

绿色木霉内切葡聚糖酶基因 I 的克隆表达

黄晓梅¹, 杨 谦¹, 范金霞¹, 陈秀玲², 王 允¹, 张向东¹

(1. 哈尔滨工业大学 生命科学系, 哈尔滨 150001, yangq@hit.edu.cn; 2. 东北农业大学 园艺学院, 哈尔滨 150030)

摘 要: 为深入研究绿色木霉 (*Trichoderma viride*) 内切葡聚糖酶 (EG I) 的特性与功能, 利用 Northern blot 方法分析不同碳源条件下绿色木霉的 *eg I* 表达, 采用 RT-PCR 方法从绿色木霉 T4 中克隆 *eg I* 基因的 cDNA 序列, 测序与生物信息学分析, 并构建诱导型表达载体 pYES2-*eg I*, 转化酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) INVSc1 和 H158 中表达. 结果表明: 绿色木霉在含有纤维素的液体培养基中生长, *eg I* 高效表达, 在秸秆中表达量最高. 纤维二糖中表达量相对较低, 在葡萄糖、果糖中没有表达. *eg I* 基因编码框长度 1 377 bp, 编码 459 个氨基酸. 含有信号肽, 为分泌蛋白, 属于糖苷水解酶家族 7, 具有纤维素酶结合域 (CBD) 和催化域 (CD). INVSc1 转化子发酵培养 48 h 达到转录高峰期, 60 h 达到酶活高峰期, 酶活为 0.081 6 U/mL, 酶活比 H158 转化子提高 32.5%.

关键词: 绿色木霉; 葡聚糖内切酶 I; 酿酒酵母; 表达

中图分类号: F25218

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2010)12-1921-06

Cloning and heterogorous expression of EGI gene from *Trichoderma viride*

HUANG Xiao-mei¹, YANG Qian¹, FAN Jin-xia¹, CHEN Xiu-ling², WANG Yun¹, ZHANG Xiang-dong¹

(1. Dept. of Life Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China, yangq@hit.edu.cn;

2. College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: To investigate the property and function of endoglucanase (EG I), the transcriptional expression of *eg I* of *Trichoderma viride* T4 was analyzed by Northern blot during its growth and development in medium with different carbon source. The full length cDNA sequence of *eg I* was obtained by RT-PCR method and the recombinant vector pYES2-*eg I* was constructed. The vector was transformed into *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 and H158. The results indicated that the *egI* was expressed strongly when *T. viride* T4 was grown in liquid medium containing cellulose as carbon source. The expression of *egI* was the highest in corn stalk medium, and cellobiose also induced the expression of *egI*, but no signal was detected in glucose or fructose medium. The ORF of *egI* was 1 377 bp encoding a protein of 459 amino acids and belonged to glycosyl hydrolase family 7 having cellulose binding-domain and catalytic - domain. *egI* was a kind of secreted protein because there was signal peptide in the amino acid sequence. The *egI* transcription of transformants reached highest at 48 hours and a peak recombinant enzyme activity was 0.081 6 U/mL at 60 hours, the recombinant enzyme of EG I of INVSc1 improved 32.5% than that of H158.

Key words: *Trichoderma viride*; endo- β -glucanase I; *Saccharomyces cerevisiae*; expression

纤维素是丰富的可再生资源, 微生物降解法是使其资源化和能源化的理想方法. 在自然界中,

只有能够水解 β -1,4 糖苷键的微生物可以直接利用纤维素, 主要包括丝状真菌及部分细菌, 以木霉、曲霉、青霉的降解能力最为突出^[1-4], 其中绿色木霉具有较强的分解天然纤维素的能力, 目前被认为是最有应用前景的纤维素酶生产菌之一^[5]. 内切葡聚糖酶 (EC3.2.1.4) 在纤维素降解中起着重要作用, 它作用于纤维素无定形区域, 随

收稿日期: 2009-04-13.

基金项目: 十一五国家科技支撑项目(2006BAD07A00);

国家高技术研究发展计划资助项目(2006AA10Z424).

作者简介: 黄晓梅(1966—), 女, 博士后;

杨 谦(1959—), 男, 教授, 博士生导师.

机地切断 β -1,4 葡萄糖苷键,为外切型纤维素酶提供自由末端^[6]. EG I 是内切葡聚糖酶中最重要的组份之一,占里氏木霉产生的胞外蛋白质总量的 10%^[7]. 国内外已有许多纤维素酶基因克隆表达的研究^[8-16]. 绿色木霉 AS3.3711 的 *eg I* 的克隆及在酿酒酵母 H158 中表达已有报导,但转化子酶活较低^[9],绿色木霉 *eg I* 不同碳源条件下诱导表达量的研究未见报道. 本试验研究了不同碳源诱导条件下,绿色木霉 T4 的 *eg I* 转录水平的表达调控. 并用 RT-PCR 方法克隆了 *eg I*, 对其序列进行功能预测,并转化于酿酒酵母 INVSc1 和 H158 中表达,宿主 INVSc1 显著提高了 *eg I* 的表达. 为进一步研究 EG I 的酿酒酵母工程菌株利用纤维素转化清洁能源奠定了基础.

1 实验

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒

绿色木霉 (*T. viride*) T4、*E. coli* Jm109 和酿酒酵母 INVSc1 (*his*-*trp*-*leu*-*ura*-) 为本实验室保存;酿酒酵母大肠杆菌穿梭质粒 pYES2 (*amp*+*ura*+) 为山东大学鲍晓明老师惠赠.

1.1.2 试剂

Sigma 公司的微晶纤维素 Sigmacell 20、羧甲基纤维素 (CMC)、纤维二糖 (cellulobiose); Invitrogen 公司的 trizol, 上海华舜生物工程公司的胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒; MBI 公司的 RT-PCR 试剂盒、pMD18-T 克隆载体、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 聚合酶; Roche Applied Science 公司的 Northern blot DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 试剂盒购.

1.1.3 培养基

LB、YPD、SC-U^[17]、MENDELS^[18]、PD.

1.2 方法

1.2.1 绿色木霉不同碳源诱导下 *eg I* 的转录分析

按培养基的 1% (体积分数) 加入 1×10^6 个/mL 孢子悬浮液于 PD 培养基, 28 °C, 150 r/min 条件培养 2 d, 制备种子液. MENDELS 为诱导基础培养基, 碳源质量分数为 1%. 接种 10% (体积分数) 的绿色木霉 T4 种子液, 于 28 °C、150 r/min 条件下培养 2, 4, 6 和 8 d, 收集菌丝于 -70 °C 下保存.

1.2.2 Northern 杂交

采用 trizo 提取总 RNA, 具体操作参照试剂说明书加以改进. Northern 杂交的探针采用 *eg I* 基因的片段, RNA 上样量 10 μ g, 总 RNA 为内参,

Northern 杂交的探针标记与检测方法参照试剂盒说明书. 总 RNA 变性电泳采用常规方法. 曝光时间均为 25 min.

1.2.3 目的基因扩增

根据 GmBank 上 AY343986 和 EU587012 的基因序列设计特异引物, 同时添加 EcoR I 和 Xba I 酶切位点.

P1: 5' -aac-gaa tccccctatcttagtctcttctgtg 3' EcoR I

P2: 5' -ctc-tct agaattaagcccaatgtctacgac-3' Xba I

RT-PCR 采用 RNA PCR Kit (AMV) 试剂盒, 方法参照说明书. 设一个不加逆转录酶的负对照以确定无 DNA 污染, 负对照的反应体系和反应条件均与样品相同以 cDNA 为模板 PCR 扩增目的基因, 25 μ L 反应体系, 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 停止反应.

电泳检测 PCR 产物, 回收所需片段, 与 pMD-18T 连接, 连接产物转化至大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 感受态, 选择阳性克隆, 进行菌落 PCR 和质粒双酶切鉴定.

1.2.4 测序及生物信息学分析

对重组质粒进行测序分析以验证克隆片段含有目的基因的起始密码子和正确的开放读码框. DNA 的测序由上海生物工程公司完成. 采用在线软件对基因序列进行功能预测.

1.2.5 酿酒酵母表达载体构建

将带有目的基因片段 pMD-18T 隆载体上经 EcoR I 和 Xba I 双酶切, 构建到的酿酒酵母表达载体 pYES2 上, 转化大肠杆菌 *E. coli* Jm109, 用菌落 PCR 和双酶切方法鉴定, 得到阳性克隆命名为 YES2-*eg I*.

1.2.6 酿酒酵母的转化、筛选和鉴定

采用 LiAc/ssDNA/PEG 转化法将 pYES2 和 pYES-*eg I* 分别转化酿酒酵母 H158 和 INVSc1, 酵母转化子采用质粒 PCR 方法鉴定^[19], 含有 pYES-*eg I* 阳性克隆分别命名为 H1 和 H2.

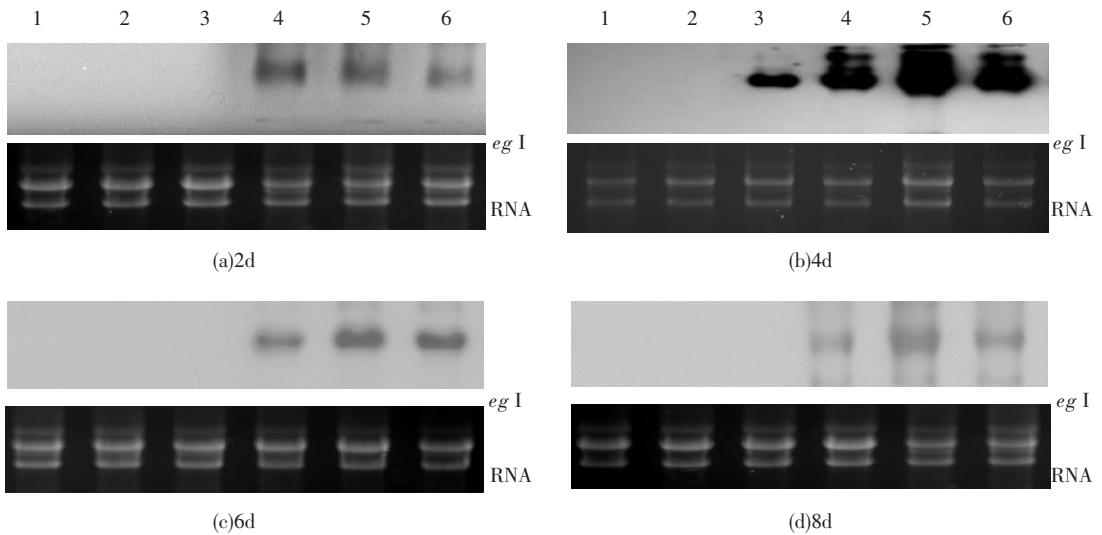
1.2.7 转化子酶活测定

将带有 pYES2-*eg I* 和 pYES2 的酵母 H158 和 INVSc1 转化子接种到含 2% β -D-半乳糖 SC-U 培养基, 30 °C、160 r/min 振荡培养, 培养 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 和 108 h, 取培养液经盐析和透析初步浓缩酶蛋白, 用 CMC 糖化力法检测内切葡聚糖酶活性. 重复 3 次.

纤维素酶活性检测方法采用常规的 CMC 糖化力法,以 CMC 为底物,在实验条件下每分钟产生 1 μmol 葡萄糖为 1 个酶活单位(U).

2 结 果

2.1 绿色木霉不同碳源转录水平分析

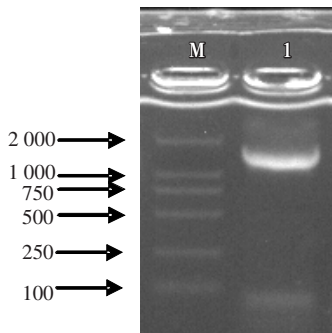


1.葡萄糖;2.果糖;3.纤维二糖;4.微晶纤维素;5.秸秆;6.CMC

图 1 不同碳源诱导绿色木霉 *eg I* 的转录水平分析

2.2 *eg I* PCR 扩增和序列生物信息学分析

PCR 扩增得到 *eg I* 的特异片段,约 1 500 kb,符合预期大小(图 2 所示).回收片段与 pMD-18T 连接,连接产物转化至大肠杆菌 *E. coli* Jm109 感受态,选择阳性克隆,进行菌落 PCR 和质粒双酶切鉴定,进行测序.



M 为 DNA Marker DL2000;1. *eg I* 约 1.3 kb

图 2 基因 *eg I* 的 PCR 扩增

克隆得到 *eg I* 全长 cDNA 序列为 1 495 bp,参考 DNA 序列的开放读码框(ORF)的同源性为

Northern blot 分析(图 1)表明,以纤维素为碳源诱导 *eg I* 的表达量较高,特别是以秸秆为碳源诱导物的转录水平最高.以纤维二糖为碳源时 *eg I* 的表达量比纤维素低;以葡萄糖和果糖为碳源时,未检测到 *eg I* 的表达.

99%. 开放阅读框长度为 1 377 bp,编码 459 个氨基酸.经 expasy 预测,理论分子质量 48.177 ku,理论等电点为 4.73,不稳定指数为 43.02,属于不稳定蛋白.经 SignalP v3.0 分析表明,该序列含信号肽可能概率为 0.999,1-22 个 aa 为信号肽序列(MAPSVTLPLTTAILAIARL VAAQQ),是分泌型蛋白.经 BlastP 分析 GenBank 非冗余蛋白数据库,表明该蛋白与 *T. reise* 的 EG I 有较高的相似性,该蛋白属于 Glycosyl hydrolase family 7(图 3 所示),经 EBI 分析,427-455 位氨基酸(HWGQCG-GIG YSGCKTCT SGTTCQYSNDYY)为 EG I 的纤维素结合区(cellulose binding domain, CBD),31-390 为催化结构域(catalytic domain, CD).通过对 24 种真菌或菌株的纤维素酶序列比对,催化结构域保守序列为 GYCD[A/S]QCP, CBD 结合区的保守序列为 GQCGGIGY(图 4).

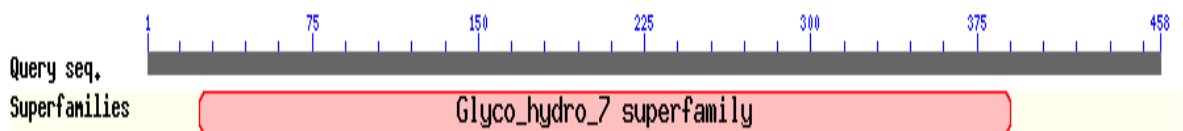


图 3 内切葡聚糖酶 EGI 保守区

2.3 构建重组质粒转化酿酒酵母

eg I 构建到的酿酒酵母表达载体 pYES2 上,

将 pYES2 和 pYES-*eg I* 分别转化酿酒酵母 H158 和 INVSc1.

含有空质粒的转化子和含有目的片段的转化子分别经 2% 半乳糖诱导 24 ~ 60 h, 进行 Northern blot 检测, 用绿色木霉 *eg I* 基因的 cDNA 片段为标记探针进行杂交, 结果如图 5 所示, 空质粒的负对照 RNA 泳道各时间点都没有杂交信号, 诱导表

达 RNA 泳道杂交得到一条与预期大小相符的约 1.5 kb 的带, 证实了目的基因在酿酒酵母中的转录. *eg I* 在培养 24 h 时没有转录, 36 h 转录水平较低, 48 h 达到高峰期, 60 h 表达量较高.

T4EG I	NQY--NTAGANYGSGYCDACQCF-	184	STTSSSPSCTQTHWGQCCGGIGYS	423
AAQ21382	NQY--NTAGANYGSGYCDACQCF-	184	STTSSSPSCTQTHWGQCCGGIGYS	423
P07981	NQY--NTAGANYGSGYCDACQCF-	184	STTSSSPSCTQTHWGQCCGGIGYS	423
AAX28897	NQY--NTAGANYGGGYCDACQCF-	184	STTSSSPSCTQTHWGQCCGGIGYS	423
ABM90986	NQY--NTAGANYGSGYCDACQCF-	184	STTSSSPSCTQTHWGQCCGGIGYT	425
ACH68455	NQY--NTAGANYGSGYCDACQCF-	184	STTSSSPSCTQTHWGQCCGGIGYT	425
Q12714	NQY--NTAGANYGSGYCDACQCF-	184	STTSSSPSCTQTHWGQCCGGIGYT	427
AAW64926	SKYSGNKAGAKYGTGYCDAQCFR	197	PTSQPPGGCT-TQKMGQCCGGIGYT	494
AAT84320	SKYSGNKAGAKYGTGYCDAQCFR	172	PTSQPPGGCT-TQKMGQCCGGIGYT	469
P38676	SKYSGNKAGAKYGTGYCDAQCFR	197	PTGQPPGGCT-TQKMGQCCGGIGYT	496
CAM98448	SKYSGNKAGAKYGTGYCDAQCFR	197	PTGQPPGGCT-TQKMGQCCGGIGYT	496
CAA37878	TKYP TNTAGAKYGTGYCDSQCPR	195	TGSSPGPT--QTHYGQCCGGIGYI	477
P19355	SKYP TNTAGAKYGTGYCDSQCPR	195	TGSSPGPT--QTHYGQCCGGIGYS	478
AAQ76092	SKYP TNTAGAKYGTGYCDSQCPR	195	TGSSPGPT--QSHYGQCCGGIGYS	478
P62694	SKYP TNTAGAKYGTGYCDSQCPR	195	TGSSPGPT--QSHYGQCCGGIGYS	477
ACH96125	SKYP TNTAGAKYGTGYCDSQCPR	195	TGSSPGPT--QTHYGQCCGGIGYS	478
ACF93800	SKYP TNAAGAKYGTGYCDSQCPR	191	TGSSPGPT--QTHYGQCCGGIGYS	469
XP_751044	SKYP TNKAGAKYGTGYCDSQCPR	204	TAGNPPGGTGVAQHYGQCCGGIGWT	496
CAA80253	AKYP TNKAGAKYGTGYCDSQCPR	191	PTQPTGVT--VPQMGQCCGGIGYT	480
AAB46373	AKYP TNKAGAKYGTGYCDSQCPR	191	PTQPTGVT--VPQMGQCCGGIGYT	480
P13860	AKYP TNKAGAKYGTGYCDSQCPR	191	PTQPTGVT--VPQMGQCCGGIGYT	480
CAA80252	SKYP GNKAGAKYGTGYCDSQCPR	191	P--PTGPT--VPQMGQCCGGIGYS	475
CAK18799	AAHTGNMAGAKYGTGYCDAQCFH	196	PTTP TGPTGTVPKMGQCCGGIGYS	487
CAK18800	AAHAGNMAGAKYGTGYCDAQCFH	196	TTTP TGPTGTVPKMGQCCGGIGYS	487

T4EG I : *Trichoderma viride* T4; AAQ21382 : *T. viride* AS 3. 3711; P07981 : *Trichoderma reesei*; AAX28897 : *T. reesei* PTCC 5142; ABM90986 : *Trichoderma pseudokoningii*; ACH68455 : *Trichoderma* sp. SSL; Q12714 : *Trichoderma longibrachiatum*; AAW64926 : *Chaetomium thermophilum* CT2; AAT84320 : *Chaetomium thermophilum* var. *thermophilum* DSM1495; P38676 : *Neurospora crassa*; CAM98448 : *Chaetomium thermophilum*; CAA37878 : *T. viride*; P19355 : *T. viride* MC300 - 1; AAQ76092 : *T. viride* AS 3. 3711; P62694 : *T. reesei* L27; ACH96125 : *Trichoderma* sp. XST1; ACF93800 : *T. virens* UKM1; XP_751044 : *Aspergillus fumigatus* A293; CAA80253 : *Phanerochaete chrysosporium*; AAB46373 : *Sporotrichum pruinosum*; P13860 : *S. pruinosum*; CAA80252 : *Phanerochaete chrysosporium*; CAK18799 : *Pleurotus* sp. 'Florida'; CAK18800 : *Pleurotus* sp. ;

图 4 绿色木霉 EGI 与糖苷水解酶家族 7 比对结果

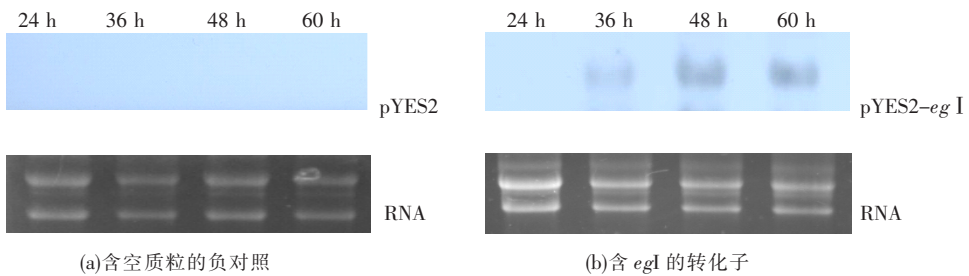


图 5 *eg I* 在酵母转化子中 Northern Blot 分析

2.4 酿酒酵母转化子的酶活测定

转化子在含 2% β -D-半乳糖 SC-U 培养基进行诱导 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 和 120 h, 表达量如图 6 所示, 两种转化子酶活变化规律相同, 在培

养 36 ~ 60 h 酶活迅速升高, 60 h 时酶活达到最高值, 从 60 ~ 84 h 酶活迅速降低, 84 h 以后酶活缓慢下降. 而对照中含空质粒没有酶活. II 最高酶活为 $0.0816 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 比 H1 酶活提高 32.5%, 说明不同菌株对外源基因的表达有较大差异.

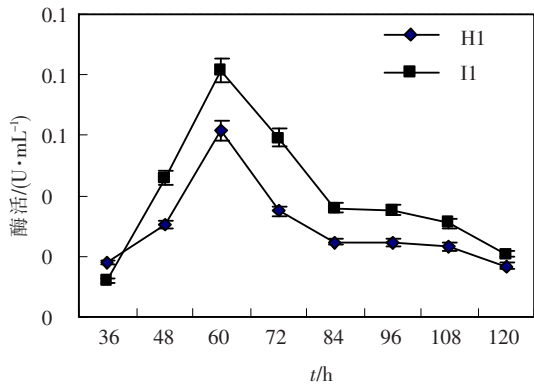


图 6 培养时间对转化子酶活的影响

3 讨 论

Trichoderma reesei 纤维素酶的调控在转录水平上受诱导和代谢抑制控制的^[20-21]. 本研究中绿色木霉 *eg I* 在含有纤维素的培养基中被大量诱导表达,特别是在秸秆中表达量最高,这也进一步说明绿色木霉具有降解天然纤维素的能力. 但 *eg I* 在纤维二糖诱导下转录表达很弱,这与 *Volvariella volvacea* 相似^[22]. 纤维二糖诱导 *eg I* 弱的原因可能是纤维二糖被菌体分泌的酶快速水解,引起葡萄糖的积累,由此形成葡萄糖的反馈抑制^[23];绿色木霉的 EG I 具有 CD 和 CBD 结构域,大多数纤维素酶都由 CD 和 CBD 组成,只有少数微生物和高等植物产生的纤维素酶不具有这类结构域^[24],如里氏木霉 (*T. reesei*) 的 EG3;迄今为止,所有已知的纤维素酶根据催化结构域氨基酸序列的相似性可分为 70 个家族,通过比较 *T. reesei* EG I 属于糖苷水解酶家族 7. 在同一个家族内具有相似的分子折叠模式和保守的活性位点. 因此,在同一家族内,其反应机制和对底物的特异性都可能相同,这已通过比较 15 种来自 3 个家族的酶解实验中得到支持^[24]. 本研究 *egI* 转化酿酒酵母 INVSc1 比 H158 的 CMC 酶活提高,可能是不同菌株的遗传背景不同引起的. 所以,克隆和表达基因应考虑菌株的选择;由于酿酒酵母表达外源蛋白受多种因素的影响,在后续的研究中还要对发酵条件进行优化,根据酿酒酵母密码子偏爱性对目的基因进行改造及研究纤维素酶诱导的高效启动子,进一步提高纤维素酶在酿酒酵母中的表达效率,是构建可降解转化需要进一步研究解决的问题.

4 结 论

1) 采用 RT-PCR 方法克隆到绿色木霉 T4 的 *eg I* cDNA 全长序列,生物信息学分析表明开

放阅读框长度为 1 377 bp,编码 459 个氨基酸,理论分子量 48.177 ku,是分泌蛋白,归属于糖苷水解酶 7 家族,具有 CD 和 CBD 结构.

2) 通过不同碳源诱导条件下,绿色木霉 *eg I* 在含有秸秆的液体培养基中转录水平表达较高.

3) 构建重组质粒 pYES2-*eg I* 转化酿酒酵母,经 Northern blot 检测,培养 48 h 达到转录高峰,在 INVSc1 中 *eg I* 表达较高,酶活为 0.081 6 U·mL⁻¹.

参 考 文 献:

- [1] ISHIHARA H, AIMI T, TAKAHASHI K, *et al.* Heterologous expression and characterization of the endocellulase encoding gene *cel3A* from the basidiomycete *Polyporus arcularius* [J]. *Mycoscience*, 2005, 46: 154 - 161.
- [2] MACRIS B J. Enhanced cellulose and beta-glucosidase production by a mutant of *alternaria alternata* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1984, 26 (2): 194 - 198.
- [3] RAHMAN Z, SHIDA Y, FURUKAWA T, *et al.* Evaluation and characterization of *Trichoderma reesei* cellulase and xylanase promoters [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 82: 899 - 908.
- [4] NAKAZAWA H, OKADA K, KOBAYASHI R, *et al.* Characterization of the catalytic domains of *Trichoderma reesei* endoglucanase I, II, and III, expressed in *Escherichia coli* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 81: 681 - 689.
- [5] GUPTA J K, DAS N B, GUPTA Y P. Effect of cultural conditions on cellulose formation by *Trichoderma viride* Agric [J]. *Biol Chem*, 1972, 36(11): 1961 - 1967.
- [6] HONG S Y, LEE J S, CHO K M, *et al.* Construction of the bifunctional enzyme cellulase-β-glucosidase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* [J]. *Biotechnol Lett*, 2007, 29: 931 - 936.
- [7] PENTTILÄM L, EHTOVAARA P, NEVALAINEN H, *et al.* Homology between cellulase genes of *Trichoderma reesei*: Complete nucleotide sequence of the endo-glucanase I gene [J]. *Gene*, 1986, 45(3): 253 - 263.
- [8] HUANG Xiaomei, YANG Qian, LIU Zhihua, *et al.* Cloning and Heterologous Expression of a Novel Endoglucanase Gene *egVIII* from *Trichoderma viride* in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 162(1): 103 - 115.
- [9] 刘北东, 杨谦, 周麒, 等. 绿色木霉 AS3.3711 的葡聚糖内切酶 I 基因的克隆与表达 [J]. *北京林业大学学报*, 2004, 26(6): 80 - 84.
- [10] RIBEIRO O, WIEBE M, ILMÉN M. Expression of *Trichoderma reesei* cellulases CBHI and EGI in *Ashbya*

- gossypii* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 87: 1437 - 446.
- [11] JEON E, HYEON J E, SUH D J, *et al.* Production of cellulosic ethanol in *Saccharomyces Cerevisiae* heterologous expressing clostridium thermocellum endoglucanase and saccharomycopsis fibuligera β - glucosidase genes [J]. Mol Cells, 2009, 28: 369 - 373.
- [12] WU Guochao, WEI Lianguo, LIU Weifeng, *et al.* Asn64 - glycosylation affects Hypocrea jecorina (syn. *Trichoderma reesei*) cellobiohydrolase Cel7A activity expressed in *Pichia pastoris* [J]. World Journal of Microbiology Biotechnol, 2010, 26: 323 - 328.
- [13] SONG Jinzhu, LIU Beidong, LIU Zhihua, *et al.* Cloning of two cellobiohydrolase genes from *Trichoderma viride* and heterogenous expression in yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Mol Biol Rep, 2010, 37: 2135 - 2140.
- [14] OGASAWARA W, SHIDA Y, FURUKAWA T, *et al.* Cloning, functional expression and promoter analysis of xylanase III gene from *Trichoderma reesei* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 72: 995 - 1003.
- [15] SÁNCHEZ - HERRERA L M, ANA C, MAYRA de L T, *et al.* Differential expression of cellulases and xylanases by *Cellulomonas flavigena* grown on different carbon sources [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 77: 589 - 595.
- [16] LI Xinghua, WANG Dan, ZHOU Fang, *et al.* Cloning and expression of a cellulase gene in the silkworm, *Bombyx mori* by improved Bac - to - Bac/BmNPV baculovirus expression system [J]. Mol Biol Rep, 2010, 37: 3721 - 3728.
- [17] ADAMS A, GOTTSCHLING E D, KAISER A C, *et al.* Methods in yeast genetics [C]//A Cold Spring Harbor Course Manual. New York: Cold Spring Harbor Press, 1998.
- [18] WYK van J P H, MOHULATSI M. Biodegradation of waste paper by cellulase from *Trichoderma viride* [J]. Bioresource Technology, 2003, 86(1): 21 - 23.
- [19] ADAMS A, GOTTSCHLING E D, KAISER A C, *et al.* Methods in yeast genetics [C]//A Cold Spring Harbor Course Manual. New York: Cold Spring Harbor Press, 1998.
- [20] ILMEN M, SALOHEIMO A, ONNELAM L, *et al.* Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* [J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 1298 - 2306.
- [21] RAUTIO J J, BAILEY M, KIVIOJA T, *et al.* Physiological evaluation of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* in production processes by marker gene expression analysis [J]. BMC Biotechnology, 2007, 7: 28 doi: 10.1186/1472 - 6750 - 7 - 28.
- [22] 丁少军, 宋美静, 池杏微. 不同碳源条件下草菇内切型纤维素酶基因 (*eg I*) 转录表达的分析 [J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(4): 419 - 422.
- [23] BARRERA - ISLAS G A, RAMOS - VALDIVIA A C, SALGADO L M, *et al.* Characterization of a β - Glucosidase produced by a high - specific growth - rate mutant of *Cellulomonas flavigena* [J]. Current Microbiology, 2007, 54: 266 - 270.
- [24] TOMME P, WARREN R A J, GILKES N R. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi [J]. Adv Microbiol Physiol, 1995, 37: 71 - 81.

(编辑 刘彤)