周围环境或培养液中,便于降解木聚糖。因此,通过基因重组技术使发酵工程菌获得降解半纤维素的能力是当前研究的热点。有资料显示^[23],五碳糖代谢途径中的相关酶类在 *C. utilis* 中表达有一定可行性。另外,宿主菌 *C. utilis* 是一种被 FDA 公认的用于重组表达外源基因的生物安全菌株,而且,其本身就是一种单细胞蛋白,可直接作为食用酵母^[24]。本文以木聚糖酶基因为目标基因来检测载体 pGLXR 的同源整合的可行性,实验证明此思路具有一定的可行性,旨在直接把稳定高效表达木聚糖酶的 *C. utilis* 工程菌株应用于青贮饲料添加剂及其它相关的工农业应用方面。本文实现了木聚糖酶在 *C. utilis* 中的整合表达,对半纤维素酶类在 *C. utilis* 中的表达提供了一种新思路。同源重组载体 pGLR9K 的构建也将为安全模式菌株 *C. utilis* 通用表达系统的构建及应用打下良好的基础。木聚糖酶在 *C. utilis* 中表达成功,为饲料及食品行业提供又一实验平台。

参考文献

- [1] 赵颖怡,梁世中,黄日波. 一种新的食品酵母表达系统:产朊假丝酵母. 生物技术通讯 (Letters in Biotechnology), 2002, 13(6): 457-458.

- [2] Yi-Ren Hong ,Ya-Lei Chen , et al. Recombinant *Candida utilis* for the production of biotin. *Applied Microbiology Biotechnology*.2006 ,71 :211 – 221.
- [3] 赵颖怡,梁世中,黄鲲,等. 一种新型酿酒酵母附加型分泌表达载体的构建. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*,2002,44(4):431 – 435.
- [4] 郑桂珍,赵颖,戴梦,等. 酵母绿色荧光蛋白报告载体的构建及其在过氧化物酶体研究中的应用. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*,2007,47(4):702 – 705.
- [5] 蒋燕明,杨治华,冉宇靓,等. 一种新型多拷贝毕赤酵母表达载体的构建. *广西医科大学学报(Journal of Guangxi Medical University)*,2005,22(4):511 – 513.
- [6] Pingzuo Li , Anukanth Anumanthan , Xue-Gong Gao , et al. Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*. *Applied Biochemical Biotechnology* ,2007 ,142 :105 – 124.
- [7] 郑立运,方先珍. 酵母表达系统最新研究进展. *郑州牧业工程高等专科学校学报(Journal of Zhengzhou College of Animal Husbandry & Engineering)* , 2005 , 25 (4) :250 – 252.
- [8] 韦宇拓,甘凤琼,苏华波,等. 巴斯德毕赤酵母新型分泌表达载体构建. *广西农业生物科学(Journal of GUANGXI Agricultural and Biological Science)* , 2003 , 22 (1) :37 – 40.
- [9] 章如安,袁中一. 巴斯德毕赤酵母表达体系研究及进展. *微生物学通报(Microbiology)* ,2000 ,27(5) :371 – 373.
- [10] Hiroshi Shimada , Keiji Kondo , Paul D. Fraser , et al. Increased Carotenoid Production by the Food Yeast *Candida utilis* through Metabolic Engineering of the Isoprenoid Pathway. *Applied and Environmental Microbiology* ,1998 ,64 (7) :2676 – 2680.
- [11] W. H. HSU , P. T. MAGEE , B. B. MAGEE , et al. Construction of a New Yeast Cloning Vector Containing Autonomous Replication Sequences from *Candida utilis*. *Journal of Bacteriology* ,1983 ,154(3) :1033 – 1039.
- [12] Kondo K , Saito T , Kajiwara S , et al. A Transformation system for the yeast *Candida utilis* use of a modified endogenous ribosomal DNA as a drug-resistant marker and ribosomal DNA as an integration target for vector DNA. *Journal of Bacteriology* ,1995 ,177(24) :7171 – 7177.
- [13] 张红莲,姚斌,王亚茹,等. 链霉菌 *Streptomyces oliaceociridis* A1 木聚糖酶基因 *xynA* 在大肠杆菌及毕赤酵母中的高效表达. *生物工程学报(Chinese Journal of Biotechnology)* ,2003 ,19(1) :41 – 45.
- [14] 邵蔚蓝,薛业敏. 以基因重组技术开发木聚糖类半纤维素资源. *食品与生物技术(Journal of Food Science and Biotechnology)* ,2002 ,21(1) :88 – 92.
- [15] Atsushi Kuno , Daisuke Shimizu , Satoshi Kaneko , et al. PCR Cloning and Expression of the F/10 Family Xylanase Gene from *Streptomyces oliaceociridis* E-86. *Journal of Fermentation and Bioengineering* ,1998 ,86(5) :434 – 439.
- [16] Zhang H L , Yao B , Wang Y R , et al. Expression of xylanase gene *XynA* from *streptomyces oliaceociridis* A1 in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology* ,2003 ,19(1) :76 – 80.
- [17] Ping Deng , Defa Li , Yunhe Cao , et al. Cloning of a gene encoding an acidophilic endo-1,4-xylanase obtained from *Aspergillus niger* CGMCC1067 and constitutive expression in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology* ,2006 ,39 :1096 – 1102.
- [18] 刘向勇,沈煜,郭亭,等. rDNA 介导的多拷贝整合表达载体的构建及其在酿酒酵母工业菌株中的应用. *山东大学学报(Journal of Shandong University)* ,2005 ,40(3) :105 – 109.
- [19] Zhang Ai-Lian , Luo Jin-Xian , et al. Constitutive Expression of Human Angiostatin in *Pichia pastoris* Using the GAP Promoter. *Acta Genetica Sinica* .2004 ,31(6) :552 – 557.
- [20] 张爱联,罗进贤,张添元,等. 用 GAP 启动子在毕赤酵母中组成型表达人血管抑制素. *遗传学报(Acta Genetica Sinica)* 2004 ,31(6) :552 – 557.
- [21] 聂国兴,李春喜,张建新,等. 底物浓度, DNA 量对木聚糖酶活性测定结果的影响. *饲料工业(Feed Industry)* ,2002 ,23(11) :24 – 25.
- [22] 费笛波,冯观泉,袁超. 饲用木聚糖酶活性测定方法的研究. *浙江农业学报(Acta Agriculturae Zhejiangensis)* ,2004 ,16(2) :53 – 58.
- [23] Kondo Keiji , Kiban Gijutsu , kenkyusho et al. Transformation systems for the yeast *candida utilis* and the expression of heterologous genes therewith. european patent application. European Patent Application : EP1792993A1. 2007/23.
- [24] Yutaka Miura , Keiji Kondo , Toshiko Saito , et al. Production of the Carotenoids Lycopene , Catotene , and Astaxanthin in the Food Yeast *Candida utilis*. *Applied and Environmental Microbiology* ,1998 ,64(4) :1226 – 1229.

Construction of integrative vector of *Candida utilis*

Honglan Yang^{1,2}, Wei Wang^{1,3*}, Huifang Bao¹, Chunsheng Cui¹, Shuang Hu^{1,2}

(¹ Institute of Microbiology of Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China)

(² Key Laboratory of Agricultural Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

(³ Xinjiang Engineering Research Center for Microbiology of Extreme Habitat, Urumqi 830091, China)

Abstract [Objective] Xylanase is a hemicellulase. It can reduce xylan, which is the abundance resource on our earth. It is important in industries to obtain recombinant strains secreting xylanase to degrade hemicelluloses and produce xylose as desired products. We constructed an integrative vector of *Candida utilis* for xylanase expression. **[Methods]** On the basis of plasmid pBR322, an integrative expression vector pGLR9K for *Candida utilis* was constructed that contained strong promoter of GAP, 18S rDNA sequence for homologous recombination and mutated L41 gene as CYH resistant marker. Recombinant expression vector pGLXR was constructed by adding xylanase gene to the pGLR9K and then was transferred into *C. utilis*. **[Results]** Both intracellular and extracellular xylanase activities were detected in transgenic strains. **[Conclusion]** This system can be used for exogenous genes expression in transgenic *C. utilis*.

Keywords: *Candida utilis*; Homologous recombination; Integrative expression; Vector construction; Xylanase.

(本文责编 张晓丽)

Supported by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2004CB719704); the High Technology Research and Development Project of Xinjiang Autonomous Region (200511107); State transformation project for agricultural research production (2006GB2G400336)

* Corresponding author. Fax: +86-991-4534829; E-mail: whangwei0718@126.com

Received: 7 March 2008/Revised: 28 November 2008

本刊荣获 2008 年度“中国精品科技期刊”称号



2008年12月9日中国科学技术信息研究所在北京国际会议中心召开的“中国科技论文统计结果发布会”上《微生物学报》被评为2008年度中国精品科技期刊。

据中国科学技术信息研究所2008年11月公布的统计结果,我国大陆的科技期刊已达6082种、中国科技核心期刊1765种,此次“精品科技期刊服务与保障系统项目组”评选出323种精品科技期刊。

《微生物学报》能够获得此项殊荣,是广大作者、专家共同努力的结果,在此表示衷心的感谢!