文章编号: 1673-1689(2011)03-0388-06

Aspergillus ficuum 内切菊粉酶基因在大肠杆菌中表达

陈晓明[1,2], 陈静[1], 陈寒青[1], 金征宇*[1], 徐学明[1]

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 3. 淮阴工学院 生命科学与化学工程学院, 江苏淮安 223001)

摘 要: 研究内切菊粉酶基因在大肠杆菌中表达, 利用基因工程的原理和方法, 将来源于 *Aspergillus ficuum* JNSP5-06 的内切菊粉酶基因(*endo*I) 克隆到 pET-28a(+), 并在大肠杆菌 BL21(DE3) 中进行表达。重组菌经 IPTG 诱导后对表达产物进行酶活检测和酶水解产物分析。结果表明已成功构建表达载体 pET28a-*endo*I, 表达后的粗酶活为 35 U/mL 发酵液; 重组酶水解菊粉的产物经 TLC 分析证实酶液具有内切菊粉酶活性, 水解产物主要为低聚二糖、三糖和四糖。为其应用和工业化生产奠定基础。

关键词: 内切菊粉酶基因; 克隆; 表达; 低聚果糖

中图分类号: Q 556.2 文献标识码: A

Expression of Endo-Inulinase gene from *Aspergillus ficuum* in *Escherichia coli*

CHEN Xiao-ming[1,2], CHEN Jing[1], CHEN Han-qing[1], JIN Zheng-yu*[1], XU Xue-ming[1]

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. School of Life Science and Chemical Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huaián, Jiangsu 223001, China;)

Abstract: In order to expand the industrial application of endo-inulinase, its gene from Aspergillus ficuum JNSP5-06 was cloned into the pET-28a(+) and expressed in *E. coli* BL21(DE3) and get a mutant strain. The mutant was induced by IPTG before the hydrolysis activity was measured and the product was analyzed. The expression vector pET28a-endoI was successfully obtained and the crude enzyme activity was 35 U/mL (fermentation broth). The hydrolysis product from the recombinant inulinase was identified by TLC analysis, indicating that endo-inulinase enzyme solution had activity and the major products were disaccharide, trisaccharide, and tetrasaccharide. These results suggested that the endo-inulinase gene has been successfully expressed in *E. coli* and significantly improved the endo-inulinase activity.

Key words: endo-inulinase gene, gene cloning, expression, oligosaccharide

收稿日期: 2010-05-30

基金项目: 食品科学与技术国家重点实验室 2008 年度目标导向项目(SKLF-MB-200804); 江苏省自然科学基金创新学者攀登项目(BK2008003)。

作者简介: 陈晓明(1969-), 女, 江苏淮安人, 教授, 主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究。
Email: hychenxm@yahoo.com.cn

* 通信作者: 金征宇(1960-), 男, 江苏扬州市人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究。Email: jinlab2008@yahoo.com

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

低聚果糖具有增殖人体内双歧杆菌, 抑制肠道沙门氏菌和腐败菌的生长, 促进肠胃功能, 防治便秘, 增加维生素的合成, 提高人体免疫功能, 控制血糖, 降低血脂等诸多调节功能和保健作用, 已经作为功能性配料应用于食品、医药行业。内切菊粉酶可以水解菊粉一步法生产高纯度低聚果糖, 具有巨大的工业应用潜力, 其实现的关键是要具备生产没有外切菊粉酶和转化酶活力的高效内切菊粉酶的技术。目前国内外研究者已从不同来源的微生物中分离到几十种菊粉酶[1], 但绝大多数的菌种所产菊粉酶都是混合酶。如: *A. ficuum*[2] 菊粉酶经纯化得到 8 种酶: 5 种外切酶和 3 种内切酶, 外切酶的相对分子量都为 74 000, 内切酶的相对分子质量都为64 000; 本实验室也从 *A. ficuum* JNSP5-06[3-4] 的粗酶液中分离纯化出 3 种外切酶和 2 种内切酶, 且内切酶与外切酶性质相似, 很难将内切酶从中分离纯化, 无法生产高纯度低聚果糖, 因此, 利用基因工程技术构建内切菊粉酶基因工程菌, 期望获得内切菊粉酶的表达, 以实现在工业生产中的应用。菊粉酶基因重组表达是当前菊粉酶研究热点之一。国外已报道了来源于无花果曲霉(*Aspergillus ficuum*)[5-7]、节杆菌(*Arthrobacter* sp.)[8]、克鲁维酵母(*Kluyveromyces*)[9-10]、青霉(*Penicillium*)[11-12]、黑曲霉(*Aspergillus niger*)[13-16]等菊粉酶基因的分子克隆、测序, 但到目前为止, 用内切菊粉酶基因构建的基因工程菌不是表达量低, 就是酶的专一性差, 用于低聚果糖的制备效果并不理想, 有必要继续深入研究。

大肠杆菌表达系统是目前最常用的外源蛋白表达系统。其生长周期短, 培养成本低廉, 代谢调控较为成熟, 在重组蛋白外源基因表达系统中占主导地位。本研究根据 Genbank 所报道的内切菊粉酶生物信息, 设计引物, 通过 PCR 技术从 *Aspergillus ficuum* JNSP5-06 野生菌中克隆内切菊粉酶基因 Endo I, 构建到原核高效表达载体 pET28a(+)上, 在 *E. coli* BL21(DE3)中得到高效诱导表达, 并进一步对重组蛋白进行纯化和酶学性质研究, 为内切菊粉酶的分子改造及应用提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　菌种、载体和质粒　基因来源菌株 *A. ficuum* JNSP5-06、克隆宿主菌 *E. coli* JM109、表达宿主 *E. coli* BL21(DE3) 由本实验室保藏, 原核表达载体 pET28a(+) 购自 Novagen 公司, pMD19 T 克隆载体购自 Takara 公司。

1.1.2　工具酶和试剂　DNA 限制性内切酶、T_4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、DNA Marker、X-gal 均购自 TaKaRa 公司; 蛋白胨、酵母粉、蛋白酶 K 和琼脂糖均购自上海华美公司; 柱式 DNA 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、氨苄青霉素(Amp)、卡那霉素(Kan)、氯霉素(Cat)、二硫苏糖醇(DTT)、Goodview-na、丙烯酰胺、亚甲双丙烯酰胺、蛋白质分子量标准购自北京博大泰克; 菊粉为 sigma 公司产品; 其它主要生化试剂为进口产品或国产分析纯产品。

1.2　方法

1.2.1　引物设计与基因克隆　参考 GenBank 中已报道的黑曲霉(GenBank 登录号: CAA07345 和 DQ233221)菊粉酶基因的 DNA 序列, 应用 Oligo 6 引物设计软件设计 1 对引物, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

上游引物: 5′-ATC GAATTC (EcoRI) CAGTCTAAT-GATTACCGTCG-3′

下游引物: 5′-GAC GAATTC (EcoRI) GGTACCT-GTCTGCACTGG-3′。

1.2.2　培养基及培养条件

1) 无花果曲霉液体培养基　蛋白胨 10 g/L, 酵母膏 5 g/L, 20 g/L 的菊粉, pH 值 6.0。30 ℃、200 r/min 往复振荡培养 36 h, 收集菌体用于总基因组 DNA 提取。

2) L-Broth(LB)　蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, pH 值 7.4。必要时加终浓度为 50 μg/mL 的卡那霉素(Kan) 或 100 μg/mL 的氨苄青霉素(Amp). 在 25~37 ℃, 220 r/min 振荡培养。

1.2.3　Endo I PCR 扩增与 TA 克隆　酚法[17] 抽提基因组 DNA, 以其为模板, PCR 扩增目的片段 Endo I。PCR 扩增体系为: DNA 3.0 μL, 10(PCR buffer (含 2 mmol/L Mg^{2+}) 5.0 μL, dNTP Mixture (2.5 mol/L each) 4.0 μL, 上游引物 2 μL, 下游引物 2 μL, Taq DNA 聚合酶 0.2 μL, 无菌水 33.8 μL, 总体积 50 μL; 反应条件为: 95 ℃预变性 5 min, 94 ℃变性 30 s, 52 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 120 s, 25 个循环; 72 ℃延伸 10 min。

将扩增后回收的 DNA 片段与 pMD19-T 载体连接, 构建克隆载体 pMD19-Endo I(见图 1)。将克隆载体 pMD19-Endo I 转化 *E. coli* JM109, 涂布于含 Amp、IPTG、X-gal 的 LB 琼脂平板上, 37 ℃培养过夜, 随机挑取白色克隆提取质粒鉴定筛选。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

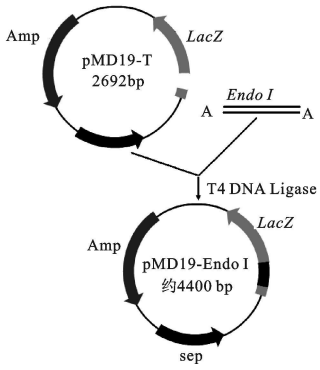


图1 TA克隆策略示意图

Fig. 1 Map of TA cloning

1.2.4 序列测定及序列分析 提取重组质粒DNA进行目的片段测序,结果经BLAST查询及同源性比较;序列递交至http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html和http://us.expasy.org/cgi-bia/prosite/scanview.cgi上进行Endo I的氨基酸序列分析及三维结构的同源建模。

1.2.5 大肠杆菌重组表达载体的构建 参照分子克隆实验指南[17]的方法构建重组表达载体。将pMD19-Endo I重组载体和表达质粒pET-28a(+)用Eco RI酶切后连接,连接产物转化*E. coli* JM109,提取转化子酶切鉴定,筛选阳性转化子转化*E. coli* BL21(DE3)。

1.2.6 诱导产酶及粗酶提取方法 将鉴定为阳性克隆的转化子接入2 mL带有相应抗生素的LB培养基中,37 ℃、220 r/min下振荡培养过夜;以2 %的接种量将其转接到50 mL相同的培养基中,37 ℃、220 r/min振荡培养至OD600值达到0.6时,加入IPTG溶液至终浓度1.0 mmol/L,22 ℃,220 r/min,诱导培养。

将发酵液中的菌体离心(8 000 r/min,10 min),保留上清,测定上清酶活。沉淀用细胞破碎液(0.5 mol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl缓冲液,pH 7.7)悬浮,冰水浴中用超声波细胞破碎机破碎菌体;破碎后,4 ℃下12 000 r/min离心20 min,所得上清液即为粗酶液,测定酶活。

1.2.7 重组大肠杆菌表达产物的分析

1) 菊粉酶活性测定 以菊粉为底物,对3,5-二硝基水杨酸(DNS)法稍作改进,测定菊粉酶酶活。反应体系为50 μL菊粉底物溶液(2 0 %)加入50 μL适当稀释的酶液,55 ℃水浴中反应30 min,反应结束加入0.5 mL DNS试剂中止反应,并加入0.9 mL去离子水。反应体系沸水处理5 min,冷却后,稀释8倍测定540 nm处吸光值。将测得的OD540在果糖标准曲线上折算为果糖量,计算菊粉酶活力。在规定反应条件下,以每分钟产生1 μmol果糖所需的酶量定义为1个酶活单位。

2) 蛋白浓度测定 采用Bradford法[19]测定酶液蛋白浓度。

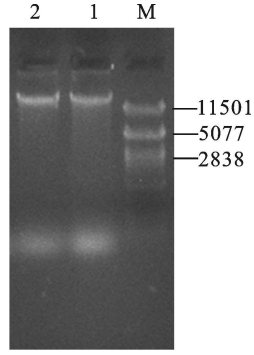
3) SDS-PAGE分析 收集1 mL菌体加2倍SDS加样缓冲液超声溶解,振荡均匀,100 ℃煮沸5 min后,10,000 r/min,离心5 min。采用5 g/dL浓缩胶,10 g/dL分离胶进行SDS-PAGE电泳[20]。

4) TLC法分析重组内切菊粉酶的水解产物 不同反应时间取出反应混合物,点样于硅胶薄板,用体积比正丙醇:乙酸乙酯:水=3:1:1作为展开剂,置于层析缸中展开。用苯胺:二苯胺:磷酸:丙酮=1(g):1(mL):5(mL):50(mL)为显色剂,100 ℃加热10 min显色。

2 结果与分析

2.1 无花果曲霉总DNA提取

提取A. ficuum JNSP5-06的基因组DNA,经质量浓度为0.8 g/dL的琼脂糖凝胶电泳鉴定,得到浓度适中、条带单一的基因组DNA,如图2所示,以此作为PCR反应的模板。



1,2、基因组DNA; M、λDNA/pst I DNA分子量标准

图2 基因组DNA电泳结果

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of resulting genomic DNA

2.2 Endo I DNA序列的PCR扩增、克隆和测定

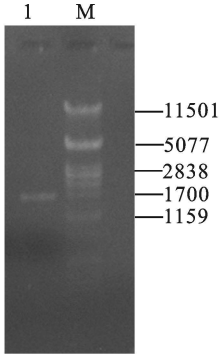
PCR扩增产物经0.8 %的琼脂糖凝胶电泳鉴定,可清晰地见到约1 700 bp长的单一扩增条带(图3第1泳道)。根据Endo I DNA片段的预计长度推测该条带就是目的基因。割胶回收第1泳道的DNA条带,经AT克隆策略,转化*E. coli* JM109,挑选白斑进一步经PCR鉴定(图4)正确后,送样测定核苷酸序列。

2.3 Endo I DNA序列分析

A. ficuum JNSP5-06中克隆的Endo I序列的GenBank登录号为FJ984582,经过BLAST查询相似序列可知,其开放阅读框长1 482 bp,不含内含

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

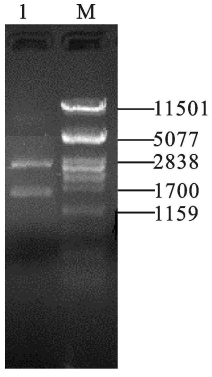
子,核苷酸序列编码 493 个氨基酸,计算相对分子质量为 53 200,等电点 pI 为 4.33。1998 年,Pons[21] 等将已发表的 GH32 族糖苷水解酶氨基酸序列进行了计算机分析,发现有 8 个保守盒(motif)、2 个活性中心的催化残基,它们在本序列中的相应位置上也同样存在,8 个保守盒分别为 WMNE(+17~+20),WHLFFQ(+31~+36),WGHATS(+49~+54),FTGT(+76~+79),RDP(+152~+154),EVP(+210~+212),WLDNGRDFDG(+267~+276),SVEVF(+446~+450)。2 个催化残基分别为+20 位对应的 E 和+153 位对应的 D,序列中还含有 4 个潜在的 N-糖基化位点。



1. 内切菊粉酶基因 *Endo I*; M. λDNA/pst I DNA 分子量标准

图 3　内切菊粉酶 *Endo I* DNA 片段的凝胶电泳

Fig. 3　Analysis of endoinulinase *Endo I* DNA amplified by PCR



1. pMD19-菊粉酶/*EcoR I* (2.68 kb 和 1.67 kb); M. λDNA/*pst I* DNA 分子量标准

图 4　重组质粒的酶切验证

Fig. 4　Identification of the recombinant plasmid by *EcoR I*

氨基酸序列的同源性比较结果表明,Endo I 与来源于 *Aspergillus niger*(GenBank 登录号: DQ233222)、*Aspergillus fumigatus*(GenBank 登录号: EAL86248)、*Penicillium sp.* TN-88(GenBank 登录号: BAA19132)、*Penicillium purpurogenum*(GenBank 登录号: BAA12321)、*Pseudomonas mucidolens*(GenBank 登录号: AAF24999)、*Arthrobacter sp.* S37(GenBank 登录号: CAB63119) 6 种微生物的菊粉酶同源性的分别为 97.97%、59.17%、73.43%、73.02%、20.97%、12.48%。说明 *A. fumigatus* 和 *A. niger*/*A. ficuum* 内切菊粉酶基因间进化有分歧,而后者与 *Penicillium* 内切菊粉酶有共同的起源。*Pseudomonas mucidolens* 和 *Arthrobacter sp.* S37 内切菊粉酶有共同的起源,与真菌内切菊粉酶基因间进化有较大分歧。

Endo I 经 SWISS-MODEL 三级结构预测的分子模型如图 5 所示。可知,*Endo I* 具有 GH32 族酶的典型结构,由 5 个反向的 β 折叠片和 1 个 β-三明治(β sandwich)结构组成。

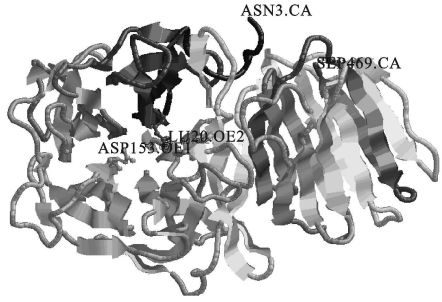


图 5　SWISS-MODEL 预测的 ***Endo I*** 三维模型

Fig. 5　Three-dimensional structure of *Endo I* predicted by SWISS-MODEL

2.4　大肠杆菌表达载体 pET-28a-*endo I* 的构建

鉴于 *T7* 启动子的强启动特性,提取重组质粒 pMD19-*endo* I,将其产物经 *EcoR I* 酶切,回收目的基因片段,与经相同酶切的 pET-28a(+)质粒连接,得到重组质粒 pET-28a-*endo I*(见图 6),该方式使目的蛋白 N 端在翻译之后与载体自身的一小段多肽(包含 His 标签、T7 标签、凝血酶切割位点)形成了融合蛋白,便于后续纯化。重组质粒经 *EcoR* I 酶切检验,出现两条条带(见图 7),判定其为重组质粒,再经测序确保序列读码框正确。

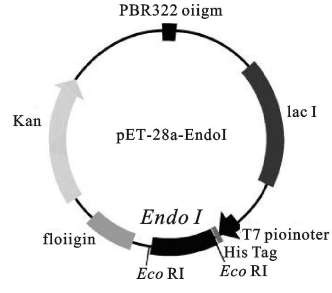
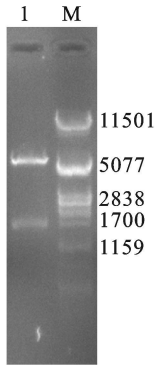


图 6　重组质粒图谱

Fig. 6　Physical map of recombinant plasmid pET-28a-*Endo I*

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



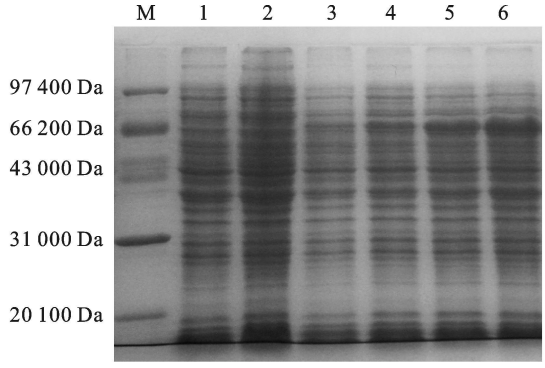
M. λDNA/pst I Marker; 1. pET-28a-*EndoI*/*EcoR I*

图 7 表达载体的酶切鉴定

Fig. 7 Identification of expression plasmids by *EcoR* I digestion

2.5 pET-28a-*Endo* I 表达载体在大肠杆菌中表达

SDS-PAGE 分析如图 8 所示, 泳道 1、2 分别为导入载体 pET-28a(+)的菌株诱导前后的全细胞蛋白电泳, 泳道 3、4、5、6 分别为导入重组质粒 pET-28a-*Endo* I 的菌株诱导前以及诱导后 2、4、6 h 的全细胞蛋白电泳, 图中可见, 4、5、6 泳道在66 000处比其它泳道多出 1 条清晰的蛋白条带, 这就是 pET-28a-*Endo* I 菌株诱导表达的目的蛋白, 说明加入 IPTG 后融合蛋白在胞内得到了表达, 且随着诱导时间的延长, 表达蛋白量依次升高。因为内切菊粉酶基因插入 pET-28a(+)表达载体中, 其表达产物的 N-端带有 6 个组氨酸, 在蛋白电泳图谱中比理论值53 000大, 是由于 His-tag 中的碱性氨基酸的作用造成蛋白在 SDS-PAGE 中迁移变慢, 而导致偏差[22]。粗酶液为 35 U/mL, 是野生菌酶活的 10 倍。



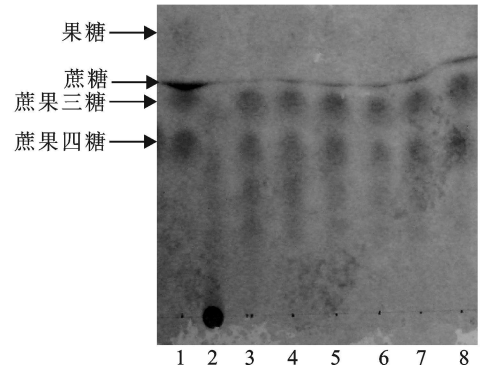
M. 低分子量标准蛋白; 1. BL21(DE3)/pET-28a 非诱导; 2. BL21(DE3)/pET-28a 诱导; 3. BL21(DE3)/pET-28a-*Endo I* 非诱导; 4~6. BL21(DE3)/pET-28a-*Endo I* 分别诱导 2、4、6 h

图 8 pET-28a-*Endo I* 在 *E. coli* BL21(DE3)中表达的电泳图谱

Fig. 8 Expression of the pET-28a-*Endo I* in *E. coli* BL21(DE3)

2.6 TLC 和 HPLC 法分析重组内切菊粉酶的水解产物

在 50 g/L 的菊粉溶液(用 0.1 mol/L、pH 5.0 醋酸缓冲液配制)中加入 5 U/g 菊粉的内切菊粉酶, 55℃下反应, 每隔一段时间取样, 10 min 沸水浴灭酶后, 用 0.2 μm 的微孔滤膜过滤, 除去大分子物质, 对水解液的最终产物进行 TLC 分析。结果如图 9。从图 9 可以看出: 水解 0.5 h 时, 样品中的菊粉已被彻底水解转变为低聚合度的低聚糖, 随着水解时间的延长, 水解液中 DP2~DP7 的低聚糖含量都不断增加, 其中 DP3 和 DP4 增长较快, DP5~DP7 的低聚糖随聚合度越大, 水解过程中增长速度越慢。DP>5 的果聚糖, 过程中逐渐减少, 说明重组内切菊粉酶优先作用于聚合度大的糖, 而对聚合度小于 4 的低聚糖作用很弱, 水解菊粉的主要产物为 DP2、DP3 和 DP4。



"1"代表低聚糖标样, 2、3、4、5、6、7、8 分别为水解 0、0.5、1、2、3、4 和 6 h 的水解产物

图 9 酶水解菊粉产物的 TLC 图

Fig. 9 TLC profiles of the hydrolysis products of inulin

3 结 语

作者从 *A. ficuum* JNSP5-06 基因 DNA 上扩增得到的内切菊粉酶的基因 endo I, 其开放阅读框不含内含子, 长 1 482 bp, 编码 493 个氨基酸; Mw 为 53 200, pI 为 4.33, 序列中有 4 个潜在的 N-糖基化位点, 包含 GH32 族糖苷水解酶氨基酸序列中存在的 8 个保守盒、2 个活性中心的催化残基, 说明从 *A. ficuum* JNSP5-06 分离得到的内切菊粉酶 Endo I 是典型的 GH32 族糖苷水解酶, 其二级结构属于(类型, 三级结构由 5 个反向的β折叠片和 1 个β-三明治结构组成。酶活测定和 SDS-PAGE 分析结果表明利用表达质粒 pET-28a(+)和 *E. coli* BL21(DE3)菌株成功地异源表达了具有较好可溶性和生物学活性的内切菊粉酶, 每 mL 发酵液的粗酶活为

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

35U, 水解菊粉的产物主要为 DP2、DP3 和 DP4。虽然以 *E. coli* 为受体的工程菌不宜用于生产食品及药品工业, 但对于基因表达、酶学性质和蛋白质工程的研究具有重要意义。

参考文献(References):

[1] 陈晓明, 陈寒青, 陈天祥, 等. 菊粉酶的酶学特性与分子生物学[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(5): 577-588.
Chen Xiao-ming, Chen Han-qing, Chen Tian-xiang, et al. Enzymatic properties and molecular biology of inulinase [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology,** 2009, 28(5) 577-588. (in Chinese)

[2] Ettalibi M and Baratti J C. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum* [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology,** 1987, 26(1): 13-20.

[3] Wang J, Jin Z, Jiang B, et al. Production and separation of exo- and endoinulinase from *Aspergillus ficuum*[J]. **Process Biochemistry,** 2003, 39: 5-11.

[4] Chen H-Q, Chen X-M, Li Y, et al. Purification and characterisation of exo- and endo-inulinase from *Aspergillus ficuum* JNSP5-06[J]. **Food Chemistry**, 2009, 115(4): 1206-1212.

[5] Uhm T B, Chae K-S, Lee D-W, et al. Cloning and nucleotide sequence of the endoinulinase-encoding gene, inu2, from *Aspergillus ficuum*[J]. **Biotechnology Letters,** 1998, 20(8): 809-812.

[6] Kim H-S, Lee D W, Ryu E J, et al. Expression of the INU2 gene for an endoinulinase of *Aspergillus ficuum* in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Biotechnology Letters,** 1999, 21(7): 621-623.

[7] Park S, Jeong H-Y, Kim H-S, et al. Enhanced production of aspergillus ficuum endoinulinase in saccharomyces cerevisiae by using the SUC2-deletion mutation[J]. **Enzyme and Microbial Technology,** 2001, 29(2-3): 107-110.

[8] Kang S-I and Kim S-I. Molecular cloning and sequence analysis of an endo-inulinase gene from *Arthrobacter* sp[J]. **Biotechnology Letters,** 1999, 21(7): 569-574.

[9] Laloux O, Cassart J-P, Delcour J, et al. Cloning and sequencing of the inulinase gene of *Kluyveromyces marxianus var. marxianus* ATCC 12424[J]. **FEBS Letters,** 1991, 289(1): 64-68.

[10] Wen T, Liu F, Huo K, et al. Cloning and analysis of the inulinase gene from *Kluyveromyces cicerisporus* CBS4857[J]. **World Journal of Microbiology & Biotechnology,** 2003, 19(4): 423-426.

[11] Akimoto H, Kiyota N, Kushima T, et al. Molecular cloning and sequence analysis of an endoinulinase gene from *Penicillium* sp. strain TN-88[J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry,** 2000, 64(11): 2328-2335.

[12] Moriyama S, Muguruma M, and Ohta K. Quantitative expression analysis of inulinase gene cluster of *Penicillium* sp. strain TN-88[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering,** 2006, 101(3): 277-279.

[13] Ohta K, Akimoto H, Matsuda S, et al. Molecular cloning and sequence analysis of two endoinulinase genes from *Aspergillus niger*[J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry,** 1998, 62(9): 1731-1738.

[14] Moriyama S, Tanaka H, Uwataki M, et al. Molecular cloning and characterization of an exoinulinase gene from *Aspergillus niger* strain 12 and its expression in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering,** 2003, 96(4): 324-331.

[15] Zhang L, Wang J, Ohta Y, et al. Expression of the inulinase gene from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*[J]. **Process Biochemistry,** 2003, 38(8): 1209-1212.

[16] Wang J, Teng D, Yao Y, et al. Expression of *Aspergillus niger* 9891 endoinulinase in *Pichia pastoris*[J]. **High Technology Letters,** 2004, 10(4): 52-56.

[17] Garber R C. Isolation of DNA from filamentous fungi and separation into nuclear mitochondrial, ribosomal, and plasmid components[J]. **Analytical Biochemistry,** 1983, 135: 416-422.

[18] Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory manual, 2nd edition [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[19] Bradford M M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Analytical Biochemistry,** 1976, 72: 248-254.

[20] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. Nature (London), 1970, 227: 680-685.

[21] Pons T, Olmeao, Chinea G, et al. Structural model for family 32 of glycosyl-hydrolase enzymes[J]. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics,** 1998, 33(3): 383-395.

[22] 唐威华, 张景六, 王宗阳, 等. SDS-PAGE 法测定 His-tag 融合蛋白分子量产生偏差的原因[J]. 植物生理学报, 2000, 26(1): 64-68.
TANG Wei-hua, ZHANG Jing-liu, WANG Zong-yang, et al. The Cause of Deviation Made in Determining the Molecular Weight of His-tag Fusion Proteins by SDS-PAGE[J]. **Acta Phytophysiologica Sinica,** 2000, 26(1): 64-68. (in Chinese)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net