

# 融合 $\beta$ -甘露聚糖酶基因的构建、表达及酶学性质的分析

王春娟<sup>1</sup>, 李剑芳<sup>1</sup>, 唐诗涵<sup>1</sup>, 董运海<sup>1</sup>, 邬敏辰<sup>\*2</sup>

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 无锡医学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 宇佐美曲霉 (*Aspergillus usamii*) YL-01-78 的糖苷水解酶 5 家族  $\beta$ -甘露聚糖酶 (AuMan5A) 是一种仅含催化域 (CM) 的单结构蛋白。为改善其酶学性质, 基于理性设计将海栖热胞菌 (*Thermotoga maritima*) MSB8 的 27 家族碳水化合物结合域 (CBM27) 融合至 AuMan5A 的 C-端, 并采用重叠 PCR 技术构建融合酶基因 *Auman5A-cbm27*。分别将 *Auman5A-cbm27* 和 *Auman5A* 在毕赤酵母 GS115 中进行表达, 对重组表达产物 reAuMan5A-CBM27 和 reAuMan5A 进行纯化和酶学性质测定。结果表明, reAuMan5A-CBM27 和 reAuMan5A 的最适温度均为 68  $^{\circ}\text{C}$ ; 两者分别在 68 和 60  $^{\circ}\text{C}$  及以下稳定。同时, 前者较后者具有更广泛的 pH 稳定范围。reAuMan5A-CBM27 对角豆胶的  $K_m$  值由融合前的 1.7 mg/mL 降至 0.7 mg/mL, 表明 AuMan5A 的底物亲和力得到了提高。

**关键词:**  $\beta$ -甘露聚糖酶; 催化域; 碳水化合物结合域; 热稳定性; 底物亲和力

**中图分类号:** TS 201.25 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)11—1135—07

## Expression and Enzymatic Properties Analysis of a Fusion $\beta$ -Mannanase

WANG Chunjuan<sup>1</sup>, LI Jianfang<sup>1</sup>, TANG Shiha<sup>1</sup>, DONG Yunhai<sup>1</sup>, WU Minchen<sup>\*2</sup>

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** AuMan5A, which belongs to the glycoside hydrolase family 5  $\beta$ -mannanase from *Aspergillus usamii* YL-01-78, only contains a catalytic module (CM). To improve its enzymatic properties, a fusion  $\beta$ -mannanase (*AuMan5A-CBM27*) was well designed by fusing a family 27 carbohydrate-binding module (CBM27) from *Thermotoga maritima* MSB8 into the C-terminus of AuMan5A. A fusion gene (*Auman5A-cbm27*) constructed by the overlapping PCR was expressed in *Pichia pastoris* GS115. The enzymatic properties of the purified reAuMan5A-CBM27 and reAuMan5A were investigated. The optimal temperatures of both reAuMan5A-CBM27 and reAuMan5A were determined at 68  $^{\circ}\text{C}$ . They were respectively thermo-stabled at 68  $^{\circ}\text{C}$  or 60  $^{\circ}\text{C}$  and below. A wider pH tolerant range was observed for reAuMan5A-CBM27, whose  $K_m$  value to locust bean dropped from 1.7 mg/mL to 0.7 mg/mL. The increase of substrate affinity of AuMan5A was

收稿日期: 2015-01-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31271811)。

\* 通信作者: 邬敏辰 (1962—), 男, 江苏无锡人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酶工程与基因工程研究。

E-mail: bioch@163.com

confirmed.

**Keywords:**  $\beta$ -mannanase, catalytic module, carbohydrate-binding module, thermostability, substrate affinity

$\beta$ -甘露聚糖酶是内切  $\beta$ -1,4-D-甘露聚糖酶 (endo- $\beta$ -1,4-D-mannanase, EC 3.2.1.78) 的简称, 根据其一级结构和疏水簇分析, 几乎所有  $\beta$ -甘露聚糖酶可归为糖苷水解酶 5、26 和 113 家族 ([http://www.cazy.org/fam/acc\\_GH.html](http://www.cazy.org/fam/acc_GH.html))<sup>[1]</sup>。 $\beta$ -甘露聚糖酶广泛存在于动植物和微生物中, 它在食品、医药、饲料、造纸、纺织和能源开发等诸多领域具有潜在的应用价值<sup>[2-3]</sup>。然而, 大多数商品化的  $\beta$ -甘露聚糖酶存在或多或少的缺陷, 如底物亲和力弱、催化活性低、对极端环境耐受性差等, 这些已成为制约  $\beta$ -甘露聚糖酶发展的瓶颈<sup>[4]</sup>。目前利用蛋白质/基因工程技术对酶分子结构进行改造, 以获取催化活性高和酶学性质优良的工程酶, 已成为众多研究者关注的热点。

多数  $\beta$ -甘露聚糖酶结构是由催化域 (CM)、碳水化合物结合域 (CBM) 以及连接两个区域的连接肽组成, 但有些酶仅含 CM 的单结构蛋白<sup>[5]</sup>。由于 CBM 具有特异性结合碳水化合物的功能, 所以可以通过其具有的吸附作用而增强酶对底物的可及度, 提高底物附近的酶浓度, 进而提高酶降解底物的表现效率。目前基于经验或理性设计, 借助连接肽将酶的 CM 与 CBM 融合, 从而达到改善酶学性质的目的, 已有一些成功的实例。Pham 等<sup>[6]</sup>借助一种天然连接肽将黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 纤维二糖水解酶 B 的 CBM1 融合至微刺曲霉 (*A. aculeatus*)  $\beta$ -甘露聚糖酶 (Man) 的 C-端。结果表明, 重组融合酶 Man-CBM1 的底物亲和力和热稳定性均有明显的提高。李相前等研究发现, 将源自海栖热袍菌 (*T. maritima*) 的内切葡聚糖酶 Cel12B 与来自同一菌株木聚糖酶 XynA 的 CBM 融合, 能显著提高 Cel12B 的热稳定性<sup>[7]</sup>。

作者所在实验室已克隆了 *A. usamii* YL-01-78 的 5 家族  $\beta$ -甘露聚糖酶基因 *Auman5A*, 由该基因编码的  $\beta$ -甘露聚糖酶 *AuMan5A* 是一个不含 CBM 的单结构域蛋白<sup>[8]</sup>。作者采用同源建模、分子对接模拟和结合自由能计算等手段, 对 *AuMan5A* 的定向改造进行理性设计。在此基础上采用重叠 PCR 技术

实施了融合酶基因 *Auman5A-cbm27* 的构建、在 *P. pastoris* 中的表达及重组融合酶 reAuMan5A-CBM27 酶学性质的测定。该理性设计并结合基因融合技术用于改善 *AuMan5A* 酶学性质的实验方案和结果, 迄今为止未见有国内外文献报道, 可为  $\beta$ -甘露聚糖酶乃至其它酶的定向改造及其机制的研究提供理论与实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 和 DH5 $\alpha$ 、毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 和表达质粒 pPIC9K: 均购自 Invitrogen 公司; 克隆质粒 pUCm-T: 购自上海 Sangon 公司; 重组质粒 pUCm-T-*Auman5A* 和 pPIC9K-*Auman5A*: 作者所在研究室构建和保存。

### 1.2 主要试剂和培养基

限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker 和蛋白质 Marker: 购自大连 TaKaRa 公司; 质粒和 PCR 产物纯化试剂盒、酵母粉、蛋白胨、酵母基础氮源和 Geneticin G418: 购自上海 Sangon 公司; 角豆胶、甘露糖和考马斯亮蓝 R-250: Sigma 公司产品; Sephadex G-75: Amersham Pharmacia Biotech 公司产品; 其它试剂为国产或进口分析纯。LB、MD、YPD、YPD-G418、BMGY 和 BMMY 培养基的配制参照 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit (Invitrogen 公司) 操作手册。

### 1.3 融合酶的理性设计

**1.3.1 CBM 数据库的构建及进化树的构建** 基于氨基酸的序列相似性, CAZy 数据库 (Carbohydrate-Active enZymes Database, <http://www.cazy.org/>) 中的 45 072 种碳水化合物结合结构域 (carbohydrate-binding module, CBM) 被分为 71 个家族, 超过 15 个家族的 CBM 具有纤维素亲和力, 5 个家族的 CBM 具有甘露糖结合力。研究表明, 27 家族的 CBM 对催化域具有一定的热保护作用<sup>[9]</sup>, 并可以特异性地结合甘露聚糖<sup>[10]</sup>。随机选取多条 27 家族 CBMs 序列, 利用 MEGA4.0 软件构建 CBM27 进化树。

**1.3.2 CBM 与模型分子的分子对接和分子动力学模拟** 根据 CBM27 进化树,从每个 CBM27 亚家族中分别选择多个具有代表性的 CBM, 利用 AutoDock 4.2 程序 (<http://autodock.scripps.edu>) 将它们与甘露五糖模型分子进行分子对接模拟<sup>[11]</sup>,再使用 Gromacs 4.5 软件进行分子动力学模拟分析,并计算它们之间的结合自由能。当配体与受体之间的结合自由能越低,表明两者之间的亲和力越强<sup>[12]</sup>。依据 CBM27 与模型分子间的结合自由能大小,最终选定 1 个自由能最高的 CBM27。为实现 CBM27 的

高效表达,根据毕赤酵母 GS115 的密码子偏好性 (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) 对 CBM27 进行密码子优化,由 TaKaRa 公司合成 (pUCm-T-cbm27)。

#### 1.4 融合酶基因的构建

基于上述理性设计结果,根据 *Auman5A* 序列 (登录号:HQ839639) 及 *Trichoderma reesei* 纤维二糖水解酶 I 的连接肽基因序列 (登录号:GL985084),设计合成 *Auman5A-cbm27* 基因所需的 4 条引物 (见表 1)。

以质粒 pUCm-T-*Auman5A* 为模板、*AMan5A*-

表 1 重叠 PCR 扩增基因 *Auman5A-cbm27* 的引物

Table 1 Primers for PCR amplification of target gene *Auman5A-cbm27*

| 引物名称      | 引物序列                                                        | 长度 | 备注               |
|-----------|-------------------------------------------------------------|----|------------------|
| AMan5A-F1 | GAATTC TCCTTCGCCAGCACCTC                                    | 23 | <i>EcoR</i> I 位点 |
| AMan5A-R1 | TAGACGAGGTTGTCGTCGATGATACGGGAGGAGGAGTGCTTGTACCGCCGGCACTAT   | 60 | 重叠区              |
| Tman5A-F2 | GACGACAACCTCGTCTAGGACCTCGTCACGCCCTCCACCGCTGGAGGTAGCGCAAGATA | 60 | 重叠区              |
| Tman5A-R2 | GCGGCCGCTATGTTCTTTTATAAAGTCTCAC                             | 32 | <i>Not</i> I 位点  |

F1 和 AMan5A-R1 为引物,PCR 扩增出融合酶的上游基因片段 *Auman5A*;同时以 pMD19-T-*cbm27* 质粒为模板、Tman5A-F2 和 Tmman5A-R2 为引物,扩增出下游基因片段 *cbm27*。上下游两片段互为引物和模板,按等摩尔数混合,PCR 扩增,融合上下游片段,加入引物 AMan5A-F1 与 Tman5A-R2,大量扩增融合基因 *Auman5A-cbm27*。获得的目的 PCR 产物与 pUCm-T 连接,得重组质粒 pUCm-T-*Auman5A-cbm27*。

#### 1.5 重组表达质粒的构建

*EcoR* I 和 *Not* I 分别双酶切质粒 pUCm-T-*Auman5A-cbm27* 与 pPIC9K,回收目的条带,用 *T*<sub>4</sub> 连接酶将两者连接,得重组表达质粒 pPIC9K-*Auman5A-cbm27*。

#### 1.6 重组 $\beta$ -甘露聚糖酶的表达

pPIC9K-*Auman5A-cbm27* 和 pPIC9K-*Auman5A* 分别用 *Sal* I 线性化,电击转化毕赤酵母,具体操作参见基因脉冲仪 (Bio-Rad 公司) 说明书。重组酵母鉴定、多拷贝筛选及诱导表达参见 Multi-Copy Pichia Expression Kit 操作手册。

#### 1.7 重组 $\beta$ -甘露聚糖酶的纯化

重组毕赤酵母经体积分数 1%甲醇诱导 96 h,4℃,8 000 r/min 冷冻离心 15 min,保留上清液,用质量分数 75%的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 进行沉淀,离心收集沉淀,取适量 20 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 缓冲液

(pH 6.0),溶解沉淀,经透析、超滤浓缩 (膜截留相对分子质量为 10 000,Millipore 公司产品),上样至 Sephadex G-75 层析柱 (1.6 cm×80 cm)。

#### 1.8 重组 $\beta$ -甘露聚糖酶活性和蛋白质的分析

$\beta$ -甘露聚糖酶活性测定参见文献[4]。每分钟释放 1  $\mu$ mol 还原糖 (以甘露糖计) 所需的酶量为一个酶活力单位 (U)。纯化后的重组表达产物 SDS-PAGE 分析采用 Laemmli 法<sup>[13]</sup>。蛋白质含量测定采用 Bradford 法<sup>[14]</sup>,以牛血清白蛋白为标准绘制标准曲线。

#### 1.9 重组 $\beta$ -甘露聚糖酶的酶学性质分析

**1.9.1 最适 pH 及 pH 稳定性** 配制一系列不同 pH 的缓冲液,pH 2.0~13.0,底物用去离子水配成质量浓度 1 g/dL,将底物与不同 pH 的缓冲液 1:1 混合,按酶活力测定方法测定。将酶液分别用不同 pH 的缓冲液稀释,40℃保温 1 h,测定不同 pH 的样品酶活性。

**1.9.2 最适温度及温度稳定性** 以 0.5 g/dL 为底物质量浓度,在 40~80℃范围内测定酶活性,得到最适宜酶反应的温度。将酶液用缓冲液适当稀释后,分别置于 45、50、55、60、65、70、75℃下,保温 1 h,测定不同温度的样品酶活性,作者将残余酶活性在 85%以上定义为热稳定<sup>[15]</sup>。

**1.9.3 酶动力学参数测定** 以 pH 3.6 的柠檬酸-磷酸氢二钠配制的不同质量浓度 (1.0~10 mg/mL) 的

角豆胶溶液为底物,在 50 ℃的条件下酶解反应 15 min,测定酶活性。利用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法,求出酶的  $K_m$  及  $V_{max}$  值。

## 2 结果与分析

### 2.1 融合酶的理性设计

利用 MEGA4.0 软件构建 27 家族 CBMs 进化树(图 1)。从中选取 8 个 CBM27 作为候选对象,利用 Modeller 9.9 软件进行 3-D 结构同源建模。同时,利用 AutoDock 4.2 程序将 8 个候选的 CBM27 分别与甘露五糖分子进行分子对接,计算其结合自由能,结果如表 2 所示。表中可以看出,来自于 *T. maritima* MSB8 的 CBM27 与甘露五糖的结合自由

能最低 (-209.99 kcal/mol)。因此,选择此 CBM27 融合至 AuMan5A 的 C 端。



图 1 27 家族 CBMs 的进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the evolutionary relativity and homology among family27 CBMs

表 2 候选 CBMs 与甘露五糖的对接分析

Table 2 Docking analyses of the candidate CBMs combined with mannopentaose

| 来源                                     | GenBank 号    | CBM 长度 | 结合自由能/(kJ/mol) |
|----------------------------------------|--------------|--------|----------------|
| <i>Vibrio</i> sp. strain MA-138        | BAG69482     | 168    | -616.34        |
| <i>Thermotoga maritima</i> MSB8        | AAD36302     | 170    | -877.76        |
| <i>Thermotoga</i> sp. EMP              | WP_008195430 | 170    | -794.91        |
| <i>Zymophilus raffinivorans</i>        | WP_019552954 | 162    | -617.05        |
| <i>Thermotoga petrophila</i> RKU-1     | YP_001245126 | 667    | -656.76        |
| <i>Thermotoga</i> sp. RQ2              | YP_001739610 | 669    | -431.04        |
| <i>Thermotoga neapolitana</i> DSM 4359 | YP_002534887 | 185    | -229.02        |
| <i>Thermotoga naphthophila</i> RKU-10  | YP_003347055 | 185    | -533.91        |

### 2.2 融合酶编码基因的构建

分别从质粒 pUCm-T-Auman5A 及 pMD19-T-cbm27 上扩增出 1 050 bp 的 *Auman5A* 和 530 bp 的 *cbm27* 条带,通过重叠 PCR 方法扩增出约 1 630 bp 融合基因 *Auman5A-cbm27* (包含 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切位点),连接至 pUCm-T。测序结果显示, *Auman5A-cbm27* 长度为 1 629 bp,与预期一致。*Auman5A-cbm27* 基因序列编码 547 个氨基酸的 AuMan5A-CBM27,包括含 347 个氨基酸的 AuMan5A、29 个氨基酸的连接肽和 171 个氨基酸的 CBM27(图 2),其理论相对分子质量与等电点 pI 分别为:60 164 和 4.41。将融合基因克隆至 pPIC9K,得到重组表达质粒 pPIC9K-Auman5A-cbm27。

### 2.3 重组 $\beta$ -甘露聚糖酶的表达和纯化

经体积分数 10%的甲醇诱导重组毕赤酵母 96 h 后,离心,取发酵上清液按 1.8 方法测定酶活性,分别得到 AuMan5A-CBM27 和 AuMan5A 表达最高的重组子,其酶活性分别为 21.75、33.84 U/mL。将筛

选得到的 AuMan5A-CBM27 和 reAuMan5A 发酵上清液分别经  $(NH_4)_2SO_4$  分级沉淀、阴离子交换层析、超滤及凝胶过滤层析进行纯化,对纯化后的样品进行 SDS-PAGE 分析,结果显示,纯化后的目的蛋白 reAuMan5A-CBM27 和 reAuMan5A 分别在 60 200 和 19 800 kDa (表观相对分子质量)显示出单一条带(图 3 泳道 2,4)。按 1.8 方法测得电泳纯的 reAuMan5A-CBM27 和 reAuMan5A 的比酶活分别为 170、231 U/mg。

### 2.4 重组 $\beta$ -甘露聚糖酶的酶学性质分析

**2.4.1 最适 pH 及 pH 稳定性** 在不同 pH 值条件下分别测定 reAuMan5A 与 reAuMan5A-CBM27 活性,结果如图 4(a)所示, reAuMan5A 与 reAuMan5A-CBM27 的最适 pH 均为 4.0。将 reAuMan5A 与 reAuMan5A-CBM27 在不同 pH 值中保温 1 h,测其酶活性,结果如图 4(b)所示, reAuMan5A-CBM27 在 pH 2.0~9.0 范围之间仍然具有较好的稳定性,残余酶活超过 85%,而 AuMan5A 在 pH 2.5~7.5 范围内

图2 Auman5A-cbm27 的核苷酸序列及其推测的氨基酸序列

**Fig. 2** Nucleotide sequence of the Auman5A-cbm27 and the hypothetical amino acid sequence of the AuMan5A-CBM27

稳定。

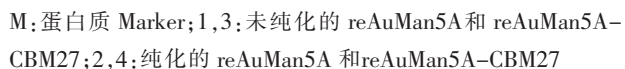
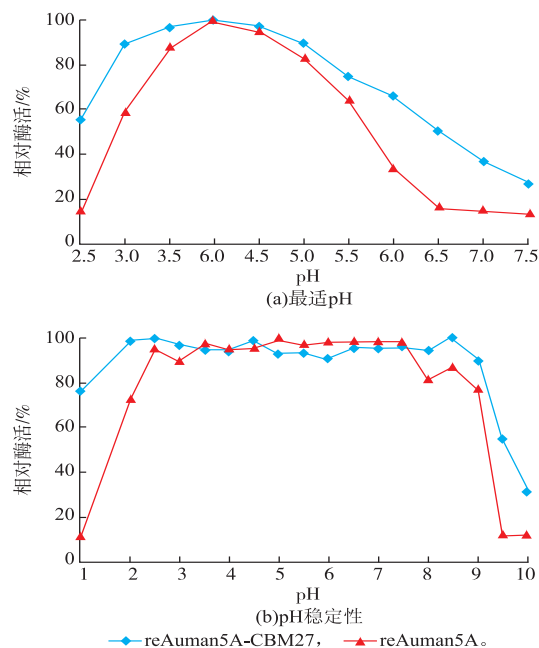


图 3 reAuMan5A 和 reAuMan5A-CBM27 的 SDS-PAGE 分析



**图4 pH对reAuMan5A-CBM27和reAuMan5A活性的影响**  
**Fig. 4 Effects of pH on the reAuMan5A -CBM27 and reAuMan5A activity**

**2.4.2 最适温度及温度稳定性** 在不同温度下分别测定 reAuMan5A 与 reAuMan5A-CBM27 酶活性, 结果如图 5 (a) 所示, reAuMan5A 与 reAuMan5A-CBM27 的最适温度均为 68 °C。将 reAuMan5A 与 reAuMan5A-CBM27 在不同温度中分别保温 1 h, 测其酶活性, 结果如图 5(b) 所示, 当温度在 60 °C 及以下时, 前者稳定, 而后者在 68 °C 及以下稳定, 表明 CBM27 在一定程度上可以提高了 reAuMan5A 的热稳定性。

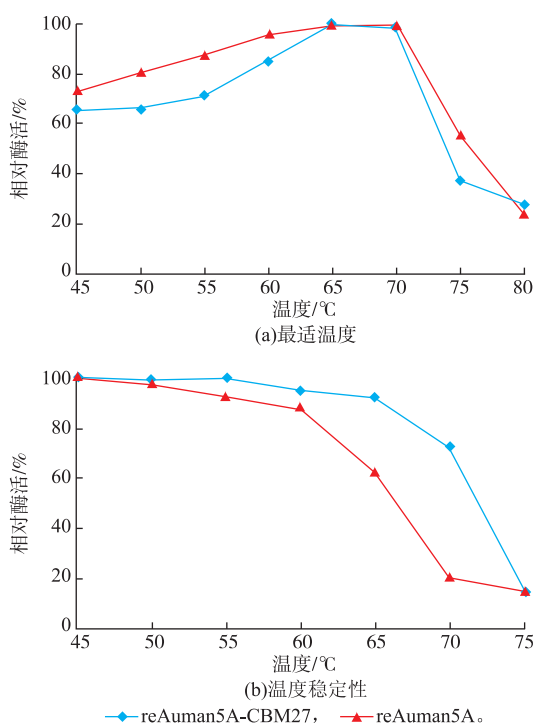


图 5 温度对 reAuMan5A-CBM27 和 reAuMan5A 活性的影响

Fig. 5 Effects of temperature on the reAuMan5A-CBM27 and reAuMan5A activity

## 参考文献:

- [1] LI J F, WEI X H, TANG C D, et al. Directed modification of the *Aspergillus usami*  $\beta$ -mannanase to improve its substrate affinity by in silico design and site-directed mutagenesis [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2014, 41 (4): 693-700.
  - [2] LU H Q, ZHANG H T, SHI P J, et al. A family 5  $\beta$ -mannanase from the thermophilic fungus *Thielavia arenaria* XZ7 with typical thermophilic enzyme features[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(18): 8121-8128.
  - [3] CHAUHAN P S, PURI N, SHARMA P, et al. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2012, 93(5): 1817-1830.
  - [4] 魏喜换, 王春娟, 赵梅, 等. 基于理性设计的  $\beta$ -甘露聚糖酶底物亲和力的定向改造[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2014, 40(1): 58-64.
- WEI Xihuan, WANG Chunjuan, ZHAO Mei, et al. Directed modification of  $\beta$ -mannanase substrate affinity based on rational

**2.4.3 酶动力学参数测定** 由 1.8.3 所述方法测得 reAuMan5A-CBM27 的  $K_m$  值为 0.7 mg/mL, 较 reAuMan5A 的 1.7 mg/mL 降低了 58.8%; reAuMan5A-CBM27 的  $V_{max}$  值为 249.3 U/mg, 较 reAuMan5A 的 325.7 U/mg 略有降低。结果表明, CBM27 对甘露五糖特有的结合力使得融合酶与底物更易结合, 从而提高了酶对底物的亲和力。

## 3 结语

借助各种生物数据库和生物计算软件, 通过 CBM27 数据库及进化树的构建, 采用同源建模、分子对接模拟和结合自由能计算等手段对 AuMan5A 分子的定向改造进行理性化设计, 借助重叠 PCR 技术克隆出了编码 AuMan5A-CBM27 的基因, 并在毕赤酵母 GS115 中实现异源表达。获得的 AuMan5A-CBM27 与原酶 AuMan5A 相比, 酶学性质表明, 融合酶比原酶能够在更宽的 pH 范围内保持稳定, 同时, 其温度耐受性也较原酶提高了 8 °C。这表明, 融合酶在工业生产上更具有应用潜力。另外, 融合酶对角豆胶的  $K_m$  值为 0.7 mg/mL, 较原酶的 1.7 mg/mL 有明显的降低, 表明融合酶对底物的亲和力有了较大程度的提高。虽然融合酶的酶活性较原酶有所下降, 但其具有的更优越的 pH 性质, 更高的热稳定性及底物亲和力, 表明其具有很大的应用潜力, 同时也为  $\beta$ -甘露聚糖酶进一步的应用和工业化生产奠定了基础。

- design[J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 2014, 40(1): 58-64. (in Chinese)
- [5] 卢海强. 嗜热微生物来源的甘露聚糖酶的克隆表达、热稳定性及催化机理的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- [6] PHAM T A, BERRIN J G, RECORD E, et al. Hydrolysis of softwood by *Aspergillus mannanase*: role of a carbohydrate-binding module[J]. *Journal of Biotechnology*, 2010, 148(4): 163-170.
- [7] 李相前, 邵蔚蓝. 海栖热袍菌内切葡聚糖酶 Cel12B 与木聚糖酶 XynA CBD 结构域融合基因的构建、表达及融合酶性质分析[J]. *微生物学报*, 2006, 46(5): 726-729.
- LI Xiangqian, SHAO Weilan. The construction of *Thermotago maritima* endoglucanase Cel12B fused with CBD and the characterization of chimeric enzyme[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(5): 726-729. (in Chinese)
- [8] TANG C D, GUO J, WU M C, et al. Cloning and bioinformatics analysis of a novel acidophilic  $\beta$ -mannanase gene, *Auman5A*, from *Aspergillus usamii* YL-01-78[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 27: 2921-2929.
- [9] dos Santos C R, Paiva J H, Meza A N, et al. Molecular insights into substrate specificity and thermal stability of a bacterial GH5-CBM27 endo-1, 4- $\beta$ -D-mannanase[J]. *Journal of Structural Biology*, 2012, 177(2): 469-476.
- [10] SUNNA A, GIBBS M D, BERGQUIST P L. Identification of novel  $\beta$ -mannan- and  $\beta$ -glucan-binding modules: evidence for a superfamily of carbohydrate-binding modules[J]. *Biochemistry Journal*, 2001, 356: 791-798.
- [11] BORASTON A B, REVETT T J, BORASTON C M, et al. Structural and thermodynamic dissection of specific mannan recognition by a carbohydrate binding module, TmCBM27[J]. *Structure*, 2003, 11: 665-675.
- [12] TIMMERS L F S M, DUCATI R G, SANCHEZ-QUITIAN Z A, et al. Combining molecular dynamics and docking simulations of the cytidine deaminase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv[J]. *Journal of Molecular Modeling*, 2012, 18(2): 467-479.
- [13] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685.
- [14] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [15] 张慧敏, 李剑芳, 郭敏辰, 等. 耐热木聚糖酶基因在毕赤酵母中的表达及酶学性质[J]. *食品与生物技术学报*, 2013, 32(2): 124-128.
- ZHANG Huimin, LI Jianfang, WU Minchen, et al. Expression of a thermostable xylanase gene in *Pichia pastoris* and its enzymatic characterization[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2013, 32(2): 124-128. (in Chinese)

## 会 议 信 息

会议名称(中文): 第六届全国微生物基因组学学术研讨会

所属学科: 动植物微生物学, 遗传与发育生物学

开始日期: 2016-12-16

结束日期: 2016-12-19

所在城市: 海南省 乐东黎族自治县

具体地点: 乐东县九所镇

主办单位: 中国微生物学会农业微生物专业委员会 中国微生物学会基础微生物专业委员会

承办单位: 海南省微生物学会 中国热带农业科学院热带生物技术研究所 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室

联系人: 吴悦女士 18040555549

联系电话: 027-87287254

E-MAIL: nercmp@mail.hzau.edu.cn

会议网站: <http://csm.im.ac.cn/templates/team/introduction.aspx?nodeid=9&page=ContentPage&contentid=3912>

会议背景介绍: 微生物基因组学已成为当前生物学前沿的研究热点。为了及时交流研究进展, 加强合作, 推广新的研究技术和分析方法, 推动我国在该领域的进步, 由中国微生物学会农业微生物专业委员会和基础微生物专业委员会主办, 海南省微生物学会、中国热带农业科学院热带生物技术研究所和华中农业大学农业微生物学国家重点实验室共同承办的“第六届全国微生物基因组学学术研讨会”将于 2016 年 12 月 16--19 日在海南省乐东县九所镇召开。热忱欢迎全国各地的微生物基因组学及合成微生物学专家、同行参会, 交流学术研究成果。