

一种灰盖鬼伞外切 β -1,3葡聚糖酶基因的克隆与表达

王 军, 康利琴, 刘中华, 袁 生

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省微生物与微生物功能基因组学重点实验室,
江苏省微生物资源产业化工程技术研究中心, 江苏 南京 210023)

[摘要] 为了简单快速地获取大量的 β -1,3葡聚糖酶以研究其在真菌形态发生过程中所发挥的作用,本研究以灰盖鬼伞的cDNA为模板克隆了一种编码外切 β -1,3葡聚糖酶的基因,并将该基因插入表达质粒pET28A(+)中,获得了重组表达质粒pET28A(+)-*exg*,转化到*E. coli Rosetta*菌株中并进行异源重组表达。结果显示,克隆基因的cDNA全长2 415 bp,共编码786个氨基酸;SDS-PAGE电泳表明该基因在*E. coli Rosetta*菌株中得到了高效表达,重组表达的酶蛋白表观分子量为85 kDa;纯化后获得的表达酶经DNS法测得比活力为45 U/mg。酶学性质测定结果表明,该酶具有 β -1,3葡聚糖外切酶活性,以昆布多糖为底物时,最适反应条件为pH 6.0、温度60℃,且有一定的耐热能力和较好的pH稳定性,具有较好的应用前景。

[关键词] 外切 β -1,3葡聚糖酶,基因克隆,异源表达,生化特性,灰盖鬼伞

[中图分类号] Q786 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2016)03-0096-06

Cloning and Expression of an Exo- β -1,3 glucanase Gene from *Coprinopsis cinerea*

Wang Jun, Kang Liqin, Liu Zhonghua, Yuan Sheng

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Key Laboratory for Microbes and Microbial Functional Genomics,
Jiangsu Engineering and Technology Research Center for Industrialization of Microbial Resources, Nanjing 210023, China)

Abstract: To acquire enough β -1,3 glucanase for investigating its role in morphological changes of fungus, an exo- β -1,3 glucanase gene (*exg*) was cloned from cDNA of *Coprinopsis cinerea* okayama 7#130 and inserted into plasmid pET28A(+) to generate the recombinant expression plasmid pET28A(+)-*exg*. pET28A(+)-*exg* was transformed into *Escherichia coli* Rosetta strain for heterologous expression. The result showed that the length of *exg* gene is 2 415 bp, which encodes 786 amino acids. SDS-PAGE analysis showed that the exo- β -1,3 glucanase was effectively expressed in *E. coli* Rosetta with an apparent molecular masses of 85 kDa. The specific enzyme activity was 45 U/mg after purification. Characterization of the recombinant enzyme showed that it had an exo-hydrolases activity and the optimum pH value was 6.0, and the optimum reaction temperature was at 60℃ when laminarin as substrate. Besides, the thermostability and pH stability give it some prospect in the future.

Key words: exo- β -1,3 glucanase, gene cloning, heterologous expression, biochemical characterization, *Coprinopsis cinerea*

β -1,3葡聚糖酶按照其反应性质可分为外切酶和内切酶两种^[1],外切 β -1,3葡聚糖酶可以从 β -1,3葡聚糖的非还原端逐步断裂 β -1,3糖苷键,生成水解产物葡萄糖^[2-4],而内切 β -1,3葡聚糖酶则随意断裂 β -1,3葡聚糖中的 β -1,3糖苷键,生成聚合度较小的寡糖^[5]。对真菌类生物而言,尽管会因为种属的不同而存在某些差异,但它们的细胞壁却拥有共同的结构核心,就是由带有 β -1,6分枝的 β -1,3葡聚糖与几

收稿日期:2015-09-08。

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31170028)、江苏省自然科学基金青年基金(BK20140918)、江苏省高校自然科学研究项目(14KJB180013)。

通讯联系人:袁生,教授,博士生导师,研究方向:微生物生长代谢调控和酶工程研究。E-mail:yuansheng@njnu.edu.cn

丁质交联形成的复合物^[6-7]. 在真菌生物细胞发育过程中,细胞壁的形态和结构会随着细胞的生长或分裂而发生相应的变化^[8]. 因此,对细胞壁的核心结构组分 β -1,3 葡聚糖有主要水解和修饰作用的 β -1,3 葡聚糖酶在其中就发挥着尤为重要的作用^[9-11],主要表现为与几丁质酶一起完成真菌细胞壁的自水解以及细胞壁形态和组成成分的重构等重要的生理过程^[12-15].

本课题组在前期的实验过程中,以模式真菌灰盖鬼伞成熟子实体的伞盖为材料,通过一系列的色谱层析方法,成功地分离纯化出 3 种 β -1,3 葡聚糖酶^[16]. 但由于分离纯化过程周期较长,且纯化过程较为复杂,获得的酶量难以满足后期实验的大规模需求. 本研究就是以其中的一种具有外切活性的外切 β -1,3 葡聚糖酶为对象,使其与组氨酸标签相融合,重组到表达质粒 pET28A(+)中,并在 *E.coli* Rosetta 菌株细胞中进行表达,以期高效快速地获取大量纯化的外切 β -1,3 葡聚糖酶.

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒和培养条件

灰盖鬼伞(*Coprinopsis cinerea* okayama 7#130)(ATCC)用于克隆外切 β -1,3 葡聚糖酶基因,菌种从保藏的斜面转移至 PDYA 平板(去皮土豆片 300 g,加适量双蒸水煮沸,用纱布过滤,滤液中加入葡萄糖 20 g,酵母提取物 5 g,琼脂粉 15 g,以 5 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0,加水补足至 1000 mL,115 °C 灭菌 20 min 后,倒平板备用),于 37 °C 黑暗环境中静置培养,待菌丝长满整个平板后,将平板揭盖罩上玻璃罩置于 28 °C,12 h 光照,12 h 黑暗的培养箱中生长子实体. 质粒 pET28A(+)(Novagen)用作表达载体,大肠杆菌 DH5 α (Novagen)用作基因克隆的宿主菌,在含 50 mg/L Kana-50 的 LB 平板(1 000 mL 中含酵母粉 5 g,蛋白胨 10 g,NaCl 10 g,琼脂粉 15 g,以 5 mol/L 的 NaOH 调 pH 至 7.0,115 °C 灭菌 20 min 后倒平板备用)上进行筛选. 大肠杆菌 Rosetta(Invitrogen)用作基因表达的宿主菌,在含 50 mg/L Kana-50 和 34 mg/L Chloromycetin 的 LB 平板上进行筛选. 最后构建成功的重组菌在含 50 mg/L Kana-50 和 34 mg/L Chloromycetin 的 LB 液体培养基(1000 mL 中含酵母粉 5 g,蛋白胨 10 g,NaCl 10 g,葡萄糖 10 g,以 5 mol/L 的 NaOH 调 pH 至 7.0,115 °C 灭菌 20 min 后备用)中进行诱导表达.

1.2 基因克隆、转化与重组表达

当灰盖鬼伞子实体生长到约 6 cm 时,收取其伞盖,用液氮速冻后研磨成粉末. 从灰盖鬼伞菌盖组织中提取总 RNA 方法参照 Sangon Biotech 公司生产的 TotalRNAExtractor(Trizol)试剂盒说明书;cDNA 的合成参照 Vazyme 公司生产的 Hiscript II Reverse Transcriptase 试剂盒说明书.

外切 β -1,3 葡聚糖酶基因(GenBank 登录号 XM_001835119)的克隆采用正向引物 5'-CTTTA-AGAAGGAGATATACCATGAAATCGTTCTCCGCAGACATT-3'和反向引物 5'-AGTGGTGGTGGTGGTGGT-GCTCGAGCTAGTTATTGCTCCAGCAGGTCACAGTA-3',以灰盖鬼伞菌盖总 cDNA 为模板,扩增外切 β -1,3 葡聚糖酶 cDNA 片段.

参照 Vazyme 公司生产的 ClonExpress® Entry One Step Cloning Kit 说明书将外切 β -1,3 葡聚糖酶 cDNA 片段与 pET28A(+)载体经 *Nco*I 和 *Xho*I 双酶切位点相连接,构建成重组表达质粒 pET28A(+)-*exg*,再将质粒 pET28A(+)-*exg* 转染大肠杆菌 DH5 α ,用含 50 mg/L Kana-50 的 LB 平板筛选,所获抗性阳性克隆经提取质粒测序验证. pET28A(+)-*exg*/DH5 α 克隆菌株经大量培养后从中提取表达质粒 pET28A(+)-*exg*,用上述方法将其转染大肠杆菌 Rosetta 菌株,用含 50 mg/L Kana-50 和 34 mg/L Chloromycetin 的 LB 平板筛选阳性克隆转化子 pET28A(+)-*exg*/Rosetta.

重组菌的诱导表达采用乳糖操纵子诱导表达模型^[17],先将 pET28A(+)-*exg*/Rosetta 转化子在诱导表达培养基中于 37 °C,220 rpm 条件下培养至 OD₆₀₀=0.8,再向培养基中加入终浓度为 0.1 mM 的异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG). 之后分为 3 种温度条件(20 °C,30 °C,37 °C),220 rpm 分别诱导表达 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h.

重组菌表达酶活检测:将分别于 20 °C、30 °C、37 °C 下诱导表达不同时间的菌体经 2 000 g/min 离心 5 min 收集,以破细胞缓冲液(10 mmol pH 7.0 的 Tri-HCl)清洗菌体 3 次后用含 1 mM PMSF 的破细胞缓冲液重新悬浮细胞,0 °C 条件下超声破碎细胞,超声工作条件:15 Hz,工作 10 s 间隔 10 s,超声 20 min 至悬液

透明, 8 000 g/min 离心 10 min 后取上清作为粗酶液, 检测其对昆布糖活性。

1.3 表达酶的纯化

表达酶的纯化过程参照 TransGen Biotech 公司生产的 ProteinIso™ Ni-NTA Resin 产品说明书, 将 100 mL 菌液在 20 ℃, 220 rpm 条件下用 IPTG 诱导 48 h, 收集菌体, 用破细胞缓冲液重悬至 20 mL, 按上述方法破碎细胞并收集上清。将上清液经 Ni 金属亲和层析柱进行表达酶的分离纯化。

1.4 表达酶的蛋白电泳

参照 UK Laemmli 的方法对纯化后的表达酶纯度及分子量大小进行 SDS-PAGE 分析, 将经破碎后的空载菌上清及重组菌破碎液上清, Ni 金属亲和层析柱纯化后收集的酶液分别混合了上样缓冲液后与标准品一起进行 SDS-PAGE 凝胶电泳(聚丙烯酰胺浓度为 12%)^[18]。

1.5 蛋白浓度的测定

纯化后的酶液蛋白浓度测定参照 Bradford 采用考马斯亮蓝法^[19], 以牛血清白蛋白(BSA)作为标准品。

1.6 表达酶的水解活性分析

表达酶降解多糖释放还原糖的量采用 DNS 法测定^[20]: 200 μ L 反应液含适量的酶, 1% 昆布糖或其他多糖或其衍生物, 50 mmol 醋酸盐缓冲液(pH 6.0), 于 37 ℃, 800 rpm 条件下温育 30 min 后, 加入 200 μ L DNS 溶液, 100 ℃ 加热 10 min 后, 置冰浴冷却 2 min 终止反应, 直接或短暂离心取上清测定其 520 nm 处的吸光度, 以葡萄糖为标准品。1 个酶活力单位定义为在反应条件下每分钟释放 1.0 μ mol 还原糖(以葡萄糖为标准)所需要的酶量。为了评价 pH 对酶活性的影响, 分别使用 50 mmol/L 醋酸盐缓冲液(pH 3~pH 6)或 50 mM Tris-HCl(pH 7~pH 9)缓冲溶液以改变反应液 pH; 或将酶液先在不同 pH 下温育 30 min, 再加入到反应液中, 在 50 mmol/L 醋酸盐缓冲液(pH 6.0)条件下进行酶反应, 以测定酶的 pH 稳定性。为了测定温度对酶活性的影响, 在 50 mmol/L 醋酸盐缓冲液(pH 6.0)条件下, 在 20 ℃~80 ℃不同的温度条件下进行酶反应; 或将酶液先在 20 ℃~80 ℃不同的温度下孵育 30 min 后再加入到反应液中, 然后在 37 ℃条件下进行酶反应, 以测定酶的热稳定性。为了测定底物浓度对酶活性的影响及酶反应动力学参数, 在 37 ℃, 50 mM 醋酸盐缓冲液(pH 6.0)条件下, 分别使用 2%~10% 的昆布糖进行酶反应^[21]。

表达酶降解昆布寡糖释放葡萄糖的量采用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法测定^[22]: 10 μ L 反应液, 含有适量的酶, 1% 昆布寡糖, 50 mM 醋酸盐缓冲液(pH 6.0), 于 37 ℃, 800 rpm 条件下温育 60 min 后, 使用葡萄糖分析测试盒(Robio, China)测定其 505 nm 处的吸光度, 以葡萄糖作标准。1 个酶活力单位定义为在反应条件下降解昆布三糖及以上昆布寡糖时每分钟释放 1.0 μ mol 葡萄糖所需要的酶量。

表达酶降解 pNPG 及其他对硝基苯酚糖苷衍生物释放的对硝基苯酚的量采用碳酸钠终止法测定^[23]: 200 μ L 反应液, 含有适量的酶, 2 mM pNPG 或其他硝基苯酚糖苷衍生物, 50 mM NaAc-HAc(pH 6.0), 于 37 ℃, 800 rpm 条件下温育 20 min 后, 加入 200 μ L 预冷的 0.5 M 碳酸钠, 所释放的硝基苯酚形成的颜色在 410 nm 处测定吸光度, 以对硝基苯酚作标准。1 个酶活力单位定义为在反应条件下降解 pNPG 或对硝基苯酚糖苷衍生物每分钟释放 1 μ mol 对硝基苯酚所需要的酶量。

2 结果

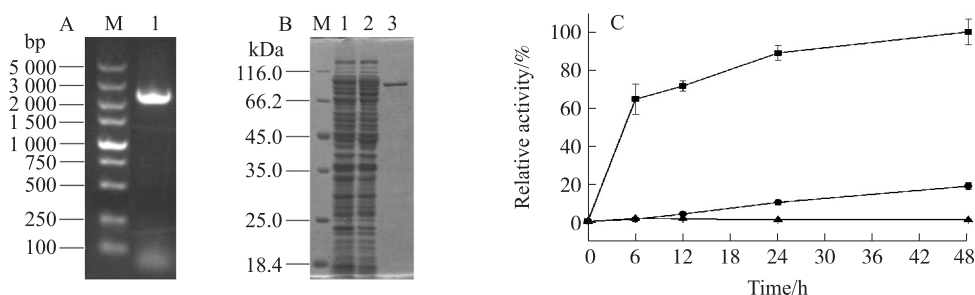
2.1 鬼伞外切 β -1,3 葡聚糖酶基因的克隆与异源重组表达

以灰盖鬼伞菌盖总 cDNA 为模板, 对外切 β -1,3 葡聚糖酶基因进行 PCR 扩增, 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示条带大小与预期相符(图 1 A)。测序结果表明, 该片段序列与 GenBank 数据库所列序列完全一致。按照材料与方法所述步骤构建重组表达质粒 pET28A(+)-*exg*, 转染大肠杆菌细胞中构建重组菌株 pET28A(+)-*exg*/Rosetta。

重组菌株 pET28A(+)-*exg*/Rosetta 在不同温度下经 IPTG 诱导表达不同时间后, 粗酶液酶活显示出非常明显的差异(图 1 C)。在 20 ℃条件下诱导表达时, 其粗酶液酶活比 30 ℃和 37 ℃时显著较高, 推测为在偏高的温度下进行诱导表达时表达蛋白形成了不溶性的包涵体, 从而相应地导致了粗酶液中可溶性的酶蛋白含量降低, 直接影响到粗酶液酶活的测定值。在 20 ℃和 30 ℃的条件下, 随着诱导表达时间的延

长,酶活都逐渐升高.所以最终确定诱导表达的条件为 20 $^{\circ}\text{C}$,220 rpm,培养 48 h.

将 20 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达的重组菌细胞破碎液与空载菌细胞破碎液相比,在 SDS-PAGE 上可明显看出新增加的一条 85 kDa 左右的蛋白条带.将重组表达菌细胞破碎液上清液经 Ni 金属亲和层析柱纯化后,所获纯化的表达酶显示仅含有单一的蛋白条带,分子量大小为 85 kDa 左右(图 1 B). 与外切 β -1,3 葡聚糖酶蛋白的理论分子量相近.纯化后的酶液经考马斯亮蓝法测定,蛋白含量为 0.07 mg/mL.



A, 外切 β -1,3 葡聚糖酶基因的 PCR 扩增电泳图, M: DL5000 标准品; 1: 外切 β -1,3 葡聚糖酶基因的 PCR 扩增产物. B, 重组表达的外切 β -1,3 葡聚糖酶蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析. M: 蛋白分子量标准品; 1: 空载菌的全细胞破碎液; 2: 表达菌的全细胞破碎液; 3: 经 Ni 金属亲和层析柱纯化后得到的重组蛋白样品. C, 重组菌在不同温度下诱导培养后细胞破碎液酶活随诱导时间的变化. ■: 20 $^{\circ}\text{C}$; ●: 30 $^{\circ}\text{C}$; ▲: 37 $^{\circ}\text{C}$

A, Electrophoresis result of *exg* PCR, M: DL5000 Marker; 1: PCR product of *exg*. B, SDS-PAGE of *exo*- β -1,3 glucanase. Note: 1: protein marker; 2: total bacteria (Blank); 3: total bacteria (Induced); 4: The recombinant protein purified by Ni-NTA affinity chromatography column. C, changes of the enzyme activity in the breaking cell extraction with cultivation time at different temperatures. ■: 20 $^{\circ}\text{C}$; ●: 30 $^{\circ}\text{C}$; ▲: 37 $^{\circ}\text{C}$

图 1 外切 β -1,3 葡聚糖酶的重组表达

Fig.1 The expression of recombinant *exo*- β -1,3 glucanase

表 1 表达酶的底物特异性

Table 1 Substrate specificity of enzyme

| Substrates | Glycoside Linkage/s | Special Activity/($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$) |
|--|---------------------|--|
| Chitin | β -1,4 | — |
| Pustulan | β -1,6 | — |
| CM-cellulose | β -1,4 | — |
| Starch Soluble | α -1,4 | — |
| Pachyman | β -1,3 | — |
| Barley β -glucan | β -1,3/1,4 | — |
| Laminarin | β -1,3/1,6 | 45 |
| periodate-oxidized laminarin | β -1,3/1,6 | — |
| Gentiobiose | β -1,6 | — |
| Cellobiose | β -1,4 | — |
| Laminaribiose | β -1,3 | — |
| Laminaritriose | β -1,3 | 747 |
| Laminaritetraose | β -1,3 | 1504 |
| Laminaripentaose | β -1,3 | 1793 |
| Laminarihexaose | β -1,3 | 1635 |
| pNPG | | — |
| p-Nitrophenyl-N-acetyl-b-D-glucosaminide | | — |
| o-Nitrophenyl-b-D-galactopyranoside | | — |
| p-Nitrophenyl-b-D-glucuronide | | — |

—: 未检测到.

2.2 重组表达的鬼伞外切 β -1,3 葡聚糖酶特性分析

该酶在 NCBI 中被注释为 β -1,3 葡聚糖苷酶, 本实验以不同底物检测其作用方式, 结果显示该酶能作用于昆布多糖(含 β -1,6-分支侧链的 β -1,3 葡聚糖), 但对 β -1,6-葡聚糖、 β -1,4-葡聚糖以及不分支的 β -1,3 葡聚糖没有作用; 该酶对 β -1,3 键的昆布二糖、pNPG、以及其他对硝基苯糖苷衍生物均不起作

用,显示其不能作用于二糖苷化合物,为非糖苷酶;且该酶可作用于含 β -1,3 葡苷键的昆布三糖以上的昆布寡糖,但又不能作用于过氧酸-氧化-昆布糖(表1),上述结果表明该酶以外切方式水解昆布糖,所以该酶应为外切 β -1,3 葡聚糖酶。

通过在不同温度下进行水解反应,发现该酶在 50℃~70℃时都具有较高的活性,酶的最适反应温度为 60℃。但根据耐热性分析显示,在 60℃及以上温度时该酶较不稳定(图2A),当在 50℃及低于此温度时,该酶具有较好的稳定性。

在不同 pH 条件下进行水解反应,结果显示表达酶的最适反应 pH 为 6.0,偏酸或者偏碱都会导致酶活性的下降。但表达酶在 pH 5.0~pH 8.0 范围内都有较好的稳定性,孵育 30 min 不会对酶活性有明显的改变,但在 pH 9.0 时,酶稳定性快速下降(图2B)。

底物对酶活性的影响及酶反应动力学数据表明,表达酶在 37℃反应条件下的 K_m 为 2.23 mg/mL, V_{max} 为 232.56 U/mL(图2C)。

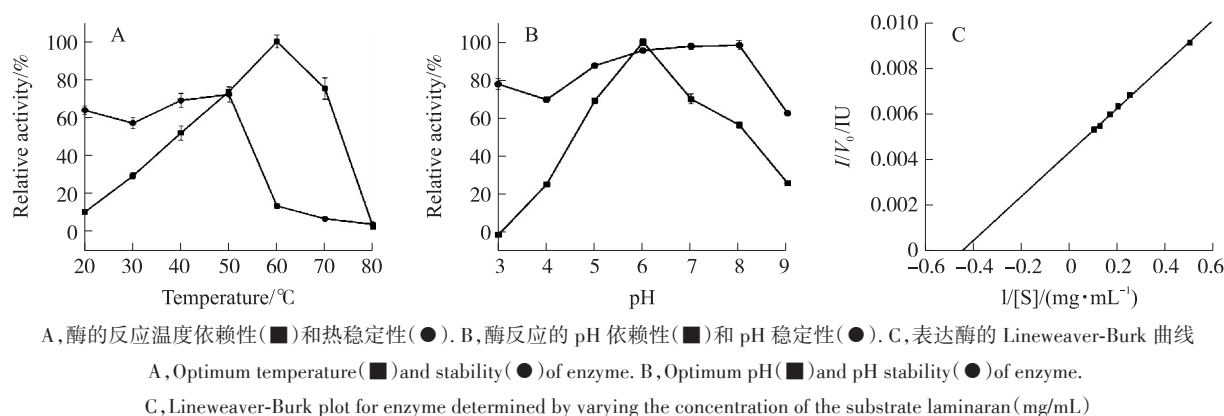


图2 重组外切 β -1,3 葡聚糖酶的酶学特性

Fig.2 The enzyme characteristic of the recombinant exo- β -1,3 glucanase

3 讨论

本实验室前期报道从灰盖鬼伞成熟子实体的伞盖中分离纯化获得 3 种 β -1,3 葡聚糖酶,其具有一定的科研价值和使用价值。但由于分离纯化过程周期较长,且需要大量培养获得灰盖鬼伞子实体,费时、费力,成本较高,难以满足后续研究对酶的大量需求,本研究试图重组异源表达这些 β -1,3 葡聚糖酶。但研究发现,内切 β -1,3 葡聚糖酶和 β -1,3 葡苷糖酶因存在表达后糖基化修饰作用,无法在原核生物大肠杆菌中异源重组表达,只有外切 β -1,3 葡聚糖酶可以成功地在大肠杆菌中异源重组表达,并且通过对表达条件的摸索可以看出,只有在较低的温度下(本研究为 20℃)诱导表达的外切 β -1,3 葡聚糖酶才可以获得较好的活性。

外切 β -1,3 葡聚糖酶基因在大肠杆菌中的异源重组表达以及同组氨酸标签的成功融合,可以通过简单的菌体发酵,超声破碎及 Ni 金属亲和层析法在较短的时间内获取大量高纯度的外切 β -1,3 葡聚糖酶以用于实验所需。研究表明,该酶活性较高,同时具有一定的耐热能力和较好的 pH 稳定性,同时异源重组表达的外切 β -1,3 葡聚糖酶虽然加上 His 融合标签,但其酶催化活性基本没有改变,为未来进一步开拓该酶的工业化生产及应用奠定了基础。

[参考文献]

- [1] MARTIN K, MCDUGALL B M, MCILROY S, et al. Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal β -(1,3)- and β -(1,6)-glucanases[J]. FEMS microbiology reviews, 2007, 31(2): 168-192.
- [2] REESE E. Degradation of polymeric carbohydrates by microbial enzymes[G]//The structure, biosynthesis, and degradation of wood. New York: Plenum Press, 1977, 11: 311-367.
- [3] YAMAMOTO R, NEVINS D J. Degradation of a glucan containing β -(1 \rightarrow 3) and β -(1 \rightarrow 6) linkages by exo-(1 \rightarrow 3)- β -d-

- glucanase[J]. Carbohydrate research, 1983, 122(2): 217-226.
- [4] PITSON S, SEVIOUR R, MCDUGALL B. Noncellulolytic fungal β -glucanases: their physiology and regulation[J]. Enzyme and microbial technology, 1993, 15(3): 178-192.
- [5] REESE E T, MANDELS M. β -d-1, 3 glucanases in fungi[J]. Canadian journal of microbiology, 1959, 5(2): 173-185.
- [6] LATGÉ J P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell[J]. Molecular microbiology, 2007, 66(2): 279-290.
- [7] ADAMS D J. Fungal cell wall chitinases and glucanases[J]. Microbiology, 2004, 150(7): 2 029-2 035.
- [8] BOWMAN S M, FREE S J. The structure and synthesis of the fungal cell wall[J]. Bioessays, 2006, 28(8): 799-808.
- [9] CHET I, ORDENTLICH A, SHAPIRA R, et al. Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria[J]. Plant and soil, 1990, 129(1): 85-92.
- [10] PEBERDY J. Fungal cell walls—a review[G]//Biochemistry of cell walls and membranes in fungi. Berlin: Springer, 1990: 5-30.
- [11] SAKURAI N. Cell wall functions in growth and development—a physical and chemical point of view[J]. The botanical magazine=Shokubutsu-gaku-zasshi, 1991, 104(3): 235-251.
- [12] FONTAINE T, HARTLAND R P, DIAQUIN M, et al. Differential patterns of activity displayed by two exo-beta-1, 3-glucanases associated with the *Aspergillus fumigatus* cell wall[J]. Journal of bacteriology, 1997, 179(10): 3 154-3 163.
- [13] MOUYNIA I, SARFATI J, RECCO P, et al. Molecular characterization of a cell wall-associated β (1-3) endoglucanase of *Aspergillus fumigatus*[J]. Medical mycology, 2002, 40(5): 455-464.
- [14] DELGADO N, XUE J, YU J J, et al. A recombinant β -1, 3-glucanosyltransferase homolog of *Coccidioides posadasii* protects mice against coccidioidomycosis[J]. Infection and immunity, 2003, 71(6): 3 010-3 019.
- [15] COLE G T, HUNG C Y. The parasitic cell wall of *Coccidioides immitis*[J]. Medical mycology, 2001, 39(1): 31-40.
- [16] ZHOU Y, ZHANG W, LIU Z, et al. Purification, characterization and synergism in autolysis of a group of β -1, 3-glucan hydrolases from the pilei of *Coprinopsis cinerea* fruiting bodies[J]. Microbiology, 2015, 161(10): 1 978-1 989.
- [17] AMANN E, BROSIUS J, PTASHNE M. Vectors bearing a hybrid trp-lac promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*[J]. Gene, 1983, 25(2): 167-178.
- [18] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of *bacteriophage T4*[J]. Nature, 1970, 227 (5259): 680-685.
- [19] 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): 248-254.
- [20] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical chemistry, 1959, 31(3): 426-428.
- [21] O'CONNELL E, PIGGOTT C, TUOHY M. Purification of exo-1, 3-beta-glucanase, a new extracellular glucanolytic enzyme from *Talaromyces emersonii*[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2011, 89(3): 685-696.
- [22] KUMAGAI Y, SATOH T, INOUE A, et al. A laminaribiose-hydrolyzing enzyme, AkLab, from the common sea hare *Aplysia kurodai* and its transglycosylation activity[J]. Comparative biochemistry and physiology part B: biochemistry and molecular biology, 2014, 167: 1-7.
- [23] SAHA B C, BOTHAST R J. Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel beta-glucosidase from *Candida peltata*[J]. Applied and environmental microbiology, 1996, 62(9): 3 165-3 170.

[责任编辑:黄 敏]