

微紫青霉 CBH I 酶纤维素结合结构域在大肠杆菌中的分泌型表达及性质研究*

汪天虹 邹玉霞 石屹峰 高培基 刘 佶 吴 静

(山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

摘要 为研究纤维素酶纤维素结合结构域的结构与功能, 进而深入了解天然纤维素的生物降解机制和提高纤维素酶的生物工艺学价值, 采用 PCR 技术体外扩增了携带微紫青霉外切葡聚糖纤维二糖水解酶 I (CBH I) CBD 编码区的 DNA 片段, 将 CBD 编码区 DNA 片段插入带有 *E. coli* *peIB* 前导肽序列的大肠杆菌质粒 pKK-tac-new 上进行了表达. 携带微紫青霉 CBD_{CBH I} 编码区的大肠杆菌重组菌株 DH5 α (pKK-tac-new-8) 产生有活性的分泌型 CBD_{CBH I} 蛋白. SDS-PAGE 检测显示所产生的 CBD_{CBH I} 蛋白分子量约 10.8 kD. 在 IPTG 诱导下, 该菌株所产生的 CBD_{CBH I} 蛋白含量达 45.2 mg/L, 且 90% 以上的 CBD 蛋白分泌到培养物上清液中. 结晶纤维素 CF-11 溶液经 CBD_{CBH I} 处理后, 浊度比对照提高了 128.9%, 天然棉花纤维结构经 CBD_{CBH I} 处理后产生一定程度的非水解性降解作用, 表明微紫青霉 CBD_{CBH I} 具有解聚天然结晶纤维素的作用.

关键词 微紫青霉, 外切葡聚糖纤维二糖水解酶 I, 纤维素结合结构域, 分泌型表达
中图分类号 Q 812

Expression and Characteristic of Secretary CBD_{CBH I} from *Penicillium janthinellum* in *E. coli**

WANG Tian-hong, ZOU Yu-xia, Shi Yi-feng, GAO Pei-ji, Liu Ji, Wu Jing
(The State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract In order to investigate the function and acting model of cellulose binding domain (CBD), further understand degradation mechanism of native cellulose and enhance the biotechnological value of cellulolytic enzymes, the CBD-encoding region of cellobiohydrolase I gene from *Penicillium janthinellum* was amplified *in vitro* by PCR. After being treated with *Xba*I and *Hind*III, the CBD_{CBH I}-encoding region was inserted into the downstream of the *peIB* signal sequence at *E. coli* vector pKK-tac-new. The plasmid with inserted CBD_{CBH I}-encoding region DNA fragment was selected and designed pKK-tac-new-8. Induced by IPTG, DH5 α (pKK-tac-new-8) secreted 45.2 mg of CBD_{CBH I} per liter of culture. By microcrystalline absorption and desorption, the CBD_{CBH I} secreted into the culture supernatant by DH5 α (pKK-tac-new-8) was purified and concentrated. The CBD_{CBH I} protein had a molecular mass of 10.8 kD and more than 90% of the CBD_{CBH I} produced by DH5 α (pKK-tac-new-8) were secreted into the culture supernatant. Treated by CBD_{CBH I}, the increment of turbidity of crystalline cellulose CF-11 was 128.9%, and the disruption effect on native cotton fibrils structure occurred after being treated with CBD_{CBH I}. Both of the experiments proved the role of CBD_{CBH I} in penetrating the fibers of crystalline cellulose.

Key words *Penicillium janthinellum*, Cellobiohydrolase I, Cellulose binding domain, Secretive expression

* 国家自然科学基金(394320020)资助

联系人: 汪天虹, 女, 1947年生, 教授; Tel: (0531) 8565344; Email: wth@life.sdu.edu.cn

收稿日期: 2000-01-14, 修回日期: 2000-03-27

纤维素酶一般是由催化结构域 (catalytic domain, CD) 和纤维素结合结构域 (cellulose binding domain, CBD) 组成, 二者之间通常是一段富含羟基的氨基酸组成的链接区^[1,2]。CD 水解可溶性纤维素, 能微弱吸附但不能水解不溶性纤维素; CBD 能吸附于纤维素表面但无水解活力。据报导, 瑞氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 外切葡聚糖酶 I 和 II CBD 结构域的缺失, 将导致酶对结晶纤维素降解活力的降低^[3,4]。因此, 对纤维素结合结构域的结构与功能的研究, 包括对纤维素酶两个结构域的相互关系, 以及纤维素结合结构域与纤维素之间吸附性质的研究, 对了解纤维素的生物降解机制以及提高纤维素酶的生物工艺学价值, 都具有重要的意义。

微紫青霉 (*Penicillium janthinellum*) 是一种腐生性的半知菌, 能产生广谱的裂解酶类, 包括纤维素酶、半纤维素酶、木聚糖酶、果胶酶和淀粉酶等。据报导, 槐糖对瑞氏木霉的包括外切葡聚糖纤维二糖水解酶 I (CBH I) 在内的纤维素酶有强烈的诱导作用^[5], 但微紫青霉的 CBH I 却不被槐糖诱导^[6], 很可能微紫青霉的 CBH I 与瑞氏木霉 CBH I 具有不同的调节机制。对微紫青霉 CBH I 的纤维素结合结构域的研究尚未报道。本实验室曾用基因序列定向缺失的方法, 得到带有微紫青霉 CBH I 纤维素结合结构域的大肠杆菌工程菌^[7], 但该结构域是以 LacZ-CBD_{CBH I} 融合蛋白的形式表达, 且不能分泌到胞外, 造成 CBD 蛋白的下游纯化工作步骤繁琐, 耗时多, 成本高, 工作量大。

本文采用 PCR 技术体外扩增了微紫青霉 CBH I 纤维素结合结构域的编码区, 利用大肠杆菌分泌型表达载体 pKK-tac-new, 在大肠杆菌中得到微紫青霉 CBD_{CBH I} 蛋白的分泌型表达, 并对重组微紫青霉 CBD_{CBH I} 蛋白的性质进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

实验中用于质粒 DNA 转化的大肠杆菌菌株为 DH5 α 。质粒 pUC18-181, 是在 pUC18 的 *Bam* H I 位点插入了微紫青霉 *cbh1* cDNA 基因而来^[7], 由德国汉堡大学 Anke Koch 博士惠赠, 分子量为 4.59 kb。分泌型表达载体 pKK-tac-new, 是在 pKK223-3 的 *Eco*R I 和 *Xma* I 位点之间插入 *Enwinia carotovora* 的 *peB* 的前导肽序列而构建的分泌型载体, 由芬兰国家技术中心生物技术研究所惠赠^[8]。质粒 pKK-tac-new-8, 为本室构建, 是在 pKK-tac-new 上 *peB*

的前导肽序列下游插入包括微紫青霉 CBD_{CBH I} 编码区在内的长度为 266 bp 的 DNA 片段而来。

1.2 培养基及培养条件

大肠杆菌培养用 LB 培养基, 转化恢复时使用 SOC 培养基。

1.3 DNA 操作及测序

DNA 操作按常规方法进行, 测序按双脱氧方法进行^[9]。

1.4 PCR 扩增微紫青霉 CBH I 纤维素结合结构域编码区

采用 DNA SIS 软件程序设计 PCR 反应的两个引物。引物序列为:

Primer A 5'-GCTCTAGA-TCCTCTCAAC TCGACCTTCA-3'

Primer B 5'-GCAAGCTT-CCAA GAT TCT CTACA GGCAC-3'

引物 A 和 B 的 5' 端分别带有 *Xba* I 和 *Hind* III 位点。

PCR 反应条件为: 97 4 min 后, 94 1 min, 55 1 min, 72 1.5 min。30 个循环后, 72 延伸 7 min。用 PCR 产物纯化试剂盒 (Boehringer Mannheim 公司产品) 纯化得的 PCR 扩增产物。

1.5 带有微紫青霉 CBD_{CBH I} 编码区的分泌型重组质粒的构建

用 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切 PCR 扩增产物; 用同样的限制酶双酶切质粒 pKK-tac-new DNA, 将二者连接后转化大肠杆菌 DH5 α , 在含 Amp 50~100 μ g/ml 的 LB 固体平板上筛选氨苄抗性转化子。提取转化子的质粒, 以插入片段的大小和以质粒作为模板再次进行 PCR 反应后是否出现预定的扩增条带来鉴定目的重组子。

1.6 CBD_{CBH I} 蛋白的制备及蛋白含量测定

将 DH5 α (pKK-tac-new-8) 在 LB 液体培养基中活化后, 以 1% 的接种量接种于含 50 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 液体培养基, 37 摇床培养 20 h 后, 加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L 进行诱导, 30~33 继续振荡培养 7 h, 离心, 取上清, 上清液即为含有分泌型 CBD_{CBH I} 蛋白的粗酶液。菌体重悬于 20 mmol/L (pH 6.0) 的磷酸缓冲液或 0.9% 生理盐水中备用。将粗酶液与微晶纤维素粉混合, 低温振荡, 所含微紫青霉 CBD_{CBH I} 蛋白将被吸附于微晶纤维素, 而不能吸附于微晶纤维素的杂蛋白则通过离心去除。再以含 6 mol/L 脲的上述磷酸盐缓冲液洗脱 CBD_{CBH I} 蛋白。用截留分子量为 5 kD 的透析袋透析

除盐后,再用 PEG 20000 将体积浓缩至原体积的 1/20 左右。

同上,当 DH5 α (pKK-tac-new-8) 培养液加入 IPTG 至终浓度 0.2 mmol/L 进行诱导后,30 继续振荡培养 7 h,离心收集菌体。菌体用蔗糖缓冲液 (20% 蔗糖, 30 mmol/L Tris-Cl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA) 悬浮,室温静置 10 min, 4 13 000 g 离心 15 min, 得菌体,再悬浮于 5 mmol/L 冰冷的 MgSO₄ 中,冰浴 10 min, 4 16 000 g 离心 20 min, 上清液即为周质蛋白溶液。收集沉淀菌体,超声波破碎,即为菌体总蛋白溶液。

蛋白质含量测定采用福林酚法^[10]。

1.7 SDS-PAGE 蛋白质凝胶电泳

按文献[10]进行。采用不连续系统,浓缩胶为 3%,分离胶为 12.5%。样品中加入 200 μ l 溴酚蓝上样缓冲液后煮沸 5 min,在 12.5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上进行凝胶电泳检测,同时进行蛋白质分子量测定。

1.8 pNPC 酶活力的测定

按本室以前所采用的方法进行^[7]。

1.9 微紫青霉 CBD_{CBH I} 处理结晶纤维素 CF-11 形成短纤维的作用

在 10 ml 含有 0.1% 球磨 CF-11 的 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液体系 (pH 6.0) 中,加入 0.5 ml 浓缩后的 CBD_{CBH I} 酶液,45 $^{\circ}$ C,作用 24 h。用 UV-240 积分球附件 (Shimadzu 公司, Japan) 于 550 nm 处测定其浊度变化,浊度变化定义为 $T\% = (T_s - T_c) / T_c$, T_s 与 T_c 分别表示样品和对照 (含有 0.1% 球磨 CF-11 的缓冲液) 的浊度。

1.10 CBD_{CBH I} 处理对天然棉花纤维的崩解作用及 STM 图像检测

反应混合体系为含 2 mg 脱脂棉花纤维粉末 (150~200 筛孔号) 和 0.05 mg CBD_{CBH I} 肽的 1 ml 5 μ mol/L 乙酸缓冲液 (pH 6.0)。于 45 $^{\circ}$ C 轻轻搅拌后,收集棉花纤维,80 $^{\circ}$ C 烘干。棉花纤维对照是以乙酸缓冲液代替 CBD_{CBH I} 加入后进行同样的处理。将处理后的棉花纤维悬浮于无水乙醇,在电导下胶粘固定于新切开的高度定向的热解石墨上,在空气中干燥后,根据本实验室以前所报道的方法^[11]用国产 STM CSPM-930A 进行 STM 观察并拍照。

2 结果与讨论

2.1 PCR 扩增微紫青霉 CBH I 纤维素结合结构域编码区

如 1.4 方法所述,以带有微紫青霉 CBH I 基因 cDNA 的重组质粒 pUC18-181 为模板进行 PCR 反应,体外扩增了微紫青霉 CBH I 基因 cDNA 的 C 端。在设计引物时,注意使所扩增部分的读码框架与载体保持一致。扩增区是从 1403~1668 之间的 266 bp,包括 CBH I 酶完整的 CBD 编码区 (108 nt),完整的链接区 (90 nt) 及少数 CD 编码区残基 (55 nt) (外加终止子 TAG 和下游的 10 个核苷酸)。PCR 扩增产物的凝胶电泳结果见 Fig. 1。可见扩增产物为单一条带,分子量在 200 bp~300 bp 之间,与预计扩增片段大小一致。

1 2 3 bp

500
400
300
200
100

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of CBD_{CBH I} coding sequence amplified by PCR

1. Negative control without the template; 2. Amplified products by PCR; 3. DNA molecular markers

2.2 带有微紫青霉 CBD_{CBH I} 结构域编码区的重组质粒的构建和筛选

将 PCR 扩增产物用 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化后,用 Xba I 和 Hind III 进行双酶切。将双酶切产物与经过同样双酶切的载体 pKK-tac-new 连接,转化大肠杆菌 DH5 α 。提取氨苄抗性转化子质粒做模板,用上述引物再次进行 PCR 扩增 (图略),将证实含有 266 bp 扩增片段的质粒命名为 pKK-tac-new-8。对质粒 pKK-tac-new-8 上所携带的外源片段进行测序。测序结果证实 pKK-tac-new-8 上所携带的 PCR 扩增片段序列与原模板序列完全相同,且读码框架与载体相符。该 DNA 片段序列见 Fig. 2。该片段带有 CBH I 酶 CBD 结构域全部 36 个氨基酸的编码区 (方框部分),少数 (18 个氨基酸) 催化区残基编码区 (字母下划线部分) 及完全的链接区 (CBD 与 CD 之间的 30 个氨基酸) Malee^[12] 对于瑞氏木霉 CBH I 的链接区的研究表明,链接区的存在与否,对 CBD 的吸附功能影响不大,但对全酶的催化活力则是非常重要的。催化区和吸附区之间足够的空间距离是酶的高效催化活力所必需的。同时,链

```

5' - T CCT CTC AAC TCG ACC TTC ACC GGC GGC ACC ACC AGC TCT TCC
      P L N S T F T G G T T S S S
AGC ACC ACG ACC ACC ACC TCC AAG AGC ACT TCG ACT TCC TCC TCG
      S T T T T T S K S T S T S S S
TCC AAG ACC ACC ACC ACT GTT ACC ACC ACC ACT ACC TCC AGC GGA
      S K T T T T V T T T T T S S G
TCG AGC GGC ACT GGT GCA CGG GAC TGG GCC CAA TGT GGC GGT AAT
      S S G T G A R D W A Q C G G N
GGC TGG ACT GGC CCG ACC TGT GTG GTG AGC CCC TAC ACT TGC ACC
      G W T G P T T C V S P Y T C T
AAG CAG AAT GAC TGG TAC TCC CAG TGC CTG TAG aga atc ttt gg -3'
      K Q N D W Y S Q C L
    
```

Fig 2 The sequence of PCR-amplified fragment inserted into pKK-tac-new-8 CBD-encoding region is showed by square frame and the partial CD-encoding region by the thin underline

接区的保留也有利于进一步利用 pKK-tac-new-8 进行嵌合酶的构建, 或利用 $CBD_{CBH I}$ 进行其它酶类或蛋白质的分离、纯化或固定研究。

2.3 SDS-PAGE 蛋白质凝胶电泳

将微紫青霉 CBH I 酶底物吸附区编码区连接到分泌型表达载体 pKK-tac-new 上, 在大肠杆菌中得到了 $CBD_{CBH I}$ 蛋白的分泌型表达。为使菌体充分表达外源蛋白, 在对 DH5 α (pKK-tac-new-8) 加入 IPTG 诱导后, 改为 30 培养。如 1.6 和 1.7 所述方法, 制备 DH5 α (pKK-tac-new-8) 分泌到胞外的 CBD 蛋白并进行 SDS-PAGE 电泳结果如图 3 所示。图中第 3 行和第 4 行均为单一蛋白条带, 与标

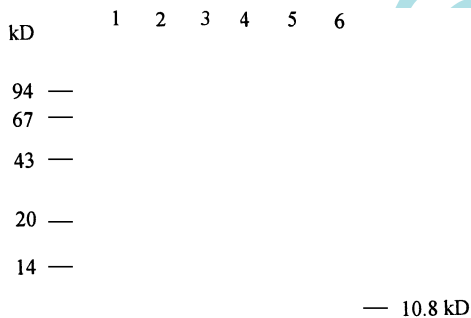


Fig 3 SDS-PAGE analysis of secretive $CBD_{CBH I}$ by DH5 α (pKK-tac-new-8)

1. Sample treated by microcrystalline absorption and desorption using the intracellular proteins of DH5 α (pKK-tac-new-8);
2. The protein molecular markers;
3. $CBD_{CBH I}$ located in the periplasmic space;
4. $CBD_{CBH I}$ secreted into the culture supernatant;
5. Total proteins of cells of DH5 α (pKK-tac-new-8);
6. Total proteins of cells of DH5 α (pKK-tac-new)

准蛋白分子量比较, 此蛋白分子量约为 10.8 kD, 并且具有生物活性, 说明 $CBD_{CBH I}$ 编码区已在 DH5 α (pKK-tac-new-8) 中得到表达并分泌至胞外。

2.4 DH5 α (pKK-tac-new-8) $CBD_{CBH I}$ 蛋白的定位及含量测定

利用 CBD 蛋白能可逆地吸附于结晶纤维素的性质, 通过对微晶纤维素的吸附、解吸附过程, 对 DH5 α (pKK-tac-new-8) 分泌到胞外上清液中以及在周质空间的 $CBD_{CBH I}$ 蛋白进行了分离、纯化。另一方面, 分离、纯化过程的顺利进行也证实了所克隆的蛋白具有 CBD 生物活性。将菌体内总蛋白溶液样品对微晶纤维素进行同样的吸附、解吸附处理后, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 未见有 $CBD_{CBH I}$ 蛋白带出现 (Fig 3 泳道 1)。用 Folin-酚法测定 DH5 α (pKK-tac-new-8) 分泌至胞外上清液中和在周质空间的 CBD 蛋白含量。测定结果见表 1。测定结果证明 DH5 α (pKK-tac-new-8) 所产生的 $CBD_{CBH I}$ 蛋白的大部分 (约 91%) 已分泌到培养物上清液中。这为下一步进行 $CBD_{CBH I}$ 蛋白的大规模分离纯化提供了条件和工作依据。

Table 1 The amounts of CBDs produced by DH5 α (pKK-tac-new-8)

| Localization | $\rho(CBD_{CBH I}) / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | Ratio (%) |
|-------------------|---|-----------|
| Supernatant | 41.1 | 90.9 |
| Periplasmic space | 4.12 | 9.1 |
| Intracellular | 0 | 0 |
| Total | 45.22 | 100 |

Note: The results were average values of three duplicate experiments

2.5 DH5 α (pKK-tac-new-8) CBH I 酶活力测定

CBH I 酶活力通常可用测定 pN PC 活力表

示. 提取经 IPTG 诱导后的 DH5 α (pKK-tac-new-8) 粗酶液, 测定其 pNPC 活力. 测定结果 DH5 α (pKK-tac-new-8) 的 pNPC 活力为 0, 证实该菌株不再具有 CBH I 酶的催化活力, 即 pKK-tac-new-8 上所携带 PCR 扩增片段中所残存的催化区 18 个氨基酸残基确实不再具有催化活力.

2.6 微紫青霉 $CBD_{CBH I}$ 处理结晶纤维素 CF-11 形成短纤维的作用

如方法 1.9 所述, 用 $CBD_{CBH I}$ 液处理浓度为 0.1% 的纤维素粉 CF-11, 处理结果见 Table 2. 45 $^{\circ}$ C, 24 h 作用后, 经 $CBD_{CBH I}$ 处理的 CF-11 溶液的浊度比未经 $CBD_{CBH I}$ 处理的 CF-11 对照有明显升高, 升高幅度达 128.9%, 浊度的升高显然是由于短纤维的形成而造成. 由此可见, 微紫青霉 $CBD_{CBH I}$ 对天然结晶纤维素 CF-11 的处理, 可帮助部分短纤维由天然纤维素表层结构中剥离、脱落, 从而对天然结

晶纤维素产生一定程度的疏解作用.

Table 2 The turbidity of CF-11 solution with and without $CBD_{CBH I}$ at 550 nm after 24 h of incubation at 45 $^{\circ}$ C

| Treatment | Turbidity | Increment of turbidity (%) |
|---|-----------|----------------------------|
| 0.1% CF-11 with buffer instead of $CBD_{CBH I}$ | 26.60 | — |
| 0.1% CF-11 with $CBD_{CBH I}$ | 60.90 | 128.9 |

2.7 $CBD_{CBH I}$ 对天然棉花纤维结构的崩解作用

天然棉花纤维按 1.10 所述方法处理后进行隧道扫描电镜图像观察 (Fig. 4), 可见天然棉花纤维在加入 $CBD_{CBH I}$ 处理 4~6 h 后, 与不加 CBD 的对照相比, 棉花纤维明显变得膨松、粗糙, 纤维表面更加不规则, 并可见某些单个的微纤维由棉花纤维表面剥离、脱落 (Fig. 4B, C).

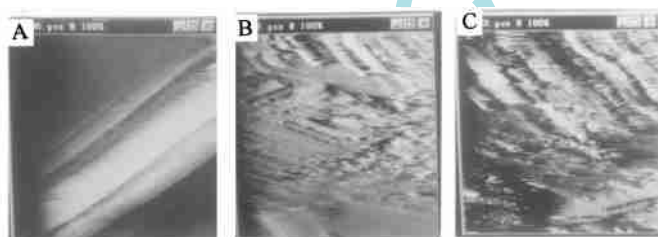


Fig. 4 STM image of native cotton fibrils treated by $CBD_{CBH I}$

(A) Native cotton fibers (Iref: 0.28 nm; V bias: 420 mV; Scanning area: 64 nm \times 64 nm);

(B) Cotton fibers treated with $CBD_{CBH I}$ for 4 hours (Iref: 0.28 nm; V bias: 420 mV; Scanning area: 64 nm \times 64 nm);

(C) Cotton fibers treated with $CBD_{CBH I}$ for 6 hours (Iref: 0.28 nm; V bias: 420 mV; Scanning area: 64 nm \times 64 nm).

纤维素 CF-11 经微紫青霉 $CBD_{CBH I}$ 作用后, 浊度明显发生变化. $CBD_{CBH I}$ 的处理对天然棉花纤维结构产生一定程度的崩解作用, 这些结果为探索微紫青霉 $CBD_{CBH I}$ 在纤维素酶降解结晶纤维素中所起的作用提供了实验证据. 由我们的实验结果分析, 微紫青霉 $CBD_{CBH I}$ 作为外切葡聚糖纤维二糖水解酶的一个结构域, 不仅有引导全酶吸附到纤维素上的功能, 作为 CBD 结构域本身也能对天然结晶纤维素起到一定程度的疏解或崩解作用, 其过程可能涉及到氢键的断裂. Karaulis P 等^[13] 曾报道了瑞氏木霉 CBH I CBD 蛋白的三维结构, 发现它折叠成大小为 3.0 nm \times 1.8 nm \times 1.0 nm 的楔形结构. 外切葡聚糖纤维二糖水解酶 CBD 的这种高级立体结构使它易于插入天然结晶纤维素的表层, 从而使纤维素链之间的氢键断裂, 部分短纤维从结晶纤维素表层脱落, 而使结晶纤维素由原来相对较规则而紧密的

结构变得疏松和不规则, 在一定程度上起到了帮助无定形化的作用.

参考文献 (References)

- 1 Tilbeurgh H V, Tomme P, Claeysens M, Bhikhabhai R, Pettersson G L. Limited proteolysis of the cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *FEBS Lett*, 1986, **204**: 223~227
- 2 高培基, 曲音波, 汪天虹, 阎伯旭. 微生物降解纤维素机制的分子生物学研究进展. 纤维素科学与技术 (Gao Pei-ji, Qu Yin-bo, Wang Tian-hong, Yan Bai-xu. Advances of molecular biology on cellulose biodegradation by microbes. *Sci Technol Cellulose*), 1995, **3**(2): 1~19
- 3 Knowles J, Lehtovaara P, Teeri T. Cellulase families and their genes. *Biotech*, 1987, **5**: 255~261
- 4 Teeri T T, Lehtovaara P, Kauppinen S, Salovuori I, Knowles J K C. Homologous domains of *Trichoderma reesei* cellulytic enzymes: gene sequence and expression of cellobiohydrolase II. *Gene*, 1987, **51**: 43~52
- 5 El-Gogary S, Leite A, Crivellaro O, Eveleigh D E, Eidi Dorry H.

- Mechanism by which cellulose triggers CBH I gene expression in *T. reesei* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 6138~ 6142
- 6 Koch A, Weigel C T O, Schulz G. Cloning sequencing and heterologous expression of a cellulase-encoding cDNA from *P. janthinellum*. *Gene*, 1993, **124**: 57~ 65
- 7 汪天虹, 王春卉, 高培基, 钟铃, 邹玉霞. 微紫青霉 CBH I 的 CBD 编码区在 *E. coli* 中的亚克隆与表达. *微生物学报* (Wang Tianhong, Wang Chunhui, Gao Peiji, Zhong Ling, Zou Yuxia. Subcloning and expression of CBD-encoding region of cellobiohydrolase I from *P. janthinellum* in *E. coli* *Acta Microbiol Sin*), 1998, **38**(4): 269~ 275
- 8 Takkinen K, Laukkanen M L, Sismann D, Alfthan K, Immonen T, Vanne L, Kaartinen M, Knowles J K C, Teeri T T. An active single-chain antibody containing a cellulase linker domain is secreted by *Escherichia coli*. *Protein Engineering*, 1991, **4**(7): 837~ 841
- 9 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press 1989
- 10 北京大学生物系生化教研室主编. 生物化学实验指导. 北京: 人民教育出版社 (Department of Biology, Peking University. *Experimental Guide in Biochemistry*. Beijing: People Education Press), 1984
- 11 Zhang Y Z, Chou X L, Liu J, Gao P J. Size and arrangement of elementary fibrils in crystalline cellulose study with scanning tunneling microscopy. *J Vac Sci Tech*, 1997, **B15**: 1502~ 1505
- 12 Srisodsuk M, Reinikainen T, Penttilä M, Teeri T T. Role of the interdomain linker peptide of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I in its interaction with crystalline Cellulose. *J Biol Chem*, 1993, **268**(28): 20756~ 20761
- 13 Kraulis P, Clore M, Nilges M, Jones T A, Pettersson G, Knowles J, Gronenborn A. Determination of the three-dimensional solution structure of the C-terminal domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. A study using nuclear magnetic resonance and hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing. *Biochemistry*, 1989, **28**: 7241~ 7257

WWW.SPM.COM