

研究报告

黑曲霉果胶裂解酶基因在毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 中的表达

强慧妮, 杨欣伟, 田宝玉, 柯崇榕, 林伟铃, 吕睿瑞, 黄薇, 王春香, 黄建忠

福建师范大学 工业微生物教育部工程研究中心 生命科学学院 福建省现代发酵技术工程研究中心, 福州 350108

摘要: 利用 RT-PCR 技术从黑曲霉(EIM-6)中扩增得到去除信号肽的果胶裂解酶基因 A, 将其插入到毕赤酵母表达载体 pPIC9k 上, 构建重组表达质粒 pPIC9K-peIA, 电击转化毕赤酵母 GS115, 得到了表达成功的工程菌株。用终浓度为 1.5% 的甲醇对其进行诱导, 将发酵上清液浓缩后, 用盐酸法测定其酶活可以达到 2.3 U/mL。通过对重组毕赤酵母诱导表达产物进行 SDS-PAGE 鉴定, 发现重组毕赤酵母分泌了 1 个约 38 kD 的蛋白, 与该酶基因产物的理论值相符, 并通过水解圈法测定验证, 均说明果胶裂解酶得到正确的分泌表达。

关键词: 黑曲霉, 果胶裂解酶, 毕赤酵母, 表达

Expression of a pectin lyase A gene from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris* GS115

Huini Qiang, Xinwei Yang, Baoyu Tian, Chongrong Ke, Weiling Lin, Ruirui Lü, Wei Huang, Chunxiang Wang, and Jianzhong Huang

Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Engineering Research Center of Fujian Modern Fermentation Technology, College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China

Abstract: In this study, the mature peptide sequence of a pectin lyase gene A was amplified from *Aspergillus niger* strain EIM-6 by using RT-PCR reverse transcription technique. The cloned gene was then inserted into a *Pichia pastoris* expression vector pPIC9k to produce the recombinant expression plasmid pPIC9K-peIA. By using electric shocks, we successfully transformed the recombinant pPIC9K-peIA into *Pichia pastoris* GS115. The activity of the engineered strain reached to 2.3 U/mL after induction with the final concentration of 1.5% methanol. SDS-PAGE analysis revealed that the pPIC9K-peIA transformant had an additional protein band of approximately 38 kD, which was not present in the control. There were no significant differences between the recombinant and native pectin lyase with regard to their hydrolysis activities.

Keywords: *Aspergillus niger*, pectin lyase, *Pichia pastoris* GS115, expression

果胶酶(Pectinases) 是指分解果胶质的一类酶 过程中重要的酶, 它能够断裂高度甲酯化果胶内部的总称, 是复合酶。其中裂解酶(Lyases)是果胶降解 的糖苷键, 不需要果胶酯酶的预先作用^[1]。果胶酶可

Received: September 23, 2009; **Accepted:** November 6, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30800735), Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2008F3036).

Corresponding author: Jianzhong Huang. Tel: +86-591-22868212; E-mail: hjz@fjnu.edu.cn

国家自然科学基金项目(No. 30800735), 福建省自然科学基金项目(No. 2008F3036)资助。

来源于动物、植物和微生物,但微生物因具有生长速度快、生长条件简单、代谢过程特殊和分布广等特点而成为果胶酶的重要来源。我国从90年代初开始对果胶裂解酶进行研究,对于果胶酶的研究报道很多,但是来源于不同菌株的果胶裂解酶的性质有很大的差别^[2-4]。本实验从一株具有较高果胶酶活性的黑曲霉菌株出发。鉴于此黑曲霉菌株在进行了紫外诱变和培养基优化等方面的改造之后,已使其整体酶活有所提高,但是其极易退化,即传代次数很短,酶活下降便很严重,而且黑曲霉分泌的杂蛋白较多,这在一定程度上增加了纯化的难度。而毕赤酵母作为近年来发展较快的一种表达系统,具备典型的真核生物分子生物学特性,能够对真核生物产生的外源蛋白进行正确的加工折叠和翻译后修饰,进而实现其成功表达。其次,毕赤酵母作为一种表达系统,其表达外源蛋白的表达量高,且所表达蛋白的稳定性好,分泌量大。目前,已经成功地利用毕赤酵母构建了多种表达宿主。再者,毕赤酵母既具备了原核生物的生长快速、易于培养和宿主与表达质粒多样性的特点,又克服了原核表达系统的一系列缺陷,较之酿酒酵母和原核表达更有利于真核蛋白的表达特征^[5-6]。故本实验尝试从该黑曲霉中克隆到果胶裂解酶基因A,并在毕赤酵母GS115中表达,通过测定其酶活以及酶学特性的研究与其在同源宿主中的相关参数进行比较,期望得到能够断裂高度甲酯化果胶且高酶活的单一果胶裂解酶。

1 材料和方法

1.1 实验材料

黑曲霉(*Aspergillus niger*)菌株EIM-6,大肠杆菌DH5 α ,均由本实验室保藏。毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 及分泌型表达载体 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司。pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 引物合成与果胶裂解酶A基因的PCR扩增

根据已公布的黑曲霉果胶裂解酶基因设计引物,

扩增获得果胶裂解酶的全长基因组基因。以测序获得的基因序列设计引物 P1、P2,以抽提出的黑曲霉总 RNA 为模板,用 oligo-dT 引物进行反转录,并用 P1、P2 为引物进行特异性扩增,获得 PelA 基因的成熟肽序列。PCR 反应程序为:95 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s,扩增 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.2 重组表达质粒的构建

将纯化后的 PCR 扩增产物连接到 PMD18-T 载体上,并转化大肠杆菌 DH5 α ,提取经过测序验证正确菌株的质粒,然后将其与表达质粒 pPIC9K,分别用限制性内切酶 *Not* I 和 *Eco*R I 进行酶切。酶切产物经苯酚-氯仿抽提、无水乙醇沉淀、75%的乙醇脱盐后,再用 T4 DNA 连接酶将二者连接。转化大肠杆菌 DH5 α ,抽提 pPIC9K-pelA 阳性克隆转化子的质粒,分别用 *Not* I 和 *Eco*R I 限制性内切酶酶切,电泳检测酶切效果。将构建好的酵母表达质粒 pPIC9K-pelA 进行测序,验证其阅读框是否正确。

1.2.3 *Pichia pastoris* GS115 感受态细胞的制备

挑取酵母单菌落,接种到 5 mL YPD 液体培养基中,30 $^{\circ}$ C、250 r/min 培养过夜。按 1% 接种量接种到 50 mL YPD 培养基中,30 $^{\circ}$ C、250 r/min 振荡培养,使 OD_{600} 值达到 1.3~1.5。取培养液放置在冰上 15 min,于 4 $^{\circ}$ C、3000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 20 mL 冰预冷的无菌水,振荡重悬菌体。4 $^{\circ}$ C、3000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 10 mL 冰预冷的无菌水,振荡重悬菌体。4 $^{\circ}$ C、3000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 10 mL 冰预冷的 1 mol/L 的无菌山梨醇溶液,重悬菌体。4 $^{\circ}$ C、3000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 1 mL 冰预冷的 1 mol/L 的无菌山梨醇溶液,振荡混匀后终体积达到约 1.5 mL。

1.2.4 线性化质粒 pPIC9K-pelA 对 *P. pastoris* GS115 的转化

取新鲜制备的感受态细胞置于冰浴中预冷。将 120 μ L 菌体移至新的离心管中,加入适量 *Sac* I 线性化质粒(5~10 μ L),轻弹混匀,转移到 0.1 cm 型的

表 1 全基因组扩增引物

Table 1 Whole genome amplification primers

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Forward	CCC GAA TTC GCA GTC GGC GTG TCC GGC TC (<i>Eco</i> R)
Reverse	CGC GCG GCC GCT TAC AGG TTG CCC TAG CCG G (<i>Not</i>)

电穿孔转化杯中。转化杯置于冰浴中放置 10 min。调节电转化仪条件, 电压: 750 V; 电阻: 200 Ω ; 电容: 25 μ F; 脉冲时间: 约 4 ms, 一次电击。电击后, 马上在电击转化杯中加入 200 μ L 经 4 $^{\circ}$ C 预冷的 1 mol/L 的山梨醇溶液, 轻微混匀。涂布于 MD 平板, 2~4 d 检测产生单菌落情况。

1.2.5 重组酵母阳性克隆子的筛选与鉴定

利用 MD 平板法筛选出阳性克隆子, 并挑取该克隆子进行培养, 最后提取它们的基因组 DNA, 如果目的基因整合到酵母基因组中, 可以使用目的片段 PCR 引物 P1 和 P2 扩增到目的条带。

1.2.6 重组酵母的诱导表达产物的 SDS-PAGE 分析

将经过测序验证正确的阳性克隆子, 即外源基因已经成功整合到毕赤酵母基因组中的重组子接种在装有 30 mL BMGY 培养基的 250 mL 三角瓶中, 30 $^{\circ}$ C、250 r/min 培养 18 h 至 OD_{600} 为 1, 然后 6000 r/min 收集菌体, 将菌体转移至装有 30 mL BMMY 培养基的 250 mL 三角瓶中进行诱导表达。每 24 h 加 1.5% 的甲醇, 30 $^{\circ}$ C、250 r/min 培养 96 h, 将发酵上清液进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.7 重组酵母的诱导表达时间的优化

将能够成功表达外源基因的毕赤酵母重组子再次进行诱导表达。每 24 h 加入 1.5% 的甲醇, 并取一次样, 30 $^{\circ}$ C、250 r/min 培养 168 h。将每一次取样的发酵上清液用 HCl 法进行酶活测定。

1.2.8 裂解酶活性分析方法

HCl 法测定果胶裂解酶活性: 1) 果胶底物配制: 将 0.425 g 果胶溶于 80 mL 琥珀酸-琥珀酸钠缓冲液中, 搅拌 3 h 让其溶解后, 4 $^{\circ}$ C 放置 16 h, 30 000 r/min 离心 30 min, 用缓冲液定容到 100 mL, 4 $^{\circ}$ C 保存。2) 待测酶样品的处理: 直接吸取酶液做适当稀释, 使测定光吸收值在 0.25~0.4 范围内。3) 裂解酶活力测定: 按下面的反应顺序进行操作, 在反应过程中, 从加入底物开始, 向每支试管中加入试剂的时间间隔要绝对一致, 30 $^{\circ}$ C 水解 30 min。

酶活力定义: 在测定条件下, 每分钟作用果胶产生 1 μ mol 双键所需酶量定义为一个酶活力单位(IU)。则: $X = OD_{235} \times 0.2424 \times$ 酶溶液稀释倍数(其中 0.2424 为最终的换算系数)。

表 2 果胶裂解酶酶活测定方法

Table 2 Methods of measurement for pectinases activity

No.	Sample	Control
1	Add substrate 2.9 mL	Add substrate 2.9 mL
2	Preheat 30 $^{\circ}$ C, 3 min	Preheat 30 $^{\circ}$ C, 3 min
3	Add fermentation supernatant 0.1 mL	Hydrolyze 30 $^{\circ}$ C, 30 min
4	Mix	Add hydrochloric acid 1 mL
5	Hydrolyze 30 $^{\circ}$ C, 30 min	Mix
6	Add hydrochloric acid 1 mL	Add fermentation supernatant 0.1 mL
7	Mix	Mix
8	Testing at 235 nm after zero setting	235 nm zero setting

1.2.9 重组果胶裂解酶的酶学特性研究

1) 温度对酶活力的影响: 将毕赤酵母重组子诱导 120 h 后的发酵上清浓缩后进行最适温度分析, 在 pH 5.5 的条件, 用 HCl 法测定 30 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C、70 $^{\circ}$ C 下的果胶裂解酶酶活力, 做温度曲线。

2) pH 对酶活力的影响: 将毕赤酵母重组子诱导 120 h 后的发酵上清浓缩后进行最适 pH 分析, 在最适温度 45 $^{\circ}$ C 下测定 pH 值的变化对酶活力的影响, 用 HCl 法分别测定 pH 3.5、pH 4.0、pH 4.5、pH 5.0、pH 5.5、pH 6.0、pH 6.5、pH 7.0 时的果胶裂解酶酶活力, 做 pH 曲线。

2 结果与分析

2.1 黑曲霉果胶裂解酶基因的获得

以抽提出的黑曲霉总 RNA 为模板, 用 oligo-dT 引物进行反转录, 并用 P1、P2 为引物进行特异性扩增, 获得 *pelA* 基因(去信号肽)大小约为 1100 bp 左右, 与理论值 1140 bp 相符(图 1)。

2.2 重组表达载体的构建

将 *pelA* 基因进行 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切后插入到毕赤酵母表达载体 pPIC9K 中, 并使之位于 α 因子信号肽序列下游, 获得重组表达质粒 pPIC9K-*pelA*。然后进行 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切, 得到预期片段长为 1140 bp 左右和 9276 bp, 电泳结果与预期相符(图 2)。

2.3 转化 *Pichia pastoris* GS115 重组子的筛选和鉴定

随机选择提取酵母的基因组 DNA, 用引物 P1、P2 进行 PCR 验证, 可以得到一条大小约为 1100 bp

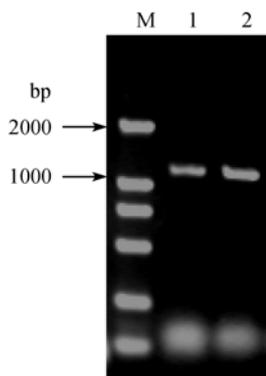


图 1 果胶裂解酶 A 全长编码基因的 PCR 扩增
Fig. 1 PCR amplification of the cDNA encoding the PLA from *A. niger* EIM-6. M: DNA marker; 1,2: *PLA* gene without introns obtained from *Aspergillus niger* EIM-6.

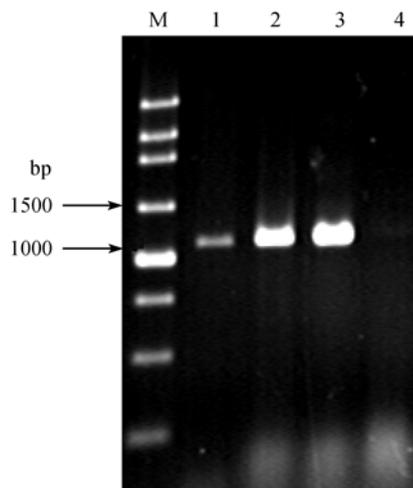


图 3 PCR 鉴定阳性克隆子
Fig. 3 Identification of *Pichia pastoris* GS115 positive clone by PCR. M: 200 bp DNA ladder marker; 1-3: positive recombinant of GS115; 4: negative recombinant of GS115.

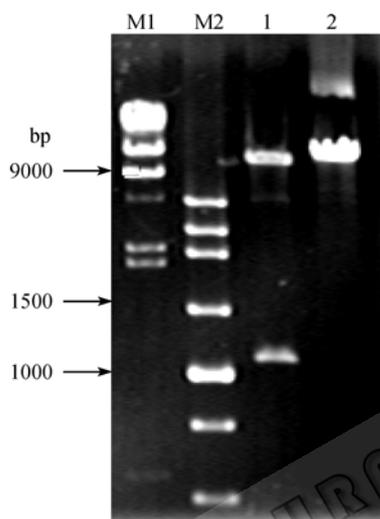


图 2 质粒 pPIC9K+pelA 双酶切凝胶电泳图
Fig. 2 Electrophoresis after digestion by *Not* I and *Eco*R I of the pPIC9K+pelAcDNA. M1: λ -*Hind* III digest DNA marker; M2: 200 bp DNA marker; 1: the plasmid of pPIC9K+ pelA digested with *Not* I and *Eco*R I; 2: the plasmid of pPIC9K+ pelA digested with *Eco*R I.

的条带,这说明外源果胶裂解酶基因已经整合到酵母基因组中,而目的基因没有整合入毕赤酵母基因组的野生型菌株,则扩增不出片段大小为 1100 bp 的条带(图 3)。

2.4 重组酵母的诱导表达产物的 SDS-PAGE 分析

将经过验证的阳性克隆子用甲醇诱导 96 h 后,取其发酵液上清进行 SDS-PAGE 电泳(图 4)。结果显示:工程菌发酵上清液较对照菌株(*P. pastoris* GS115 with pPIC9K)而言,在大约 38 kD 的位置出现一条明显的电泳条带。该条带的分子量与用生物信息学软件预

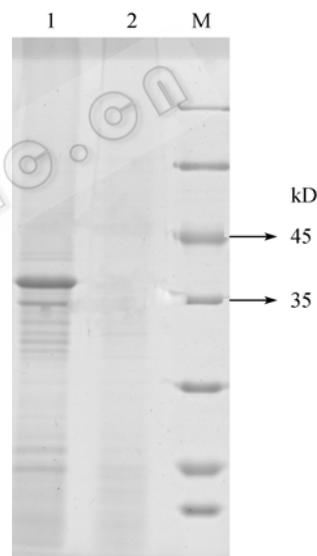


图 4 SDS-PAGE 分析 *P. pastoris* GS115 转化子诱导表达结果

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the expression recombinant pectin lyase in *P. pastoris* GS115 transformant. M: protein marker; 2: negative recombinant of GS115 (pPIC9K); 1: positive recombinant of GS115 (pPIC9K+pelAcDNA).

测的果胶裂解酶的分子量大小吻合,说明该条带很可能就是重组子分泌产生的果胶裂解酶。

2.5 重组酵母的诱导表达产物的酶活测定

水解圈法:在 1%的果胶配成的固体培养基上,可以看到加入重组毕赤酵母诱导发酵液的小孔周围存在有水解圈,而其对照不含有重组目的片段的毕赤酵母(转 pPIC9K)周围则看不到水解圈(图 5)。

2.6 重组酵母的诱导表达时间的优化

将能够成功表达外源基因的毕赤酵母重组子再次进行诱导表达。每 24 h 取一次样, 30°C、250 r/min 培养 168 h。对每一次取样的发酵上清液浓缩后, 用 HCl 法进行酶活测定。结果显示在甲醇浓度为 1.5%、诱导 120 h 时, 毕赤酵母分泌的重组果胶裂解酶的表达量达到最高值, 约为 2.3 U/mL 个酶活单位(图 6)。

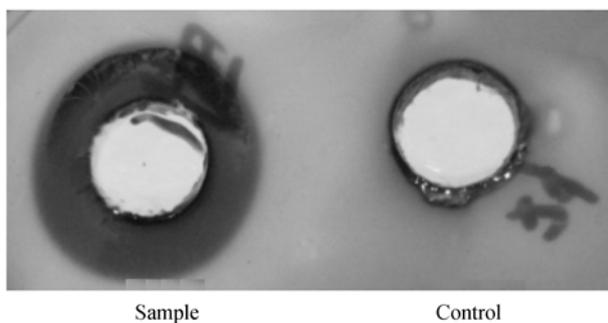


图 5 透明圈法鉴定果胶裂解酶活力

Fig. 5 Activity analysis of PLA by transparent zone.

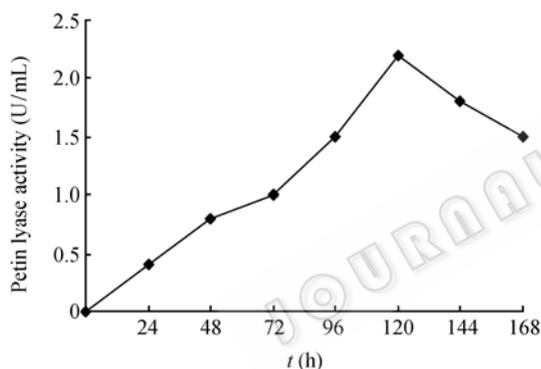


图 6 毕赤酵母重组子果胶酶活性分析图

Fig. 6 Pectin lyase activity of the *P. pastoris* recombinant with 1.5% methanol induction every 24 hours.

2.7 重组果胶裂解酶酶学特性的研究

2.7.1 温度对酶活力的影响

将毕赤酵母重组子诱导 120 h 后的发酵上清液浓缩, 然后进行最适温度分析, 在 pH 5.5 的条件下, 用 HCl 法测定 30°C、35°C、40°C、45°C、50°C、55°C、60°C、65°C、70°C 下的果胶裂解酶酶活力, 做温度曲线(图 7)。从图中可以看出, 在 pH 5.5、温度 40°C~50°C 的条件下, 酶活力都保持在一个较高的水平上, 说明 40°C~50°C 是该酶作用的最适温度范围。当温度高于 50°C 以后, 酶活力随着温度的继续

升高而急速下降, 直到 70°C 时, 酶活力几乎为零。在 35°C 时, 酶活力有一个小的波动, 推测该酶在 35°C 时可能存在某种机制使得酶活下降。整体分析可知: 该酶的最适温度范围较广, 温度低于最适温度范围时, 酶活力受影响程度不大, 但当温度超过最适温度范围时, 温度的变化对酶活力的影响加剧, 直至彻底失活。对于温度对酶活性的影响分析, 通过做 3 次平行实验, 均得到相同的结果。

2.7.2 pH 对酶活力的影响

将毕赤酵母重组子诱导 120 h 后的发酵上清液浓缩, 然后进行最适 pH 分析, 在最适温度为 45°C 的条件下, 用 HCl 法分别测定 pH 3.5、pH 4.0、pH 4.5、pH 5.0、pH 5.5、pH 6.0、pH 6.5、pH 7.0 时的果胶裂解酶酶活力, 做 pH 曲线(图 8)。由此看出, 最适温度 45°C 下, 当 pH 为 5.5 时, 果胶裂解酶的活性达到最高值, 而以此 pH 值为中间值, 整个曲线呈正态分布状。在偏酸的环境下, 酶的活力下降的幅度小于在偏碱的环境下。该实验结果均是在进行 3 次平行实验的基础上得出的最终结果。

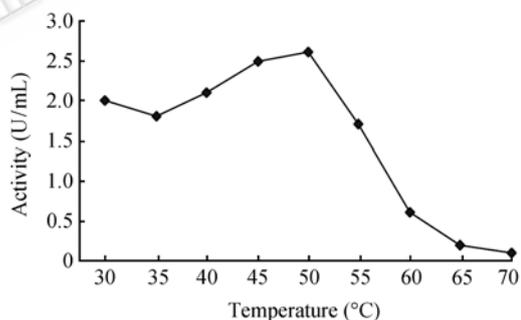


图 7 重组果胶裂解酶最适作用温度曲线

Fig. 7 Optimum temperature for reaction of the recombinant pectin lyase A.

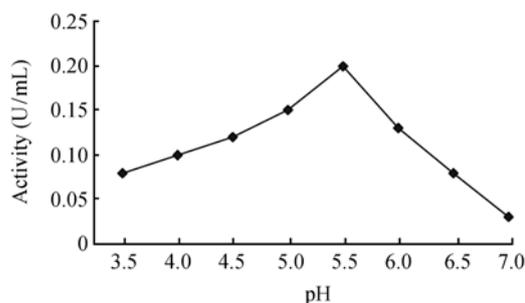


图 8 重组果胶裂解酶最适作用 pH 值曲线

Fig. 8 Optimum pH for reaction of the recombinant pectin lyase A.

3 讨论

本研究利用毕赤酵母自身分泌的杂蛋白极少且可以进行胞外表达的特点, 来表达黑曲霉果胶裂解酶基因 A。同时, pPIC9K 是一个常用的毕赤酵母表达载体, 该载体包含卡那霉素抗性基因, 能够快速筛选出高拷贝整合转化子, 而且, 外源基因与 pPIC9K 载体重组整合到毕赤酵母中能够分泌表达^[7]。故本实验将来自于黑曲霉的果胶裂解酶基因与 pPIC9K 连接, 构建表达载体, 然后转化毕赤酵母, 进而实现其异源表达。通过对诱导表达的结果进行验证得知, 该工程菌构建成功, 只是其酶活仍低于原始黑曲霉菌株的酶活。鉴于原始菌株易退化的特点, 使得其紫外诱变后获得的高酶活菌株在传代 2~3 代之后酶活便由 10 U/mL 降到 5 U/mL。并通过对该构建表达成功的工程菌进行连续转接的稳定性研究结果可知, 其最重要的特点是很好地弥补了原始菌株遗传不稳定性缺陷。而且通过与原始菌株的进行比较, 发现其酶学特性没有发生改变。

影响外源蛋白在毕赤酵母中表达的因素很多: 如毕赤酵母表达外源基因具有密码子偏好性^[8], 目的基因的特性、整合位点、mRNA 的 5'和 3'非翻译区、信号肽及培养条件等^[9], 使得重组到毕赤酵母的目的基因不能获得更高效的表达, 尤其是信号肽序列的调整对外源蛋白质在毕赤酵母中的表达有一定的影响^[10], 酵母细胞对信号肽序列的识别有一定的灵活性, 在一定程度上可以识别外源蛋白的信号肽进行蛋白输送。但利用外源蛋白的天然信号肽引导表达的重组蛋白虽可分泌, 但效率较低。因此, 在一定程度上, 需要利用酵母本身的蛋白信号肽来引导外源蛋白的表达^[11]。另外, 还可以通过对重组酵母表达条件的优化来获得高产的工程菌株, 例如, 接种量、甲醇浓度、起始 pH 值和通气量等均可以影响重组毕赤酵母的表达^[12], 还可以应用一些实验设计如通过单因素实验及正交实验, 确定重组酵母的最佳发酵培养基^[13]。另外, 随着计算机使用的普及和各种计算方法的不断完善, 近些年来响应面方法已成功地应用于生物技术的许多研究领域^[14-15], 所以, 为了提高工程菌的酶活表达, 可以综合并充分地利用上述手段。综上所述, 工程菌果胶酶在表达方面有

很大的潜力, 有必要对其进行更深入地研究。

REFERENCES

- [1] Harmsen JA, Kusters-van Someren MA, Visser J. Cloning and expression of a second *Aspergillus niger* pectin lyase gene (pelA): indications of a pectin lyase gene family in *A. niger*. *Curr Genet*, 1990, **18**(2): 161-166.
- [2] Zhuge B, Du GC, Shen W, *et al.* Construction of engineering strain producing pectate lyase. *Appl Environ Biol*, 2006, **12**(4): 547-549.
诸葛斌, 堵国成, 沈微, 等. 碱性果胶酯裂解酶工程菌的构建. *应用与环境生物学报*, 2006, **12**(4): 547-549.
- [3] Zhen DX, Wang SY, Yan Q. Cloning and expression of gene Pel9A encoding thermostable pectate lyase. *Food Sci Biotechnol*, 2006, **25**(3): 112-115.
甄东晓, 王树英, 严群. 耐热果胶裂解酶基因 pel9A 的克隆和表达. *食品与生物技术学报*, 2006, **25**(3): 112-115.
- [4] Zhao QX, Yuan S, Zhang YL. Expression of pectin lyase from *Aspergillus oryzae* in *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2007, **23**(5): 873-877.
赵庆新, 袁生, 张宇玲. 米曲霉果胶酯裂解酶(pectin lyase1)在原核系统中重组表达. *生物工程学报*, 2007, **23**(5): 873-877.
- [5] Zhang CJ, Shen XL, Lei Q, *et al.* Secreted expression of hepatitis E virus ORF2 gene in *Pichia pastoris*. *Pharm Biotechnol*, 2002, **9**(4): 200-205.
张春江, 沈心亮, 雷清, 等. 戊型肝炎病毒结构区 ORF2 基因在毕赤酵母中的分泌型表达. *药物生物技术*, 2002, **9**(4): 200-205.
- [6] Zhao QX, Wang X, Zhang YL. Expression of P56 pectate lyase from *Solanum lycopersicum* in *Escherichia coli*. *Wuhan Bot Res*, 2007, **25**(6): 539-543.
赵庆新, 王鑫, 张宇玲. 番茄 (*Solanum lycopersicum*) 果胶裂解酶 P56 在大肠杆菌中的重组表达. *武汉植物学研究*, 2007, **25**(6): 539-543.
- [7] Sun MH, Ye LB. Expression of the full length preS gene of Hepatitis B virus in *Pichia pastoris*. *Chin Virol*, 2003, **18**(2): 99-103.
孙明颢, 叶林伯. 乙型肝炎病毒全长 PreS 蛋白基因在酵母中的表达. *中国病毒学*, 2003, **18**(2): 99-103.
- [8] Sharp PM, Tuohy TM, Mosurski KR. Codon usage in yeast cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes. *Nucleic Acids Res*, 1986, **14**(3): 512-525.
- [9] Liu SA, Li DC, Zhang Y, *et al.* Effective expression of *Chaetomium thermophilum* CT2 cellobiohydrolase in *Pichia pastoris*. *Mycosystema*, 2006, **25**(2): 256-262.
刘守安, 李多川, 张燕, 等. 嗜热毛壳菌 CT2 纤维二糖水解酶 I 在毕赤酵母中的高效表达. *菌物学报*, 2006, **25**(2): 256-262.

- [10] Bei JL, Chen Z, Yang L, *et al.* Overexpression of artificial synthetic gene of *Aspergillus niger* NRRL3135 phytase in *Pichia pastoris*. *Chin Biotechnol*, 2007, **17**(3): 254–258.
- [11] Zhao H, Zheng WL. Effect of signal peptide on the secretory efficiency of exogenous proteins. *Life Chem*, 2003, **23**(3): 177–179.
赵慧, 郑文岭. 信号肽对外源蛋白分泌效率的影响. *生命的化学*, 2003, **23**(3): 177–179.
- [12] Wu ZF, Chen H, Zeng M, *et al.* Over-expression of endo glucanase gene in *Pichia pastoris*. *J Agr Biotechnol*, 2009, **17**(3): 529–535.
吴振芳, 陈惠, 曾民, 等. 内切葡聚糖酶基因在毕赤酵母中高效表达研究. *农业生物技术学报*, 2009, **17**(3): 529–535.
- [13] Tian SL, Shao R, Liu G. Expression of gene encoding alkaline cellulose in *Pichia pastoris* and fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. *Chin Biological*, 2009, **22**(5): 425–437.
田生礼, 邵睿, 刘刚. 碱性纤维素酶基因在巴氏毕赤酵母中的表达及重组酵母菌发酵工艺的优化. *中国生物制品学杂志*, 2009, **22**(5): 425–437.
- [14] Ooijkaas LP, Wilkinson EC. Medium optimization for spore production of coniothummitans using statistically-based experimental designs. *Biotechnol Bioeng*, 1999, **64**(5): 92–100.
- [15] Ismail A, Soultani S, Ghoul M. Optimization of the enzymatic synthesis of butyl glucoside using response surface methodology. *Biotechnol Prog*, 1998, **14**(6): 874–878.



科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

遗传学工作者的生物信息学（原书第二版）

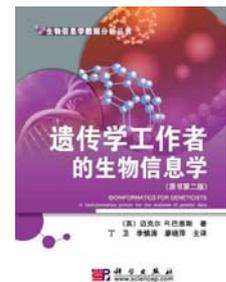
（生物信息学数据分析丛书）

（英）迈克尔 R 巴恩斯 著 丁卫 李慎涛 廖晓萍 主译

978-7-03-025490-0 ¥88.00 2009年10月出版

本书由五部分共 19 章组成，第一部分主要介绍了遗传学工作者所面临的生物信息学挑战以及遗传数据的操作和管理；第二部分主要介绍了以人类单体型图谱计划（HapMap）、人类基因组学和比较基因组学等为代表的多元化数据；第三部分主要介绍了用于遗传学研究设计和分析的生物信息学策略和手段；第四部分重点介绍了基因分析与疾病的关联及其代表案例；第五部分介绍了利用数据库界面进行全面生物信息学系统分析的流程，其中覆盖了微阵列等一些非常实用的技术，并且就药物遗传学等前沿领域展开了前瞻性的论述。

本书适合统计学和群体遗传学专业，以及具有分子遗传学和医学遗传学背景的高等院校师生和科研人员阅读，对从事人类及模式生物研究的广大实验室研究人员、临床研究人员以及实验室负责人都有较大的参考意义。



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