

黑曲霉中葡萄糖氧化酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达

刘虎军, 罗玮, 范新蕾, 余晓斌*

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为了提高葡萄糖氧化酶的生产能力, 提取和纯化了黑曲霉 *Aspergillus niger* PCTC 的基因组 DNA, 以此为模板进行 PCR 扩增获得葡萄糖氧化酶基因, 经测序, 所得基因全长 1 772 bp, 编码含有 589 个氨基酸的蛋白质。将目的基因和表达载体 pPIC9K 连接经电转化导入毕赤酵母 GS115 中, 在甲醇诱导和 α 信号肽的转运下, 将葡萄糖氧化酶分泌到胞外。经 G418 梯度抗性平板和显色平板的初筛以及摇床复筛, 获得了一株产葡萄糖氧化酶活力较高的菌株, 该菌株在 30 °C、180 r/min 的培养条件下, 经 0.5% 的甲醇诱导发酵 4 d 可获得 0.342 U/mL 的酶活。对该菌株进行了摇瓶产酶条件优化, 其最佳发酵条件为: 200 r/min、pH 5、接种体积分数 50%、25 °C 下经 1.5% 甲醇诱导 7 d, 酶活达到 25 U/mL。实验结果表明: 葡萄糖氧化酶基因已经成功转入毕赤酵母, 并获得相当的产量。

关键词: 葡萄糖氧化酶; 黑曲霉; 异源表达; 甲醇毕赤酵母

中图分类号: Q 786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)06—0615—07

Cloning and Heterologous Expression of Glucose Oxidase Gene from *Aspergillus niger* PCTC in *Pichia pastoris*

LIU Hu-jun, LUO Wei, FAN Xin-lei, YU Xiao-bin*

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The aim of this study was to improve the production capacity of glucose oxidase. A gene of glucose oxidase (GOD) from *Aspergillus niger* TCPC was cloned and sequenced. The whole open reading frame (ORF) consisted of 1 772 bp bases and encoded a putative protein of 589 amino acids. The gene was fused to the pPIC9k plasmid and expressed in *Pichia pastoris* GS115. The recombinant GOD (rGOD) was secreted into the culture under the control of methanol and α factor signal peptide. After screening by G418 gradient resistance plate, color plate and shaker culture, one strain named GOD2-14 was obtained, which gave the highest enzyme activity (0.342 U/mL) after 4-day induction by methanol. Shake flask experiments were conducted to optimize the culture

收稿日期: 2012-07-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(21176105); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(JUSRP111A24)。

* 通信作者: 余晓斌(1964—), 男, 安徽芜湖人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事发酵法生产功能食品因子方面的研究。

E-mail: xbyu@jiangnan.edu.cn

conditions for the enhanced production of GOD. Highest enzyme activity of 25 U/mL was achieved in the shake flask by induction for 7 days under the optimal conditions (200 r/min, pH 5, 22 °C, inoculation amount of 50% and 1.5% methanol). The result showed that GOD gene has been successfully transferred and expressed in the *Pichia pastoris* GS115.

Keyword: glucose oxidase, *Aspergillus niger*, heterologous expression, *Pichia pastoris*

葡萄糖氧化酶 (GOD, β -D-glucose: oxygen 1-oxidoreductase, EC 1.1.3.4) 是一种糖蛋白类的氧化酶, 能够将 β -D-葡萄糖氧化成葡萄糖酸内酯和过氧化氢, 过氧化氢在过氧化氢酶的作用下进一步转化成水和氧气, 葡萄糖酸内酯能够进一步转化成葡萄糖酸^[1]。葡萄糖氧化酶被广泛应用在食品、饲料、医药、传感器等行业中, 例如: 作为食品添加剂能够去除葡萄糖从而减缓美拉德反应的发生以防止产品在加工过程中出现褐变^[2]; 能够在一定程度上降低蛋白清的致敏性^[3]; 能够去除啤酒、葡萄酒、软饮中的氧气以提高产品的质量和货架期^[4]; 作为饲料添加剂能够改善动物肠道环境促进动物生长^[5]; 葡萄糖氧化酶是新型传感器中的重要组成部分, 可以用来测定糖含量^[6]; 此外利用基因工程技术还可以将葡萄糖氧化酶基因克隆到植物体中用来抗虫抗病^[7]。

目前, 葡萄糖氧化酶主要采用黑曲霉和青霉进行发酵生产获得^[8], 但是存在发酵条件复杂、产量较低、发酵产物复杂和后期纯化成本高、难以获得较高纯度的酶制剂等缺点^[9]。很多学者试图利用基因工程手段改良和提高葡萄糖氧化酶的生产, 例如: 增加黑曲霉菌株中葡萄糖氧化酶基因的剂量^[10], 在瑞氏木霉^[11]等霉菌中表达、在原核菌株中表达^[12]、在毕赤酵母中表达^[13]等。其中利用甲醇毕赤酵母表达葡萄糖氧化酶基因具有较为明显的优势: 毕赤酵母的遗传背景清晰、表达系统高效, 同时甲醇毕赤酵母的高密度发酵经验非常有利于工业化生产^[14]。然而, 毕赤酵母中表达的外源葡萄糖氧化酶产量和酶活力仍然较低, 远不能与其他产酶基因工程菌的表达水平相比较。

本实验旨在克隆来源于黑曲霉 PCTC 的葡萄糖氧化酶基因, 在毕赤酵母 GS115 中异源表达, 以期获得高产葡萄糖氧化酶的生产用菌株。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与质粒 黑曲霉菌株 PCTC: 由作者所在实验室保存; 大肠杆菌 Top10, JM109: 用来构建和克隆目的基因; 毕赤酵母 GS115: 用来表达目的基因; 质粒 pMD18-T (Takara Biotechnology, Dalian Branch): 用来构建克隆载体; 质粒 pPIC9K: 用来表达目的基因。

1.1.2 试剂与仪器 PCR 相关试剂、T 克隆相关试剂和限制性内切酶: 购自 Takara 公司; PCR 产物纯化试剂盒和 G418 等: 购自上海生工生物有限公司; 琼脂糖、辣根过氧化物酶和邻联茴香胺等试剂: 购自 Sigma 公司; 色谱纯甲醇及其他试剂 (AR): 均购自国药集团。PCR 仪和电转化仪: Eppendorf 公司; 电泳仪: 北京六一仪器厂。

1.1.3 培养基 黑曲霉活化培养基用 POD 培养基, 大肠杆菌的培养和转化用 LB 培养基。酵母的培养、转化和蛋白的诱导生成用 YPD、MD、MM、BMGY 及 BMMY 等培养基。培养基组成成分如下:

1) POD 培养基: 将洗净的去皮的马铃薯 200 g 切成小块, 煮沸 30 min, 过滤, 加入 20 g 葡萄糖, 加水定溶到 1 000 mL, 自然 pH 值, 121 °C 下灭菌 20 min;

2) LB: 蛋白胨 10 g, 酵母膏 5 g, 氯化钠 10 g, 用 NaOH 调节 pH 值为 7.4, 定容至 1 000 mL; 121 °C 下灭菌 20 min;

3) YPD: 蛋白胨 20 g, 酵母膏 10 g, 葡萄糖 20 g, 定容至 1 000 mL; 自然 pH 值, 121 °C 下灭菌 20 min;

4) MD: 酵母基本氮源培养基 (YNB) 1.7 g, 硫酸铵 5 g, 葡萄糖 200 g, 定容至 1 000 mL; 自然 pH 值, 121 °C 下灭菌 20 min。加入 500×B (过滤灭菌) 2 mL;

5) MM: YNB 1.7 g, 硫酸铵 5 g, 甲醇 12 mL, 定容至 1 000 mL; 自然 pH 值, 121 °C 灭菌 20 min。加入

500×B(过滤灭菌) 2 mL;

6)BMMY 培养基:酵母浸出物 10 g,蛋白胨 20 g,加入 800 mL 水中,121 °C 下灭菌 20 min,冷至室温,加入灭好菌的 PBS 100 mL,10×YNB 100 mL,500×B 2 mL(过滤灭菌),甲醇 5 mL;

7)BMGY 培养基:酵母浸出物 10 g,蛋白胨 20 g,加入 700 mL 水中,121 °C 下灭菌 20 min,冷至室温加入灭好菌的 PBS100 mL,10×YNB 100 mL,500×B 2 mL(过滤灭菌),10×GY 100 mL;

8)显色培养基:将 10 mL 的 1%琼脂加热溶化并冷至 50 °C 左右后加入 3 mL 的显色液(1 mL 溶液 2 中加入 100 μL 溶液 1 和 200 μL 溶液 3 混匀,补加缓冲液到 3 mL)。溶液 1:0.1 g 邻联茴香胺溶于 10 mL 甲醇中,4 °C 保存;溶液 2:10% D-葡萄糖;溶液 3:60 U/mL 的辣根过氧化物酶。

1.2 实验方法

1.2.1 黑曲霉基因组 DNA 的提取和目的基因的克隆

1)黑曲霉 PCTC 菌体预处理:采用 POD 培养基平板活化黑曲霉 PCTC,于 28 °C 下培养 24 h,刮取孢子配置成悬液,接种到含有 50 mL 种子液的 250 mL 摇瓶中,取培养好的种子液以相同的方法接种到含有 1.5% 吐温-60(TW-60)的摇瓶中,于 200 r/min、30 °C 摇床中培养 24 h。将数颗灭菌的玻璃珠加入到摇瓶中,置于 200 r/min 摇床中振荡 3~4 h,取 1~1.5 mL 的菌液 8 000 r/min 离心,去掉上清液,用生理盐水洗涤两次,再次离心收集菌体。

2)基因组 DNA 的提取:采用氯化苜法^[15]提取黑曲霉 PCTC 的基因组 DNA。

3)目的基因的获得:设计如下引物:

GOD-R:TTGCGGCCGCTCACTGCATGGAAGCA
TAATCTTCCAAG

GOD-F:GCTTACGTAAGCAATGGCATTGAAGC
CAGCCTCCT

其中斜体部分分别为 *Not1*、*Snab1* 酶切位点,以黑曲霉基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物经纯化回收后,在 T4 连接酶的作用下连接到 pMD18-T 载体上,并转化 *E. coli* JM109,经蓝白斑筛选和菌落 PCR 鉴定获得阳性克隆子,同时提取 pMD18-GOD 质粒送至上海生工生物工程有限公司测序进行验证。

1.2.2 表达载体的构建和宿主转化 用 *Snab1* 和

Not1 分别将 pPIC9K 和 pMD18-GOD 质粒酶切。pPIC9K 酶切产物用 PCR 产物回收试剂盒回收纯化,pMD18-GOD 质粒的酶切产物用胶回收试剂盒回收纯化。在 T4 连接酶的作用下构建重组质粒 pPIC9K-GOD,转化 *E. coli* Top10,经氨苄抗性平板筛选和菌落 PCR 鉴定,同时送至上海生工测序验证,保存测序正确的菌株,利用电转化方法转化毕赤酵母 GS115,将电击转化的感受态细胞在 MD 培养基上培养至转化子出现。

1.2.3 GOD 高效表达株的筛选 将上述获得的转化子制备成菌液涂布在含有 G418 的梯度平板上,G418 质量浓度梯度从 0 mg/mL 到 3 mg/mL,培养温度为 30 °C,挑选在高浓度下生长的单菌落,再将其分别点种在 MM 和 MD 平板中,以确定其表型。培养出单菌落后将 MD 平板置于 4 °C 冰箱中保存,然后利用平板筛选法^[16],将 10 mL 显色培养基倾倒在 MM 平板上。30 °C 下放置 1 h,然后将其放于 4 °C 冰箱中显色。将显色圈较大的阳性克隆子接种在 3 mL BMGY 培养基上,30 °C、200 r/min 下培养 24 h,离心收集菌体,用 3 mL 的 BMMY 培养基重悬,在相同的培养条件下诱导表达,每 24 h 补充 300 μL 甲醇,摇床培养 4 d 后测定上清液中酶活性大小,确定高产菌株。

1.2.4 摇瓶发酵条件优化 为了提高毕赤酵母的产酶活性,作者对接种量、pH 值、诱导温度、诱导甲醇浓度、装液量和诱导时间等 6 个因素进行了优化。将重组菌接种在含有 100 mL 的 YPG 培养基的 500 mL 的摇瓶中,在 30 °C、200 r/min 下培养 24 h,以 5% 的接种体积分数接种到含有 BMGY 培养基的 250 mL 的摇瓶中,在 30 °C、200 r/min 下培养 16~24 h,直到 OD₆₀₀ 达到 5~6 时,静置 1~2 h 以消耗剩余的甘油并且使菌体沉淀。然后倒掉上层培养基,用一定体积的 BMMY 培养基重悬,以后每 24 h 补充 1% 的甲醇诱导产酶。甲醇体积分数选择 0.5%、1%、1.5%、2% 和 2.5% 五个浓度;接种体积分数选择 25%、50%、100% 和 150% 四个梯度;pH 设置为 3、4、5、6 和 7 五个梯度;诱导温度分别设为 22、25、28、30 °C;装液量选择 15、20、30、40、50 mL 五个梯度;诱导表达时间的优化以每天取样测定酶活性、OD₆₀₀ 来确定最佳发酵时间。每组实验设置 3 个平行,分别测定酶活性和 OD 值。

1.2.5 酶活性的测定 酶活性测定方法根据 Sigma

和周建芹^[17]公司的方法并加以改进:配置 21 $\mu\text{mol/mL}$ 的双氧水标准液,反应体系中含有 2.5 mL 的 0.21 mmol/L 的邻联茴香胺溶液,0.4 mL 的 10% 葡萄糖溶液,0.1 mL 的 60 U/mL 的辣根过氧化物酶,再加入 1 mL 不同浓度的双氧水,在 35 $^{\circ}\text{C}$ 下预热 5 min,加水补到 10 mL,在 OD_{500} 下测定吸光度,以吸光度为横坐标,以浓度为纵坐标制作标准曲线。样品的测定用 1 mL 稀释好的样品代替双氧水,反应 1~5 min 测定 OD 值然后计算酶活性大小,酶活性单位定义为:37 $^{\circ}\text{C}$ 下,每分钟催化产生 1 μmol 的双氧水所需要的酶量为一个酶活单位。

2 结果与分析

2.1 黑曲霉 PCTC 基因组 DNA 的提取和葡萄糖氧化酶基因克隆

将配制的黑曲霉孢子悬液($\text{OD}_{500}=0.4$)以不同的接种体积分数接种于摇瓶,培养 24 h 后加入等量的玻璃珠,摇床振荡 4 h。未添加玻璃珠处理的培养液中,菌丝体集结形成菌球,难以提取出基因组 DNA,用玻璃珠处理后则相对容易地提取出基因组 DNA,这是因为采用玻璃珠处理使菌丝处于分散状态,有利于氯化苄和细胞壁充分接触。接种体积分数对基因组 DNA 的提取也产生很大的影响,接种量小于 0.5% 时容易形成较大菌球,当菌球直径大于 0.2 mm 时,即使用玻璃珠处理也无法提取出基因组 DNA。另外 TW-60 有利于基因组 DNA 的提取,因为添加 1.5% 的 TW-60 能够有效减小菌球的直径和离散菌丝体。

以黑曲霉 PCTC 基因组为模板克隆获得了 GOD 基因,见图 1。目的基因条带单一、浓度较高。图 2 中 4 号和 5 号为两个白色菌落的菌落 PCR,第三条带为蓝斑质粒 DNA 线性化的条带,4 号 5 号菌株经测序其全长为 1 772 bp,将其提交 Genbank 所获序列登录号是 JX105360 与 Genbank 中其他葡萄糖氧化酶基因的序列的相似度在 92%~98% 之间,预期能够编码含有 589 个氨基酸残基的蛋白质。对序列进行分析,发现序列中不含有内含子和基因原有的信号肽序列,不含有 *SacI*、*NotI* 和 *SnaBI* 酶切位点,含有 *EcoRI* 酶切位点,符合之前的预测。

2.2 重组表达载体的构建

分别用 *SnaBI* 和 *NotI* 对 pMD18-T-GOD 和 pPIC9K 做分步酶切,结果见图 3。切胶回收位于 2 000

bp 处的条带,pPIC9K 酶切后用 PCR 回收试剂盒纯化回收,以适当比例混合后在 16 $^{\circ}\text{C}$ 下进行连接。挑选阳性克隆进行菌落 PCR 验证,电泳检测结果见图 4。由图 4 可以看出 2、4、6、8 和 9 号都出现目的条带,送 2 号测序,由测序结果可以看出目的基因正确的插入到 pPIC9K 中。



图 1 目的基因克隆 PCR 电泳检测结果
Fig. 1 PCR assay of the Target gene

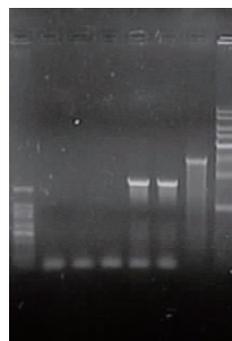


图 2 蓝白斑筛选阳性克隆 PCR 验证结果
Fig. 2 PCR assay of the positive clones

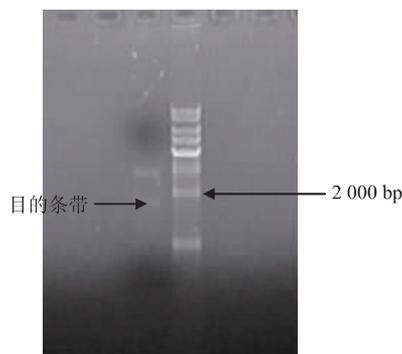


图 3 重组质粒 pMD18-T-GOD 的酶切鉴定
Fig. 3 Restriction pattern of recombinant pMD18-T-GOD

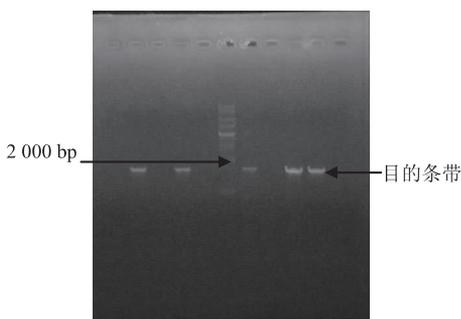


图4 重组质粒 pPIC9K-GOD 的 PCR 鉴定结果

Fig. 4 PCR assay of recombinant pPIC9K-GOD

2.3 毕赤酵母宿主菌转化和筛选

大量提取 2 号质粒做电转化, 从 MM 平板、G418 梯度平板筛选获得了 20 个阳性克隆子。再用显色平板筛选所获得的阳性克隆, 见图 5。从图 5 可以看出, A、B、C 三个菌落的显色圈大小不同, 经测定 A 酶活性最高, B 酶活性较低, C 基本没有酶活, 说明该方法可以用来进行转化株的有效筛选。

对筛选得到的 20 株菌进行摇瓶复筛, 其中菌株 GOD2-14 经诱导获得了最高的酶活性 (0.128 U/mL)。将菌株分别接种在 MM 平板和 MD 平板上培养, 结果显示转化子在 MM 平板上和 MD 平板上长势相近, 其表型为 HIS⁺MUT⁺。

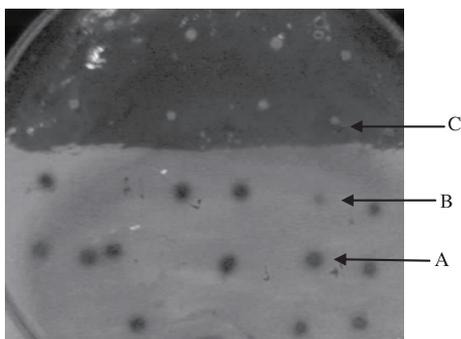


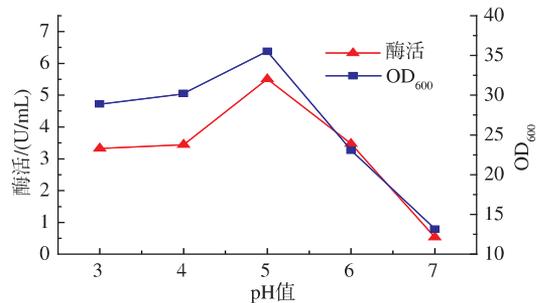
图5 重组酵母显色平板鉴定结果

Fig. 5 Plat assay for GOD production

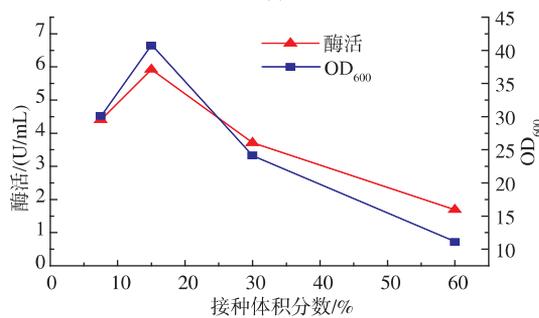
2.4 发酵条件优化

对 pH、接种量、甲醇浓度、装液量、培养温度和诱导时间等六个因素进行了优化。结果表明, 当 pH 设置为 5 时, 重组酵母的葡萄糖氧化酶表达活力比在 4 和 6 时高, 到培养第七天时, 其表达的酶活性比 pH 为 4 和 6 分别高 34% 和 33% (图 6a)。这有可能是葡萄糖氧化酶在碱性条件下不稳定的原因造成的^[18]。不同接种体积分数的影响结果见图 6b, 接种体积分数为 50% 时, 其发酵液酶活性最高; 甲醇

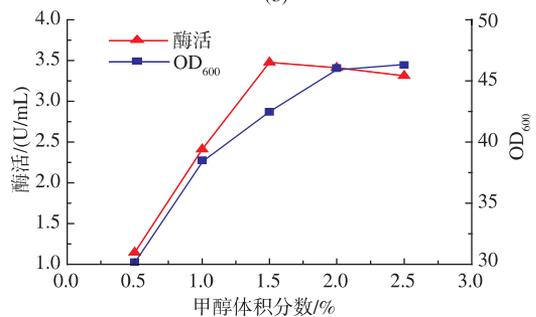
浓度对产酶也有很大影响, 由图 6c 可以看出随着甲醇体积分数的增加, 酶活性和菌浓度显著增加, 当其体积分数达到 2% 的时候酶活性不再提高, 反而有下降的趋势, 这说明甲醇体积分数过高时会抑制重组菌产酶; 随着装液量的增加细胞浓度不断降低, 酶活性也随之降低, 见图 6d; 装液量直接影响溶氧, 装液量较高, 溶氧不足, 细胞浓度较低, 酶活性也随之降低, 但是由于装液量太小时不利于后期的取样和甲醇的添加, 所以选取 25 mL 的装液量做为最佳值; 不同温度下诱导产酶发现, 22 °C 下产酶较高, 随着温度的升高产酶量下降, 这说明低温有利于菌株产酶, 图 6e; 随着诱导时间的增加, 菌体密度持续增加, 酶活性也不断的增加, 两者存在正相关性, 在第 7 天时酶活性达到最高, 为 14.23 U/mL, 见图 6f。通过发酵条件的优化, 获得了最佳发酵条件为 200 r/min、pH 5、接种体积分数 50%、装液量为 20 mL, 25 °C 下经 1.5% 甲醇诱导 7~8 d, 获得的最高酶活为 25 U/mL, 是优化前的 73 倍。



(a)



(b)



(c)

3 结 语

从一株高产葡萄糖氧化酶的黑曲霉 PCTC 中获得了葡萄糖氧化酶基因的完整序列,并进行了克隆和表达的研究,获得了一株具有较强表达能力的重组菌。

本研究对通用的丝状真菌基因组 DNA 提取方法进行了改进,在加入氯化苄破壁前,用灭菌玻璃珠对发酵液进行预处理,获得了黑曲霉基因组 DNA。该方法相对于液氮和溶菌酶的前处理方法,操作简单,经济安全而且能满足后续试验要求,因此更加适用于丝状真菌基因组 DNA 的提取。重组菌能够在以甲醇为唯一碳源的培养基上生长并在其诱导下高效表达葡萄糖氧化酶基因,以 1.5% 的甲醇诱导 7~8 d,其酶活性达到 20~25 U/mL。周亚凤^[17]等利用 pPIC9 质粒成功将来源于黑曲霉的葡萄糖氧化酶基因在毕赤酵母 GS115 中表达,获得 30~40 U/mL 的酶活;Yao Guo^[14]等利用 pPIC α A 质粒将来源于黑曲霉的葡萄糖氧化酶基因在毕赤酵母 SMD1168 中表达,获得 40 U/mL 的酶活性。一般认为不同的表达系统和表达宿主对外源基因的表达会产生很大的影响;当外源蛋白质在宿主中表达时,常常由于密码子偏好性不同导致产量低甚至不表达;表达菌株的甲醇利用表型与表达盒的染色体整合位点和方式也会影响外源基因的表达。因此,通过筛选高表达菌株、密码子优化、选用不同的线性化位点、利用不同的表达载体和宿主菌以及信号肽优化会进一步提高重组菌的 GOD 表达水平。

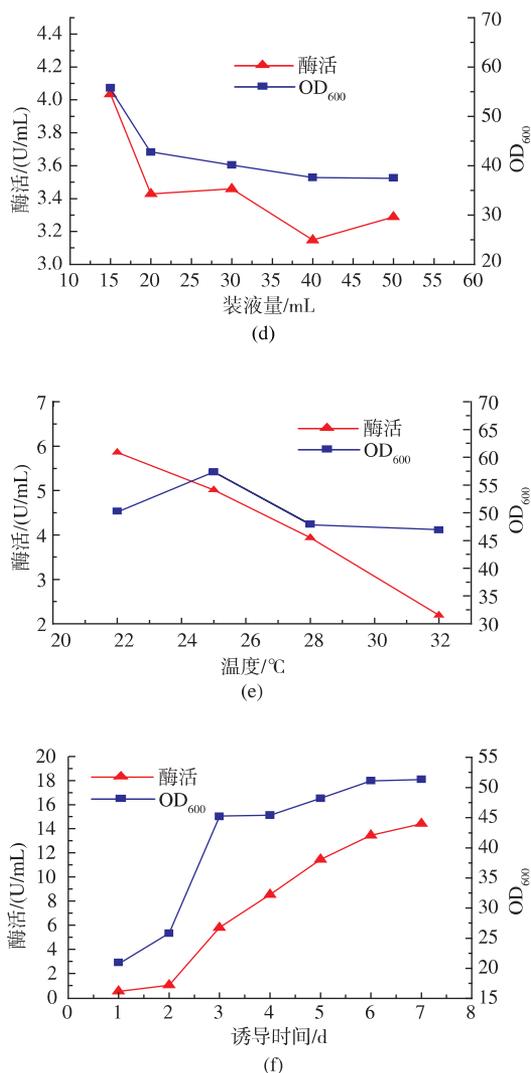


图 6 重组菌发酵条件优化

Fig. 6 Optimization of fermentation conditions

参考文献:

- [1] Ramzan I M, Mehmood T. Enhanced production of glucose oxidase from uvmutant of *Aspergillus niger* [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2009, 8(2): 288-290.
- [2] 王树庆, 刘秀华. 葡萄糖氧化酶及其在食品工业上的应用[J]. *食品科技*, 2001, 3: 30-31.
WANG Shu-qing, LIU Xiu-hua. Glucose oxidase and its application on food industry [J]. *Food Science and Technology*, 2001, 3: 30-31. (in Chinese)
- [3] 聂君, 杨哪, 金征宇, 等. 不同加工处理方式对蛋清致敏的影响[J]. *食品与生物技术学报*, 2011, 30(7): 528-534.
NIE Jun, YANG Na, JIN Zheng-yu, et al. Influence of different processings on egg white's antigenicity [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2011, 30(7): 528-534. (in Chinese)
- [4] Wong C M, Wong K H, Chen X D. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 78(6): 927-938.
- [5] 谌斌, 唐雪明, 沈微, 等. 粗糙脉孢菌漆酶基因的克隆及在毕赤酵母中的初步表达[J]. *食品与生物技术学报*, 2006, 25(4): 43-47.

- CHENG Bin,TANG Xue-ming,SHEN Wei,et al. Cloning of a laccase gene from *Neurospora crassa* and it's preliminary expression in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of food Science and Biotechnology**,2006,25(4):43-47.(in Chinese)
- [6] Chang G,Tatsu Y,Goto T,et al. Glucose concentration determination based on silica sol-gel encapsulated glucose oxidase optical biosensor arrays[J]. **Talanta**,2010,83(1):61-65.
- [7] Tang Q B,Hu Y H,Kang L,et al. Characterization of glucose-induced glucose oxidase gene and protein expression in *Helicoverpa armigera* Larvae[J]. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**,2012,79(2):104-119.
- [8] Sandip B,Bankar,Mahesh V,et al. Glucose oxidase-an overview[J]. **Biotechnology Advances**,2009,27(4):89-501.
- [9] Crognale S,Pulci V,Brozzi V,et al. Expression of *Penicillium variable* P16 glucose oxidase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme[J]. **Enzyme and Microbial Technology**,2006,39(6):1230-1235.
- [10] Whittington H,Kerry-Williams S,Bidgood K,et al. Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *A. niger*[J]. **Curr Gene**,1990,18(6):531-536.
- [11] 母敬郁,王娇,杨纯中,等. 瑞氏木霉表达黑曲霉葡萄糖氧化酶[J]. 生物工程学报,2006,1:82-85.
MU Jing-yu,WANG Qiao,YANG Chun-zhong,et al. Recombinant *Aspergillus niger* glucose oxidase expression in *Trichoderma reesei*[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**,2006,1:82-85.(in Chinese)
- [12] 安玉麟,孙瑞芬,张鹤龄,等. 黑曲霉葡萄糖氧化酶基因的原核表达及其蛋白产物的 Western-blot 分析 [J]. 华北农学报,2009,4:84-87.
AN Yu-lin,SUN Rui-fen,ZHANG He-ling,et al. Prokaryotic expression and western-blot analysis of glucose oxidase gene from *Aspergillus niger*[J]. 2009,4:84-87.(in Chinese)
- [13] Yao G,Feng X L,Hai Z Z,et al. Cloning and heterologous expression of glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* Z-25 in *Pichia pastoris*[J]. **Appl Biochem Biotechnol**,2009,162(2):498-502.
- [14] 齐连权,陈薇,来大志,等. 毕赤酵母表达系统研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2002,6:45-47.
QI Lian-quan,CHENG Wei,LAI Da-zhi,et al. Advances in *Pichia* expression system [J]. **Journal of Chinese Biotechnology**,2002,6:45-47.(in Chinese)
- [15] 周建芹,陈韶华,王剑文. 测定葡萄糖氧化酶活力的一种简便方法[J]. 实验技术与管理,2008,25(12):58-60.
ZHOU Jian-qin,CHEN Shao-hua,WANG Jian-wen. A simple and convenient method to determine the activity of glucose oxidase[J]. **Experimental Technology and Management**,2008,25(12):58-60.(in Chinese)
- [16] 周亚凤,张先恩,刘虹,等. 黑曲霉葡萄糖氧化酶基因的克隆及其在酵母中的高效表达[J]. 生物工程学报. 2001,17(4):400-405.
ZHOU Ya-feng,ZHANG Xian-en,LIU Hong,et al. Cloning and expression of *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in methylotrophic yeast[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**,2001,17(4):400-405. (in Chinese)