

膀胱癌分子标志物基质金属蛋白酶 1 的可溶性表达和尿液中的活性分析

晋学飞¹ 孔祥波¹ 张丹² 刘婷婷³ 王凯臣^{* 1}

¹(吉林大学中日联谊医院泌尿外科, 长春 130023) ²(吉林大学中日联谊医院内分泌科, 长春 130023)

³(吉林省军队离退休干部疗养中心, 长春 130061)

摘 要 通过分离人胚胎肾细胞(HEK293) 中基质金属蛋白酶 1(MMP1) 基因序列, 利用基因工程技术在大肠杆菌中表达并纯化了包涵体复性的 MMP1; 采用融合表达硫氧还蛋白(Thioredoxin, TrxA) 的方法获得了可溶性的 MMP1-TrxA 复合蛋白, 在 TrxA 蛋白和 MMP1 活性中心之间引入了一个肠激酶切割位点, 通过酶切作用获得可溶性 MMP1。明胶酶谱分析法对体外表达的 MMP1 和体内(尿液中) MMP1 进行了分析比较。结果表明, TrxA 蛋白能够显著提高 MMP1 的可溶性, 且可溶性 MMP1 的明胶降解活性是复性的 MMP1 降解活性的 1.54 倍, 与尿液中的 MMP1 的明胶酶降解活性相当。因此, 明胶酶谱法是一种有效的、高灵敏的 MMP1 检测方法, 所表达的可溶性 MMP1 为小分子探针筛选提供了更可靠的分子靶点。

关键词 膀胱癌生物标志物; 基质金属蛋白酶; 分子探针筛选; 明胶酶谱

1 引 言

目前, 由膀胱癌引起的男性致死率处于上升趋势。尽管对膀胱癌的诊断和治疗技术已有了很大提高, 但膀胱癌患者的生存率仍然不佳, 迫切需要针对膀胱癌术后复发的诊断技术^[1]。寻找新型膀胱癌标志物, 开发非侵入性、高敏感性和特异性、操作简便、费用低廉的检测技术, 将提高膀胱癌的早期诊断水平, 达到及时治疗的目的^[2,3]。

基质金属蛋白酶(MMP) 也被称为间质胶原酶和成纤维细胞胶原酶, 同肿瘤的发生和发展过程密切相关, 在胰腺癌、前列腺癌、大肠癌和乳腺癌中的表达都有升高^[4,5]。有研究表明: 在膀胱癌患者尿液中, MMP1 可以作为新型生物标志物, 用于预测患者是否会发展为晚期或者高级膀胱癌^[6,7]。目前, 临床主要使用酶联免疫吸附分析法(ELISA) 对尿液样本中的 MMP1 进行检测, 但该方法耗时、尿样制备复杂, 容易导致蛋白降解以及蛋白酶失活。因此, 在膀胱癌诊断过程中迫切需要针对 MMP1 检测的简单、灵敏、快速的检测技术。

对基质金属蛋白酶的体外和体内检测方法主要有小分子荧光探针、免疫印迹分析和 ELISA 等^[8~10], 但是免疫印迹方法成本较高, 需要靶蛋白特异性抗体、内参抗体以及二抗, 检测费时费力, 且一次检测的通量有限。Wigner 等^[11]利用小分子荧光探针快速检测了尿液中 MMP9 和 MMP13 的水平。该方法将 MMPs 的活性同荧光检测技术巧妙结合, 具有高敏感性、快速、方便等特点, 适合不同生物样本的分析, 特别适合 MMPs 的高通量检测。目前, 尚没有适用于 MMP1 的小分子探针检测方法。Kleiner 等^[12]建立了一种基于非还原 SDS-PAGE 电泳和反相凝胶染色的蛋白酶检测方法, 即明胶酶谱法, 该方法成本低、简单, 适合血浆、组织细胞蛋白提取物或细胞培养上清液等多种生物样本的分析, 灵敏度与小分子荧光探针法相当^[13]。Roy 等^[14]将明胶酶谱进一步运用到尿液检测中, 并建立了一个基于不同尿液中 MMP9 活性指纹图谱进行分类的肿瘤分析鉴定方法。

重组蛋白表达是小分子荧光探针筛选的基础, 获得天然构象的重组蛋白一直是探针筛选过程的重点与难点, 利用明胶酶谱法可以对重组蛋白与内源蛋白进行评估, 以改进和加快分子探针的筛选进程。可溶性重组蛋白较包涵体复性蛋白更接近其天然构象, 而 MMP1 蛋白在大肠杆菌中重组表达很容易形

成包涵体,需要进行包涵体复性来获得活性蛋白。文献[5]采用特殊处理方法增加 MMP1 的可溶性表达,但是并没有分析可溶性 MMP1 同包涵体复性 MMP1 的区别以及同内源 MMP1 的关系。本研究尝试不同的表达载体,最终实现通过融合表达硫氧还蛋白(Thioredoxin, TrxA)的方法获得可溶性的 MMP1,并利用明胶酶谱法对体外表达的可溶性以及包涵体复性的 MMP1 进行了对比。研究结果证明, TrxA 可以明显提高 MMP1 的溶解性;同包涵体复性的 MMP1 相比,可溶性 MMP1 具有更高的明胶降解活性,更接近体内 MMP1 的活性。本研究为 MMP1 的小分子探针筛选提供了更可靠的分子靶点,证明了明胶酶谱法是一种有效的、高灵敏的 MMP1 检测方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

DYCZ-24DN 型电泳仪(北京市六一仪器厂); TCA0096 型 PCR 仪(美国 Thermo Scientific 公司); UV1800 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); HD-9706 型紫外检测仪(上海精科实业有限公司); BIO-RAD GelDoc 2000 凝胶成像系统(美国伯乐 BIO-RAD 公司)。

胎牛血清(Hyclone 公司); DMEM(Invitrogen 公司); pET-32a 载体(Novagen 公司); 分子生物学试剂均购自 TAKARA 公司,其它试剂均为分析纯。HEK293 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 中进行培养。

2.2 MMP1 的体外表达

2.2.1 MMP1 的 cDNA 克隆和表达质粒构建 用 Trizol 试剂分离 HEK293 细胞的总 RNA。利用正向引物(5'-ATGCACAGCTTTCTCCACTGC TG-3')和反向引物(5'-TCAATTTTTCCTGCAGTTGAACAG-3')逆转录 PCR 方法的通过 AMV RNA PCR 试剂盒扩增 MMP1 的 cDNA。使用正向引物(5'-ATGCCATG-GACGACGACGACAAGTTTGTCTCACTGA GGGGAAC-3')和反向引物(5'-CCGCTCGAGACGTC-CATATATGGCTTGG-3')通过 PCR 的方法扩增 MMP1 的催化结构域。扩增片段用 Nco I 和 Xho I 双酶切,连接到表达载体上。所有引物的合成以及 MMP1 基因阳性质粒基因测序由生工生物工程(上海)有限公司进行。

2.2.2 MMP1 蛋白表达 将表达载体转化大肠杆菌 BL21(DE3) 细胞。将转化的细胞接种到 3 mL LB 培养基中,180 r/min 过夜培养 12 h,第二天将菌液接种于含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素的新鲜 LB 培养基中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡(180 r/min)培养直到 OD600 为 0.6~0.8。0.4 mmol/L(可溶)或 1 mmol/L(包涵体)的 IPTG 加入到培养基中诱导构建重组蛋白质的表达;振荡(180 r/min)培养,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 2 h 或 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 4 h,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 6000 r/min 离心收集细胞,并用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)洗涤两次,收集沉淀,在-80 $^{\circ}\text{C}$ 下保存,待用。

2.2.3 可溶性 MMP1 和包涵体复性的 MMP1 的纯化 将可溶性表达蛋白经冷冻菌体沉淀,重新悬浮在含 1 mg/mL 溶菌酶的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)中,室温孵育 30 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12000 r/min 离心 30 min,收集上清液和不溶的细胞碎片,SDS-PAGE 电泳分析。得到的可溶部分在 20 mmol/L Tris-HCl 溶液(pH 7.5)中透析过夜。镍离子螯合琼脂糖亲和层析纯化含组氨酸标签的 TRX-MMP1 蛋白。收集洗脱的融合蛋白含量最高的组分并在裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0),0.5 mol/L NaCl)中透析过夜。用肠激酶裂解将 TrxA 标签从融合蛋白中移除,镍离子螯合层析柱纯化可溶性 MMP1。

对于包涵体蛋白质,冷冻细胞颗粒悬浮在 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)中,超声裂解细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12000 r/min 离心 10 min 收集包涵体,洗涤 3 次,包涵体溶解于含 8 mol/L 尿素的 20 mL 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)中,搅拌 2 h。在 4 $^{\circ}\text{C}$,12000 r/min 离心 10 min,上清液用 Ni 离子螯合层析纯化,收集高含量的包涵体蛋白组分,用缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)、10 mmol/L DTT 和 8 mol/L 尿素)稀释成大约 100 $\mu\text{g/mL}$ 蛋白质溶液。在不同浓度尿素(6,4 和 2 mol/L)的复性液(pH 7.5,50 mmol/L HEPES,100 mmol/L NaCl,10 mmol/L GaCl₃,20 $\mu\text{mol/L}$ ZnSO₄,0.05% Brij-35)中透析 2 h。最后在不含尿素的复性缓冲液中透析 12 h。

2.3 尿液 MMP1 的分离

取 4 mL 尿液,用截留分子量 50 kD 的 15 mL 超滤离心管(Millipore),经 4 ℃,5000 r/min 离心 30 min 并收集滤出液,截留分子量 10 kD 的 15 mL 超滤离心管,经 4 ℃,5000 r/min 离心 30 min,收集截留液并用 PBS 调整为 500 μL 浓缩样品(回收率大于 90%)。取 2.5 μg 总蛋白的浓缩样品进行明胶酶谱分析。

2.4 明胶酶谱分析

将 15 mg 明胶溶解在 10 mL 5% ~ 10% 的非还原变性 SDS-PAGE 分离胶中,将样品同上样液混合,不经煮沸,在无 DTT 条件下电泳;电泳结束后,用 2.5% Triton X-100 溶液洗涤 30 min,用含有 5 mmol/L CaCl₂ 的 50 mmol/L Tris 溶液(pH 7.5)洗涤 30 min;在 37 ℃,用含有 0.02% Brij-35 和 5 mmol/L CaCl₂ 的 50 mmol/L Tris 溶液(pH 7.5)孵育 18 h,用 0.1% 考马斯亮蓝 R250 染色液染色。

利用 Photoshop 软件对 MMP1 的明胶酶谱条带的灰度值进行定量分析。单位明胶酶活性定义为:在 37 ℃,孵育 18 h 后,能够产生明显的蛋白降解条带所需要的 MMP1 蛋白量。在相同蛋白浓度上样量的前提下计算相对明胶降解活性(RDR):

$$\text{RDR}(\%) = 100 \times (G_0 - G_s) / G_0 \quad (1)$$

其中, G_s 为样品的明胶降解条带的灰度值, G_0 为空白对照的降解条带灰度值。

3 结果与讨论

3.1 MMP1 表达载体的构建

MMP1 的催化结构域在 MMP 家族中既保留了 MMP1 的蛋白酶活性,同时具有较高的特异性,这一特点符合小分子探针筛选的靶点的要求。本研究克隆了 550 bp、30 kDa 的 MMP1 催化结构域,并尝试在不同的表达载体中获得更高活性的 MMP1 靶点,包括 pET-22b, pET-15a, pET-28a 和 pET-32a。结果表明, MMP1 在表达载体 pET-15a, pET-22b 和 pET-28a 中以包涵体形式表达,在 pET-32a 表达载体中以可溶性蛋白形式表达,这些结果表明 pET-32a 载体中的 TrxA 蛋白标签会增加 MMP1 在大肠杆菌中的可溶性。为了比较具有相同的蛋白质一级结构的可溶性 MMP1 和包涵体复性 MMP1 的活性,本研究在 Trx 蛋白和 MMP1 活性中心之间引入了一个蛋白酶切割位点,构建了一个修饰后的 pET-32a 载体(pET-32a⁺),并纯化了可溶性 MMP1 和包涵体复性的 MMP1,具体的 MMP1 的体外表达和纯化过程如图 1 所示。

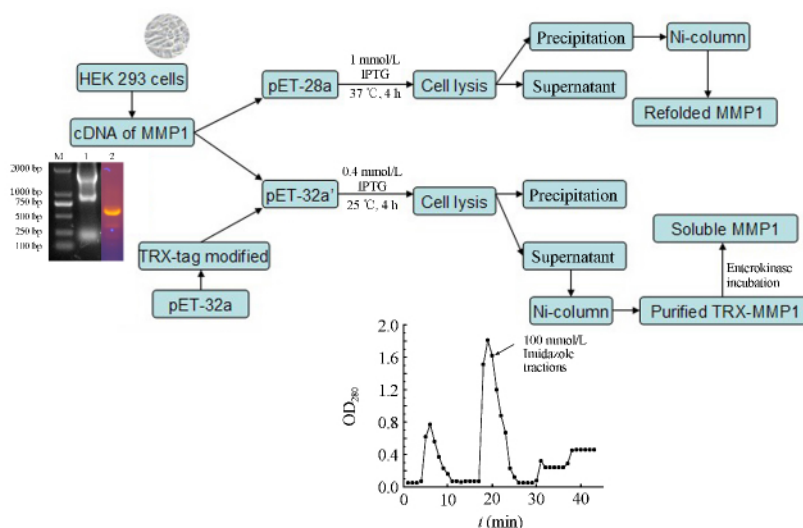


图 1 大肠杆菌中表达和纯化基质金属蛋白酶-1(MMP1)的流程示意图

Fig. 1 Schematic diagram of matrix metalloproteinase-1(MMP1) expression in *E. coli* and purification

3.2 重组 MMP1 的体外表达

通过包涵体复性的方法获得活性 MMP1 的研究已有很多报道,而关于可溶性表达 MMP1 的报导则很少^[4]。本研究在载体 pET-28a 中表达含有 His 标签的 MMP1 催化结构域蛋白(MMP1-His6)。结果

表明,在 37 °C 下,1 mmol/L IPTG 可以诱导 MMP1-His6 包涵体的形成。并且在 4 h 内,包涵体蛋白表达量随着时间的延长而增加。同时在 pET-32a⁺载体中表达 MMP1 融合蛋白(TRX-MMP1)。同 MMP1-His6 相比较,TRX-MMP1 在 MMP1-His6 之前含有 TrxA 蛋白,并且在 TrxA 和 MMP1 之间有一个肠激酶酶切位点。在 25 °C 下,0.4 mmol/L IPTG 可以诱导可溶性 TRX-MMP1 的表达,但是表达量在 2 h 后达到最大值(图 2)。SDS-PAGE 电泳结果表明, MMP1-His6 存在于菌体总蛋白中,而不存在于细胞裂解液上清液中,而 TRX-MMP1 在细菌总蛋白和细胞裂解液的上清液中都存在(图 3)。上述研究表明,TRX-MMP1 是以可溶形式表达的,而 MMP1-His6 是以包涵体形式表达的,TrxA 能够增加 MMP1 的可溶性表达,并且可溶性的 TRX-MMP1 表达同包涵体 MMP1-His6 相比,所需的诱导时间和 IPTG 诱导剂量均不相同。

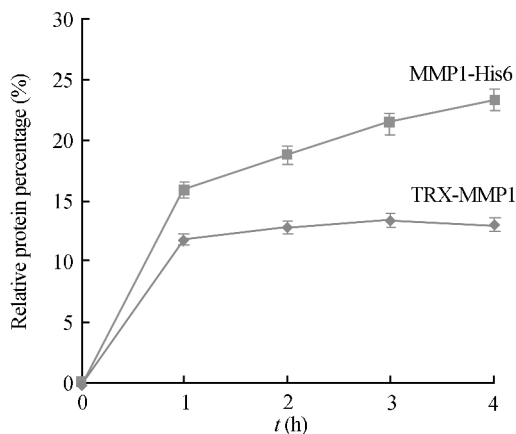


图2 诱导时间对 MMP1 可溶型和包涵体蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of induction time on the expression of TrxA-MMP1 and MMP1-His6

3.3 MMP1 纯化及明胶酶谱活性分析

MMP1-His6 和 TRX-MMP1 的 C-末端都含有 His

标签,可以通过镍离子螯合层析纯化。利用 8 mol/L 尿素溶液溶解 MMP1-His6 包涵体,将包涵体溶解液进行镍离子螯合层析,用含 100 mmol/L 的咪唑的洗脱液洗脱 MMP1-His6 蛋白,通过透析复性获得 20 kDa 大小的复性 MMP1 蛋白(图 4,泳道 3)。可溶性 MMP1(TRX-MMP1) 蛋白则表达在菌液裂解上清液中,将裂解上清液循环上样,通过镍离子螯合层析柱纯化出 30 kDa 的 TRX-MMP1 融合蛋白(图 4,泳道 1)。融合蛋白 TRX-MMP1 在 TrxA 标签蛋白和 MMP1 蛋白之间包含一个肠激酶酶切位点,通过肠激酶裂解后,TRX-MMP1 中 10 kDa 的 TrxA 标签蛋白以及可溶性 MMP1(图 4A,泳道 2)通过镍离子螯合层析分离纯化。结果表明,纯化的可溶性 MMP1 同包涵体复性的 MMP1 具有相同的分子量大小(图 4,泳道 2 和泳道 3)。对纯化的融合蛋白 TRX-MMP1 和可溶性 MMP1 进行明胶酶谱分析,表明两者都具有明胶降解活性(图 4,泳道 4 和泳道 5),而分离的 TrxA 标签并不含有明胶降解活性。同时,对可溶性 MMP1 和包涵体复性的 MMP1 活性进行明胶酶谱比较(图 4,泳道 5 和泳道 6 及图 5)。结果表明,可溶性 MMP1 的明胶降解活性为复性 MMP1 的 1.54 倍(明胶降解比率分别为 22.2% 和 14.4%)。由于尿液中存在 MMP2 和 MMP9,会干扰明胶酶谱的结果,通过超滤离心收集尿液中的 MMP1 组分,并移除尿液中高分子量 50 kDa 以上的蛋白组分(MMP2 和 MMP9 组分)。结果表明,sMMP1 的明胶降解活性几乎与体内 MMP1 的明胶降解活性一致(明胶降解比率分别为 22.2% 和 25%)。这些结果表明,可以通过融合 TrxA 蛋白实现 MMP1 在体外的可溶性表达,并且可溶性 MMP1 相对于包涵体复性的 MMP1 蛋白更高的明胶降解活性,接近体内 MMP1 的明胶降解活性。

4 结 论

本研究利用 TrxA 实现了 MMP1 在大肠杆菌中的可溶性表达,并利用明胶酶谱法比较了体外表达的

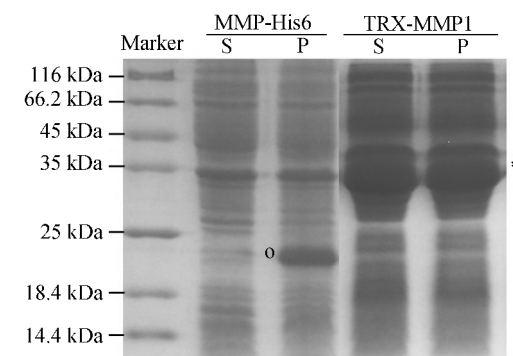


图3 在大肠杆菌中表达的包涵体和可溶性 MMP1

Fig. 3 Expression pattern of recombinant MMP1 proteins in *E. coli*

TRX-MMP1(*) 主要存在细胞裂解上清液(S) 中, MMP1-His6 (O) 表达在细胞裂解的包涵体沉淀(P) 中。

TRX-MMP1(*) mainly exists in the supernatant of cell lysate (S), and MMP1-His6(O) mainly exists in the inclusion precipitation (P).

MMP1 和体内 MMP1 的活性,结果表明,可溶性的 MMP1 活性高于包涵体复性 MMP1,更接近体内 MMP1 的活性。结果表明,可溶性的 MMP1 较包涵体复性的 MMP1 在小分子探针筛选中具有更大的优势,可为针对 MMP1 检测的小分子探针筛选提供更可靠的分子靶点。

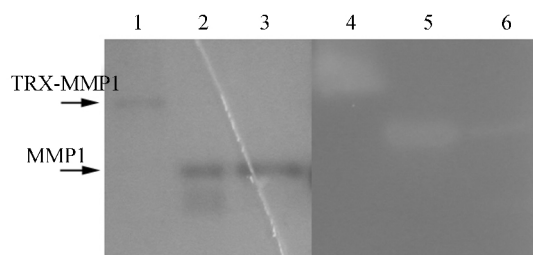


图 4 体外表达 MMP1 的纯化及明胶降解活性

Fig. 4 SDS-PAGE purification and gelatin-degradation activity analysis of in vitro expressed MMP1

SDS-PAGE 电泳分离检测 2.5 µg 的融合蛋白 TRX-MMP1(泳道 1)以及可溶性 MMP1(sMMP1,泳道 2)和包涵体复性的 MMP1(rMMP1,泳道 3)。明胶酶谱电泳检测 TRX-MMP1、sMMP1 和 rMMP1(泳道 4,5 和 6)。

lane 1, 2 and 3: SDS-PAGE separation of 2.5 µg purified fusion protein TrxA-MMP1, soluble MMP1 (sMMP1) and renatured inclusion MMP1 protein (MMP1-His6) respectively. Lane 4, 5 and 6 represents the gelatin-degradation analysis of purified TrxA-MMP1, sMMP1 and rMMP1 respectively.

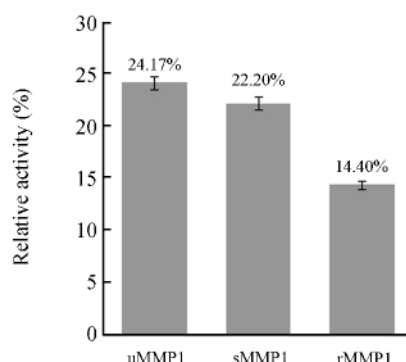


图 5 明胶酶谱分析体外表达的 sMMP1 和 rMMP1 和尿液中 MMP1(uMMP1) 明胶降解活性

Fig. 5 Gelatin-degradation activity of in-vitro expressed sMMP1, rMMP1 and in vivo MMP1 in urine(uMMP1)

References

- Wood S L, Knowles M A, Thompson D, Selby P J, Banks R E. *Nat. Rev. Urol.*, **2013**, 10(4): 206–218
- GAO Yuan, QIAO Guang-Ming, LI Na, GAO Lin-Hai, TANG Bo. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2011**, 39(12): 1926–1931
高源, 乔光明, 李娜, 嵯林海, 唐波. *分析化学*, **2011**, 39(12): 1926–1931
- Liao D, Li W, Chen J, Jiao H, Zhou H, Wang B, Yu C. *Anal. Chim. Acta*, **2013**, 797: 89–94
- Bostrom P, Soderstrom M, Vahlberg T, Soderstrom K, Roberts P, Carpen O, Hirsimaki P. *BMC Cancer*, **2011**, 11: 348
- LIU Xing-Chen, LI Hong-Wei, WANG Ye, JIANG Kun, FANG Xue-Xun, WU Yu-Qing. *Chem. J. Chinese Universities*, **2010**, 31(1): 88–93
刘星辰, 李洪伟, 王烨, 蒋坤, 房学迅, 吴玉清. *高等学校化学学报*, **2010**, 31(1): 88–93
- Durkan G, Nutt J, Rajjayabun P, Neal D, Lunec J, Mellon J. *Clin. Cancer Res.*, **2001**, 7(11): 3450–3456
- ZHU Feng-Ying, YU Ai-Na, QIU Yi-Hong, SA Ying-Long, WANG Fu. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2007**, 35(8): 1132–1136
朱凤英, 虞爱娜, 邱意弘, 撒应龙, 王复. *分析化学*, **2007**, 35(8): 1132–1136
- Lombard C, Saulnier J, Wallach J. *Biochimie*, **2005**, 87(3-4): 265–272
- Kupai K, Szucs G, Cseh S, Hajdu I, Csonka C, Csont T, Ferdinandy P. *J. Pharmacol. Toxicol. Met.*, **2010**, 61(2): 205–209
- Wang Y, Shen P, Li C, Wang Y, Liu Z. *Anal. Chem.*, **2012**, 84(3): 1466–1473
- Wigner N A, Kulkarni N, Yakavonis M, Young M, Tinsley B, Meeks B, Einhorn T A, Gerstenfeld L C. *Injury*, **2012**, 43(3): 274–278
- Kleiner D E, Stetler-Stevenson W G. *Anal. Biochem.*, **1994**, 218(2): 325–329
- Hughes A J, Herr A E. *Anal. Chem.*, **2010**, 82(9): 3803–3811
- Roy R, Louis G, Loughlin K, Wiederschain D, Kilroy S, Lamb C, Zurakowski D, Moses M. *Clinical Cancer Research*, **2008**, 14: 6610–6617
- Lu W, Zhu J, Zou S, Li X, Huang J. *J Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2013**, 28(4): 741–746

Soluble Expression of Recombinant Bladder Cancer Biomarker Matrix Metalloproteinase-1 and Analysis of Urinary Enzyme by Gelatin Zymography

JIN Xue-Fei¹, KONG Xiang-Bo¹, ZHANG Dan², LIU Ting-Ting³, WANG Kai-Chen^{* 1}
(*Department of Urinary Surgery¹, Department of Endocrinology, China-Japan Union Hospital²,
Jilin University, Changchun 130033, China*)
³(*The Retired People in Army Residents of Jilin, Changchun 130061, China*)

Abstract To obtain more efficient matrix metalloproteinase-1 (MMP1) targets for small-molecule fluorescence probe screen, the cDNA of MMP1 was isolated from human embryonic kidney 293 (HEK293) cells, and soluble expression of MMP1 has been performed and compared with recombinant MMP1 refolded from inclusion body in *E. coli* by genetic engineering. The activities of purified soluble MMP1 were compared with in-vivo MMP1 (urinary MMP1) by zymography. The soluble MMP1 was expressed as fusion protein of MMP1 and thioredoxin (TrxA-MMP1). By introducing a cleavage site in TrxA-MMP1 fusion protein, the soluble MMP1 was obtained through hydrolysis by enterokinase. The results exhibited TrxA could obviously increase the solubility of MMP1, and soluble MMP1 showed 1.54 fold of gelatin-degradation activity as the refolded MMP1, which was more close to the activity of urinary MMP1 (uMMP1). In conclusion, we successfully detected the activity of in vitro recombinant MMP1 and in vivo MMP1 by zymography, which was a more reliable target for small-molecule probe screen.

Keywords Bladder cancer biomarker; Matrix metalloproteinase; Probe screen; Gelatin zymography

(Received 18 August 2014; accepted 5 February 2015)

《精细化学品催化合成技术(下册):催化合成反应与技术》

陈诵英、赵永祥、王琴 编著

《精细化学品催化合成技术》分上、下两册,上册(第1~6章)为“绿色催化技术”,下册(第7~14章)为“催化合成反应与技术”。

本册(下册)在上册叙述精细化学品合成的绿色催化技术基础上详细介绍了各种类型催化剂参与的各种类型有机合成反应。包括在多孔本体和负载金属催化剂上使用氢气的有机化合物催化加氢和催化加氢裂解反应;在酸碱催化剂上进行精细化学品催化合成反应;使用分子氧和过氧化物作为氧源的催化氧化反应;使用手性辅助试剂催化合成手性化合物的反应;使用生物催化剂催化合成精细化学品的反应。

书 号: 9787122205292

定价: 168.0 元

出版时间: 2015 年 2 月

开本: 16 化学工业出版社出版