

文章编号 :1009 - 038X(2002)03 - 0218 - 06

圆弧青霉脂肪酶基因的克隆和表达

邬敏辰¹, 朱吉¹, 黄伟达², 孙崇荣²

(1. 江南大学医学系, 江苏 无锡 214063 ; 2. 复旦大学 生命科学学院, 上海 200433)

摘要 :圆弧青霉 PG37 总 RNA 甲醛变性电泳呈现真核生物所特有的 28S rRNA 和 18S rRNA 条带. 根据 PG37 所产碱性脂肪酶 (Lip PC) N 末端氨基酸残基序列和真核生物 mRNA 在 3' 端具有 poly(A) 等所提供的生物信息, 采用 RT-PCR 技术扩增了 Lip PC 成熟肽和 3' 非编码区的 cDNA 片段, 并将该 PCR 产物直接克隆至 pUCm-T 载体中. 序列分析表明, Lip PC 含有 258 个氨基酸残基, 其中保守的五肽序列为 Gly-His-Ser-Leu-Gly. 进一步采用 ClonTech 公司的 SmartTM PCR cDNA 文库构建试剂盒, 扩增、克隆和测定了自转录起始点至编码区的 cDNA 片段, 从而完成了 Lip PC 完整 cDNA 的分析测定. 最后将编码完整脂肪酶蛋白质的 cDNA 克隆至 pGEX-5X-3 表达载体中, SDS-PAGE 检测结果表明, 大肠杆菌 BL21 所表达的 GST-Lip PC 融合蛋白质分子质量约为 53 ku.

关键词 :圆弧青霉 PG37 碱性脂肪酶 克隆 表达

中图分类号 :Q93-3

文献标识码 :A

Cloning and Expression of the Gene Encoding Alkaline Lipase from *Penicillium cyclopium*

WU Min-chen¹, ZHU Ji¹, HUANG Wei-da², SUN Chong-rong²

(1. Department of Medicine, Southern Yangtze University, Wuxi 214063, China ; 2. School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract : Total RNA was isolated from *Penicillium cyclopium* PG37 with TRIzol reagent by one-step method, in which the 28S and 18S rRNA bands of fungi were characterized on formaldehyde denatured electrophoresis. With the information of N-terminal amino acid sequence of Lip PC and 3'-terminal poly(A) of eukaryotic mRNA, the mature peptide encoding region and 3' non-encoding one of Lip PC cDNA from PG37 were amplified by RT-PCR, and PCR products were cloned into the vector pUCm-T. Sequence analysis showed that the mature protein of Lip PC was composed of 258 amino acids, in which a well-conserved -Gly-His-Ser-Leu-Gly- sequence was included. Amplification, cloning and sequencing of cDNA fragment from the transcription start point to Lip PC encoding region were carried out with SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit obtained from ClonTech. From above two steps of PCR, an entire Lip PC cDNA sequence from PG37 was determined and analyzed. The cDNA encoding entire Lip PC mature peptide was cloned into expression plasmid pGEX-5X-3 and expressed in *E. coli* BL21 with IPTG induction. SDS-PAGE analysis of the gene product of pGEX-Lip PC in

收稿日期 2001 - 11 - 18 ; 修订日期 2002 - 04 - 03.

基金项目 国家“九五”科技攻关项目 (96-C03-02-01) 资助课题.

作者简介 邬敏辰 (1962 -), 男, 江苏无锡人, 理学博士, 高级工程师.

E. coli showed that the molecular mass of the fusion protein was about 53 ku.

Key words: *Penicillium cyclopium* PG37; alkaline lipase; cloning; expression

脂肪酶(Lipase EC 3.1.1.3., Triacylglycerol acylhydrolase)是分解三脂酰甘油的水解酶类。1988年,Novo Industrial A/B公司以基因重组的方法将绵毛状腐质菌(*Humicola lanuginosa*)中的脂肪酶基因克隆到 *Aspergillus oryzae* 中,得到了高效表达,首次向市场推出商品化的碱性脂肪酶 Liporase,并成功地将其应用于洗涤剂行业^[1]。国内江南大学对微生物碱性脂肪酶的研究已有近20年的历史,圆弧青霉 PG37 菌株产碱性脂肪酶能力处于国内外领先地位,但研究主要致力于产酶微生物的常规诱变育种^[2]、产酶发酵工艺条件优化^[3,4]、酶的分离纯化^[5,6]、酶学性质^[7]和工业化应用等方面。本文报道了圆弧青霉碱性脂肪酶 cDNA 的克隆和表达,在测定了 Lip PC N 末端氨基酸残基序列的基础上,采用 RT-PCR 扩增和克隆了相关的基因片段,通过拼接获得了 Lip PC 完整的 cDNA 核苷酸序列,推导出了包括信号肽在内的完整的脂肪酶一级结构。与最接近的 *H. lanuginosa* 脂肪酶仅有 25.6% 的同源性,表明作者所克隆的 Lip PC cDNA 是一种新的脂肪酶基因(GenBank 登录号 AF274320)。有关圆弧青霉碱性脂肪酶 cDNA 的克隆、核苷酸序列,以及在大肠杆菌中的表达等方面的研究,国内外尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 菌株

大肠杆菌 XL1-Blue,用作基因克隆、质粒转化的受体菌;大肠杆菌 BL21,用作基因表达的受体菌。圆弧青霉 PG37 为碱性脂肪酶基因的来源菌株。

1.2 质粒

pUCm-T 质粒(Sangon,上海)大肠杆菌融合表达质粒 pGEX-5X-3,氨苄青霉素抗性,作者所在实验室保存。

1.3 化学试剂及试剂盒

各种限制性内切酶、连接酶及其他工具酶,购自 Bio-Labs、BIM 及华美公司;RNA 分离 TRIzol 试剂及培养基,购自 Gibco BRL 公司;IPTG、X-gal、M-MLV 逆转录酶,均购自 Promega 公司;DEPC、MOPS 为 Amresco 公司产品;TaKaRa RNA PCR 试剂盒(Ver. 2.1),购自 TaKaRa 生物工程(大连)有限公司;SmartTM PCR cDNA 文库构建试剂盒,购

自 ClonTech 公司。其他主要的生化试剂为进口产品或国产分析纯产品。

1.4 PCR 引物

1.4.1 N₁ 和 N₂ 简并引物 5'端外引物 N₁:5'-GA(C/T)GC(C/T)GC(C/T)GC(C/T)TTCCC-3',对应于 Lip PC N 末端氨基酸 Asp⁴ 至 Pro⁹;内引物 N₂:5'-CC(C/T)GA(C/T)CT(G/C/T)CA(C/T)CG(C/T)GC(A/G/C/T)GC-3',对应于 Lip PC 末端氨基酸 Pro⁹ 至 Ala¹⁵。

1.4.2 Lip₁ 和 Lip₂ 引物 3'端外引物 Lip₁:5'-GACCAAGGTCTGTGAACACCT-3',内引物 Lip₂:5'-CTCTCATGATCTTCACATCAG-3'。均是为了扩增 Lip PC 自 5'端转录起始点至结构基因的 cDNA 片段。

1.4.3 Lip₃ 和 Lip₄ 引物 5'端引物 Lip₃:5'-GGGATCCCCGCAACTGCTGACGCCG-3',其中设计了一个 BamH I 酶切位点;3'端引物 Lip₄:5'-AAGAATTCTCAGCTCAGATAGCCAC-3',其中设计了一个 EcoR I 酶切位点。这一对引物是为了扩增 Lip PC 成熟肽完整的 cDNA,用于 Lip PC 基因的重组表达。

1.5 培养基

1.5.1 L-Broth 培养基 蛋白胨 10 g/L,NaCl 10 g/L,酵母粉 5 g/L,pH 7.4。对于固体平板 LB 培养基,在 L-Broth 的基础上添加 15 g/L 的琼脂粉。

1.5.2 圆弧青霉培养基 大豆磷脂 7.5 g/L,玉米浆 30 g/L,豆油 4 g/L,豆饼水解液 400 g/L,K₂HPO₄ 10 g/L,柠檬酸三钠 0.5 g/L,MgSO₄ 1.0 g/L,pH 7.5。

1.6 方法

1.6.1 圆弧青霉总 RNA 提取 将培养 24~30 h 的圆弧青霉菌培养液抽滤、无菌水洗涤菌体数次,取 100 mg 湿菌体加 1 mL TRIzol 试剂,用玻璃匀浆器研磨 3~5 min,室温放置 5 min 后加入 0.2 mL 氯仿,剧烈摇动 15 s 后,4℃ 12 000 r/min 离心 15 min,将上清液移至另一试管中,加入 0.5 mL 异丙醇,室温放置 10 min,4℃ 12 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,用 75% 乙醇洗涤 1~2 次;干燥后的总 RNA 沉淀溶于 30 μL DEPC 水中。

1.6.2 质粒的抽提、酶切及 DNA 片段的回收、连接、转化 参照 Sambrook 等^[8]的分子克隆实验指南

一书的方法进行.

1.6.3 cDNA 第一条链的合成 以圆弧青霉 PG37 总 RNA 为模板,其他操作参见 TaKaRa RNA PCR 试剂盒(Ver. 2.1)和 Smart™ PCR cDNA 文库构建试剂盒说明书.

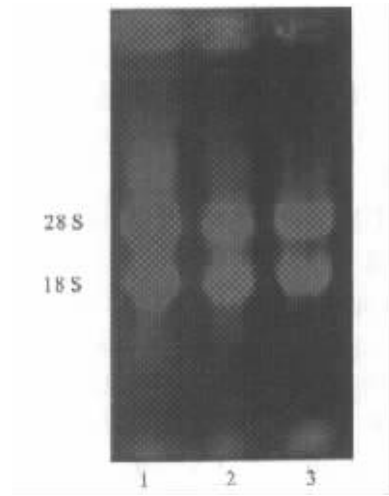
1.6.4 PCR 产物的克隆、鉴定 对于用 pUCm-T 作载体的基因克隆,PCR 产物经凝胶电泳后,可直接割胶玻璃粉回收、连接、转化 XL1-Blue 对于用其他载体的基因克隆,以常规的基因工程方法操作.所有基因克隆需先经酶切或 PCR 鉴定无误后,再测定核苷酸序列.

1.6.5 表达质粒的构建 以总 RNA 为模板,Lip₃ 和 Lip₄ 为引物,采用 RT-PCR 技术扩增 Lip PC 成熟肽完整的 cDNA.PCR 产物用 BamH I 和 EcoR I 双酶切,回收目的基因片段,与经相同内切酶双酶切的 pGEX-5X-3 质粒连接,构建重组质粒 pGEX-Lip PC.

2 结果与分析

2.1 圆弧青霉 PG37 总 RNA 提取

高质量总 RNA 的提取是 RT-PCR 扩增目的基因的关键.从图 1 可见,TRIzol 试剂一步抽提法提取的不同培养时间的圆弧青霉 PG37 总 RNA,经甲醛变性 RNA 琼脂糖凝胶电泳检测,其 28S rRNA 和 18S rRNA 条带清晰,浓度比值恰当;RNA 紫外吸收检测表明, A_{260}/A_{280} 比值介于 1.8~2.0 之间.以上两个检测指标显示所提取的 RNA 无明显降解,并且纯度较高,符合逆转录和 PCR 扩增目的基因的要求.



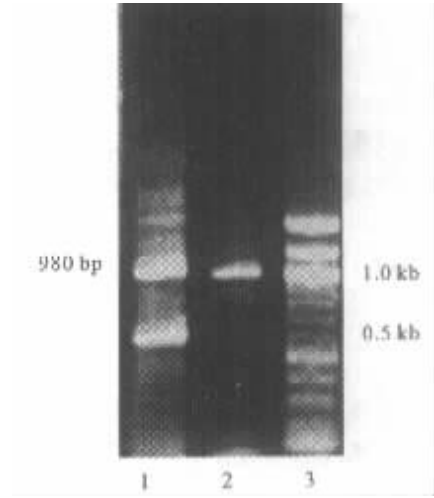
1. 24 h RNA ;2. 28 h RNA ;3. 30 h RNA

图 1 PG37 总 RNA 甲醛变性电泳图谱

Fig.1 Analysis of total RNA isolated from PG37 on formaldehyde denatured agarose gel

2.2 Lip PC cDNA 的 RT-PCR 扩增、克隆和序列测定

首先以 PG37 总 RNA 为模板,Oligo dT-M₁₃ Primer M₄ 为逆转录引物,合成了第一链总 cDNA ;然后再以合成的第一链 cDNA 为模板,N₂ 或 N₁ 和 M₁₃ Primer M₄ 为引物,进行 PCR 扩增.PCR 扩增 Lip PC cDNA 的条件为 :MgCl₂ (25 mol/L) 6 μL,10 × RNA PCR Buffer 8 μL,无菌去离子水 73.5 μL, TaKaRa Taq (5 U/μL) 0.5 μL,5' 引物 N₁ 或 N₂ (50 pmol/μL) 1 μL,3' 引物 M₁₃ Primer M₄ (20 pmol/μL) 1 μL,逆转录产物 10 μL,94 °C 预变性 2 min ,94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 50 s,共 35 个循环 ;第 35 个循环 72 °C 延伸 10 min.经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定,可清晰地见到约 980 bp 和 600 bp 长的扩增产物(图 2 第 1 泳道).根据目的基因的长度和嵌式 PCR 扩增结果(图 2 第 2 泳道),割胶回收 980 bp cDNA 条带,直接与 pUCm-T 载体连接,转化 XL1-Blue 受体菌,挑选白斑进一步用 Pst I 酶切或 PCR 鉴定正确后,送样测定核苷酸序列.测定结果表明,所克隆的 PCR 产物包含了 PG37 Lip PC 成熟肽编码区、3' 非编码区和 poly(dA) .



1. 引物 N₁/M₄ ;2. N₂/M₄ ;3. Marker

图 2 Lip PC cDNA 的凝胶电泳(1%)

Fig.2 Analysis of Lip PC-encoding cDNA amplified by PCR on 1% agarose gel

2.3 Lip PC 5' 端转录位点 cDNA 片段 PCR 扩增、克隆和序列测定

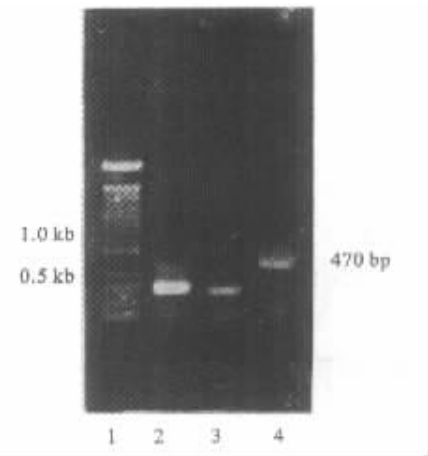
采用 Smart™ PCR cDNA 文库构建试剂盒,其中:SMART II 寡聚核苷酸序列为 5' - AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCCGGG - 3',PCR Primer 序列为 5' - AAGCAGTGGTAA-CAACGCAGAGT -3'.以 PG37 总 RNA 为模板,Lip₁ 为逆转录引物,SMART II 作为 5' 端的延伸引

物,合成了第一链 cDNA.以合成的 cDNA 为模板, Lip₂ 和 PCR Primer 为引物,进行 PCR 扩增. PCR 扩增条件为:10× Advantage 2 PCR Buffer 10 μL,去离子水 80 μL,50× Advantage 2 Polymerase Mix 2 μL,50× dNTP mix 2 μL,PCR Primer 2 μL,Lip₂ 2 μL,逆转录产物 2 μL,94 °C 预变性 2 min 94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 40 s,35 个循环.经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,可清晰地见到一约 470 bp 长的条带(图 3 第 4 泳道). 割胶回收 470 bp 条带,直接与 pUCm-T 载体连接、转化,Pst I 酶切或 PCR 鉴定正确后,送样测定核苷酸序列.测定结果表明,该 cDNA 片段包含 PG37 Lip PC mRNA 转录起始位点、信号肽编码区和部分成熟肽编码区等核苷酸序列.

2.4 PG37 Lip PC cDNA 序列分析

将上述 2.2 和 2.3 测定的 PG37 Lip PC cDNA 部分序列进行拼接,得到了 Lip PC cDNA 全序列(图 4).编码区核苷酸序列推导的 Lip PC 氨基酸序列与纯化的 PG37 Lip PC N 末端测定的 20 个氨基酸序列以及胰蛋白酶酶解的 2 个肽段部分氨基酸

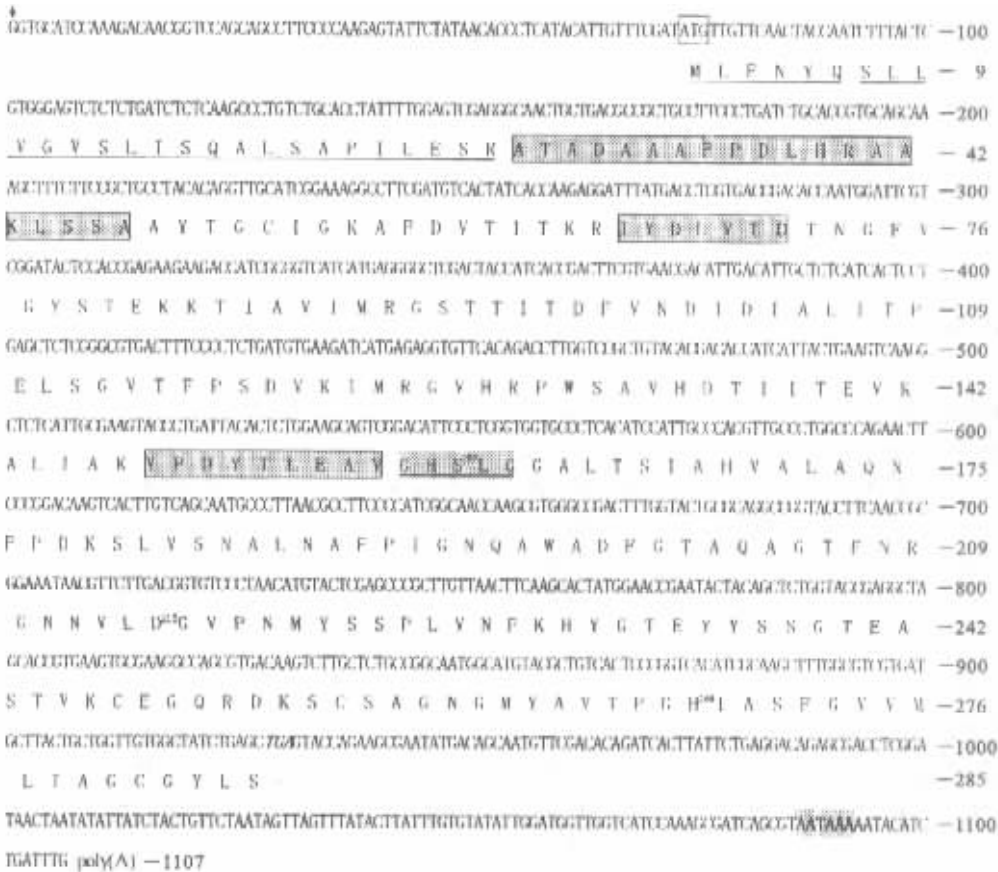
序列完全匹配;Lip PC 计算分子质量(27.21 ku)与质谱测定的 Lip PC 分子质量完全一致,说明该碱性脂肪酶蛋白质不含糖基,与整个序列中不含糖基化位点相一致^[9].



1. Marker ;2. 引物 N₁/Lip₂ ;3. N₂/Lip₂ ;4. Primer/Lip₂

图 3 Lip PC 5' 端基因片段的凝胶电泳

Fig.3 Gel electrophoresis of 5' regional cDNA encoding Lip PC from PG37



注:黑框代表起始密码子,下划线为信号肽序列,黑框加阴影代表测定的 Lip PC N 末端 20 个氨基酸序列以及胰蛋白酶酶解的 2 个肽段部分氨基酸序列,下划线加阴影代表所有脂肪酶的保守五肽序列,黑体阴影代表 mRNA 加尾识别信号,黑斜体为终止密码子,箭头所指为转录起始点,Ser159、Asp215、His268 组成 Lip PC 活性催化中心.起始密码子 ATG 前面核苷酸序列为 5' 非编码区,终止密码子 TGA 后为 3' 非编码区.

万方数据

图 4 PG37 Lip PC cDNA 全序列和推导的 Lip PC 氨基酸序列

Fig.4 Entire cDNA and deduced amino acid sequences of Lip PC from PG37

2.5 PG37 Lip PC 与其他脂肪酶一级结构的同源性比较

来源于人胰腺组织^[10]和丝状真菌 *Rhizomucor miehei* 的脂肪酶空间结构的研究^[11]表明,脂肪酶中同样存在丝氨酸蛋白酶类的 Asp-Ser 和 His 三组合活性催化中心,而 Ser 即为保守 motif 中 Ser. 肝脂肪酶的定点突变分析也证实了上述结论,并进一步证

实了 Ser 对脂肪酶催化活性的重要性^[12].

将 PG37 Lip PC 与其他脂肪酶一级结构的同源性进行比较,除了保守 motif Gly-X-Ser-X-Gly 以外未发现有明显的同源性.

图 5 列出了 Lip PC 与 3 种较具代表性的真菌脂肪酶同源性比较的结果,分别仅有 22.9%、25.6% 和 22.3% 的同源性.

Lip	A-----TADAAAFPLHRAAKLSSAAY-----TGCIGKA---FDVTITKRIYDL---YDVTNGFVGYSTKKTLAVIM	62
Pca	DV-----STSELNQEFWFQYAAASYEADYTAQVGDKLSCSKGNQFEVEATGATVSYDPSDSTITDTAGYIADVHTNSAVYLAF	80
Hla	EV-----SQDLFNQFNLFQAQYAAAYCGKNDAFAGTVITCTGNACFEVEKADATFLYSFEDSGVGDVTGFLALDNTNKLIVLSF	80
Mmi	SIDGGIRAATSGEINELTYITLSANSYCRTVIPGATWDCIHCDATEDLKI IKTWSTLIY-----DTNAMVARGDSEKTIYIVF	79
	* *	
Lip	RGSTTITDVFNDIDIALITHELSGVTFFSDVKIMRGVHRIWASAVHDTIITEVKALIAKYHDTLEAVGHSLGGALTSIAHVAL---	146
Pca	RGSYSVRNFWAD-A-TF-VHTNPGLC--DGCLAELEGFWSSWKLVRDDIKELKEVVAQNPNYELVYVGHSLGAAVATLAATDL--RG	160
Hla	RGRSRIEETGSG-NLNFDLKEINDIC--SGCRGHGFTSSWSVADTLRQLVEDAVREHFDYRYVFTGHSLGGALATYAGADL--RG	162
Mmi	RGSSSIRNWIAD--LTFVPVSYPPY---SGTKVHKGFLDSYGEVQNELVATVLDQPKQYPSYKVAVTGHSLGGATALLCALDLYORE	161
	*** *	
Lip	QNFDPKSLYSNALNAFFIGNQAWADFGTAQAG-TFNRGNNVLDGVPNMYSPLVNFKHGYTEYYSSGTEASTV-----KIEGQRDK	226
Pca	KGYPsAKLYAY--ASPRVGNAALAKYITAG--GNNFRFTHNDPVPKL-PLLSMGYVHVSPEYWTSPNNATVSTSDIKVIXQVSI	242
Hla	NGY-DIDVFSY--GAPRVGNRAFAEFLTVQTGTGLYRIHTNDIVPRL-PPREFGYSHSPEYWILSGTLVPVTRNDIVKIEG---	242
Mmi	EGLSSSNLFlyTQGQPRVGNPAFANYV-VSTGIPYRRTVNERDIVPHL-PPAAFGLFHAGSEYWITDN-----SPETVQVQTSDET	241
	 * * * . . . * . . . * * . . . * . . . *	
Lip	SCSAGNGM--YAVTPGHIAFGVVMLTAGCGY---LS	258
Pca	DGNTGTGLPLLTDFEAHIWYFVQVDAGKGPGLPKRV	279
Hla	DATGGNNQPNIPDIPAHLLWYFGLIGTC-----L	270
Mmi	SDCSNSIVP-FTSVLDHLSYFGI-----NTGLC---T	269
	 * *	

* : 相同氨基酸 ; : 相似氨基酸 ;Lip : Lip PC form *Penicillium cycloptium* PG37 (258 aa) ;Pca : lipase from *Penicillium camembertii* U-150 (279 aa) ;Hla : lipase from *Humicola lanuginosa* (270 aa) ;Mmi : lipase from *Rhizomucor miehei* (269 aa) .

图 5 Lip PC 与 *Pen camembertii*, *H Lanuginosa* 和 *M miehei* 脂肪酶序列比较

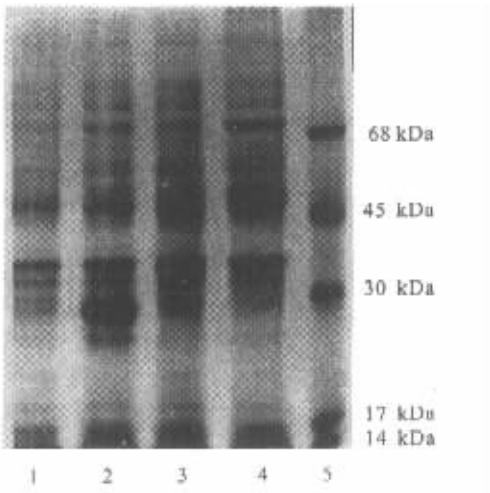
Fig.5 Comparison of deduced amino acid sequence among Lip, Pca, Hla and Mmi

在所比较的 4 个脂肪酶一级结构中,存在几段保守的短序列,例如(以 PG37 Lip PC 的氨基酸序号计),Met⁶²(或 Pro)-Arg-Gly-Ser、Gly¹³⁰-His-Ser-Leu-Gly-Gly(或 Ala)-Ala、Gly¹⁶⁵-Asn-Xaa-Ala-Xaa-Ala 和 Asp¹⁸⁸-Xaa-Val-Pro-Xaa-Met(或 Leu). 存在于 *M miehei* 的 Ser¹⁴⁴、Asp²⁰³ 和 His²⁵⁷ 三组合活性催化中心相当于 PG37 Lip PC 的 Ser¹³²、Asp¹⁸⁸ 和 His²⁴¹, *Penicillium camembertii* 的 Ser¹⁴⁵、Asp¹⁹⁹ 和 His²⁵⁹, *Humicola lanuginosa* 的 Ser¹⁴⁷、Asp²⁰² 和 His²⁵⁹,是完全保守的. *M miehei* 脂肪酶 Trp⁸⁸ 附近序列被认为是覆盖活性中心 Ser 的 lid 中心部位的组成序列,与 *Penicillium camembertii* 是同源的,而与 PG37 Lip PC 和 *Humicola lanuginosa* 不同源.

2.6 pGEX-Lip PC 重组质粒的表达

分别用 pGEX-Lip PC 重组表达质粒和 pGEX-5X-3 质粒转化大肠杆菌 BL21 菌株,所得转化菌株定义为 BL21/Lip PC 和 BL21/pGEX. 分别接种于 1.5 mL 含 Amp (100 μg/mL) 的 LB 中,37 °C 培养过夜,再以 1:10 的体积比接种于 3 mL 含 Amp 的新鲜 LB 中,继续在 37 °C 培养至对数生长中期(A₆₀₀ 为 0.6 ~ 1.0),加入 IPTG 使终浓度达 1.0 mol/L,诱导表达 6 h. 进行 15% SDS-PAGE 检测(图 6). 从图 6 可见,泳道 2 在 26 kDa 处有一明显主带,这是 BL21/pGEX 转化菌株在 IPTG 诱导下所表达的 GST 蛋白质;泳道 4 比其他泳道在 53 kDa 多出一蛋白条带,这是 BL21/pGEX-Lip PC 转

化菌株诱导表达的 GST-Lip PC 融合蛋白质.



1. BL21/pGEX; 2. BL21/pGEX 诱导; 3. BL21/pGEX-Lip PC; 4. BL21/pGEX-Lip PC 诱导; 5. Marker

图 6 pGEX-Lip PC 在 BL21 中表达的电泳图谱

Fig.6 15% SDS-PAGE of fusion protein expressed in *E. coli* BL21

3 结 语

脂肪酶基因的克隆一般可采用 3 种方法：

1) 从样本的 cDNA 或 DNA 文库中筛选目的基因,即利用标记的特异性探针与目的基因杂交的方法获取目的基因；

2) 构建 cDNA 或 DNA 表达文库,通过直接检测脂肪酶活性或抗原-抗体特异性结合来筛选目的基因；

3) 利用 PCR 技术从 cDNA 或 DNA 文库、总 DNA 中扩增目的基因,或直接采用 RT-PCR 技术,以 mRNA 为模板扩增目的基因.研究中采用 PCR 和 RT-PCR 技术分段扩增目的基因片段,然后将所克隆并测序的基因片段拼接,获得了完整的 PG37 脂肪酶的 cDNA 序列.

重组质粒 pGEX-Lip PC 在 *E. coli* BL21 中进行了融合表达,但所表达的融合蛋白质 GST-Lip PE 活性很难检测到,推测可能存在的原因是：融合的 GST 蛋白质影响 Lip PC 的表达和高级结构的形成；pGEX-Lip PC 在 *E. coli* BL21 中的表达易形成不溶性的包涵体,在细胞的破碎、包涵体溶解和蛋白质复性过程中引起酶活性的丧失；Lip PC cDNA 在 *E. coli* BL21 中的复制、转录和翻译等过程与宿主菌圆弧青霉存在明显的差异.

参考文献：

[1] BRIGITTE H J. Rhizomucor miehei triglyceride lipase is processed and secreted from transformed *Aspergillus oryzae* [J]. *Lipids*, 1989, 24 : 781 – 785.

[2] 李江华,邬敏辰,陶文沂等.用筛选抗性突变株法选育碱性脂肪酶的高产菌[J]. *无锡轻工大学学报*, 1999, 18(1) : 7 – 11.

[3] 李江华,邬敏辰,邬显章.圆弧青霉 PG37 碱性脂肪酶的发酵工艺条件[J]. *无锡轻工大学学报*, 2000, 19(2) : 100 – 104.

[4] 邬敏辰,李江华.圆弧青霉 PG37 碱性脂肪酶的研究[J]. *江苏食品与发酵*, 1997(4) : 2 – 7.

[5] 邬敏辰,王曙,黄伟达等.圆弧青霉碱性脂肪酶的分离纯化和特性[J]. *生物化学和生物物理学报*, 1999, 31 : 664 – 668.

[6] 邬敏辰,黄伟达,孙崇荣等.碱性脂肪酶同工酶的分离纯化[J]. *无锡轻工大学学报*, 2000, 19(1) : 9 – 13.

[7] 邬敏辰,张晓东.碱性脂肪酶提取的探讨[J]. *江苏食品与发酵*, 1995(4) : 4 – 8.

[8] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. *Molecular cloning : A laboratory manual*, 2nd ed [M]. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

[9] 邬敏辰,刘为平,许云敏等.碱性脂肪酶的高效液相色谱和质谱分析[J]. *无锡轻工大学学报*, 2000, 19(5) : 484 – 487.

[10] WINKLER F K, DARCY A, HUNZIKER W. Structure of human pancreatic lipase[J]. *Nature*, 1990, 343 : 771 – 774.

[11] BRADY L, BRZOWSKI A M, DEREWENDA Z S, *et al.* A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase[J]. *Nature*, 1990, 343 : 767 – 770.

[12] DAVIS R C, STAHNKE G, WONG H, *et al.* Hepatic lipase : site-directed mutagenesis of a serine residue important for catalytic activity[J]. *J Biol Chem*, 1990, 265 : 6291 – 6295.

(责任编辑 秦和平)