

绿色木霉 AS3.3711 的葡聚糖内切酶 III 基因的克隆与表达

刘北东, 杨谦*, 周麒, 宋金柱, 陈佃福, 刘恒

(哈尔滨工业大学生命科学与工程系, 哈尔滨 150001)

摘要: 为研究构建可降解纤维类固体废弃物的工程菌, 采用 RT-PCR 方法克隆到绿色木霉 (*Trichoderma viride*) AS3.3711 的葡聚糖内切酶 III (EG III) 的 cDNA 基因, 测序后构建到酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 诱导型表达载体 pYES2 上, 用正交实验对超声波辅助酵母转化系统进行了优化. 转化获得的 EG III 转化子用 2% 的 β -D-半乳糖诱导, 用 Northern 杂交、刚果红染色法和 CMC 糖化力法分别对目的基因的转录和表达产物的葡聚糖内切酶活性进行检测. 结果表明, EG III 的 cDNA 基因开放阅读框长度为 1254bp, 编码 418 个氨基酸, 推测蛋白质分子量为 44.1×10^3 . 正交实验中较优组合为第 5 组 (超声波处理 60s, 温育 40 min, 单链 DNA 150 μ g, 热激 5 min); 刚果红染色显示, 转化子可产生明显的水解圈; CMC 酶活检测显示该基因能在酿酒酵母中表达有生物活性的 EG III 并分泌到胞外, 发酵液中的酶活在培养 60h 达到最高 0.041 U/mL; 最适酶解温度为 50 $^{\circ}$ C; 最适 pH 值为 5.8.

关键词: 绿色木霉; 葡聚糖内切酶 III; 酿酒酵母; 表达

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2004)05-0127-06

Cloning and Expression of the Endo- β -Glucanase III cDNA Gene from *Trichoderma viride* AS3.3711

LIU Bei-dong, YANG Qian, ZHOU Qi, SONG Jin-zhu, CHEN Dian-fu, LIU Heng

(Department of Biotechnology, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China)

Abstract: To study the construction of yeast bioengineering strain which can degrade cellulosic waste, an endo- β -glucanase III (EG III) cDNA gene of *Trichoderma viride* AS3.3711 was isolated with RT-PCR protocol. After sequencing it was constructed on *S. cerevisiae* inducible expression vector pYES2. A $L_9(3^4)$ orthogonal design was used to optimize yeast sonication assistant transformation. The expression of EG III gene was induced by 2% β -D-glucose, the transcription and expression of it was detected by Northern blotting and Congo Red method respectively. The endo- β -glucanase activity was assayed as CMCase activity with CMC-Na as a substrate. The results show that the ORF of EG III was 1254bp, encoding 418aa, deducing molecular weight 44.1×10^3 , group 5 (sonication treat time 60 s, incubate 40 min, SS-DNA 150 μ g, heat shock 5 min) was the optimum one of the orthogonal experiment, and EG III transformants can produced clear hydrolysis halos on the Congo Red-CMC plate. The measure of the enzyme activity show that the expression product can be expressed in active forms and secreted to the medium. The enzyme activity was approached the highest level (0.041 U/mL) when the culture time was 60h. The optimized enzyme reaction temperature was 50 $^{\circ}$ C and the optimized pH was 5.8.

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

纤维类固体废弃物包括农作物秸秆、枯枝落叶、木屑以及城市生活垃圾中的纤维类成分等. 其中的纤维素是自然界中最丰富的有机物, 其潜在的可再生资源 and 清洁能源的价值是解决日益严重的环境问题和能源危机的有效途径之一. 但是由于天然纤维素结构的复杂性和对纤维素酶解转化的分子机理缺乏完整的认识, 使这方面的研究进展缓慢^[1].

绿色木霉 (*T. viride*) 的内切葡聚糖酶包括 EG I、EG II、EG III、EG V 等, 其酶解作用是在纤维素长链内部随机切割迅速降低纤维素结构的完整性, 是纤维素酶系的重要组成部分^[2,3]. EG III 是内切葡聚糖酶的重要成员, 是一种低分子量的 H 族纤维素

酶, 其基因的表达受纤维素的诱导, 而且可以与 CBHI 发生强烈的协同效应, 在降解微结晶纤维素的过程中起重要作用^[4,5].

近年来国内外有许多关于纤维素酶基因及木聚糖酶基因等的克隆与表达的相关研究^[6-13]. Saloheimo M 等 (1988) 克隆得到里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) EG III 基因并测序^[4]; Macarron R 等 (1995) 和 Sandgren M 等 (2001) 对 EG III 分子结构和

收稿日期: 2003-11-07; 修订日期: 2004-02-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 50178021)

作者简介: 刘北东 (1972-), 男, 博士生, 主要研究方向为环境微生物基因工程.

* 联系人

作用机理进行了研究,确定了 EG III分子中的纤维素结合有关的区域和催化区^[14,15]. Okada H 等(1998)克隆了里氏木霉(*T. reesei*) EG III基因的 DNA 和 cDNA 片段,并且研究了其在大肠杆菌(*Escherichia coli*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中的表达,发现大肠杆菌(*E. coli*)表达的 EG III 大部分没有活性,而酿酒酵母(*S. cerevisiae*)产生的 EG III 具有较强的生物活性并且能够分泌到胞外^[10];肖志壮等(2001)在酿酒酵母(*S. cerevisiae*)中表达了里氏木霉(*T. reesei*) EG IIIcDNA 基因,检测了 2 种酵母分泌组分对 EG II 的分泌的影响,并发现 EG III 基因的 5' 端的先导序列中可能存在基因表达的调控序列^[16].

本文采用 RT-PCR 方法克隆得到绿色木霉(*T. viride*) AS3.3711 的主要葡聚糖内切酶 cDNA 基因 EG III,建立并优化了酵母超声波辅助转化体系,将 EG IIIcDNA 基因转入酿酒酵母 H158 菌株中并表达出具有内切葡聚糖酶活性的蛋白质,初步研究了重组 EG III 的特性,为进一步研究 EG II 的纤维素降解机理及构建酿酒酵母工程菌株奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料

(1) 菌株及质粒 绿色木霉(*T. viride*) AS3.3711 购自中国科学院微生物菌种保藏中心;大肠杆菌(*E. coli*) DH5 α 本实验室保存;酿酒酵母大肠杆菌穿梭质粒 pYES2(amp⁺ ura⁺)、酿酒酵母菌株 *S. cerevisiae* H158(his⁻ trp⁻ leu⁻ ura⁻) 为山东大学微生物技术国家重点实验室赠.

(2) 试剂 绿色木霉总 RNA 提取、酵母总 RNA 提取、胶回收、质粒提取试剂盒购自上海华舜生物工程公司;RT-PCR 试剂盒、pMDI8-T 克隆载体、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Ex-Taq DNA 聚合酶、购自大连宝生物工程公司;Northern 杂交的 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 试剂盒购自 Roche Applied Science 公司;其他生化试剂为国产分析纯.

(3) 培养基 LB^[17], YPD, SC-U 酵母尿嘧啶营养缺陷型选择培养基^[18], MENDELS, PDA^[19].

1.2 方法

(1) 绿色木霉的总 RNA 提取 采用上海华舜生物工程公司小量植物叶总 RNA 提取试剂盒,方法参照说明书加以改进.

(2) 引物设计 参照 Saloheimo 等^[4]发表的里

氏木霉(*T. reesei*)纤维素酶基因进行设计.

(3) RT-PCR RT-PCR 采用 TaKaRa 公司的 One Step RNA PCR Kit(AMV)试剂盒,方法参照说明书;反应体系 25 μ L,反应条件 50 $^{\circ}$ C 30 min(逆转录),94 $^{\circ}$ C 2 min(停止逆转录反应、预变性);94 $^{\circ}$ C 30 s(变性),59.2 $^{\circ}$ C 30 s(退火),72 $^{\circ}$ C 2 min(延伸)35 个循环;72 $^{\circ}$ C 7 min,4 $^{\circ}$ C 停止反应.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.

(4) 大肠杆菌基因工程操作和 DNA 测序 大肠杆菌基因工程操作采用常规方法^[17];DNA 测序由上海联众基因研究院进行.

(5) 纤维素酶基因酿酒酵母表达载体构建 将目的基因片段 pMDI8-T 克隆载体上经双酶切,构建到带有高效半乳糖诱导启动子的酿酒酵母表达载体 pYES2 上,命名为 pYES2-EG III.

(6) 超声波辅助 LiAc/ssDNA/PEG 转化法的优化 采用超声波对酵母细胞进行处理,用 LiAc/ssDNA/PEG 转化法,将 pYES2 转化酿酒酵母,对这一转化体系中影响转化效率的 4 个主要因素进行 4 因素 3 水平的 L₉(3⁴) 正交试验,以每个实验组合的转化率(转化子/ μ g 质粒)为评价指标,3 次重复.4 个影响因素及相应的 3 水平如表 1 所示.用优化后的转化方法将 pYES2-EG II 转化酿酒酵母 *S. cerevisiae* H158,酵母转化子检测采用常规方法^[18].

表 1 L₉(3⁴) 正交实验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment design L ₉ (3 ⁴)				
水平	超声波处理	温育时间	SS-DNA 量	热激时间
	时间 A/s	B/min	C/ μ g	D/min
1	50	30	50	5
2	60	40	100	7
3	70	60	150	9

(7) Northern 杂交 酵母总 RNA 提取采用上海华舜生物工程公司酵母总 RNA 提取试剂盒,方法参见试剂盒说明书稍加改进.总 RNA 变性及电泳采用常规方法^[17],Northern 杂交的探针标记与检测方法参照试剂盒说明书.

(8) 刚果红染色 刚果红染色法参照官家发等(1995)的方法^[20].

(9) 转化子的诱导表达及培养时间最适酶解温度和 pH 值测定 将 EG II 转化子接种到含 2% β -D-半乳糖 SC-U 培养基进行诱导 60h,培养液经离心、盐析再用乙酸钠缓冲液溶解后为粗酶液,用 CMC 糖化力法检测内切葡聚糖酶活性,对不同培养时间

的纤维素酶活性以及最适酶解温度和 pH 值进行测定,最适酶解温度的反应条件为:pH5.5,反应温度分别为 30~80℃,6 个梯度;最适 pH 值反应条件为:反应温度 50℃,pH 值分别为 3.8~6.6,8 个梯度.实验设一个用葡萄糖抑制 EG III 基因表达的负对照,3 次重复.以纤维素酶利用相应底物,在实验条件下每 min 产生 1 μmol 葡萄糖为 1 个酶活单位(U).

2 结果

2.1 绿色木霉总 RNA 提取和引物设计

绿色木霉用微晶纤维素为碳源的 Mendels 培养基诱导 4d,过滤收集菌体,用小量植物叶总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,绿色木霉基因的内含子较小,通常小于 100bp, DNA 片段和 cDNA 片段在琼脂糖凝胶电泳上较难分开,除去 RNA 中得痕量 DNA 对于得到正确的 cDNA 片段是非常重要的.为防止 DNA 污染,对 RNA 提取方法进行了改进,将提取到的 RNA 用 Dnase I 37℃处理 30 min,然后再用 RNA 吸附柱纯化一次,这样可以保证得到无 DNA 污染的高质量的绿色木霉总 RNA(图 1 A).

引物设计时在上下游分别加入 EcoRI 和 XbaI 位点,引物如下:

P 7:5'- tgc gaa ttc ccg ttc acc ttg acc tg-3'
R7:5'- cgc tct aga cga gaa cag aca gcc tca-3'

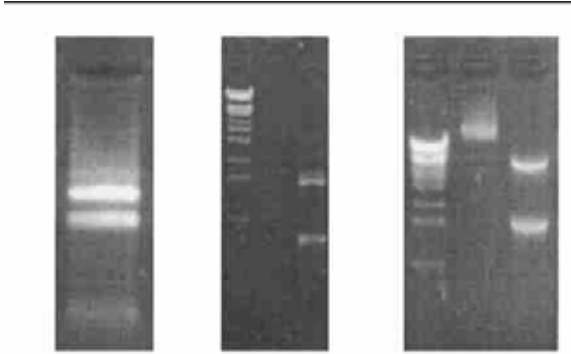
2.2 RT-PCR 及 DNA 测序及序列分析

RT-PCR 反应结果为负对照无带,说明模板 RNA 中无 DNA 污染,扩增得到的片段应为 cDNA 片段;样品得到 1 条与预期大小相符的约 1.5kb 的条带和 1 条较小的非特异条带.回收与预期大小相符的条带(图 1 B),连接到克隆载体 pMD18-T 上,转化大肠杆菌 DH5α,得到阳性克隆经菌落 PCR 和限制性内切酶酶切鉴定后,由上海联众基因研究院进行 DNA 测序.测序结果为,克隆到的绿色木霉 AS3.3711 的 EG III cDNA 基因片段全长为 1450bp,开放阅读框长度为 1254bp,编码 418 个氨基酸,推测的蛋白质分子量为 44.1 × 10³,GENBANK 注册号 AY343987;与参考 DNA 序列的开放读码框(ORF)的同源性为 99.6%,证实了获得的基因的正确性.

2.3 酿酒酵母表达载体的构建

测序正确后,将目的基因片段经 EcoRI 和 XbaI 双酶切,构建酿酒酵母表达载体 pYES2-EG III,转化大肠杆菌,用双酶切方法鉴定,得到大小约为

5.9kb 空质粒和 1.5kb 插入片段的 2 条带(图 1 C),酒酵母表达载体图谱如图 2 所示,保存阳性克隆菌种.



A. 绿色木霉总 RNA; B. RT-PCR (M. Marker λ EcoT14 I digest; —,不加逆转录酶的负对照; 1. EG III cDNA 1466bp); C. pYES2-EG III 酶切鉴定 (M. Marker λ EcoT14 I digest; 2. pYES2-EG III 未酶切质粒; 3. pYES2-EG III EcoRI XbaI 双酶切结果)

图 1 绿色木霉 (*Trichoderma viride* AS 3.3711) 总 RNA、RT-PCR 及 pYES2-EG III 的酶切鉴定结果
Fig.1 Total RNA of *Trichoderma viride* AS 3.3711 and result of RT-PCR and pYES2-EG III double restriction enzyme digestion

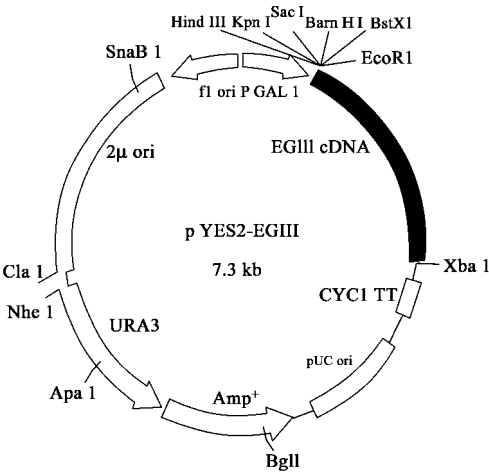


图 2 pYES2-EG III 质粒图谱
Fig.2 Map of pYES2-EG III

2.4 超声波辅助 LiAc/ssDNA/PEG 转化法的优化及转化子的检测

对正交实验分析表明,各因素的最大 k 值分别是:因素 A 的 k₂ = 1400、因素 B 的 k₂ = 1446、因素 C 的 k₃ = 1536、因素 D 的 k₁ = 1535.即第 5 号实验组合(超声波处理 60s、温育处理 40 min、单链 DNA 浓度为 150 μg、热激 5 min)为较优组合.通过对表 8 数据的极差分析,各因素的极差顺序是:RD(852) > RA(699) > RB(587) > RC(583).即各影响因素的主

次顺序是:单链载运 DNA 量 > 热激时间 > 超声波处理时间 > 温育时间;本实验中最主要的影响因素是单链载运 DNA 的量(表 2).用优化后的实验组合将 pYES2-EGⅡ转化酵母,转化后在不含尿嘧啶的 SC-U 酵母尿嘧啶营养缺陷型选择培养基上筛选,对得到的转化子经酵母菌落 PCR 和提质粒、转大肠杆菌后进行酶切鉴定,确定阳性克隆.

表 2 酵母转化 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 2 Result of the orthogonal test $L_9(3^4)$ of yeast transformation					
	A	B	C	D	转化率 ¹⁾
	1	2	3	4	
1	1	1	1	1	644
2	1	2	2	2	876
3	1	3	3	3	920
4	2	1	2	3	923
5	2	2	3	1	2666
6	2	3	1	2	611
7	3	1	3	2	1021
8	3	2	1	3	796
9	3	3	2	1	1294
K1 ²⁾	2440	2588	2051	4604	
K2	4200	4338	3092	2507	
K3	3111	2825	4607	2639	
k1 ³⁾	813	863	684	1535	
k2	1400	1446	1031	836	
k3	1037	942	1536	880	
R ⁴⁾	587	583	852	699	
r ⁵⁾	3	4	1	2	

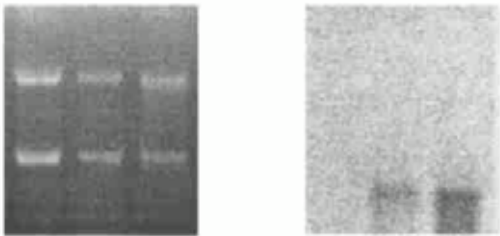
1) 3 次重复平均数 2) A 因素 1 水平的转化率之和 3) A 因素 1 水平的转化率平均数 4) 极差 5) 各影响因素的主次顺序

2.5 Northern 杂交

采用上海华舜生物工程公司小量酵母总 RNA 提取试剂盒提取 EGⅢ酵母转化子总 RNA,将细胞破碎由酶解法改为玻璃珠法.转化子经 2 % 半乳糖诱导 60h, 实验设一个采用 2 % 葡萄糖抑制 EGⅢ基因表达的负对照和微晶纤维素诱导的绿色木霉纤维素酶基因表达的阳性对照.各取约 10 μ g 总 RNA 电泳,用绿色木霉 EGⅢ基因的 cDNA 片段随机标记探针进行杂交,结果为葡萄糖抑制的负对照 RNA 泳道没有杂交信号,在诱导表达酵母 RNA 泳道和阳性对照泳道各杂交得到一条与预期大小相符的 1.5kb 的带(图 3),证实了目的基因在酿酒酵母中的转录.

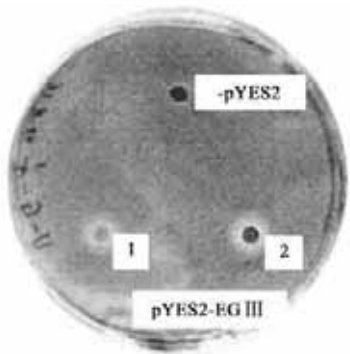
2.6 刚果红染色

pYES2-EGⅢ酵母转化子在 SC-U 平板上经 2 % 的半乳糖诱导 60h,加入含 0.5 % CMC-Na 的上层琼脂,后进行刚果红染色,以含有 pYES2 空质粒的转化子作为阴性对照.由图 4 可见,转化子都可在 SC-U 平板上生长,pYES2-EGⅢ酵母转化子可产生直径约为 1.0 ~ 1.5cm 的清晰的水解圈,而对照则没有产生水解圈.



A. pYES2-EGⅢ酵母转化子总 RNA 和绿色木霉总 RNA
B. Northern 杂交结果 1. 采用葡萄糖抑制的负对照
2. 半乳糖诱导表达的转化子 3. 微晶纤维素诱导的绿色木霉阳性对照

图 3 EGⅢ酵母转化子的 Northern 杂交分析
Fig.3 Northern analysis of EGⅢ transformant



— 空质粒 pYES2 的转化子,阴性对照
1,2. pYES2-EGⅢ转化子
图 4 pYES2-EGⅢ转化子刚果红染色产生的水解圈
Fig.4 Hydrolysis halos produced on Congo Red-CMC plate by pYES2-EGⅢ transformants

2.7 转化子的诱导表达及培养时间最适酶解温度和 pH 值测定

以 CMC-Na 为底物,分别测定了培养 36、48、60、72、84、96、108、120h 的内切葡聚糖酶活性,结果如图 4 所示.在培养 36h 到 60h 酶活迅速升高,在培养 60h 达到最高为 0.041 U/mL,从 60h 到 84h 酶活迅速降低(图 5).确定 60h 为 EGⅢ酶分离提纯、最适温度和 pH 值测定的最佳培养时间.

对酶解温度的研究表明,酵母转化子产生重组 EG II 的最适酶解温度为 50 ℃,温度从 30 ℃到 50 ℃时,相对酶活迅速升高,在 50 ℃时达到最高,随着温度继续提高相对酶活缓慢下降,这一结果与报道过的里氏木霉纤维素酶的最适温度基本一致(图 6)。

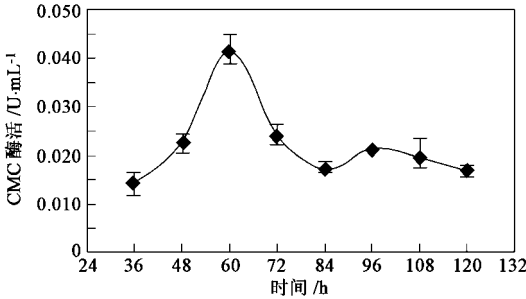


图 5 培养时间对转化子酶活的影响

Fig. 5 Effect of culture time on enzyme activity

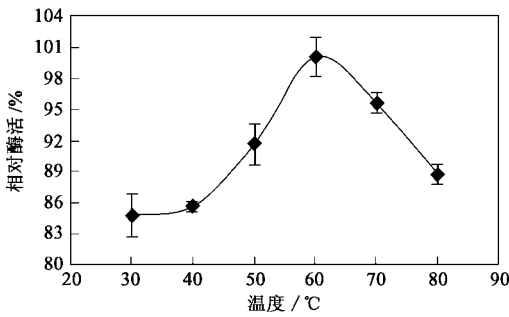


图 6 温度对 EG III 酶活的影响

Fig. 6 Effect of temperature on EG III relative enzyme activity

酵母转化子产生的葡聚糖内切酶 II 的最适酶解反应 pH 值在 5.8 左右,在 pH 值为 3.8 时,相对酶活仅为 63.98 %,在 pH 值达到 6.6 时,相对酶活为 80.95 %,重组酶的最适 pH 值与报道过的里氏木霉纤维素酶的最适 pH 值基本相同(图 7)。

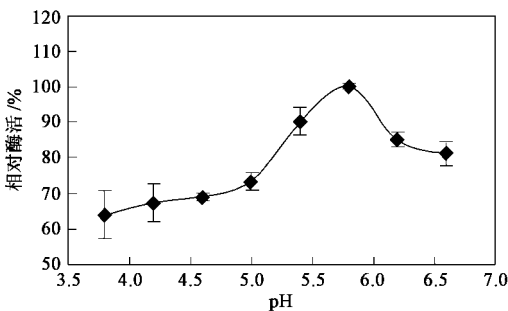


图 7 pH 值对 EG III 酶活的影响

Fig. 7 Effect of pH on EG III enzyme activity

3 讨论

超声波生物作用的机制是十分复杂的,主要是空化作用引起的机械力和热作用,可能导致空泡周围细胞的细胞壁和质膜的击穿或可逆的质膜透性改变,使细胞内外可发生物质交换。丁志山等(1996)研究了超声波对酵母原生质体转化的影响,发现超声波可以显著提高原生质体转化率^[21],但是对于超声波对酵母完整细胞转化的影响并不明确。本实验通过预实验发现超声波处理 50 ~ 70s 时可以显著提高酵母完整细胞 LiAc/ TE/ PEG 转化法的转化率(另文发表),在此基础上对影响转化的主要因素进行了优化,建立了超声波辅助酵母完整细胞转化体系。

通过刚果红染色可以看出,转化子可以产生具有内切葡聚糖酶活性的 EG III,并且绿色木霉 EG III cDNA 基因的前端信号肽可以被酿酒酵母正确识别,将表达产物分泌到细胞外,因此,不需要细胞裂解,就可以在 CMC-Na 平板上产生清晰的水解圈。对照 pYES2 空质粒的转化子由于不含有插入片断,虽然可以在 SC-U 培养基上生长,但是不能产生水解圈。本研究也对转化子的胞内葡聚糖内切酶活性进行了检测,结果没有检测到明显的酶活,进一步说明酿酒酵母能够正确的识别绿色木霉葡聚糖内切酶基因前部的信号肽,表达产物不在胞内积累,从而将绝大部分表达产物分泌到胞外培养液中。

在转化子诱导培养前期重组酶在培养液中逐渐积累,在达到最高点后由于营养物质的消耗和酶活性的丧失,体系中的酶活迅速降低,因此确定最佳的培养时间,对下一步进行重组酶分离纯化工作非常重要。在酶解温度的研究中,重组酶表现出一定的热稳定性,在 80 ℃时也能保持 80 %的葡聚糖内切酶活性,这一点与该酶自身得结构特点和酵母表达体系可以对表达产物进行糖基化修饰有关,对重组酶在工业上的应用是一个有利条件。重组酶的最适酶解温度与 pH 值与报道过的里氏木霉纤维素酶的最适酶解温度和 pH 值基本一致。在偏酸性的范围内重组酶葡聚糖内切酶活性较高,但是在实际应用中常见的中性环境下酶活较低,可以通过研究改变重组酶的分子结构,提高最适 pH 值来尝试解决这一问题。

除了表达产物的分泌外,研究纤维素诱导的高效启动子,进一步提高纤维素酶在酿酒酵母中的表达效率,以及多个纤维素酶基因共转化酵母或带有不同纤维素酶基因的转化子的混合发酵,是构建可

降解转化纤维类固体废弃物的工程菌仍需要进一步研究解决的问题。

致谢:感谢山东大学微生物技术国家重点实验室鲍晓明老师提供酵母菌株及质粒,并对实验过程中有关酵母转化的问题给予指导。

参考文献:

- [1] Lechine S B. Cellulose degradation in anaerobic environments [J]. Annu. Rev. Microbiol. ,1995 , **49** : 399 ~ 426 .
- [2] 杨谦, Kase m Soy tong. 城市生活垃圾中易堆腐物的生物降解初步研究[J]. 环境卫生工程, 2000 , **3**(8) : 111 ~ 113 .
- [3] Haiyin Wang, Richard W jones. Cloning, characterization and functional expression of an endoglucanase-encoding gene from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* [J]. Gene, 1995 , **158** : 125 ~ 128 .
- [4] Saloheimo M, Lehtovaara P, Penttila M, *et al.* EGIII, a new endoglucanase from *Trichoderma reesei*: the characterization of both gene and enzyme[J]. Gene, 1988 , **63** : (1) , 11 ~ 22 .
- [5] LIU Beidong, YANG Qian, ZHOU Qi. Cloning a small Endoglucanase (EG V) Gene from *Trichoderma viride*[A]. In: YANG Qian. Biological Control and Biotechnology [C]. Harbin, Heilongjiang, China: Heilongjiang Science and Technology Press , 2003 . 289 ~ 295 .
- [6] 鲍晓明,高东,王祖农.嗜热细菌木糖异构酶基因 xyl A 在酿酒酵母中的高效表达[J].微生物学报, 1999 , **39**(1) : 49 ~ 54 .
- [7] 肖志壮,吴志红,王婷,等.瑞氏木霉 EGI 3'-UTR 对基因在酿酒酵母中表达的影响[J].微生物学报, 2001 , **41**(5) : 557 ~ 591 .
- [8] 祝令香,于巍,梁改琴,等.康宁木霉 K801 纤维素酶 CBH2 基因的克隆及序列分析[J].菌物系统, 2001 , **20**(2) : 174 ~ 177 .
- [9] Susanne Zeilinger, Robert L Mach, Christian P Kubicek. Two Adjacent Protein Binding Motifs in the CBH2 (CellobiohydrolaseI-encoding) Promoter of the Fungus *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) Cooperate in the Induction by Cellulose [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1998 , **273** (51) : 34463 ~ 34471 .
- [10] Okada H, Kohji T, Tadashi S, *et al.* Molecular characterization and heterologous expression of the gene encoding a low-molecular mass endoglucanase from *Trichoderma reesei* QM9414[J]. Applied and environmental microbiology, 1998 , **64**(2) : 555 ~ 563 .
- [11] Takashima S, Nakamura A, Hidaka M, *et al.* Molecular cloning and expression of the novel fungal β -glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei* [J]. J. Biochem. (Tokyo), 1999 , **125**(4) : 728 ~ 36 .
- [12] Anu Saloheimo, Nina Aro, Marja Ilmén, *et al.* Isolation of the *ace1* Gene Encoding a Cys2-His2 Transcription Factor Involved in REGulation of Activity of the Cellulase Promoter CBH1 of *Trichoderma reesei*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000 , **275**(8) : 5817 ~ 5825 .
- [13] Peter Richard, John Londesbrough, Mikko Putkonen, *et al.* Cloning and expression of a fungal β -Arabinitol 4-Dehydrogenase gene[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001 , **276**(44) : 40631 ~ 40637 .
- [14] Macarron R, Henrissat B, Claeyssens M. Family A cellulases : two essential tryptophan residues in endoglucanase III from *Trichoderma reesei*[J]. Biochim Biophys Acta, 1995 , **1245**(2) : 187 ~ 190 .
- [15] Sandgren M, Shaw A, Ropp TH, *et al.* The X-ray crystal structure of the *Trichoderma reesei* family 12 endoglucanase 3, Cell 2A, at 1.9 Å resolution[J]. J Mol Biol. , 2001 , **308**(2) : 295 ~ 310 .
- [16] 肖志壮,王婷,汪天虹,等.瑞氏木霉内切葡聚糖酶 III 基因的克隆及在酿酒酵母中的表达[J].微生物学报, 2001 , **41**(4) : 391 ~ 396 .
- [17] Joesph Sambrook, David W Russell. Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 3rd ed [M]. Cold Spring Harbor , New York , USA: Cold Spring Harbor Press, 2001 .
- [18] Alison Adams, Daniel E Gottschling, Chris A. Kaiser , *et al.* METHODS IN YEAST GENETICS: A Cold Spring Harbor Course Manual [M]. Cold Spring Harbor , New York , USA: Cold Spring Harbor Press, 1998 .
- [19] JPH van Wyk M Mohulatsi . Biodegradation of wastepaper by cellulase from *Trichoderma viride*[J]. Bioresource Technology, 2003 , **86** : 21 ~ 23 .
- [20] 官家发,范成英,吴怡庆,等.耐热芽孢杆菌 E2 菌株纤维素酶基因克隆的研究[J].遗传学报, 1995 , **22**(4) : 322 ~ 328 .
- [21] 志山,沃兴德.超声波法转化酵母原生质体[J].生物技术, 1996 , **6**(4) : 41 ~ 43 .