

## 滇金丝猴粪便微生物 GH10 家族木聚糖酶基因多样性

戴利铭<sup>1</sup> 邓梦<sup>1</sup> 黄遵锡<sup>1,2,3,4</sup> 王余娇<sup>1</sup> 李俊俊<sup>1,2,3,4</sup> 周峻沛<sup>1,2,3,4</sup>  
慕跃林<sup>1,2,3,4</sup> 许波<sup>1,2,3,4\*</sup>

- (1. 云南师范大学生命科学学院 云南 昆明 650500)
- (2. 生物能源持续开发利用教育部工程研究中心 云南 昆明 650500)
- (3. 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室 云南 昆明 650500)
- (4. 云南师范大学酶工程重点实验室 云南 昆明 650500)

**摘要:**【目的】分析滇金丝猴粪便微生物中 GH10 家族木聚糖酶的基因多样性。【方法】以野生和半圈养滇金丝猴粪便微生物宏基因组 DNA 为模板,用 GH10 木聚糖酶简并引物扩增木聚糖酶基因片段,利用 pMD19-T 载体构建细菌克隆文库并进行分析。【结果】从野生和半圈养滇金丝猴粪便微生物克隆文库中分别获得 26、28 条 GH10 木聚糖酶基因片段,与 GenBank 中木聚糖酶序列一致性分别介于 58%–95%、63%–81% 之间。比对分析表明,两种环境中的 GH10 木聚糖酶均来自厚壁菌门、拟杆菌门和未培养细菌。野生滇金丝猴粪便微生物的 GH10 木聚糖酶基因来源于 Uncultured bacterium 和 *Butyrivibrio*、*Bacteroides*、*Ruminococcus*、*Sphingobacterium*、*Chryseobacterium*、*Clostridium*、*Bacillus* 7 个属;而半圈养滇金丝猴粪便微生物的 GH10 木聚糖酶基因来源于 Uncultured bacterium 和 *Clostridium*、*Paludibacter*、*Sphingobacterium*、*Ruminococcus*、*Roseburia*、*Chryseobacterium* 6 个属,其中两种环境都存在来源于 *Ruminococcus*、*Clostridium*、*Chryseobacterium*、*Sphingobacterium* 的 GH10 木聚糖酶。【结论】滇金丝猴粪便微生物中含有丰富的 GH10 木聚糖酶基因,且野生和半圈养两种不同环境中 GH10 木聚糖酶基因的微生物来源存在一定差异。该研究丰富了动物胃肠道中 GH10 木聚糖酶基因多样性,并为新型木聚糖酶的开发和滇金丝猴胃肠道微生物资源的利用奠定了基础。

**关键词:** 未培养, 滇金丝猴, 粪便微生物, 木聚糖酶, 多样性

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31160229, 31360268)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-871-65920952; E-mail: xubo128028@163.com

**Received:** April 08, 2015; **Accepted:** June 23, 2015; **Published online** (www.cnki.net): July 10, 2015  
**基金项目:** 国家自然科学基金项目(No. 31160229, 31360268)

**\*通讯作者:** Tel: 86-871-65920952; E-mail: xubo128028@163.com

**收稿日期:** 2015-04-08; **接受日期:** 2015-06-23; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-07-10

## Gene diversity of the glycosyl hydrolase family 10 xylanase in the fecal microorganism of *Rhinopithecus bieti*

DAI Li-Ming<sup>1</sup> DENG Meng<sup>1</sup> HUANG Zun-Xi<sup>1,2,3,4</sup> WANG Yu-Jiao<sup>1</sup> LI Jun-Jun<sup>1,2,3,4</sup>  
ZHOU Jun-Pei<sup>1,2,3,4</sup> MU Yue-Lin<sup>1,2,3,4</sup> XU Bo<sup>1,2,3,4\*</sup>

(1. School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming, Yunnan 650500, China)

(2. Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Ministry of Education, Kunming, Yunnan 650500, China)

(3. Key Laboratory of Yunnan for Biomass Energy and Biotechnology of Environment, Kunming, Yunnan 650500, China)

(4. Key Laboratory of Enzyme Engineering, Yunnan Normal University, Kunming, Yunnan 650500, China)

**Abstract:** [Objective] The diversity of the glycosyl hydrolase family 10 (GH10) xylanase gene of fecal microorganism of *Rhinopithecus bieti* is studied. [Methods] Using the genomic DNA extracted from the feces of wild and half-wild *R. bieti* as template, we amplified xylanase gene fragments by degenerate primer of GH10 xylanase. Bacteria clone library is constructed and analyzed using pMD19-T vector. [Results] From fecal microbial clone library of wild and half-wild *R. bieti* 26 and 28 GH10 xylanase gene fragments are respectively acquired, whose identity with xylanase sequences in GenBank varies from 58%–95% to 63%–81%. Blast results shows that microbial composition of GH10 xylanase from two different environments is similar, including the Firmicutes, Bacteroidetes and uncultured bacteria. GH10 xylanase gene of fecal microbiome of wild *R. bieti* derives from Uncultured bacterium, *Butyrivibrio*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Sphingobacterium*, *Chryseobacterium*, *Clostridium*, *Bacillus*, while that of half-wild *R. bieti* only from Uncultured bacterium, *Clostridium*, *Paludibacter*, *Sphingobacterium*, *Ruminococcus*, *Roseburia*, *Chryseobacterium*. There is GH10 xylanase existing in both environments, including *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Chryseobacterium*, *Sphingobacterium*. [Conclusion] There are abundant GH10 xylanase genes in fecal microorganism of wild and half-wild *R. bieti* and there is some difference in their microbial sources. This research enriches the diversity of GH10 xylanase in animal gastrointestinal tract as well as sets foundations for the exploitation of novel xylanase and the utilization of microbial resources in *R. bieti*'s gastrointestinal tract.

**Keywords:** Culture-independent, *Rhinopithecus bieti*, Fecal microorganism, Xylanase, Diversity

木聚糖是植物细胞壁中半纤维素的主要组成成分,其完全水解需要多种酶的协同作用。内切-1,4-β-D-木聚糖酶俗称木聚糖酶,它随机切割木聚糖主链后生成木糖,是木聚糖降解过程中发挥主要作用、具广泛应用价值的一类酶<sup>[1]</sup>。研究表明木聚糖酶分布于 GH5、7、8、10、11、43 等家族中, GH10 家族的木聚糖酶由于能将天然支链木聚糖降解为木寡糖而备受关注<sup>[2-3]</sup>。木聚糖酶在饲料添加剂、纸浆漂白、食品加工、医药等行业中具有广泛的应用前景,但不同应用领域所需木聚糖酶性质具有差异,因此对不同环境来源木聚糖酶基因资源的开发具有重要意义<sup>[4-5]</sup>。

植食性动物胃肠道中存在丰富的与木质纤维

素降解有关的酶类,但不同动物之间存在差异<sup>[6-8]</sup>。近年来,研究者通过微生物分离培养和宏基因组学等方法从天牛胃肠道<sup>[9]</sup>、黑颈鹤粪便<sup>[10]</sup>、山羊瘤胃<sup>[11]</sup>、奶牛瘤胃<sup>[12]</sup>等动物中获取了多种木聚糖酶。滇金丝猴(*Rhinopithecus bieti*)主要采食地衣、野果、针叶树的嫩叶、越冬的叶芽苞、松萝等<sup>[13-14]</sup>,是典型的植食性动物,由于动物摄食植物种类以及动物的物种差异,其胃肠道中可能蕴含不同于其它动物的新微生物木聚糖酶基因资源。

本研究以野生和半圈养的滇金丝猴粪便微生物为研究对象,提取其宏基因组 DNA,利用简并引物 PCR 扩增获得 GH10 木聚糖酶基因片段,通过构建系统进化树首次研究了滇金丝猴粪便微生物中

GH10 家族木聚糖酶基因的多样性, 为新型木聚糖酶的开发和滇金丝猴胃肠道微生物资源的利用奠定了基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 野生和半圈养滇金丝猴食物结构及其粪便样品采集

野生和半圈养滇金丝猴粪便样品采自云南省维西县白马雪山国家级自然保护区。滇金丝猴的粪便颗粒较小、粪便量少, 为保证目的 DNA 的质量, 粪便样品用干冰保存运输。采集野生和半圈养滇金丝猴的粪便样品各 23 份, 于  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

半圈养滇金丝猴不关在笼子里, 而在自然保护区内被人为限制活动区域, 并接受人工投食。投食植物采自保护区内, 主要包括松萝、地衣、箭竹、鸡素子等树木的嫩叶、花、果实。野生型滇金丝猴的食谱比半圈养更为广泛, 除半圈养投喂的植物外, 还包括华山松、大叶杨、岷江冷杉、大叶杜鹃、野萝卜等多种植物, 且随季节变化其采食的植物种类会发生变化, 例如: 野生滇金丝猴春季以芽苞、嫩叶为主要食物; 夏季以叶片为主要食物; 秋季以果实为主要食物; 冬季以针叶树松果籽及嫩枝皮为主要食物<sup>[15]</sup>。

### 1.2 菌株和质粒

大肠杆菌感受态细胞 *Escherichia coli* Trans-I 由本实验室保存; pMD19-T vector 购自日本 TaKaRa 公司。

### 1.3 酶和生化试剂

DNA Marker (DL2000、DL15000)、*Taq* DNA 聚合酶购自日本 TaKaRa 公司; 质粒抽提试剂盒购自上海捷瑞公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒、dNTPs、PCR 产物纯化试剂盒购自上海华舜公司; 氨苄青霉素(Ampicilline)、琼脂糖(Agarose)购自德国 Sigma 公司; 其余为国产分析纯。

### 1.4 滇金丝猴粪便微生物 GH10 木聚糖酶基因片段的扩增及文库构建

1.4.1 滇金丝猴粪便微生物宏基因组 DNA 的提取: 参照 QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)试剂盒

操作说明, 分别提取 23 份野生滇金丝猴的粪便微生物宏基因组 DNA, 然后取相同浓度的 DNA 混合(半圈养滇金丝猴宏基因组 DNA 的获取方法同野生型), 对野生和半圈养滇金丝猴的混合基因组 DNA 进行 Nanodrop 检测, 其  $A_{260}/A_{280}$  值分别为 1.88 和 1.87, 均满足后续实验要求, 置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

1.4.2 GH10 木聚糖酶基因扩增: 分别以混合的野生和半圈养滇金丝猴粪便微生物基因组 DNA 作为模板, 用简并引物 Xyn 10F (5'-GGYACACBCTNRTNTGGCA-3')和 Xyn 10R (5'-YTCRTTNACNACRTCCCA-3')扩增目的片段<sup>[16]</sup>。PCR 反应体系(20  $\mu\text{L}$ ):  $10\times\text{PCR buffer}$  4  $\mu\text{L}$ , dNTPs (2.5 mmol/L) 2  $\mu\text{L}$ , *rTaq* DNA polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.3  $\mu\text{L}$ , 上下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 10.7  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 min;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s, 15 个循环;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $44\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s, 30 个循环;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 min; 其中从  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  到  $44\text{ }^{\circ}\text{C}$  每个循环下降  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.4.3 克隆文库构建及阳性克隆筛选: 2%的琼脂糖凝胶电泳显示野生和半圈养滇金丝猴粪便微生物宏基因组 DNA 都能扩增出 100–250 bp 的基因片段, 符合简并引物 Xyn 10F 和 Xyn 10R 扩增第十家族木聚糖酶基因的理论值。扩增产物经琼脂糖核酸电泳检测后切下目的条带, 胶回收试剂盒纯化 PCR 产物。用 pMD19-T 载体于  $16\text{ }^{\circ}\text{C}$  过夜连接, 产物转化到 *E. coli* Trans-I 感受态细胞中, 在含有 X-gal、IPTG、Amp 的 LB 平板上检测, 选择白色菌落进行菌液 PCR 验证, 鉴定为阳性重组子的克隆送深圳华大生物科技有限公司测序, 测序通用引物为 M13。

1.4.4 系统发育分析: 测序所得 DNA 序列使用 Vector NTI 11.5 软件去除两端载体序列, 用 NCBI 中的 BLASTx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)工具比对, 与 GenBank 中木聚糖酶基因序列有较高相似性的序列鉴定为木聚糖酶基因, 将基因片段翻译为氨基酸序列构建系统进化树并进行多样性分析, 参考序列选用与环境来源木聚糖酶基因片段相似性较

高的木聚糖酶基因序列。多序列比对采用 ClustalX, 采用 MEGA 6.0 软件选择邻近相接法 (Neighbor-Joining method) 构建系统进化树, 其步值设定为 1 000。

**1.4.5 序列登录号:** 两种环境中获得的序列信息提交至 EMBL 数据库, 野生和半圈养粪便微生物来源的木聚糖酶基因片段登录号分别为: LN717193–LN717218 和 LN717219–LN717246。

## 2 结果与分析

### 2.1 野生、半圈养滇金丝猴粪便微生物 GH10 木聚糖酶基因比对分析

从两个克隆文库中分别挑取 100 个阳性重组子测序, 去载体比对分析发现, 野生和半圈养文库中分别有 96、70 条基因片段与 GenBank 数据库中 GH10 木聚糖酶基因有高度一致性, 其氨基酸序列一致性分别在 58%–95%、63%–81% 之间; 序列长度分别介于 151–193 bp 和 166–196 bp 之间。ClustalX 软件比对发现所有蛋白质序列都具有 GH10 木聚糖酶的催化残基(DVVNE)。

利用 CD-Hit 程序将两种环境样品中获得的基

因序列去冗余, 最终获得 54 条不同序列, 微生物组成对应厚壁菌门、拟杆菌门、未培养细菌。其中野生滇金丝猴粪便微生物 GH10 木聚糖酶基因克隆文库中得到 26 条, 微生物来源于 *Uncultured bacterium* 和 *Butyrivibrio*、*Bacteroides*、*Ruminococcus*、*Sphingobacterium*、*Chryseobacterium*、*Clostridium*、*Bacillus* 7 个属的 14 个种。从半圈养滇金丝猴粪便微生物 GH10 木聚糖酶基因克隆文库得到 28 条, 来源于 *Uncultured bacterium* 和 *Clostridium*、*Paludibacter*、*Sphingobacterium*、*Ruminococcus*、*Roseburia*、*Chryseobacterium* 6 个属的 15 个种。

比较两种环境 GH10 木聚糖酶的微生物来源(表 1), 发现获取的基因片段都与 *Uncultured bacterium*、*Ruminococcus*、*Clostridium*、*Chryseobacterium*、*Sphingobacterium* 来源的 GH10 木聚糖酶基因有较高的一致性; 而 *Bacillus*、*Bacteroides*、*Butyrivibrio* 这 3 种微生物来源的 GH10 木聚糖酶基因仅在野生环境克隆文库中发现; *Paludibacter* 和 *Roseburia* 来源的 GH10 木聚糖酶基因仅存在半圈养环境克隆文库中。

表 1 不同植食性动物胃肠道微生物 GH10 家族木聚糖酶来源比较

Table 1 The comparison of microorganisms which produce xylanase (GH10) from different sources of herbivorous animal

| 来源<br>Origin                | 山羊瘤胃 <sup>[19]</sup><br>Goat rumen | 绵羊瘤胃 <sup>[19]</sup><br>Sheep rumen | 野生滇金丝猴粪便<br>Feces of wild <i>R. bieti</i> | 半圈养滇金丝猴粪便<br>Feces of half-wild <i>R. bieti</i> |
|-----------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---|---|
| <i>Uncultured bacterium</i> | +                                  | +                                   | +   | +   |
| <i>Butyrivibrio</i>         |                                    |                                     | +   |   |
| <i>Bacteroides</i>          | +                                  | +                                   | +   |   |
| <i>Ruminococcus</i>         | +                                  | +                                   | +   | +   |
| <i>Sphingobacterium</i>     |                                    |                                     | +   | +   |
| <i>Chryseobacterium</i>     |                                    |                                     | +   | +   |
| <i>Clostridium</i>          |                                    | +                                   | +   | +   |
| <i>Paludibacter</i>         |                                    |                                     |   | +   |
| <i>Roseburia</i>            |                                    |                                     |   | +   |
| <i>Prevotella</i>           | +                                  | +                                   |   |   |
| <i>Xanthomonas</i>          | +                                  |                                     |   |   |
| <i>Verrucomicrobiae</i>     | +                                  | +                                   |   |   |
| <i>Cellulosilyticum</i>     | +                                  | +                                   |   |   |
| <i>Schizophyllum</i>        |                                    | +                                   |   |   |
| <i>Bacillus</i>             |                                    |                                     | +   |   |

## 2.2 滇金丝猴粪便微生物木聚糖酶基因多样性分析

用本研究获得的 54 条(野生 D、半圈养 S)木聚糖酶基因片段与 GenBank 来源的 25 条参考序列构建进化树(图 1), 并将其分为 A、B、C、D、E、F 和 G 7 个分支。

滇金丝猴粪便微生物中未培养细菌来源的 GH10 木聚糖酶基因为优势组分, 分支 A、B 共有 20 条序列与未培养细菌来源的木聚糖酶基因参考序列聚在一起, 其中野生环境来源的木聚糖酶基因丰度与半圈养环境来源的相当。分支 A 中 xynd-3-5、xynd-5-5、xyns-5-5 与来自奶牛瘤胃 Uncultured bacterium 的木聚糖酶基因聚在一起。分支 B 中有 3 个小分支, 其中一个小分支有 13 条基因没有与参考序列聚在一起而单独成簇, 而 xyns-5-13 与其他克隆存在明显的进化距离而成为新的一簇。xynd-1-13、xyns-5-2、xyns-5-12 与已知的其他 Uncultured bacterium 来源的木聚糖酶基因不相关, 单独聚集为一簇。

由图 1 可见, 20 条 GH10 木聚糖酶基因与厚壁菌门 Firmicutes 来源的木聚糖酶基因参考序列相似性较高。其中来自 C、D、F 亚簇的 9 条序列与梭菌属 *Clostridium* 来源的木聚糖酶参考序列聚在一起, 但 C、D、F 之间的距离较远, 说明滇金丝猴粪便微生物中 *Clostridium* 来源的 GH10 木聚糖酶序列多样性较高。此外, 有 8 条序列(分支 E)与源于瘤胃球菌属 *Ruminococcus* 的木聚糖酶参考序列聚在一起, 其中有 5 条序列来源于野生环境; 序列 xynd-6-53 和 xynd-6-60 单独聚为一类, 与其他序列存在一定的进化距离。分支 E 中仅有半圈养环境来源的木聚糖酶基因 xyns-5-6、xyns-5-17 与 *Roseburia intestinalis* 来源的木聚糖酶聚在一起。xynd-6-80 虽然与来源于土壤的 *Bacillus* sp. HJ2 的木聚糖酶存在最高一致性(58%), 但在进化树中存在明显的进化距离。

分支 G 中有 14 条 GH10 木聚糖酶基因与拟杆菌门 Bacteroidetes 来源的木聚糖酶基因参考序列聚

在一起, 分布于 4 个不同的属, 包括 *Bacteroides*、*Sphingobacterium*、*Chryseobacterium*、*Paludibacter*。基于进化分析和序列比对发现, 仅 xynd-6-42、xynd-6-44、xynd-6-79 三条野生粪便微生物来源的木聚糖酶基因序列和 *Bacteroides* sp. CAG:875 聚在一起, xyns-3-15、xyns-5-16、xyns-3-2 三条半圈养粪便微生物来源的木聚糖酶基因序列和 *Paludibacter propionicigenes* WB4 聚在一起。

## 3 结论与讨论

植物细胞纤维主要由纤维素、半纤维素和木质素组成, 其中半纤维素的主要组成成分是木聚糖, 而木聚糖酶是木聚糖降解过程的重要酶类。植食性动物胃肠道中蕴含着丰富的微生物木聚糖酶基因资源, 并且不同动物之间存在差异, 然而目前对其基因多样性的研究报道还很少, 且主要集中在反刍动物。Wang 等<sup>[17]</sup>采用同源克隆法研究山羊瘤胃中 GH10 家族的木聚糖酶基因多样性, 并用改进的 TAIL-PCR 方法从山羊瘤胃中获得 5 个 GH10 的木聚糖酶全长基因。Li 等<sup>[18]</sup>通过研究绵羊饲喂周期内不同时间点 GH10 木聚糖酶和 CP 植酸酶基因组成的比较, 表明了瘤胃环境 GH10 木聚糖酶和 CP 植酸酶基因呈现多样的转录变化趋势, 从分子水平揭示了瘤胃环境降解酶的动态性和复杂性。

本文首次报道灵长类植食性动物滇金丝猴粪便微生物来源的 GH10 木聚糖酶基因多样性, 采用未培养技术, 直接从滇金丝猴粪便微生物中提取总 DNA, 用 GH10 简并引物扩增基因片段并构建克隆文库。结果从两种环境的滇金丝猴粪便微生物宏基因组克隆文库中获得 54 条第十家族的木聚糖酶基因片段, BLAST 比对分析表明, 实验所得大多数木聚糖酶基因同已知的木聚糖酶基因相似性较低, 其中最低为 58%, 表明所得的基因片段具有较高的新颖性。

野生和半圈养滇金丝猴粪便中 GH10 木聚糖酶的微生物来源存在差异, *Bacillus*、*Bacteroides*、*Butyrivibrio* 微生物来源的 GH10 木聚糖酶基因只存

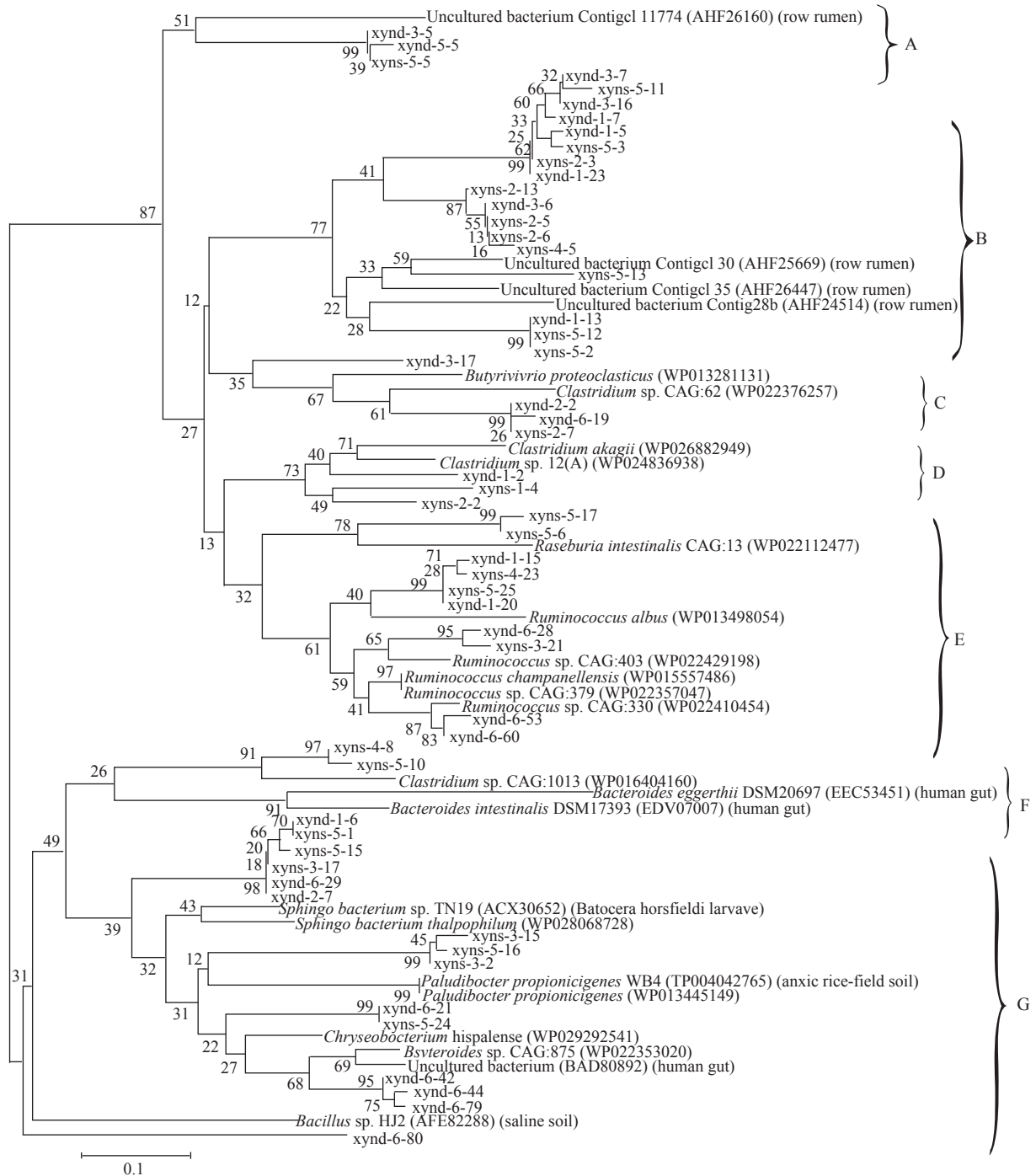


图 1 滇金丝猴粪便微生物第十家族木聚糖酶基因片段进化分析

Figure 1 Phylogenetic analysis based on the partial amino acid sequences of GH10 xylanase genes detected in the fecal microorganism of *Rhinopithecus bieti*

Note: The bootstrap values ( $n=1\ 000$  replicates) are reported as percentages. The scale bar represents the number of changes per amino acid position. Accession numbers are given at the end of each species name. Based on annotation of the sequences in public databases, the sources from which the strains were isolated are indicated in parentheses.

在于野生滇金丝猴的克隆文库中, 而 *Paludibacter*、*Roseburia* 微生物来源的 GH10 木聚糖酶基因只在半圈养滇金丝猴的克隆文库中存在。两者不同的生活方式和食物结构可能是引起差异的主要因素, 半圈养滇金丝猴以人工投食为主, 食物相对单一, 而野生滇金丝猴由于活动区域广阔, 其摄食植物种类丰富多样。来源于瘤胃球菌属 *Ruminococcus* 的 GH10 木聚糖酶在野生和半圈养滇金丝猴粪便、山羊和绵羊瘤胃中都存在, 说明该菌在木聚糖的降解中发挥着重要作用(表 1)。来源于 *Butyrivibrio*、*Sphingobacterium*、*Chryseobacterium*、*Paludibacter*、*Roseburia*、*Bacillus* 6 个属细菌的 GH10 木聚糖酶仅见于滇金丝猴粪便, 而山羊瘤胃来源于 *Prevotella*、*Xanthomonas*、*Verrucomicrobiae*、*Cellulosilyticum* 4 个属, 绵羊瘤胃来源于 *Schizophyllum* 属的 GH10 木聚糖酶在滇金丝猴粪便中没有发现。滇金丝猴粪便 GH10 木聚糖酶基因来源的微生物主要来自厚壁菌门, 而山羊和绵羊瘤胃中 GH10 木聚糖酶基因主要来源拟杆菌门细菌<sup>[19]</sup>, 这一结果丰富了动物胃肠道中木聚糖酶基因分布的微生物多样性, 也表明了动物摄食植物种类以及动物的物种差异对木聚糖酶基因微生物来源的影响。

本研究结果表明滇金丝猴胃肠道中蕴含不同于其它动物的新微生物木聚糖酶基因资源, 获得了丰富的 GH10 木聚糖酶基因片段, 下一步可在获得的基因片段基础上, 利用热不对称交错 PCR (TAIL-PCR)或反向 PCR 等方法获得木聚糖酶全长基因, 并进行基因的克隆表达, 以充分开发利用滇金丝猴胃肠道微生物的木聚糖酶基因资源。

## 参 考 文 献

- [1] Öhgren K, Bura R, Saddler J, et al. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(13): 2503-2510
- [2] Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, et al. Microbial xylanases and their industrial applications: a review[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 56(3/4): 326-338
- [3] Kopečný J, Williams AG. Synergism of rumen microbial hydrolases during degradation of plant polymers[J]. *Folia Microbiologica*, 1988, 33(3): 208-212
- [4] Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29(1): 3-23
- [5] Liu XS, Huang ZQ, Zhang XN, et al. Cloning, expression and characterization of a novel cold-active and halophilic xylanase from *Zunongwangia profunda*[J]. *Extremophiles*, 2014, 18(2): 441-450
- [6] Hess M, Sczyrba A, Egan R, et al. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen[J]. *Science*, 2011, 331(6016): 463-467
- [7] Dai X, Zhu YX, Luo YF, et al. Metagenomic insights into the fibrolytic microbiome in yak rumen[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40430
- [8] Pope PB, Mackenzie AK, Gregor I, et al. Metagenomics of the Svalbard reindeer rumen microbiome reveals abundance of polysaccharide utilization loci[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38571
- [9] Zhou JP, Shi PJ, Zhang R, et al. Symbiotic *Streptomyces* sp. TN119 GH 11 xylanase: a new pH-stable, protease- and SDS-resistant xylanase[J]. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 2011, 38(4): 523-530
- [10] Zhou JP, Shen JD, Zhang R, et al. Molecular and biochemical characterization of a novel multidomain xylanase from *Arthrobacter* sp. GN16 isolated from the feces of *Grus nigricollis*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 175(1): 573-588
- [11] Wang GZ, Luo HY, Wang YR, et al. A novel cold-active xylanase gene from the environmental DNA of goat rumen contents: direct cloning, expression and enzyme characterization[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(3): 3330-3336
- [12] Cheng FS, Sheng JP, Dong RB, et al. Novel xylanase from a holstein cattle rumen metagenomic library and its application in xylooligosaccharide and ferulic acid production from wheat straw[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(51): 12516-12524
- [13] Li DY, Ren BP, He XM, et al. Diet of *Rhinopithecus bieti* at xiangguing in baimaxueshan national Nature Reserve[J]. *Acta Theriologica Sinica*, 2011, 31(4): 338-346 (in Chinese)  
黎大勇, 任宝平, 和鑫明, 等. 白马雪山自然保护区响古箐滇金丝猴的食性[J]. *兽类学报*, 2011, 31(4): 338-346
- [14] Long YC, Zhong T, Xiao L. Study on geographical distribution and population of the Yunnan Snub-nosed monkey[J]. *Zoological Research*, 1996, 17(4): 437-441 (in Chinese)  
龙勇诚, 钟泰, 肖李. 滇金丝猴地理分布、种群数量与相关生态学的研究[J]. *动物学研究*, 1996, 17(4): 437-441
- [15] Ding W. Feeding ecology, social organization and conservation biology of *Rhinopithecus bieti* at tacheng, yunnan[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, 2003 (in Chinese)  
丁伟. 塔城黑白仰鼻猴(*Rhinopithecus bieti*)的觅食生态学和社会组织—兼论其保护现状[D]. 北京: 中国科学院动物研究所博士学位论文, 2003
- [16] Zhou JP. Preliminary study on cellulases and hemicellulases from symbiotic bacteria harbored in the gut of *Batocera Horsfieldi* larvae[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Institute of Feed, Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010 (in Chinese)  
周峻沛. 云斑天牛胃肠道内共生细菌来源的纤维素酶和半纤维素酶的初步研究[D]. 北京: 中国农业科学院饲料研究所博士学位论文, 2010
- [17] Wang GZ, Luo HY, Meng K, et al. High genetic diversity and different distributions of glycosyl hydrolase family 10 and 11 xylanases in the goat rumen[J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e16731
- [18] Li ZY, Zhao H, Yang PL, et al. Comparative quantitative analysis of gene expression profiles of glycoside hydrolase family 10 xylanases in the sheep rumen during a feeding cycle[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(4): 1212-1220
- [19] Wang GZ. Diversity of xylanase genes in different environments and heterologous expression of novel xylanase gene cloned directly from metagenomic DNA[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Institute of Feed, Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2011 (in Chinese)  
王国增. 不同环境中木聚糖酶基因多样性分析及宏基因组来源的新基因克隆与表达[D]. 北京: 中国农业科学院饲料研究所博士学位论文, 2011