

纤维微菌海藻糖合成酶基因克隆表达及酶学特性鉴定*

Cloning, Expression and Characterization of a Novel Gene Encoding Trehalose Synthase from *Cellulosimicrobium cellulans*

曹磊^{1,2}, 刘滔滔^{1,2}, 张宏涛^{1,2}, 谢敏^{1,2}, 杜丽琴^{1,2}, 梁智群^{1,2}, 韦宇拓^{1,2**}

CAO Lei^{1,2}, LIU Taotao^{1,2}, ZHANG Hongtao^{1,2}, XIE Min^{1,2}, DU Liqin^{1,2}, LIANG Zhiqun^{1,2}, WEI Yutuo^{1,2}

(1. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530005; 2. 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西南宁 530005)

(1. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530005, China; 2. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Nanning, Guangxi, 530005, China)

摘要:【目的】开发适用于海藻糖生产的新型海藻糖合成酶。【方法】通过反向 PCR 技术, 从一株纤维微菌的基因组 DNA 中获知海藻糖合成酶基因完整 ORF 序列, 进而克隆得到纤维微菌海藻糖合成酶基因 (*CCTreS*), 将其与表达载体 pSE380 构建重组质粒后转入大肠杆菌 BL-21(DE3) 中诱导表达, 通过镍柱亲和层析纯化得到纯酶并进行酶学性质测定。【结果】从纤维微菌中克隆并在大肠杆菌中成功表达海藻糖合成酶基因 (*CCTreS*)。经纯化获得的重组酶 (*CCTreS*) 在以麦芽糖为底物生成海藻糖时, 最适反应 pH 值为 7.0, 最适反应温度为 45°C, 40°C 保温 1 h 仍具有 80% 以上的相对酶活力, 在 pH 值 5.5~8.5 保存 24 h, 相对酶活力仍保留 80% 以上。Cu²⁺ 对其有明显抑制作用。【结论】该重组酶具有很好的热稳定性和 pH 稳定性, 具有一定的研究价值和潜在的工业应用价值。

关键词: 海藻糖合成酶 纤维微菌 反向 PCR 酶学性质

中图分类号: Q785, Q786 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2016)01-0019-06

Abstract:【Objective】A new trehalose synthase was developed for application in industrial production of trehalose.【Methods】The complete ORF sequence of trehalose synthase gene was obtained from *Cellulosimicrobium cellulans* by inverse-PCR, and then it was amplified by PCR. The recombinant plasmid pSE380-*CCTreS* was constructed and transformed into *Escherichia coli* BL-21(DE3). The expressed protein was purified using nickel-nitrilotriacetic acid agarose resin.

At last, the enzymatic characteristics of recombinant enzyme were studied.【Results】The trehalose synthase gene (*CCTreS*) was cloned from *Cellulosimicrobium cellulans* and successfully expressed in *Escherichia coli*. The optimum activity for the purified recombinant enzyme to convert maltose into trehalose was at 45°C and pH 7.0. *CCTreS* had a good stability and could be reserved above 80% relative activity when it

收稿日期: 2015-11-16

修回日期: 2016-02-26

作者简介: 曹磊 (1991-), 男, 硕士研究生, 主要从事基因工程菌的构建及酶工程研究。

* 国家自然科学基金项目 (31160311) 和广西自然科学基金项目 (2012GXNSFAA053051) 资助。

** 通讯作者: 韦宇拓 (1971-), 男, 教授, 主要从事发酵与酶工程研究, E-mail: weiyutuo@gxu.edu.cn.

was placed in the environment at 40°C for an hour or the environment in pH 5.5~8.5 for 24 hours. Cu²⁺ strongly inhibited the enzyme activity. **【Conclusion】**The recombinant enzyme has good thermal stability and pH stability, which provide certain research value and potential industrial application value.

Key words: trehalose synthase, *Cellulosimicrobium cellulans*, inverse-PCR, enzymatic characteristics

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20160315.001

0 引言

【研究意义】海藻糖旧称蜚蜜糖和覃糖,广泛存在于细菌、真菌、藻类、植物和无脊椎动物当中^[1-2]。海藻糖在许多生物中起到维持渗透压、保护体内蛋白质、核酸及生物膜的作用^[3-5],对在高温、干燥、冷冻、高渗甚至是辐射等极端条件下维持生命的存在起到关键作用,所以被称为“生命之糖”^[1]。海藻糖的优异特性使得它在食品、化妆品、医药、保健品等诸多行业得到广泛应用^[6-9],随着海藻糖研究的推进,海藻糖将具有更为广阔的应用前景。**【前人研究进展】**海藻糖合成酶可以将麦芽糖通过一步转化作用生成海藻糖,用其制备海藻糖较其他方法具有原料低廉、转化率较高等诸多优势^[10-11]。自从在1995年被日本的 Nishimoto 等^[12-13]首次在 *Pimelobacter* sp. R48 中发现,海藻糖合成酶便成为世界各国科学家积极深入研究的对象。现已从多种生物中克隆到海藻糖合成酶基因,其中大部分来自细菌^[14]。**【本研究切入点】**多数海藻糖合成酶最适反应温度偏低,应用到工业生产中会造成生产耗能过大、设备利用率较低等问题,若在偏离生物酶最适作用条件下反应则会造成酶活性降低甚至是失活。**【拟解决的关键问题】**克隆纤维微菌海藻糖合成酶基因(*CCTreS*),构建重组质粒转入大肠杆菌中表达及纯化,并对重组酶进行酶学性质研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

纤维微菌(*Cellulosimicrobium cellulans*)、克隆宿主 *Escherichia coli* Trans10、表达宿主 *Escherichia coli* BL-21(DE3)及表达载体 pSE380 均由本实验室保藏,pMD19-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.1.2 酶和主要试剂

DNA 聚合酶、限制性内切酶等分子生物学工具酶购自宝生物工程(大连)有限公司和东洋纺(上海)生物科技有限公司;IPTG 购自 Gibco 公司;镍离子

金属螯合亲和层析介质购自 Phamacia 公司;果糖、葡萄糖、麦芽糖、海藻糖均为色谱纯 Sigama 公司产品;乙腈购自 Fisher 公司;其它试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 *CCTreS* 保守区的扩增

在 Genbank 数据库中检索到纤维微菌属的 *Cellulosimicrobium cellulans* J36 和 *Cellulosimicrobium cellulans* LMG 16121 等几种菌的假定的海藻糖合成酶基因,将其与其它几种海藻糖合成酶基因进行 blast 分析,根据比对结果设计引物 P1: 5'-GCACCGCTTCTTCTCCCACC-3'; P2: 5'-CGACGCACAGGATCGTCTCC-3',以纤维微菌总 DNA 为模板扩增海藻糖合成酶基因保守区。PCR 体系(50 μL): 10×PCR buffer 5 μL, dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 4 μL, 引物 P1(10 μmol/L) 1 μL, 引物 P2(10 μmol/L) 1 μL, 纤维微菌总 DNA(100 ng/μL) 1 μL, PrimeSTAR DNA Polymerase(2.5 U/μL) 0.5 μL, ddH₂O 补至 50 μL。PCR 程序: 98°C 2 min; 98°C 10 s, 58°C 15 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物送测序。

1.2.2 反向 PCR 扩增保守区外未知区域

(1) 酶切处理纤维微菌总 DNA

根据 Genbank 数据库中 *Cellulosimicrobium cellulans* J36 的全基因测序结果,查找到位于海藻糖合成酶基因 3' 端下游位置的 *Kpn* I 酶切位点, *Kpn* I 完全酶切后包含有保守区的目的片段大小约为 2 kb。采用 *Kpn* I 对纤维微菌总 DNA 进行充分酶切,37°C 下反应 36 h(中间补加两次酶),尽量酶切充分。

(2) 连接

将酶切纯化后的 DNA 用 T4 连接酶在 16°C 条件下连接过夜。

(3) 反向 PCR

根据保守区测序结果,分别在扩增到的保守区核苷酸序列 212,826,114,864 位点设计两对反向引物: 上游 P3: 5'-CGGCCACTGGTTCGCCTCGGCG-3'; 下游 P4: 5'-GACGTCGCTGCTGCACTGGGTG-3'; 上游 P5: 5'-TCTCGCAGTTGGTGCCCTCGGC-3';

下游 P6: 5'-CCGCTCGACTGCGACAACCAGT-3'。以(2)中连接产物为模板,用引物 P3、P4 进行第一次 PCR,回收第一次 PCR 产物做模板,以引物 P5、P6 进行第二次 PCR,第二次 PCR 目的是为了验证第一次 PCR 是否扩增到含有未知区域的 DNA 片段(图 1)。PCR 体系:10×PCR buffer 5 μL,dNTP(各 2.5 mmol/L) 4 μL,引物 a(10 μmol/L) 1 μL,引物 b(10 μmol/L) 1 μL,模板 DNA 1 μL,KOD DNA Polymerase (2.5 U/μL) 0.5 μL,DMSO 4 μL,甲酰胺 2 μL,ddH₂O 31.5 μL。PCR 程序:98℃ 2 min;98℃ 10 s,58℃ 15 s,72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 10 min。反向扩增成功后,将 PCR 产物送测序。

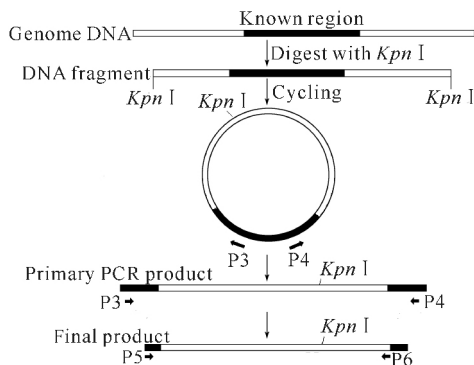


图 1 反向 PCR 示意图^[15]

Fig. 1 The process of inverse PCR

1.2.3 CCTreS 完整 ORF 的克隆及重组质粒的构建

根据来源于 *Cellulosimicrobium cellulans* J36 的海藻糖合成酶基因和 1.2.2 节的 PCR 产物测序结果设计 CCTreS 的上游和下游引物,在上游引物添加酶切位点 *EcoR* I (下划线部分),并在起始密码子后添加 6 个组氨酸,即 P7: 5'-CTGAATTCATGCAC-CATCATCATCATCATGTGACGTTCCCGCGCG-ACGCTGCACCGGTC-3';在下游引物添加酶切位点 *Hind* III (下划线部分),即 P8: 5'-ACAAAGCTTTCACGCGGGGTCGTGCACGAC-GAGC-3'。以纤维微菌总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 体系(50 μL):10×PCR buffer 5 μL,dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 4 μL,引物 P7 (10 μmol/L) 1 μL,引物 P8(10 μmol/L) 1 μL,纤维微菌总 DNA(100 ng/μL) 1 μL,PrimeSTAR DNA Polymerase(2.5 U/μL) 0.5 μL,ddH₂O 补足 50 μL。程序:98℃ 2 min;98℃ 10 s,58℃ 15 s,72℃ 2 min,30 个循环;72℃ 10 min。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳验证后胶回收纯化,产物经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后与表达载体 pSE380 连接,连接产物转化至大肠杆菌 Trans10 感受态细胞,筛选重组质粒

pSE380-CCTreS 并送测序。

1.2.4 重组蛋白表达与纯化

将重组质粒 pSE380-CCTreS 转入大肠杆菌 BL-21(DE3),37℃ 培养至 $OD_{600} = 0.6$,加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L,20℃ 诱导培养 20 h 后离心收集菌体。用 10 mL Lysis Buffer (50 mmol/L NaH₂PO₄,300 mmol/L NaCl,10 mmol/L 咪唑,pH 值为 8.0)重悬,超声波破碎细胞,破碎条件:工作功率 200 W,工作时间 7 s,间歇时间 10 s,总共时间 20 min,4℃。破碎完成后,4℃ 条件下充分离心,收集上清液即为粗酶液,将粗酶液利用镍柱亲和层析法进行纯化。采用 10% SDS-PAGE 检测纯化效果,蛋白质含量检测参照 Bradford 法^[16]。

1.2.5 重组蛋白酶活力的测定

稀释适当倍数的纯酶 10 μL 加入 190 μL 2% (W/V)的麦芽糖底物中,在一定温度下反应 30 min,反应结束后沸水浴 10 min 终止反应,去除固体杂质后 HPLC 检测海藻糖含量。HPLC 检测条件:柱温 24℃,柱压 60 bar,流动相成分为乙腈:水=79:21 (V/V),流速 1 mL/min。所有实验数据测定均为 3 个平行实验。酶活力单位(U):在特定条件下 1 min 生成 1 μmol 海藻糖所需要的酶量为一个活力单位。

1.2.6 温度和 pH 值对酶活力的影响

温度的影响:在 pH 值为 7.0 的环境下,以浓度 2%的麦芽糖为底物,分别在 25~60℃(每隔 5℃为一个梯度)条件下反应 30 min,HPLC 测定酶活力,以酶活力最高者为 100%,绘制相对酶活力曲线。

pH 值的影响:在最适反应温度下,分别在 pH 值为 4.0~9.0(pH 值每隔 0.5 为一个梯度)条件下反应 30 min,HPLC 测定酶活力,以酶活力最高者为 100%,绘制相对酶活力曲线。

1.2.7 酶的热稳定性和 pH 稳定性

热稳定性:将纯酶分别置于 25~60℃(每隔 5℃为一个梯度)条件中保温 1 h,在酶的最适反应温度和 pH 值下反应 30 min,HPLC 测定酶活力,以 4℃ 保存的酶在最适条件下的酶活力为对照,计算相对酶活力。

pH 稳定性:将酶分别置于 pH 值为 4.0~9.0 (pH 值每隔 0.5 为一个梯度)环境中 4℃ 保存 24 h,然后在酶的最适反应温度和 pH 值下反应 30 min,HPLC 测定酶活力,以未处理的酶做对照,计算每个梯度下的相对酶活力。

1.2.8 金属离子和化学试剂对酶活力的影响

在酶反应体系中添加终浓度为 5 mmol/L 的金属离子 Ca²⁺、Mg²⁺、Fe³⁺、Ba²⁺、Ni²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺、

K⁺、Co²⁺、Cu²⁺ 以及 5 mmol/L 的 SDS、DTT 和 10 mmol/L 的 EDTA, 在酶的最适反应温度和 pH 值下反应 30 min, HPLC 测定酶活力, 以不含有金属离子和化学试剂的反应作为对照, 计算各个条件下的相对酶活力。

1.2.9 重组酶水解麦芽糖的产物组成分析

以 2% (W/V) 的麦芽糖为底物, 分别在 25℃、35℃、45℃ 及最适 pH 值条件下反应 48 h, 分别于 20 min, 40 min, 1 h, 1.5 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h 取样并采用 HPLC 检测分析产物变化。

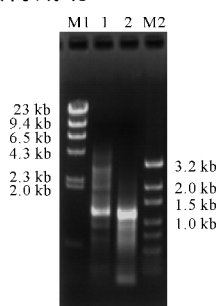
1.2.10 底物特异性的研究

酶在最适条件下分别与浓度为 2% (W/V) 的海藻糖、纤维二糖、果糖、蔗糖、乳糖、葡萄糖、麦芽三糖、普鲁兰糖、海藻酮糖、山梨糖、糊精、淀粉反应 36 h, HPLC 检测产物。

2 结果与分析

2.1 目的基因 CCTreS 的克隆

成功克隆出目的基因 CCTreS 的保守区, 根据测序结果设计两对反向 PCR 引物 P3 和 P4、P5 和 P6。引物 P3 与引物 P5 间距为 98 bp, 引物 P4 与引物 P6 间距为 38 bp。如图 2 所示, 第一次 PCR 扩增得到大小约为 1.3 kb 的条带; 第二次 PCR 扩增获得大小约为 1.2 kb 的条带。两次 PCR 的结果相差大小符合两对引物间的距离, 表明反向 PCR 扩增到保守区以外的未知区域获得成功。



M1: λDNA/ *Hind* III DNA Marker; 1: The inverse PCR product of the first time; 2: The inverse PCR product of the second time; M2: W2003 DNA Marker

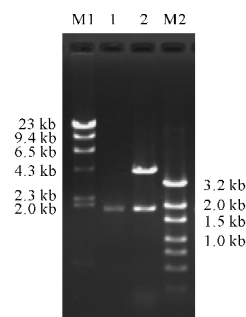
图 2 反向 PCR 产物凝胶电泳分析

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis analysis of inverse PCR product

2.2 CCTreS 完整 ORF 的克隆及重组质粒的构建

成功扩增到大小约为 1.8 kb 的 CCTreS 完整 ORF, 并用于构建重组质粒 pSE380-CCTreS。双酶切验证结果显示有两条带, 大小分别为 1.8 kb 和 4.3 kb 左右(图 3), 这分别与目的基因和 pSE380 载体大

小一致, 证明重组质粒构建成功。



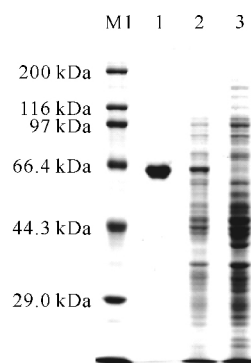
M1: λDNA/ *Hind* III DNA Marker; 1: CCTreS gene; 2: pSE380-CCTreS digested with *Eco*R I and *Hind* III; M2: W2003 DNA Marker

图 3 pSE380-CCTreS 重组质粒的双酶切验证

Fig. 3 Verification of recombinant plasmid pSE380-CCTreS digested with *Eco*R I and *Hind* III

2.3 重组酶 CCTreS 的表达纯化

如图 4 所示, 粗酶液经纯化得到大小略微小于 66 kDa 的单一一条带, 表明 CCTreS 在大肠杆菌内表达成功, 且蛋白纯度较高, 适合进行下一步酶学性质分析。



M1: Protein molecular weight marker; 1: Recombinant enzyme purified on nickel column; 2: Recombinant strain *E. coli* BL-21 (DE3) containing pSE380-CCTreS; 3: Recombinant strain *E. coli* BL-21 (DE3) containing pSE380

图 4 表达产物 CCTreS 的 SDS-PAGE 检测分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant CCTreS

2.4 最适温度和热稳定性

由图 5 可知, 重组酶的最适反应温度为 45℃, 在 35℃ 和 40℃ 具有 80% 以上相对酶活力, 60℃ 时酶活力不足 10%。重组酶在 25~35℃ 保存 1 h 后仍具有 90% 以上的相对酶活力, 在 60℃ 保存 1 h 后基本失活。

2.5 最适 pH 值和 pH 稳定性

由图 6 可知, 重组酶最适反应 pH 值为 7.0, 当 pH 值为 5.0~7.5 时, 相对酶活力在 75% 以上, 当 pH 值小于 5.0 或大于 9.0 时, 相对酶活力在 40% 以下; 重组酶在 pH 值为 7.0 环境中酶活最高, 稳定性

最好,在 pH 值为 5.5~8.5 环境中稳定性也较好,相对酶活力在 80% 以上。

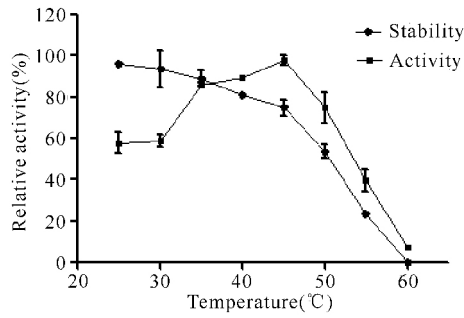


图 5 温度对 CCTreS 酶活力影响及热稳定性

Fig. 5 Effect of temperature on the activity and stability of CCTreS

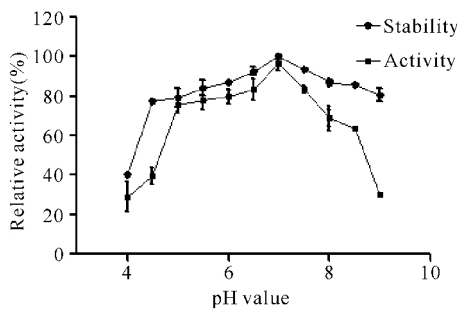


图 6 pH 值对 CCTreS 酶活力的影响及 pH 稳定性

Fig. 6 Effect of pH on the activity and stability of CCTreS

2.6 金属离子和化学试剂对重组酶酶活力的影响

由图 7 可知,所用金属离子和化学试剂对重组酶均没有激活作用。 Cu^{2+} 和 Co^{2+} 对重组酶抑制作用明显, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ni^{2+} 以及 5 mmol/L 的 SDS、DTT 和 10 mmol/L 的 EDTA 均对重组酶有轻微抑制作用, Fe^{3+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 K^+ 对酶活力的影响不大。

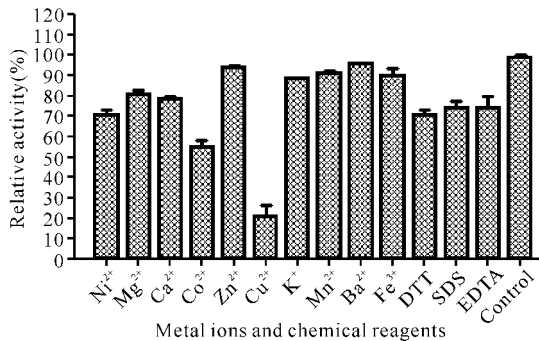


图 7 金属离子和化学试剂对 CCTreS 酶活力的影响

Fig. 7 Effect of metal ions and reagents on CCTreS enzyme activity

2.7 产物分析

由图 8~10 可知,在最适温度 45°C 反应 1.5 h,海藻糖产物含量达到最大值,但仅有 45.82%,而在 25°C 和 35°C 条件下海藻糖最高含量分别能达到 68.18% 和 59.21%,可见以麦芽糖为底物生产海藻糖

糖的最高转化率随着温度的升高而减小;在反应 48 h 内,副产物葡萄糖的含量一直呈现增长状态,分别于 25°C、35°C 和 45°C 条件下反应 48 h,葡萄糖的含量分别达到 46.81%、79.32% 和 94.01%,这说明海藻糖合成酶的水解作用会一直伴随整个反应进程,温度越高水解作用越明显,副产物葡萄糖生成速度越快,随着反应的进行,海藻糖产物含量达到最大值后逐渐降低,而葡萄糖的含量则逐渐增加。

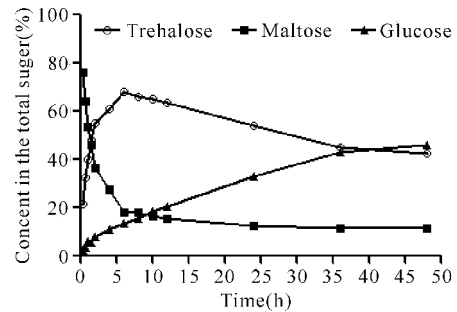


图 8 25°C 条件下 CCTreS 水解麦芽糖的产物组成分析

Fig. 8 Analysis of reaction time at 25°C on the product composition of CCTreS

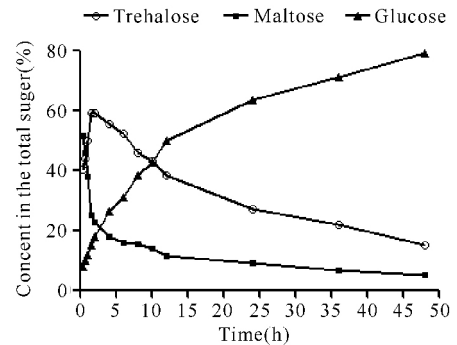


图 9 35°C 条件下 CCTreS 水解麦芽糖的产物组成分析

Fig. 9 Analysis of reaction time at 35°C on the product composition of CCTreS

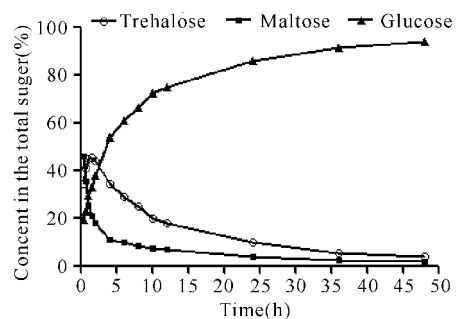


图 10 45°C 条件下 CCTreS 水解麦芽糖的产物组成分析

Fig. 10 Analysis of reaction time at 45°C on the product composition of CCTreS

2.8 底物特异性的研究

由表 1 可知重组酶除了能催化麦芽糖反应外,还可以与海藻糖和蔗糖反应,但是催化蔗糖的反应是以水解作用为主,生成海藻酮糖的活力非常弱。

表 1 重组酶对不同底物的作用

Table 1 Recombinant enzyme reaction with different substrates

底物 Substrate	对底物作用 Effect on the substrate	主要产物 Main product
麦芽糖 Maltose	+	海藻糖 Trehalose
海藻糖 Trehalose	+	麦芽糖 Maltose
蔗糖 Sucrose	+	果糖、葡萄糖 Fructose, glucose
果糖 Fructose	-	
葡萄糖 Glucose	-	
乳糖 Lactose	-	
淀粉 Starch	-	
糊精 Dextrin	-	
山梨糖 Sorbose	-	
麦芽三糖 Maltotriose	-	
海藻酮糖 Trehalulose	-	
普鲁兰糖 Pullulan	-	
纤维二糖 Cellulose	-	

注: +表示能作用; -表示不能作用

Note: +, work on substrate; -, do not work on substrate

3 结论

本研究成功从纤维微菌克隆到海藻糖合成酶基因,并在大肠杆菌中实现高效表达。重组酶 CCTreS 的最适反应温度为 45℃,最适 pH 值为 7.0,在 50℃ 以下及 pH 值为 4.5~9.0 时具有较好的稳定性。Cu²⁺ 对酶活力的抑制作用较为明显,暂时没有找到对酶活力有激活作用的金属离子和化学试剂。CCTreS 属于中温酶,但是在最适反应温度 45℃ 条件下,海藻糖最高得率只有 45% 左右,水解作用较为明显,需要进行分子改造以提高其应用价值。与其它海藻糖合成酶不同的是,CCTreS 转化蔗糖生成海藻酮糖的活力很弱,可以对其进行突变,探究转化海藻酮糖的关键位点。

参考文献:

[1] SCHIRALDI C, DI LERNIA I, DE ROSA M. Trehalose production: Exploiting novel approaches[J]. Trends in Biotechnology, 2002, 20(10): 420-425.

[2] OHTAKE S, WANG Y J. Trehalose: Current use and future applications[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, 100(6): 2020-2053.

[3] REED R H, RICHARDSON D L, WARR S R, et al. Carbohydrate accumulation and osmotic stress in cyanobacteria[J]. Journal of General Microbiology, 1984, 130(1): 1-4.

[4] WELSH D T, GUYONEAUD R, CAUMETTE P. Utilization of the compatible solutes sucrose and trehalose by purple sulfur and nonsulfur bacteria[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1998, 44(10): 974-979.

[5] LOPEZ-DIEZ E C, BONE S. The interaction of trypsin with trehalose: An investigation of protein preservation

mechanisms[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2004, 1673(3): 139-148.

[6] ELBEIN A D, PAN Y, PASTUSZAK I, et al. New insights on trehalose: A multifunctional molecule[J]. Glycobiology, 2003, 13(4): 17R-27R.

[7] HIGASHIYAMA T. Novel functions and applications of trehalose[J]. Pure and Applied Chemistry, 2002, 74(7): 1263-1269.

[8] 程池. 天然生物保存物质——海藻糖的特性和应用[J]. 食品与发酵工业, 1996, 1(22): 59-64.

CHENG C. Natural biological preservation material: Characteristics and applications of trehalose[J]. Food and Fermentation Industry, 1996, 1(22): 59-64.

[9] 程晨晨, 常青. 海藻糖在医学领域中的应用研究进展[J]. 齐鲁医学杂志, 2010, 25(4): 374-375.

CHENG C C, CHANG Q. Progress of research on application of trehalose in the field of medicine[J]. Medical Journal of Qilu, 2010, 25(4): 374-375.

[10] WOO E J, RYU S I, SONG H N, et al. Structural insights on the new mechanism of trehalose synthesis by trehalose synthase TreT from *Pyrococcus horikoshii* [J]. Journal of Molecular Biology, 2010, 404(2): 247-259.

[11] ZHU Y, WEI D, ZHANG J, et al. Overexpression and characterization of a thermostable trehalose synthase from *Meiothermus ruber* [J]. Extremophiles: Life under Extreme Conditions, 2010, 14(1): 1-8.

[12] TSUSAKI K, NISHIMOTO T, NAKADA T, et al. Cloning and sequencing of trehalose synthase gene from *Pimelobacter* sp. R48[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1996, 1290(1): 1-3.

[13] NISHIMOTO T, NAKANO M, NAKADA T, et al. Purification and properties of a novel enzyme, trehalose synthase, from *Pimelobacter* sp. R48[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1996, 60(4): 640-644.

[14] 吴秀丽, 岳明, 丁宏标. 海藻糖合酶的研究进展[J]. 微生物学通报, 2009, 36(7): 1067-1072.

WU X L, YUE M, DING H B. Research progress on trehalose synthase [J]. Microbiology, 2009, 36(7): 1067-1072.

[15] 王德培, 孙伟, 李明春, 等. 利用长引物嵌套式反向 PCR 方法克隆雅致枝霉 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因上游序列[J]. 生物工程学报, 2006, 22(4): 581-586.

WANG D P, SUN W, LI M C, et al. A Method using long primers for cloning the upstream sequence of delta $\Delta 6$ fatty acid desaturases gene of *Thamnidium elegans* by nested inverse PCR[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2006, 22(4): 581-586.

[16] 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.

(责任编辑: 陆雁)