文章编号: 1673-1689(2010)04-0602-07

圆弧青霉脂肪酶基因序列的生物信息学分析

张慧敏[1], 李剑芳[1], 邬敏辰*[2]
(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 医药学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 从圆弧青霉 PG37 中克隆了碱性脂肪酶(Lip I)基因, 并采用生物信息学分析了 PG37 Lip I 基因携带的遗传信息。序列分析结果表明: Lip I DNA 序列全长 1 480 bp, 不存在重复序列, 含有 5 个内含子, 5′端存在 TATA box 和多个转录因子结合位点; cDNA 序列全长 1 128 bp, 包含了转录起始位点、5′和 3′非编码区及 858 bp 的开放阅读框架; Lip I 编码区对 TGC、GAC、TTC、CAC、AAG、AAC 和 TAC 这 7 种密码子使用频率最高; 比对 Lip I 基因与 *Pichia pastoris* 基因组中的密码子使用频率, 其中有 21 个密码子使用频率的比值相差较大。

关键词: 生物信息学; 圆弧青霉 PG37; 碱性脂肪酶; 基因序列
中图分类号: Q 811.4 文献标识码: A

Bioinformatics Analysis on the Sequence of Lipase Gene from *Penicillium cyclopium*

ZHANG Hui-min[1], LI Jian-fang[1], WU Min-chen*[2]
(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 2141224, China)

Abstract: The gene encoding alkaline lipase (Lip I) is cloned from *Penicillium cyclopium* PG37 and the genetic information is analyzed by bioinformatic tool. Sequence analysis showed that Lip I DNA is 1480 bp long with no repeat sequence and five introns, and there is a TATA box and several transcription factor binding sites in the 5′end. Lip I cDNA is 1128 bp long with an open reading frame containing 858 bp. It also has transcription start site, 5′and 3′non-coding region. TGC, GAC, TTC, CAC, AAG, AAC and TAC codons are used at highest frequency in Lip I gene. Comparing codon usage frequency of the Lip I with *Pichia pastoris* genome' showed that the ratios of 21 codon usage frequency are different widely.

Key words: bioinformatics, *Penicillium cyclopium* PG37, alkaline lipase, gene sequence

脂肪酶(Lipase EC 3.1.1.3)是一类分解三脂酰甘油的水解酶, 目前研究最多的是来源于真菌和细菌的脂肪酶, 已广泛应用于洗涤剂、食品、造纸、香料、医药、纺织、废物处理、化妆品、有机合成和生物柴油等行业, 碱性脂肪酶主要用作洗涤剂添加剂[1-2]。1988 年, NoVo Industrial A/B 公司最先

收稿日期: 2009-09-15
基金项目: 国家自然科学基金项目(20776061)。
* 通信作者: 邬敏辰(1962-), 男, 江苏无锡人, 理学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事酶工程与基因工程方面的研究。Email: bioch@163.com

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

推出了商品化的重组碱性脂肪酶 Liporase, 并将其应用于洗涤剂行业。1985 年以来, 作者所在研究室一直致力于微生物碱性脂肪酶的研究, 主要集中在圆弧青霉 PG37 菌株的诱变育种、发酵工艺条件优化、酶的分离纯化、酶学性质、酶的应用以及酶基因的克隆和表达等方面[3-4]。

鉴于上述的研究结果与基础, 有必要进一步了解圆弧青霉 PG37 碱性脂肪酶(Lip I)基因携带的遗传信息。作者拟采用生物信息学的相关分析软件和数据库, 分析、预测 PG37 Lip I 基因的各种功能单位, 例如重复序列、转录起始位点、内含子、转录因子结合位点[5] 和开放阅读框架等, 从而加深对基因结构、表达和调控机制的认识; 同时分析和计算 PG37 Lip I 编码区密码子使用频率, 并与毕赤酵母(*Pichia pastoris*) 基因组密码子使用频率进行比对, 为 Lip I 基因在 *Pichia pastoris* 中的高效表达打下基础。有关圆弧青霉 PG37 Lip I 基因序列的生物信息学分析, 国内外尚未见报道。

1　材料与方法

1.1　菌株和质粒

圆弧青霉 PG37: 为 Lip I 基因的供体菌, 作者所在研究室保藏; 大肠杆菌 XL1-Blue: 用作基因克隆、质粒转化的受体菌; pUCm-T 质粒, 氨苄青霉素抗性, 购自上海生工公司。

1.2　培养基

1.2.1　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, 柠檬酸三钠 0.5 g/L, K_2HPO_4 10 g/L, $MgSO_4$ 1.0 g/L, pH 7.5。

1.2.2　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。

1.3　试剂、试剂盒和 PCR 引物

参见文献[3, 4]。

1.4　PG37 Lip I 基因的克隆

参照 Sambrook 等[6] 的《分子克隆实验指南》一书的方法进行。

1.5　PG37 Lip I 基因的生物信息学分析

采用生物信息学相关分析软件及数据库对 PG37 Lip I 基因序列进行分析、预测, 见表 1。

表 1　生物信息学相关分析软件与数据库网址

Tab.1　Website of bioinformatics software and database

名称	描述	网址	参考文献
CENSOR	重复序列分析	http://www.girinst.org/	[7]
NNPP	转录起始位点预测	http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html	
GeneMark	内含子分析	http://opal.biology.gatech.edu/GeneMark/eukhmm.cgi	[8]
TFSEARCH	转录因子结合位点预测	http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html	[9]
PLACE	启动子序列预测	http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html	[10]
ORF Finder	开放阅读框架分析	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html	
Codon Database	密码子使用频率查阅	http://www.kazusa.or.jp/codon	[11]
CHIPS	ENc 值统计	http://vm-bioinfo.toulouse.inra.fr/emboss/emboss.cgi/chips	[12]
CUSP	密码子使用频率统计	http://vm-bioinfo.toulouse.inra.fr/emboss/emboss.cgi/cusp	
CodonW	RSCU 统计	http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=codonw	

1.5.1　PG37 Lip I 基因序列分析　采用 CENSOR 软件分析 DNA 序列中的重复序列; 采用 NNPP 预测基因转录起始位点; 采用 GeneMark 分析内含子/外显子剪接位点; 采用 TFSEARCH 和 PLACE 预测转录因子结合位点; 采用 ORF Finder 确定开放阅读框架。

1.5.2　有效密码子数目(ENc)统计　ENc 值是指密码子使用频率与同义密码子平均使用频率偏差的量化值, 其取值范围为 20~61, ENc 值越接近 20, 则密码子偏爱性越强, 反之则偏爱性越低。采用 CHIPS 软件统计 PG37 Lip I 编码区的 ENc 值。

1.5.3　密码子使用频率(FCU)统计　FCU 表示在基因组或基因的所有密码子中某种密码子出现的频率, 特指在 1 000 个密码子中某种密码子被使用的次数。采用 CUSP 软件统计 PG37 Lip I 编码区的密码子使用频率 FCU。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

1.5.4 同义密码子使用的相对概率(RSCU)统计 RSCU 是指某种密码子在编码对应氨基酸的同义密码子间的相对概率。当 RSCU 值大于 1.0, 表示该密码子使用频率相对较高; 反之则使用频率相对较低[13]。在同义密码子中若某一密码子 RSCU 值大于 1, 而其余密码子 RSCU 值均小于 1, 则前者定义为使用频率最高的密码子[14]。采用 CodonW 软件统计 PG37 Lip I 编码区的 RSCU 值。

1.5.5 密码子使用频率比值 当某种密码子 FCU 比值在 0.5~2.0 范围内, 表示该密码子在不同物种或基因中的 FCU 较接近; FCU 比值超出此范围则 FCU 相差较大。

2 结果与讨论

2.1 PG37 Lip I 基因克隆

在测定了 PG37 完整 Lip I 及其胰蛋白酶酶解肽段 N 末端部分氨基酸序列的基础上, 分别提取圆弧青霉 PG37 总 RNA 和基因组 DNA 作为模板, 采用 RT-PCR、嵌合式 PCR 和单侧 PCR 等技术, 分多次扩增和克隆了 Lip I 基因的相关片段, 通过拼接获得了 Lip I 基因完整的 DNA 序列, 见图 1。

```
   1 gcaaatatag cgacaacgag tacgatggga ctttgagggg tacctgaaga attatataaa
  61 gagcaagata accccacaca attttctgtt tggtgcatcc aaagacaacg gtccagcagc
 121 cttccccaag agtattctat aacaccctca tacattgttt cgatatgttg ttcaactacc
 181 aatctttact cgtgggagtc tctctgatct ctcaagccct gtctgcacct attttggagt
 241 cgagggcaac tgctggtatg tcaatttatc agcccagctc cattcgacta ggcagctcta
 301 acattttctc aagacgccgc tgccttccct gatctgcacc gtgcagcaaa gctttcttcc
 361 gctgcctaca caggttgcat cggaaaggcc ttcgatgtca ctatcaccaa gaggatttat
 421 gacctcgtga ccgacaccaa tgtaggcgtg gtatttgccc tatacgttgg caaataacta
 481 atttcaatag ggattcgtcg gatactccac cgagaagaag accatcgcgg tcatcatgag
 541 gggctcgact accagtatgg caaaatcact tcttaatact agctcaacat gctaattaat
 601 ccagtcaccg acttcgtgaa cgacattgac attgctctca tcactcctga gctctcgggc
 661 gtgactttcc cctctgatgt gaagatcatg agaggtgttc acagaccttg gtccgctgta
 721 cacgacacca tcattactga agtcaaggct ctcattgcga agtaccctga ttacactctg
 781 gaagcagtcg gacattccct cggtggtgcc ctcacatcca ttgcccacgt tgccctggcc
 841 cagaacttcc cggacaagtc acttgtcagc aatgcccttа acgccttccc catcggcaac
 901 caagcgtggg ccgactttgg tactgcgcag gccggtacct tcaaccgcgg aaataacgtt
 961 cttgacggtg tccctgtaag ccatggttga aactgacatg ctatattaaa gtagctaacc
1021 atacaacaca gaacatgtac tcgagcccgc ttgttaactt caagcactat ggaaccgtga
1081 gttatcctac cgattccct ttagatatca atgttcaatc gcttatcaac cataaccatg
1141 cacaggaata ctacagctct ggtaccgagg ctagcaccgt gaagtgcgaa ggccagcgtg
1201 acaagtcttg ctctgccggc aatggcatgt acgctgtcac tcccggtcac atcgcaagct
1261 ttggcgtcgt gatgcttact gctggttgtg gctatctgag ctgagtacca gaagcgaata
1321 tgacagcaat gttcgacaca gatcacttat tctgaggaca gagcgacctc ggataactaa
1381 tatattatct actgttctaa tagttagttt atacttattt gtgtatattg gatggttggt
1441 catccaaagc gatcagcgta ataaaaatac atctgatttg —— 1480 bp
```

图 1 圆弧青霉 **PG37 Lip I** 基因完整的 **DNA** 序列

Fig. 1 Entire DNA sequence of Lip I gene from *Penicillium cyclopium* PG37

2.2 PG37 Lip I 基因重复序列分析

以 PG37 Lip I 基因完整 DNA 序列为研究对象, 采用 CENSOR 软件对该序列进行了分析。分析结果表明, 该 DNA 序列中不存在重复序列。

2.3 PG37 Lip I 基因转录起始位点预测

采用 NNPP 软件预测了 PG37 Lip I 完整 DNA 序列的转录起始位点。预测结果显示, 基因转录起始位点是位于该 DNA 序列第 71 位的腺苷酸(AMP), 与邬敏辰等的实验结果[15]存在差异, 后者是位于 DNA 序列第 92 位的鸟苷酸(GMP)。

2.4 PG37 Lip I 基因内含子剪接位点分析

GeneMark 软件分析结果表明, PG37 Lip I 完整 DNA 序列中含有 5 个内含子, 其 5′ 端剪切位点均为 GT, 3′ 端剪切位点均为 AG, 见表 2, 符合 GT-AG 法则。GeneMark 预测的内含子数目及内含子/外显子剪接位点与邬敏辰的实验结果[3]完全一致。

在 Lip I 完整 DNA 序列中剔除转录起始位点 AMP 的上游序列及 5 个内含子序列, 可获得理论上的 Lip I 完整 cDNA 序列, 全长 1 128 bp, 与实验获得的 Lip I 完整 cDNA 序列长度(GenBank 登录号 AF274320)相差 21 bp, 原因是两者的转录起始位点不同。

© 1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2　PG37 Lip I 基因内含子结构与剪接位点的分析

Tab. 2　Analysis on the structure and splice sites of introns in Lip I gene from PG37

内含子	5′ – 剪切位点	内部位点	间隔距离/bp	3′ – 剪切位点	长度/bp
1	G/**GT**ATGT	CTCT**AAC**	– – – – – 5 – – – – –	CT CA**AG**/A	58
2	T/**GT**AGGC	AAAT**AAC**	– – – – – 6 – – – – –	CAAT**AG**/G	49
3	A/**GT**ATGG	GCTC**AAC**	– – – – – 10– – – – –	ATCC**AG**/T	50
4	T/**GT**AAGC	AGCT**AAC**	– – – – – 6 – – – – –	ACAC**AG**/A	56
5	C/**GT**GAGT	CCAT**AAC**	– – – – – 3 – – – – –	GCAC**AG**/G	69

注: 间隔距离表示内部位点 3′端距 3′剪切位点 5′端的距离; 内部位点中的黑体字表示内部位点中的保守序列

2.5　PG37 Lip I 基因转录因子结合位点预测

采用 TFSEARCH 软件对 PG37 Lip I DNA 的 5′端序列(从转录起始位点上游的– 70 bp 位至下游的+ 95 bp 位) 进行了转录因子结合位点扫描分析, 见图 2。扫描结果显示: 检测到预测分值在 85 分以上的有 44 个转录因子结合位点; 分值在 90 分以上的有 23 个转录因子结合位点。其中 HSF (heat shock factor) 9 个, 其存在表明基因能在较高温度下诱导表达[16]; ADR1(alcohol dehydrogenase gene regulator 1) 3 个, 它可调节利用碳源基因的表达, 也可与过氧化物酶 A 等基因的启动子结合[17]; CdxA(caudal type homeobox transcription factor A) 3 个, 它作为启动子的一部分, 在基因调控区能增强基因转录的活性[18]; NIT2(activator of nitrogen-regulated genes) 2 个; SRY(sex-determining region Y gene product) 2 个; cap(cap signal for transcription initiation) 1 个, 它的存在与基因的转录起始有关; GATA-1(GATA- binding factor 1) 1 个, 它通过疏水作用来识别 DNA 结合位点, 可调节氮代谢、光诱导等, 还可以提高启动子的强度和活性; SREBP 和 Sox-5 各 1 个。由于实验手段的限制, 生物信息学已成为分析基因转录因子结合位点的重要工具。

此外, 在转录起始位点上游的– 16~ – 11 bp 处发现存在 TATA box, 预测分值为 85.6, 与采用 PLACE 软件预测的位置相同。

2.6　PG37 Lip I cDNA 阅读框架分析

以全长为 1 128 bp 的 PG37 Lip I cDNA 序列为研究对象, 采用 ORF Finder 程序对该 cDNA 进行了分析。分析统计结果表明, Lip I cDNA 序列中最长的一个开放阅读框架为 858 bp, 从 95 bp 位至 952 bp 位, 起始 ATG, 终止密码子 TGA, 编码 285 个氨基酸, 与邬敏辰的实验结果[15]完全一致。

2.7　PG37 Lip I 编码区密码子统计分析

采用 CHIPS 程序计算结果表明, PG37 Lip I

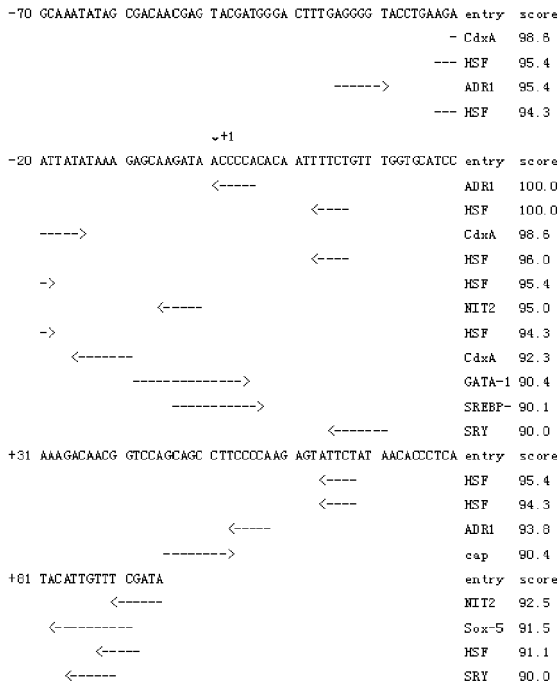


图 2　PG37 Lip I DNA 序列转录因子结合位点预测

Fig. 2　Prediction of the transcription factor binding sites in Lip I DNA sequence

编码区有效密码子数目 **ENc** 值为 48.32, 说明 Lip I 编码区不存在特别明显的密码子偏爱性。采用 CUPS、CodonW 程序及密码子数据库对 Lip I 编码区密码子进行了统计分析, 见表 3。统计结果表明: GCC、GCT、TGC 和 GAC 等 28 个密码子的 RSCU 值大于 1, 且 FCU 也较大, 为 Lip I 使用频繁的密码子, 其中 TGC、GAC、TTC、CAC、AAG、AAC 和 TAC 这 7 种密码子使用频率最高; 在 Lip I 基因与 *Pichia pastoris* 基因组中, 有 21 个密码子的使用频率比值相差较大。通过不同物种或基因间密码子使用频率比对, 可择优选择表达系统或改变密码子, 从而提高外源基因的表达。若某一密码子在 Lip I 基因中使用频率较高, 而在 *Pichia pastoris* 基因组中使用频率较低, 可以把此密码子突变为 *Pichia pastoris* 基因组中使用频率较高的同义密码

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

子,如将密码子 CAC 突变为 CAT,以提高 Lip I 组氨酸在 *Pichia pastoris* 中的表达量。但外源基因的表达受到多种因素的共同作用,如表达的蛋白是否是毒素、需要糖基化或其它修饰等,密码子使用的影响只是其中之一。

表 3 Lip I 密码子统计分析及与 *Pichia pastoris* 密码子比对

Tab. 3 Statistics on codon of Lip I and comparison with codon of *Pichia pastoris*

密码子	氨基酸	密码子个数	RSCU 值	Lip I FCU	*P. pastoris* FCU	FCU 比值
GCA	A	6	0.73	20.979	15.1	1.389
GCC	A	14	**1.7**	48.951	16.6	**2.949**
GCG	A	4	0.48	13.986	3.9	**3.586**
GCT	A	9	**1.09**	31.469	28.9	1.089
TGC	C	3	**1.5**	10.49	4.4	**2.384**
TGT	C	1	0.5	3.497	7.7	**0.454**
GAC	D	11	**1.47**	38.462	25.9	1.485
GAT	D	4	0.53	13.986	35.7	**0.392**
GAA	E	4	1	13.986	37.4	**0.374**
GAG	E	4	1	13.986	29	**0.482**
TTC	F	10	**1.67**	34.965	20.6	1.697
TTT	F	2	0.33	6.993	24.1	**0.29**
GGA	G	7	**1.12**	24.476	19.1	1.281
GGC	G	8	**1.28**	27.972	8.1	**3.453**
GGG	G	0	0	0	5.8	0
GGT	G	10	**1.6**	34.965	25.5	1.371
CAC	H	6	**1.71**	20.979	9.1	**2.305**
CAT	H	1	0.29	3.497	11.8	**0.296**
ATA	I	0	0	0	11.1	0
ATC	I	11	**1.83**	38.462	19.4	1.983
ATT	I	7	**1.17**	24.476	31.1	0.787
AAA	K	0	0	0	29.9	0
AAG	K	12	**2**	41.958	33.8	1.241
CTA	L	0	0	0	10.7	0
CTC	L	7	**1.91**	24.476	7.6	**3.221**
CTG	L	6	**1.64**	20.979	14.9	1.408
CTT	L	6	**1.64**	20.979	15.9	1.319
TTA	L	1	0.27	3.497	15.6	**0.224**
TTG	L	2	0.55	6.993	31.5	**0.222**
AAC	N	9	**1.38**	31.469	26.7	1.179
AAT	N	4	0.62	13.986	25.1	0.557
CCA	P	0	0	0	18.9	0

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

续表 3

密码子	氨基酸	密码子个数	RSCU 值	Lip I FCU	*P. pastoris* FCU	FCU 比值
CCC	P	3	**1.09**	10.49	6.8	1.543
CCG	P	2	0.73	6.993	3.9	1.793
CCT	P	6	**2.18**	20.979	15.8	1.328
CAA	Q	3	1	10.49	25.4	**0.413**
CAG	Q	3	1	10.49	16.3	0.644
AGA	R	2	**1.5**	6.993	20.1	**0.348**
AGG	R	3	**2.25**	10.49	6.6	1.589
CGA	R	0	0	0	4.2	0
CGC	R	1	0.75	3.497	2.2	1.59
CGG	R	0	0	0	1.9	0
CGT	R	2	**1.5**	6.993	6.9	1.013
AGC	S	6	**1.44**	20.979	7.6	**2.76**
AGT	S	0	0	0	12.5	0
TCA	S	1	0.24	3.497	15.2	**0.23**
TCC	S	5	**1.2**	17.483	16.5	1.06
TCG	S	4	0.96	13.986	7.4	1.89
TCT	S	9	**2.16**	31.469	24.4	1.29
ACA	T	2	0.33	6.993	13.8	0.507
ACC	T	12	**2**	41.958	14.5	**2.894**
ACG	T	0	0	0	6	0
ACT	T	10	**1.67**	34.965	22.4	1.561
GTA	V	1	0.18	3.497	9.9	**0.353**
GTC	V	10	**1.82**	34.965	14.9	**2.347**
GTG	V	7	**1.27**	24.476	12.3	1.99
GTT	V	4	0.73	13.986	26.9	0.52
TGG	W	2	1	6.993	10.3	0.679
TAC	Y	9	**1.5**	31.469	18.1	1.739
TAT	Y	3	0.5	10.49	16	0.656

注: 起始和终止密码子未统计在内; 黑体字表示 RSCU 值大于 1 的密码子; 下划线表示 Lip I 基因与 *P. pastoris* 基因组 FCU 比值≤0.5 或≥2 的密码子

3　结　语

1) 分多次 PCR 扩增和克隆了 PG37 Lip I 基因的相关片段, 并通过拼接获得了 Lip I 基因完整的 DNA 序列。该 DNA 序列全长 1 480 bp, 无重复序列, 转录起始位点位于序列的第 71 位, 含有 5 个内含子, 5′端存在 TATA box 和多个转录因子结合位点。

2) 由 PG37 Lip I DNA 序列推导的 cDNA 序列全长 1 128 bp, 包含了转录起始位点、5′和 3′非编码区和开放阅读框架, 后者编码 285 个氨基酸。

3) PG37 Lip I 编码区的 ENc 值为 48.32, 说明 Lip I 编码区不存在特别明显的密码子偏爱性; Lip I 编码区的 GCC、GCT、TGC 和 GAC 等 28 个密码子的 RSCU 值大于 1, FCU 也较大, 为 Lip I 使用频繁的密码子, 其中 TGC、GAC、TTC、CAC、AAG、AAC 和 TAC 这 7 种密码子使用频率最高。比对 Lip I 基因与 Pichia pastoris 基因组中的密码子使用频率, 其中有 21 个密码子使用频率的比值相差较大。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

参考文献(References):

[1] Hasan F, Shah A A, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases[J]. **Enzyme and Microbial Technology,** 2006, 39: 235-251.

[2] 王蕾, 蔡宇杰, 廖祥儒, 等. 一株碱性低温脂肪酶产生菌发酵条件的优化[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27: 114-119.
WANG Lei, CAI Yu-jie, LIAO Xiang-ru, et al. Optimization of fermentation conditions for a low-temperature lipase-producing strain[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology,** 2008, 27: 114-119. (in Chinese)

[3] 邬敏辰. 圆弧青霉 PG37 碱性脂肪酶的发酵生产、分离纯化及基因克隆和表达[D]. 上海: 复旦大学, 2000.

[4] 邓珊珊, 邬敏辰, 李江华, 等. 圆弧青霉 BD26 碱性脂肪酶基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34: 42-46.
DENG Shan-shan, WU Min-chen, LI Jiang-hua, et al. Cloning and expression of alkaline lipase gene from *Penicillium cyclopium* mutant in *Escherichia coli*[J]. **Food and Fermentation Industries,** 2008, 34: 42-46. (in Chinese)

[5] 侯琳, 钱敏平, 朱云平, 等. 转录因子结合位点生物信息学研究进展[J]. 遗传, 2009, 31: 365-373.
HOU Lin, QIAN Min-ping, ZHU Yun-ping, et al. Advances on bioinformatic research in transcription factor binding sites[J]. **Hereditas,** 2009, 31: 365-373. (in Chinese)

[6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[7] Kohany O, Gentles A J, Hankus L, et al. Annotation, submission and of screening repetitive elements in repbase: repbase submitter and censor[J]. **BMC Bioinformatics,** 2006, 25: 474.

[8] Lomsadze A, Ter-Hovhannisyan V, Chernoff Y, et al. Gene identification in novel eukaryotic genomes by self-training algorithm[J]. **Nucleic Acids Research,** 2005, 33: 6494-6506.

[9] Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, et al. Databases on transcriptional Regulation: TRANSFAC, TRRD, and COMPEL[J]. **Nucleic Acids Research,** 1998, 26: 364-370.

[10] Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database[J]. **Nucleic Acids Research,** 1999, 27: 297-300.

[11] Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T. Condon usuage tabulate form the international DNA sequence databases: status for the year 2000[J]. **Nucl Acids Research,** 2000, 28: 292-295.

[12] Wright F. The effective number of codons used in a gene[J]. **Gene,** 1990, 87: 23-29.

[13] 赵耀, 刘汉梅, 顾勇, 等. 玉米 waxy 基因密码子偏好性分析[J]. 玉米科学, 2008, 16: 16-21.
ZHAO Yao, LIU Han-mei, GU Yong, et al. Analysis of characteristic of codon usage in waxy gene of *Zea mays*[J]. **Journal of Maize Sciences,** 2008, 16: 16-21. (in Chinese)

[14] 沈庆航, 江明锋, 钟金城, 等. MUC1 基因遗传多态性与密码子偏好性的生物信息学分析[J]. 西南民族大学学报: 自然科学版, 2009, 35: 513-518.
SHEN Qing-hang, JIANG Ming-feng, ZHONG Jin-cheng, et al. The bioinformatics analysis of genetic polymorphism and code bias of MUC1 gene[J]. **Journal of Southwest University for Nationalities: Natural Science Edition,** 2009, 35: 513-518. (in Chinese)

[15] 邬敏辰, 朱劼, 黄伟达, 等. 圆弧青霉脂肪酶基因的克隆和表达[J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21: 218-223.
WU Min-chen, ZHU Jie, HUANG Wei-da, et al. Cloning and expression of the gene encoding alkaline lipase from *Penicillium cyclopium*[J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry,** 2002, 21: 218-223. (in Chinese)

[16] 马志杰, 魏雅萍, 钟金城, 等. 藏绵羊 GHR 基因 5′ 侧翼区序列特征分析[J]. 遗传, 2007, 29: 963-971.
MA Zhi-jie, WEI Ya-ping, ZHONG Jin-cheng, et al. Sequence characterization of the 5′-flanking region of the GHR gene in Tibetan sheep[J]. **Hereditas,** 2007, 29: 963-971. (in Chinese)

[17] Schaufler L E, Klevit R E. Mechanism of DNA binding by the ADR1 zinc finger transcription factor as determined by SPRJ[J]. **J Mol Biol,** 2003, 329: 931-939.

[18] 周颖君, 杨亦桦, 武淑文, 等. 棉铃虫细胞色素 P450 CYP9A12 基因 5′-上游区的克隆及序列分析[J]. 昆虫学报, 2008, 51: 120-125.
ZHOU Ying-jun, YANG Yi-hua, WU Shu-wen, et al. Cloning and sequence analysis of the 5′-upstream region of cytochrome P450 gene CYP9A12 of *Helicoverpa armigera*[J]. **Acta Entomologica Sinica,** 2008, 51: 120-125. (in Chinese)

(责任编辑: 李春丽)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net