

# 交替假单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.) DY3 菌株 产内切葡聚糖酶的性质研究及基因克隆

熊鹏钧 文建军\*

(国家海洋局第三海洋研究所 海洋生物工程重点实验室 厦门 361005)

**摘 要** 从深海样品 ES0109 中分离到一株具有高内切葡聚糖酶活力的细菌 DY3, 16SrDNA 序列分析表明该菌与交替假单胞菌属(*Pseudoalteromonas* sp.) 的 *Pseudoalteromonas citrea* 和 *Pseudoalteromonas elyakovii* 的同源性为 99%。PCR 扩增 DY3 的内切葡聚糖酶基因 *celX* 全长 1479bp, 编码一个 492AA 的蛋白质。酶的氨基酸序列分析表明 *CelX* 与 *Pseudoalteromonas haloplanktis* 的内切葡聚糖酶 *CelG* 有 95% 的相似性, 包括一个糖基水解酶家族 5 的催化结构域, 一个连接序列和位于 C 端的 CBM5 结构域。对酶性质的初步研究发现, *CelX* 的最适温度为 40 °C, 酶的最适 pH 在 6 ~ 7 之间。

**关键词** 交替假单胞菌 DY3 菌株, 耐冷菌, 内切葡聚糖酶, 纤维素酶, 基因克隆

中图分类号 Q87 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)02-0233-05

纤维素是最为丰富的天然多聚物, 主要由 D-葡萄糖通过  $\beta$ -1, 4-糖苷键连接形成的线状多聚物, 有望成为食品和工业原料的来源, 而且纤维素是可再生的碳源和能源, 所以对纤维素分解的研究一直吸引着众多的研究人员。纤维素酶可以应用在工业和生物技术领域的许多方面, 一个成功的应用是作为洗涤剂添加剂<sup>[1]</sup>。由于洗涤剂一般作用于温度不高和偏碱性的环境, 因此适用于这一领域的纤维素酶必须在碱性和低温条件下有较高的活性。

纤维素酶广泛分布, 但到目前为止, 未见有关深海样品低温纤维素酶的报道。本文报道一株深海交替假单胞菌的分离及其低温碱性内切葡聚糖酶性质的初步研究和酶基因的克隆及序列分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

实验所用样品采自西太平洋暖池深海底部 5000m (N 8°21'07", W145°19'29") 沉积物, 样品编号为 WS0109。

1.1.2 2216E 培养基: 蛋白胨 5g, 酵母膏 1g, 硫酸

亚铁  $\text{FeSO}_4$  0.01g, 海水 1L。

1.1.3 筛选培养基: 羧甲基纤维素 10g, 硫酸亚铁  $\text{FeSO}_4$  0.01g, 酵母膏 1g, 海水 1L, 琼脂 20g。

1.1.4 发酵培养基: 羧甲基纤维素 10g, 蛋白胨 5g, 酵母膏 1g, 硫酸亚铁  $\text{FeSO}_4$  0.01g, 海水 1L。

1.1.5 菌种和质粒: *E. coli* DH5 $\alpha$  为本室保存, T-载体购自 Promega。

1.1.6 试剂: 刚果红 (congored), 羧甲基纤维素 (carboxymethylcellulose) 购自 Sigma, GENECLEAN II 核酸纯化试剂盒购自 BIO101, *Taq* 酶等 PCR 用品购自 MBI, 其他为国产分析纯试剂。

### 1.2 方法

1.2.1 内切葡聚糖酶产生菌株的筛选: 在 1.5 mL 灭菌离心管中用灭菌海水将样品混匀, 静置后取上清 100  $\mu$ L 涂布初筛培养基平板, 置于 8 °C 培养 7d。影印平板后用 1% 刚果红对原平板染色 30min, 然后用 5% NaCl 脱色 30min, 挑选周围有透明或浅色圈最大的菌落, 保种备用, 记做 DY3。

1.2.2 染色体 DNA 的提取及核酸操作: 参照文献 [2, 3]。

1.2.3 16S rDNA 的扩增和克隆: 使用通用引物<sup>[4]</sup>

收稿日期 2003-09-18, 修回日期 2004-01-02。

基金项目 国家大洋协会项目 (No. 4-2-4)。

\* 通讯作者。Tel 86-592-2195303; Fax 86-592-2085376; E-mail: wenjian6308@yahoo.com.cn

fdI(5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3')和 rP2(5'ACG-GCTACCTTGTACGACTT3') (上海生工合成)。PCR 扩增细菌 16S DNA。扩增参数为 95℃ 2min, 然后以 94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 2min 为一个循环, 共进行 30 个循环。PCR 产物经 GENECLAN II KIT 纯化后连接到 T-载体, 转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 得到含有 16S rDNA 的转化子 pT-rDY3。

**1.2.4 粗酶制备** :DY3 接种到 2L 发酵培养基, 25℃ 200r/min 培养 2d, 将培养物于 4℃, 10 000g 离心 30min, 取上清, 加硫酸铵至 90% 饱和度, 4℃ 冰箱过夜。离心取沉淀, 加 50mmol/L (pH 8.0) 的磷酸盐缓冲液透析过夜, 浓缩到 4mL。

**1.2.5 纤维素酶活力测定** :酶活力按文献 [5] 中羧甲基纤维素酶(CMCase)活力测定法进行。酶活力单位定义为每分钟催化底物产生 1 $\mu$ mol 葡萄糖作为一个活力单位。

**1.2.6 酶的最适温度测定** :在 1.5mL 离心管中混匀 360 $\mu$ L 含 1% CMC 的 50mmol 磷酸盐 (pH 8.0) 缓冲液和 40 $\mu$ L 粗酶液, 于不同温度下测定酶活力。

**1.2.7 酶的热稳定性测定** :将 40 $\mu$ L 粗酶液在不同温度下保温 60min 后, 与 360 $\mu$ L 含 1% CMC 的 50mmol 磷酸盐 (pH 8.0) 缓冲液混匀, 在 40℃ 测酶活。

**1.2.8 酶的最适 pH 测定** :在 1.5mL 离心管中混匀 360 $\mu$ L 含 1% CMC 的不同 pH 缓冲液 (pH 4 ~ 5 醋酸-醋酸钠缓冲液, pH 6 ~ 7 磷酸钠缓冲液, pH 8 ~ 10 硼酸缓冲液) 和 40 $\mu$ L 粗酶液, 于 40℃ 测定酶活力。

**1.2.9 酶的 pH 稳定性测定** :分别将 40 $\mu$ L 粗酶液和 120 $\mu$ L 不同 pH 的缓冲液混匀, 于 0℃ 保温 60min 后加入 240 $\mu$ L 含 1.5% CMC 的同样缓冲液, 在 40℃ 测定酶活力。

**1.2.10 内切葡聚糖酶基因 *celX* 的克隆** :参考 GenBank 存放序列 [6], 设计引物 (celX-fB :5'GGATCCAT-GAATAACAGTTCAAATAATCACAA3', celX-rN :5'GCTAGCTTAATTACAAGTATAA AGAAGCGTCC3', 上海生工合成)。以基因组 DNA 为模板, 使用高保真 Taq 酶扩增基因 *celX*。PCR 反应体系是 :Buffer 10 $\mu$ L, dNTP10 $\mu$ L, 引物各加 10 $\mu$ mol, Mg<sup>2+</sup> 浓度为 1mmol/L, Taq 聚合酶 2u/100 $\mu$ L, 补 ddH<sub>2</sub>O 到 100 $\mu$ L。反应条件 :95℃ 2min, 然后以 94℃ 30s, 52℃ 30s, 72℃ 2min 为一个循环, 共进行 30 个循环。产物由 BIO101 的 GENECLAN II KIT 纯化后按 3 :1 连接到 Promega 的 T-载体, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 通过菌落 PCR 筛选含有纤维素酶基因 *celX* 的克隆, 得到转化子 pT-*celX*。

**1.2.11 核酸测序及同源性分析** :上海生工完成 pT-rDY3 和 pT-*celX* 的测序及拼接工作, 序列同源性分析在 NCBI 网站完成。

## 2 结果

### 2.1 低温纤维素酶产生菌的筛选

在平均温度 8℃ 的冷室中, 以羧甲基纤维素为单一碳源的筛选培养基平板上一共上找到 6 株分泌胞外纤维素酶的菌株, 取其中水解圈最大的作为试验菌, 记为 DY3。

### 2.2 DY3 的 16S rDNA 分析

以 DY3 基因组 DNA 为模板, 16S rDNA 通用引物扩增出 1.5kb 带, 测序拼接后搜索 GenBank, 发现它与 *Pseudoalteromonas* sp. 的许多成员相似性达 98%, 与 *Pseudoalteromonas citrea* 和 *Pseudoalteromonas elyakovii* 的同源性高达 99%。因此将所分离的耐冷菌归为交替假单胞菌属 (*Pseudoalteromonas* genera), 命名为 *Pseudoalteromonas* sp. DY3 菌株。16S rDNA 的 GenBank 注册号为 :AY170899。参考 DY3 的 16S rDNA 在 GenBank 的比较结果, 利用 RDP II 构建系统发育树 (图 1)。

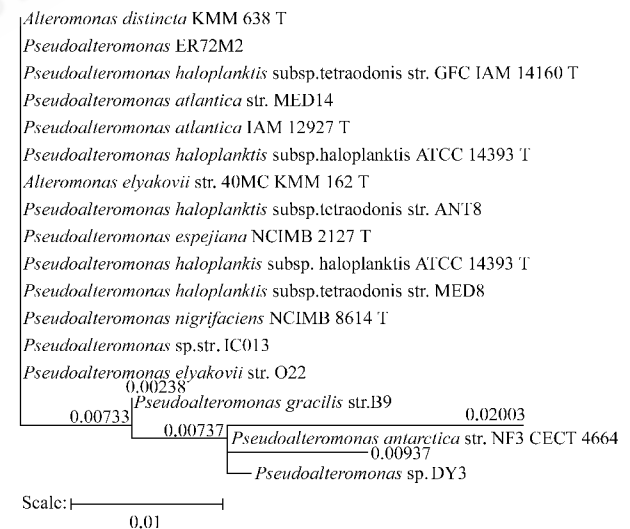


图 1 DY3 菌株 16S rDNA 系统发生树

Fig.1 16S rDNA phylogenetic tree of DY3 strain

### 2.3 DY3 菌株所产内切葡聚糖酶的性质

图 2 是 DY3 菌株所产内切葡聚糖酶的酶活与温度关系和酶的热稳定性曲线图, 显然酶作用的最适温度为 40℃, 20℃ 时酶的相对活力为 60%, 60℃ 时仅为 30%。该酶在 20℃ 时稳定性最好, 保温 60min 后仍有 98% 活力, 随着温度的升高稳定性下降, 50℃ 保温 60min 后, 剩余活力不到 10%, 55℃ 时

酶极不稳定,保温 60min 后活力丧失。

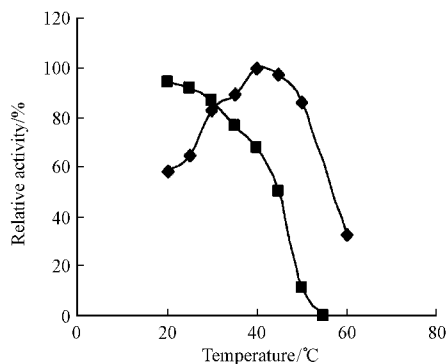


图2 温度对酶活力(◆)及稳定性(■)的影响

Fig.2 Effect of temperature on activity(◆) and stability(■) of the enzyme

图3是酶的最适 pH 曲线及其 pH 对酶稳定性的影响,该酶的最适 pH 在 6~7 之间,pH9 时相对活力为 73%,pH10 时为 63%。pH 对酶的稳定性的影响与 pH 对酶活力的影响基本一致。在 pH9 的缓冲液中处理 60min 后酶活还有 64.3%,在 pH10 的缓冲液中处理 60min 后酶活还有 37.6%,这说明该酶有一定程度的耐碱性。

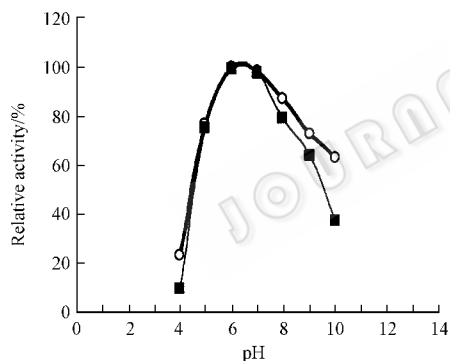


图3 pH 对酶活力(○)及稳定性(■)的影响

Fig.3 Effect of pH on activity(○) and stability(■) of the enzyme

## 2.4 交替假单胞菌 DY3 内切葡聚糖酶基因 *celX* 的克隆和测序

PCR 扩增的产物大小在 1.3~1.5kb 之间(图4)纯化后连接到 T 载体(3kb)上,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  培养过夜。经 *Bam*H I 和 *Nhe* I 双酶切鉴定正确后(图5)测序,获得 *celX* 的全长核酸序列,GenBank 注册号为 AY250997。

## 2.5 氨基酸序列分析

使用 DNAMAN 软件对全长 ORF 为 1479bp 的 *celX* 基因进行分析。*celX* 基因编码一个由 492 个氨基酸残基组成、分子量预计为 52744D 的蛋白质 CelX,其理论 pI 为 4.05。通过比较发现,CelX 与

*Pseudoalteromonas haloplanktis* 的内切葡聚糖酶 CelG 有 95% 的相似性(图6)。

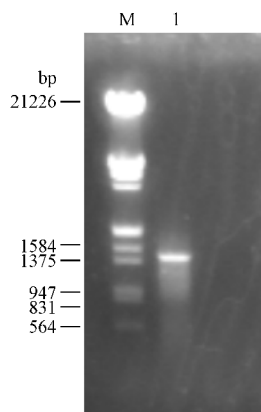


图4 PCR 扩增内切葡聚糖酶基因 *celX*

Fig.4 Amplification of endoglucanase gene

M  $\lambda$ DNA/*Eco*R I + *Hind*III ;

I : PCR product of *CelX*

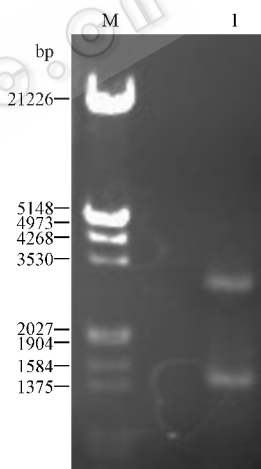


图5 重组质粒 pT-*celX* 的酶切鉴定

Fig.5 Digestion pattern of recombinant plasmid pT-*celX*

M  $\lambda$ DNA/*Eco*R I + *Hind*III ;

I : double digestion of recombinant plasmid pT-*celX* with *Bam*HI and *Nhe*I

通过 NCBI 的保守结构域检索,*celX* 编码的内切葡聚糖酶 CelX 有一个位于 N 端 33AA 到 323AA 之间、属于糖基水解酶家族 5 的催化结构域和一个位于 C 端的碳水化合物结合模块,两者通过富含脯氨酸、丝氨酸和苏氨酸的连接序列相连<sup>[6]</sup>。

比较催化结构域(图7),发现 *celX* 编码的酶和 *Erwinia Chrysanthemi* 的 Chain A、B、C 相似性为 64%; 跟 *Pectobacterium chrysanthemi* 的 endo-1,4-beta-glucanase precursor 和 *Pseudomonas* sp. ND137 的 cellulase 以及 *Cellvibrio cellulosa* 的 endo-1,4-beta-glucanase 的相似性为 61% 跟 *Cellvibrio mixtus* 的 cellulase B 的相

```

CLUSTAL multiple sequence alignment
Identity=95.75%
CelG_p      MNNSSNNHKKRDFKVASLSLALLLGCSTMANAAVEKLTVSGNQILAGGENTSFAAGPSLFW
CelX_p      MNNSSNNHKKRDFKVASLSLALLLGCSTMANAAVEKLTVSGNQILAGGKNTSFAAGPSLFW
*****
CelG_p      SNTGWGAEKFYTAETVAKAKTEFNATLIRAAIGHGTSTGGSLNFDWEGNMSRLDITVNVAA
CelX_p      SNTGWGAEKFYTAETVAKAKTEFNATLIRAAIGHGTSTGGSLNFDWEGNMSRLDITVNVAA
*****
CelG_p      IAEDMYVIIDFHSHEAHTDQATAVRFFEDVATKYGQYDNNVIEIYNEPLQISWVNDIKPY
CelX_p      ISEDMYVIIDFHSHEAHTDQATAVRFFEDVATKYGQYDNNVIEIYNEPLQISWVNDIKPY
*****
CelG_p      AETVIDKIRAIIDPNDLIVVGTPTWSQDQVVASQNPIDRANIAITLHFYAGTHGQSYRNKA
CelX_p      AETVINKIRAIIDPNDLIVVGTPTWSQDQVVASQNPIDRANIAITLHFYAGTHGQSYRNKA
*****
CelG_p      QTALDNGIALFATEWGTVNADGNGGVNINETDAWMAFFKTNNISHANWALNDKNEGASLF
CelX_p      QTALDNGIALFATEWGTVNADGNGGVNINETDAWMAFFKTNNISHANWALNDKNEGASLF
*****
CelG_p      TPGGSWNSLTSSGSKVKEIIQGGWGGSSNVLDLSDGDGVSDSLQCNMTPAGTTVDSIGC
CelX_p      TPGGSWNSLTASGTVKVEIIQGGWGG--STIALDSDGDGSDSDNDQCDNTPAGTTVDSIGC
*****
CelG_p      AVTDSADGISTDNVDQCPNTPVGTPTVNNVGCVEVVEVPEQSDADNDGVNDDIDQCPDTPAG
CelX_p      AVTDSADGISTDSVDQCPNTPAGTPTVNNVGCVEVVEVPEQSDVDNDGVNDDIDQCPDTPAG
*****
CelG_p      TSVDINGCSVVSSTDCNGINAYPNVWNKDYSGGPFTHNNTDDKMQYQGNAYSANUYTNSL
CelX_p      TSVDINGCSVVSSTDCNGINTYPNVWNKDYSDGPFTHNNTDDKMQYQGNAYSANUYTNSL
*****
CelG_p      PGSDASWTLTYTCN
CelX_p      PGSDASWTLTYTCN
*****

```

图 6 CelG 与 CelX 的氨基酸序列比较

Fig.6 Comparison of amino acid sequences between CelG and CelX

PSEUDOMONAS_SP22	.ASMTNADVAPISTNGNQLFGGAVDSVAGPSLFWSNMNGGGEKFNAGAVASAOQDWNAEIIPRAAMGVDEP.GGYL.ED	77
CELLVIBRIO_CELLU	...aqADVAPISvqGNkILanGqpaSfeGmSLFWsntEUGGEKYNAqVswlksDWNaklVRAAMGVede.GGYL.tD	74
CELLVIBRIO_MIXTU	fcStalaaVpaIcqvqGNkVlvGGksvSleGvSLFWsntGUGaEKFYtAaaVkrAktefNAnIIPAAIChgEg.GGig,dD	78
PECTOBACTERIUM_C	.....sVePISvNGNkiyaGekakSfAGnSLFWsNWGU GgkKFYtAdtVASlkkkWksIvRAAMGVQEs.GGYL.qD	72
EGZ_B	.....sVePISvNGNkiyaGekakSfAGnSLFWsNWGU GGEKFYtAdtVASlkkdWksIvRAAMGVQEs.GGYL.qD	71
CelX	.....aVekitvsGNQILaGGkntSfAGPSLFWsntGUGaEKFYtAetVAKaktefNAtIIPAAIChgtstGGsLnfd	73
Consensus	v gn s g slfwn og kya v raag gg d	
PSEUDOMONAS_SP22	ASANLNRVAVVDAAILANDMYVIIDWHSShAhqYqsqAiaFFQeMArkYgannhVIEIYNEPLQVVSUNTIKPYAEQVI	157
CELLVIBRIO_CELLU	p.AnkdrVtqvVDAAILANDMYVIIDWHSShAhqYqsqAiaFFQeMArkYgannhVIEIYNEPLQVVSUNTIKPYAEQVI	153
CELLVIBRIO_MIXTU	wngNmaRldtViqAAIGNDMYVIIDVYHSHkAhenwgsAeaFFkQvAqkwGQhNVIEIYNEPLGvDuhsvIKPYAEhVg	158
PECTOBACTERIUM_C	pagNkakVerVVDAAAILANDMYVIIDWHSShAknmrseAieFFQeMArkYgdkpNVIEIYNEPLQVVSUNTIKPYAEaVI	152
EGZ_B	pagNkakVerVVDAAAILANDMYVIIDWHSShAknmrseAieFFQeMArkYgdkpNVIEIYNEPLQVVSUNTIKPYAEaVI	151
CelX	segNmsRldtVvNaaIseDMYVIIDFHSHEAhtdqatAVrFFedvAtkYGQyDNNVIEIYNEPLQISWvNdIKPYAEtVI	153
Consensus	n v aai dmy i hsh a aff a g viye ynepl w kpya v	
PSEUDOMONAS_SP22	GAIRAIDPNDLIVVGTPTWSQDQVDAANDPITNYNNIAYTLHFYAGTHQYLRDKAQYALDMGIPLFVTEGTVNANGDG	237
CELLVIBRIO_CELLU	aAIRAIIDPNDLIIvGTPTWSQDQVDAANDPITgYqNIAYTLHFYAGTHgQYLRDKAQQtAlnrGIaLFVTEGwSVNANGDG	233
CELLVIBRIO_MIXTU	GkIRAIIDPNDLIIimGTpNWSQDQVdAstnkan,vENIAYTLvHFYAdshrgsYRaKaQtAlnGaaLFaTEWGVghANGrG	237
PECTOBACTERIUM_C	sAIRAIIDPNDLIIvGTpSWSQnVDeAsrDPIn.akNIAYTLHFYAGTHgesLRnKArqAlnGaaLFVTEGTVNAdGnG	231
EGZ_B	sAIRAIIDPNDLIIvGTpSWSQnVDeAsrDPIn.akNIAYTLHFYAGTHgesLRnKArqAlnGaaLFVTEGTVNAdGnG	230
CelX	nkIRAIIDPNDLIVVGTPTWSQDQVdvsqnpId.raNIAYTLHFYAGTHGQsYrNKAQtAlbnGIaLFaTEWGTVNAdGnG	232
Consensus	ira dpdnli gtp esq v d a n ayt hfya h r ka al g lf tewg a g g	
PSEUDOMONAS_SP22	GVAYNETNTWHDfLkANNISHANWALNDKAEgSSALVtGTNPsgNWADnQYtASGTfVRDlVRDw	302
CELLVIBRIO_CELLU	aVAnsETNaUvsFmRtNhIIsnANWALNDKVEGaSALVpGa sanGgUvnsQITASGalaksIisgW	298
CELLVIBRIO_MIXTU	tVnhaETwaWiDFLRAnGISHAgWafhdKerdqatgeveTs.SifWADgslkeSGrFVkeIag.	300
PECTOBACTERIUM_C	GvNqtETdaUvtFmrDNnIsnANWALsDKnEGaStyypdsI.....nITeSgkVksIiqsW	288
EGZ_B	GvNqtETdaUvtFmrDNnIsnANWALNDKNEGaStyypdsK.....nITeSgkVksIiqsW	287
CelX	GvNIETdaWMAfRtNNISHANWALNDKNEGaSlftpGgswn.....sITASGTVkeliqgW	291
Consensus	v et w i n is a wa dk sq l	

图 7 DY3 菌株的内切葡聚糖酶催化结构域氨基酸序列的比较

Fig.7 Comparison of the amino acid sequence of catalytic domains among CelX and endoglucanases

Pseudomonas sp22 cellulase from *Pseudomonas* sp. ND137 , Cellvibrio cellul 'endo-1 A'-beta-glucanase from *Cellvibrio cellulose* ,Cellvibrio mixtu 'cellulase B from *Cellvibrio mixtus* ;EGZ-B1-287 'Chain B of cel5 from *Erwinia Chrysanthemi* ;Pectobacterium-c 'endo-1 A'-beta-glucanase precursor from *Pectobacterium chrysanthemi* ; CelX 'Cellulase from *Pseudoalteromonas* sp. DY3

似性为 58% 跟 *Pratylenchus penetrans* 的 beta-1 A-endoglucanase 的相似性为 46%。

### 3 讨论

低温微生物可以分为两类 :一类是其最高生长温度低于 20℃ 的微生物 ,称为嗜冷菌( psychro-

philes ) ;另一类是指能在 0~40℃ 可以生长的微生物 ,称为耐冷菌( psychrotrophs )。DY3 可以在 4℃ 生长 ,25℃ 为最适温度 ,超过 37℃ 不生长 ,表现出耐冷微生物的典型特征<sup>[7]</sup>。

CelX 与文献报道的来自 *Pseudoalteromonas haloplanktis* 的嗜冷纤维素酶 CelG<sup>[6]</sup>相比 ,两者的氨基酸

序列相似性虽然为 95.75% ;但在系统发育树上,与 *Pseudoalteromonas* sp. DY3 亲缘关系最近的不是 *Pseudoalteromonas haloplanktis*, 而是 *Pseudoalteromonas antarctica* str. NF3 CECT 4664, 其次是 *Pseudoalteromonas gracilis* str. B9。说明种属进化与具体某一分子进化并不同步,可能具体分子进化与生存环境关系更为密切。

大多数葡聚糖内切酶水解纤维素底物时,一般为酸性或中性偏酸性条件,而洗涤剂工业要求添加的纤维素酶为碱性或耐碱性纤维素酶。DY3 菌株分泌的内切葡聚糖酶在较广的 pH 范围内均有很高活性,在 pH9 时有 73% 的活性,而在 pH10 时仍有 63% 以上的活性。即使在 pH9 和 pH10 维持 60min, 仍然保留 64.3% 和 37.6% 的活性,这体现了该酶具有抗碱性,也说明本研究结果有一定的理论意义,更具有应用开发价值。

## Characterization and Gene Cloning of the Endoglucanase from *Pseudoalteromonas* sp. DY3 Strain

XIONG Peng-Jun WEN Jian-Jun\*

(The Key Laboratory of Marine Biotechnology, The Third Institute of Oceanography, SOA, Xiamen 361005, China)

**Abstract** A bacteria strain DY3 with high endoglucanase activity was isolated from deep sea sediment sample ES0109. The 16S rDNA sequence of DY3 exhibits identity of 99% with those of the same genus bacteria *Pseudoalteromonas citrea* and *Pseudoalteromonas elyakovii*. The *celX* gene of DY3 obtained by PCR method is 1479bp in length and encodes a protein of 492 amino acids. The protein encoded by *celX* gene exhibits 95% sequence identity with endoglucanase CelG from *Pseudoalteromonas haloplanktis*. There are two modules in the deduced amino acids sequence, a catalytic domain of glycosyl hydrolases family 5 at the N terminal and a carbohydrate binding domain at the C terminal which was linked to catalytic domain by a short linker. The optimal temperature of CelX is 40°C and the optimal pH was between 6 and 7.

**Key words** *Pseudoalteromonas* sp. DY3 strain, psychrotrophs, endoglucanase, cellulase, gene cloning

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Xiao CI(肖春玲), Xu CX(徐常新). Study on application of microbial cellulose. *Journal of Microbiology*(微生物学杂志), 2002, 22(2) 33-35
- [ 2 ] Fred Ausubel, Roger Brent, Robert E Kingston *et al.* Short Protocols in Molecular Biology, 3<sup>rd</sup> ed, John Wiley & Sons, Inc., 1995
- [ 3 ] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [ 4 ] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bac*, 1991, 173(2) 697-703
- [ 5 ] Qi YF(齐义鹏). Cellulases and their application. Chengdu Sichuan demotic Press(四川人民出版社), 1980
- [ 6 ] S'ebastien V, Richard H, Guillaume S *et al.* Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of a psychrophilic cell  $\mu$  Lase from *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Acta Cryst*, 2003, D59: 1256-1258
- [ 7 ] Zhu F(朱非), Wang S(王珊), Zhou PX(周培瑾) *et al.* Molecular mechanism of cold adapted enzymes and their applications in biotechnology. *Acta Microbiologica Sinica*(微生物学报), 2002, 42(5): 640-644

Received: 09-18-2003

This work was supported by Grant from China Ocean Mineral Resources R&D Association( No. 4-2-4 ).

\* Corresponding author. Tel 86-592-2195303; Fax 86-592-2085376; E-mail: wenjian6308@yahoo.com.cn