

## 牦牛瘤胃元基因组文库中木聚糖酶基因的分析

王敏<sup>1,2</sup>, 陈富荣<sup>1,3</sup>, 张山<sup>1</sup>, 朱雅新<sup>1</sup>, 东秀珠<sup>1</sup>, 黄力<sup>1</sup>, 田瑞华<sup>2</sup>, 董志扬<sup>1\*</sup>, 戴欣<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

<sup>2</sup> 内蒙古农业大学生命科学学院, 呼和浩特 010018

<sup>3</sup> 内蒙古工业大学化工学院, 呼和浩特 010051

**摘要:** 【目的】了解牦牛瘤胃微生物木聚糖酶多样性及其降解特征, 为木聚糖降解提供新的基因资源。【方法】根据对已构建的瘤胃微生物元基因组细菌人工染色体(BAC)克隆文库高通量测序结果的注释, 筛选其中编码木聚糖酶的基因并进行多样性分析; 对其中一个木聚糖酶基因及其连锁的木糖苷酶基因进行克隆表达和酶学性质表征, 分析其协同作用。【结果】共筛选到 14 个木聚糖酶基因, 均编码 GH10 家族木聚糖酶, 其氨基酸序列之间的相似性为 20.5% - 91.3%; 其中 7 个木聚糖酶基因所在的不同的 DNA 片段(contig)上存在木糖苷酶基因, 编码的木糖苷酶属于 GH43 或 GH3 糖苷水解酶家族。将其中一对连锁的木聚糖酶(Xyn32)和木糖苷酶基因(Xyl33)分别克隆、表达和纯化。纯化后的木聚糖酶比活为 1.98 IU/mg, 但不具有阿魏酸酯酶活性; 木糖苷酶比活为 0.07 U/mg, 且具有  $\alpha$ -阿拉伯呋喃糖苷酶活性。体外实验证明, 木糖苷酶 Xyl33 对与之连锁的木聚糖酶 Xyn32 的木聚糖降解具有协同作用。

**关键词:** 牦牛瘤胃, 细菌人工染色体(BAC)文库, 木聚糖酶, 木糖苷酶, 协同作用

**中图分类号:** Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2011)10-1364-10

半纤维素是自然界中继纤维素之后第二丰富的可再生生物质资源, 木聚糖是植物细胞壁中半纤维素的主要成分<sup>[1-2]</sup>, 因此对木聚糖降解酶资源的研究成为国内外研究热点之一。木聚糖是由  $\beta$ -D-吡喃木糖经  $\beta$ -1,4-糖苷键相连形成的多聚五碳糖, 带有阿拉伯糖、乙酰基甘露糖以及葡萄糖醛酸等多种取代基, 其完全降解需要 1,4- $\beta$ -木聚糖酶(endo-1,4- $\beta$ -xylanase)、 $\beta$ -木糖苷酶( $\beta$ -xylosidase)、 $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶( $\alpha$ -glucuronidase)、 $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶( $\alpha$ -L-arabinofuranosidase)、乙酰木聚糖酯酶(acetyl xylan esterase)和阿魏酸酯酶(ferulic acid esterase)

等共同作用<sup>[3-5]</sup>, 其中木聚糖酶是其降解过程中的主要关键酶, 它以内切方式水解木聚糖分子中  $\beta$ -1,4-糖苷键, 生成低聚木糖和少量木糖, 低聚木糖由木糖苷酶通过外切方式进一步水解为木糖。

对木聚糖酶的研究由来已久。1955 年, Sørensen 发现土壤和动物瘤胃中存在大量木聚糖酶, 这些酶能够将这些环境中的木聚糖降解为木糖、木二糖和木三糖等低聚木糖<sup>[6]</sup>; 随后, 人们对来自细菌、真菌、酵母的各类木聚糖酶进行了分离纯化和酶学特性研究, 结果表明, 木聚糖酶种类丰富, 其分子质量在 8 - 145 kDa 之间, 多属于糖苷水解酶 10

基金项目: 国家“973 项目”(2011CB100800); 中国科学院重大项目(KSCX1-YW-11B1); 国家自然科学基金(30770053)

\* 通信作者。戴欣, Tel: +86-10-64807418, Fax: +86-10-64807429, E-mail: daixin@im.ac.cn; 董志扬, Tel: +86-10-64807337, Fax: +86-10-64807337, E-mail: dongzy@im.ac.cn

作者简介: 王敏(1985-), 女, 陕西省府谷县人, 硕士研究生, 主要研究方向为微生物生态学。E-mail: minwang2009@126.com

收稿日期: 2011-03-26; 修回日期: 2011-06-07

和 11 家族<sup>[7-8]</sup>。瘤胃作为木质纤维素高效降解的天然体系, 含有丰富的木聚糖降解微生物和降解酶。

已有的研究表明, 瘤胃与其他生态环境一样, 其中存在大量未培养微生物, 利用元基因组手段对其基因的研究是近年的热点<sup>[9-10]</sup>。牦牛是我国独特的牛种, 生活在高寒地带, 终年以牧草、灌丛、落叶、根茬为食。基于瘤胃微生物 16S rRNA 基因序列的分析显示, 其瘤胃微生物群落结构与黄牛、水牛等不同, 并且存在大量未培养微生物类群<sup>[11]</sup>。本研究从已构建的牦牛瘤胃微生物元基因组 BAC 文库的高通量测序结果中筛选木聚糖酶基因, 对其编码产物的多样性进行分析, 并对其中一个木聚糖酶基因及其下游的木糖苷酶基因进行克隆表达和产物表征, 为进一步研究瘤胃木聚糖降解特点提供基础, 也为木聚糖降解提供新的基因资源。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒和培养基:** 菌株 *Escherichia coli* BL21 和 *E. coli* DH5 $\alpha$  购自全式金公司, 表达载体 pET-30a(+) 购自 Novagen 公司。

LB 培养基: 10 g/L 胰蛋白胨, 5 g/L 酵母提取物, 10 g/L NaCl, 根据需要添加 60  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素、50  $\mu$ g/mL 卡那霉素。在 LB 培养基中加入 15 g/L 的琼脂粉为 LA 培养基, 在 LA 和 LB 培养基中加 5 g/L 木聚糖作为筛选培养基和发酵培养基。

**1.1.2 工具酶与试剂:** 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、ExTaq DNA 聚合酶及 Pfu DNA 聚合酶分别购自 TaKaRa、NEB、Promega 和 Fermentas 公司, 木聚糖、对硝基苯酚-阿拉伯呋喃糖苷和对硝基苯酚- $\beta$ -木糖苷购自 Sigma 公司, 酵母提取物、胰蛋白胨购自 OXOID 公司, X-gal、IPTG 购自 AMRESCO 公司, 蛋

白分子量 Marker 和 DNA Marker 购自 Fermentas 公司。质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司, PCR 产物纯化试剂盒和 BAC 质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司。His-trap Ni affinity column (1 mL) 和蛋白纯化系统购自 GE 公司。硅胶板 (G60 F254 20 cm  $\times$  20 cm) 购自德国 Merck 公司。木二糖、木三糖和木四糖购自 Megazyme 公司。各种引物和 DNA 测序委托上海英骏生物、上海生工和北京华大基因公司完成。

### 1.2 木聚糖酶基因筛选和分析

**1.2.1 木聚糖酶基因筛选:** 从已构建的牦牛瘤胃 BAC 克隆文库中筛选得到 223 个具有纤维素酶、木聚糖酶、酯酶或脂肪酶活性的克隆, 对这些克隆采用 1/4run454 高通量测序, 将获得的约 300 Mb 序列进行拼接后, 利用 <http://nibi.nlm.nih.gov> 网站提供的 ORF Finder 软件进行 ORF 预测并与 GenBank 的蛋白数据库、KEGG 数据库以及 COG 数据库比对, 结合 Pfam 的分析结果以及来自 CAZy (<http://www.cazy.org>) 的信息, 筛选其中编码木聚糖酶的基因。

**1.2.2 木聚糖酶蛋白序列的分析:** 将获得的木聚糖酶的氨基酸序列采用 Clustalx 软件进行排序, 通过 DNAMAN 分析它们之间的相似性矩阵, 用 MEGA 软件作系统发育树。

### 1.3 木聚糖酶/木糖苷酶基因的克隆表达和产物纯化

**1.3.1 木聚糖酶 (ORF32) 和木糖苷酶基因 (ORF33) 的扩增:** 以牦牛瘤胃 89 号菌质粒为模板, 进行 PCR 扩增, 所用引物见表 1。反应体系 50  $\mu$ L: ddH<sub>2</sub>O 37  $\mu$ L, 模板 1  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4  $\mu$ L, Pfu 酶 1  $\mu$ L, 含 MgSO<sub>4</sub> 的 10  $\times$  Pfu 缓冲液 5  $\mu$ L, 特异性引物各 1  $\mu$ L (0.2  $\mu$ mol/L)。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 共 35 循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min。

表 1 PCR 扩增所用的引物

Table 1 PCR primers used for DNA amplification

Primers	Primers sequence (5'→3')	Size/bp	Restriction site
32F	CGCCATATGCAGCAGGGGCTGAAAGACGCCATC	33	<i>Nde</i> I
32R	CCGCTCGAGTTGATATAGTTTAAATGATTTCCGTTG	34	<i>Xho</i> I
33F	CATATGGCAAAACTTCCACGTTATCTTTCC	31	<i>Nde</i> I
33R	GCGGCCGCTTCATTCACAACAGGCTTGATGGTG	33	<i>Not</i> I

**1.3.2 重组质粒的构建:** 纯化后的 ORF32 和 ORF33 PCR 扩增产物用 *Nde* I 和 *Xho* I 两种限制性

内切酶在 37 $^{\circ}$ C 酶切 4 h, 经 PCR 产物纯化试剂盒纯化后, 与同样酶切并纯化后的 pET30a 载体用 T4

DNA 连接酶连接,转化到 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中,经酶切筛选阳性克隆进行 DNA 序列测定,确定克隆获得的目的片段,将获得的重组质粒 pET30a-ORF33 和 pET30a-ORF34 转化到 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中,经酶切及 DNA 测序确定获得转入重组质粒的表达菌株。

**1.3.3 目的蛋白的诱导表达:**将构建好的表达菌株接种于5 mL含有 kan 抗性的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 摇床培养至指数生长期。取0.25 mL 菌液转接到25 mL含 kan 的 LB 培养基中,220 r/min 摇床培养至  $OD_{600}$  为 0.6-0.8 之间,加入 IPTG 进行诱导。4 $^{\circ}$ C, 6000  $\times$  g 离心15 min 收集菌体。菌体沉淀用缓冲液 A (0.02 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 10% 甘油) 悬浮,进行冰浴超声破碎(间隔2 s, 1 s)10 min 以后,4 $^{\circ}$ C, 13000  $\times$  g 离心10 min。取出上清,此即为粗酶液。另将沉淀用同样体积的缓冲液 A 悬浮。取一定体积的粗酶液,使上样孔中的蛋白量一致,加入2倍体积上样缓冲液,混合后沸水煮5 min,上样电泳。聚丙烯酰胺分离胶浓度为12%。进行 SDS-PAGE 分析,每个样品都以空载体为阴性对照。为提高重组酶的产量,对诱导温度、诱导时间、IPTG 浓度等主要影响因素进行优化,确定最佳的诱导表达条件。

**1.3.4 重组蛋白的分离纯化:**用 His-trap Ni affinity column 直接纯化上清中的目的蛋白,0-500 mmol/L 咪唑溶液设30个梯度进行洗脱,SDS-PAGE 检测纯化产物的纯度和分子量。用 Folin-酚法测定蛋白质浓度,以牛血清蛋白(BSA)作为标准蛋白,绘制标准曲线<sup>[12]</sup>。

#### 1.4 纯化的木聚糖酶/木糖苷酶特性分析

**1.4.1 木聚糖酶(endo-1,4-beta-xylanase)酶活:**木聚糖酶活的测定参考文献<sup>[13]</sup>的方法。取200  $\mu$ L用0.1 mol/L 醋酸-醋酸钠溶液(pH 6.0)配制1%的木聚糖于1.5 mL 离心管中。于每个离心管中加入200  $\mu$ L 酶液,50 $^{\circ}$ C 水浴保温1 h。不同时间间隔取样后,加入500  $\mu$ L DNS 煮沸5 min。在540 nm 下测定吸光值。以400  $\mu$ L 缓冲液中加入500  $\mu$ L DNS 煮沸5 min 作为空白对照。以木糖作标准曲线,测定 ORF32 的 endo-1,4-beta-xylanase 酶活力。

endo-1,4-beta-xylanase 酶活的定义为:在标准测定条件下,每分钟水解木聚糖生成1  $\mu$ mol 还原糖(木糖)所需要的酶量定义为一个酶活单位。

**1.4.2 木糖苷酶(beta-xylodase)酶活:**木糖苷酶的活力测定参照 Lack 的方法<sup>[14]</sup>。在25 mL 刻度管中加入0.1 mL 适当稀释的酶液和0.5 mL 用0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液配制的2.5 mmol/L 对硝基苯酚- $\beta$ -木糖苷(pNPX, Sigma 公司)溶液。放入恒温水浴锅中在50 $^{\circ}$ C 下保温30 min 后立即加入4 mL 0.25 mol/L  $Na_2CO_3$  溶液终止反应,定容到25 mL,充分摇匀后于410 nm 波长下测定释放的对硝基苯酚的吸光度值  $A_{410}$ 。每个样品做有底物无酶,有酶无底物空白实验作对照。根据对硝基苯酚的标准曲线(用对硝基苯酚的绝对量对  $A_{410}$  作图),测定 ORF33 beta-xylodase 酶活力。

beta-xylodase 酶活的定义为:在标准测定条件下,每分钟生成1  $\mu$ mol 对硝基苯酚所需要的酶量定义为一个酶活单位。

**1.4.3 温度对酶活力的影响:**pH 6.0 的缓冲液中于不同温度下测定纯化的重组木聚糖酶和木糖苷酶的活力,确定其最适反应温度,实验温度范围为20 $^{\circ}$ C-70 $^{\circ}$ C,间隔温度为10 $^{\circ}$ C。

**1.4.4 pH 值对酶活力的影响:**在最适反应温度40 $^{\circ}$ C 下,pH 值为2-8 中分别测定重组酶的木聚糖酶和木糖苷酶的活力,间隔 pH 值为1。

**1.4.5 其他酶活的测定:**①酯酶酶活的测定:采用平板法测定酯酶活性。LB 固体培养基配置好后加入50  $\mu$ g/mL 卡那霉素和0.8 mmol/L 的 IPTG 后倒平板。将克隆分别接种到平板上。37 $^{\circ}$ C 恒温培养过夜,倒入酯酶显色液(0.1 mol/L pH 7.0 磷酸钠缓冲液,0.04% 乙酸奈酯,0.04% Fast blue RR),37 $^{\circ}$ C 放置1-2 min 观察一次,加入1 mol/L NaCl 脱色过夜后观察脱色圈。并以空载体的 *E. coli* BL21 作为阴性对照,酯酶粗酶液作为阳性对照。②脂肪酶酶活的测定:将体积比为9:1 的蒸馏水:三丁酸甘油酯超声振荡成乳浊液,加入到 LB 固体培养基配置好后,加入50  $\mu$ g/mL 卡那霉素和0.8 mmol/L 的 IPTG 后倒平板。将克隆分别接种到脂肪酶测活平板上。37 $^{\circ}$ C 恒温培养12 h,观察有无透明圈。以空载体的 *E. coli* BL21 作为阴性对照,脂肪酶粗酶液作为阳性对照。③阿拉伯呋喃糖苷酶酶活的测定:配制3 mmol/L pNp- $\alpha$ -L-arabinofuranoside 溶液。将0.5 mL 溶酶缓冲液与0.5 mL 底物溶液于40 $^{\circ}$ C 孵育10 min,然后加入0.5 mL 酶液,40 $^{\circ}$ C 孵育20 min,加入2.5 mL 的0.5 mol/L  $Na_2CO_3$  溶液停止反应,与释

放的 P-nitrophenol 反应,用分光光度计在410 nm下测吸光值。④纤维素酶酶活的测定:将 LB 固体培养基中加入 0.5% 的 CMC-Na, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素和 0.8 mmol/L 的 IPTG 后倒平板。将克隆分别接种到纤维素酶测活平板上。37 $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 24 h, 倒入刚果红染色液染色 10 min 后, 加入 1 mol/L NaCl 脱色 30 min 后观察水解圈。以空载体的 *E. coli* BL21 作为阴性对照, 纤维素酶粗酶液作为阳性对照。⑤淀粉酶酶活的测定:将 LB 固体培养基中加入 0.2% 的 Soluble starch, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素和 0.8 mmol/L 的 IPTG 后倒平板。将克隆分别接种到淀粉酶测活平板上。37 $^{\circ}\text{C}$  恒温过夜培养, 加碘液 (0.67 g KI, 0.33 g I 溶于 100 mL 蒸馏水) 浸没, 10 min 后观察透明水解圈。以空载体的 *E. coli* BL21 作为阴性对照, 淀粉酶粗酶液作为阳性对照。

### 1.5 木糖苷酶与木聚糖酶的协同作用

以木聚糖酶单独作用于木聚糖作为对照, 通过加入木糖苷酶后, 测定木聚糖酶比活的变化研究木糖苷酶对木聚糖酶的协同作用。通过 TLC 法检测酶解产物的变化<sup>[15]</sup>。先将薄层层析板 (纤维素板) 在 100 $^{\circ}\text{C}$  下活化 0.5 h。取一定量的酶解液, 在

4000 r/min 下离心 15 min, 用微量进样器取适量的上清液, 点样于薄层层析板, 吹干, 在层析缸中展开。展开剂为正丁醇: 冰醋酸: 水 (体积比为 2:1:1), 显色剂为苯胺 0.93 g, 邻苯二甲酸 1.66 g, 溶于水饱和的正丁醇 100 mL 中。展开结束后吹干, 喷显色剂后, 于 105 $^{\circ}\text{C}$  烘箱中放置 10 min, 进行显色。

## 2 结果和讨论

### 2.1 木聚糖酶基因的筛选与分析

将获得的约 300 Mb 来自 BAC 克隆文库的序列进行拼接, 利用 <http://nibi.nlm.nih.gov> 网站提供的 ORF Finder 软件进行 ORF 预测并与 GenBank 的蛋白数据库、KEGG 数据库以及 COG 数据库比对, 结合 Pfam 的分析结果以及来自 CAZy (<http://www.cazy.org>) 的信息, 筛选和分析其中编码木聚糖酶的基因。

经过以上分析, 共筛选得到 14 个编码木聚糖酶的基因。表 2 是它们的氨基酸序列相似性矩阵, 这些木聚糖酶在氨基酸水平上的相似性为 20.5% - 91.3%, 其中一半以上的序列两两之间的相似性小于 60%, 呈现丰富的多样性。

表 2 牦牛瘤胃木聚糖酶氨基酸序列相似性矩阵

Table 2 Homology matrix of the amino acid sequences of xylanases from Yak rumen

N	ORFs	Identities / %													
1	212-00030-32	100													
2	212-01199-23	91.3	100												
3	212-01221-21	78.2	74.4	100											
4	212-01221-23	79.1	76.1	86.5	100										
5	404-00010-25	64.9	63.6	66.8	66.0	100									
6	212-00025-32	<b>50.9</b>	<b>50.9</b>	<b>49.4</b>	<b>49.9</b>	<b>54.3</b>	100								
7	201-00206-06	<b>28.0</b>	<b>24.1</b>	<b>24.5</b>	<b>23.8</b>	<b>23.6</b>	<b>36.3</b>	100							
8	301-00036-27	<b>27.6</b>	<b>24.8</b>	<b>24.7</b>	<b>24.5</b>	<b>23.1</b>	<b>34.3</b>	67.9	100						
9	201-00201-18	<b>34.2</b>	<b>30.1</b>	<b>29.5</b>	<b>29.4</b>	<b>29.9</b>	<b>46.3</b>	<b>23.5</b>	<b>22.8</b>	100					
10	301-00178-03	<b>47.7</b>	<b>46.8</b>	<b>47.5</b>	<b>47.5</b>	<b>46.2</b>	<b>47.3</b>	<b>42.9</b>	<b>41.1</b>	<b>47.8</b>	100				
11	404-00027-06	<b>22.8</b>	<b>22.4</b>	<b>22.6</b>	<b>22.6</b>	<b>21.8</b>	<b>31.7</b>	<b>20.8</b>	<b>20.5</b>	<b>24.2</b>	<b>38.1</b>	100			
12	201-00204-18	<b>32.9</b>	<b>31.9</b>	<b>31.6</b>	<b>31.7</b>	<b>32.8</b>	<b>35.7</b>	<b>31.3</b>	<b>32.6</b>	<b>32.1</b>	<b>41.1</b>	<b>24.8</b>	100		
13	301-00210-02	<b>33.3</b>	<b>33.3</b>	<b>33.3</b>	<b>33.7</b>	<b>32.3</b>	<b>33.7</b>	<b>32.0</b>	<b>31.4</b>	<b>30.7</b>	<b>53.8</b>	<b>31.3</b>	<b>29.8</b>	100	
14	201-00018-09	<b>31.0</b>	<b>30.7</b>	<b>31.5</b>	<b>31.3</b>	<b>30.4</b>	<b>31.8</b>	<b>28.5</b>	<b>26.9</b>	<b>29.9</b>	<b>43.9</b>	<b>27.2</b>	<b>28.9</b>	<b>31.1</b>	100

Numbers in boldface: amino acid sequence identities < 60%

Pfam 的分析结果显示, 14 个基因编码的木聚糖酶均属于糖苷水解酶家族 10。常见的木聚糖酶属于 GH10 和 GH11 家族, GH10 的木聚糖酶分子量较大, 常含多个结构域, 除具有木聚糖酶活性外, 往往还具有其它的酶活, 如纤维素酶、阿魏酸酯酶等活性<sup>[1, 16]</sup>; 而 GH11 家族的木聚糖酶多为单结构域, 分

子量较小, 是“纯粹”的木聚糖酶, 产物中含有的木寡糖较多<sup>[17]</sup>。目前对瘤胃微生物元基因组的分析结果显示<sup>[9, 18-19]</sup>, 瘤胃中存在 GH11 的木聚糖酶, 但其多样性上远低于 GH10 家族的木聚糖酶, 推测多结构域的 GH10 家族具有更多的变化方式以适应瘤胃内复杂多糖的环境。

与 GenBank 蛋白数据库 BLAST 相似性比对结果显示(表 3),在获得的 14 个木聚糖酶中,7 个与 CFB 类群的拟杆菌(*Bacteroides*)、普氏菌(*Prevotella*)和产琥珀酰丝状杆菌(*Fibrobacter succinogenes*)等细菌的相关蛋白的相似性为 35% - 83%,3 个与 Firmicutes 类群微生物的相关蛋白的相似性为 54% - 80%。这与原来所认为的 CFB 类群微生物是瘤胃中主要的半纤维素降解菌一致<sup>[20]</sup>。

进一步分析发现,14 个木聚糖酶基因分别位于 13 个不同的 contigs 上(表 3),其中 10 个含有木聚糖酶基因的 contigs 的长度大于 10 kb。对这些 contigs 上其他基因的分析显示,在 7 个 contigs 上,木聚糖

酶基因附近或其下游存在木糖苷酶基因(表 3 中加黑的基因),它们分别编码属于 GH43 家族(4 个)和 GH3 家族(3 个)的糖苷水解酶。已有的证据表明,低聚木糖的水解可促进木聚糖酶活性<sup>[21]</sup>,推测这些酶基因在基因组上的近距离排列是其协同作用的遗传基础。事实上,GH10 - GH43 类木聚糖酶-木糖苷酶基因串联定位于基因组上的情况在多个微生物菌株中存在<sup>[22]</sup>。因此,我们选取 contig212 - 00025 上的 ORF32(即 contig212 - 00025 - 32)及其下游的 ORF33(一个编码 GH43 家族的木糖苷酶基因)进行克隆表达和酶学特性分析,并对它们之间的协同作用进行研究。

表 3 牦牛瘤胃木聚糖酶蛋白的同源性及其结构特征

Table 3 Analysis of xylanases retrieved from Yak rumen

ORF (contig length) /xylosidase	Length (aa)	Pfam	Best hit with BLAST (organisms and GenBank accession number)	Homology <sup>#</sup>
<b>Contig201-00201-18</b> (51377 bp) /GH43	<b>688</b>	<b>GH10</b>	<b><math>\beta</math>-1, 4-D-xylanase ( <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> , CAA43712)</b>	<b>E = 0.0; I = 512/635 = 80%</b>
Contig201 - 00204 - 18 (54021 bp)	408	GH10	Glycoside hydrolase 10 ( <i>T. thermosaccharolyticum</i> <sup>+</sup> , EET53393)	E = 1e-134; I = 226/404 = 55%
Contig201 - 00206 - 6 (59089 bp)	752	GH10	Glycoside hydrolase 10 ( <i>Fibrobacter succinogenes</i> , ACX75889)	E = 0.0; I = 587/764 = 76%
<b>Contig404 - 00010 - 25</b> (64105 bp) / GH43	<b>732</b>	<b>GH10</b>	<b>xylanase/ferulic acid esterase ( <i>Prevotella ruminicola</i> , ACN78954)</b>	<b>E = 0.0; I = 609/730 = 83%</b>
<b>Contig404 - 00027 - 36</b> (56353 bp) / GH3	<b>611</b>	<b>GH10</b>	<b>Glycoside hydrolase 10 ( <i>Prevotella ruminicola</i> , ADE83221)</b>	<b>E = 1e-115; I = 208/335 = 62%</b>
<b>Contig210 - 00018 - 9</b> (44899 bp) / GH43	<b>680</b>	<b>GH10</b>	<b>Xylanase (<i>Eubacterium rumintium</i> , BAA09971)</b>	<b>E = 1e-124; 220/405 = 54%</b>
Contig310 - 00036 - 27 (39588 bp)	767	GH10	Glycoside hydrolase 10 ( <i>Fibrobacter succinogenes</i> , ACX75889)	E = 0.0; I = 475/783 = 60%
Contig310 - 00178 - 1 (400 bp)	134	GH10	Hypothetical protein ( <i>Bacteroides cellulosilyticus</i> , EEF88944)	E = 5e-21; I = 56/129 = 43%
Contig310 - 00210 - 2 (1857 bp)	211	GH10	Glycoside hydrolase 10 ( <i>Bacteroides ovatus</i> , EEF52889)	E = 4e-10; 33/93 = 35%
<b>Contig212 - 00025 - 32</b> (77333 bp) / GH43	<b>363</b>	<b>GH10</b>	<b>endo-1, 4-beta-xylanase ( <i>Prevotella buccae</i> , EFU31532)</b>	<b>E = 1e-120; I = 199/345 = 57%</b>
<b>Contig212-00030-32</b> (63007 bp) /GH3	<b>588</b>	<b>GH10</b>	<b>Hypothetical protein ( <i>Bacteroides eggerthii</i> , EEC53451)</b>	<b>E = 0.0; I = 404/575 = 70%</b>
<b>Contig212-01199-23</b> (61593 bp) /GH3	<b>754</b>	<b>GH10</b>	<b>Hypothetical protein ( <i>Bacteroides eggerthii</i> , EEC53451)</b>	<b>E = 0.0; I = 481/755 = 63%</b>
Contig212-01221-21 (53900 bp)	717	GH10	Hypothetical protein ( <i>Bacteroides cellulosilyticus</i> , EEF91240)	E = 0.0; I = 492/726 = 67%
Conti212-g01221-23 (53900 bp)	716	GH10	Hypothetical protein ( <i>Bacteroides eggerthii</i> , EEC53451)	E = 0.0; I = 490/720 = 68%

<sup>#</sup>: E: Expected value; I: Identities; <sup>+</sup>: *T. thermosaccharolyticum*: *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. contigs in black: both xylanase gene and xylosidase gene are located on the contig.

## 2.2 木聚糖酶和木糖苷酶的基因克隆表达和重组蛋白纯化

### 2.2.1 扩增目的基因:分别以 ORF32F、ORF32R 和

ORF33F、ORF33R 为上下游引物,通过 PCR 的方法从牦牛瘤胃 89 号菌的 BAC 质粒 DNA 中分别获得 1047 bp ORF32(去除信号肽)和 1020 bp ORF33

DNA 片段,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,与预测基因大小相符。

**2.2.2 诱导基因表达和纯化蛋白质:**将 ORF32 和 ORF33 的 PCR 扩增产物经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切后与 pET30a 连接,经测序证实,成功构建了原核表达质粒 pET28a-ORF32 和 pET28a-ORF33。分别转化 *E. coli* BL21 (DE3),获得了表达木聚糖酶和木糖苷酶的重组子。培养获得的重组菌株及带有空质粒的宿主菌,诱导基因表达,分别将其表达的蛋白命名为 Xyn32 和 Xyl33。经试验,确定最优表达条件为:含有 50 μg/mL kan 的 LB 培养基,1% 接种量,37°C 220 r/min 摇床培养至  $OD_{600}$  0.6 时,加入 0.08 mmol/L IPTG,继续诱导 3.5 h,收集菌体。处理后取样采用 SDS-PAGE 方法进行分析。在 39.5 kDa 和 36.9 kDa 的位置观察到了表达的蛋白条带,大小分别与木聚糖酶 Xyn32 和木糖苷酶 Xyl33 预期大小相一致。His-trap Ni affinity column 亲和层析进一步获得电泳纯的木聚糖酶 Xyn32 和木糖苷酶 Xyl33 重组蛋白,结果见图 1-A 和 1-B。

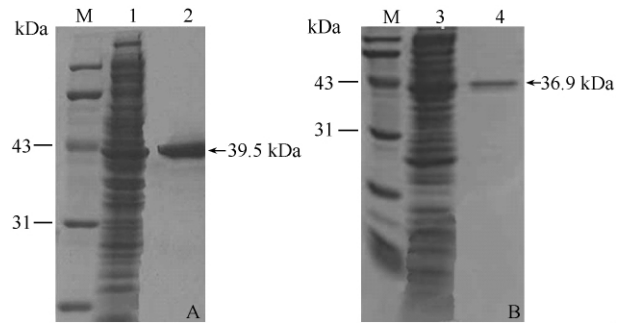


图 1 Xyn32 和 Xyl33 重组蛋白纯化

Fig. 1 Purification of recombinant protein Xyn32 and Xyl33. M: Protein Marker; 1: Supernatant of the extract of induced Xyn32; 2: Column fractions of the Xyl 32 sample; 3: Supernatant of the extract of induced Xyl33; 4: Column fractions of the Xyl33 sample.

**2.3 木聚糖酶和木糖苷酶酶学特性分析**

酶活分析结果显示(表 4),异源表达的木聚糖酶和木糖苷酶的最适反应温度均为 40°C,最适 pH 值均为 6,酶的比活力分别为 1.98 IU/mg 和 0.07 IU/mg(图 2)。木聚糖酶和木糖苷酶的最适温度和最适 pH 值与牦牛瘤胃中的环境条件相一致。

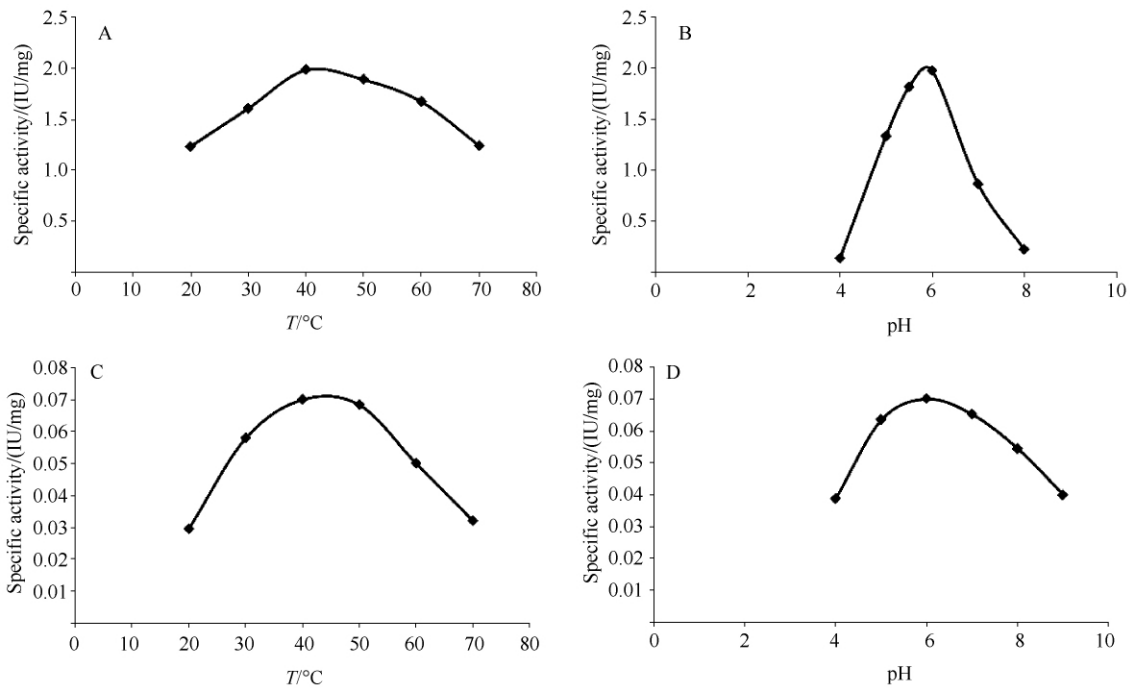


图 2 Xyn32 和 Xyl33 最适温度与 pH 值的测定

Fig. 2 The optimum temperature and pH value for Xyn32 and Xyl33. A ,B: The optimum temperature and pH for Xyn32 respectively; C ,D: The optimum temperature and pH for Xyl33 respectively.

序列分析显示,木聚糖酶 Xyn32 只有一个单独的 GH10 结构域,推测它是单一活性的木聚糖酶,而木糖

苷酶 Xyl33 的序列中有两个 GH43 结构域,推测其为双功能酶。分别对木聚糖酶 Xyn32 和木糖苷酶 Xyl33

进行了酯酶、脂肪酶、纤维素酶、阿拉伯呋喃糖苷酶和淀粉酶等活性检测。结果表明(表4),木聚糖酶

Xyn32 只表现木聚糖酶酶活 而 Xyl133 除具有木糖苷酶酶活外还表现出阿拉伯呋喃糖苷酶酶活。

表4 Xyn32 和 Xyl133 的酶学特性

Table 4 Characteristics of Xyn32 and Xyl133

Gene	Mr/kDa	pI	Opt. pH	Opt. T	Hydrolytic activity						
					xyn	xyl	amy	est	lip	cel	ara
Xyn32	39.5	6.09	6.0	40	+	-	-	-	-	-	-
Xyl133	36.9	4.76	6.0	40	-	+	-	-	-	-	+

xyn: xylanase; xyl: xylosidase; amy: amylase; est: esterase; lip: lipase; cel: cellulase; ara:  $\alpha$ -arabfuranglycosidase

基因 Contig212 - 00025 - 32 大小为1110 bp, 编码363个氨基酸残基的多肽。ExPASy Proteomics Server 工具预测该蛋白质的分子质量为39.5 kDa, 等电点为6.09。Signal P 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析显示, 该蛋白质含有可识别的信号肽序列; BLAST 分析表明, 该酶与其他木聚糖酶的氨基酸序列相似性为38% - 58%, 与其序列相似性最高的是 *Prevotella buccae* ATCC 33574 的 endo-1,4- $\beta$ -xylanase (GenBank 登录号 EFU31532)。它与 *Bacteroides xylanisolvens* 的木聚糖酶相似性为51%, 后者是一个GH10家族蛋白, 分离自人肠道, 对各种木聚糖和低聚木糖都具有降解活性, 能微弱降解羧甲基纤维素(CMC)<sup>[23]</sup>。与之相似的另一个蛋白是 *Glaciecola mesophila* KMM 241 的 endo- $\beta$ -1,4-xylanase (相似性为43%), 该酶最适温度为30 $^{\circ}$ C, 是一个严格的内切木聚糖酶, 作用底物为至少含4个糖基单元的木聚糖<sup>[24]</sup>。

ORF33 基因长为1020 bp, 编码326个氨基酸残基的蛋白质, 预测蛋白质分子质量为36.9 kDa, 等电点为4.76。BLAST 相似性比对分析显示, 与该木糖苷酶相似的为各种细菌的木糖苷酶, 相似性约为46% - 79%, 其中最相似(79%)的是来自 *Prevotella ruminicola* 23 的木糖苷酶 (GenBank 登录号 ADE1401), 该酶同时具有木糖苷酶和  $\alpha$ -N-阿拉伯呋喃糖苷酶活性 (xylan 1,4- $\beta$ -xylosidase/ $\alpha$ -N-arabinofuranosidase)。已发现不少木糖苷酶具有阿拉伯呋喃糖苷酶活性<sup>[25-26]</sup>。

#### 2.4 木聚糖酶 Xyn32 与木糖苷酶 Xyl133 的协同作用

我们在木聚糖酶 Xyn32 的酶解反应液中, 加入木糖苷酶 Xyl133, 并测定前者比活的变化, 以研究木糖苷酶对木聚糖酶的协同作用。结果显示(图3-A), 加入木糖苷酶 Xyl133 后, 与对照相比, 木聚糖酶

Xyn32 降解木聚糖的活力提高了3倍, 表明木糖苷酶对木聚糖酶降解木聚糖具有协同作用。用 TLC 法检测两个酶共同作用的降解产物表明, 木糖苷酶单独不能水解木聚糖, 木聚糖酶单独作用于木聚糖的产物多为木二糖和木寡糖。而2个酶共同作用的产物中, 木糖含量明显提高, 而木二糖和木寡糖的含量水平降低(图3-B)。证明了木糖苷酶在木聚糖酶降解木聚糖的过程中具有重要作用。

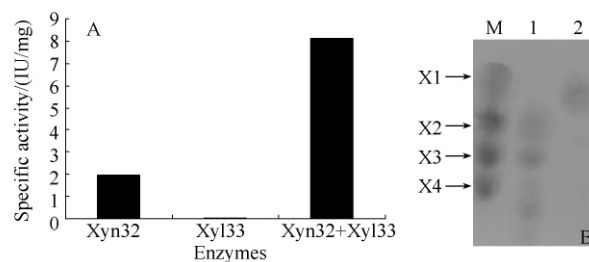


图3 Xyl133 木糖苷酶对 Xyn32 木聚糖酶的协同作用

Fig.3 Xyn32 and Xyl133 function synergistically to release xylose from xylan. A: Xylanase activity of different enzymes. B: TLC analysis of birchwood hydrolysis by Xyn32 and Xyn33. M, sugar standard, X1-X4 xylo-oligosaccharide; 1, hydrolysis products by Xyn32; 2, hydrolysis products with Xyl133 and Xyn32.

木聚糖酶和木糖苷酶的协同作用可提高木聚糖的降解效率以及木糖、阿拉伯糖等单糖的获得率, 具有重要的工业应用价值。Kambourova 等曾将 *Anoxybacillus flavithermus* 的高温木聚糖酶与古菌 *Sulfolobus solfataricus* 的高温双酶活木糖苷酶/阿拉伯糖苷酶进行体外组合, 通过它们之间的协同作用, 将木聚糖降解为木糖和阿拉伯糖<sup>[27]</sup>。Dodd 等<sup>[1]</sup> 从瘤胃 *Prevotella ruminicola* 23 的基因组中得到一个木聚糖降解基因簇, 发现其中的木聚糖酶 (GH10) 兼有阿魏酸酯酶活性, 是一个双功能酶, 与其基因下游的木糖苷酶 (GH3) 在降解木聚糖时也存在协同作用, 在 *Prevotella ruminicola* B<sub>1</sub>4 菌株中这种协同作用则由 GH10 - GH43 两个串联的糖苷水解酶完成。

本研究通过元基因组 BAC 克隆文库获得的结果,也证实了 GH10 - GH43 家族两类酶的协同作用。

### 3 结论

牦牛瘤胃 BAC 克隆文库中获得的木聚糖酶主要为 GH10 家族,编码它们的基因在基因组上常与木糖苷酶基因相邻,对其中一组串联的木聚糖酶 Xyn32 和木糖苷酶 Xyl33 的体外异源表达分析显示,这两个酶在木聚糖降解过程中具有协同作用,木糖为它们降解后的主要产物,因此推测两个酶蛋白编码基因相邻(成簇)是其协同作用的遗传学基础。获得的具有协同作用的木聚糖酶和木糖苷酶,由于来自同一生境,具有相似的最适 pH 和最适温度,易于组成降解复合酶制剂,具有潜在的应用前景。

致谢 本研究中序列测定和分析是在中国科学院青岛能源与过程研究所徐健老师研究员和曾晓维博士、南方基因研究中心郑华军博士、中国科学院北京基因组研究所胡松年研究员和骆迎峰博士、以及中国科学院微生物研究所刘翟博士的大力协助下完成的。酶活性筛选和克隆表达还得到了中国科学院微生物研究所何永志老师、宋磊博士、苏小运博士和顾淳、畅磊、任菲、李劲亭等同学的帮助,在此表示衷心感谢。

### 参考文献

- [ 1 ] Dodd D , Kocherginskaya SA , Spies MA , Beery KE , Abbas CA , Mackie RI , Cann IK. Biochemical analysis of a  $\beta$ -D-xylosidase and a bifunctional xylanase-ferulic acid esterase from a xylanolytic gene cluster in *Prevotella ruminicola* 23. *Journal of Bacteriology* 2009 , 191(10) : 3328-3338.
- [ 2 ] Emami K , Topakas E , Nagy T , Henshaw J , Jackson KA , Nelson KE , Mongodin EF , Murray JW , Lewis RJ , Gilbert HJ. Regulation of the Xylan-degrading Apparatus of *Cellvibrio japonicus* by a Novel Two-component System. *The Journal of Biological Chemistry* 2009 , 284(2) : 1086-1096.
- [ 3 ] Lynd LR , Weimer PJ , Van Zyl WH , Pretorius IS. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2002 , 66(3) : 506-577.
- [ 4 ] Aro N , Pakula T , Penttila M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by *filamentous fungi*. *FEMS Microbiology Reviews* 2005 , 29(4) : 719-739.
- [ 5 ] Van Peij NNME , Gielkens MMC , De Vries RP , VisserJ , De Graaff LH. The transcriptional activator xlnR regulates both xylanolytic and endoglucanase gene expression in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology* ,1998 , 64(10) : 3615-3619.
- [ 6 ] Sorensen H. Xylanase in the soil and the rumen. *Nature* ,1955 ,176(4471) : 74.
- [ 7 ] Polizeli MLTM , Rizzatti ACS , Monti R , Terenzi HF , Jorge JA , Amorim DS. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied of Microbiology and Biotechnology* 2005 , 67(5) : 577-591.
- [ 8 ] Bergquist P , Te' o V , Gibbs M , CziferszkyA , De Faria FP , Azevedo M , Nevalainen H. Expression of xylanase enzymes from thermophilic microorganisms in fungal hosts. *Extremophiles* 2002 6(3) :177-184.
- [ 9 ] Wang G , Luo H , Meng K , WangY , Huang H , Shi P , Pan X , Yang P , Diao Q , Zhang H , Yao B. High genetic diversity and different distributions of glycosyl hydrolase family 10 and 11 xylanases in the goat rumen. *Plos One* , 2011 6(2) :1-10.
- [10] Miller MEB , Antonopoulos DA , Rincon MT , Band M , Bari A , Akraiko T , Hernandez A , Thimmapuram J , Henrissat B , Coutinho PM , Borovok I , Jindou S , Lamed R , Flint HJ , Bayer EA , White BA. Diversity and strain specificity of plant cell wall degrading enzymes revealed by the draft genome of *ruminococcus flavefaciens* FD-1. *Plos One* 2009 , 4(8) :e6650.
- [11] An D , Dong X , Dong Z. Prokaryote diversity in the rumen of yak (*Bos grunniens*) and Jinnan cattle (*Bos taurus*) estimated by 16S rDNA homology analyses. *Anaerobe* ,2005 , 11(4) :207-215.
- [12] Lindeboom N , Wanasundara PKJPD. Interference of phenolic compounds in *Brassica napus* , *Brassica rapa* and *Sinapis alba* seed extracts with the Lowry protein assay. *Food Chemistry* ,2007 , 104(1) : 30-38.
- [13] 李卫芬 孙建义. 木聚糖酶的特性研究. 浙江大学学报(*Journal of Zhejiang University*) 2001 , 27(1) : 103-106.



- [14] 江正强, 杨绍青, 朱会芳, 王岚. 嗜热拟青霉木糖苷酶的性质及其与木聚糖酶的协同作用. *食品与发酵工业 (Food and Fermentation Industries)*, 2008, 34(7): 12-16.
- [15] 石波, 李里特. 玉米芯酶法制取低聚木糖的研究. *中国农业大学学报 (Journal of China Agricultural University)*, 2001, 6(2): 92-95.
- [16] Ito T, Yokoyama E, Sato H, Ujita M, Funaguma T, Furukawa K, Hara A. Xylosidases associated with the cell surface of *penicillium hurquei* IFO 4674. *Journal of Bacteriology* 2003, 96(4): 354-359.
- [17] 王红贵, 武振军, 蔡恒, 吴启赐, 石楠. 微生物发酵产木聚糖酶研究进展. *中国生物工程杂志 (China Biotechnology)*, 2010, 30(2): 141-146.
- [18] Hess M, Sczyrba A, Egan R, Kim TW, Chokhawala H, Schroth G, Luo S, Clark DS, Chen F, Zhang T, Mackie RI, Pennacchio LA, Tringe SG, Visel A, Woyke T, Wang Z, Rubin EM. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. *Science*, 2011, 331:463-467
- [19] Brulc JM, Antonopoulos DA, Miller MEB, Wilson MK, Yannarell AC, Dinsdale EA, Edwards RE, Frank ED, Emerson JB, Wacklin P, Coutinho PM, Henrissat B, Nelson KE, White BA. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(6): 1948-1953.
- [20] Stevenson MD, Weimer PJ. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Applied of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75:165-174.
- [21] 王文雅, 刘卿, 傅晓蕾, 袁其朋. 木聚糖降解酶系基因代谢调控研究进展. *中国生物工程杂志 (China Biotechnology)*, 2009, 29(6): 143-150.
- [22] Gasparic A, Martin J, Daniel AS, Flint HJ. A xylan hydrolase gene cluster in *Prevotella ruminicola* B<sub>4</sub>: sequence relationships, synergistic interactions, and oxygen sensitivity of a novel enzyme with exoxylanase and  $\beta$ -(1, 4)-xylosidase activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(8):2958-2964.
- [23] Mirande C, Mosoni P, Béra-Maillet C, Bernalier-Donadille A, Forano E. Characterization of Xyn10A, a highly active xylanase from the human gut bacterium *Bacteroides xylanisolvens* XB1A. *Applied of Microbiology and Biotechnology* 2010, 87(6):2097-2105.
- [24] Guo B, Chen X, Sun C, Zhou B, Zhang Y. Gene cloning, expression and characterization of a new cold-active and salt-tolerant endo- $\beta$ -1, 4-xylanase from marine *Glaciecola mesophila* KMM 241. *Applied of Microbiology and Biotechnology* 2009, 84(6):1107-1115.
- [25] Shao W, Wiegel J. Purification and characterization of a thermostable  $\beta$ -Xylosidase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(18): 5848-5853.
- [26] Tyson JW, Chapman J, Hugenholtz P, Allen EE, Ram RJ, Richardson PM, Solovyev VV, Rubin EM, Rokhsar DS, Banfield JF. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 2004, 428: 37-43.
- [27] Kambourova M, Mandeva R, Fiume I, Maurelli L, Rossi M, Morana A. Hydrolysis of xylan at high temperature by co-action of the xylanase from *Anoxybacillus flavithermus* BC and the  $\beta$ -xylosidase/ $\alpha$ -arabinosidase from *Sulfolobus solfataricus* O<sub>α</sub>. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102: 1582-1593.

## Analysis of xylanases derived from the metagenomic BAC clone library of yak rumen

Min Wang<sup>1,2</sup>, Furong Chen<sup>1,3</sup>, Shan Zhang<sup>1</sup>, Yaxin Zhu<sup>1</sup>, Xiuzhu Dong<sup>1</sup>,  
Li Huang<sup>1</sup>, Ruihua Tian<sup>2</sup>, Zhiyang Dong<sup>1\*</sup>, Xin Dai<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Microbial Resource, the Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

<sup>2</sup> College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China

<sup>3</sup> College of Chemical Engineering, Inner Mongolia University of Technology, Huhhot 010051, China

**Abstract:** [Objective] The diversity of rumen microbial xylanases and their degradation characteristics were studied and the resources of new xylanases genes and enzymes were provided. [Methods] According to the result of the high-throughput sequencing of the rumen microbial metagenome bacterial artificial chromosome (BAC) clones library, the diversity of xylanase genes was analyzed and screened. Then one xylanase and its downstream xylosidase gene screened was cloned and expressed in *Escherichia coli*. The enzyme characterization of the recombinant xylanase and xylosidase and their synergistic effect were studied. [Results] All 14 xylanases screened from the library belong to GH10 family proteins. These xylanases shared the amino acid sequence similarity between 20.5% and 91.3%. Intriguingly, 7 xylanase genes in different contigs were found to be followed by xylosidase gene. The specific enzyme activity of the xylanase (Xyn32) was 1.98 U/mg and no ferulic acid esterase activity was detected. The specific enzyme activity of the coupled xylosidase (Xyl33) was 0.07 IU/mg, and xylosidase (Xyl33) also displayed the activity of arabinofuranosidase. In addition, the *in vitro* experiment confirmed the synergistic effect between the coupled xylanase and xylosidase.

**Keywords:** yak rumen, bacterial artificial chromosome (BAC) clone library, xylanase, xylosidase, synergistic effect

(本文责编:张晓丽)

---

Supported by the National Key Basic Research Program of China (2011CB100800), by the National Natural Science Foundation of China (30770053) and by the Project of Knowledge Innovation of Chinese Academy of Sciences (KSCX1-YW-41B1)

\* Corresponding authors. Xin Dai, Tel: +86-10-64807418, Fax: +86-10-64807429, E-mail: daixin@im.ac.cn; Zhiyang Dong, Tel: +86-10-64807337, Fax: +86-10-64807337, E-mail: dongzy@im.ac.cn

Received: 26 March 2011/Revised: 7 June 2011