

密级:

论文编号:

中国农业科学院

学位论文

福寿螺多功能纤维素酶基因 *egx* 的克隆 与功能研究

**Clone and Fuctional Analysis of the Multi-fuction Cellulase gene
egx from Mollusc, *Ampullaria crosean***

硕士研究生: 谷 嵩
指导教师: 刘昱辉
申请学位类别: 理学硕士
专业: 分子生物学
研究方向: 分子生物学
培养单位: 生物技术研究所
研究生院

提交日期 2007 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences

Master Dissertation

Clone and Functional Analysis of the Multi-fuction Cellulase gene *egx* from Mollusc, *Ampullaria crosean*

Candidate: Song Gu
Advisor: YuHui Liu
Degree: Master of Science
Major: Biochemistry and Molecular Biology
Specialty: Graduate School of Chinese Academy
of Agricultural Sciences

Chinese Academy of Agricultural Sciences

June, 2007

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名： 时间： 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

研究生签名： 时间： 年 月 日

导师签名： 时间： 年 月 日

摘要

随着石化能源等不可再生资源的日益枯竭，人们试图寻找可以代替石化燃料的新型能源。利用纤维素酶将纤维素降解为简单糖，进而发酵生产乙醇，为新能源的开发提供了一个新方法。

本研究针对福寿螺 (*Ampullaria crossean*) 内源性多功能纤维素酶基因 *EGX* (Gene Bank Accession NO. AY285999)，以蛋白质二级结构 α 融合和 β 折叠为单位进行末端缺失，利用巴斯德毕赤酵母表达系统表达末端缺失蛋白片段，研究蛋白 N 端及 C 端 α 融合和 β 折叠的缺失对内切- β -1,4-葡萄糖苷酶 (E.C.3.2.1.4)、外切- β -1,4-葡萄糖苷酶 (E.C.3.2.9.11)、内切- β -1,4-木聚糖酶 (E.C.3.2.1.8) 活力的影响，研究其作用机理，为酶分子的蛋白质工程改造提供理论依据。

根据 *egx* cDNA 全长序列，设计了 7 对引物 5-1、5-2、5-3、5-4、5-5、3-1、3-2，用于 PCR 扩增末端缺失的基因片段。以 *EGX* 基因 cDNA 全长序列为模版，分别得到 1132bp、1089bp、1056bp、891bp、828bp、1044bp、921bp 片段，插入载体 pPIC9K，转化巴斯德毕赤酵母 GS115，甲醇诱导表达获得 7 种末端缺失蛋白：5-1 (N 端缺失一个 α 融合)、5-2 (N 端缺失 α 融合- β 折叠)、5-3 (N 端缺失 α 融合- β 折叠- α 融合)、5-4 (N 端缺失 α 融合- β 折叠- α 融合- β 折叠)、5-5 (N 端缺失 α 融合- β 折叠- α 融合- β 折叠- α 融合)、3-1 (C 端缺失 4 个 β 折叠)、3-2 (C 端缺失 4 个 β 折叠-2 个 α 融合)。完成了 7 种蛋白的内切- β -1,4-葡萄糖苷酶、内切- β -1,4-木聚糖酶、外切- β -1,4-葡萄糖苷酶活性测定。研究结果表明，5-1 的内切- β -1,4-葡萄糖苷酶、内切- β -1,4-木聚糖酶、外切- β -1,4-葡萄糖苷酶活性与 *EGX* 全长蛋白近似。5-2 的内切- β -1,4-木聚糖酶活性与 *EGX* 全长蛋白近似，内切- β -1,4-葡萄糖苷酶、纤外切- β -1,4-葡萄糖苷酶活性与 *EGX* 全长蛋白相比活性下降很多。5-3、5-4、5-5、3-1、3-2 的外切- β -1,4-葡萄糖苷酶、内切- β -1,4-木聚糖酶、外切- β -1,4-葡萄糖苷酶活性很微弱。

N 末端第一个 β 折叠到 C 端之间序列的完整性对内切- β -1,4-葡萄糖苷酶、外切- β -1,4-葡萄糖苷酶活性是重要的。N 端第二个 α 融合至 C 段之间序列的完整性对内切- β -1,4-木聚糖酶活性也是非常必要的。

在研究过程中，得到了 3 段 EST 序列，它们的蛋白序列分别含有 vWFA_subfam1nly_ECM, Peptidase_M41, FN3 结构域。

关键词：纤维素酶，*egx*，末端缺失

Abstract

The target gene is cDNA of *egx* from mullusc, *Ampullaria crossean* (Gene Bank Accession NO. AY285999). The EGX is a multi-fuctional cellulase with the activities of exo- β -1,4-glucanase (E.C.3.2.9.11), endo- β -1,4-glucanase (E.C.3.2.1.4) and endo- β -1,4-xylanase(E.C.3.2.1.8). Accoding to the full sequence of *egx* cDNA, a series of primers (5-1, 5-2, 5-3, 5-4, 5-5, 3-1, 3-2) were designed to amplify different fragment of *egx*. Seven deletions in different length of 1132bp, 1089bp, 1056bp, 891bp, 828bp, 1044bp, 921bp were obtained respectively. These DNA fragments were inserted into expression vector pPIC9K and expressed in *Pichia pastoris* GS115 strain. Seven truncated proteins were obtained which named 5-1 (lacking the structure of α helix of N terminal) ,5-2 (lacking the structure of α helix- β strand of N terminal), 5-3 (lacking the structure of α helix- β strand- α helix of N terminal), 5-4 (lacking the structure of α helix- β strand- α helix- β strand of N terminal), 5-5 (lacking the structure of α helix- β strand- α helix- β strand- α helix of N terminal), 3-1 (lacking the structure of β strand – β strand- β strand- β strand of C terminal) and 3-2 (lacking the structure of β strand – β strand- β strand- β strand- α helix of C terminal).

The activity assays of these seven truncated proteins were performed. The result indicated that the endo- β -1,4-glucanase, exo- β -1,4-glucanase and endo- β -1,4-xylanase activity of 5-1 were similar to that of the full length *EGX* protein. The endo- β -1,4-xylanase activity of 5-2 was similar to that of the full length *EGX* protein while the endo- β -1,4-glucanase and exo- β -1,4-glucanase decreased sharply. The endo- β -1,4-glucanase, exo- β -1,4-glucanase and endo- β -1,4-xylanase activity of 5-3, 5-4, 5-5, 3-1, 3-2 decreased greatly.

These results suggested that the sequence between the first β strand of N terminal and C terminal was important to the activities of the endo- β -1,4-glucanase and exo- β -1,4-glucanase. The sequence between the second α helix of N terminal and C terminal was important also.

Three EST (Expressed Sequence Tags) were obtained. According to blast them on NCBI (The National Center for Biotechnology Information) , three domains were found which were vWFA_subfamilly_ECM, Peptidase_M41, FN3.

Key word: cellulase, *egx*, truncated

目 录

第一章 引言	1
1.1 纤维素的利用	1
1.1.1 纤维素的结构	1
1.1.2 纤维素酶的应用	2
1.2 微生物和动物纤维素酶研究近况	4
1.2.1 纤维素酶分类	4
1.2.2 微生物纤维素酶结构	4
1.2.3 微生物纤维素酶降解模型	8
1.3 动物纤维素酶的研究	9
1.4 纤维素酶应用展望	10
1.5 毕赤酵母表达系统	10
1.5.1 毕赤酵母表达系统优点	10
1.5.2 毕赤酵母表达宿主菌	10
1.5.3 毕赤酵母表达载体	11
1.5.4 外源蛋白在毕赤酵母中的表达	11
本研究的目的和意义	12
技术路线	13
第二章 材料与方法	14
2.1 材料	14
2.1.1 动物材料	14
2.1.2 质粒和菌株	14
2.1.3 培养基	14
2.1.4 试剂和仪器	14
2.1.5 PCR引物	14
2.2 方法	16
2.2.1 质粒DNA的小量提取	16
2.2.2 DNA限制性酶切反应	16
2.2.3 DNA片段的电泳回收	17
2.2.4 DNA片段连接	17
2.2.5 大肠杆菌感受态细胞的制备	17
2.2.6 质粒DNA转化大肠杆菌	18
2.2.7 蛋白质的SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳	18
2.2.8 毕赤酵母电击感受态细胞的制备	19
2.2.9 酵母电击转化	20
2.2.10 酵母基因组的提取	20
2.2.11 酵母重组子的PCR检测	21
2.2.12 外源蛋白在毕赤酵母中甲醇诱导分泌表达	21
2.2.13 <i>egx</i> 基因末端缺失PCR	22
2.2.14 福寿螺组织RNA提取和反转录	22

2.2.15 考马斯亮蓝法测定蛋白质含量标准曲线绘制.....	23
2.2.16 纤维素酶活力测定.....	23
2.2.17 菌密度测定.....	25
第三章 结果与讨论.....	26
3.1 结果	26
3.1.1 福寿螺多功能纤维素酶 <i>egx</i> 基因的克隆	26
3.1.2 表达载体的构建.....	28
3.1.3 酵母转化及重组子表型筛选.....	30
3.1.4 酵母重组子的PCR检测	30
3.1.5 PCR阳性重组子的表达	31
3.1.6 酶活力的计算.....	32
3.1.7 全长序列末端缺失片段的扩增.....	32
3.2 讨论	41
3.3 EST片段克隆结果和分析	46
第四章 全文结论	51
参考文献	52
致谢	57
作者简历	58

第一章 引言

纤维素是地球上资源最丰富、最廉价的可再生资源。植物每年通过光合作用，可以产生 15.5×10^{10} 吨的纤维素类物质，其中纤维素、半纤维素约占一半以上(汪维云 等,1996)。人类活动也产生大量的纤维素类物质，比如建材、造纸等。虽然纤维素的开发利用早已引起人们的重视，但目前其利用率仅有1%左右(张平平等,2004)。除极少数部分作为饲料、燃烧和农业渣肥为人们所利用外，绝大部分废物都未被利用，这不仅造成极大的资源浪费，而且有可能造成环境污染。随着现代工业的发展，世界人口激增，能源的短缺越发严峻。1998年，Campbell和Laherrere(Campbell B A , Laherrere J H, 1998)对现有石油储备和石油储量进行估计后认为，2010年天然油产量开始下降，到2050年全球每年石油供应量将从目前的25亿桶下降至5亿桶。纤维素以其巨大的自然资源贮备逐渐受到人们的青睐。因此，如何有效地利用纤维素，使之转化为人们可以利用的能源和物质，一直是中外学者关注的课题。利用纤维素酶降解纤维素的优点在于特异性高，反应条件温和，环境污染小。对纤维素微生物的研究始于1912年，到现在大致经历了3个发展高峰期(王祖农,1986)：五十年代以前主要是研究防止微生物对天然纤维素的破坏作用；六十年代到七十年代针对世界人口的剧增，主要研究利用纤维素资源生产单细胞蛋白；七十年代以后，随着能源危机和环境污染，研究的重点逐步转移到开辟新能源和防止环境污染上来。近些年动物内源性纤维素酶的发现，其不同于微生物纤维素酶的分子结构，更为纤维素酶的应用提供了新的思路。目前限制纤维素生物转化的因素主要是生物转化成本高和降解酶的效率低。随着分子生物学技术的快速发展，纤维素酶基因的克隆、作用机理的研究和结构改造逐渐成为近年来的研究热点。

1.1 纤维素的利用

1.1.1 纤维素的结构

纤维素分子是由D-葡萄糖残基以 β -1,4-糖苷键相连接的结构复杂的结晶分子。纤维素具有 $(C_6H_{10}O_5)_n$ 的结构式，其中n为葡萄糖残基数量，称为聚合度(DP)。纤维素分子的聚合度变化很大，从几百至几千甚至几万，一般为8000~10,000(孟雷 等,2002)。纤维素结晶分子先由基本单元构成直链分子，大分子经折叠形成具有高结晶度的纤维素基本单位，再由这些基本单位构成微小的结构单位，最后由这些结构单位构成自然界中种类各异、长短不同、千差万别的纤维素。纤维素巨大的分子聚集体存在很多结晶变体。迄今为止，已发现固态纤维存在五种结晶变体，五种变体各自有独特的晶胞结构(汪为云 等,1998)。

天然纤维素由排列整齐而规则的结晶区域和相对不规则、松散的无定形区域组成。纤维素分子之间存在着氢键。在结晶区域，纤维素分子平行排列，通过氢键的缔合作用，形成纤维束。结晶区分子密度大，排列紧密。无定形区域纤维素分子密度小，排列松散，分子空隙大，定向性差。结晶程度对纤维素的水解影响很大。结晶度高的区域分子间空隙小，葡萄糖分子的羟基或在分子内部或与分子外部的氢离子相结合，没有游离的羟基存在，所以生物大分子和水分子很难介入。因此结晶区比无定型区难降解。普遍认为，纤维素的酶解优先发生在无定形区域(张平平

等,2004)。此外,天然的纤维还含有约 40%-50%半纤维素、木质素,紧紧包裹着纤维素分子(周正红等,1998) 并且与半纤维素有共价关系形成较复杂的网状结构,阻碍酶与纤维素的接触(王玉万 等,1989)。这可能是天然纤维难以被纤维素酶降解的原因之一。

一般实验室研究中常用的纤维素底物有:纤维素粉、水杨苷、结晶纤维素或微晶纤维素、羧甲基纤维素及其钠盐、羧乙基纤维素、对-硝基酚- β -葡萄糖苷、无定形纤维素、纤维四糖、硫酸纤维素、硼酸膨润纤维素、纤维糊精和脱脂棉等。自然界的天然底物有:木浆、糠醛渣、木屑、稻草(蔗渣、麦秆、稻壳、花生壳粉等)、滤纸、木浆纸、啤酒滤饼、制糖工业甜菜废丝等(王巧兰 等,2004)。棉花结晶度为 80-90%,聚合度为 3,500-10,000(宋桂经,1997),是纤维素中最完善、抗性最强的形式。滤纸是一种多重底物,既有自由末端和无定型区也有结晶纤维。一般而言,对天然底物进行化学预处理可以提高底物对酶的敏感性,例如经酸中和脱碱处理的稻壳酶解转化率比未经处理的提高约 3-4 倍(王淑军 等,1995)。

半纤维素含有一种或几种糖基,比如 D-木糖基、D-甘露糖基、D-葡萄糖基等,其他糖基作为支链连接于主链之上。半纤维素与纤维素在化学结构上的不同主要表现在:分子含有不同的糖基,主链可由一种糖基组成也可能有几种不同的糖基组成,分子链短且存在侧链。木聚糖是半纤维素中的主要组成成分(Beguin P.,1994)。

1.1.2 纤维素酶的应用

纤维素酶现在已经被广泛应用于食品、酿酒、纺织、洗衣、农业、饲料加工等诸多领域。

在食品工业中,纤维素酶被应用于提取水果汁和蔬菜汁。生产果汁的原料,有很多水果是极易腐烂的。许多热带水果不仅难于压榨,而且其果汁带有难以调和的酸涩味,不适用于单独制作果汁饮料,必须要稀释,和其他水果果汁一起调和口味。然而,有些热带水果和其他果汁一起调和后口感非常好。这样的水果比如杏、桃、梨、李子、芒果、番石榴、番木瓜和香蕉。纤维素酶的使用不仅可以提高果肉的稳定性,质地和使果汁易于浓缩,而且还可以降低果汁的黏度,提高浸出率,减低浸出时间,提高营养价值(Grassin C,1996)。近些年,随着人们愈加关注健康,国际市场对橄榄油的需求日益高涨。萃取橄榄油的过程包括:(1)用压榨机压碎,碾磨橄榄。(2)将碾碎的糊状碎块送入搅拌器搅拌。(3)高速离心,获得橄榄油(Galante YM,1998)。通常 100 千克橄榄可以压榨出 16-20 千克橄榄油。橄榄油的等级以含有的游离脂肪酸(FFA)含量划分(Galante YM,1998),极纯的(<1%FFA),纯(1-3%FFA)的和普通的。Olivex (Fantozzi P,1977) 是第一个用于提高橄榄油萃取率的商业混合酶制品,它主要由从 *Aspergillus aculeatus* 分离出的果胶酶,纤维素酶和半纤维素酶组成。此后,在意大利南部应用的商业酶 Cytolase O,成功地将橄榄油产量每吨提高 1-2 千克(Galante YM,1998)。生物酶组合的使用还可以增加极纯品质的橄榄油中的抗氧化剂含量,减少腐臭变质(Galante YM,1998)。显然,纤维素酶与其他生物酶一起,成为水果和蔬菜汁生产加工环节中的重要角色。

啤酒、葡萄酒的酿造技术历史悠久。啤酒发酵包括大麦的发芽,麦芽汁的发酵,而葡萄酒需要从葡萄中提取葡萄汁,并且利用酵母菌发酵。酶技术在这些发酵过程中扮演着关键的角色。发酵中添加额外的葡聚糖酶和多聚糖酶不仅可以提高啤酒和葡萄酒的质量,而且还可以全面地提高生产效率(Galante YM,1998)。由于季节变化,大麦种类和品质不同,麦芽汁中活性酶含量也不

尽相同。有些大麦品质较低，麦芽汁中酶活性不足，影响啤酒的品质与口感。麦芽汁中有 6-10% 非淀粉多聚糖，主要是 β -葡聚糖。这会使麦芽汁在发酵时结块，降低流速，以致难以过滤，降低产量，并且有可能最终导致产品浑浊。人们通常通过向麦芽汁发酵物中添加微生物 β -葡聚糖酶来解决这个问题。一般使用的 β -葡聚糖酶主要来自 *Penicillium emersonii*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* 和 *Trichoderma reesei* (Galante YM,1998)。Oksanen 等发现，*Trichoderma* 纤维素酶系统的内切纤维素酶 II 和 纤维二糖水解酶 II 可以有效地降低麦芽汁的聚合度和黏度。每公斤谷物加入 0.05-0.1 毫升商业化的 *Trichoderma* 纤维素酶就可以降解 90% β -葡聚糖，节约 30% 的过滤时间 (Oksanen J et al,1985)。*Trichoderma* β -葡聚糖酶被认为是从低质量麦芽中生产高品质啤酒最合适的酶 (Canales AM et al,1988)。

纤维素酶制剂也广泛应用于动物饲养行业。据报道(Beauchemin K A,1995; Rode L M,1999; Schingoethe D J,1999; Kung L,2000)，在奶牛饲料中添加纤维素酶制剂不仅可以提高饲料的利用率，而且还可以提高奶产量。Beauchemin 等(Beauchemin K A et al)对 16 头杂交奶牛进行研究发现，饲料中添加纤维素酶制剂的奶牛较常规饲喂的对照组每天摄入干物质质量增加 1.6kg，而且奶产量每天增加 1.3kg，增幅 4.2%。Nsereko (Nsereko V L et al,2002)指出，在奶牛饲料中添加纤维素酶制剂可以显著增加瘤胃微生物数量。此外，纤维素酶还被用来做生物洗涤。1998 年梁如玉等(梁如玉 等,1998) 利用纤维素酶水解经硫酸和高温高压预处理的啤酒槽，100 克干啤酒槽水解得到了 10.8 克还原糖。纤维素酶亦可在处理有机垃圾方面发挥重要作用 (Camp,Mcsweeney et al,1989)。

纤维素酶应用于纺织行业才不到 20 年，但是在 2000 年就已经成为纺织业第三大工业用生物酶。纤维素酶在纺织业中主要被用来生物打磨和生物抛光。应用纤维素酶进行生物打磨可以降低手工打磨的破损率，缩短处理时间，减小工作强度，并有利于工作环境的安全。生物抛光可以去除布料上细小的纤维碎屑，使衣物表面平滑，提高色彩光亮和均匀性，提高衣物吸汗和亲水性能。生物抛光已经成为生产高质量衣物的关键环节。纤维素酶还可以提高洗涤衣物的效果，降低洗涤成本(M.K.BHAT et al,1997)。

随着石化燃料等不可再生资源的日益枯竭，纤维素资源的利用也为人类开拓新型能源提供了一条新思路。纤维素可以由纤维素酶降解成简单糖，再由简单糖发酵生产乙醇，将大大地缓解目前的能源不足。从上世纪 80 年代开始，人们就将乙醇掺入汽油中以代替纯汽油使用(Sun Y et al,2002)。但是为了满足市场竞争的需要，生产 1 加仑乙醇，所用的纤维素酶成本应该低于 7 美分。细菌和真菌中纤维素酶水解微晶纤维素的能力非常强，但是其酶复合物的分子量十分巨大，单个组分没有水解纤维素的能力，因此要实现由纤维素物质到乙醇的转化，需要尽量将复杂的水解系统简化。即找到一种具有高比活力的纤维素酶。并且要利用基因重组技术筛选到高比活力的重组型纤维素酶。Suzuki K 等已经从甲虫中克隆到一种葡聚糖内切酶，其水解所甲基纤维素的比活力高达 150IU/mg(Suzuki K et al,2003)。

1.2 微生物和动物纤维素酶研究近况

1.2.1 纤维素酶分类

纤维素酶根据其催化反应功能的不同可分为三种：葡聚糖内切酶（endo- β -1,4-glucanase, E.C.3.2.1.4）（来自真菌的简称 EG，来自细菌的简称 Cen）作用于纤维素非结晶区水解 β -1,4-糖苷键，生成较短的纤维寡糖和大量的非还原末端；葡聚糖外切酶(exdo- β -1,4-glucanase, E.C.3.2.9.11)，也称外切纤维素酶（exocellulase）、外切葡聚糖酶（exoglucanase）、纤维二糖水解酶（cellobiohydrolase）（来自真菌的简称 CBH，来自细菌的简称 Cex），作用于纤维素分子游离末端水解 β -1,4-糖苷键生成纤维二糖和葡萄糖； β -葡萄糖苷酶（ β -glucanase, E.C.3.2.1.21）（简称 BG），将纤维二糖水解成葡萄糖。

在半纤维素酶中，木聚糖酶是研究最多的一种。木聚糖酶同样由多种酶组成，主要有内切- β -1,4-木聚糖酶（endo- β -1,4-xylanase, E.C.3.2.1.8）和 β -木糖苷酶（ β -xylosidase, E.C.3.2.1.37），其次还包括多种侧链水解酶，比如 α -L-arabinofuranosidase (E.C.3.2.1.55) 和 α -glucuro-nidase (E.C.3.2.1.1)，水解糖单元上各种酯化基团的酯酶，比如 acetylxyran esterase (E.C.3.1.1.6), ferulic acid esterase (E.C.3.1.1.1) 和 *p*-coumaric acid esterase (E.C.3.1.1.1)。各种酶协同作用才可将木聚糖转化为简单糖（图 1-1）(Sunna A., 1997; Beg Q.K., 2001)。

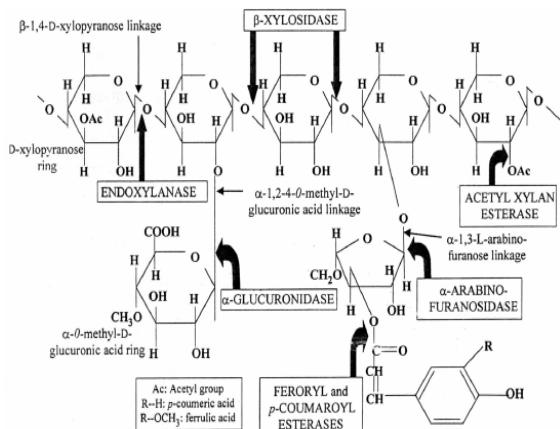


图 1-1 木聚糖各组分的协同作用
(王骥 等,2004)

1.2.2 微生物纤维素酶结构

大多数微生物纤维素酶都有一个或几个催化结构域（catalytic domain,CD）和纤维素结合结构域(cellulose binding domain,CBD) 组成。由一段柔性的连接肽(lingker peptide)连接 CD 与 CBD。连接肽的存在可以给予酶分子良好的韧性，使 CD 有更多的机会接触纤维素链(Irwin D *et al*,1993)。由于连接肽易于暴露于水中，易受到蛋白酶的水解，所以这段肽链常被 O-glycosilated 糖基化。真菌的连接肽富含 Pro、Thr、Ser，并且比细菌的小，大约有 30-40 个氨基酸残基组成，细菌的约

有 100 个氨基酸残基(Cavaco-Paulo A *et al*,1999)。*Trichoderma* CBH I 隧道扫描纤维图像如图 1-2。

纤维素酶高效的催化活力来自于完整的拓扑结构。高培基实验室 (高培基,2003) 利用基因重组技术, 将底物亲和力高的瑞氏木霉 EGIII 的 CBD 与催化能力强的 EG I 的 CD 区杂交, 组成重组的酶分子。结果显示杂合酶的比活力和对纤维素的吸附能力都显著低于两亲本。从而推测 (高培基,2003) (1) 重组的酶分子由于其氨基酸序列的改变, 不能折叠成同各自亲本一样的三维结构域;

(2) 两个不同来源的结构域打乱了其在亲本分子中结构域之间的协同作用关系, 从而使杂合酶活性显著下降。

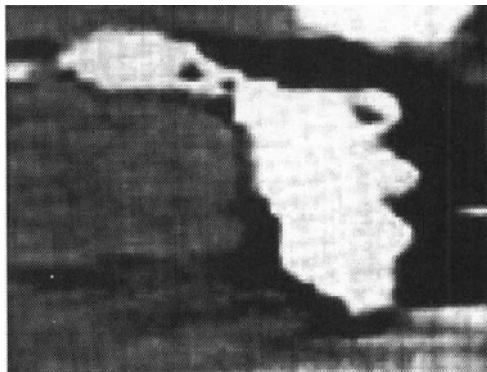


图 1-2 纤维素酶 CBH I 分子隧道扫

描纤维图像 (高培基, 2003)

$I_{ref}=0.19\text{nA}$ $V_{bias}=180\text{mV}$ 扫描范围:

36nmX36nm

所有已知的纤维素酶的 CD 根据其氨基酸序列可以分为 70 个家族, 同一家族内的纤维素酶具有相似的分子折叠方式和保守活性位点, 因此它们也可能具有相同的反应机制 (Yang Y B *et al*,2004)。这已通过比较 15 种来自 3 个家族的酶解实验中得到了支持(Lingder M *et al*,1997)。人们利用 X 光衍射的方法对纤维素酶的 CD 进行分析, 1990 年 Rovinen (Rouvinen J,1990) 对 *T.reesei* 的 CBH II 的催化结构域、1992 年 Juy (Juy M,1992) 对 *C.thermocellum* 的 CelD 的催化结构域、1993 年 Spezio (Spezio M,1993) 对 *T.fusca* E2 的催化结构域、1994 年 Divne (Divne C,1994) 对 *T.reesei* CBH I 的催化结构域进行结晶和 X 光衍射分析。从而对内切酶和外切酶的底物特异性作出了较为合理的解释(阎伯旭,1999): 纤维素内切酶的活性位点位于一个裂隙 (cleft) 中, 它可以“夹”在纤维素链的任意位置并切断纤维素链。纤维素外切酶的活性位点位于长环状(loop)的隧道(tunnel)里面, 它只能从纤维素非还原末端切下纤维二糖。例如 *Trichoderma reesei* CBH II 的催化结构域, 它是由 5 个 α 螺旋和 7 条 β 链组成的筒状结构, 长度大约 2nm(Te'o V,1998); *Thermomonosporafusca* EG2 与 *Trichoderma reesei* CBH II 同属一个家族, 但活性部位的结构却有显著不同。它的活性位点表面没有环覆盖的结构, 因此看起来更像一个“沟槽”, 而不是一个“隧道”(Cooper V,2000)。所有属于 EG 家族的环结构都缺失, 而所有属于 CBH 家族却正相反, 都有一个环结构(杨永彬,2004)。1995 年, Meinke 利用蛋白质工程的方法将 *C. fimi* 的外切酶 CbhA 分子的 Loop 删除后, 发现该酶的活性提高。这进一步证实了上述分析(Meinke A,1995)。综上所述, 外切纤维素酶的活性中心是陷入其催化结构域内的隧道状结构, 游离的单链纤维素分子“插”入其中, 由催化活性位点在单链纤维素的末端一次切下一个纤维二糖分子(Teeri T T,*et al*,1998); 内切纤维素酶的催化结构域更像是“骑”在纤维素分子上, 随机内切, 水解出纤维寡糖(Yan B X,*et al*,1997; 阎伯旭 等,1998) (图 1-3)。催化结构域催化底物的机制与溶菌酶相似, 遵循双置换机制(Sinnott M L,1990)。其保守区

域两个羧基氨基酸分别作为质子供体和亲核试剂 (Tomme P *et al*,1995; Kraulis P J,1987)。

CBD通常位于酶肽链的N端或者C端。细菌的CBD较大, 约有63~240个氨基酸残基, 而真菌只有30~40个氨基酸残基。CBD的作用是使纤维素酶吸附到纤维素分子表面, 提高纤维素表面的催化结构域的局部浓度。也有人认为CBD能促使结晶纤维素产生游离的单链纤维素分子, 从而有利于催化结构域与之作用(Lingder M *et al*,1997)。1989年, Kraulis (Kraulis P J,1987) 利用核磁共振方法对*T.reesei* CBH I 的CBD进行分析, 1995年Xu (Xu G Y,1995)对*C.fimi* Cex的CBD三维结构进行研究, 1996年Tormo (Tormo J,1996) 用X光衍射的方法对*C.thermocellum* 的Cip的CBD进行研究, 比较这些研究成果后发现, 虽然它们在分子大小和肽链折叠方式上不尽相同, 但是在纤维素的吸附面上都比较平坦, 暴露了几个芳香族氨基酸残基。比如, *T.reesei* CBH I 的CBD是一个楔形不规则的 β 折叠结构, 疏水面的三个保守的Tyr残基与纤维素分子的结合有关。而*C.fimi* Cex的CBD则是两个 β 折叠片形成的类似“三明治”的结构, 与吸附有关的保守氨基酸残基是两个Trp (图 1-4)。去除掉CBD后纤维素酶对可溶性底物活力影响较小, 而对结晶纤维素的吸附和水解活力则有明显降低 (Gilkes N R,1988)。通过化学诱变和定点突变替换掉吸附面上的芳香族氨基酸残基 (Linder M,1995a; Linder M ,1995b), 突变的CBD对结晶纤维素的吸附能力急剧下降。高培基利用扫描隧道显微镜观察到经外切纤维素酶CBD作用后, 微纤维间的排列表现为无序化和单一基元纤维分离的情景 (图 1-5) (高培基,2003)。这恰好证明了纤维素酶的CBD结构域可以使结晶纤维素分子间氢键断裂, 分离出单一链的游离纤维素分子, 有利于催化结构域CD水解。目前人们推测 (Tormo J,1996), CBD可能通过芳香环与葡萄糖环的堆积分力吸附到纤维素上, 由其他的氨基酸残基与相邻的葡萄糖环形成氢键, 将单个纤维素链从纤维束中解离下来。只有少数微生物和高等植物产生的纤维素酶不具备这类结构, 如*Trichoderma reesei* EG的EG3 就没有CBD结构域 (Lingder M *et al*,1997)。*Humicola insolens*的EG5 和*Cellulomonas fimi*的CenEG都未发现有CBD结构 (Azevedo H *et al*,2000)。此外, *Trichoderma reesei* 的CBH1 和EG1 在没有CBD的情况下仍然具有水解纤维素酶活性 (Zhang Y Z, *et al.*,1998)。由此推测, 对于有些外切和内切纤维素酶, CBD结构域不是必需的。另外, Reese等猜想应该存在破坏氢键的氢键酶, 但一直未得到实验的证实 (高培基,2003)。1994年, MacQueen-Mason (McQueen-Mason S,1994) 等在黄瓜胚轴中分离出一种蛋白质, 它可以使植物细胞壁伸长, 也可以使滤纸强度减弱, 但无还原糖产生。高培基实验室从*T.pseudokoningii*滤液中分离到一种 24×10^4 , pI为 7.0。红外光谱线时它可使棉纤维膨胀, 但无还原糖产生 (高培基,2003)。关于氢键酶的研究还在进行中。

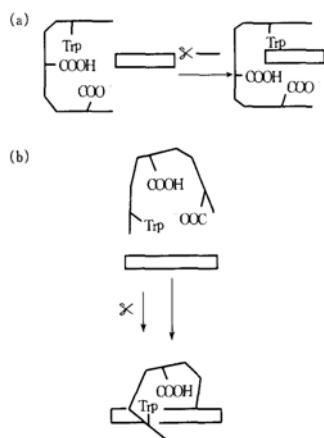


图 1-3 内切、外切纤维素酶示意图[17,18]
 (a) 外切纤维素酶与底物作用 (b) 内切纤维素酶与底物作用

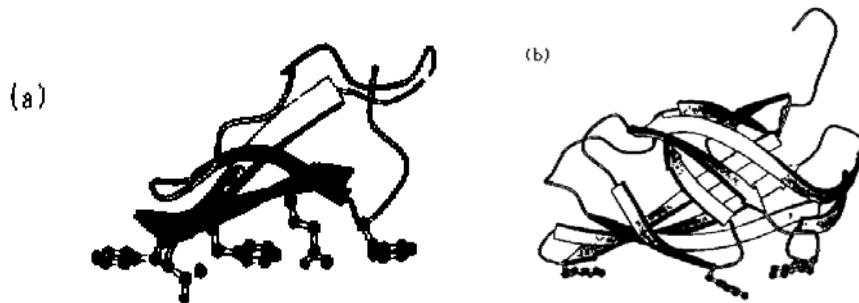
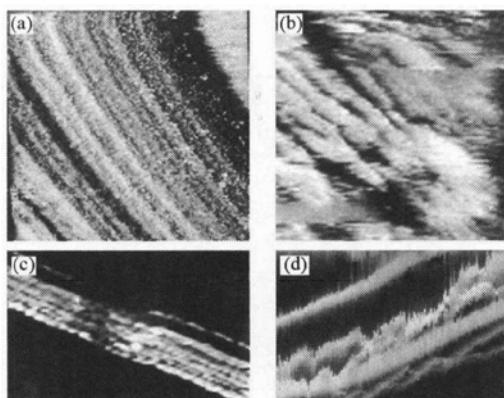


图 1-4 CBH 的骨架结构(阎伯旭,1999)
 (a) *T.reesei* CBH I 的 CBD (b) *C.fimi* Cex 的 CBD



(a) 天然棉纤维 $I_{ref}=0.28\text{nA}$, $V_{bias}=420\text{mV}$, 扫描范围: $32\text{nm} \times 18\text{nm}$
 (b) CBH I吸附结构域作用后纤维间的排列无序化
 $I_{ref}=0.1\text{nA}$, $V_{bias}=266\text{mV}$, 扫描范围: $24\text{nm} \times 14\text{nm}$
 (c) CBH I吸附结构域作用后单一基元分离的情景
 $I_{ref}=0.1\text{nA}$, $V_{bias}=187\text{mV}$, 扫描范围: $60\text{nm} \times 41\text{nm}$
 (d) 在CBH I和EG I协同作用下, 棉纤维结构完全
 被破坏 $I_{ref}=0.28\text{nA}$, $V_{bias}=420\text{mV}$, 扫描范围: 80nm
 $\times 46\text{nm}$

图 1-5 棉纤维的隧道显微镜图像
 (高培基,2003)

1.2.3 微生物纤维素酶降解模型

1950 年, Reese 等人提出了 C₁-C_X 假说, 提出 C₁ 酶先将结晶纤维素降解成无定形纤维素, 然后再由 C_X 酶降解成纤维二糖, 最后由 β -葡萄糖苷酶将纤维二糖水解成葡萄糖。但是在随后的研究中发现, C₁、C_X 和 β -葡萄糖苷酶必须同时存在才能水解天然纤维素。若先用 C₁ 酶作用结晶纤维素, 然后除掉 C₁ 酶, 再加入 C_X 酶, 如此顺序作用不能将结晶纤维素水解 (高才昌 等, 1984; 王祖农, 1986)。

纤维素酶是如何与纤维素分子结合的, 如何把高度结晶的纤维素水解, 这种水解作用的过程还未被完全阐释。通常认为纤维素酶将纤维素降解成葡萄糖需要三种酶的协同作用: 葡聚糖内切酶附着在可及度较高的无定型区, 随机地切断纤维素链, 产生大量的还原性末端和非还原性末端。再由葡聚糖外切酶从这些末端起始逐步切割纤维素长链。葡聚糖外切酶的水解作用会产生大量的纤维二糖, 高浓度的纤维二糖对葡聚糖外切酶的水解会产生抑制作用。 β -葡萄糖苷酶可以将纤维二糖水解为葡萄糖, 从而解除这种抑制 (图 1-6) (Beguin P., 1994)。

另外, 高培基等发现 (高培基, 2003), 纤维素酶解过程中微纤维排列和取向的无序化是纤维素难以酶解的一个重要原因。在酶解过程中不断补入新鲜酶液并不能提高酶解效率, 而纤维素结晶度基本保持不变的情况下, 纤维素酶的吸附效率大大降低 (高培基, 2003)。这可以基本排除酶失活和纤维素结晶度增加的因素。在酶解过程中, 纤维晶格会发生改变 (高洁, 1996), 变得更短, 堆砌更紧密, 在热力学上更稳定。一个纤维素酶分子吸附纤维时, 其宽度要跨越 2-4 根纤维 (Zhang Y Z, 1997; 张玉忠, 1997), 纤维素排列间隙的加大和取向无序化都会造成纤维素酶吸附困难。由于水解速度正比于吸附量 (Sinnott M L, 1990), 上述超分子结构的变化导致了纤维素酶吸附能力下降, 水解活化能增加, 水解效率降低。

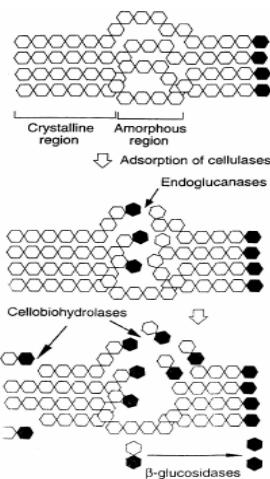


图 1-6 三种纤维素酶组分在纤维素水解反应中的协同作用 (Beguin P., 1994)

1.3 动物纤维素酶的研究

植物、微生物可以产生纤维素酶的观点早已被人们广泛地接受。但是对动物来说，最初的观点认为动物自身不含有纤维素酶，那些以植物为食的动物，它们对纤维素的消化主要依靠其消化道内大量的可水解纤维素的共生菌、原生动物完成的。这一理论最初由 Cleveland 于 1924 年提出。他发现去除白蚁后肠中的原生动物后，白蚁不能存活。在很长一段时间里，人们用这个理论来解释高等动物如何消化纤维素。随后学者们从动物消化系统中的细菌和真菌中分离出了纤维素酶，进一步验证了这个观点 (Watanabe H,2001)。

随着纤维素酶研究的深入，这一理论受到了挑战。1963 年，Marshall 等在无菌的蜗牛肝胰腺中检测到了纤维素酶活性。此外，还有研究表明纤维素白蚁和蜗牛消化道内纤维素酶活力高低和微生物数量没有明显关系 (李燕红,2005)。1998 年，Smant 等从植物寄生的线虫中得到了 4 个内切- β -1,4 葡聚糖酶的 cDNA (Smant G et al,1998)。同年，Watanabe 等 (李燕红,2005) 利用 RACE 技术得到了白蚁内切- β -1,4-葡聚糖酶 cDNA。2000 年，Nakashima K 等从一种低等白蚁中分离到一个分子量为 48kD 的内切- β -1,4 葡聚糖酶 (Nakashima K et al,2000)。2003 年，我国中科院上海生物化学所王骥从软体动物福寿螺中分离得到了一个同时具有外切- β -1,4-葡聚糖酶、内切- β -1,4-葡聚糖酶和内切- β -1,4-木聚糖酶三种活性，分子量为 41.5kD 的多功能纤维素酶(EGX)(WangJi et al,2003)。同时在福寿螺的卵母细胞中获得了编码该酶的基因，从而证明了 EGX 是福寿螺内源性纤维素酶。福寿螺多功能纤维素酶 *egx* 具有很高的比活力，其三种酶活力 (外切- β -1,4-葡聚糖酶、内切- β -1,4-葡聚糖酶和内切- β -1,4-木聚糖酶) 在 50°C-55°C 具有最大酶活力，在 pH5.0-10.8 下显示出较高的稳定性。EGX 可以把未经处理的天然干稻草水解成为简单糖，并且 100Mm 的纤维二糖对其无反馈抑制作用，显示出了较好的应用潜力 (WangJi et al,2003)。利用计算机软件对 EGX 的氨基酸序列进行了疏水簇分析，结果表明 EGX 氨基酸序列中不含有明显的亲水性区段 (WangJi et al,2003)。由于微生物的纤维素酶一般都存在一条亲水性的连接肽连接催化结构域与结合结构域。EGX 很可能与多数微生物纤维素酶不同，不具有可分离的催化结构域和结合结构域。EGX 具有高比活力和不同于微生物纤维素酶的分子结构，因此对 EGX 酶学特性的研究也具有重要的理论意义。李文颖等对 EGX 的稳定性作了进一步的研究，发现在 PH5.6-7.5 范围内，EGX 在 60°C 水浴下 30 分钟，仍残余 75%-85% 的酶活力。用蛋白酶 Papain, Pronase E, Proteinase K 和 Thermolysin 水解 EGX，仍有 80% 以上的 pNPC 酶活力残留。SDS-PAGE 显示，EGX 可以抵抗 Papain, Thermolysin 的酶解作用，而 Pronase E 和 Proteinase K 能够明显的把 EGX 降解。但是在非变性 PAGE 电泳中，经过以上四种蛋白酶消化过的 EGX 与未经消化的 EGX 电泳行为完全相同。由此推断蛋白酶 Pronase E 和 Proteinase K 虽然可以把肽链切断，但是 EGX 依靠其强大的次级键作用力维持原来或者近似于原来的分子结构，从而得以部分地保留了 pNPC 酶活性(李文颖等)。

虽然，近十年来很多动物纤维素酶基因被克隆，但是可能由于动物纤维素酶存在着复杂的翻译后修饰，并且这些修饰，比如糖基化修饰，对酶的稳定性和水解活性具有重要意义，因此很少有报道动物纤维素酶成功表达的例子 (李燕红,2005)。最近报道的甲虫 *apriona germari* 动物纤维素酶在昆虫细胞中表达 (Lee S J,2004; Lee S J,2005)，福寿螺纤维素酶 EGX 在毕赤酵母中表达，算是为数不多的成功例子 (WangJi et al,2003)。

1.4 纤维素酶应用展望

利用地球上丰富的纤维素资源生产洁净的可再生资源是人们由来已久的愿望。目前已经得到的纤维素酶无论是动物的、植物的还是微生物的，还都不能满足工业生产的需要。不过随着生物化学、分子生物学以及诸多交叉学科的快速发展，人们必将实现利用纤维素生产洁净的可再生能源。

1.5 毕赤酵母表达系统

巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达系统是目前最优秀、应用最广泛的外源基因表达系统之一 (Sreekrishna *et al*,1997)。它克服了大肠杆菌表达系统不能表达结构复杂的蛋白质，表达的蛋白质容易形成不溶性的包涵体，背景蛋白多等缺点；同时也弥补了母乳类细胞和昆虫细胞表达系统操作程序复杂，表达水平低，产业化造价昂贵等不足，而且还具有其它酵母表达系统无法比拟的优越之处 (彭毅等，2000)。

1.5.1 毕赤酵母表达系统优点

- 1) 具有强力的醇氧化酶 (Alochol Oxidase, AOX1) 基因启动子，可严格调控外源蛋白的表达；
- 2) 作为真核表达系统，可对表达的真核外源蛋白进行翻译后的加工与修饰，从而使表达出的蛋白具有生物活性；
- 3) 生长快，培养成本低，易于操作和培养；
- 4) 高密度发酵技术成熟，便于工业化生产；
- 5) 表达量高，许多蛋白可达到 g/L 以上水平；
- 6) 表达的外源蛋白可分泌到胞外，分泌的酵母内源蛋白少，便于外源蛋白的分离和纯化；
- 7) 外源基因通过质粒整合到基因组上，基因工程菌株遗传稳定性好；
- 8) 胞内表达蛋白区域化，增加了外源蛋白的稳定性，减少表达产物对宿主菌株的毒害；
- 9) 糖基化程度低，与 *S.cerevisiae* 相比，*P.pastoris* 不产生过度糖基化，所分泌的外源糖蛋白免疫原性较低，更利于临床应用 (Montesino *et al*,1998;Gemmill *et al*,1999)。

1.5.2 毕赤酵母表达宿主菌

毕赤酵母是甲醇营养型酵母，能在甲醇为唯一碳源的培养基上生长。甲醇能诱导其表达甲醇代谢所需的酶，如 AOX, DHAS (二羟丙酮合成酶) 和过氧化氢酶 (Catalase)，表达 AOX 和 DHAS 含量甚至可达到细胞总蛋白质的 60-80%。而有葡萄糖、甘油存在时，毕赤酵母优先利用葡萄糖、甘油，AOX 几乎不表达。AOX 基因启动子为诱导型，AOX 基因的合成是在转录水平调控的 (James *et al*,1989;李晶等，1999)。

多数毕赤酵母表达宿主菌是通过野生型石油酵母 Y11430 进行突变改造而来的，宿主菌在组氨酸脱氢酶基因 (HIS4) 处有一处突变，使宿主菌在不含组氨酸的培养基上不能生长，用于转化后筛选重组菌株。最常用的是 GS115 (his4-)，它含 AOX1 和 AOX2 基因，在以甲醇作为唯一碳

源的培养基上以野生型速率生长。

毕赤酵母中存在着一种叫做微体的细胞器，其中大量合成过氧化物酶，因此称为过氧化物酶体。甲醇代谢的第一步就是在过氧化物酶体中进行的，这样可以避免甲醇在AOX催化下产生的H₂O₂对细胞的毒害。合成的外源蛋白贮存在微体里，可免受蛋白酶的降解，也不会对细胞产生毒害。

1.5.3 毕赤酵母表达载体

毕赤酵母表达载体包括自我复制型的游离载体和整合型载体，但已整合型载体为主。表达胞内蛋白的载体有pPIC3、pPIC3K、pPICZA(B,C)等；分泌表达的载体有：pPIC9、pPIC9K、pPICZαA(B,C)等（马孟根等，2001）。通用的整合载体多含AOX1启动子，有一个外源基因表达框，多克隆位点(MCS)，一个从AOX1基因上拷贝下来的终止序列(TT)，作为筛选标记的HIS4基因和在细菌中进行复制起始点和选择标记（比如ColE1复制起始点和抗氨苄基因）以及AOX1 3'非编码区序列（可以使外源基因能以同源重组的方式整合到染色体AOX1部位）。分泌型表达载体在AOX1启动子下游加入了一个编码信号肽的序列，可以引导外源蛋白分泌到细胞外。分泌型表达载体pPIC9K载体图谱如图1-7所示

1.5.4 外源蛋白在毕赤酵母中的表达

毕赤酵母表达外源蛋白一般步骤为：(1)目的基因的克隆，如果选用分泌型表达载体，则外源基因的阅读框架和信号肽阅读框架应该保持一致；(2)重组载体线性化；(3)转化，一般选用原生质球转化或电击转化；(4)重组子筛选；(5)外源蛋白表达；(6)目的蛋白质的纯化和检测。

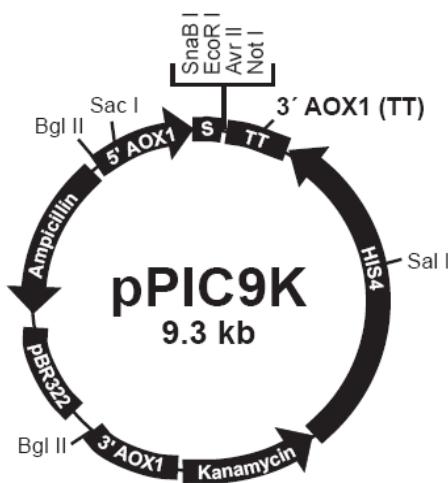


图 1-7 pPIC9K 分泌型表达载体图谱

胞内表达蛋白质较胞外分泌表达水平高，但产物纯化较复杂。对于不稳定的蛋白质或对宿主细胞具有毒性作用的蛋白质，胞内表达可以将它们储存在过氧化物酶体中。巴斯德毕赤酵母分泌

的内源性蛋白水平非常低，分泌表达产物纯化方便，所以分泌表达为优先选择方式。但是基于蛋白稳定性和折叠的需要，分泌表达方式通常先于天然宿主的分泌蛋白质，而非天然的分泌蛋白往往难于分泌表达。同样，天然分泌蛋白如血清蛋白、生长激素等也难以在胞内表达为可溶性蛋白 (Sreekrishna *et al*,1997)。表达方式还要受到目的蛋白本身的限制。

影响外源蛋白表达的因素很多，它不仅受目的基因的特性、基因剂量、整合位点、mRNA 5' 和 3' 非翻译区 (UTR)、cDNA 的 AT 含量、翻译起始区和信号肽上游的影响，也受宿主菌、Mut 表型、蛋白酶、蛋白加工、酶切和糖基化以及培养条件的影响 (聂东宋等, 2001)。主要表现为以下几个方面 (马兴元等, 2003)：

1) 目的基因的特性：目的基因的特性是决定表达成败的首要因素。特定的 AT 富含区可作为多腺苷酸或转录终止信号，导致仅产生低水平的或截短的 mRNA (Sreekrishna *et al*,1997)。某些稀有密码子和稀有密码子富集区往往成为制约翻译速率的因素。在某些情况下，可通过定点突变去除成熟前终止结构域和替换稀有密码子 (Zhang *et al*,2001)。

2) 基因剂量：许多成功的表达事例证明，单靠北的表达盒就可以得到较理想的表达产量，增加拷贝数对表达产量的提高没有明显的作用 (Wegner *et al*,1983;Siegel *et al*,1990)。但在另外一些例子中，拷贝数可以大大增加表达水平，比如鼠表皮生长因子、人肿瘤坏死因子在毕赤酵母中的高效表达是通过表达载体的高拷贝整合而实现的 (Sreekrishna *et al*,1997)。也有增加了拷贝数反而降低表达量的例子，可能是由于过高的表达对分泌途径产生反馈抑制的结果 (李洪钊等,2003)。基因拷贝数对表达量的影响很难预测。因此从众多含有不同拷贝数的重组子中筛选高表达菌株时不宜起始于定量 PCR、Southern blot 等 DNA 水平的分析，应以表达的蛋白两位最重要的筛选标准，比如 SDS-PAGE 和活性分析等。

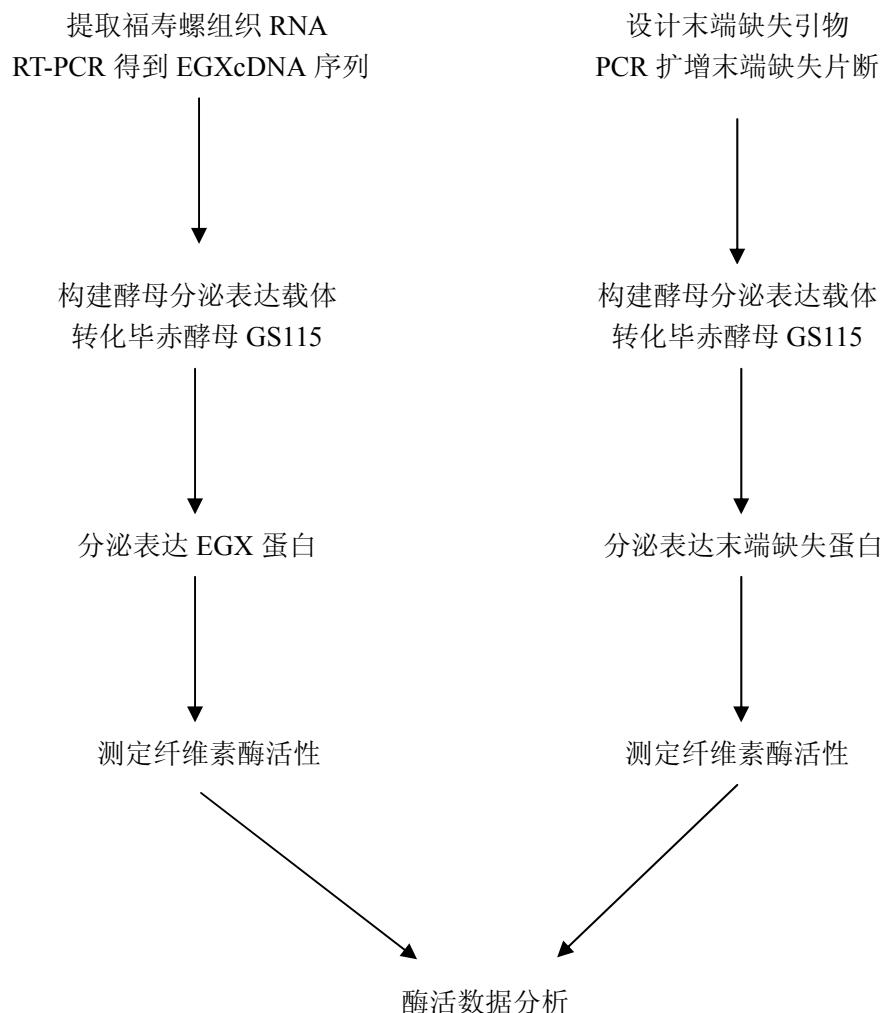
3) 培养条件：培养基的组成、pH、培养温度、通气状况、培养时间、诱导时间等直接影响细胞生长量和蛋白表达水平。对于诱导表达的蛋白培养条件更为重要。在毕赤酵母中用甲醇诱导外源基因的表达，控制甲醇浓度十分重要。由于甲醇容易挥发和胞内 AOX 酶活性，培养基中的甲醇会不断消耗。在培养中后期，甲醇消耗速度加快。如果甲醇耗尽或浓度太低，AOX1 启动子不能有效启动，外源基因不能高效转录；如果甲醇浓度过高，则会对细胞产生毒害作用。

毕赤酵母表达系统自 20 世纪 80 年代建立以来就倍受青睐，到 2000 年，已有 300 多种外源蛋白在毕赤酵母表达系统中表达 (Cregg *et al*,2000)。毕赤酵母表达系统以其诸多优越性已经成为最广泛采用的真核表达系统之一。

本研究的目的和意义

本研究针对福寿螺 (*Ampullaria crossean*) 多功能纤维素酶 EGX 设计区间引物，PCR 扩增不同长度的 5' 端缺失和 3' 端缺失的基因片段，利用毕赤酵母表达重组蛋白，分析纤维素酶活性。对 5' 和 3' 末端序列对酶活力的影响做探索性的研究。

技术路线



第二章 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 动物材料

福寿螺（*Ampullaria crossean*）取自福建。

2.1.2 质粒和菌株

甲醇酵母 *Pichia pastoris* GS115, 表达载体 pPIC9K 由中国农业科学院生物技术所郭三堆老师馈赠, 大肠杆菌 (*Eschenchia coli*) 菌株 DH5 α 为本实验室保存。

2.1.3 培养基

- 1) LB培养基: 1% yeast extract, 2% Tryptone, 1% NaCl, 高压蒸气灭菌 (121℃, 1.034x10⁵Pa) 15 分钟, 固体LB培养基在高压灭菌前加入 1%的琼脂粉;
- 2) YPD 培养基: 1% yeast extract, 2% Tryptone, 2% 葡萄糖;
- 3) RDB 培养基: 1M 山梨醇, 1% 葡萄糖, 1.34%酵母基本氮源 (YNB) , 0.00004% Biotin, 0.005% 谷氨酸, 0.005% 甲硫氨酸, 0.005% 赖氨酸, 0.005% 亮氨酸, 0.005% 异亮氨酸, 固体培养基加入 1% 琼脂粉;
- 4) BMGY-Cl 培养基: 1% yeast extract, 2% Tryptone, 100mM 磷酸缓冲液 (pH6.0) , 1.34% YNB, 0.00004% Biotin, 100mM NaCl, 1%甘油 (V/V) ;
- 5) BMMY-Cl 培养基: 除以 0.5%甲醇代替甘油, 其余成分与 BMGY-Cl 相同;

2.1.4 试剂和仪器

- 1) DNA限制性内切酶、T₄DNA连接酶、Taq酶等购自TaKaRa和BioLabs公司
- 2) PMD18-T Vector 试剂盒购自 Takara 公司
- 3) 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司
- 4) RT-PCR 试剂盒购自 Invitrogen 公司
- 5) 其他化学试剂为国产分析纯;
- 6) DNA 电泳仪, 电泳槽购自六一仪器厂;
- 7) 电转化仪为 Biorad 公司产品
- 8) 核算蛋白分析仪为 lambda 35 UV/UIS spectrometer

2.1.5 PCR 引物

引物合成由上海生工生物工程技术服务有限公司完成, 分别为:

为方便克隆，在每个引物上加入了 EcoR I 酶切位点 GAATTCTGCTGGTCTGCCCTCATCGATTGAGTCGCTCTGAGTGTCTCGCTAG

N 端缺失设计引物：

第一个（标号为 5-1）：N 端缺失 20 个氨基酸（含 1 个 Helix）

5'端引物 **GAATTCTATTGCCCTCTGAGTGTGTCGCT**

3'端引物 **GAATTCTATTGCCCTCTGAGTGTGTCGCT**

第二个（标号为 5-2）：N 端缺失 34 个氨基酸（含 1 个 Helix, 1 个 β 折叠）

5'端引物 **GAATTCTATTGCCCTCTGAGTGTGTCGCT**

3'端引物 **GAATTCTATTGCCCTCTGAGTGTGTCGCT**

第三个（标号为 5-3）：N 端缺失 51 个氨基酸（含 2 个 Helix, 1 个 β 折叠）

5'端引物 **GAATTCTATTGCCCTCTGAGTGTGTCGCT**

3'端引物 **GAATTCTATTGCCCTCTGAGTGTGTCGCT**

第四个（标号为 5-4）：N 端缺失 100 个氨基酸（含 2 个 Helix, 2 个 β 折叠）

5'端引物 **GAATTCTATTGCCCTCTGAGTGTGTCGCT**

3'端引物 **GAATTCTATTGCCCTCTGAGTGTGTCGCT**

第五个（标号为 5-5）：N 端缺失 127 个氨基酸（含 3 个 Helix, 2 个 β 折叠）

5'端引物 **GAATTCTATTGCCCTCTGAGTGTGTCGCT**

3'端引物 **GAATTCTATTGCCCTCTGAGTGTGTCGCT**

C 端缺失设计引物：

第一个（标号为 3-1）：C 端缺失 47 个氨基酸（含 4 个 β 折叠）

5'端引物 **GAATTCTATTGCCCTCTGAGTGTGTCGCT**

3'端引物 **GAATTCTATTGCCCTCTGAGTGTGTCGCT**

第二个（标号为 3-2）：C 端缺失 89 个氨基酸（含 4 个 β 折叠, 2 个 Helix）

5'端引物 **GAATTCTATTGCCCTCTGAGTGTGTCGCT**

3'端引物 **GAATTCTATTGCCCTCTGAGTGTGTCGCT**

2.2 方法

2.2.1 质粒 DNA 的小量提取

所涉及溶液的配置：

- Solution I : 50mM 葡萄糖
25mM Tris-Cl (pH 8.0)
10mM EDTA (pH 8.0)
- Solution II : 0.2M NaOH
1% SDS
使用前现配现用
- Solution III: 每 100ml 含：
5M KAc 60.0ml
冰乙酸 11.5ml
蒸馏水 28.5ml
- 无 DNA 酶的 RNA 酶：将 100mgRNA 酶粉剂溶于 10mM Tris-Cl (pH7.5) , 15mM NaCl 中, 定容至 10ml, 配成 10mg/ml 的浓度, 于 100℃ 加热 15 分钟, 缓慢冷却至室温, 分装成小分保存于-20℃。
- TE Buffer: 10mM Tris-Cl (pH 8.0)
1mM EDTA (pH 8.0)
 - 1) 挑取 *E.coli* 单菌落于 5ml 带有相应抗生素的液体 LB 培养基中, 37℃, 200rpm 培养过夜;
 - 2) 取 1.5ml 菌液加入 1.5ml Eppendorf 管中, 12000rpm 离心 1min, 弃上清;
 - 3) 向管中加入 200μl Solution I 混匀;
 - 4) 加入 400μl Solution II, 上下倒置混匀数次;
 - 5) 立刻加入 300μl 冰上预冷的 Solution III 轻轻混匀, 冰上放置 15min;
 - 6) 12000rpm 离心 5min, 吸上清于另一 Eppendorf 管中;
 - 7) 分别用苯酚(Tris 平衡, PH8.0)、氯仿各抽提一次, 每次抽提后均于 12000rpm 离心 6min, 小心收集上层水相;
 - 8) 加 2 倍体积的无水乙醇, -20℃ 放置 0.5h;
 - 9) 12000rpm 离心 10min, DNA 沉淀用 70% 乙醇洗 2-3 次, 吹干, 溶于 TE 或水中。

2.2.2 DNA 限制性酶切反应

- 1) 在一灭菌的微量离心管中加入以下成分：

DNA	0.2-1.0 μg
10×限制酶缓冲液	3 μl
RNA 酶	3 μl
限制性内切酶	0.5 μl

- | | |
|-----|------------------|
| 超纯水 | up to 30 μ l |
|-----|------------------|
- 2) 轻弹管外壁混匀反应物, 置于酶反应适当温度并按所需时间进行温浴。反应完成后, 直接进行凝胶电泳分析或其它操作。

2.2.3 DNA 片段的电泳回收

冻溶法:

- 1) 将目的基因片段从琼脂糖凝胶上切下, 置于一新离心管中;
- 2) 加入 1mlTris-Cl 饱和酚, 放入液氮中冷冻 5min;
- 3) 取出置 65℃水浴中 5min, 至管内容物完全融化;
- 4) 反复冻溶 3-5 次, 直至琼脂糖胶块溶解为止;
- 5) 12000 rpm 离心 10 min, 取上层水相继续用氯仿抽提, 2 倍无水乙醇沉淀 2h;
- 6) 12000 rpm 4℃ 离心 10 min, 70%乙醇洗涤 2-3 次, 吹干, 用 20 μ l TE 缓冲液或水溶解备用。

Kit 法:

- 1) 用干净的手术刀割下含需回收 DNA 的琼脂块, 放入 1.5ml 离心管中;
- 2) 按 400 μ l/100mg 琼脂糖凝胶的比例加入 Binding Buffer II, 置于 50~60℃水浴中 10 分钟, 使胶彻底融化, 加热融胶时, 每 2 分钟混匀一次;
- 3) 将融化的胶溶液转移到套放在 2ml 收集管内的 UNIQ-10 柱中, 室温放置 2 分钟。8000rpm 室温离心 1 分钟;
- 4) 取下 UNIQ-10 柱, 倒掉收集管中的废液, 将 UNIQ-10 柱放入同一个收集管中, 加入 500 μ l Wash Solution, 8000rpm 室温离心 1 分钟;
- 5) 重复步骤 4;
- 6) 取下 UNIQ-10 柱, 倒掉收集管中的废液, 将 UNIQ-10 柱放入同一个收集管中, 12000rpm 室温离心 15 秒;
- 7) 将 UNIQ-10 柱放入一根新的 1.5ml 离心管中, 在柱子膜中央加 20 μ l Elution Buffer 或水(PH>7.0), 室温或 37℃放置 2 分钟;
- 8) 12000rpm 室温离心 1 分钟, 离心管中的液体即为回收的 DNA 片段, 可立即使用或存于-20℃备用。

2.2.4 DNA 片段连接

- 1) 在一灭菌的微量离心管中, 加入 0.1 μ g 载体 DNA 及 3 倍外源 DNA;
- 2) 加适量水, 再加入 1 μ l 10×T4 DNA Ligase buffer 和 1 μ l T4 DNA Ligase, 使总体积为 10 μ l; 混匀后与 16 ℃ 连接过夜;

2.2.5 大肠杆菌感受态细胞的制备

- 1) 取大肠杆菌 DH5 α 单菌落, 接种于 5 mlLB 液体培养基, 于 37℃, 200rpm 培养过夜;
- 2) 取 1 ml 上述过夜培养物, 按 1: 100 的稀释比例倒入 100 mlLB 液体培养基中, 37℃振荡培养

- 3~4h, 使细菌达到对数生长期 (OD₆₀₀为 0.5~0.6);
- 3) 将培养液转移到两只预冷的 50ml 无菌离心管中, 冰预 30min, 4℃ 5000rpm 离心 5min, 弃上清;
 - 4) 每只离心管中加入 4ml 冰冷的 0.1M CaCl₂, 使菌体重悬, 冰浴 30min, 4℃、5000rpm 离心 5min, 弃上清;
 - 5) 每只离心管中加入 1ml 冰冷的 0.1M CaCl₂, 重悬后分装到无菌的 1.5ml 离心管中 (每管 100μl);
 - 6) 液氮快速冷冻后置-70℃冰箱长期保存。

2.2.6 质粒 DNA 转化大肠杆菌

- 1) 在 100μl 感受态细胞中加入待转化的 DNA, 轻轻旋转以混匀内容物, 在冰上放置 30min;
- 2) 将离心管放至 42℃ 的循环水浴中 90 sec
- 3) 快速将管转移到冰浴中, 使细胞冷却;
- 4) 每管加 800μl LB 液体培养基, 37℃ 200 rpm 复苏 45min;
- 5) 取 50、100、200μl 转化的感受态细胞, 分别转移到含相应抗生素的 LB 固体培养基上 (如要检测 α-互补, 应预先在平板上涂好 X-gal 和 IPTG), 用一无菌的弯头玻璃棒将菌液涂满整个平板表面;
- 6) 将平板置于室温下至液体被吸收;
- 7) 倒置平皿, 于 37℃ 培养, 12-16h 后可出现菌落。

2.2.7 蛋白质的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

1) 溶液的配制

A. 30%丙烯酰胺凝胶母液 (29: 1) :	丙烯酰胺	29g
	甲叉双丙烯酰胺	1g
用H ₂ O定容至 100 ml		
B. 2×上样缓冲液: Tris	0.35g	
SDS	1g	
蔗糖	4.5g	
巯基乙醇	0.5g	
溴芬兰	0.025g	
HCl 调 pH6.8, 用水定容至 25ml		
C. 染色液: 甲醇	45% (V/V)	
冰乙酸	10% (V/V)	
H ₂ O	45% (V/V)	
考马斯亮蓝	0.25% (W/V)	
D. 托色液: 甲醇	45% (V/V)	
冰乙酸	10% (V/V)	

H ₂ O	45% (V/V)
------------------	-----------

2) 灌胶

A. 配制 10% 分离胶溶液

H ₂ O	9.9 ml
30% 丙烯酰胺母液	8.3 ml
1.5 M Tris-Cl (pH8.8)	6.3 ml
10% SDS	0.25 ml
10% 过硫酸铵	0.25 ml
TEMED	0.01 ml
总体积	25 ml

迅速灌胶，留出关注浓缩胶空间，小心用注射器在分离胶上覆盖 1 厘米高的水，室温聚合 40 分钟。

B. 配制 5% 浓缩胶溶液

H ₂ O	5.5 ml
30% 丙烯酰胺母液	1.3 ml
1.5 M Tris-Cl (pH8.8)	1.0 ml
10% SDS	0.08 ml
10% 过硫酸铵	0.08 ml
TEMED	0.008 ml
总体积	7.968 ml

在分离胶上灌注浓缩胶，插入梳子，室温聚合 45 分钟。

3) 样品处理

- 取蛋白样品溶液 20 μ l，加入等体积 2 \times 上样缓冲液混匀，100°C 煮沸 3 min，12000rpm 离心去除不溶物；
- 取 20 μ l 上清上样电泳。

4) 电泳

8v/cm 电泳至染料前沿进入分离胶，将电压提高至 15v/cm，继续电泳至染料到达分离胶底部，下胶；

5) 染色，脱色

- 加入至少 5 倍体积的染色液浸泡凝胶，放在平缓摇动的摇床上室温染色 4 个小时以上；
- 环脱色液，平缓摇动，直至电泳条带显示清晰为止，其间为加快脱色效率可以更换脱色液；
- 脱色后凝胶可短暂保存于清水中或制作成干胶长期保存。

2.2.8 毕赤酵母电击感受态细胞的制备

- 挑取毕赤酵母受体菌 GS115 (His⁻,Mut⁺) 的单菌落接种于 10mlYPD 液体培养基中，30°C 摆床培养过夜；

- 2) 再以 1% 的接种量转接于 500mlYPD 培养基中, 30°C 培养至 $OD_{600}=1.3-1.5$;
 - 3) 4°C 1500g 离心 5min, 弃上清;
 - 4) 500ml 冰冷的无菌水将菌体重旋, 4°C 1500g 离心 5min, 弃上清;
 - 5) 250ml 冰冷的无菌水将菌体重悬, 4°C 1500g 离心 5min, 弃上清;
 - 6) 20ml 1M 山梨醇重悬, 4°C 1500g 离心, 弃上清;
 - 7) 沉淀溶于 1ml 冰冷的山梨醇中, 分装为每管 80 μ l, 以备转化。
- 酵母电击感受态最好现用现制备。冻溶会使转化效率大大降低。

2.2.9 酵母电击转化

因毕赤酵母表达载体为整合型载体, 电击转化前载体需要做线性化处理。不同的酶切 pPIC9K, 转化宿主 GS115 (His-,Mut+) 会引发不同的位点和方式的整合, 产生不同表型的转化子, 如下表所示:

限制性内切酶	整合位点和方式	GS115 基因型
Sal I	在 His4 插入	His ⁺ Mut ⁺
Bpu1102 I	在 5'AOX1 插入	His ⁺ Mut ⁺
Bgl II	AOX1 置换	His ⁺ Mut ^s

- 1) 用 Bpu1102 I 酶切重组表达质粒, 使其线性化;
- 2) 去 80 μ l 感受态细胞与线性化质粒 (20 μ g) 混合后转移到冰冷的 0.2cm 电击杯中, 点击转化酵母感受态细胞 (1500V,25 μ F,200 Ω) ;
- 3) 立即向电击杯中加入 1ml 冰冷的 1M 山梨醇, 混匀后以每板 200 μ l 菌液涂布于 RDB 平板上;
- 4) 30°C 培养 2-3 天, 至长出转化子。

2.2.10 酵母基因组的提取

- 破菌 Buffer:

SDS	1%
Triton X-100	2%
NaCl	100mM
Tris-Cl pH8.0	10mM
EDTA	1mM

- 1) 取过夜培养的 1ml 酵母菌液, 5000rpm 离心 5min;
- 2) 沉淀中加入 1ml 无菌水, 洗涤一次, 离心;
- 3) 沉淀中加入 200 μ l 破菌 Buffer, 剧烈震荡;
- 4) 加入 200 μ l 酚/氯仿/异戊醇 (体积比 25:24:1), 剧烈震荡, 12000rpm 离心 5min 取上清;
- 5) 上清加入等体积氯仿, 颠倒轻微震荡, 12000rpm 离心 5 min 取上清;

- 6) 上清加入 2 倍体积无水乙醇和 1/10 体积 3M NaAc, 颠倒混匀, 置于-20℃冷冻 10min;
- 7) 4℃ 12000rpm 离心, 沉淀用 70%乙醇洗涤 2 遍, 吹干, 溶于 20μl 水或 TE 溶液, -20℃保存备用。

2.2.11 酵母重组子的 PCR 检测

- PCR 所用引物及退火温度:

egx 全长引物: 56℃

5'端缺失设计引物:

第一个: 56℃

第二个: 57℃

第三个: 57℃

第四个: 57℃

第五个: 57℃

3'端缺失设计引物:

第一个: 60℃

第二个: 59℃

第三个: 60℃

- 酵母基因组 PCR 检测所用酶购自华美公司

- 1) 50μl 反应体系:

10×扩增缓冲液Buffer (Mg ²⁺ free)	5μl
--	-----

MgCl ₂ (25mM)	3μl
--------------------------	-----

dNTP (4 种 dNTP 混合物 10mM each)	4μl
-------------------------------	-----

上游引物	1μl
------	-----

下游引物	1μl
------	-----

灭菌水	34μl
-----	------

Taq 酶	1μl
-------	-----

DNA 模版 (酵母基因组 DNA)	1μl
--------------------	-----

- 2) 反应混合液 95℃变性 5min

- 3) 扩增条件: 94℃变性 1min, 按不同引物相应的退火温度退火 1min, 72℃ 延伸 1min; 重复此步骤 35 个循环;

- 4) 72℃延伸 10min;

- 5) 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果。

2.1.12 外源蛋白在毕赤酵母中甲醇诱导分泌表达

- 1) 挑取待表达菌株, 接种 2ml BMGY-C1 培养基, 30℃ 200rpm 培养 24h;
- 2) 以 1:100 比例接种于 20ml BMGY-C1 培养基, 30℃ 200rpm 培养至 OD₆₀₀=2 左右 (稀释 5 倍

- 测定, $OD_{600}=0.4-0.5$);
- 3) 室温下 3450rpm 离心收集菌体, 重悬于 20ml BMMY-C1 培养基中, 30℃ 200rpm 表达 4 天, 每天补加甲醇至终浓度 0.5%;
 - 4) 4℃ 8000rpm 离心, 吸取 300 μ l 上清, -70℃冷冻 2 小时, 然后用冷冻干燥机冷冻干燥 6h, 得到表达产物粗提粉末。

2.2.13 *egx* 基因末端缺失 PCR

- *EGX* 基因末端缺失 PCR 所用的酶为 Takara 公司 ExTaq

- 1) 30 μ l 反应体系:

10×ExBuffer	3 μ l
dNTP (4 种 dNTP 混合物 10mM each)	3 μ l
上游引物	1 μ l
下游引物	1 μ l
灭菌水	20 μ l
Taq 酶	1 μ l
DNA 模版 (质粒 pPIC9K)	1 μ l

- 2) 反应混合液 95℃变性 5min
- 3) 扩增条件: 94℃变性 1min, 按不同引物相应的退火温度退火 1min, 72℃ 延伸 1min; 重复此步骤 35 个循环;
- 4) 72℃延伸 10min;
- 5) 1%琼脂糖凝胶电泳, 回收目的 DNA 片段。

2.2.14 福寿螺组织 RNA 提取和反转录

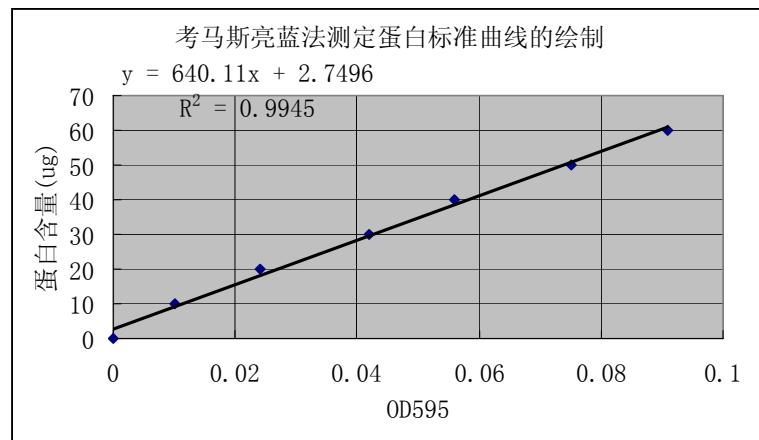
- 1) 取 100mg 福寿螺消化道组织, 加入 1mlTrizol (Invitrogen 公司), 混匀;
- 2) 12000rpm 4℃ 离心 10min, 取上清, 室温放置 5min, 加入 200 μ l 氯仿, 震荡 15 秒, 室温放置 2-3min
- 3) 12000rpm 4℃ 离心 10min 取上清, 加入 500 μ l 异丙醇, 室温放置 10min
- 4) 4℃ 12000rpm 离心 5min, 倒掉液体
- 5) 加入 1ml75%乙醇, 震荡, 4℃ 7500rpm 离心 5min
- 6) 倒掉液体, 沉淀放置 5-10min, 溶于 20ml 水中
- 7) 使用 Invitrogen 公司反转录试剂盒, 向标号为 1 的无菌 PCR 管中加入引物 OligoT 2 μ l, 新提取的 RNA2 μ l, 10mM dNTP 2 μ l, DEPC-Water 6 μ l, 混匀, 65℃温浴 5min, 置于冰上;
- 8) 向标号为 2 的无菌 PCR 管中加入 5×cDNA synthesis buffer (用前混匀) 4 μ l, 0.1M DTT 1 μ l, RNase outTM 8 μ l, DEPC-Water 1 μ l, Thermo ScriptTM RT 1 μ l, 混匀;
- 9) 将管 2 中的液体加入管 1, 混匀, 55℃温浴 1h, 85℃ 5min
- 10) 加入 1 μ l RNaseH, 37℃温浴 20min, 获得 cDNA, 4℃保存。

2.2.15 考马斯亮蓝法测定蛋白质含量标准曲线绘制

- 称取 50mg 考马斯亮蓝 G-250, 溶于 25mL 90% 乙醇中, 加入 85% (W / V) 的磷酸 50mL, 最后用蒸馏水定容到 500mL;
- 取 50mg 牛血清白蛋白 (BSA), 溶于 50ml 0.15M NaCl 溶液中, 制成 1mg/ml 标准蛋白溶液;
- 按下表分别加入不同量的 BSA 标准蛋白溶液和 0.15M NaCl 溶液, 再加入 5ml 考马斯亮蓝 G-250 溶液, 测定 OD₅₉₅ 的光吸收值, 绘制标准曲线

表 2-1 蛋白含量标准曲线的绘制

编号	1	2	3	4	5	6	7
BSA (1mg/ml) (μl)	0	10	20	30	40	50	60
0.15M NaCl (μl)	100	90	80	70	60	50	40
蛋白含量 (μg)	0	10	20	30	40	50	60
考马斯亮蓝 G-250 溶液 (ml)	5	5	5	5	5	5	5
OD ₅₉₅	0	0.011	0.028	0.043	0.051	0.073	0.092
	0	0.009	0.024	0.042	0.054	0.078	0.091
	0	0.011	0.021	0.042	0.064	0.075	0.089
平均 OD	0	0.010	0.024	0.042	0.056	0.075	0.091



$$\text{样品蛋白含量} = (\text{OD}_{595} \times 640.11 + 2.7496) / 1000 \text{ (mg)}$$

2.2.16 纤维素酶活力测定

- DNS 试剂配制 (3,4-二硝基水杨酸试剂)：取 3,5-二硝基水杨酸 2g, 溶于 40ml 2M NaOH 溶液, 待其全部溶解后, 加入 60g 酒石酸钾钠。完全溶解后, 用去离子水定容至 400ml, 棕色

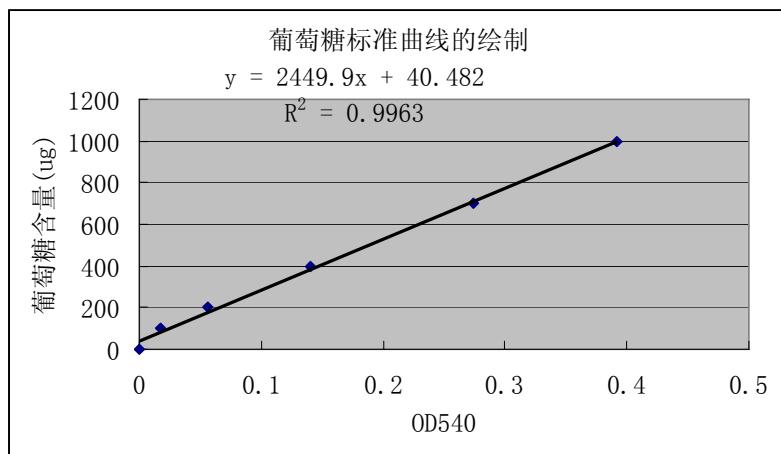
瓶保存。

1) 葡萄糖标准曲线测定

秤取 1g 葡萄糖, 溶于 1000ml 蒸馏水, 配制成葡萄糖标准溶液 (1000 μ g/ml); 按下表加入不同量的葡萄糖标准液、蒸馏水和 DNS 试剂, 沸水浴 5min 显色, 冷却后以标号 0 样品作为空白对照, 测 540nm 处光吸收值。以葡萄糖含量 (μ g) 为横坐标, 吸光值 (A) 为纵坐标绘制葡萄糖标准曲线。

表 2-2 葡萄糖浓度标准曲线的绘制

样品\标号	0	1	2	3	4	5
葡萄糖标准液 (ml)	0	0.1	0.2	0.4	0.8	1
蒸馏水 (ml)	1	0.9	0.8	0.6	0.2	0
葡萄糖含量 (μ g)	0	100	200	400	800	1000



2) 羧甲基纤维素钠水解活力测定

反应体系含有: 100mM 醋酸-醋酸钠缓冲液 pH4.6

100mM NaCl

1% (W/V) 中等黏度型羧甲基纤维素钠

0.5ml 该反应体系于 50°C 水浴预热 5min, 加入适量酶液, 混匀, 50°C 反应 10min, 加入的 0.5ml DNS 试剂终止反应, 沸水浴 5min 显色, 冷却至室温, 再补入 0.5ml 二次蒸馏水, 混匀后测定 540nm 处光吸收值。羧甲基纤维素钠水解活力定义为: 上述条件下, 每分钟水解生成 1 μ mol 葡萄糖还原当量所需的酶量为 1 单位。参照葡萄糖标准曲线查出生成的葡萄糖量, 计算酶活力。

3) 纤维二糖水解活力测定

反应体系含有： 100mM 醋酸-醋酸钠缓冲液 pH5.2

100mM NaCl

1% (W/V) D-纤维二糖

0.5ml 该反应体系于 55℃水浴预热 5min, 加入适量酶液, 混匀, 50℃反应 10min, 加入的 0.5mlDNS 试剂终止反应, 沸水浴 5min 显色, 冷却至室温, 再补入 0.5ml 二次蒸馏水, 混匀后测定 540nm 处光吸收值。纤维二糖水解活力定义为：上述条件下, 每分钟水解生成 1μmol 葡萄糖还原当量所需的酶量为 1 单位。参照葡萄糖标准曲线查出生成的葡萄糖量, 计算酶活力。

4) Birchwood 木聚糖水解活力测定

可溶性木聚糖制备：

取 4g Birchwood 木聚糖加入 20ml 二次蒸馏水搅拌 2h, 抽提可溶性组分, 4℃10000rpm 离心 10min, 取上清；将沉淀悬浮于 20ml 二次蒸馏水中, 二次抽提；合并抽提物, 冷冻干燥即得可溶性木聚糖。

反应体系含有： 100mM 醋酸-醋酸钠缓冲液 pH5.2

100mM NaCl

1% (W/V) 可溶性木聚糖

0.5ml 该反应体系于 55℃水浴预热 5min, 加入适量酶液, 混匀, 50℃反应 10min, 加入的 0.5mlDNS 试剂终止反应, 沸水浴 5min 显色, 冷却至室温, 再补入 0.5ml 二次蒸馏水, 混匀后测定 540nm 处光吸收值。纤维二糖水解活力定义为：上述条件下, 每分钟水解生成 1μmol 葡萄糖还原当量所需的酶量为 1 单位。参照葡萄糖标准曲线查出生成的葡萄糖量, 计算酶活力。

根据酶活定义, 1 单位酶 10 分钟可生成 1740μg (10μM) 葡萄糖。由此推导出待测样品
酶总活力= $(OD_{540} \times 2499.9 + 40.482) / 1740$ (IU)

样品比活力=总酶活 (IU) /蛋白含量 (mg)

2.2.17 菌密度测定

菌液经生理盐水适当稀释, 用紫外分光光度计在 600nm 处测吸光度, 光程为 1cm, 参照为稀释同样倍数的相应液体培养基, 线性范围 0.1-1.0

第三章 结果与讨论

3.1 结果

3.1.1 福寿螺多功能纤维素酶 *egx* 基因的克隆

提取福寿螺消化道总 RNA, 逆转录合成 cDNA。根据已发表的 *EGX* 核苷酸序列设计全长引物 *EGX5'* 和 *EGX3'*, 以 cDNA 为模版扩增得到 1.2kb 的 DNA 片段 (如图 3-1)。

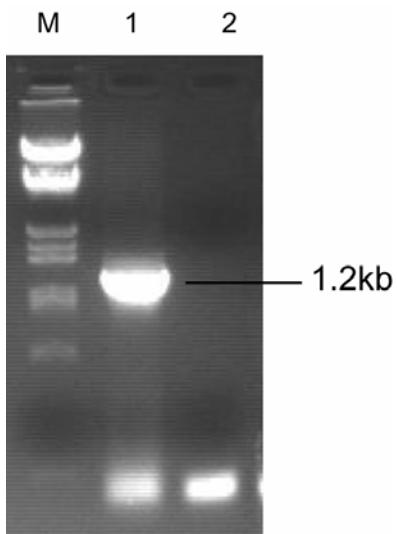


图 3-1 扩增 EGX 全长序列的电泳

M: DNA 标准分子量 Marker

1: 以 cDNA 为模版扩增 EGX 全长序列

2: 水对照

回收 1.2kb 片段, 以 T-A 方式克隆入 T 载体 pMD18-T, 转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 提取质粒 DNA, EcoR I 酶切鉴定阳性克隆 (图 3-2,3-3)。为避免 PCR 反应可能导致的点突变, 共挑取 4 个阳性克隆测序, 得到一个克隆的碱基序列与已发表的 *EGX* 序列相比有 7 处点突变, 氨基酸序列 100% 同源 (表 3-1), 将此克隆编号为 T-*egx*。

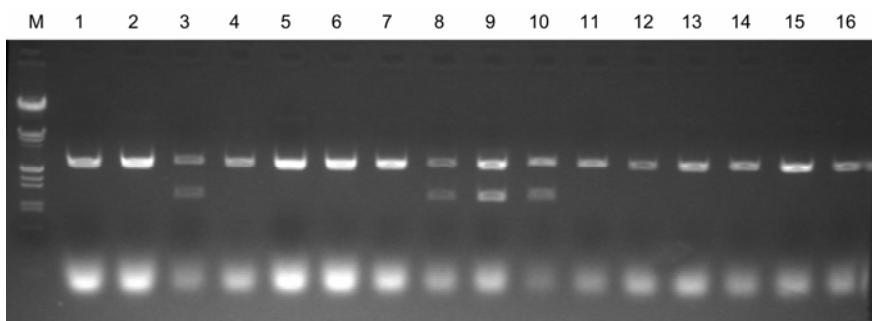


图 3-2 T-EGX 阳性克隆的酶切鉴定

表 3-1 T-egx 核酸序列和氨基酸序列

↓

1 ATGCCCTCTGGTGCCTGGCTGGGAGACAGCGAGATCGAC**A**GA**C**ACTGAGAAGAAGC
 1 M P S G A A G A G V T S E I D R L R R S
 61 GACATAACGGTTCACGTGAATGTTGGTGGTAACATCAACCACGGTCAAGTGAGCATTGCA
 21 D I T V H V N V G G N I N H G Q V S I
 121 GTGTTACAAAAGAGAAAGGCATTCCCGTTGGGACATGTGTGGCCGCCTGGGCCTAC**A**AC
 41 V L Q K R K A F P F G T C V A A W A Y N
 181 GATGGGTCAAAGGAGCATA**C**CGGATTTCATCCACCAGCACTACA**A**CTGGC**G**GTGCCA
 61 D G S K G A Y R D F I H Q H Y N W A V P
 241 GAAA**A**CTCACTCAAGTGGCTAGCATCGAAC**C**TAACAGGGACAAAAGAA**A**CTATCAGCCT
 81 E N S L K W A S I E P N R G Q K N Y Q P
 301 GGCCTAACATGCTTACGGACTGAGAA**A**TCACGGATTAAAGGTGAGAGGTACAA**A**CTG
 101 G L N M L H G L R N H G I K V R G H N L
 361 GTGTGGTCTGTCGACA**A**ACGGTGCAGAA**C**TTGGTCAAGGCTCTGCATGGGATGAGCTT
 121 V W S V D N T V Q N W V K A L H G D E L
 421 CGAAAGGTTGTCCATGACCACATTGTGGAA**A**CCATCAACACATTAAAGGATTAGTGGAG
 141 R K V V H D H I V E T I N T F K G L V E
 481 CACTGGGATGTGAACAC**A**CGAGAAC**C**CTGCATGCCAGTGGTAC**C**AGCAT**C**AA**A**CTGAATGAC
 161 H W D V N N E N L H G Q W Y Q H Q L N D
 541 AATGGCTACAA**A**CTGGAA**C**TTGTCCGTATCGCACACGCCGCCAAC**C**CA**A**CTGCAA**A**CTC
 181 N G Y N L E L F R I A H A A D P N V K L
 601 TTCCCTCAACGACTACAA**C**GTGCAACAGTTATTCAAC**A**AC**A**CGACTATCTCGACAA
 201 F L N D Y N V V S N S Y S T N D Y L R Q
 661 GGTCAACAGTTAAGGCCGCTAATGTGGGTCTTACGGTTGGGTG**C**T**C**AGTGCCACTTT
 221 G Q Q F K A A N V G L Y G L G A Q C H F
 721 GGCGACGAAAGCGAC**C**CCAGAAC**C**CGGTACTAAG**C**AC**C**T**C**GG**C**AT**C**TTAG**C**T**C**AGTG
 241 G D E S D P E P G T K Q R L D T L A Q V
 781 GGCGTGCC**C**ATCTGGGCC**C**ACTGAGTTGGATGTGGTAGCT**C**GG**C**AT**C**GG**C**AG**C**AC**C**AG**C**GG
 261 G V P I W A T E L D V V A S D E N R R A
 841 GACTTCTACGAGC**C**CG**C**T**C**GC**C**T**C**AG**C**T**C**GT**C**GG**C**AT**C**GG**C**AT**C**CC**C**
 281 D F Y E H A L T V L Y G H H A V E G I L
 901 ATGTGGGCTCTGGACAAGGCC**C**ACTGGCG**C**GT**C**GG**C**AG**C**GT**C**GT**C**TT**C**GG**C**
 301 M W G F W D K A H W R G A R A A L V V G
 961 GACA**A**CT**C**TCAG**C**T**C**AG**C**T**C**GG**C**GG**C**AC**C**GT**C**GG**C**GT**C**GG**C**AG**C**GT**C**GG
 321 D N L Q L T A A G R R V L E L F E H R W
 1021 ATGACAGAC**G**AG**C**GC**C**A**C**CT**C**GG**C**AG**C**GG**C**ACT**C**AG**C**TT**C**AC**C**AG**C**T**C**GG**C**TT**C**C**C**
 341 M T D E T H N L A A G T Q F T V R G F H
 1081 GGCGACTACGAGGTG**C**A**G**T**C**AT**C**GT**C**CCAGGG**C**TAAG**C**AG**C**AC**C**ACT**C**AC**C**T**C**AG**C**AG**C**
 361 G D Y E V Q V I V Q G Q E H T N L R Q T
 1141 TTCTCG**T**GG**C**AC**C**GG**C**CC**C**AC**C**CG**C**TAAC**A**TT**A**AT**G**T**T**AG**C**T**A**
 381 F S L G N G P H T V N I N V S *

分析 EGX 蛋白二级结构 (图 3-3)。EGX 蛋白质二级结构主要由 α 螺旋和 β 折叠组成, 由无规则卷曲相连。

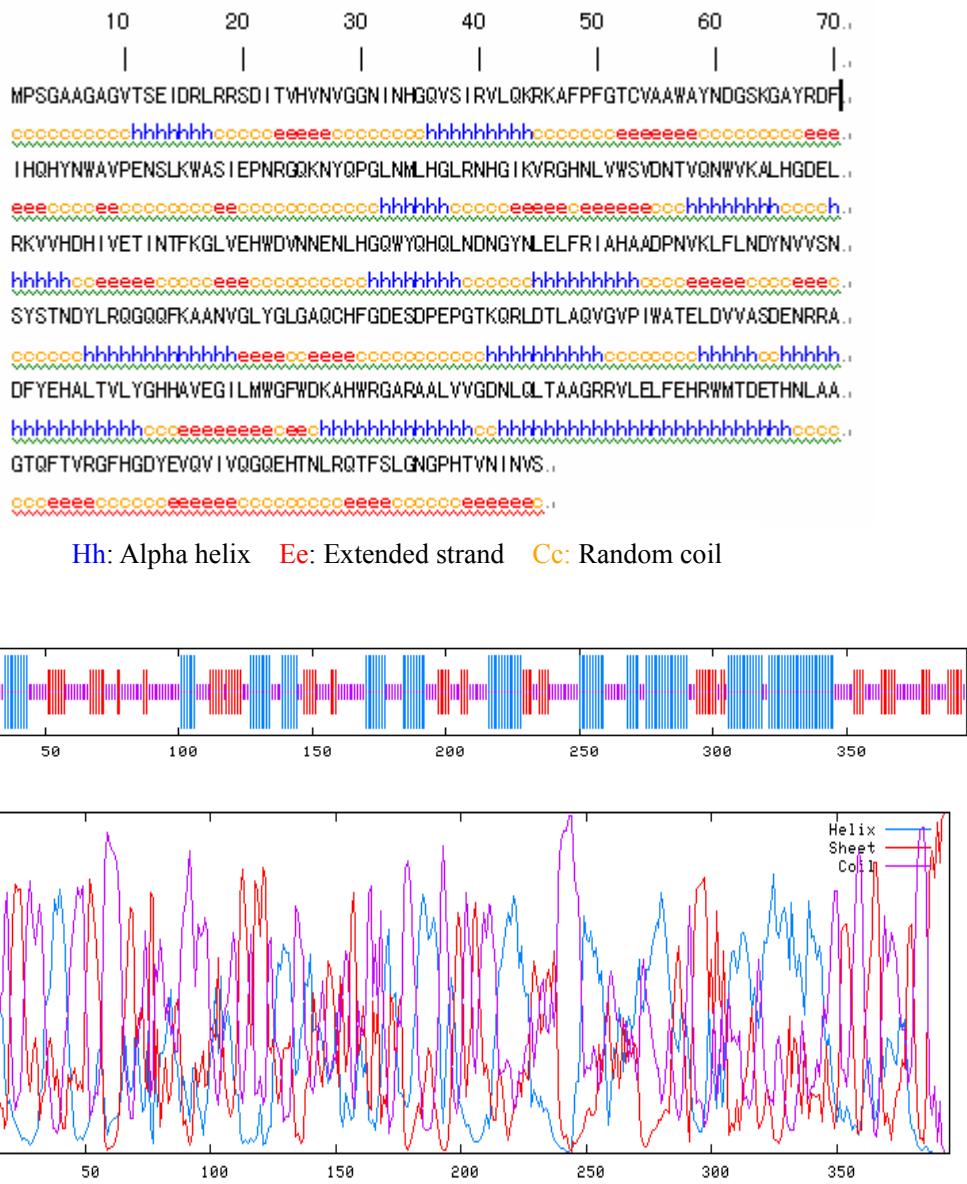


图 3-3 EGX 蛋白二级结构分析

3.1.2 表达载体的构建

用 *EcoR* I 从 T-*egx* 质粒切下 *egx* 开放阅读框, 通过 *EcoR* I 酶切位点接入毕赤酵母表达载体 pPIC9K (具体构建过程如图 3-4 所示), 命名为 pPIC9K-*egx*。转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑克隆提取质粒, 得到一个重组质粒。*EcoR* I 单酶切重组质粒, 琼脂糖凝胶电泳可见 1.2kb 条带, 证实 *egx* 开放阅读框已插入表达载体 pPIC9K。利用 pPIC9K 质粒 5'AOX1 区段内的一个 *Sac* I 位点和 *egx* 开放阅读框内的一个 *Sac* I 位点验证开放阅读框插入方向, 用 *Sac* I 单酶切可见到 8.5kb 和 2kb 条带 (图 3-5), 说明 *egx* 开放阅读框正向插入表达载体。

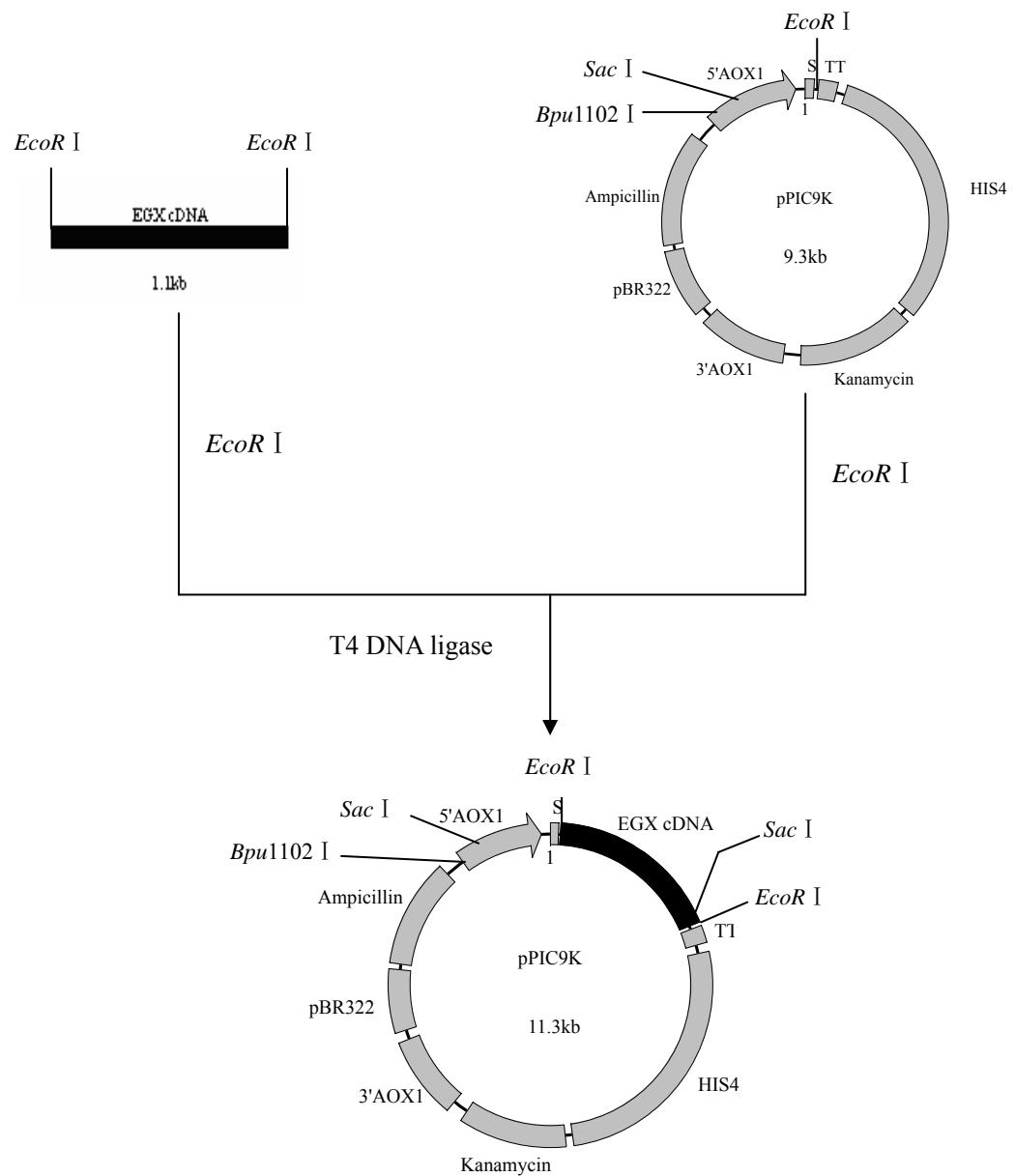


图 3-4 重组质粒 pPIC9KEGX 的构建

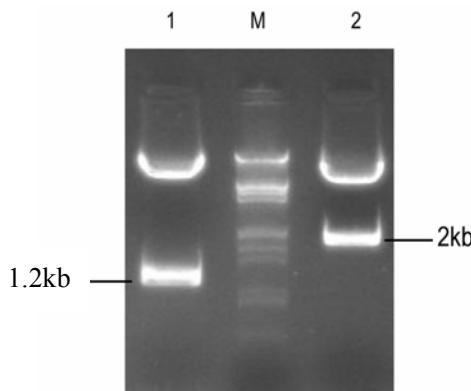


图 3-5 酶切验证阅读框插入方向

M: DNA 标准分子量 Marker

1: pPIC9K-egx/EcoR I

2: pPIC9K-egx/Sac I

3.1.3 酵母转化及重组子表型筛选

用 *Bpu1102 I* 线形化 20 μ g 质粒 pPIC9K-egx, 通过电击法转化宿主菌毕赤酵母 GS115 (His⁻, Mut⁺), 转化物涂布 RDB 平板, 筛选出 25 个重组子。用无菌牙签挑取重组子, 点种到另一个 RDB 平板上 (图 3-6)。所有的重组子均能在缺乏组氨酸的 RDB 平板生长, 即有外源基因插入的、具有正确 His⁺ Mut⁺ 表型的重组子。

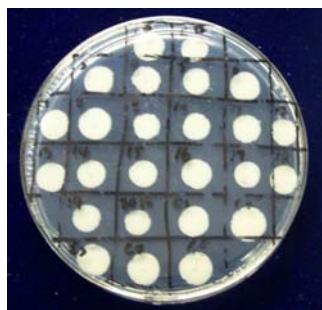


图 3-6 重组酵母组氨酸利用型筛选

3.1.4 酵母重组子的 PCR 检测

挑取 9 个重组子, 提取酵母基因组 DNA。用 *egx* 全长引物 *EGX5'* 和 *EGX3'*, 以挑取的 9 个重组子基因组 DNA 为模板, 以菌株 GS115 基因组 DNA 为对照进行 PCR 扩增。有 5 个重组子扩增出了 1.2kb 的 DNA 片段 (图 3-7), 与以重组表达载体 pPIC9K-egx 为模板的结果一致 (图 3-7, lane 11), 而对照菌株没有扩增出相应条带 (图 3-7, lane 10)。初步证明 PCR 阳性的重组子中, *egx* 开放阅读框可能已经整合到酵母基因组中。

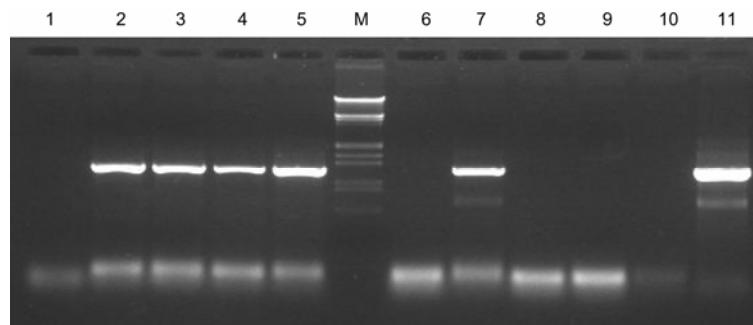


图 3-7 *egx* 酵母重组子的 PCR 检测
 M: DNA 标准分子量 Marker 2-5、7: PCR 阳性重组子
 1、6、8、9: PCR 阴性重组子 10: GS115
 11: pPIC9K-*egx*

3.1.5 PCR 阳性重组子的表达

挑取 PCR 阳性重组子，甲醇诱导表达，所得表达产物粉末溶于 50 μ l 10mM 磷酸缓冲液 (pH6.0)，取 10 μ l SDS-PAGE 电泳检测蛋白表达。与空载体 pPIC9K 和宿主菌株 GS115 的上清表达产物相比，有两个重组子的泳道有一条 70kDa 的条带（图 3-8）。

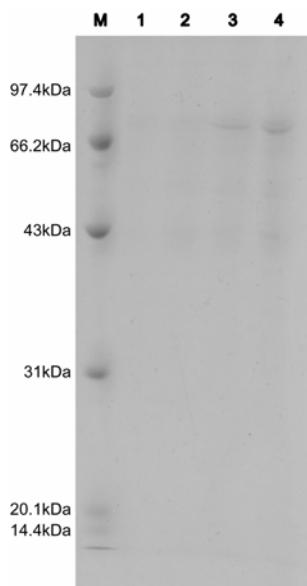


图 3-8 重组酵母诱导表达 SDS 检测
 M: 蛋白质标准低分子量 Marker
 1: GS115
 2: 空载体 pPIC9K
 3、4: 与对照相比有特异蛋白带的重组子

3.1.6 酶活力的计算

各取 10 μ l 表达产物加入 0.5ml 反应体系, 测羧甲基纤维素钠、纤维二糖、木聚糖水解酶活力。根据葡萄糖标准曲线和蛋白含量标准曲线计算酶总活力和比活力:

$$\text{蛋白含量} = 0.616 \text{ mg}$$

$$\text{内切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶酶总活力} = 0.0376 \text{ IU}$$

$$\text{比活力} = 0.0611 \text{ IU/mg}$$

$$\text{外切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶酶总活力} = 0.0683 \text{ IU}$$

$$\text{比活力} = 0.111 \text{ IU/mg}$$

$$\text{内切-}\beta\text{-1,4-木聚糖酶酶总活力} = 0.0342 \text{ IU}$$

$$\text{比活力} = 0.0555 \text{ IU/mg}$$

3.1.7 全长序列末端缺失片段的扩增

以 pPIC9Kegx 质粒为模版, 用 7 组引物 (5-1,5-2,5-3,5-4,5-5,3-1,3-2) PCR 扩增片段。以 T-A 方式克隆入 T 载体 pMD18-T, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑克隆提取质粒, EcoR I 单酶切鉴定阳性克隆 (图 3-9—3-15)。在 7 种含有末端缺失片段的 T 载体中, 每种挑 3 个克隆测序。得到了 7 组末端缺失片段, 和预先设计的序列完全相同。

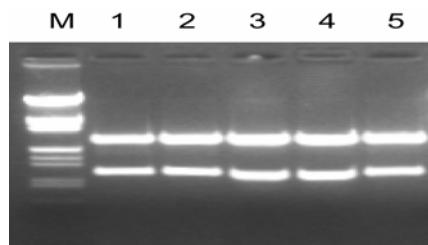


图 3-9 末端缺失 5-1 T 载体酶切鉴定
M: DNA Marker 1-5: T 载体克隆

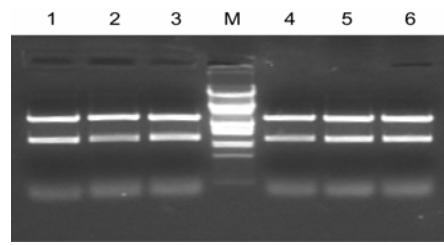


图 3-10 末端缺失 5-2 T 载体酶切鉴定
M: DNA Marker 1-6: T 载体克隆

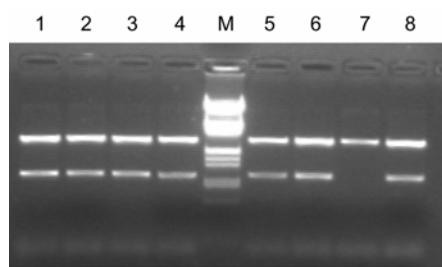


图 3-11 末端缺失 5-3 T 载体酶切鉴定
M: DNA Marker 1-8: T 载体克隆

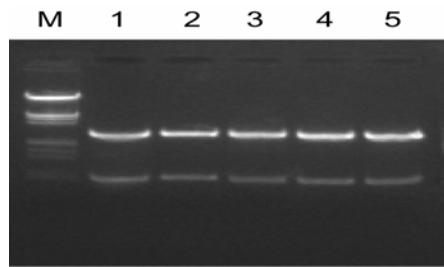


图 3-12 末端缺失 5-4 T 载体酶切鉴定
M: DNA Marker 1-5: T 载体克隆

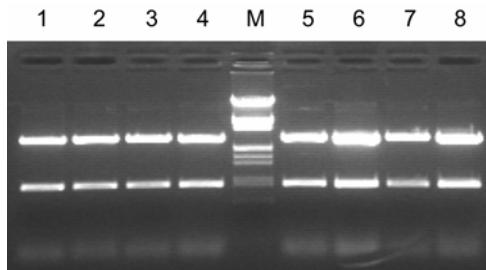


图 3-13 末端缺失 5-5 T 载体酶切鉴定

M: DNA Marker 1-8: T 载体克隆

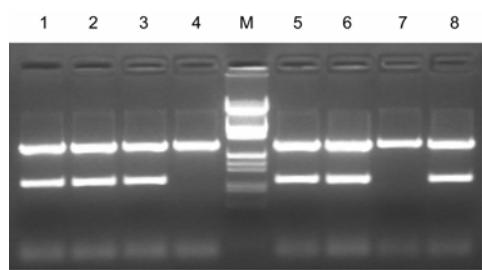


图 3-14 末端缺失 3-1 T 载体酶切鉴定

M: DNA Marker 1-8: T 载体克隆

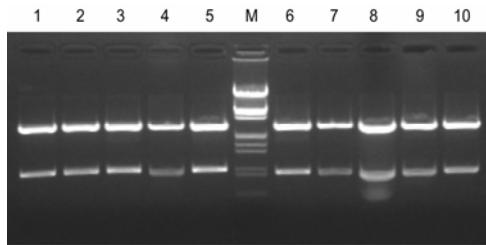
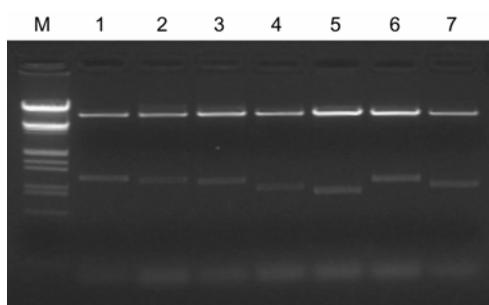


图 3-15 末端缺失 3-2 T 载体酶切鉴定

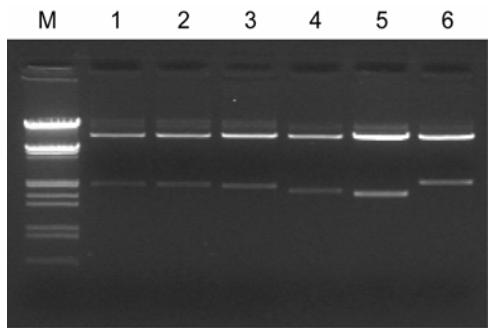
M: DNA Marker 1-10: T 载体克隆

3.1.8 含有末端缺失片段表达载体的构建

参照 pPIC9K-egx 质粒构建过程 (图 3-4), 用 *Eco*R I 从克隆载体上切下末端缺失片段, 通过 *Eco*R I 位点接入表达载体 pPIC9K。转化大肠杆菌, 提质粒, 用 *Eco*R I 单酶切 7 组重组的表达载体鉴定阳性克隆。7 组含有末端缺失片段的表达载体分别命名为 pPIC9K5-1、pPIC9K5-2、pPIC9K5-3、pPIC9K5-4、pPIC9K5-5、pPIC9K3-1、pPIC9K3-2。其中 pPIC9K5-1、pPIC9K5-2、pPIC9K5-3、pPIC9K5-4、pPIC9K5-5、pPIC9K3-1 用 *Sac* I 单酶切鉴定插入方向, pPIC9K3-2 用 5'AOX1 和 3'AOX1 通用引物测序, 验证插入方向。得到 7 个正向插入的克隆 (图 3-16,3-17)。

图 3-16 *EcoR I* 鉴定阳性克隆

- M: DNA 标准分子量 Marker
 1: pPIC9K5-1
 2: pPIC9K5-2
 3: pPIC9K5-3
 4: pPIC9K5-4
 5: pPIC9K5-5
 6: pPIC9K3-1
 7: pPIC9K3-2

图 3-17 *Sac I* 鉴定正向插入

- M: DNA 标准分子量 Marker
 1: pPIC9K5-1
 2: pPIC9K5-2
 3: pPIC9K5-3
 4: pPIC9K5-4
 5: pPIC9K5-5
 6: pPIC9K3-1
 7: pPIC9K3-2

3.1.9 末端缺失表达载体转化酵母

参照 3.1.3, 7 组末端缺失表达载体, 每个载体提取 20 μ g 质粒, 用 *Bpu1102 I* 单酶切线形化质粒, 通过电击法转化宿主菌毕赤酵母 GS115 (His^- , Mut^+), 转化物涂布 RDB 平板, 得到若干有外源基因插入的、具有正确 His^+ Mut^+ 表型的重组子 (图 3-18—3-24)。

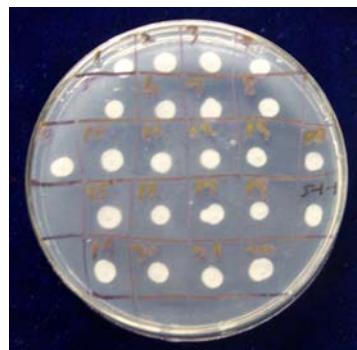


图 3-18 pPIC9K5-1 和 pPIC9K5-2 组氨酸利用型筛选

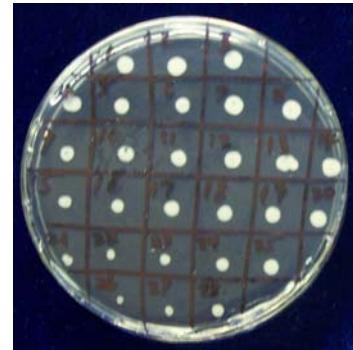


图 3-19 pPIC9K5-3 组氨酸利用型筛选

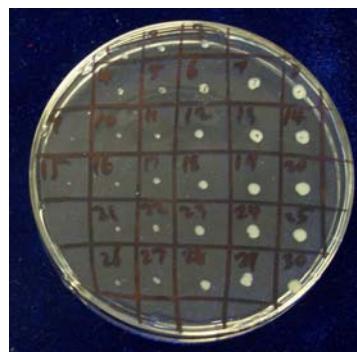


图 3-20 pPIC9K5-4 组氨酸利用型筛选

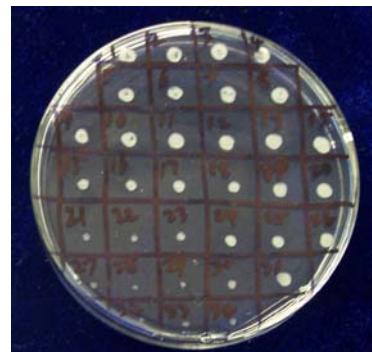


图 3-21 pPIC9K5-5 组氨酸利用型筛选

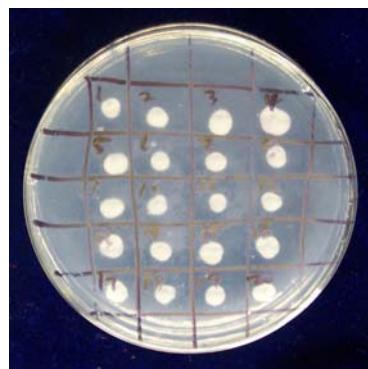


图 3-22 pPIC9K3-1 组氨酸利用型筛选

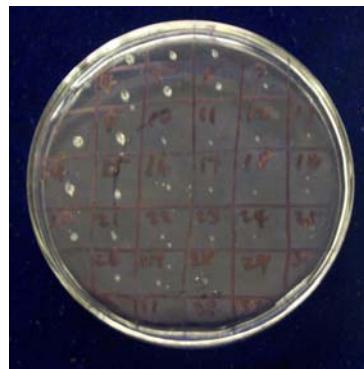


图 3-23 pPIC9K3-2 组氨酸利用型筛选

3.1.10 EGX 末端缺失片段酵母重组子的 PCR 检测

提取 *egx* 末端缺失片段酵母重组子基因组 DNA。以重组子基因组 DNA 为模板, 以菌株 GS115 基因组 DNA 为对照, 用相应的末端缺失扩增引物进行扩增。PCR 鉴定的结果如图 3-24—3-30。初步证明 PCR 阳性的重组子中, *egx* 末端缺失片段可能已经整合到酵母基因组中。

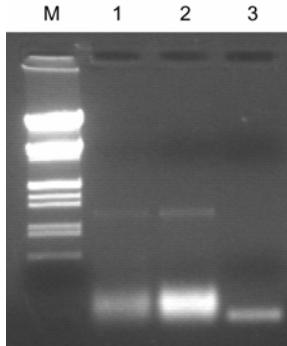


图 3-24 pPIC9K5-1 PCR 鉴定电泳图谱

M: DNA 标准分子量 Marker

1: pPIC9K5-1 重组子

2: pPIC9KEGX 阳性对照

3: GS115 阴性对照

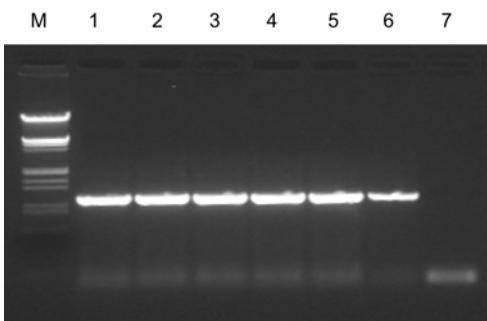


图 3-25 pPIC9K5-2 PCR 鉴定电泳图谱

M: DNA 标准分子量 Marker

1-5: pPIC9K5-1 重组子

6: pPIC9KEGX 阳性对照

7: GS115 阴性对照

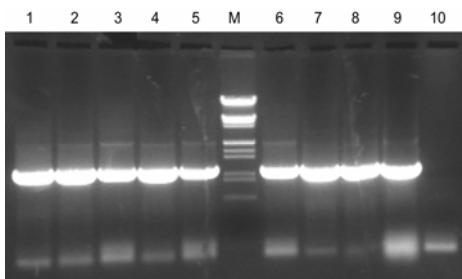


图 3-26 pPIC9K5-3 PCR 鉴定电泳图谱

M: DNA 标准分子量 Marker

1-8: pPIC9K5-1 重组子

9: pPIC9KEGX 阳性对照

10: GS115 阴性对照

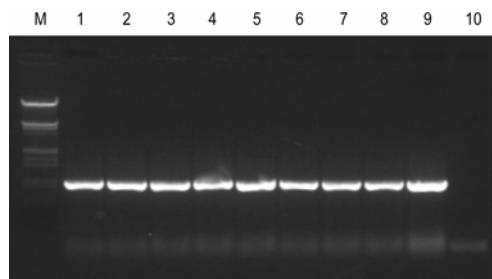


图 3-27 pPIC9K5-4 PCR 鉴定电泳图谱

M: DNA 标准分子量 Marker

1-8: pPIC9K5-1 重组子

9: pPIC9KEGX 阳性对照

10: GS115 阴性对照

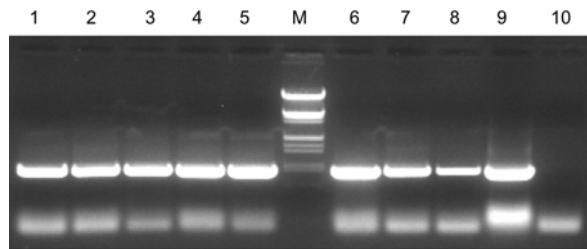


图 3-28 pPIC9K5-5 PCR 鉴定电泳图谱

M: DNA 标准分子量 Marker

1-8: pPIC9K5-1 重组子

9: pPIC9Kegx 阳性对照

10: GS115 阴性对照

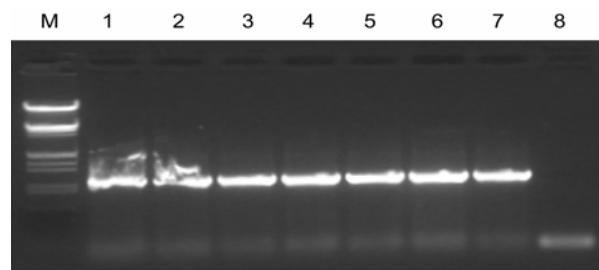


图 3-29 pPIC9K3-1 PCR 鉴定电泳图谱

M: DNA 标准分子量 Marker

1-8: pPIC9K5-1 重组子

9: pPIC9Kegx 阳性对照

10: GS115 阴性对照

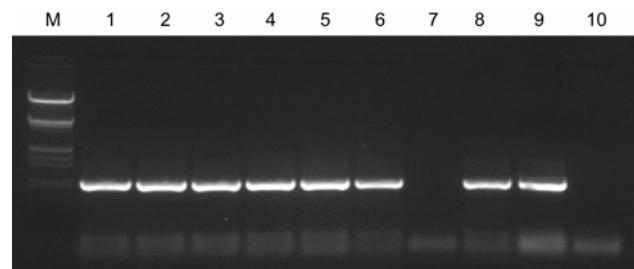


图 3-30 pPIC9K3-2 PCR 鉴定电泳图谱

M: DNA 标准分子量 Marker

1-8: pPIC9K5-1 重组子

9: pPIC9Kegx 阳性对照

10: GS115 阴性对照

3.1.11 末端缺失片段的甲醇诱导表达和纤维素酶活力检测

pPIC9K5-1 挑取一个重组子, 其他 6 组末端缺失片段各挑取 3 个重组子, 甲醇诱导表达 4 天, 所得表达产物冷冻干燥, 粉末溶于 50 μ l 10mM 磷酸缓冲液 (pH6.0)。每个重组子各取 10 μ l 表达产物, 空载体作空白对照, 用考马斯亮蓝染色法测蛋白含量; 另外取 10 μ l 表达产物加入 0.5ml 反应体系, 空载体作空白对照测内切- β -1,4-葡聚糖酶、外切- β -1,4-葡聚糖酶、外切- β -1,4-木聚糖酶活力。根据葡萄糖标准曲线和蛋白含量标准曲线, 计算酶总活力和比活力(表 3-2—3-6) 并对表中的数据作折线图分析 (图 3-31—3-33)。

表 3-2 重组子编号与表达载体对应情况

标号	说明
5 1	pPIC9K5-1 重组子
5 2 1	pPIC9K5-2 重组子 1
5 2 3	pPIC9K5-2 重组子 3
5 2 4	pPIC9K5-2 重组子 4
5 3 1	pPIC9K5-3 重组子 1
5 3 2	pPIC9K5-2 重组子 2
5 3 3	pPIC9K5-2 重组子 3
5 4 1	pPIC9K5-4 重组子 1
5 4 2	pPIC9K5-4 重组子 2
5 4 3	pPIC9K5-4 重组子 3
5 5 1	pPIC9K5-5 重组子 1
5 5 2	pPIC9K5-5 重组子 2
5 5 3	pPIC9K5-5 重组子 3
3 1 1	pPIC9K3-1 重组子 1
3 1 2	pPIC9K3-1 重组子 2
3 1 3	pPIC9K3-1 重组子 3
3 2 1	pPIC9K3-2 重组子 1
3 2 2	pPIC9K3-2 重组子 2
3 2 3	pPIC9K3-2 重组子 3
EGX	pPIC9Kegx

表 3-3 重组子蛋白含量

标号\项目	蛋白 OD	蛋白含量(mg)
5 1	0.106	0.070601
5 2 1	0.122	0.080843
5 2 3	0.781	0.502676
5 2 4	0.777	0.500115
5 3 1	0.867	0.557725
5 3 2	0.858	0.551964
5 3 3	0.963	0.619176
5 4 1	0.934	0.600612
5 4 2	0.914	0.58781
5 4 3	0.856	0.550684
5 5 1	0.999	0.642219
5 5 2	0.898	0.577568
5 5 3	0.977	0.628137
3 1 1	0.952	0.612134
3 1 2	1.001	0.6435
3 1 3	0.71	0.457228
3 2 1	0.986	0.633898
3 2 2	0.921	0.592291
3 2 3	0.934	0.600612
EGX	0.958	0.615975

表 3-4 内切- β -1,4-葡聚糖酶活测定

标号\项目	OD	总酶活	比活力
5 1	0.0127	0.041512	0.587977
5 2 1	0.0113	0.039501	0.488607
5 2 3	0.0111	0.039213	0.078009
5 2 4	0.0095	0.036914	0.073812
5 3 1	0.0031	0.027719	0.049701
5 3 2	0.0018	0.025852	0.046836
5 3 3	0.0169	0.047546	0.076789
5 4 1	0.0114	0.039644	0.066006
5 4 2	0.009	0.036196	0.061578
5 4 3	0.0071	0.033466	0.060772
5 5 1	0.0091	0.03634	0.056585
5 5 2	0.0122	0.040794	0.07063
5 5 3	0.0124	0.041081	0.065401
3 1 1	0.0102	0.03792	0.061947
3 1 2	0.0076	0.034185	0.053123
3 1 3	0.0126	0.041368	0.090476
3 2 1	0.0057	0.031455	0.049621
3 2 2	0.0066	0.032748	0.05529
3 2 3	0.0066	0.032748	0.054524
EGX	0.24574	0.37632	0.61095

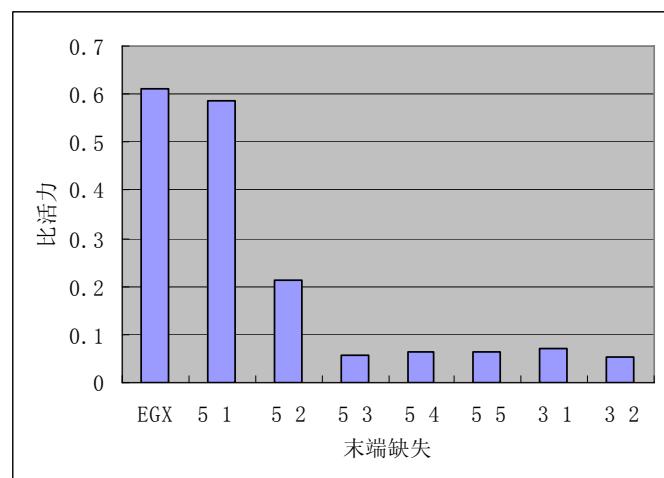
表 3-5 内切- β -1,4-木聚糖酶酶活测定

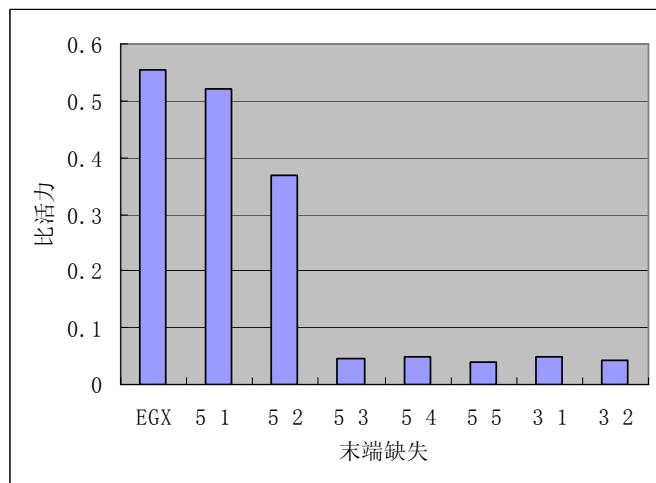
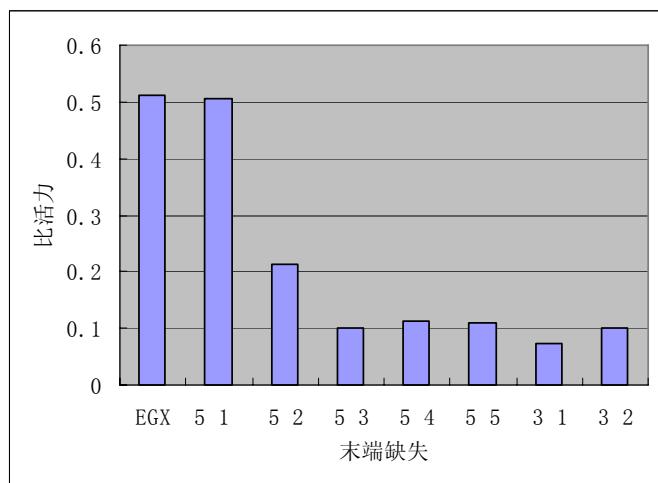
标号\项目	OD	总酶活	比活力
5 1	0.0094	0.036771	0.520822
5 2 1	0.009	0.036196	0.447732
5 2 3	0.005	0.030449	0.060574
5 2 4	0.0045	0.029731	0.059448
5 3 1	0.0028	0.027288	0.048928
5 3 2	0.002	0.026139	0.047356
5 3 3	0.0019	0.025995	0.041984
5 4 1	0.0031	0.027719	0.046152
5 4 2	0.0039	0.028869	0.049112
5 4 3	0.0053	0.03088	0.056076
5 5 1	0.0022	0.026426	0.041148
5 5 2	0	0	0
5 5 3	0.0012	0.02499	0.039784
3 1 1	0.0022	0.026426	0.043171
3 1 2	0	0	0
3 1 3	0.002	0.026139	0.057168
3 2 1	0.0018	0.025852	0.040782
3 2 2	0.0017	0.025708	0.043404
3 2 3	0.0015	0.025421	0.042324
EGX	0.22174	0.34185	0.55497

表 3-6 外切- β -1,4-葡聚糖酶活性测定

标号\项目	OD	总酶活	比活力
5 1	0.0088	0.035656	0.505031
5 2 1	0.0038	0.028616	0.353968
5 2 3	0.0173	0.047624	0.09474
5 2 4	0.05	0.093665	0.187287
5 3 1	0.0044	0.029461	0.052823
5 3 2	0.032	0.068321	0.123778
5 3 3	0.038	0.076769	0.123986
5 4 1	0.0375	0.076065	0.126646
5 4 2	0.0247	0.058043	0.098744
5 4 3	0.0292	0.064379	0.116907
5 5 1	0.041	0.080993	0.126114
5 5 2	0.0046	0.029742	0.051496
5 5 3	0.0528	0.097607	0.155392
3 1 1	0.028	0.062689	0.102411
3 1 2	0.002	0.026081	0.040531
3 1 3	0.008	0.034529	0.075519
3 2 1	0.0134	0.042133	0.066466
3 2 2	0.062	0.110561	0.186666
3 2 3	0.005	0.030305	0.050458
EGX	0.20654	0.37632	0.510915

对相同的末端缺失样品计算其比活力平均值, 绘制图表 (图 3-31, 3-32, 3-33)

图 3-31 内切- β -1,4-葡聚糖酶比活力图

图 3-32 内切- β -1,4-木聚糖酶比活力图图 3-33 外切- β -1,4-葡聚糖酶比活力图

3.2 讨论

自 1912 年人们开始研究能降解纤维素的微生物以来，对纤维素酶的研究已有近百年历史。尤其是上世纪 70 年代以后，对纤维素酶的研究热点逐渐转移到开辟新能源上(王祖农,1986)。纤维素酶可以将纤维素降解成简单糖，进而发酵生产乙醇。乙醇可以部分地替代石油，为缓解因石油资源日益短缺而带来的能源危机提供了一个安全环保而又行之有效的解决办法。要实现乙醇工业化生产代替石油，关键在于纤维素的酶活力和生产成本。所以对纤维素酶的研究重点就集中在如何最大限度地提高纤维素酶活力上。20 世纪九十年代初期，随着分子生物学技术的快速发展，

许多纤维素酶分子的三维结构和作用机制被揭示 (Rouvinen J, 1990; Juy M, 1992; Spezio M, 1993; (Divne C, 1994), 尤其是蛋白质工程和基因定点突变技术的发展, 使人们能够按照需要改变天然蛋白质的序列和结构。能否用分子生物学技术改造出高活力的纤维素酶, 这已经成为目前人们十分关心的问题。本实验以福寿螺多功能内源性纤维素酶 *EGX* 蛋白质二级结构为基础, 以 α 螺旋和 β 折叠为单位进行分段缺失, 赘在研究哪些二级结构对酶的活力是至关重要的。

本实验共测得 7 组末端缺失 (N 端缺失 5 组 C 端缺失 2 组) 共 19 个样品, 得到的 7 组末端缺失的三种酶比活力都比较低, 介于 0.5-0.7 之间。有报道从福寿螺消化道液中提取出来的 *EGX* 酶经疏水层析后外切- β -1,4-葡聚糖酶比活力, 内切- β -1,4-木聚糖酶比活力, 内切- β -1,4-葡聚糖酶比活力分别为 12.5U/mg, 196U/mg, 40.3U/mg (图 3-34) (王骥 等, 2004), 但是未经蛋白纯化的福寿螺消化道胃液, β -1,4-葡萄糖苷酶比活力 (底物 pNPC) 却只有 0.38U (图 3-35)。这可能是因为胃液中含有的杂蛋白和干扰物质比较多, 导致酶比活力偏小。本实验采用毕赤酵母外分泌表达系统, 收获分泌蛋白的方法为培养基上清直接冷冻干燥, 所得粉末用 1/10 体积的磷酸缓冲液溶解 (相当于浓缩 10 倍)。虽然毕赤酵母表达系统所分泌的内源蛋白很少 (唐元家等, 2002), 在 4 天的诱导培养过程中, 培养基中可能含有很多死亡菌体释放的蛋白和少量酵母内源性外分泌的蛋白, 还有培养基中的一些杂质, 这些因素都可能造成酶比活力观测值偏低。

底物	水解比活力 (U/mg)
pNPC	12.5
微晶纤维素 Sigmacell	37.2
CMC-Na	40.3
β -水杨素	未测出
Birchwood 的木聚糖	196
Oat spelt 的木聚糖	275
对-硝基酚吡喃型木糖苷	未测出
可溶性淀粉	未测出

图 3-34 *EGX* 几种酶的比活力 (王骥 等, 2004)

纯化步骤	总蛋白(mg)	总活力(U)	比活力(U/mg)	得率(%)	纯化倍数
抽提上清	440.0	167	0.380	100	1
硫酸沉淀	308.7	162	0.525	97.0	1.38
离子交换柱层析	57.8	93.3	1.61	55.9	4.24
凝胶过滤柱层析	6.77	62.0	9.15	37.1	24.8
疏水层析	2.85	35.7	12.5	21.4	32.9

图 3-35 福寿螺消化道抽提液 pNPC 酶比活力 (王骥 等, 2004)

比较末端缺失片段比活力与 EGX 完整阅读框表达的全酶比活力(图 3-31—3-33),可以看出,蛋白质 N 段第一个 α 融合缺失,对三种酶比活力影响不大,缺失一个 Helix 和一个 β 折叠对内切- β -1,4-木聚糖酶活力影响也不大,但对外切- β -1,4-葡聚糖酶活性和内切- β -1,4-葡聚糖酶活性有很大的影响,酶比活力急剧下降。由此推断,蛋白 N 端第一个 α 融合 β 折叠(如图 3-3 所示)对外切- β -1,4-葡聚糖酶活性和内切- β -1,4-葡聚糖酶活性很重要。C 端 4 个 β 折叠缺失就会极大削弱三种酶活力。

在所作的 7 组末端缺失中,虽然有六组都使酶比活力有急剧的下降,但是都未使酶完全丧失活性。有报道推断 EGX Glu268 有可能是催化反应的亲核反应基团, Glu167 有可能是催化反应的质子供体。本研究所作的 7 组末端缺失片段都没有涉及这两个保守的活性基团和邻近的氨基酸残基,这可能是经过截短的酶分子仍旧能够保持少许酶活力的原因。图 3-36 为末端缺失片段与 EGX 所在的糖苷水解酶第 10 家族其他纤维素酶氨基酸序列的对比(Glu268 和 Glu167 已标出)。

EGX_5-4	-----
EGX_5-5	-----
EGX_5-3	-----MTC 3
EGX_5-2	-----MGQVSIRVLQKRKAFPFGTC 20
EGX_5-1	-----MDITVHVNVGGNINHGQVSIRVLQKRKAFPFGTC 34
EGX_3-1	-----MPSGAAGAGVTSEIDRLRRSDITVHVNVGGNINHGQVSIRVLQKRKAFPFGTC 53
EGX_3-2	-----MPSGAAGAGVTSEIDRLRRSDITVHVNVGGNINHGQVSIRVLQKRKAFPFGTC 53
EGX	-----MPSGAAGAGVTSEIDRLRRSDITVHVNVGGNINHGQVSIRVLQKRKAFPFGTC 53
P.	-----QASVSIADFKAHGKKYLGTI 21
T.	-----MVRPTILLTSLLLAAFFAAASPITLEER---QAAQSVQDQIKARGKVVYFGVA 47
S.	-----MGSYALPRSGVRRSIRVLLALVVGVLTATAIAPPGAHAAESTLGAAAAQSGRYFGTA 60
C.	-----MPRTTPAPGHPARGARTALRTRRAATLUVVATVVLPAQAATTLEAADGAG-RDFGFA 59
EGX_5-4	-----MGLNMLHGLRNHGI 14
EGX_5-5	-----
EGX_5-3	-----VAAWAYNDGSKGAYRDIHQHYNWAVPENSLKWAISIEPNRGQKNYQPGLNMLHGLRNHGI 63
EGX_5-2	-----VAAWAYNDGSKGAYRDIHQHYNWAVPENSLKWAISIEPNRGQKNYQPGLNMLHGLRNHGI 80
EGX_5-1	-----VAAWAYNDGSKGAYRDIHQHYNWAVPENSLKWAISIEPNRGQKNYQPGLNMLHGLRNHGI 94
EGX_3-1	-----VAAWAYNDGSKGAYRDIHQHYNWAVPENSLKWAISIEPNRGQKNYQPGLNMLHGLRNHGI 113
EGX_3-2	-----VAAWAYNDGSKGAYRDIHQHYNWAVPENSLKWAISIEPNRGQKNYQPGLNMLHGLRNHGI 113
EGX	-----VAAWAYNDGSKGAYRDIHQHYNWAVPENSLKWAISIEPNRGQKNYQPGLNMLHGLRNHGI 113
P.	-----GDQYTLTKNT---KNPAIKADFGQQLTPENS MKWDATEPNRGQFTFSGSDFYLVMFAQSNGK 79
T.	-----TDQNRLTTG---KNAAIIQADFGQVTPENS MKWDATEPNRGQFTFSGSDFYLVMFAQSNGK 104
S.	-----IASGRLSDS---TYTSIAGREFNMVTAENEMKIDATEPQRGQFNFSSSADRVYVNWAVQNGK 117
C.	-----LDPNRNSEA---QYKAIADSEFNLVVAENAMKWDATEPQSNSFSFGAGDRVASYAADTGK 116
EGX_5-4	-----KVRGHNLVWSVDNTVQNWVKALHGD-ELRKVVDHIVETINTFKGLVEHWDVNNENLH-- 71
EGX_5-5	-----MVQNWVKALHGD-ELRKVVDHIVETINTFKGLVEHWDVNNENLH-- 44
EGX_5-3	-----KVRGHNLVWSVDNTVQNWVKALHGD-ELRKVVDHIVETINTFKGLVEHWDVNNENLH-- 120
EGX_5-2	-----KVRGHNLVWSVDNTVQNWVKALHGD-ELRKVVDHIVETINTFKGLVEHWDVNNENLH-- 137
EGX_5-1	-----KVRGHNLVWSVDNTVQNWVKALHGD-ELRKVVDHIVETINTFKGLVEHWDVNNENLH-- 151
EGX_3-1	-----KVRGHNLVWSVDNTVQNWVKALHGD-ELRKVVDHIVETINTFKGLVEHWDVNNENLH-- 170
EGX_3-2	-----KVRGHNLVWSVDNTVQNWVKALHGD-ELRKVVDHIVETINTFKGLVEHWDVNNENLH-- 170
EGX	-----KVRGHNLVWSVDNTVQNWVKALHGD-ELRKVVDHIVETINTFKGLVEHWDVNNENLH-- 170
P.	-----LIRGHTLVUHSQ---LPGWVSSITDKNTLISVLUHNTTVMTRYKGKIYAWDVLNEIFNED 137
T.	-----LIRGHTLVUHSQ---LPSWVSSITDKNTLTNVMKHNTTLMTRYKGKIRAWDVMNEAFNED 162
S.	-----QVRGHTLAWHSQ---QPGWUMQSLSGS-ALRQAMIDHINGVMAHYKGKIVQWDVVMNEAFADG 174
C.	-----ELYGHTLVUHSQ---LPDWAKNLNGS-AFESAMVNHVTKVADHFEGKVASWDVVMNEAFADG 173
EGX_5-4	-----GQWYQHQLNDNGYNLELFRIAHAADPNVKLFLNDYNVVNSNSYSTNDYLR-QGQQFK 126
EGX_5-5	-----GQWYQHQLNDNGYNLELFRIAHAADPNVKLFLNDYNVVNSNSYSTNDYLR-QGQQFK 99
EGX_5-3	-----GQWYQHQLNDNGYNLELFRIAHAADPNVKLFLNDYNVVNSNSYSTNDYLR-QGQQFK 175
EGX_5-2	-----GQWYQHQLNDNGYNLELFRIAHAADPNVKLFLNDYNVVNSNSYSTNDYLR-QGQQFK 192
EGX_5-1	-----GQWYQHQLNDNGYNLELFRIAHAADPNVKLFLNDYNVVNSNSYSTNDYLR-QGQQFK 206
EGX_3-1	-----GQWYQHQLNDNGYNLELFRIAHAADPNVKLFLNDYNVVNSNSYSTNDYLR-QGQQFK 225
EGX_3-2	-----GQWYQHQLNDNGYNLELFRIAHAADPNVKLFLNDYNVVNSNSYSTNDYLR-QGQQFK 225
EGX	-----GQWYQHQLNDNGYNLELFRIAHAADPNVKLFLNDYNVVNSNSYSTNDYLR-QGQQFK 225
P.	-----GS-LRNSVFTNVIGEDYVRIAFETARSVDPNAKLYINDYNLDSAGYSKVNGMVSIVVKWL 196
T.	-----GS-LRQTVFLNVIGEDYIPIAFQTTARAADPNAKLYINDYNLDSASYPKTQAIVNVRVKQWR 221
S.	-----SSGARDSDNLQRSGNDWIEVAFRTARAADPSAKLCYNDYVNENUTWAKTQAMYNMVRDFK 234
C.	-----DGPPQDSAFQQKLGNGYIETAFRAARAADPTAKLCINDYVNVEGIN-AKSNSLYDLVKDFK 232
	-----: * . * : : * : * : * * * * : : : : : : : :

EGX_5-4	AANVGLYGLGAQCHFGDESDPEPGTKQRLDTLAQVG-VPIWATELDVVVASDEN-----R	179
EGX_5-5	AANVGLYGLGAQCHFGDESDPEPGTKQRLDTLAQVG-VPIWATELDVVVASDEN-----R	152
EGX_5-3	AANVGLYGLGAQCHFGDESDPEPGTKQRLDTLAQVG-VPIWATELDVVVASDEN-----R	228
EGX_5-2	AANVGLYGLGAQCHFGDESDPEPGTKQRLDTLAQVG-VPIWATELDVVVASDEN-----R	245
EGX_5-1	AANVGLYGLGAQCHFGDESDPEPGTKQRLDTLAQVG-VPIWATELDVVVASDEN-----R	259
EGX_3-1	AANVGLYGLGAQCHFGDESDPEPGTKQRLDTLAQVG-VPIWATELDVVVASDEN-----R	278
EGX_3-2	AANVGLYGLGAQCHFGDESDPEPGTKQRLDTLAQVG-VPIWATELDVVVASDEN-----R	278
EGX	AANVGLYGLGAQCHFGDESDPEPGTKQRLDTLAQVG-VPIWATELDVVVASDEN-----R	278
P.	AAGIPIDGIGSQTHLGAG--AGSAVAGALNALASAGTKEIAITELDIAG-----A	244
T.	AAGVPIDGIGSQTHLSAG--QGASVQLQALPLLASAGTPEVAITELDVAG-----A	269
S.	QRGVVIDCUGFQSHFNNSGPYNSNFRRTLQNFALG-VDVAITELDIQG-----A	283
C.	ARGVPLDCVGFQSHLIVG-QVPGDFRQNLQRFADLG-VDVRIITELDIRMRTPSDATKLAT	290
	.. : : * * : * : * * : * * * :	
EGX_5-4	RADFYEHALTIVLYGHHAVEGILMWGFWDKAHWURGARAA-----LUVGDNLQLTAAGRRLV	234
EGX_5-5	RADFYEHALTIVLYGHHAVEGILMWGFWDKAHWURGARAA-----LUVGDNLQLTAAGRRLV	207
EGX_5-3	RADFYEHALTIVLYGHHAVEGILMWGFWDKAHWURGARAA-----LUVGDNLQLTAAGRRLV	283
EGX_5-2	RADFYEHALTIVLYGHHAVEGILMWGFWDKAHWURGARAA-----LUVGDNLQLTAAGRRLV	300
EGX_5-1	RADFYEHALTIVLYGHHAVEGILMWGFWDKAHWURGARAA-----LUVGDNLQLTAAGRRLV	314
EGX_3-1	RADFYEHALTIVLYGHHAVEGILMWGFWDKAHWURGARAA-----LUVGDNLQLTAAGRRLV	333
EGX_3-2	RADFYEHALTIVLYGHHAVEGILMWGFWDKAHWURGARAA-----LUVGDNLQLTAAGRRLV	306
EGX	RADFYEHALTIVLYGHHAVEGILMWGFWDKAHWURGARAA-----LUVGDNLQLTAAGRRLV	333
P.	SSTDYVNVNNACLNQAKCVGITVWGVADPDWSURSSSS-----LLFDGNYNPKAAYNAIA	299
T.	SSTDYVNVNNACLNVQSCVGITVWGVADPDWSURASTTP-----LLFDGNFNPKPAYNAIV	324
S.	PASTYANVTNDCLAVSRLCLGITVWGVVRDSDSWSRSEQTP-----LLFNNDGSKKAAYTAVL	338
C.	QAADYKKVVAQCMQVTRCQGVTVWGITDKYSWVDPDFPGEAGAALVWDASYAKKPAYAAVM	350
	: * : . * : * : * : * :	
EGX_5-4	ELFEHRUMTDETHNLAAGTQFTVRGFHGDYEVQVIVQGQEHTNLRQTFSLGNGPHTVNIN	294
EGX_5-5	ELFEHRUMTDETHNLAAGTQFTVRGFHGDYEVQVIVQGQEHTNLRQTFSLGNGPHTVNIN	267
EGX_5-3	ELFEHRUMTDETHNLAAGTQFTVRGFHGDYEVQVIVQGQEHTNLRQTFSLGNGPHTVNIN	343
EGX_5-2	ELFEHRUMTDETHNLAAGTQFTVRGFHGDYEVQVIVQGQEHTNLRQTFSLGNGPHTVNIN	360
EGX_5-1	ELFEHRUMTDETHNLAAGTQFTVRGFHGDYEVQVIVQGQEHTNLRQTFSLGNGPHTVNIN	374
EGX_3-1	ELFEHRUMTDETHNL-----	348
EGX_3-2	ELFEHRUMTDETHNLAAGTQFTVRGFHGDYEVQVIVQGQEHTNLRQTFSLGNGPHTVNIN	393
EGX	NAL-----	302
P.	QDLQQ-----	329
T.	DALNNGDSSEPPADGGQIKGVGSGRCLDVFDASTSDGTQLQLWDCHSGTNQQWAATDAGE	398
S.	EAFGASPTPTPTPTPTPTPTSGPAGCQLWGVN-----QWNTGFTANVTVKNTSS	406
C.		
EGX_5-4	VS-----	296
EGX_5-5	VS-----	269
EGX_5-3	VS-----	345
EGX_5-2	VS-----	362
EGX_5-1	VS-----	376
EGX_3-1	-----	
EGX_3-2	-----	
EGX	VS-----	395
P.	-----	
T.	-----	
S.	LRVYGDKCLDAAGTSNGSKVQIYSCWGGDNQKWRNLNSDGSVVGVQSGLCLDAVGNGTANG	458
C.	APVDGWTLTSFPSQGQVTQAWSSTVTQSGSAVTVRNAPWNGSIPAGGTAQFGFNGSHTG	466
EGX_5-4	-----	
EGX_5-5	-----	
EGX_5-3	-----	
EGX_5-2	-----	
EGX_5-1	-----	
EGX_3-1	-----	
EGX_3-2	-----	
EGX	-----	
P.	-----	
T.	-----	
S.	TLIQLYTCNSGSNQRWTRT	477
C.	TNAAPTAFSLNGTPCTVG-	484

图 3-36 末端缺失片段与糖苷水解酶家族其他成员氨基酸序列对比

EGX 酶蛋白是高比例的 α 融合螺旋蛋白质 (李文颖, 2004)。其酶活力与其蛋白二级结构 α 融合螺旋关系密切。蛋白质的变性失活常常伴随着大量 α 融合螺旋的去折叠。保守活性位点 Glu167 和 Glu268 也位于蛋白二级结构中 α 融合螺旋富集区 (见图 3-3 和 3-36)。这段 α 融合螺旋富集区很靠近蛋白序列 C 端 (DNA 序列 3' 端), 距离 C 末端只有 4 个 β 折叠。这也解释为什么蛋白序列 C 端第一个 β 折叠的缺失对酶活力影响如此显著。

N 端缺失 3 个 α 融合螺旋 2 个 β 折叠 (127 个氨基酸残基), C 端缺失 4 个 β 折叠和 2 个 α 融合螺旋 (89 个氨基酸残基) 虽使酶活力大幅度下降, 但是未使酶完全失活, 即未触及催化活性位点。假设 *EGX* 三种酶活力由相对独立的三个结构域完成, *EGX* 氨基酸序列全长 396 个氨基酸残基, 在 N 端和 C 端共缺失 216 个氨基酸后仍旧有三种酶活力, 那么三个结构域要集中在短短 180 个氨基酸的肽段里, 这种情况是极少见的。王骥用计算机软件对 *EGX* 氨基酸序列作疏水性分析, 未发现有明显的亲水区域 (王骥 等, 2004), 推断 *EGX* 不含有空间上互相独立的结构域。Glu167 和 Glu268 很可能是三种酶活力共同的催化位点。N 端和 C 端二级结构单元的缺失可能使酶分子天然的立体构象发生改变, 从而影响到酶与底物的“诱导-契合”和对底物的水解, 使酶不能高效地催化底物。纤维素酶 *EGX* 属于糖苷水解酶第 10 家族, 家族内部成员可能具有相似的分子折叠方式和相同的作用机制。糖苷水解酶第 10 家族成员中既有纤维素酶 (Davies G. J., 1998), 又有木聚糖酶 (Fukumura M., 1995), 纤维素酶与木聚糖酶的催化机制可能是相似的, 纤维素酶 *EGX* Glu167 和 Glu268 同时行使三种酶活性是可能的。

egx 阅读框全序列表达 *EGX* 酶 SDS-PAGE 电泳显示, 差异性条带分子量为 70kDa (图 3-8)。已报道的 *EGX* 蛋白序列含有 396 个氨基酸残基, 分子量 41.5kDa (王骥 等, 2004)。王骥在利用毕赤酵母表达 *EGX* 时, 表达的 *EGX* 分子量为 66kDa, 并且利用计算机软件分析, 发现 *EGX* 有 4 个潜在的 O-糖基化位点和一个 N 糖基化位点 (王骥 等, 2004)。由此推断, *EGX* 在表达过程中过度糖基化是造成以上分子量差异的主要原因。

3.3 EST 片段克隆结果和分析

材料: 褐云玛瑙螺 (*Achatina fulica*) 购自北京

引物: 以福寿螺多功能纤维素酶基因 *egx* cDNA 序列为模版, 设计 9 条引物

引物 1: TGCCCTCTGGTGCTGCTG

引物 2: GCCCTCCACGGCATGATG

引物 4: GAACTGAGTGCCCCCTGC

引物 5: CAATGGCTACAACCTGGAAC

引物 6: AACGACTATCTTCGACAAGGTC

引物 7: CTAGCTAACATTAATGTTGACGGT

引物 8: TGGGTCCAAAGGAGCATACC

引物 9: CATGCTTCACGGACTGAGAAAT

引物 10: TCGAAAGGTTGCCATGACC

提取褐云玛瑙螺组织 RNA (图 3-37), 反转录 cDNA。以 cDNA 为模版, 以……为引物 PCR 扩增 (图 3-38)。

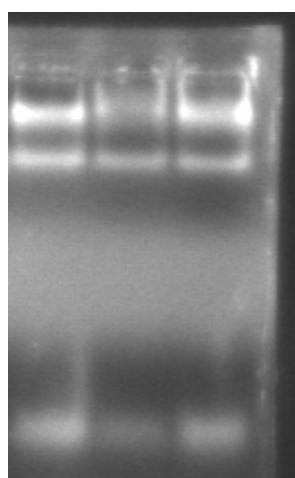


图 3-37 褐云玛瑙螺 RNA 电泳

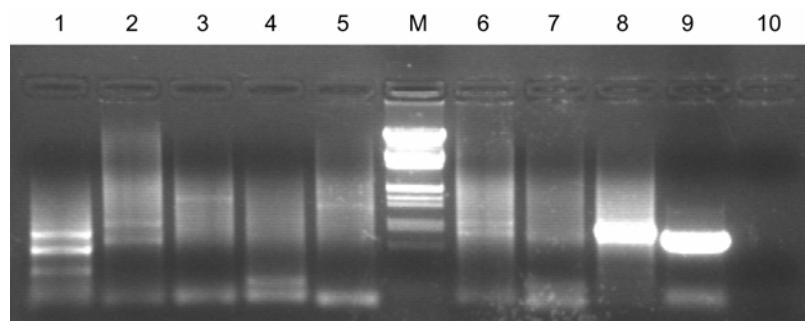


图 3-38 PCR 电泳图

M:DNA 标准

4:引物 6/引物 7

8:引物 1/引物 7

1:引物 1/引物 2

5:引物 8/引物 7

9:阳性对照

2:引物 1/引物 4

6:引物 9/引物 7

10:水对照

3:引物 5/引物 7

7:引物 10/引物 7

10:水对照

以 T-A 克隆的方式连接 T 载体 pMD18-T, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受肽细胞。提取转化子质粒, 以 *Bam*H/*Hind*III 双酶切检测外源片段插入, 选择插入片段在 500bp-4000bp 之间的克隆测序。共选取 60 个转化子克隆测序。测序结果经与 NCBI 核酸序列和蛋白序列比较, 未发现与纤维素酶基因同源的核酸序列和蛋白序列, 但是比对中发现了三个 EST 序列, DNA 片段长度分别为 855bp、270bp、768bp。其核酸序列和蛋白序列及其结构域如下:

核酸序列:

```

1      CTAGCTAACAA TTAATGTTGA CGGTGCCGTA GAGCAGGAAC TTGACACGAT
51     CGCTACTCAT CCTGAGGATG TGTTCAAGT TCCAAATTAC GATCAAATCT
101    TGTCAATCGT ACAAGATTAT AGTGAGCTTG TCTGCAATGA AGTGAAACTG
151    TTCAAGTGCT ACAATGACGC TGATATCTAC TTTCTACTGG ACTCGTCTAG
201    CGGGATATCC CCAGCTTACT TCCAGAACGC TGTTCTCTAC GCTCAGAATA
251    TCACCAACAG ATTGATTTG TCTGTGTTCA GCTTCGGAGC CGCAACTTTC
301    GGTGGTTCCA ACGTGCAGTC TCTCTCAA CTAGGTCAAA TAAGTGATCG
351    CTACCAGCTA GCTCAGACAT TTAGCACAGC CGCGTACCTA GGCGGAGCCA
401    CGGACATAAA CGCCGCCCTC CAGTACGTGT TAAGCCAGAG AGTGTGGAC
451    CCGTCTTTAG GTGGCCGGCC TAATGCCATC AAGATACTTG TCATCTTCAC
501    AAACGGTGGT TCAGCTACAC GACCTCAAGC TGTAAGTACC GCCAACCGAC
551    TGAAGGCAGA AGGCGTGAAC ATCGTCGCTG TTGGCGTGTCA TAACCCGAAT
601    ATTCAAGAGC TACAGCAGCT GGTGGTTGAG AAAGCTCTGG ATGTGGTAAC
651    CAACCTGGC ACACAGACAT TGCTGCTGGC CGTCTACAGA CGCTAACACAG
701    CTGCGGAAGT TTGCACAGTC CCTAAACTG CAGTCAGAGG TGCCGAAGAC
751    GCCTGCAGAC TGTACAGCTG GGAGAACGGC ATCCATCCTC ACCCCTACGA
801    CTGCACAAAG TACATCGAGT GCACCTTCCT GAAGACGGAC ATCATGCCGT
851    GGAGGGC

```

蛋白序列:

```

1      LANINVDGAV EQELDTIATH PEDVFQVPNY DQLLSIVQDY SELVCNEVKL
51     FKCYNDADIY FLLDSSSGIS PAYFQNAVLY AQNITNRFDL SVFSFGAATF
101    GGSNVQSLFK LGQISDRYQL AQTFSSTAAYL GGATDINAAL QYVLSQRVFD
151    PSLGGRPNAI KILVIFTNGG SATRPQAVST ANQLKAEGVN IVAVGVSNPN
201    IQELOQLVVE KALDVVTNLG TQTLLLAVYR RTAAEVCTVP KTAVRGAEDA
251    CRLYSWENGI HPHPYDCTKY IECTFLKTDI MPWR

```

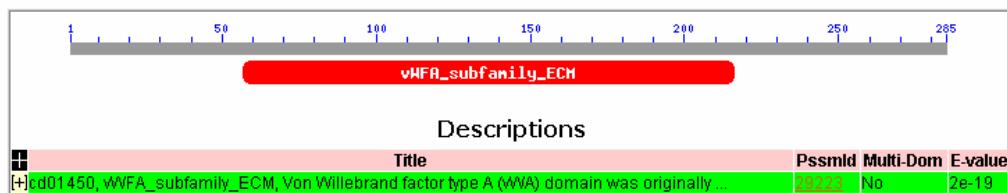


图 3-39 vWFA_subfamily_ECM 图示

```

Feature 1      # # #
1DZI_A      3 IDVVVVVCDENSIY. [1]. WDAVKNFLEKFVQGL. [8]. VGLIQYA. [1]. NPRVVFN. [8]. MIVAT. [3]. SQY 75
query      57 ADIYFLLDSSSGIS. [3]. FQNAVLYAQNITNRF. [6]. FGAATFG. [2]. NWQSLFKL. [8]. LAQTF. [3]. AYL 130
1JLM      7 SDIAFLIDGSGSII. [3]. FRRMKEFVSTVMEQL. [6]. FSLMQYS. [1]. EFRIHFTF. [8]. PRSLV. [3]. TQL 79
1FE8_C      12 LDVILLLDGSSSPP. [3]. PDEXKSFAKAFISKA. [8]. VSVLQYG. [1]. ITTIDVPW. [8]. LLSLV. [3]. QRE 86
1M10_A      16 LDLVFLLDGSSRLS. [3]. FEVLKAFVVDKMEQL. [8]. VAVVEYH. [1]. GSHAYIGL. [8]. LRRIA. [3]. KYA 90
1AOX_A      8 IDVVVVVCDENSIY. [1]. WDAVKNFLEKFVQGL. [8]. VGLIQYA. [1]. NPRVVFN. [8]. MIVAT. [3]. SQY 80
1BHQ_1      2 SDIAFLIDGSGSII. [3]. FRRMKEFVSTVMEQL. [6]. FSLMQYS. [1]. EFRIHFTF. [8]. PRSLV. [3]. TQL 74
1CQP_A      3 VDLVFLFDGSMQL. [3]. FQKILDFMKDVMKKL. [6]. FAAVQFS. [1]. SYKTEFDF. [8]. PDALL. [3]. KHM 75
gi 7494391  568 YDITVLDESASIS. [4]. RNEVIPFSLEIKRI. [8]. MGVLFS. [1]. YTRDIVRF. [10]. LQTKI. [3]. KRD 645

Feature 1      # # #
1DZI_A      76 . [4]. TNTFGAIQYAR      KY. [13]. KVMVVVTDG. [11]. IDQCN. [3]. ILRFGIAV. [14]. IKEIKAIA 163
query      131 . [3]. TDINAALQYWL. [1]. QR. [13]. KILVIFTNG. [11]. ANQLK. [3]. VNIVAVGV. [4]. IQELQQLV 208
1JLM      80 . [3]. THTATGIRKVW      RE. [13]. KILVVTIDG. [12]. IPFAD. [3]. VIRYVIGV. [9]. RQELNTIA 162
1FE8_C      87 . [3]. SQIGDALGFAV      RY. [14]. AVVILVTDV. [8]. ADAAR. [3]. VIVFPIGI. [5]. AAQLRILA 162
1M10_A      91 . [4]. ASTSEVLKYTL      FQ. [11]. RIALLLMAS. [13]. WQGLK. [3]. VIVIPWGI. [5]. LKQIRLIE 169
1AOX_A      81 . [4]. TNTFGAIQYAR      KY. [13]. KVMVVVTDG. [11]. IDQCN. [3]. ILRFGIAV. [14]. IKEIKAIA 168
1BHQ_1      75 . [3]. THTATGIRKVW      RE. [13]. KILVVTIDG. [12]. IPFAD. [3]. VIRYVIGV. [9]. RQELNTIA 157
1CQP_A      76 . [3]. TNTFGAINYVA      TE. [13]. KVLVIIIDG. [7]. IDAAK. [1]. IIRYIIGI. [9]. QETLHKFA 151
gi 7494391  646 . [8]. TYIIIQALRYAL      TY. [11]. KVTMLFTDG. [13]. ALIYR. [3]. VKLLVVGW. [4]. ENKLKMLV 725
gi 18780273 111 . [3]. TKTGKAIQFAL      DY. [10]. KIAVVLTDG. [9]. AQAAAR. [3]. ITLFAIGV. [5]. DAEELRAIA 183

Feature 1
1DZI_A      164 . [6]. YF. [1]. 172
query      209 . [6]. VV. [1]. 217
1JLM      163 . [6]. HV. [1]. 171
1FE8_C      163 . [6]. NV. [1]. 171
1M10_A      170 . [6]. KA. [1]. 178
1AOX_A      169 . [6]. YF. [1]. 177
1BHQ_1      158 . [6]. HV. [1]. 166
1CQP_A      152 . [6]. FV. [1]. 160
gi 7494391  726 . [9]. FV. [1]. 737
gi 18780273 184 . [6]. YV. [1]. 192

```

图 3-40 vWFA_subfamily_ECM 蛋白序列同源性对比

核酸序列

```

1      CCTCCACGGC ATGATGGTGC TGACATTCT AATATCTGCA ATGAGGCTGC
51     CATCCATGCA GCGCGGGACA AGAAGACAGA GATAGACAGA GGAGATTTG
101    AGTATGCTGT AGAAAGGGTG ATTGCAGGAG TAGAGAAAAA GAGCCGCTTA
151    CTGTCCCCAT CAGAGAAGAA AGTTGTGGCG TATCACGAGT CAGGCCATGC
201    TCTTGTGGC TGGATGCTGA AATATACTGA TGCTCTGTTG AGAATTCCA
251    TTGTGCCAG AACAAACAGT GCCTTGGGT TTGCCAGTA CTTACCTCA
301    GACCAGAAGC TCTACTCCA GGAAGAGTTA TTTGAAAGAA TGTATATGGC
351    TCTGGGTGGA CGAGCAGCTG AGAGTCTCAT TTTCAACCAT GTGTCAACAG
401    GAGCACAGGA TGATCTACAA AGAGTTACAA AGATGGCATA TGATCAGATT
451    CGGTCTTTG GCATGAATGC CACCATCGGT CACTTGTCTAT TTCCCTAGAGA
501    TGATGAGAAA CCAGGTCTGA AACCTTACAG TCAGAGACTG GCAGCTGTCA
551    TTGATGAAGA GGCAAGATTG TTAGTTAGCA GAGCCTTTCT GCACACTCAG
601    TCAGTTTGC AGGAACACAA AGACAAATTG CACAAAGCCTG CAGTGAGTCT
651    CTTGGAGAAG GAGGTACTCA ACTACGAGGA CATTGAGAAG CTGATTGGTC
701    CACCCGTTCA TGGGAAGAAG AACATGATTG AGCCGCAGGG GTGGGAGGGC
751    ATCATGCCGT GGAGGGCA

```

蛋白序列

1 PPRHDGADIS NICNEAAIHA ARDKKTEIDR GDFEYAVERVER IAGVEKKSR
51 LSPSEKKVVA YHESGHALVG WMLKYTDALL RISIVPRTNS ALGFAQYILPS
101 DQKLYSQEEL FERMYMALGG RAAESLIFNH VSTGAQDDLQ RVTKMAYDQI
151 RSFGMNATIG HLSFPRDDEK PGLKPYSQRL AAVIDEEARL LVSRAFLHTQ
201 SVLQEHKDKL HKPAVSLLEK EVLNYEDIEK LIGPPVHGKK NMIEPQGWEG
251 IMPWRA

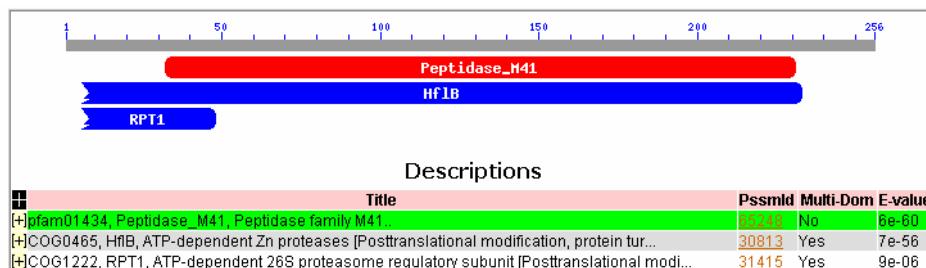


图 3-41 Peptidase M41 图示

gi_2492513	390	[3]. EVNDAIDRVLAGPEKKNRVMSERKRLTLVAYHEAGHALGVALMPDYDPVKQKISIIPRG	R	AGGLTWF	457
query	29	[3]. DFEYAVERVIAGVEKKSRLLSPSEKKVWVAYHEAGHALGVWMLKYTDALLRISVPR.	[1]. S	ALGFAQY	97
gi_75318740	651	[3]. JHFQFAIERVIGGLEKSKRLLSPSEKKVWVAYHEAGHALGVWMLKYTDALLRISVPR.	[1]. S	ALGFAQY	619
gi_728820	525	[3]. HFQFAIERVIGGLEKSKRLLSPSEKKVWVAYHEAGHALGVWMLKYTDALLRISVPR.	[1]. S	ALGFAQY	593
gi_1710045	580	[3]. HFQFAIERVIGGLEKSKRLLSPSEKKVWVAYHEAGHALGVWMLKYTDALLRISVPR.	[1]. S	ALGFAQY	648
gi_116242796	541	[3]. NFEYAVERVLAGTAKSKILSEEQKWPVAFHEAGHALGVWMLHETEAVMKVSIIPRT	[1]. S	ALGFAQY	609
gi_74764443	575	[3]. NLEYAVERVLAGTAKSKILSEEQKWPVAFHEAGHALGVWMLHETEAVMKVSIIPRT	[1]. S	ALGFAQY	643
gi_17865766	491	[3]. EISDALERIIAGPEKKNAVSSSEKKRLVAYHEAGHALGVALMPDYDPVAKISIIPRG	Q	AGGLTFF	558
gi_585159	390	[3]. DIDEATDRVIAPIGPAKRSRVIISKERNITVAYHEGGHTVIGLVLDDEADMVKVIIIPRG	Q	AGCYAVM	457
gi_2492512	405	[3]. DFREAIERVVAGLEKKSRVLSDEKKIVAYHEGVHALGVAVMPGGQVAKISIIPRG	M	[1]. ALGTYLQ	473
gi_2492513	458	TPSED. [6]. YSRSLYLNQNMQVALGGRIAEEIFIG. [2]. EVTIGASNDLQQVARVARQMVTRFGMSDRLCPVVALGRQG			534
query	98	LPSDQ. [2]. YSQEELFERMYMALGGRAAESELIFN	HVSTGAQDDLQRVTKMYADQIRSGFMNATIGHLSFPRDD		168
gi_75318740	620	VPNEN. [2]. MTKBQLFDMDTCMTLGGRAAEQVLIG	KISTGAQNDLERTKVTMITYAQAVYVGSDFKVLSSFPDRD		690
gi_728820	594	LPPDQ. [2]. ISEEEQFRHMRIMALGGRAESELHFP	SVTSGAHDFFKVKVTQMANAFTVLSGMSPKIGYLSFQPRD		664
gi_1710045	649	LPDGI. [2]. LTEQKLDKRTMSTLSLGRVSEELHP	SVTSGASDDDFKKVTSMATANVTEMLGMSDKICWVNTQKRD		719
gi_116242796	610	LPRDQ. [2]. FTEKQLFERMCALGGRAESELFSN	EVTIGASDDDLRKVTIRIAYSMVKQFGMAGPICPIPSPEAQ		680
gi_74764443	644	TPSEQ. [2]. YSKEEFLDKMCALGGRAAEENLUFN	RITTGAGNDLERTKVIKTAQSIKKQFGMNDTLLGPIYVWRDAD		714
gi_17865766	559	APSEEE. [6]. YSRSLYLNQNMQVALGGRAEEIFIGV. [2]. NVTIGASNDLQFMQVSRVARQMIERFGFSKKIQCQVAVGPGG			635
gi_585159	458	LPRED. [3]. QTKPELLDKIVGLLGGRVAAEEIFIG	EVTIGAHNDFDQRATNIAARRVTEFGMSEKLCPLQFGQSQ		529
gi_2492512	474	MPTED. [3]. LNESELRDQIATLGGRAAEEIFVD	SITITGAANLDLQRATDLAEQNIVTYGMSKVLCPPLAYDKQ		545
gi_2492513	535	[12]. RDFSDETAIIIDEEVSQLVDQAYQRACKVLFENRGILDQLAEILVKEKETVDSEELQTL			604
query	169	[5]. KPYSLRGLAAVIDEEARLLWVSRALFLHTQSVLQEHKKDKLHKPVAASLLEKEVNLNYDIEIKL			231
gi_75318740	691	[6]. KPYNSKNTGAIIDEEVWRDVLWVAKAYTERVTELVEEHHVKVVAEIAELLEKEVLHQLDDLLKI			754
gi_728820	665	[6]. KPFNSKNTARTIDLEVKSTIVDADRAHACTELLTKMLDKVLDVLAKEKLKEAEDVETIQAQVLLKKEVLHQLDDLLKI			728
gi_1710045	720	[5]. KPFSDETCGIDIDSEVYRIVQECBHDRCRCKLKEKEAEDVETIQAQVLLKKEVLHQLDDLLKI			782
gi_116242796	681	[8]. RPFSQGLQMQMDHEARLLWVAKAYRHTEKVLQDNLNDLKLQALANALLEKEVINYDIEAL			746
gi_74764443	715	[13]. KPFSSRAMESMIDNEARHVWASAYQTEGILITLTHDRDKLEKLAELLEKEKETVLDQVWQL			785
gi_17865766	636	[12]. KDYSMATADIVDAEVRLEWEKAYKRATEIIITHIDILHLKLAQLLKEKETVLDQVWQL			705
gi_585159	530	[13]. QNYSQDQIAYEIDQIEQIRKITEKEAKLTDTEMKDLRILIAQATLLKWEVTLDAEQKHL			600
gi_2492512	546	[13]. RMVSSDTEAKIDLEVKFIVEFGHNGQALIALEHMRDOLIAEATAEIULEKEVIEGEEFHHI			616

图 3-42 Peptidase M41 蛋白序列同源性对比

核酸序列

```

1      CCTGGCAAGC CAACATCCGT CAGCATTCCA AGGTCAACAG ATGAGGGCCT
51     ACAATTGAG TGGAAGCCTC CAACCAGTGA TGGCGGAGCT AGAATAAAGA
101    AATATGTAGT TCAGATGAAA GAAGACACAC CCACAGCTGA ATGGGTGGAT
151    GTTGGAAAGCA CAGAAGGTTT CAAGACCAAC TTAACAGTGC CAAATCTGGA
201    CACTGAAAAG AAATATTAT TCAAGGTGGC TGCAGGAAAT GAGATTGGTC
251    TTGGTGAATA TCTCCAAACT

```

蛋白序列

```

1      PGKPTSVSIP RSTDEGLTIE WKPPSDGGA RIKKYVVQMK EDTPTAEWVD
51     VGSTEGFKTN LTVPNLDTEK KYLFKVAAGN EIGLGEYLQT

```

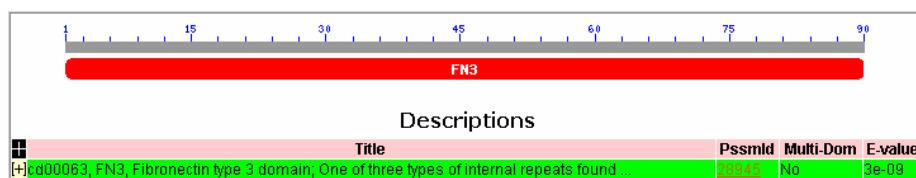


图 3-43 FN3 结构域图示

Feature 1	#		
1BQU_B	104	PN	PPH. [1]. L
			SVIN. [6]. ILKLTWTINP. [7]. LKYNIQYR. [6]. WSQI. [9]. SSFTWQ. [1]. LK
1FNH_A	183	ID	APS. [1]. L
			RFLA. [4]. SLVSWQPP. [4]. TGYLIKYE. [5]. PREV. [8]. TEATIT. [1]. LE
1QG3_A	2	LG	APQ. [1]. P
			NAKA. [4]. KIHFNWLPP. [4]. MGYRVVKYW. [8]. AHLL. [4]. PSVELT. [1]. LY
1MFN	3	LD	SPT. [1]. F
			DSSD. [4]. SFTVHWAP. [4]. TGYLIIRHH. [7]. PRQD. [6]. NSITLT. [1]. LN
1FNF	2	LS	PPT. [1]. L
			HLEA. [5]. VLTWSWERS. [5]. TGYRITTT. [8]. SLEE. [6]. SSCTFD. [1]. LS
1QR4_A	7	LD	NPK. [1]. L
			EVSD. [4]. TISLRLRRP. [4]. DRYRLTYV. [5]. KNEM. [6]. TSFILR. [1]. LD
1CFB	104	PF	[1]. NPD. [1]. V
			VGQG. [4]. NLVNSWTPM. [9]. FHYVSVWK. [7]. WENN. [7]. NNIVIA. [1]. QP
gi_1170784	724	PI	VAP. [1]. F
			TWED. [4]. SILVWEDI. [9]. RGYLFYFG. [8]. MRVL. [17]. KTLRIA. [1]. LQ
gi_417206	288	PS	NIR
			I. [1]. NISA. [6]. NVMITWDLP. [7]. HHYKVFW. [3]. SKYV. [14]. QNYVVL. [2]. LQ
gi_8393087	824	IT	GPH
			I. [1]. YTEA. [4]. QIMLKWTYI. [9]. QGFYIYR. [6]. DSDY. [9]. QWHTIG. [1]. LQ
			892

Feature 1	#	#	#
1BQU_B	173	P. [1].	TEYVFRIRCM. [6]. YWS
			DWS. [2]. ASGIT
1FNH_A	245	P. [1].	TEYYIYVIAL. [3]. QKS
			EPL. [1]. GRKKT
1QG3_A	63	P. [1].	CDYEMKWCAY. [3]. CEG
			PYS. [2]. VSCR
1MFN	65	P. [1].	TEYVWSIIAV. [3]. EES
			PPL. [1]. GQQAT
1FNF	67	P. [1].	LEYNWSVYT. [3]. KES
			VPI. [1]. DTIIP
1QR4_A	67	A. [1].	TEYTISLVAE. [3]. HKS
			KPT. [1]. IKGST
1CFB	173	T. [1].	VKYLIXKVWAI. [3]. GES.
			[2]. AAE. [1]. WVGYS
gi_1170784	803	G. [1].	TSYHLVLRAY. [3]. GVG.
			[1]. EKS. [1]. YVWIK
gi_417206	360	P. [1].	SNXNVELQAV. [7]. LKS
			AKV. [2]. HFSTA
gi_8393087	893	P. [1].	TSTDIKMQCF. [3]. GES
			EFS. [2]. MICET
			920

图 3-44 FN3 蛋白序列同源性对比

vWFA_subfamilly_ECM最初在人血液凝块中发现，广泛存在于细胞膜，内质网，细胞间隔等多个细胞器，可能参与细胞支撑，染色体稳定性，信号传导等多种生物学过程。此EST序列的蛋白序列与一种淡水大蜗牛 (*Lymnaea stagnalis*) DEC-1 (AB159149.1) 蛋白的同源性很高。

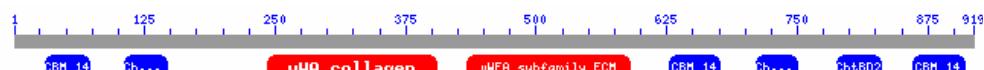


图 3-45 DEC-1 蛋白结构域分析

Peptidase_M41 是蛋白酶家族 M41 结构域。

FN3 结构域发现于纤维连接蛋白中。近 2% 的动物蛋白包含 FN3 重复序列，具有此结构的蛋白广泛分布于胞外和胞内蛋白，膜蛋白，激素受体，酪氨酸酯酶受体，类似于 FN3 的结构也分布于细菌的糖苷水解酶中。

第四章 全文结论

随着石化能源等不可再生资源的日益枯竭，人们试图寻找可以代替石化燃料的新型能源。利用纤维素酶将纤维素降解为简单糖，进而发酵生产乙醇，为新能源的开发提供了一个新方法。

本研究拟用福寿螺 (*Ampullaria crossean*) 内源性多功能纤维素酶基因 *egx* (Gene Bank Accession NO. AY285999)，以蛋白质二级结构 α 融合和 β 折叠为单位进行末端缺失，利用巴斯德毕赤酵母表达系统表达末端缺失蛋白片段，研究蛋白 N 端和 C 端 α 融合和 β 折叠的缺失对内切- β -1,4-葡萄糖苷酶 (E.C.3.2.1.4)、外切- β -1,4-葡萄糖苷酶 (E.C.3.2.9.11)、内切- β -1,4-木聚糖酶 (E.C.3.2.1.8) 活力的影响，研究其作用机理，为酶分子的蛋白质工程改造提供理论依据。

根据 *egx* cDNA 全长序列，设计了 7 对引物 5-1、5-2、5-3、5-4、5-5、3-1、3-2。以 *EGX* 基因 cDNA 全长序列为模版，PCR 扩增分别得到 1132bp、1089bp、1056bp、891bp、828bp、1044bp、921bp 片段，插入载体 pPIC9K，转化巴斯德毕赤酵母 GS115，甲醇诱导表达获得 7 种末端缺失蛋白：5-1 (N 端缺失一个 α 融合)、5-2 (N 端缺失 α 融合- β 折叠)、5-3 (N 端缺失 α 融合- β 折叠- α 融合)、5-4 (N 端缺失 α 融合- β 折叠- α 融合- β 折叠)、5-5 (N 端缺失 α 融合- β 折叠- α 融合- β 折叠- α 融合)、3-1 (C 端缺失 4 个 β 折叠)、3-2 (C 端缺失 4 个 β 折叠-2 个 α 融合)。测定了 7 种末端缺失蛋白的内切- β -1,4-葡萄糖苷酶、内切- β -1,4-木聚糖酶、外切- β -1,4-葡萄糖苷酶活性。5-1 的内切- β -1,4-葡萄糖苷酶、内切- β -1,4-木聚糖酶、外切- β -1,4-葡萄糖苷酶活性与 *EGX* 全长蛋白近似。5-2 的内切- β -1,4-木聚糖酶活性与 *EGX* 全长蛋白近似，内切- β -1,4-葡萄糖苷酶、纤外切- β -1,4-葡萄糖苷酶活性远小于 *EGX* 全长蛋白。5-3、5-4、5-5、3-1、3-2 的外切- β -1,4-葡萄糖苷酶、内切- β -1,4-木聚糖酶、外切- β -1,4-葡萄糖苷酶活性很微弱。

N 末端第一个 β 折叠到第三个 α 融合之间序列的完整性对于内切- β -1,4-葡萄糖苷酶、外切- β -1,4-葡萄糖苷酶活性、N 端第二个 α 融合至第三个 α 融合之间序列的完整性对于内切- β -1,4-木聚糖酶活性、C 末端 4 个 β 折叠和 2 个 α 融合对于三种酶活性的高低有非常重要的意义。

得到了 3 段 EST 序列，它们的蛋白序列分别含有 vWFA_subfamilly_ECM, Peptidase_M41, FN3 结构域。

参考文献

1. 高才昌, 张树政, 酶制剂工业[M].北京: 北京科学出版社, 1984: 595-623
2. 高洁, 等. 纤维素科学. 北京: 科学出版社. 1996: 42-43
3. 高培基, 纤维素酶降解机制及纤维素酶分子结构与功能的研究进展[J]. 自然科学进展, 2003, 13 (1) : 21-29.
4. 李洪钊, 李亮助, 孙强明, 江洪映. 巴斯德毕赤酵母表达系统优化策略. 微生物学报. 2003, 43(2): 288-292
5. 李晶, 赵小祥, 沙长清, 张淑梅, 田洁萍. 甲醇酵母基因表达系统的研究进展. 生物工程进展. 1999, 19(2): 17-20
6. 李文颖 等, 福寿螺多功能纤维素酶 *EGX* 的稳定性研究. 吉林大学硕士学位论文.
7. 李燕红, 赵辅昆. 纤维素酶的研究进展. 生命科学, 2005, 17(5): 392-397
8. 梁如玉, 等. 纤维素水解酶研究[J]. 微生物通报, 1998, 24(3): 145-148
9. 马孟根, 王红宁. 巴斯德毕赤酵母表达外源蛋白研究进展. 四川农业大学学报. 2001, 19(3): 277-280
10. 马兴元, 谭建华, 朱平, 孙曼霁. 巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统及其在外源蛋白生产中的优势与应用前景. 中国兽医学报. 2003, 23(1): 98-101
11. 孟雷, 陈冠军, 王怡, 等. 纤维素酶的多样性[J]. 纤维素科学与技术, 2002, 10 (2): 47-55
12. 聂东宋, 梁宋平, 李敏. 外源蛋白在巴氏毕赤酵母中高效表达的策略. 吉首大学学报(自然科学版). 2001, 22(3): 40-44
13. 彭毅, 步威, 康良仪. 甲醇酵母表达系统. 生物技术通报. 2000, 1: 38-41
14. 宋桂经. 碱性纤维素酶及其去污机理[J]. 微生物学通报, 1997, 24(6): 364-367
15. 唐元家, 于柏松. 巴斯德毕赤酵母表达系统. 国外医药抗生素分册. 2002-11 月, 23(6): 246-251
16. 王祖农, 纤维素酶研究工作进展[J]. 山东大学学报, 1986 (增刊): 1-32.
17. 王祖农, 山大微生物, 1986, 1: 1-16
18. 王骥, 等. 福寿螺 (*Ampullaria crossean*) 多功能纤维素酶 *EGX* 的研究[中国科学院博士论文]. 中国科学院研究生院 (上海生命科学研究院), 2004.
19. 王巧兰, 郭刚, 林范学等. 纤维素酶研究综述[J]. 湖北农业科学, 2004, 3: 14-19
20. 王淑军, 袁素珍, 杨军, 等. 纤维素酶媒介稻壳的条件实验[J]. 生物学通报, 1995, 22(6): 354-357
21. 王玉万, 王云. 构菌栽培中对木质纤维素的降解和集中多糖分解酶活性的变化[J]. 微生物通报, 1989, 16(3): 137-140
22. 汪维云, 朱金华, 吴守一. 纤维素科学及纤维素酶的研究进展[J]. 江苏理工大学学报. 1998, 19 (3): 20-27.
23. 阎伯旭 等, 有限梅切拟康氏木霉纤维素酶分子研究其结构域的结构与功能[J]. 纤维素科学与技术, 1998, 6: 1-9.
24. 阎伯旭, 齐飞, 张颖舒, 高培基. 纤维素酶分子结构和功能研究进展. 生物化学与生物物理进展. 1999, 26(3): 233-237

25. 杨永彬, 黄彦彦, 林跃鑫. 纤维素酶的结构及分子多样性. 生命的化学, 2004, 24(3): 211-213
26. 张平平, 刘宪华, 纤维素生物降解的研究状况与进展[J], 天津农学院学报.2004, 11 (3): 48-54
27. 张玉忠, 等. 天然纤维素超微结构研究. 生物物理学报, 1997, 13: 375
28. 周正红 等, 纤维素酶在食品发酵工业中的应用及前景[J], 暨南大学学报(自然科学版).1998, 19 (5): 125-130
29. Azevedo H *et al.* Effects of agitation level on the adsorption, desorption, and activities on cotton fabrics of full length and core domains of EGV (*Humicola insolens*) and CenA (*Cellulomonas fimi*) [J]. Enzyme and Microbial Technology.2000, 27: 325-329.
30. Beauchemin K A, Morgavi D P, Meallister T A, et al. The use of enzymes in ruminant diets[M]. In recent advance in animal nutrition.
31. Beauchemin K A, Rode I M, Sewalt, et al. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forage[J]. J. Anim. Sci., 1995, 75:641-644
32. Beg Q.K., Kapoor M., Mahajan L. and Hoondal G.S.. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001, 56:326-338
33. Beguin P. and Aubert J.P.. The biological degradation of cellulose. FEMS Microbiol. Rev., 1994, 13:25-58
34. Camp, McSweeney, Jefferry M, et al. Application of rumen microorganisms in anaerobic fermentation of an organic fraction of domestic refuse[J]. Biological Wastes, 1989, 30(4):309-316
35. Campbell B A, Laherrere J H. The end of cheap oil. Sci Am, 1998, 3:78-83
36. Canales AM, Garza R, Sierra JA, Arnold R. The application of a β -glucanase with additional side activities in brewing. MBAA Tech Q. 1988, 25:27-58
37. Cavaco-Paulo A *et al.* Interactions of cotton with CBD peptides[J]. Enzyme Microb Technol. 1999, 25 (8-9) : 639-643.
38. Cooper V, et al. Mol Gen Genet, 2000, 241: 341-350
39. Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* Mol. Biotechnol. 2000 Sep, 16(1):23-52
40. Davies G. J.. Structure studies on cellulases. Biochem. Soc. Trans.. 1998, 26: 167-173
41. Divne C, Stahlberg J, Reinikainen T, et al. The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. Science, 1994, 265(5171):524-528
42. Fantozzi P, Petruccioli G, Montedoro G. Trattamenti con additive enzimatici alle paste di oliva sottoposte ad estziona per pressione unica. Grasse, 1977, 54:381-389
43. Fukumura M., et al. Nucleotide sequence of *Clostridium stercorarium* xynB encoding an extremely thermostable xylanase, and the characterization of the translated product. Biosci. Biotechnol. Biochem.. 1995, 59: 40-46
44. Galante YM, De Conti A, Monteverdi R. Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries. *Trichoderma & Gliocladium-Enzymes, biological control and commercial applications*. 1998, 2:327-369
45. Gemmill TR, Trimble RB. Overview of N-and O-linked oligosaccharide structures found in

- various yeast species. *Biochem Biophys Acta*.1999,1426(2):227-237
46. Gilkes N R, Warren R A J, Muller R C, et al. Precise excision of the cellulose binding domains from two *Cellulomonas fimi* cellulases by a homologous protease and the effect on catalysis. *J Biol Chem*. 1988, 263(21): 10401-10407
47. Grassin C, Fauquembergue P. Fruit juices. *Industrial enzymology*. 1996:266-230
48. Irwin D et al. Activity studies of eight purified cellulases: specificity, synergism and binding domain effects[J]. *Biotechnol Bioeng*. 1993, 42: 1002-1013.
49. James M. Cregg, Knut R. Madden, Kevin J. Barringer, Gregory P. Thill, Cathy A. Stillman, Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology*. 1989,9(3):1316-1323
50. Juy M, Amit A G, Alzari P M, et al. Crystal structure of a thermostable bacterial cellulose degrading enzyme. *Nature* 1992, 3357(6373):89-91
51. Kraulis P J, Jones T A. Determination of three dimensional protein structures from nuclear magnetic resonance data ;using fragments of known structures. *Proteins*, 1987, 2(1): 188-201
52. Kung L, Jacket M, Wilmut G, et al. The effect of treating forages with fibrolytic enzyme on its nutritive value and lactation performance of dairy cow[J]. *J.Dairy.Sci.*, 2000, 83:115-122
53. Lee S J, Lee K S, Kim S R, et al. A novel cellulase gene from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*: gene structure, expression, and enzymatic activity. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2005, 140(4): 551~560
54. Lee S J, Kim S R, Yoon H J, et al. cDNA cloning, expression, and enzymatic activity of a cellulase from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol*, 2004, 139(1): 107~116
55. Lingder M et al. The roles and function of cellulose-binding domains[J]. *J Biotechnol*. 1997, 57:15-28.
56. Meinke A, Damude H G, Tomme P, et al. Enhancement of the endo- β -1,4-glucanase activity of an exocellulobiohydrolase by deletion of a surface loop. *J Bio Chem*. 1995, 270(9):4383-4386
57. McQueen-Mason S, et al. Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proc Natl Sci USA*, 1994, 91: 6574
58. M.K.BHAT,S BHAT, Celllose degrading enzymes and their potential industrial applications[J]. *Biotechnology Advances*. 1997, 15:583-620.
59. Montesino R, Garcia R, Quintero O, Cremata J A. Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Exp Purif*. 1998,14(2):197-207
60. Nakashima K, Azuma J. Distribution and properties of endo β -1,4 glucanase from a lower termite, *Coptotermes formosanus*(Shiraki) [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2000, 64(7):1500-1506
61. Nsereko V L, Beauchemin K A, Morgavi D P, et al. Effect of a fibrolytic enzymes preparation from *Trichodermam longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cow[J]. *Can.J.Microbial.*, 2002, 48:14-20

62. Oksanen J,Ahvenainen J,Home S.Microbial cellulose for improving filterability of wort and beer.Proc Eur Brew Chem Helsinki.1985:419-444
63. Rode L M,Yang W E,Beauchemin.Fibrolytic enzyme supplements for dairy cow in early lactation[J].J Dairy.Sci.,1999,82:2121-2126
64. Rouvinen J,Bergfors T, Teeri T.Three-dumisional structure of cellobiohydrolase II from *T.reesei*. Science, 1990, 249(4967):380-386
65. Schingoethe D J,Stegeman G A,Teacher R J.Response of lactating dairy cow to cellulose and xylanse enzyme mixture applied to foragest at the time of feeding[J].J.Dairy.Sci.,1999,82:996-1003
66. Siegel RS, Buckholz RG, Thill GP, Wondrack LM. Production of epidermal growth factor in methlotrophic yeasts. International Patent Application.1990,WO90/10697
67. Sinnott M L. Catalytic mechanism of enzymatic glycosyl transfers. Chem Rev. 1990, 90(12): 1171-1192
68. Smant G, Stokkemans J P, Yan Y T, *et al*.Endogenouscellulases in animals: isolation of β -1,4 endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst enatodes[J].Proc Natl Acad Sci USA.1998, 95(9):4906-4911.
69. Spezio M, Wilson D B, Karplus P A. Crystal structure of the catalytic domain of a thermophilic endocellulase. Biochemistry, 1993, 32(38):9906-9916
70. Sreekrishna K, Brankamp RG,Kropp KE,Blankenship DT, Tsay JT, Smith PL, Wierschke JD,Subramaniam A, Birkenberger LA. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Gene. 1997,190(1):55-62
71. Sun Y,Cheng J Y.Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production:a review[J].Bioresource Technol.2002, 83(1):1-11.
72. Sunna A. and Fantranikian G.. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. Crit.Rev. Biotechnol., 1997, 17(1):39-67
73. Suzuki K,Ojima T ,Nishita K.Purification and cDNA cloning of a cellulose from abalone *Haliotis discus hannai*[J].Eur J Biochem.2003, 270(4):771-778.
74. Teeri T T, *et al*. *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase:Why so efficient on crystalline cellulose? [J].Biochemical Sociaty Transaction.1998, 26:160-164.
75. Te'o V, *et al*. Extremophiles. 1998, 32: 24-32
76. Tomme P *et al*. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi [J].Adv microb physiol.1995, 37: 1-81.
77. Tormo J, Lamed R, Chirino A J. *et al*. Crystal structure of a bacterial family-III cellulose binding domain: a general mechanism for attachment to cellulose. EMBO J. 1996, 15(21): 5739-5751
78. WangJi, et al. Isolation of a Mutifunctional Endogenous Cellulase Gene from Mollusc, Ampullaria crossean[J]. Acta Biochimica et Biophysica sinica.2003, 35(10):941-946.
79. Watanabe H,TokudaG.Animal cellulases[J].Cell Mol Liife Sci. 2001, 58(9):1167-1178.
80. Wegner GH. Biochemical conversions by yeast fermentation at high cell dendities. USA patent. 1983,No,4414329

81. Xu G Y , Ong E , Gilkes N . *et al* . Solution structure of a cellulose-binding domain from *Cellulomonase fimi* by nuclear magnetic resonance spectroscopy . *Biochemistry* . 1995 , 34(21):6993-7009
82. Yan B X, *et al*. Domain structure and conformation of a cellobiohydrolase from *Trichoderma pseudokononingii* s-38[J].*J protein chem.*..1997, 16: 59-66.
83. Yang Y B, Huang Y Y, Lin Y X. Structure and molecular variety of cellulose [J].*Chemistry of life*.2004, 24 (3): 211-213.
84. Zhang YJ, Jin NY, Jiang WZ. Cloning and expression of the external-glycoprotein gene mutant from HIV-2 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and identification of the glycoprotein. *Biotechnol Appl Biochem*,2001,34:1-4
85. Zhang Y Z, *et al*. Structure investigation of cellobiohydrolase I from *Trichoderma pseudokomingee* s-38 with a scanning tunneling microscopy. *Applied Physics A*, 1998, 67:483-485
86. Zhang Y Z, *et al*. Size and arrangement of elementary fibril of cellulose by STM. *J Vacuum Science &Technology*, 1997(B), 15: 1502

致 谢

在论文完成之际，首先向我的导师刘昱辉副研究员表示由衷的感谢！从论文的选题、设计、实施到最后的完成，无不凝聚着刘老师的智慧与心血。从刘老师身上，我学到的不仅是作为一个科研工作者严谨治学的态度，还有刘老师不畏辛劳、勤奋工作的精神。在双休日和节假日中，实验室里也经常会看到刘老师忙碌的身影。她用行动示范给我如何才能成为一个优秀的科研工作者，最重要的就是——严谨和勤奋。在论文实验阶段，每当我遇到实验上的困难无法进行时，不管刘老师有多忙都会耐心地给我讲解，甚至带我去向其他老师请教。刘老师的实验技术精湛，对我的实验要求也非常严格。在实验过程中，哪怕是一点的不规范和疏漏，刘老师都会要求我们改正。正刘老师严谨治学的作风和精湛的实验技能，对我实验的有力支持，是我论文完成的保障。

在我课程学习期间和论文实验阶段，研究生院和生物所的领导、老师为我提供了许多便利条件。在此对他们的支持和关怀表示感谢。

衷心感谢我的同学尚威、岳明、周庭辉、陈宝瑞、刘锡娟和其他帮助过我的人。在我实验遇到困难时，他们给予我极大的帮助。感谢本实验室的同事和同学对我的大力帮助，和他们在一起我度过了一段非常愉快难忘的时光。

在此，谨向所有关系和帮助我的每一个人表达我最诚挚的谢意！

感谢爸爸妈妈对我的理解和关怀。出门在外，家人的支持是我精神的支柱。特别在实验期间，我的姥姥姥爷相继去世，是我的家人分担了我的忧伤，使我能安心地做实验。谢谢爸爸妈妈！感谢所有亲人和朋友的理解和帮助！

谷 嵩

2007年6月

作 者 简 历

谷嵩，男，1980 年生，籍贯黑龙江省绥化市。1999 年考入东北农业大学生物技术系，2003 年 6 月毕业，获得生物技术理学学士学位。2004 年 9 月考取中国农业科学院分子生物学专业研究生，攻读分子生物学专业硕士。