

## 用 Overlap-PCR 法从 *Trichoderma reesei* QM9414 基因组 DNA 中克隆并表达木聚糖酶 III

陆长梅 袁 生\* 赵庆新

(江苏省资源生物技术重点实验室, 南京师范大学生命科学院微生物工程重点实验室, 南京 210097)

**摘 要** 禾本科植物木聚糖酶在其成熟过程中需在细胞进入程序性死亡后, 经蛋白水解酶多次剪切方显活性, 常规蛋白质克隆表达系统无法表达这类酶。通过 GenBank 搜索获得一与之同族、结构相似的来源于 *T. reesei* QM9414 (ATCC26921) 突变种 PC-3-7 菌株的 *xynIII*。但该酶在 *T. reesei* QM9414 中不表达, 而在基因组中存在。通过 overlap-PCR 法将 4 个外显子分别克隆、测序, 再连接测序, 最终获得该基因的全长 cDNA 序列。将该基因连接到表达载体 pETBlue-2 上, 并转化到 Tuner DE3 表达菌株中, 常规条件下可表达并有木聚糖酶活性显示。低温 (15℃) 64h 诱导显著提高可溶性 *xynIII* 酶活。

**关键词** 木聚糖酶, *T. reesei* QM9414, overlap-PCR

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)05-0764-06

禾本科植物如大麦等在种子萌发时木聚糖酶活性在其他水解酶如淀粉酶等活性降低时仍持续升高并延续至第 15 天仍未见下降趋势<sup>[1,2]</sup>; 玉米花粉在成熟与花粉管延伸过程中木聚糖酶活性持续升高, 最终约占可溶性蛋白的 50%<sup>[3]</sup>。提示木聚糖酶可能在种子萌发、胚芽鞘伸长与花粉管伸长过程中起着重要作用。但从植物组织无法纯化获得 100% 纯度的木聚糖酶, 无法准确说明其作用, 因此需要克隆表达这类酶, 重新作用于植物组织才能说明其确切功能。

分析小麦、大麦糊粉层与玉米花粉等来源木聚糖酶结构、特性等发现, 它们拥有许多共同点: 1. 它们具有高度同源性 (41%), 同属于 family10; 2. 没有信号肽, 无法通过正常途径分泌到细胞外; 而是通过细胞进入程序性死亡, 细胞破碎后释放到细胞外<sup>[3-5]</sup>; 3. 最初由 mRNA 翻译成的蛋白质大小分别为 64kD (糊粉层) 和 60kD (花粉), 大小相近, 且酶活性很小或者检测不到酶活, 随着细胞进入程序性死亡, 蛋白的 N 端和 C 端在酸性蛋白水解酶的作用下多次剪切, 最终形成约 35kD 的具有木聚糖水解酶活性的蛋白<sup>[3-5]</sup>, 此时仅含 Glyco-hydro-10 结构域; 4.

将大麦糊粉层木聚糖酶原和 35kD 蛋白所对应的基因分别在大肠杆菌、酵母以及高等植物细胞等体系表达, 最终发现只有将酶原全长 cDNA 克隆到大麦糊粉层细胞中, 并诱导程序性死亡时酶活才显现出来<sup>[5]</sup>, 花粉中的木聚糖酶至今依然没有表达成功<sup>[3]</sup>。鉴于上述特殊性, 目前用常规手段尚无法克隆表达这类木聚糖酶。因此它们在植物生长发育中的作用目前尚属推测。本文试图通过寻找与克隆表达与之相近的酶, 以便为进一步研究该类酶对植物的可能作用奠定基础。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材料与培养方法

*T. reesei* QM9414 (American Type Culture Collection 26921), 培养于 Volgel's 液体培养基中<sup>[6]</sup>, 静置 27℃ 培养 8d, 待形成一定厚度菌膜时进行基因组 DNA 提取。

#### 1.2 方 法

1.2.1 基因组 DNA 提取: 参照张明和吴志红等的方法并加以改进<sup>[7,8]</sup>。

1.2.2 PCR 引物设计: 采用 Generuner 软件并参照

收稿日期: 2004-02-05, 修回日期: 2004-05-13。

基金项目: 国家自然科学基金资助 (No. 30170005)、江苏省自然科学基金 (No. BK2001112)、江苏省高校自然科学基金项目 (No. 01KJB180004)。

\* 通讯作者。 Tel: 86-25-53598790; Fax: 86-25-83598215; E-mail: shengyuan@email.njnu.edu.cn

Seffan N. Ho 等的方法<sup>[9]</sup>设计 8 个引物, P2 与 P3、P4 与 P5、P6 与 P7 各有 20bp 的序列相互重叠, 以利于片段延伸。具体序列分别如下:

P1: 5'-CCA TGG CTC TCC CCA CCG AAA CC-3' (序列与去除信号肽后的 exon1 的 5' 序列相同, 划线部分为引入的 *Nco* I 酶切位点, 该酶切位点带来最后表达蛋白 N-端增加一个额外 Met),

P2: 5'-GAC CAC GTC CCA AGC ACG AA T CTT GC-3' (16bp 与 exon1 的 3' 序列互补, 10bp 与 exon2 的 5' 序列互补)

P3: 5'-TTC GTG CTT GGG ACG TGG TG A ATG AA-3' (10bp 与 exon1 的 3' 序列相同, 16bp 与 exon2 的 5' 序列相同)

P4: 5'-GGG ACT GGC TAC CAA TAC CG T CAA TG-3' (16bp 与 exon2 的 3' 序列互补, 10bp 与 exon3 的 5' 序列互补)

P5: 5'-CGG TAT TGG TAG CCA GTC CC A TCT CA-3' (10bp 与 exon2 的 3' 序列相同, 16bp 与 exon3 的 5' 序列相同)

P6: 5'-CAC GAG TCC TTG TCA CTG AT G CCC CA-3' (16bp 与 exon3 的 3' 序列互补, 10bp 与 exon4 的 5' 序列互补)

P7: 5'-ATC AGT GAC AAG GAC TCG TG G CGT GC-3' (10bp 与 exon3 的 3' 序列相同, 16bp 与 exon4 的 5' 序列相同)

P8: 5'-GGA TCC TAT TGT AAG ATG CCA ACA ATG-3' (与 exon4 的 3' 序列互补, 画线部分为引入的 *Bam*HI 酶切位点)。

**1.2.3 PCR 与 overlap-PCR:** 采用 ultra-pfu DNA 聚合酶 (Stratagene), 常规 PCR 方法从基因组 DNA 中克隆出各段外显子。pMD 18-T vector (TaKaRa) 克隆测序, 再参照 Seffan N Ho 等的方法将各段外显子通过 overlap-PCR 法连接起来<sup>[9]</sup>, 再次克隆测序。

**1.2.4 表达载体的连接、转化与表达:** 将连接有 xyn III cDNA 序列的 pMD 18-T vector 与表达载体 pET-Blue-2 (Novagen), 进行 *Nco* I 和 *Bam*HI (Biolabs) 双酶切, T4 ligase (Biolabs) 连接, 并转化到 *E. coli* DE3 pLacI 细胞 (Novagen) 中。转化株在 LB 中加入 50μg/mL 羧苄青霉素 (carbenicillin) 和 34μg/mL 氯霉素 (chloramphenicol) 条件下按照按说明书 37℃, 1mmol/L IPTG, 220 r/min, 3h 诱导表达。采取 15℃, 0.2mmol/L IPTG, 220 r/min, 60h 进行低温诱导表达。空载质粒同样条件培养作为对照。

**1.2.5 重组 xyn III 的获得:** 诱导表达结束后, 参照 Yuan S 等的方法收集菌体, 洗涤、破碎、离心, 上清即为重组 xyn III 液<sup>[10]</sup>。

**1.2.6 xyn III 包涵体的获得与洗涤:** 上述破碎细胞离心后, 所得沉淀即为粗包涵体<sup>[10]</sup>。粗包涵体经过 4 次洗涤与离心过程, 具体为: (1) pH7.5 20 mmol/L Tris·HCl 洗涤、离心; (2) 3 mmol/L Urea 洗涤、离心; (3) 1% Triton X-100 pH7.5 20 mmol/L Tris·HCl 洗涤、离心; (4) pH7.5 20 mmol/L Tris·HCl 洗涤、离心。最后所得沉淀即为初步纯化后的包涵体。该包涵体在 8mol/L 尿素室温 20min 条件下即可完全溶解。

**1.2.7 木聚糖酶活性测定与酶活力单位定义:** 参照 Gross K 的方法<sup>[11]</sup>测定反应液中的还原糖 (以木糖为标准) 含量。酶活力单位定义: 在最适反应条件下, 以每分钟生成 1μmol 还原糖所需的酶量作为一个酶活力单位 (IU)。

**1.2.8 琼脂糖平皿结合刚果红染色法显示木聚糖酶活性:** 参照 Sakamoto S. 等的方法进行<sup>[12]</sup>。

**1.2.9 可溶性蛋白含量测定:** 参照 Bradford MA 的方法<sup>[13]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 相似木聚糖酶序列的对比分析

木聚糖酶广泛来源于微生物与植物, 它们主要分属两个水解酶家族: family10 和 family11<sup>[14]</sup>。植物来源的木聚糖酶多属 family10<sup>[1-5]</sup>。以成熟大麦糊粉层木聚糖酶蛋白序列应用 Blast 程序对 GenBank 进行搜索, 共得 78 个序列, 去除细菌蛋白与未确定为木聚糖酶的序列, 并合并相同序列, 最后所剩 16 个木聚糖酶序列构建同源树 (图 1)。分析同源树可见, 植物来源与真菌来源的木聚糖酶分属两支。真菌来源的木聚糖酶有 6 个, 分别为 *Fusarium oxysporum* 的 AAC06240 (GenBank 登录序列号, 下同)、CAB65468 (*Thermosascus aurantiacus*)、BAA89465 (*Trichoderma reesei*)、AAC06239 (*Fusarium oxysporum*)、AAM95237 (*Magnaporthe grisea*)、BAB69703 (*Aspergillus oryzae*)。AAC06240 已转入番茄植株, 但没有发现促植物生长作用。CAB65468 已有表达成功的报道, 而 BAA89465 (Xyn III) 目前尚未表达成功, 该酶分子量约在 35kD 左右, 仅含 Glyco-hydro-10 结构域, 与植物糊粉层、花粉来源的木聚糖酶很相似。另外结合本实验室长期以 *T. reesei* 为研究对象从事秸秆降解水解酶的研究, 初步锁定 Xyn III 作为研究对象。

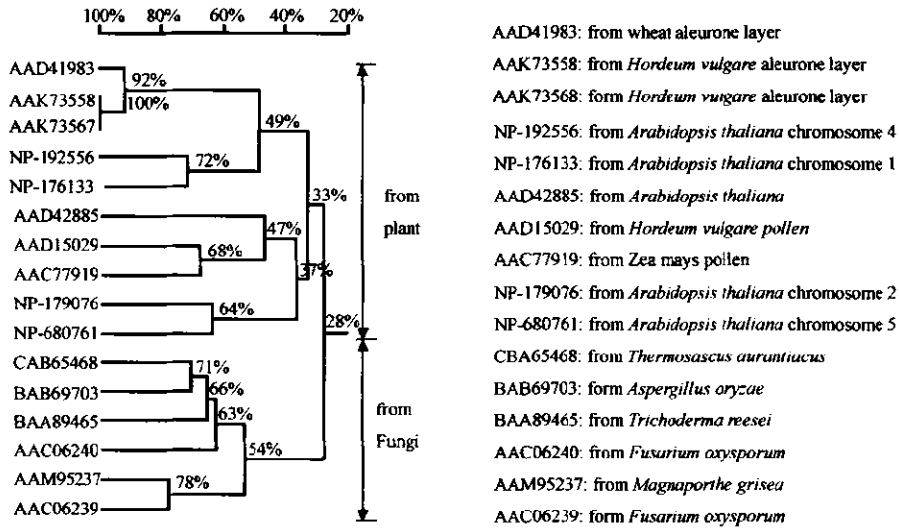


图1 与大麦糊粉层木聚糖酶相似的各种来源木聚糖酶同源性分析

Fig. 1 Homology tree of xylanase from barley aleurone-layer and its homologs

Protein sequences are aligned using DNAMAN program. GenBank accession numbers are indicated for each sequence

进一步分析 Xyn III, 发现该酶是 Xu J 等人在 *T. reesei* QM9414 的突变种 PC-3-7 发现。他们的进一步研究表明 Xyn III 在 *T. reesei* QM9414 的基因组 DNA 中具有编码该蛋白的单拷贝基因, 但目前所采用的任何诱导条件均不能使 Xyn III 在 *T. reesei* QM9414 中表达, 而在木聚糖为唯一碳源时, Xyn III 可在 PC-3-7 中表达<sup>[15,16]</sup>; 该基因含有 4 个外显子和 4 个内含子(图 2)。因此通过常规提取 mRNA 进行 RT-PCR 无法从 *T. reesei* QM9414 菌株中获得该基因 cDNA 序列, 而 PC-3-7 目前无法获得。我们尝试采用 PCR 方法先从基因组 DNA 中获得各段外显子序列, 再采用 overlap PCR 法将各段外显子两两拼接获得全长 cDNA 序列(图 2)。

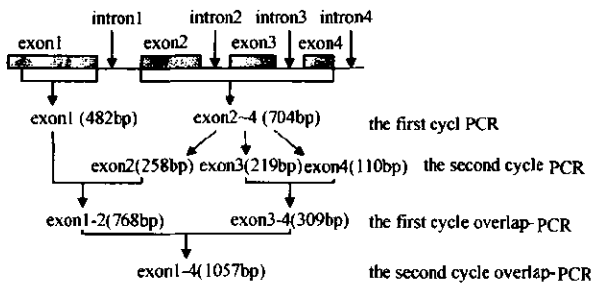


图2 xyn III 基因结构示意图与 overlap-PCR 顺序

Fig. 2 Xyn III gene structure and overlap-PCR sequence

## 2.2 xyn III 全长 cDNA 序列的获得

第一轮 PCR 分别用 P1 与 P2、P3 与 P8 对基因组 DNA 进行 PCR 获得 exon1 与 exon2-4(包含 intron2 与 intron3)(图 3: 1-4), TA-clone 测序; 待序列完全正确后, 第二轮 PCR 分别用 P3 与 P4、P5 与 P6、P7 与

P8 从含有 exon2-4 序列的载体上获得 exon2、exon3、exon4(图 3: 5-8), TA-clone 测序; 第一轮 overlap-PCR 分别用 P1 与 P4、P5 与 P8 将 exon1 与 exon2、exon3 与 exon4 两两拼接, 获得 exon1-2、exon3-4 序列(图 3: 9-11), TA-clone 测序; 第二轮 overlap-PCR 用 P1 与 P8 将 exon1-2 与 exon3-4 拼接, 获得 exon1-4(图 3: 12-13), TA-clone 测序。经送申能博彩公司测序证明最终获得了与 GenBank 中外显子序列完全一致的完整 cDNA 序列。

## 2.3 xyn III 的表达检验与酶活性检测

将 xyn III 成熟蛋白 cDNA 序列酶切并连接到表达质粒 pETBlue-2 上, 转化 *E. coli* DE3 pLacI 细胞, 37°C, 1mmol/L IPTG, 220 r/min, 3h 诱导表达, 收集并裂解细菌, 获得重组 xyn III 液。测定其中木聚糖水解酶活性, 显示木聚糖酶活性为 0.56 IU/mL; 平皿水解木聚糖刚果红染色法亦显示具有木聚糖酶活性(图 4); 未经诱导表达组亦可降解木聚糖, 表明该质粒表达渗漏; SDS-PAGE 电泳, 银染, 可见诱导组较空载体对照组在 35kD 处明显多出一条蛋白条带(图 5); 以上结果显示 xyn III 在大肠杆菌中得到表达, 并有水解酶活性显示。

将粗包涵体沉淀用枪头沾取少许直接进行 SDS-PAGE 电泳, 银染, 在 35kD 处有一浓粗条带, 正好对应图 5 中诱导组中多出的一条蛋白条带处(图略)。将粗包涵体经多次洗涤离心, 最终仍有沉淀无法溶解, 将此沉淀经 8mol/L 尿素完全溶解后, 进行 SDS-PAGE 电泳, 银染, 结果仍显示主条带在 35kD 处

(图 6),与可溶性蛋白和粗包涵体的电泳结果相对应。以上结果再一次确证 xyn III 在 *E. coli* DE3 pLacI 细胞中得到了表达,并在大肠杆菌中可形成包涵体。

进一步通过 0.2mmol/L IPTG 15℃ 诱导 64h 后,

发现上清中木聚糖酶活为 15.28 IU/mL,较常规表达有大幅度提高,SDS-PAGE 显示在 35kD 处 15℃ 诱导组较 37℃ 诱导组蛋白条带明显加粗加深(图 8),表明 15℃ 低温诱导可以显著提高可溶性 xyn III 酶活。

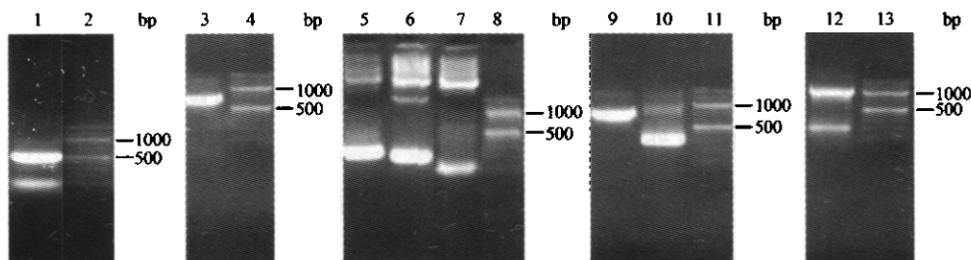


图 3 PCR 与 overlap-PCR 结果

Fig.3 Results of PCR and overlap-PCR

1: DNA marker; 2: exon1; 3: exon2-4; 4: DNA marker; 5: exon2; 6: exon3; 7: exon4; 8: DNA marker; 9: exon1-2; 10: exon3-4; 11: DNA marker; 12: exon1-4; 13: DNA marker

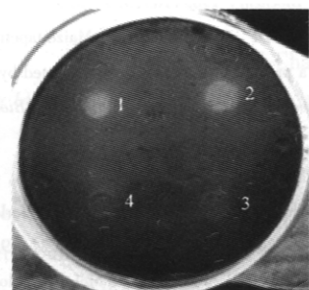


图 4 重组 xyn III 活性检测

Fig.4 Activity test of recombinant xyn III

1:lysate of *E. coli* DE3 pLacI cells (including pETBlue-2 vector inserted with xyn III) induced by 0mmol/L IPTG, 37℃, 3h; 2:lysate of *E. coli* DE3 pLacI cells (including pETBlue-2 vector inserted with xyn III) induced by 1mmol/L IPTG, 37℃, 3h; 3:lysate of *E. coli* DE3 pLacI cells (including pETBlue-2 vector not inserted with xyn III) induced by 1mmol/L IPTG, 37℃, 3h; 4:recombinant xyn III extraction buffer

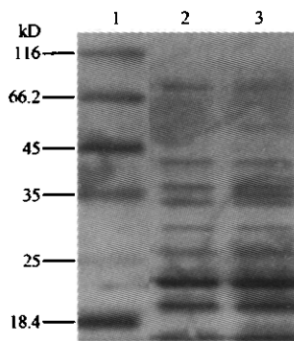


图 5 重组可溶性 xyn III SDS-PAGE 检测

Fig.5 Test of the soluble recombinant xyn III by SDS-PAGE.

1:protein marker; 2:lysate of *E. coli* DE3 pLacI cells (including pET-Blue-2 vector not inserted with xyn III) induced by 1mmol/L IPTG, 37℃, 3h; 3:lysate of *E. coli* DE3 pLacI cells (including pETBlue-2 vector inserted with xyn III) induced by 1mmol/L IPTG, 37℃, 3h

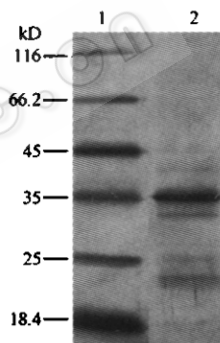


图 6 重组 xyn III 包涵体 SDS-PAGE 检测

Fig.6 Test of the inclusion body of the recombinant xyn III by SDS-PAGE

1:protein marker; 2:inclusion body

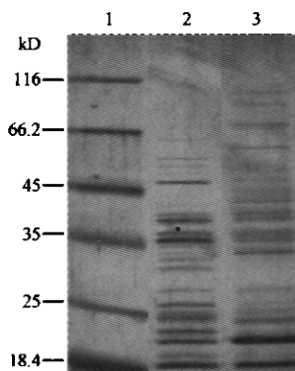


图 7 常规诱导与低温诱导条件下重组可溶性 xyn III SDS-PAGE 比较

Fig.7 Comparison of soluble recombinant xyn III by SDS-PAGE under normal induction (37℃) and low temperature induction(15℃)

1:protein marker; 2:lysate of *E. coli* DE3 pLacI cells (including pET-Blue-2 vector inserted with xyn III) induced by 0.2mmol/L IPTG, 15℃, 64h; 3:lysate of *E. coli* DE3 pLacI cells (including pETBlue-2 vector inserted with xyn III) induced by 1mmol/L IPTG, 37℃, 3h

### 3 讨论

虽然一系列研究显示禾本科植物糊粉层与花粉木聚糖酶在其种子萌发后期、花粉管伸长等生理活动中可能扮演重要角色,但由于其结构、蛋白成熟过程中以及酶如何排到细胞外等一系列特殊性<sup>[1-5]</sup>,目前采用常规手段无法获得这类木聚糖酶的重组蛋白,阻止了对这一类酶生理功能的深入研究。大量研究表明木聚糖酶除存在于植物体以外,还广泛存在于微生物。于是我们将思路转向微生物尤其与植物同属真核生物的真菌中筛选相似木聚糖酶。通过 GenBank 搜索获得一 *T. reesei* QM9414 来源的木聚糖酶与植物来源木聚糖酶分子量、结构等相似,同属 Family 10。通过克隆表达微生物来源的木聚糖酶作用于植物组织,以揭示植物源木聚糖酶的可能作用机理,尚属首次尝试。

*xynIII* 在 *T. reesei* QM9414 不表达,但该基因在基因组 DNA 中以单拷贝存在,因此无法通过 mRNA 来获取该酶 cDNA 序列。如何获取不表达的 cDNA 序列,目前人们常将基因分成若干个小片段直接合成,然后通过 overlap-PCR 法将之一一拼接<sup>[17]</sup>,但对 *xynIII* 至少需要合成 25 个 60bp 的基因片段,然后再经过 24 次 overlap-PCR 才能获得全长 cDNA 序列,显然耗时费钱。由于 *xynIII* 基因只有 4 个外显子,我们首先借鉴 overlap-PCR 方法,设计 overlap 引物,从基因组 DNA 中通过 PCR 方法获得 4 个外显子,然后再通过 overlap-PCR 方法将 4 个外显子按顺序一一拼接,仅需 8 次 PCR 反应就成功获得了与 GenBank 上外显子序列完全一致的成熟 *xynIII* cDNA 序列。overlap-PCR 法常用于获取点突变<sup>[18]</sup>,而用来除去内含子获得 cDNA 序列方面的报道,通过搜索仅发现 2000 年有一篇文献报道<sup>[19]</sup>,且该文献中所涉及的基因为狗促甲状腺素  $\beta$  亚基的基因,该基因全长 441bp,在基因组 DNA 上仅含 2 个外显子与 1 个内含子,运用 overlap-PCR 法从其他来源的基因组 DNA 中获得多个外显子的长序列基因至今尚未见报道。常规获取全长 cDNA 序列需经过提取 mRNA,通过 RT-PCR 来获得,但由于 RNA 操作需要严格的实验室设备与操作技术,如果目的基因外显子数量不多,改从基因组 DNA 中直接获取各个外显子,然后采用 overlap-PCR 方法将所有外显子一一顺序拼接,本实验显示该实验思路切实可行。

将成熟 *xynIII* cDNA 序列插入 pETBlue-2 表达载体,并在 *E. coli* DE3 pLacI 细胞获得表达,这不仅进

一步证实了所得 cDNA 序列的正确,而且这也是迄今为止该酶蛋白第一次获得成功重组表达<sup>[20]</sup>。为提高重组 *xynIII* 的得率,通过低温长时间诱导(15℃、64h),结果显示该法可以显著提高该酶的得率。

通过本实验,成功获得了包含有 *XynIII* 基因的、可以在大肠杆菌中表达的质粒,获得了重组 *xynIII*,这为进一步研究该酶对植物的作用,提示植物内源木聚糖酶的可能作用奠定基础。后续研究将继续报道。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Chrispeels MJ, Varner JE. Gibberelic acid enhanced synthesis and release of  $\alpha$ -amylase and ribonuclease by isolated barley aleurone-layers. *Plant Physiol*, 1967, 42:398 - 406
- [2] Slade AM, H $\ddot{u}$ J PB, Morrice NA *et al* Purification and characterization of three (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-xylan endohydrolases from germinated barley. *Eur J Biochem*, 1989, 185:533 - 539
- [3] Wu SSH, Suan DF, Chang HC *et al*. Maize tapetum xylanase is synthesized as a precursor, processed and activated by a serine protease, and deposited on the pollen. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(50):49055 - 49064
- [4] Caspers MPM, Lok F, Sinjorgo KMC. Synthesis, processing and export of cytoplasmic endo- $\beta$ -1,4-xylanase from barley aleurone during germination. *The Plant Journal*, 2001, 26(2):191 - 204
- [5] Banik M, Garrett TPJ, Fincher GB. Molecular cloning of cDNAs encoding (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -xylan endohydrolases from the aleurone layer of germinated barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Mol Biol*, 1996, 31:1163 - 1172
- [6] Sandhu DK, Kalra MK. Production of cellulase, xylanase and pectinase by *Trichoderma longibrachitum* on different substrates. *Trans Br Mycol Soc*, 1983, 19:409 - 413
- [7] Zhang M(张明), Zhao CY(赵呈裕). Studies on extraction of high molecular weight DNA from filamentous fungi. *Journal of Guangxi Medical University* (广西医科大学学报), 1998, 15(2):41 - 43
- [8] Wu ZH(吴志红), Wang TH(汪天虹), Huang W(黄卫) *et al*. A simple method for chromosome DNA preparation from filamentous fungi. *Mycosystema* (菌物系统), 2001, 20(4):575 - 577
- [9] Ho SN, Hunt HD, Horton RN *et al*. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 1989, 77:51 - 59
- [10] Yuan S, Wu YJ, Cosgrove DJ. A fungal endoglucanase with plant cell wall extension activity. *Plant Physiology*, 2001, 127:324 - 333
- [11] Gross KC. A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-Cyanoacetamide. *Hort Science*, 1982, 17(6):933 - 934
- [12] Sakamoto S, Tamura G, Ito K *et al*. *Aspergillus kawachii* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 1995, 27:435 - 439
- [13] Bradford MA. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye

- binding. *Anal Biochem*, 1970, **72**:248 - 250
- [14] Biely P. Diversity of microbial endo-beta-1,4-xylanases. *Applications of Enzymes to Lignocellulosics Symposium Series*, 2003, **855**:361 - 380
- [15] Xu J, Takakuwa N, Nogawa M *et al.* A third xylanase from *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, **49**:718 - 724
- [16] Xu J, Nogawa M, Okada H *et al.* Regulation of *xyn3* gene in *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, **54**:370 - 375
- [17] Yan B(颜冰), Huang PT(黄培堂). Brain drug delivery vector-cloning, expression and identification of the single chain antibody to transferrin receptor. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*(中国生物化学与分子生物学报), 2002, **18**(3):303 - 307
- [18] Zhang XE, Zhou YH, Zhang ZP *et al.* Engineering *E. coli* alkaline phosphatase yields changes of catalytic activity, thermal stability and phosphate inhibition. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2002, **20**(6):381 - 389
- [19] Yang X, McGraw RA, Su X *et al.* Canine thyrotropin beta-subunit gene: cloning and expression in *Escherichia coli*, generation of monoclonal antibodies, and transient expression in the Chinese hamster ovary cells. *Domestic Animal Endocrinology*, 2000, **18**(4):363 - 378
- [20] Kimura T, Mizutani T, Tanaka T *et al.* Molecular breeding of transgenic rice expressing a xylanase domain of the *xynA* gene from *Clostridium thermocellum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, **62**(4):374 - 379

## Cloning and Expression of *xynIII* from Genomic DNA of *Trichoderma reesei* QM9414 by Overlap-PCR

LU Chang-Mei YUAN Sheng\* ZHAO Qing-Xin

(The Key Laboratory of Bioresources Technology of Jiangsu Province, The Key Laboratory of Microbial Technology of Nanjing Normal University, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

**Abstract** After the cell enters into its programmed cell death, xylanases from grass plants gradually matured through its N-terminal and C-terminal sequence been cut by acid proteases several times. They could not be expressed by conventional protein expression system. Search the GenBank database, *xynIII* from a mutant of *T. reesei* QM9414(ATCC26921) was found. It is similar to grass plants' xylanase in their families and structures. It couldn't express in *T. reesei* QM9414, but its gene exist in genomic DNA as one copy. Through overlap-PCR method, 4 exons of *xynIII* were cloned, sequenced, spliced, and the whole cDNA of mature *xynIII* was acquired. The cDNA was inserted into pETBlue-2 vector and transformed into *E. coli* DE3 pLacI cell. *XynIII* could be expressed in the transformed cell under the conditions of 37°C, 1mmol/L IPTG induced for 3h. Low temperature (15°C), long time(64h) induction(0.2 mmol/L IPTG) could enhance *xynIII* activity.

**Key words** xylanase, *T. reesei* QM9414, overlap-PCR

Received: 02-05-2004

This work was supported by Grants from National Natural Science Funds of China (No. 30170005), Natural Science Funds of Jiangsu Province (No. BK2001112) and Natural Science Research projects of Jiangsu Province's College (No. 01KJB180004).

\* Corresponding author. Tel: 86-25-83598790; Fax: 86-25-83598215; E-mail: shengyuan@email.njnu.edu.cn