

## 绿色木霉 EG III 基因的克隆及其 在工业酿酒酵母中的整合表达\*

刘泽寰, 台艳, 唐根云, 全艳彩, 王峻梅, 肖文娟, 龚映雪  
(暨南大学生命与健康工程研究院分子生物研究中心, 广东 广州 510632)

**摘要:** 通过 RT-PCR 从绿色木霉 AS3.3711 中克隆得到 EG III 基因, 序列分析显示该基因编码序列全长为 1 257 bp, 编码 418 个 aa, 且自身带有 21 个 aa 的信号肽序列, 与里氏木霉 *eg3* 的同源性为 99.6%。将该基因连入酿酒酵母多拷贝整合型表达载体 pScIKP 中获得重组质粒, 线性化后电转化酿酒酵母工业菌株 AS2.489, 通过 SDS-PAGE 蛋白电泳、刚果红染色和酶活测定对转化子进行了分析。结果表明: 转化子有明显的重组 EG III 表达带, 能够产生 CMC 水解圈, 说明 *eg3* 基因已在酿酒酵母中获得了正确的分泌表达, 表达 EG III 的重组菌产酶高峰出现时间为 60 h, 最高酶活接近 120 U/mL, 重组酶 EG III 的最适温度为 60 °C, 最适 pH 为 6.0, 转化子的遗传稳定性达到 99.17%, 实现了绿色木霉 *eg3* 基因在工业酿酒酵母中的稳定高效表达。

**关键词:** 内切葡聚糖酶 III; 酿酒酵母; 绿色木霉; 整合表达

中图分类号: Q939.97 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579(2009)06-0083-06

### Cloning and Intergration Expression of Endo- $\beta$ -glucanase III Gene from *Trichoderma viride* in *Saccharomyces cerevisiae*

LIU Zehuan, TAI Yan, TANG Genyun, QUAN Yancai,  
WANG Junmei, XIAO Wenjuan, GONG Yingxue

(Research Center for Molecular Biology, Institutes of Life and  
Health Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** The endo- $\beta$ -glucanase III gene (*eg3*) was obtained from the total RNA of *Trichoderma viride* AS3.3711 by RT-PCR. Sequence analysis indicated that this *eg3* gene was composed of 1 257 nucleotides, coding for 418 amino acid residues, and had its own signal peptide. The sequence homologies between this gene with *Trichoderma Reesei eg3* were 99.6%. Then it was cloned into the high-copy integrative expression vector pScIKP, generating a recombinant plasmid named pScIKP-*eg3*, which was then transformed by electroporation into *Saccharomyces cerevisiae* AS2.489 after linearization. Transformants were detected by SDS-PAGE analysis, Congo Red method and enzyme activity assay. The results showed that transformants could secrete recombinant EG III and produced hydrolysis halos on the Congo-Red-CMC plate, indicating that this *eg3* gene was correctly expressed in *S. cerevisiae*. The highest enzyme activity of recombinant EG III reached 120 U/mL after 60 h cultivation, and the optimum temperature and pH were 60 °C and 6.0 respectively. The genetic stability of transformants achieved 99.17% after 50 generations in nonselective medium. In conclusion, the *eg3* gene of *T. viride* could be expressed in industrial yeast strain stably and efficiently.

**Key words:** endo- $\beta$ -glucanase III; *Saccharomyces cerevisiae*; *Trichoderma viride*; integrative expression

\* 收稿日期: 2009-02-07

基金项目: 新世纪优秀人才支持计划资助项目 (NCET-05-0745); 广东省科技计划资助项目 (2005B10401015); 珠海市科技攻关资助项目 (PC20071080)

作者简介: 刘泽寰 (1972年生), 男, 博士, 副教授; E-mail: zhliu@jnu.edu.cn

纤维素是自然界中存在最广泛的碳水化合物,也是地球上数量最大且廉价的可再生资源,其开发利用一直是关注热点。但由于纤维素具有水不溶性的高结晶构造,要把它降解为可利用的葡萄糖相当困难,到目前为止仍没有找到高效、简便、低成本的方法<sup>[1]</sup>。目前,纤维素降解常用的方法主要有两类:酸水解和酶水解。酸水解虽然效率较高,但同样能耗高、污染大;而利用纤维素酶水解纤维素虽然成本高、效率低,但胜在污染小,可持续发展的前景好。因此,针对纤维素酶的研究越发显得急迫而重要。纤维素酶是指能够水解纤维素的 $\beta$ -1,4-糖苷键,使纤维素降解为纤维寡糖、纤维二糖和葡萄糖的一组酶的总称。通常由作用方式不同的3类酶组成<sup>[2]</sup>:①内切葡聚糖酶(endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase, EC3.2.1.4,简称EG);②外切葡聚糖酶(exo-1,4- $\beta$ -D-glucanase, EC3.2.1.91,简称CBH);③ $\beta$ -葡萄糖苷酶( $\beta$ -glucosidase, EC3.2.1.21,简称BG)。

在纤维素酶系中,EG是最主要的成分,它首先作用于纤维素长链,随机水解纤维素分子内部的 $\beta$ -1,4-糖苷键,将纤维素长链打断,能迅速降低纤维素结构的完整性,对整个纤维素的降解起到至关重要的作用<sup>[3]</sup>。同时,它还可以与CBH发生强烈的协同效应,在降解结晶纤维素的过程中起重要作用<sup>[4]</sup>。而绿色木霉是高效的纤维素酶产生菌之一,常被用作工业纤维素酶制剂的生产菌,有关其EG的研究对于纤维素酶的开发应用具有比较重要的意义。

本研究拟采用RT-PCR的方法从绿色木霉 *Trichoderma viride* AS3.3711 中克隆出EG III的编码序列,利用酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 整合型表达载体 pScIKP 将其整合到工业用酿酒酵母的染色体上并使之高效分泌表达,以期研究重组酵母和重组酶EG III的生长和酶活特性,为进一步在酿酒酵母中同时表达整个纤维素酶系基因,以便早日实现重组酿酒酵母直接利用纤维素合成乙醇的目标打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及质粒

绿色木霉 AS3.3711 购自广东微生物所菌种保藏中心;大肠杆菌 JM109 为本实验室保存;酿酒酵母工业菌株 AS2.489 购自中科院微生物所菌种保藏中心;pGEM-T Easy 克隆载体购自 Promega 公司;多拷贝整合型表达载体 pScIKP (含 C418 抗性

基因,酿酒酵母 PGK 启动子和 PGK 终止子,以酿酒酵母基因组中的 rDNA 重复序列作为外源基因的整合位点)由本实验室自行构建<sup>[5]</sup>。

### 1.2 酶和试剂

各种限制性内切酶、DNase I (RNase Free)、T4 DNA 连接酶和胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司, RNA 提取试剂 TRIzol<sup>®</sup> Reagent 购自 Invitrogen 公司,反转录用的 ReverTra Ace- $\alpha$ - 试剂盒购自 TOYOBO 公司,PCR 产物纯化试剂盒购自上海申能博彩,质粒提取试剂盒购自 Omega 公司,DL2000 Marker 和 DL3000 Marker 购自东胜创新生物科技有限公司,少量酵母菌基因组 DNA 提取试剂盒购自上海华舜生物工程公司,GoldView<sup>™</sup> 核酸染料购自赛百胜基因技术有限公司,PCR 引物合成及序列测定由 Invitrogen 公司完成,其余试剂均为国产、进口分析纯。

### 1.3 培养基

LB 培养基用于大肠杆菌培养,马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)和 Mendels 培养基用于绿色木霉的培养和纤维素酶表达的诱导<sup>[6-8]</sup>,YPD 用于酿酒酵母的培养<sup>[6]</sup>,YPDA 固体培养基则在 YPD 中加入  $w = 1.5\%$  琼脂,含有 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 的 YPD 培养基用于酵母转化子筛选,添加  $w = 0.5\%$  羧甲基纤维素(CMC)的 YPD 培养基用于鉴定转化子。

### 1.4 绿色木霉 cDNA 的合成

参照 Invitrogen 公司的 TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Cat. No. 15596-018) 说明书进行操作,提取绿色木霉 AS3.3711 的总 RNA,对提取的总 RNA 用 DNase I 进行处理,然后参照 TOYOBO 公司的 ReverTra Ace- $\alpha$ - 试剂盒说明书进行反转录,以 Olio (dT) 为引物反转录得到绿色木霉的 cDNA。

### 1.5 常规基因克隆操作方法

外源基因片段与载体的连接,大肠杆菌感受态的制备及转化方法, DNA 凝胶电泳和 SDS-PAGE 电泳等操作及相关试剂配制参考《分子克隆实验指南》<sup>[6]</sup>,其他分子生物学常规操作按各公司说明书进行。

### 1.6 *eg3* 基因的克隆

参考里氏木霉 *Trichoderma reesei* *eg3* 基因的编码序列,GenBank 的登陆号为 M19373<sup>[4]</sup>,利用引物设计软件 oligo6 设计 *eg3* 扩增引物:上游引物 eu: 5'-CGGGATCCATGAACAAGTCCGTGGCTCCAT-3',下游引物 el: 5'-GGACTAGTCTACTTTCTT-GCCGAGACACGAG-3',分别引入 *Bam*H I 和 *Spe* I 酶切位点(见下划线部分)用于连入表达载体

pScIKP。以绿色木霉 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,循环条件为:95 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 70 s,28 个循环;72 ℃ 10 min。将 PCR 产物进行纯化回收,与 pGEM-T Easy Vector 连接,转化 *E. coli* JM109,把经菌落 PCR 和酶切鉴定筛选出阳性克隆进行测序鉴定。

### 1.7 重组质粒的构建

将 *eg3* 基因片段用 *Bam*H I 和 *Spe* I 从 pGEM-T Easy 载体上双酶切切下,与采用同样双酶切过的 pScIKP 用 T4 DNA 连接酶连接,构建重组质粒。

### 1.8 酿酒酵母 AS2.489 对 G418 敏感性测定

将少量过夜培养的酿酒酵母 AS2.489 适当稀释后,涂布于含有不同质量浓度 G418 的 YPD 平板上,G418 质量浓度分别为:50,100,150,200,250 μg/mL,30 ℃ 培养 3~4 d,观察生长情况。

### 1.9 酿酒酵母的电转化

酿酒酵母的电转化参考 Thompson 等<sup>[9]</sup>的方法,将 30 ℃ 活化培养 14~16 h 的酿酒酵母 AS2.489 ( $A_{600}$  介于 1.2~1.5 之间)制备成感受态;用限制性内切酶 *Apa* I 将重组质粒线性化,1500 V 电击转化感受态菌;然后涂布于含 200 μg/mL G418 的 YPD 平板以筛选转化子,30 ℃ 培养 2~3 d 后挑取单克隆转化子到 5 mL YPD 中,30 ℃ 培养 24 h,提取基因组,用 *eg3* 的上下游扩增引物扩增目的基因,鉴定阳性转化子。

### 1.10 SDS-PAGE 蛋白电泳

将用 G418 抗性筛选出来的转化子和宿主酵母 AS2.489 按 1% 接种量分别用 3 mL YPD 培养 60 h 后,离心分别取 2 mL 上清用三氯乙酸-丙酮浓缩法<sup>[6]</sup>浓缩后上样跑 SDS-PAGE 蛋白电泳。

### 1.11 转化子的酶活测定

1.11.1 定性分析 采用刚果红染色法<sup>[10]</sup>,将 G418 抗性平板上生长的转化子点种在含 0.5% CMC 的 YPD 平板上,30 ℃ 培养 3 d 后,将菌落刮掉,用  $w = 0.1\%$  的刚果红染色 1 h,再用 1 mol/L NaCl 脱色 40 min,产生透明水解圈的为阳性转化子。

1.11.2 定量测定 取 0.5 mL 阳性转化子的培养液上清,加入 0.5 mL  $w = 1\%$  CMC 溶液(溶于 0.05 mol/L 柠檬酸-0.1 mol/L 磷酸氢二钠缓冲液,pH 5.0),50 ℃ 保温 30 min,用 DNS 法测定生成的还原糖<sup>[11]</sup>。另取沸水浴 15 min 灭活的转化子培养液上清以同样步骤操作后作为空白对照。定义在 50 ℃,pH 5.0 时产生 1 μg/min 分子葡萄糖的酶量为一个酶活力单位 U。

### 1.12 转化子的遗传稳定性测定<sup>[12]</sup>

将酵母转化子以相同的起始接种量接种到 2 mL YPD 培养液中即为 0 世代菌。在 30 ℃ 摇床培养 24 h 后即为 10 世代菌。取 2 μL 10 世代菌接入 2 mL YPD 培养液中,在 30 ℃ 摇床培养 24 h 后即为 20 世代菌。以此类推,连续培养 50 世代。从 0 世代起,每隔 10 世代取少量菌液,经适当稀释后,涂布于 YPD 平板上,培养 24 h 后,把板上的菌落挑到含 G418 的 YPD 固体平板上,培养 3 d,观察菌落数,按下列公式计算质粒的遗传稳定性:

$$\text{质粒 } n \text{ 世代稳定性} = \frac{\frac{M_n}{M'_n}}{\frac{M_0}{M'_0}}$$

式中, $M_n$  为  $n$  世代含 G418 的 YPD 平板上生长菌落数; $M'_n$  为  $n$  世代 YPD 平板上生长菌落数; $M_0$  为 0 世代含 G418 的 YPD 平板上生长菌落数; $M'_0$  为 0 世代 YPD 平板上生长菌落数。

## 2 结果与讨论

### 2.1 绿色木霉 AS3.3711 cDNA 的获取

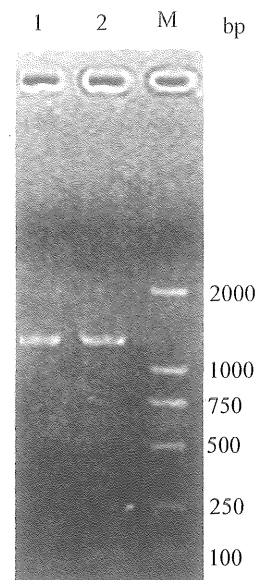


图1 绿色木霉 *eg3* 基因 PCR 扩增产物电泳结果

Fig.1 The PCR result of *T. reesei* *eg3* gene

M: Marker DL2000;

1, 2: 长度为 1 257 bp 的 *eg3* 扩增片段

绿色木霉用微晶纤维素为碳源的 Mendels 培养基诱导培养 4 d,过滤收集菌体,用 TRIzol 法提取总 RNA 并进行电泳分析,结果可以看到清晰的 18S 和 28S 条带,表明所提总 RNA 完整性很好,

无明显降解, 可用来进行反转录。对提取的总 RNA 用 DNase I 进行处理, 消除了痕量的基因组 DNA 污染, 然后通过反转录得到了绿色木霉的 cDNA。

## 2.2 *eg3* 基因的克隆及序列分析

以绿色木霉 cDNA 为模板, 用上下游引物 eu 和 el 进行 PCR 扩增, 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 1, 证明目的基因已被成功扩增。随后将扩增片段接入 pGEM-T Easy Vector, 转化大肠杆菌 JM109 并挑取阳性克隆进行测序 (数据未列出), 发现克隆到的 *eg3* 编码序列全长为 1 257 bp, 编码 418 个氨基酸残基 (aa), 与参考序列里氏木霉 *eg3* 基因的同源性为 99.6%, 证实了获得基因的正确性。利用 SignalP 3.0 在线信号肽预测软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 对 *eg3* 的编码序列进行信号肽预测, 发现 *eg3* 基因自身具有信号肽序列, 最大可能的信号肽剪切位点位于编码序列的第 21 和 22 个氨基酸残基之间, 这与 Saloheimo 等<sup>[4]</sup>报道的里氏木霉 *eg3* 基因的信号肽序列长度一致, 均为 21 个氨基酸残基, 但在第 20 位氨基酸残基存在一个 Val/Ala 的差异。

## 2.3 表达载体的构建及电转化

用 *Bam*H I 和 *Spe* I 从 pGEM-T Easy 载体上把 *eg3* 的编码序列双酶切下, 连接到用同样双酶切过的 pScIKP 载体上, 构建成重组表达质粒 pScIKP-*eg3*, 经测序证明 *eg3* 与载体的连接完全正确 (数据未列出)。

将 pScIKP-*eg3* 电转入宿主酿酒酵母 AS2.489 中, 通过 G418 抗性筛选出了阳性转化子, 转化子经 PCR 扩增产进一步证明 *eg3* 基因已经成功导入酵母 (数据未列出)。由于预先测试了宿主酿酒酵母 AS2.489 对不同质量浓度 G418 的耐受, 发现酵母在 G418 质量浓度为 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 YPD 板上的生长已经被完全抑制, 故使用 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 G418 质量浓度来筛选阳性转化子以降低假阳性转化子产生的机率。

## 2.4 SDS-PAGE 蛋白电泳鉴定

将经过验证的阳性转化子用 YPD 培养 60 h 后, 分别取重组酵母与宿主酵母上清液进行 SDS-PAGE 电泳 (图 2), 重组酵母大约在 48 000 处有较明显的蛋白带出现, 与预期的 EG III 酶蛋白相对分子质量大小相符, 进一步证明 *eg3* 基因已经整合入酿酒酵母基因组中并且获得了正确的分泌表达, 且表达量较高。这可能是因为采用的表达载体 PScIKP 带有组成型强启动子 PGK<sup>[5]</sup>, 能够高效稳定地表达外源基因, 同时绿色木霉 *eg3* 基因自

身携带的信号肽也能被酿酒酵母很好地识别, 将外源蛋白高效地分泌到胞外。

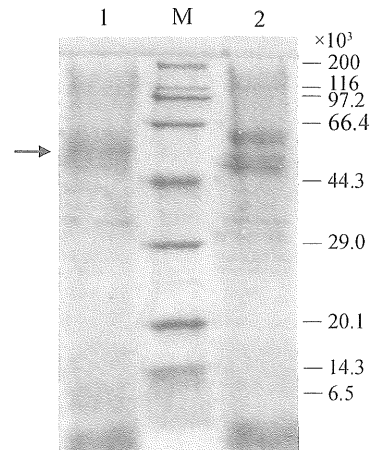


图 2 重组酵母和宿主酵母培养上清的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of culture supernatant of the recombinant and host *S. cerevisiae*

M: 标准相对分子质量参照;  
1: 重组酵母的培养上清;  
2: 宿主酵母的培养上清;  
箭头: 重组 EG III 酶

## 2.5 刚果红染色鉴定:

从 G418 抗性板上随机挑取了多个生长良好的菌落到含有  $w = 0.5\%$  CMC 的 YPD 平板上, 静置于 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 3 d 后, 进行刚果红染色, 结果如图 3, 其中 98.2% 的菌形成了水解圈, 平均直径约 1.5 cm, 证明转化子分泌的重组 EG III 酶具有较高的酶活, 能对培养基中的 CMC 发生明显的水解作用。

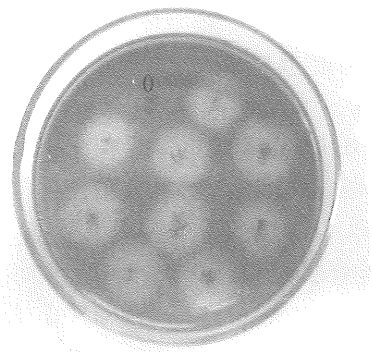


图 3 经刚果红染色形成的重组酵母转化子 CMC 水解圈

Fig. 3 Hydrolysis halos produced on Congo-Red-CMC plate by recombinant transformants

0: 宿主酿酒酵母 AS2.489; 其余为重组酵母转化子

## 2.6 重组酵母的产酶特性和重组EG III的酶活检测

2.6.1 重组酵母的最佳培养时间和产酶特性 挑取刚果红染色实验中形成最大水解圈的第17号菌株(AS2.489-eg3-17)到2 mL YPD 液体培养基中,30 °C,200 r/min 培养12 h后,按1%接种量接种到50 mL YPD 中,30 °C,200 r/min 培养。此后,每隔12 h 取样,测定 $A_{600}$ 和酶活。结果如图4表明:重组菌到60 h 时开始进入生长稳定期,同样重组菌产酶高峰也出现在60 h 左右,重组EG III 酶的CMC 酶活力最高接近120 U/mL。这一结果远高于其他利用酿酒酵母表达系统表达内切葡聚糖酶的同类研究<sup>[13-15]</sup>。这可能与采用的表达载体有关,PScIKP 由于采用了酿酒酵母基因组中的rDNA 重复序列作为外源基因的整合位点,这种rDNA 重复序列在酿酒酵母基因组中有100~200个拷贝<sup>[5]</sup>,因此能实现外源基因的高效表达。

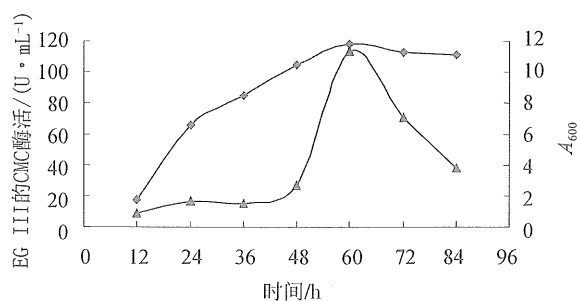


图4 重组酵母的生长曲线和产酶时间曲线

Fig. 4 The growth curve and the time course of enzyme activity of transformant

▲: 重组酵母的生长曲线;  
◆: 重组酵母的产酶时间曲线

2.6.2 重组酶EG III 最适反应温度和pH 挑取酿酒酵母AS2.489-eg3-17转化株,培养60 h 时取上清酶液,在不同温度和不同pH 下测定酶活。结果见图5和图6,表明:重组酿酒酵母转化子产生的EG III 最适酶解温度为60 °C,最适酶解pH 为6.0。此结果与文献报道的里氏木霉<sup>[4,13]</sup>和绿色木霉<sup>[14-15]</sup>的EG III 相近,只是最适pH 为上述EG III 中最高的,接近中性。

## 2.7 重组酵母转化株的遗传稳定性测定

挑取重组酵母转化株接种到YPD 液体培养基中连续培养50代后,仍有99.17% 菌能在含有G418的YPD 平板上生长,结果如图7。说明在无选择压力下,重组质粒pScIKP-eg3 在酵母基因组上

整合表达的遗传稳定性很好。推测是因为采用了整合表达的缘故,目的基因整合到了宿主基因组上不容易丢失,这对于工业微生物生产应用方面具有重要意义。

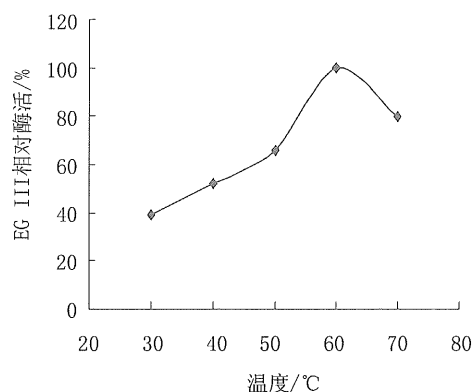


图5 温度对EG III 重组酶活性的影响

Fig. 5 Effect of temperature on the activity of recombinant EG III

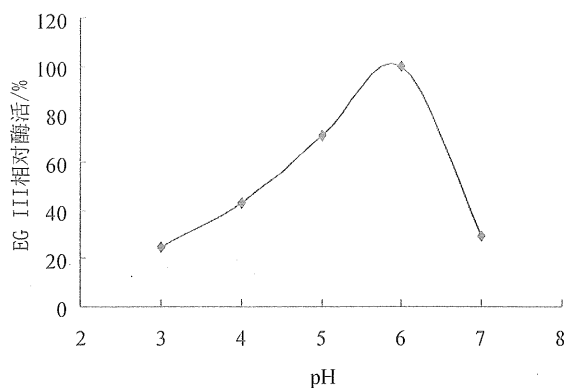


图6 pH 对EG III 重组酶活性的影响

Fig. 6 Effect of pH on the activity of recombinant EG III

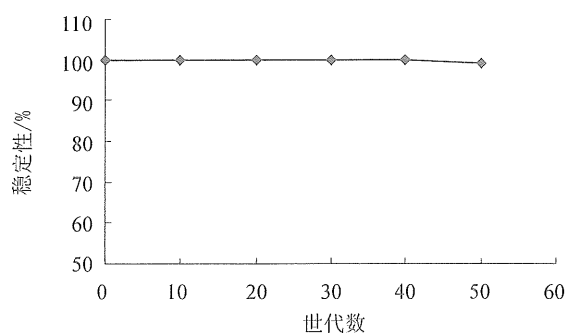


图7 转化子遗传稳定性测定

Fig. 7 Genetic stability of transformant

### 3 结 论

纤维素酶基因在酵母中的表达是纤维素代谢工程的一个重要研究方向。酿酒酵母具有将葡萄糖转化为酒精的能力,但其缺乏有效转化纤维素生成葡萄糖的酶,因此在自然条件下酿酒酵母不能直接利用纤维素类物质发酵产生乙醇。若能将整个纤维素酶系的基因同时导入酿酒酵母中,使得酿酒酵母具有高效率的纤维素降解能力,便可以实现梦寐以求的纤维素直接发酵生产乙醇的工艺。本研究在这方面做了初步的尝试,使得重组酿酒酵母获得了较高的纤维素分解能力,为进一步的研究打下了良好的基础。

#### 参考文献:

- [1] 马文漪,杨柳燕,程树培. 废物乙醇化处理进展[J]. 环境科学进展, 1994, 2(3): 58-64.  
MA Wenyi, YANG Liuyan, CHEN Xupie. Progress in fermentation of wastes into ethanol[J]. Advances in Environmental Science, 1994, 2(3): 58-64.
- [2] HAN S J, YOO Y J, KANG H S. Characterization of a bifunctional cellulase and its structural gene. The cell gene of *Bacillus* sp. D04 has exo- and endoglucanase activity[J]. Biol Chem, 1995, 270(43): 26012-26019.
- [3] LYND L R, WEIMER P J, van ZYL W H, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2002, 66(3): 506-577.
- [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] 刘泽寰,台艳,肖文娟,等. 一种酿酒酵母多基因表达载体及其构建方法与应用: 中国, CN101319225 [P]. 2008-12-10.  
LIU Zehuan, TAI Yan, XIAO Wenjuan, et al. Construction and application of a *Saccharomyces cerevisiae* multi-genic expression vector: China, CN101319225 [P]. 2008-12-10.
- [6] 萨姆布鲁克,拉塞尔. 分子克隆实验指南(上、下册) [M]. 黄培堂等,译. 3版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [7] 赵斌,何绍红. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 251.
- [8] van WYK J P, MOHULATSI M. Biodegradation of waste-paper by cellulase from *Trichoderma viride*[J]. Bioresour Technol, 2003, 86(1): 21-23.
- [9] THOMPSON J R, REGISTER E, CUROTTO J, et al. An improved protocol for the preparation of yeast cells for transformation by electroporation [J]. Yeast, 1998, 14(6): 565-571.
- [10] 官家发,范成英,吴怡庆. 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.  
GUAN Jiafa, FAN Chengying, WU Yiqing, et al. Molecular cloning of cellulase gene from the *Bacillus* sp, strain E2 [J]. Journal of Genetics and Genomics, 1995, 22(4): 322-328.
- [11] 张树政. 酶制剂工业[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 608.
- [12] 霍克克,虞兰兰,陈新杰,等. 酵母高稳定载体的构建及人- $\alpha$ A 干扰素在酵母中的高表达和分泌[J]. 中国科学, 1992, 9: 922-929.  
HUO Keke, YU Lanlan, CHEN Xinjie, et al. A Stable Vector for High-Level Expression and Secretion of Human Interferon  $\alpha$ A in Yeast [J]. Science in China: Ser. B, 1992, 9: 922-929.
- [13] 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.  
XIAO Zhizhuang, WANG Ting, WANG Tianhong, et al. Cloning and expression of *Trichoderma reesei* endoglucanase III (EG III) gene in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2001, 41(4): 391-396.
- [14] 刘北东,杨谦,周麒,等. 绿色木霉 AS3\_3711 的葡聚糖内切酶 III 基因的克隆与表达[J]. 环境科学, 2004, 25(5): 127-132.  
LIU Beidong, YANG Qian, ZHOU Qi, et al. Cloning and Expression of the Endo- $\beta$ -Glucanase III cDNA Gene from *Trichoderma viride* AS3. 3711 [J]. Environmental Science, 2004, 25(5): 127-132.
- [15] 王利英,刘一,杨登峰,等. 绿色木霉葡聚糖内切酶 cDNA 基因的克隆及其在酿酒酵母中的表达[J]. 广西科学, 2007, 14(3): 315-319.  
WANG Liying, LIU Yi, YANG Dengfeng, et al. Cloning of the Endoglucanase cDNA Genes from *Trichoderma viride* and Their Expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Guangxi Sciences, 2007, 14(3): 315-319.