

腐生葡萄球菌 M36 耐有机溶剂脂肪酶基因的克隆与原核表达

汤彦翀, 卢亚萍, 吕凤霞, 别小妹, 郭瑶, 陆兆新

南京农业大学食品科学与技术学院 酶工程研究室, 南京 210095

摘要: 脂肪酶是重要的工业用酶, 在食品加工、生物柴油的合成等领域具有广泛的应用。但是在应用中有有机溶剂对脂肪酶具有一定的毒性, 因此获得耐有机溶剂的脂肪酶基因并实现高效表达是脂肪酶规模化应用的前提。本研究应用 PCR 技术首次从耐有机溶剂脂肪酶产生菌腐生葡萄球菌 M36 基因组 DNA 中扩增得到脂肪酶 III 基因 *lip3* (GenBank Accession No. FJ979867), 其编码区长度为 741 bp, 编码 247 个氨基酸, 推测蛋白分子量大小为 31.6 kD。它与腐生葡萄球菌 *lip3* 推测的基因 (GenBank Accession No. AP008934) 只有 83% 的同源性。将该基因与大肠杆菌表达载体 pET-DsbA 连接, 转化大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 获得重组菌株 BL21(DE3)/pET-DsbA-*lip3*, 在 pH 8、25 °C 条件下, OD_{600} 为 1.0 时用 0.4 mmol/L IPTG 诱导 12 h 酶活达到 25.8 U/mL。重组酶在甲醇、正己烷、异辛烷、正庚烷等有机溶剂中具有较好的耐性。*lip3* 基因的克隆及在大肠杆菌中有效表达的研究为进一步进行基因工程改造和脂肪酶应用奠定了基础。

关键词: 腐生葡萄球菌, *lip3* 基因, 耐有机溶剂脂肪酶, 基因克隆, 序列分析, 原核表达

Cloning and expression of organic solvent tolerant lipase gene from *Staphylococcus saprophyticus* M36

Yanchong Tang, Yaping Lu, Fengxia Lü, Xiaomei Bie, Yao Guo, and Zhaoxin Lu

Enzyme Engineering Laboratory, College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: Lipases are important biocatalysts that are widely used in food processing and bio-diesel production. However, organic solvents could inactivate some lipases during applications. Therefore, the efficient cloning and expression of the organic solvent-tolerant lipase is important to its application. In this work, we first found out an organic solvent-tolerant lipase from *Staphylococcus saprophyticus* M36 and amplified the 741 bp Lipase gene *lip3* (GenBank Accession No. FJ979867), by PCR, which encoded a 31.6 kD polypeptide of 247 amino acid residues. But the lipase shared 83% identity with tentative *lip3* gene of *Staphylococcus saprophyticus* (GenBank Accession No. AP008934). We connected the gene with expression vector pET-DsbA, transformed it into *Escherichia coli* BL21 (DE3), and obtained the recombinant pET-DsbA-*lip3*. With the induction by 0.4 mmol/L of isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside at pH 8.0, OD_{600} 1.0, 25°C for 12 h, the lipase activity reached up to 25.8 U/mL. The lipase expressed was stable in the presence of methanol, n-hexane, and isooctane, n-heptane.

Keywords: *Staphylococcus saprophyticus*, *lip3* gene, organic solvent tolerant lipase, gene cloning, sequence analysis, prokaryotic

Received: September 16, 2009; **Accepted:** November 10, 2009

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2008AA10Z309), Natural Foundation of Jiangsu (No. BK2007160), High Technology Program of Jiangsu (No. BE2008308).

Corresponding author: Zhaoxin Lu. Tel: +86-25-8439-5572; Fax: +86-25-8439-5583; E-mail: fmb@njau.edu.cn

国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2008AA10Z309), 江苏省自然科学基金(No. BK2007160), 江苏省高技术计划(No. BE2008308)资助。

expression

脂肪酶 (Triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) 是一类特殊的酯键水解酶, 分解脂肪, 广泛存在于动物组织、植物种子和微生物体中, 催化天然底物油脂(甘油三酯)水解^[1]。脂肪酶应用于各种工业中, 如食品工业、乳制品工业、药学工业、清洁剂工业、纺织工业、生物柴油、化妆品、材料合成和环境工业等^[2]。

研究发现以甲醇等短链醇为代表的有机溶剂对脂肪酶有一定毒性, 使脂肪酶的使用寿命缩短、合成生物柴油的成本变高。耐受有机溶剂的脂肪酶, 特别是耐受甲醇和乙醇的脂肪酶能明显提高生物柴油的产量^[3], 所以寻找耐受有机溶剂的脂肪酶成为酶工程研究工作者的一个重要研究课题。至今发现的产耐有机溶剂脂肪酶的细菌很少, 多数是从土壤或海洋中分离出的。本实验室从江苏连云港海洋中分离出一种新型的耐受有机溶剂的腐生葡萄球菌 *Staphylococcus saprophyticus* M36, 其发酵上清中的脂肪酶对 25%(V/V) 的二甲苯、苯酚、甲苯和正己烷有较好的耐性, 它能在苯或甲苯浓度高达 40%(V/V) 的培养基中生长^[4]。

从以往脂肪酶的获得途径看, 通过微生物发酵获得脂肪酶是最常用的方法。随着分子生物学技术的发展, 现在可以利用基因工程的手段得到高活性的工业用酶, 国内外已成功克隆了包括细菌、真菌在内的众多微生物脂肪酶基因并在 *Escherichia coli*、*Bacillus subtilis*、*S. carnosus* 或 *Pichia pastoris* 等宿主菌中表达^[5-8], 其中 Chin 等从基因组文库获得了 *Bacillus sphaericus* 205y 脂肪酶基因, 并将该基因在 *E. coli* 中获得了表达, 得到的粗酶 37°C 下在 25% (V/V) 的正己烷中处理 30 min 后, 活性增加 10%^[9]。许多 *Staphylococcus* 属的脂肪酶基因序列也已经被测定, 如 *Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus hyicus*, 但目前尚未见腐生葡萄球菌耐有机溶剂脂肪酶基因的报道。

现已从腐生葡萄球菌全基因组序列上推测出 5 个脂肪酶同工酶基因, 本研究通过对腐生葡萄球菌 M36 脂肪酶基因的克隆、构建原核表达载体, 试图找到耐有机溶剂的脂肪酶基因, 为下一步进行工业

应用、降低生物柴油的生产成本奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒

腐生葡萄球菌 *S. saprophyticus* M36 为本实验室从江苏连云港海洋中分离的菌株。大肠杆菌 DH5 α 、BL21 (DE3) 为本实验室保存。质粒 pET-DsbA 载体购自深圳市勤宝升生物技术开发公司, 大肠杆菌 pMD19-T simple 载体购自 TAKARA 公司。

1.1.2 工具酶与试剂

限制性内切酶 *Nhe*、*Bgl*、去磷酸化酶、RNAase、蛋白酶 K、氨苄青霉素、琼脂、罗丹明 B、*Taq* DNA 聚合酶和 *pfu Taq* DNA 聚合酶购自上海生工生物工程公司。X-gal、IPTG、T4 DNA 连接试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、购自大连宝生物公司; 酵母提取物、胰蛋白胨等购自英国 Oxoid 公司。acrylamide、N,N'-methylenebisacrylamide、N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine TEMED、过硫酸铵(AP)、考马斯亮兰 G250 购自美国 Sigma 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 脂肪酶基因 *lip3* 的克隆

参考 GenBank 中腐生葡萄球菌脂肪酶基因 *lipase* 的序列(GenBank Accession No. AP008934), 设计腐生葡萄球菌脂肪酶基因引物: 上游引物 *lip3f*: 5'-GCGAGATCTATGCAGATTAACTTCCAGAACCATT-3'; 下游引物 *lip3r*: 5'-CTAGCTAGCTAGTTAATTTCGACCAATCTAATGATTCT-3'。上游引物阴影碱基为 *Nhe* 酶切位点, 下游引物阴影碱基为 *Bgl* 酶切位点, 由上海 Invitrogen 生物公司合成。

PCR 条件: 95°C 5 min; 94°C 40 s, 45°C 40 s, 72°C 1 min, 35 个循环; 72°C 延伸 10 min。PCR 产物通过 TA 克隆方式连入 pMD19-Tsimple 载体构建质粒 pMD-Lip3, 插入片段由金思特公司进行序列分析。

1.2.2 重组质粒的构建

测序正确的质粒 pMD-Lip3 用 *Nhe*/*Bgl* 双酶切, 酶切片段纯化后与 *Nhe*/*Bam*H 双酶切的大肠杆菌表达载体 pET-DsbA 连接, 获得重组质粒

pET-DsbA-lip3, 转化大肠杆菌 DH5α, 通过酶切鉴定筛选出阳性克隆。

1.2.3 脂肪酶的诱导表达及表达条件优化

含有重组质粒 pET-DsbA-lip3 和空质粒 pET-DsbA 的大肠杆菌分别在 37°C 振荡培养过夜, 以 2.5%接种量转接于 100 mL 含 Amp 和葡萄糖的 LB 培养基中, 35°C、180 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 左右, 加入 IPTG 终浓度为 0.2 mmol/mL, 30°C 诱导培养 2 h, 离心收集菌体。菌体中加入 10 mL 含有 NaCl 和 TritonX-100 的 PBS(pH 7.4)混匀, 冰浴超声波破碎处理, 破碎后的上清液即为重组酶液。

用不同 pH 的培养基、诱导温度、诱导时机以及不同浓度的 IPTG、诱导时间进行诱导表达, 寻找最佳表达条件。

1.2.4 表达产物的鉴定

取破碎上清液用罗丹明 B 平板检测活性, SDS-PAGE 电泳和坚牢兰 RR 盐活性染色法^[10]检测目的蛋白分子量和表达水平。采用对硝基苯丁酯法测定酶活, 酶活单位定义为: 以每分钟产生 1 μmol 对硝基苯酚所需的酶量定义为 1 个酶活单位(U)^[4]。

1.2.5 重组脂肪酶的纯化及融合蛋白配体的酶切

将重组酶液吸附于镍柱上, 用 20 mmol/L 咪唑洗去杂蛋白, 再用高浓度咪唑洗脱, 得到电泳纯的重组脂肪酶, SDS-PAGE 电泳检测。

用 10 倍介质体积酶切液 (20 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 2.5% CaCl₂, pH 7.4)平衡吸附有重组酶液的镍柱, 留 2 mL 酶切液, 加入凝血酶 50~60 U, 混匀; 22°C 酶切 8 h。

1.2.6 pH 和温度对重组脂肪酶酶活的影响

将酶液分别加在不同 pH(pH 5.0~10.0)的缓冲液中, 测定脂肪酶活力, 以最高酶活为相对酶活 100%。酶液在不同 pH 的缓冲液中 25°C 保温 6 h, 测定残余酶活, 未处理酶液的酶活力为 100%。

在不同的温度(15°C~40°C)下测定酶活, 以最高酶活为相对酶活 100%。将酶液在不同的温度下(15°C~40°C)分别保温 2 h, 迅速冷却, 测定残余活力, 以未保温酶液的酶活力为 100%。

1.2.7 耐有机溶剂特性检测

酶液中加入 25%(V/V)不同极性常数(logP)的有

机溶剂, 37°C, 200 r/min, 1 h 后测定残余脂肪酶活力。

2 结果

2.1 脂肪酶基因 lip3 的克隆及序列分析

以 lip3f 和 lip3r 为引物, 从 *S. saprophyticus* M36 基因组 DNA 中扩增得到 741 bp 的 DNA 片段 lip3(GenBank Accession No. FJ979867)。

与 GenBank 数据库中推测的脂肪酶序列 AP008934 比较, 有 115 个碱基的差异, 31 个氨基酸的差异, 同源性只有 83%。用 Signal P 服务器对氨基酸序列进行分析, 未发现信号肽序列。

研究表明, 尽管不同来源的脂肪酶具有不同的氨基酸组成, 但是其空间结构却非常相似, 其催化中心拥有相似或相同的特征区 GX SXG(X 代表任意氨基酸残基)。绝大多数脂肪酶的活性中心都由 Ser 和 His 参与组成, 并与另一种氨基酸残基一起构成脂肪酶催化活性中心的三元组^[11]。通过同源性比对可知, 脂肪酶 lip3 一级结构上也含有保守 motif Gly-X-Ser-X-Gly(91~95 位), 并推测其余两个活性中心为 190 位的 Asp 和 220 位的 His, 共同组成三连体催化中心(triad)Ser⁹³-Asp¹⁹⁰-His²²⁰^[12](图 1)。此外, lip3 的氨基酸序列中没有潜在的 N-糖基化位点。

```

1  ATG CAGATTAACCTCCAGAACCTCTTTTGAAGAAGGTAATCGCGCTGTATTACTTTTACACGGTTTTTACT
1  M Q I K L P E P F F F F E E G N R A V L L L L E G F T
76  GGAATTCCTCAGATGTAAGACAATTAGGGCGATTCTTACAAAAAAGGGTTACACTTCTTATCGGCCACAATAT
26  G N S S D V R Q L G R F L Q K K G Y T S Y A P Q Y
151  GATGGGCTGCAGCACCCAGAAAGATACTCCAATCTAGTCCATTTGCATGGTATAAAGATGCGATAGATGGA
51  D G H A A P P P E E I L G S S P F A W Y K D A I D G
226  TATGAACTCCTTGTGGATAAAGGATATGATGAAATTTGGTTCGGCGCTTATCACTCGGTGGTGTATGCACTG
76  Y E F L V D K G Y D E I V V A G L S L G G C Y A L
301  AAAATAAGCTTAGATAGAGACGTAAGGGTATTATAACAATGTGTTACACATATGATGATTAAGACTGAAGGGGCA
101  K I S L D R D V K G I I T N C S P N H I K T E G A
376  ATGTTGATGGTGTCTTAACGTATGCACGTAATTTTAAAAAATCGAAGGCAAGATGAACAACCAATAGAAAAA
126  M F D G V L T Y A R N F K K Y E G K D E T T I E K
451  GAAATGGATGAGTTTCATCCACAGATACITTAAGAAGATTGCAAGGTCAAATTAAGATATACGTAATCAAGTA
151  E H D E F H P T D T L K D L Q G Q I Q S I R N Q V
526  GATGAGGTTTATGGATCCGCTACTGGTTATCCAAAGGTAGCAAGATCAATGATTAAATACAGATCTGCTAACATT
176  D E V M D P L L V I Q G E Q Q M I N T D S A N I
601  ATATACAATGAAGGACTCAGATGATAAAGAGATTAATGGTATCGCAATTCAGGACATGTCATTACAATTGAT
201  I Y N E S D S D D K E I K W Y A N S G V I T I D
676  AAAGAAAAAGAACAAAGTTTTTGAAGATATATACCAATCTTGAAGATCAATGATTGGTTCGAATTA
226  K E K E Q V F E D I Y Q F L E S L D W S N *
    
```

图 1 lip3 全基因序列和相应的氨基酸序列

Fig. 1 Complete sequence of lip3 and corresponding amino acid sequence. The dashed area: initiation codon; : catalytic center.

2.2 重组表达质粒的构建和重组子的鉴定

将经过测序验证的脂肪酶基因 *lip3* 以正确的阅读框克隆到原核表达载体 pET-DsbA 上, 获得重组质粒 pET-DsbA-*lip3*(图 2), 转化 *E. coli* BL21 (DE3), 挑选转化子, 提取质粒 DNA, 经 *Nhe* I /*Bgl* II 双酶切得到与 pET-DsbA 以及目的基因 *lip3* 大小相符的片段(图 3), 说明脂肪酶基因 *lip3* 已正确插入到原核表达载体 pET-DsbA 上。

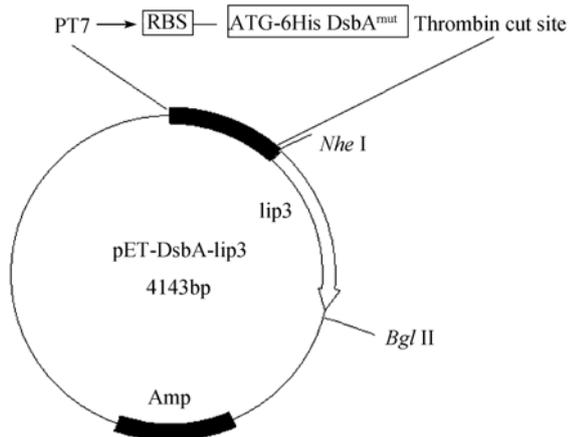


图 2 重组质粒 pET-DsbA-*lip3* 的物理图谱
Fig. 2 Physical map of recombinant plasmid pET-DsbA-*lip3*.

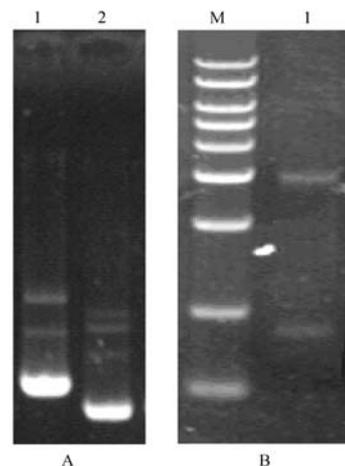


图 3 pET-DsbA-*lip3* 质粒的构建及酶切鉴定
Fig. 3 Construction and enzyme digestion of pET-DsbA-*lip3*. (A)1: pET-DsbA-*lip3*; 2: pET-DsbA. (B) M: DNA marker; 1: the digestion of recombinant plasmid.

2.3 脂肪酶基因 *lip3* 的诱导表达条件优化

重组质粒 pET-DsbA-*lip3* 转化 *E. coli* BL21(DE3), 筛选出的阳性克隆在 IPTG 诱导下表达。表达条件优化结果如图 4 所示, 在 pH 8 培养基中, OD_{600} 为 1.0 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L, 25°C 诱导培养 12 h, 该脂肪酶的酶活最高达到 25.8 U/mL, 较原始酶活提高了 5 倍。

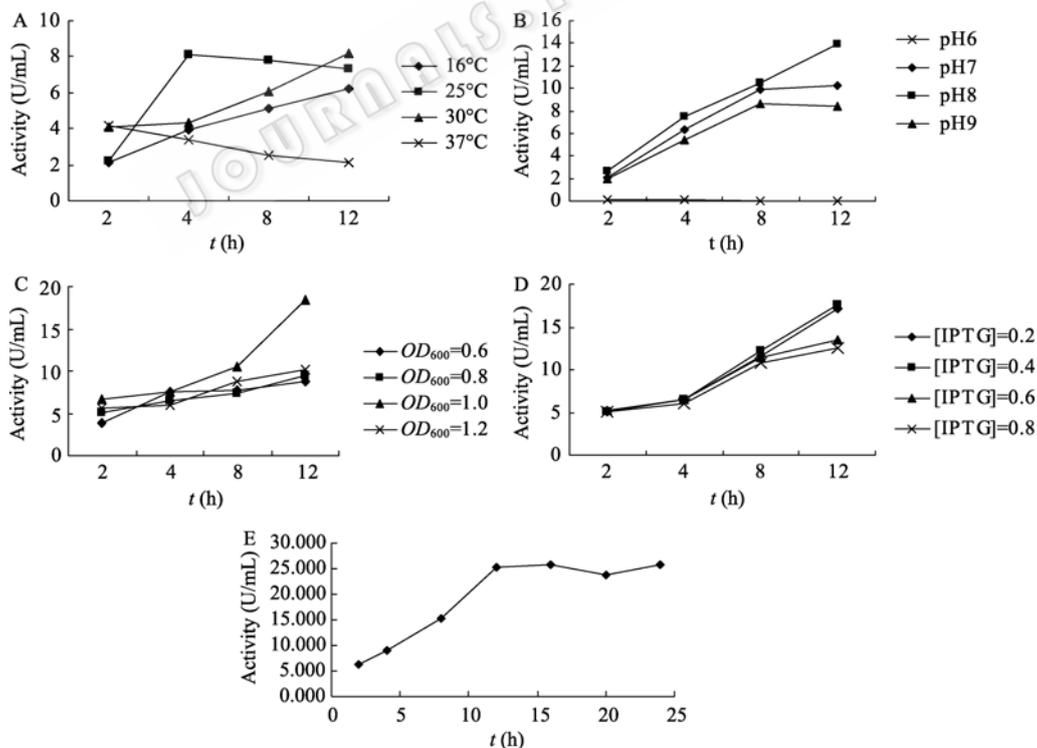


图 4 不同温度(A)、培养基 pH(B)、诱导时机(C)、诱导剂浓度(D)和诱导时间(E)对 *lip3* 产酶的影响
Fig. 4 Effect of different temperature(A), medium pH value(B), induction opportunity(C), inoculation amount(D), and induction time(E) on the *lip3* activity expression in recombinant *E. coli* cells.

2.4 lip3 基因诱导表达产物的鉴定

含有重组质粒 pET-DsbA-lip3 和空白质粒 pET-DsbA 的大肠杆菌经破碎, 上清液点样于罗丹明 B 平板, 重组酶液产生了荧光圈(图 5)。

10% SDS-PAGE 电泳结果显示, 脂肪酶基因 lip3 的表达产物在大约 58 kD 处有明显的特异性表达蛋白条带; 而经诱导、含有空质粒 pET-DsbA 的对照菌在同一位置没有相应的条带(图 6A)。同时, 活性 PAGE 电泳后用坚牢兰 RR 盐进行活性染色, 能够在目的蛋白区域看到明显的褐色条带(图 6B)。以上结果表明脂肪酶基因 lip3 在大肠杆菌中得到了有效表达, 软件分析表达量达到 80%以上。发酵上清以及对对照菌处理液未检测到酶活, 表明脂肪酶基因 lip3 的表达产物在胞内具有正常的生物学活性。

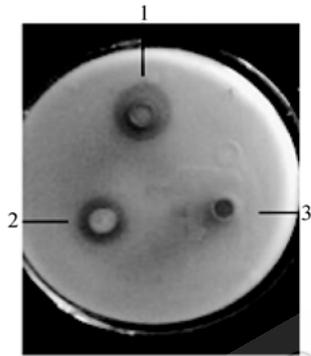


图 5 罗丹明 B 平板检测重组酶的活性
Fig. 5 Recombinase activity detected by Rhodamine B plate. 1, 2: pET-DsbA-lip3 after induction; 3: pET-DsbA after induction.

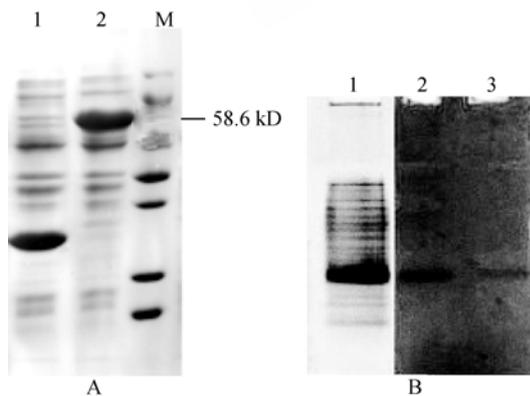


图 6 lip3 表达产物的 SDS-PAGE 及 PAGE 电泳活性染色
Fig. 6 SDS-PAGE analysis and activity stain of lip3 gene expressed in *E. coli* BL21 (DE3). (A) 1: the crude extracts cell carrying pET-DsbA; 2: the supernatant of the disrupted cells carrying pET-DsbA-lip3, indicated by arrowhead; M: molecular mass marker. (B) 1: stained by Coomassie brilliant blue R250; 2, 3: activity stain.

2.5 重组脂肪酶的纯化及融合蛋白配体的酶切

重组脂肪酶经过镍柱纯化, 得到电泳纯的目的蛋白(58.6 kD), 切除融合蛋白配体后得到正确大小(31.6 kD)的目的蛋白 pET-lip3(图 7)。融合蛋白配体的酶切为进一步研究重组纯酶的酶学性质奠定了基础。

2.6 pH 和温度对重组脂肪酶酶活的影响

对纯化得到的重组脂肪酶 pET-lip3 酶学性质进行考察。结果(图 8)表明, pH 显著影响了重组蛋白的脂肪酶活性, 最适反应 pH 为 8.0, 并且在其最适反应 pH 稳定性最好, 当 pH<7.0 和 pH>9.0 时, 酶活迅速降低。

温度对重组脂肪酶活力的影响如图 9。pET-lip3 的最适反应温度为 25°C, 在 35 以下时, 其相对酶活均高于 60%。温度对脂肪酶的稳定性有类似的影

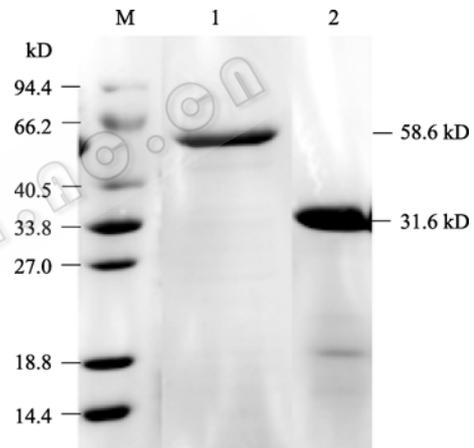


图 7 工程菌表达产物的纯化及融合蛋白配体的酶切
Fig. 7 SDS-PAGE analysis of recombinant lip3 purified by NiTrap chelating affinity chromatography and the digestion of ligand by thrombin. M: protein marker; 1: purified pET-DsbA-lip3; 2: pET-lip3.

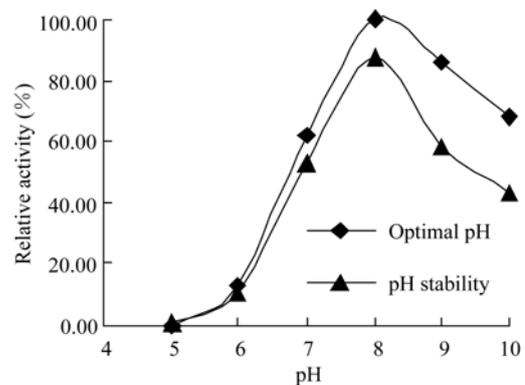


图 8 重组脂肪酶的最适反应 pH 及 pH 稳定性
Fig. 8 Optimal pH and pH stability of recombinase.

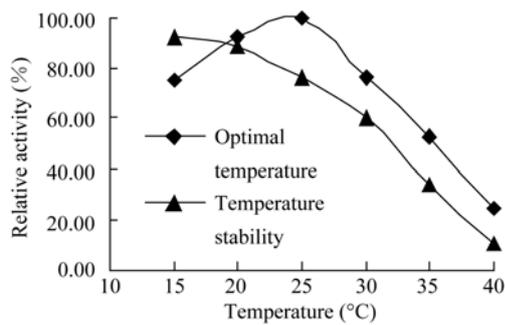


图9 重组脂肪酶的最适反应温度及温度稳定性

Fig. 9 Optimal temperature and temperature stability of recombinase.

响, 40°C 以下脂肪酶活力损失不大, 可保持原有活力的 60%以上。但当温度高于 40°C, 两脂肪酶活力下降明显。

2.7 重组脂肪酶有机溶剂耐性的检测

重组脂肪酶在不同有机溶剂中的耐性如表 1 所示, 试验中选择了从小到大不同 LogP 值的有机溶剂。总的来说, 有机溶剂 LogP 值越大, 对酶的影响越小, 耐性越好。重组酶在 25%(V/V)甲醇、正己烷、正庚烷和异辛烷中仍旧有较好的耐性。

表 1 pET-lip3 与野生菌有机溶剂耐性的比较

Table 1 Comparison of tolerance in organic solvent between pET-lip3 and *S. saprophyticus* lipases

Organic solvent	LogP	Relative activity (%) at concentration of 25% organic solvent	
		<i>S. saprophyticus</i> lipases	pET-lip3
Control	-	100	100
Methanol	-0.76	75.64	75.4
Acetonitriles	-0.33	22.94	0.74
Ethanol	-0.24	66.24	0
Isopropanol	0.14	83.12	0.72
Isoamylol	1.14	40.37	2.23
t-Pentanol	1.4	17.59	1.77
Toluene	2.5	35.76	30.9
n-Hexane	3.1	85.34	72.69
n-Heptane	4.0	71.05	69.61
Isooctane	4.7	77.68	72.82

3 讨论

本研究以产耐有机溶剂脂肪酶的腐生葡萄球菌 M36 为实验材料, 克隆了其脂肪酶基因 *lip3* (GenBank Accession No. FJ979867)。该基因含有 741 个碱基, 编码 247 个氨基酸。脂肪酶 *lip3* 一级结构

上含有保守 motif Gly-X-Ser-X-Gly(91~95 位), 并推测出其三连体催化中心 Ser⁹³-Asp¹⁹⁰-His²²⁰。通过构建大肠杆菌表达载体 pET-DsbA-lip3 实现了 *lip3* 在大肠杆菌中的有效表达, 经优化确定在 pH 8 培养基中, OD_{600} 为 1.0 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L, 25°C 诱导培养 12 h, 酶活最高达到 25.8 U/mL。

切除融合蛋白配体后, 重组酶最适反应 pH 为 8.0, 最适反应温度为 25°C, 在甲醇、正己烷、异辛烷和正庚烷等有机溶剂中有较好的耐性。但相比野生菌, 重组酶有机溶剂的耐受范围较窄, 首先可能是由于野生菌中有多个脂肪酶同工酶共同作用, 而 *lip3* 只控制其中一个脂肪酶, 表达出的产物耐性范围没有野生菌广; 其次有研究发现革兰氏阴性菌对有机溶剂的敏感性比革兰氏阳性菌强^[13], 因此大肠杆菌中表达出的重组酶比野生菌分泌出的脂肪酶对有机溶剂更敏感, 影响其酶活及耐受性等酶学性质。

现在普遍认为酶在有机溶剂中失活的原因是酶表面最关键的水分子被剥去或被有机溶剂代替^[14]。如果能弄清脂肪酶的有机溶剂耐受性和结构之间的关系, 那么就可能采取理性设计的方法来改善脂肪酶的有机溶剂耐受性。目前本实验室正在努力利用基因工程的手段对 *lip3* 进行定向进化, 同时将其在枯草芽孢杆菌中进行分泌型表达, 期望获得对有机溶剂耐受范围更广、耐受性更好的工程菌, 为工业应用奠定基础。

REFERENCES

- [1] Wu XZ, Wu MC. Review of studies on molecular biology of lipases. *J Food Sci Biotechnol*, 2002, **21**(1): 94-98. 郭显章, 郭敏辰. 脂肪酶分子生物学的研究进展. 食品与生物技术学报, 2002, **21**(1): 94-98.
- [2] Hasan F, Ali SA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol*, 2006, **39**: 235-251.
- [3] Kaieda M, Samukawa T, Kondo A, et al. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. *J Biosci Bioeng*, 2001, **91**: 12-15.
- [4] Fang YW, Lu ZX, Lv FX, et al. A newly isolated organic solvent tolerant *Staphylococcus saprophyticus* M36 produced organic solvent-stable lipase. *Curr Microbiol*,

- 2006, **53**: 510–515.
- [5] Maria CB, Louise L, David YT, *et al.* Polymorphism in the lipase genes of *Geotrichum candidum* strains. *Eur J Biochem*, 1994, **219**: 119–125.
- [6] Yuan C, Lin L, Shi QQ, *et al.* Overexpression of *Penicillium expansum* lipase gene in *Pichia pastoris*. *Chin J Biotech*, 2003, **19**(2): 231–235.
袁彩, 林琳, 施巧琴, 等. 扩展青霉碱性脂肪酶基因在毕赤酵母中的高效表达. *生物工程学报*, 2003, **19**(2): 231–235.
- [7] Wu MC, Zhu J, Huang WD, *et al.* Cloning and expression of the gene encoding alkaline lipase from *Penicillium cyclopium*. *J Food Sci Biotechnol*, 2002, **21**: 218–223.
邬敏辰, 朱吉, 黄伟达, 等. 圆弧青霉脂肪酶基因的克隆和表达. *食品与生物技术学报*, 2002, **21**: 218–223.
- [8] Karl EJ, Thorsten E. Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, **13**: 390–397.
- [9] Rahaman RNZRA, Chin JH, Salleh AB. Cloning and expression of a novel lipase gene from *Bacillus sphaericus* 205y. *Mol Genet Genomics*, 2003, **269**(2): 252–260.
- [10] Lu P, Liu J, Wu HM. A new method of easter isozyme dyeing. *J Inn Mong Norm Univ (Nat Sci Ed)*, 1999, **28**(4): 327–328.
卢萍, 刘军, 邬惠梅. 一种新的酯酶同工酶染色方法. *内蒙古师大学报(自然科学版)*, 1999, **28**(4): 327–328.
- [11] Jurgen P, Markus F, Marcus P, *et al.* Lipase engineering database understanding and exploiting sequence-structure-function relationships. *J Mol Catal B: Enzym*, 2000, **10**: 491–508.
- [12] Finn RD, Tate J, Mistry J, *et al.* The pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*, 2008, **36**: 281–288.
- [13] Vermne M, Sikkema J, Verheul A, *et al.* Toxicity of homologous series of organic solvents for the gram-positive bacteria *Arthrobacter* and *Nocardia* sp. and the gram-negative bacteria *Acinetobacter* and *Pseudomonas* sp.. *Biotechnol Bioeng*, 1993, **42**(6): 747–758.
- [14] Ogino H, Miyamoto K, Ishikawa H. Organic-solvent-tolerant bacterium which secretes organic-solvent-stable lipolytic enzyme. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**(10): 3884–3886.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

医学遗传学

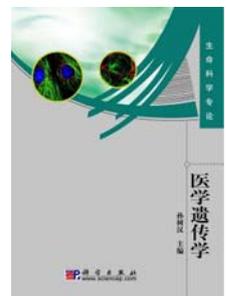
(生命科学专论)

孙树汉 主编

978-7-0-025768-0 ¥60.00 2009年9月出版

本书提炼了当前医学遗传学教学内容的精华,同时引入了医学遗传学理论和相关研究的最新进展。书中染色体病、单基因病、多基因遗传、线粒体遗传及免疫遗传等章节在保留基本原理要点的同时,力求做到深入浅出,从新的角度启发读者认识医学遗传学的基本问题;表观遗传学、疾病相关基因克隆策略及连锁、关联分析等章节注重对前沿领域的介绍;而遗传学理论在医学上的应用是本书意图强化的内容要点,这在临床遗传学和各种遗传病的介绍中都有体现。

本书主要用作医学院校各专业本科生教材,也可供生命科学研究人员或临床医生参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址:北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编:100717

联系人:李韶文(010-64000849) 周文字(010-64031535)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目