

汪伟,孙春娃,杨爱文,等. 利用重叠 PCR 法克隆里氏木霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 *cella*[J]. 江苏农业科学,2018,46(21):42-45.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.21.009

# 利用重叠 PCR 法克隆里氏木霉 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 *cella*

汪伟,孙春娃,杨爱文,金皓,姚萍,袁维维,徐建明,周玉珍

(淮阴师范学院/江苏省环洪泽湖生态农业技术重点实验室,江苏淮安 223300)

**摘要:**在利用里氏木霉降解纤维素为葡萄糖继而发酵生产液体燃料和大宗化学品的工业生产过程中,降解纤维素为葡萄糖是关键的一步。 $\beta$ -葡萄糖苷酶在调控纤维素酶的活性及其表达时起到至关重要的双重作用。为了研究  $\beta$ -葡萄糖苷酶 *Cella* 在里氏木霉 Rut C-30 中对纤维素酶诱导表达及其酶活性的影响,以里氏木霉的基因组 DNA 为模板,设计扩增看家基因( $\beta$ -*actin*)的启动子(Pact)和 *cella* 的引物,分别进行 Pact、*cella* 的 PCR 扩增,然后利用重叠 PCR 将 Pact、*cella* 连成 1 个片段 Pact-*cella*,再通过酶切成功地将 Pact-*cella* 片段连接到 pCambia1300 二元质粒上,从而为后续研究  $\beta$ -葡萄糖苷酶在调控纤维素酶的酶活性及其表达过程中的作用奠定了基础。

**关键词:**重叠 PCR; $\beta$ -葡萄糖苷酶 *cella*;里氏木霉

**中图分类号:**S188+.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)21-0042-03

木质纤维素是地球上储量最丰富的可再生资源。近年来,各地露天大面积直接焚烧秸秆的现象时有发生,并且日趋严重。而秸秆焚烧不但造成严重的资源浪费,而且会排放大量的污染物,使得局部大气和水环境质量恶化,造成环境污染<sup>[1]</sup>。在矿物燃料资源日趋枯竭、环境日趋恶化的严峻形势下,利用廉价的木质纤维素生产液体燃料和大宗化学品,可以有效地缓解能源和环境危机,促进全球经济的可持续发展<sup>[2-3]</sup>。

纤维素酶是实现秸秆等废弃木质纤维素水解为单糖,继而发酵生产生物乙醇和其他化工产品的生产过程中最为关键的环节之一<sup>[4]</sup>。生物产纤维素酶的效率很低、生产成本低、酶活性低、用量大等因素限制了纤维素酶的推广和应用<sup>[5]</sup>。丝状真菌是自然界中降解木质纤维素的主要微生物,其中木霉属中的里氏木霉是最重要的代表菌株<sup>[6]</sup>。里氏木霉分泌的纤维素酶具有产量高、种类相对齐全等特点,也是工业生产纤维素酶的主要菌株<sup>[7]</sup>。里氏木霉的纤维素降解酶的表达合成受到多级控制,然而大部分调节发生在转录水平。不同纤维素酶的编码基因被共同调节,这意味着它们同时受到诱导或抑制,虽然诱导或抑制的程度不尽相同<sup>[8-10]</sup>。其中外切酶 CBH I (cellobiohydrolase I) 占里氏木霉分泌的纤维素酶组分的 60%,其次为 CBH II (cellobiohydrolase II) 和 EG2。而  $\beta$ -葡萄糖苷酶在里氏木霉分泌的纤维素酶组分中含量最少,其酶活性较低,因此造成水解体系中纤维二糖的积累,由此可见,人为过量表达  $\beta$ -葡萄糖苷酶是提高纤维素酶整体

酶活性的有效途径之一。

有研究显示,在细胞膜上 1 个通透酶负责将纤维二糖运送到细胞内,从而诱导纤维素酶的合成<sup>[11]</sup>。然而,关于纤维二糖是否就是纤维素酶的诱导分子还不是很清楚。纤维二糖的诱导效果不如其位置异构体,如槐糖、龙胆二糖和昆布二糖,其中槐糖的诱导效果最好<sup>[12-13]</sup>。有研究者在使用  $\beta$ -葡萄糖苷酶作用过的纤维素酶降解纤维素的溶液分离得到纤维二糖的异构体,主要有槐糖,说明  $\beta$ -葡萄糖苷酶对纤维二糖不仅有水解作用,很可能还在纤维素酶诱导分子的合成过程中起到重要作用<sup>[14]</sup>。

相关研究还显示, $\beta$ -葡萄糖苷酶 *Cella* 有转糖基作用的酶活性,可以催化纤维二糖得到槐糖、纤维三糖、纤维四糖等<sup>[14]</sup>。敲除里氏木霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶 *cella*、*cel3a* 或 *cel1b* 后,严重延迟了纤维素酶的表达时间,使得胞外纤维素酶的活性也有所降低(*cella* 受到的影响最严重),而添加强诱导物槐糖后又恢复了纤维素酶的正常表达<sup>[11,15-16]</sup>,说明  $\beta$ -葡萄糖苷酶在里氏木霉纤维素酶诱导物槐糖的形成过程中起着重要作用。1 个不影响  $\beta$ -葡萄糖苷酶 *Cella* 的转糖基作用的酶活性而降低了其水解酶活性的单个氨基酸的突变(V409F)提高了纤维二糖对里氏木霉纤维素酶的诱导作用<sup>[17]</sup>,进一步说明  $\beta$ -葡萄糖苷酶的转糖基作用在纤维素酶的诱导合成过程中起到重要作用,因此,体内过量表达  $\beta$ -葡萄糖苷酶不但能提高里氏木霉体内纤维素酶的整体酶活性,更能研究其纤维素酶的诱导表达机制。本研究利用重叠 PCR 成功克隆  $\beta$ -葡萄糖苷酶 *cella*,并使其受里氏木霉看家基因  $\beta$ -*actin* 的启动子(Pact)启动,能够在里氏木霉细胞内持续过量表达,以期为后续研究  $\beta$ -葡萄糖苷酶在调控纤维素酶的酶活性及其表达过程中的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒及试剂

大肠杆菌 (*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ )、二元载体 pCambia1300、里氏木霉 Rut C-30 均为笔者所在课题组保

收稿日期:2017-07-11

基金项目:江苏省自然科学基金面上项目(编号:BK20131213);淮安市科技计划(编号:HG201307);江苏省生物质与酶技术重点实验室项目(编号:JSBEET1303)。

作者简介:汪伟(1981—),女,山东聊城人,博士,讲师,主要从事微生物次生代谢产物的生物合成方面的研究。E-mail:weiwang2599@126.com。

通信作者:周玉珍,博士,副教授,主要从事微生物代谢相关酶的酶活机制及其表达调控机制方面的研究。E-mail:zyz@hytc.edu.cn。

存。大肠杆菌(*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ )感受态细胞由笔者所在实验室制备。DNA 回收试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶、PCR DNA 纯化试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、Pfu DNA 聚合酶、*T<sub>4</sub>* DNA 连接酶、RNase、dNTP、DNA marker、限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xba* I, 均购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)。其他试剂均为进口或国产分析纯。PCR 引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成,DNA 测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

## 1.2 引物设计

根据 GenBank 上里氏木霉基因组 DNA 中看家基因( $\beta$ -*actin*)的启动子(Pact)DNA 序列和  $\beta$ -葡萄糖苷酶 *cella* 基因序列,设计 PCR 程序,分别扩增 Pact(长度约为 1 200 bp)和 *cella*(长度约为 2 200 bp) DNA 片段 *Xba* I - Pact - F 和 Pact - *cella* - R、Pact - *cella* - F 和 *cella* - *Hind* III - R,考虑到后续要利用重叠 PCR 拼接 2 个基因片段为 Pact - *cella*(长度约为 3 400 bp)及其后续的克隆酶切位点,在扩增 Pact 的上游引物上添加 *Xba* I 酶切位点 5'-TCTAGA-3'(用波浪线标出),在下游引物上添加 *cella* 的 5'端 DNA 序列(用下划线标出);在扩增 *cella* 的上游引物上添加 Pact 的 3'端 DNA 序列(用下划线标出),在下游引物上添加 *Hind* III 酶切位点 5'-AAGCTT-3'(用波浪线标出)。引物序列如下(加粗的为 2 个引物的重叠部分):

*Xba* I - Pact - F: 5' - TATATATATCTAGACACAGCA-GAAGGGGTTCCGTC AAC - 3' ;

Pact - *cella* - R: 5' - **GGGCAGCATTGTGACTGATTAATGTATGAAGCTGATGAAAG** - 3' ;

Pact - *cella* - F: 5' - **ATTAATCAGTCACAATGCTGCCCAAGGACTTTCAGTGG** - 3' ;

*cella* - *Hind* III - R: 5' - ATTATATATAAGCTTGCCATCATGGTGCTGCTGTTTCTG - 3'。

## 1.3 启动子 Pact 与 *cella* 的 PCR 扩增与纯化

用江洁等的方法提取里氏木霉 Rut C - 30 基因组 DNA<sup>[18]</sup>,经 DNA 琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 检查纯度及其浓度后,以里氏木霉 RutC - 30 基因组为模版,根据 Pfu DNA 聚合酶说明书要求,用第 1.2 节中设计的引物分别扩增启动子 Pact 和 *cella* DNA 片段。其 PCR 扩增程序均如下:94 ℃ 4 min;94 ℃ 30 s,52 ℃ 36 s,70 ℃ 30 s,30 个循环;72 ℃ 5 min,4 ℃ 冷却后进行琼脂糖凝胶电泳检测。由于 PCR 产物较纯,采用 PCR 纯化试剂盒分别纯化 Pact、*cella* DNA 片段。

## 1.4 重叠 PCR 连接 Pact 与 *cella*

以第 1.3 节 PCR 扩增并纯化的 Pact 和 *cella* 为 DNA 模板,按照 Pfu DNA 聚合酶说明书要求,以 *Xba* I - Pact - F、*cella* - *Hind* III - R 为引物拼接 Pact、*cella* DNA 片段,并扩增 Pact - *cella*。其 PCR 扩增程序均如下:94 ℃ 4 min;94 ℃ 30 s,52 ℃ 36 s,70 ℃ 3 min,30 个循环;72 ℃ 5 min,4 ℃ 冷却后进行琼脂糖凝胶电泳检测。由于出现多条 PCR 产物,采用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收大小合适的 PCR 产物。

## 1.5 融合 DNA 片段 Pact - *cella* 的克隆

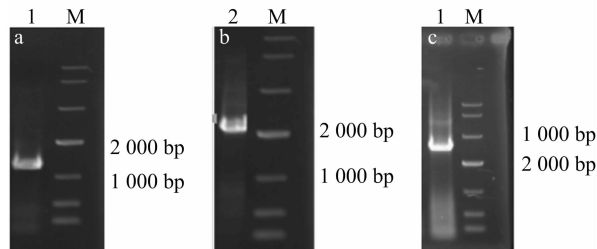
由于引物 *Xba* I - Pact - F、*cella* - *Hind* III - R 上分别设计有 *Xba* I、*Hind* III 酶切位点,Pact - *cella* 的两端分别含有 *Xba* I、*Hind* III 酶切位点。因此可以通过 *Xba* I、*Hind* III 双酶

切把 Pact - *cella* DNA 片段克隆到二元载体 pCambia1300 上。根据说明书要求选择 Tango buffer 对 Pact - *cella* 和二元载体 pCambia1300 分别进行 *Xba* I、*Hind* III 双酶切。分别纯化 Pact - *cella*、pCambia1300 双酶切片段,按照 *T<sub>4</sub>* 连接酶试剂盒说明书,将酶切后的 Pact - *cella* 和 pCambia1300 片段连接起来,得到重组质粒 Pact - *cella* - pCambia1300,并用化学转化法将连接产物转化到大肠杆菌(*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ )感受态细胞中进行重组子的筛选、鉴定。从阳性克隆子中提取重组质粒进行酶切和 PCR 鉴定,然后将所得阳性克隆委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

## 2 结果与分析

### 2.1 启动子 Pact 与 *cella* 的 PCR 扩增

以里氏木霉 RutC - 30 基因组为模版,分别以 *Xba* I - Pact - F 和 Pact - *cella* - R、Pact - *cella* - F 和 *cella* - *Hind* III - R 为引物 PCR 扩增 Pact、*cella*。取 4  $\mu$ L PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,由图 1 - a、图 1 - b 可以看出,PCR 获得了大小约为 1 200 bp 的 Pact DNA 片段和约为 2 100 bp 的 *cella* DNA 片段,与预期片段大小符合,表明 PCR 成功。由于 PCR 产物较为单一,采用 PCR 纯化试剂盒分别纯化 Pact、*cella* DNA 片段,所得 DNA 浓度分别为 12.5、11.5 ng/ $\mu$ L。



a—Pact PCR产物; b—*cella* PCR产物; c—重叠PCR产物 Pact-*cella*。DNA marker 从上到下依次为10 kb、7 kb、4 kb、2 kb、1 kb、500 bp、250 bp

图1 PCR 产物电泳结果

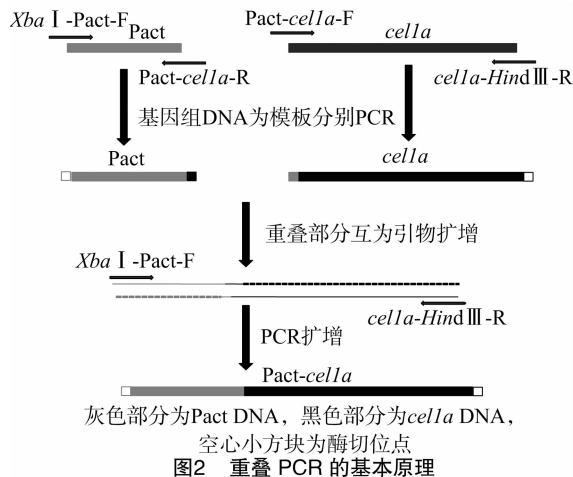
### 2.2 重叠 PCR 连接 Pact 与 *cella*

2.2.1 重叠 PCR 的原理 重叠 PCR 的原理如图 2 所示。以里氏木霉 Rut C - 30 基因组 DNA 为模版,分别扩增 Pact、*cella* DNA 片段,由于本研究采用具有互补末端的引物 *cella* - Act - F、*cella* - Act - R,使得 Pact 的 3'端和 *cella* DNA 的 5'端 DNA 序列相同,在 PCR 过程中,Pact 和 *cella* DNA 片段可以互为模板,并将 Pact 和 *cella* DNA 片段拼接在一起,得到 Pact - *cella*,如果用两端引物 *Xba* I - Pact - F、*cella* - *Hind* III - R 进行扩增,将得到 Pact - *cella* DNA 片段。

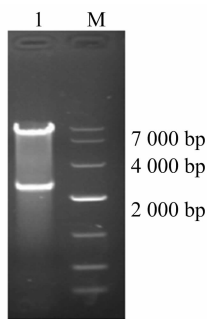
2.2.2 Pact - *cella* PCR 扩增 以 Pact、*cella* 为模板,以 *Xba* I - Pact - F、*cella* - *Hind* III - R 为引物,能将 Pact、*cella* 2 个 DNA 片段连接起来,并扩增得到 Pact - *cella*。由图 1 - c 可以看出,*cella* 大小约 2 100 bp,启动子 Pact 大小为 1 200 bp,拼接在一起约为 3 400 bp。由图 1 - c 还可以看出,PCR 产物的主要条带在 3 400 bp 左右,说明拼接成功。由于 PCR 产物不单一,通过切胶回收得到 Pact - *cella* 的 DNA 浓度约为 13.5 ng/ $\mu$ L。

### 2.3 Pact - *cella* 的克隆

由于扩增 Pact - *cella* 时所用引物 *Xba* I - Pact - F、*cella* -



*Hind* III - R 分别含有 *Xba* I、*Hind* III 限制性酶切位点, 使得 Pact - *cella* 两端分别含有 *Xba* I、*Hind* III 限制性酶切位点。因此可以通过 *Xba* I、*Hind* III 双酶切而连接到二元载体 pCambia1300 上。Pact - *cella*、pCambia1300 经 *Xba* I、*Hind* III 双酶切、纯化后, 利用 *T*<sub>4</sub> 连接酶将 2 个 DNA 片段连接在一起, 并将连接反应产物转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中。筛选阳性转化子进行 PCR 及质粒酶切鉴定。由图 3 可以看出, 上面的条带为 pCambia1300 的质粒片段, 大小约为 9 kb, 下面的条带为 Pact - *cella* 片段, 大小约为 3.4 kb, 因此可见载体和插入 DNA 片段与预期结果一致。重组质粒测序结果也与 GenBank 中的序列完全一致, 进一步说明本研究成功用重叠 PCR 将启动子 Pact 与 *cella* 连接起来, 并克隆到了 pCambia1300 二元载体上, 得到重组质粒 Pact - *cella* - pCambia1300。



DNA marker 大小从上到下依次为 10 kb、7 kb、4 kb、2 kb、1 kb、500 bp、250 bp

图3 重组质粒Pact-*cella*-pCambia1300经 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切后的琼脂糖凝胶电泳结果

### 3 讨论

重叠 PCR 技术是采用具有互补末端的引物, 分别扩增 2 个 DNA 片段, 使得 PCR 产物的引物互补部分形成重叠链, 并在随后的扩增反应中通过重叠链的延伸, 将不同来源的扩增片段拼接起来<sup>[19]</sup>。因此, 通过精心设计引物, 可以将任意 2 个基因拼接连接形成 2 个目的基因的融合基因, 中间无需任何目的基因的 DNA 序列, 从而避免了依靠限制性内切酶进行基因重组的麻烦, 也避免了连接序列中可能出现的非目的基因的 DNA 序列<sup>[20]</sup>。

本研究成功利用重叠 PCR 技术将里氏木霉看家基因 ( $\beta$ -actin) 的启动子 (Pact) DNA 序列与里氏木霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶 *cella* 的 DNA 序列拼接在一起, 使得 *cella* 基因在里氏木霉内能由看家基因 ( $\beta$ -actin) 的启动子 (Pact) 驱动, 能够在里氏木霉细胞内持续过量表达, 从而增加了  $\beta$ -葡萄糖苷酶 *cella* 的表达量, 有望提高纤维素酶的整体酶活性, 今后也可以进一步研究与证实  $\beta$ -葡萄糖苷酶 *cella* 在里氏木霉纤维素酶表达调控中的作用。本克隆方法的建立为后续研究其他  $\beta$ -葡萄糖苷酶在里氏木霉纤维素酶表达调控中的作用, 以及利用强弱不同的启动子控制  $\beta$ -葡萄糖苷酶在里氏木霉中的表达水平及其细胞定位奠定了技术基础。

### 参考文献:

- [1] 史志进. 当前农村秸秆焚烧环境污染治理面临的难题与出路 [J]. 科技致富向导, 2011(8): 319.
- [2] Zhu J J, Zhu Y Y, Jiang F X, et al. An integrated process to produce ethanol, vanillin, and xylooligosaccharides from *Camellia oleifera* shell [J]. Carbohydrate Research, 2013, 382: 52 - 57.
- [3] 顾方媛, 陈朝银, 石家骥, 等. 纤维素酶的研究进展与发展趋势 [J]. 微生物学杂志, 2008, 28(1): 83 - 87.
- [4] 冀春雪, 杜风光, 史吉平, 等. 纤维乙醇用纤维素酶的研究进展 [J]. 酿酒科技, 2007(7): 118 - 121.
- [5] Zeilinger S, Mach R L, Kubicek C P. Two adjacent protein binding motifs in the *cbh2* (cellobiohydrolase II - encoding) promoter of the fungus *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) cooperate in the induction by cellulose [J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(51): 34463 - 34471.
- [6] Kuhls K, Lieckfeldt E, Samuels G J, et al. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(15): 7755 - 7760.
- [7] Zou G, Shi S H, Jiang Y P, et al. Construction of a cellulase hyper-expression system in *Trichoderma reesei* by promoter and enzyme engineering [J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11(1): 21 - 32.
- [8] Castro L S, Antonieto A C C, Pedersoli W R, et al. Expression pattern of cellulolytic and xylanolytic genes regulated by transcriptional factors XYR1 and CRE1 are affected by carbon source in *Trichoderma reesei* [J]. Gene Expression Patterns, 2014, 14(2): 88 - 95.
- [9] Bischof R H, Ramoni J, Seiboth B. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei* [J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 106 - 118.
- [10] Seiboth B, Herold S, Kubicek C P. Metabolic engineering of inducer formation for cellulase and hemicellulase gene expression in *Trichoderma reesei* [M]. Sub - Cellular Biochemistry, 2012, 64: 367 - 390.
- [11] Zhang W X, Kou Y B, Xu J T, et al. Two major facilitator superfamily sugar transporters from *Trichoderma reesei* and their roles in induction of cellulase biosynthesis [J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(46): 32861 - 32872.
- [12] Kubicek C P, Messner R, Gruber F, et al. Triggering of cellulase biosynthesis by cellulose in *Trichoderma reesei*. Involvement of a constitutive, sophorose - inducible, glucose - inhibited  $\beta$  - diglucoside permease [J]. Journal of Biological Chemistry, 1993,

周一鹏,何 丽,罗 丽,等. 不同酶液组合对桧柑原生质体分离的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(21):45-47.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.21.010

# 不同酶液组合对桧柑原生质体分离的影响

周一鹏,何 丽,罗 丽,许晓玲,徐小勇

(扬州大学园艺与植物保护学院,江苏扬州 225009)

**摘要:**以桧柑愈伤组织和试管苗叶片为试验材料,采用纤维素酶 R-10 + 离析酶 R-10 的酶液组合 I 和纤维素酶 Worthington + 离析酶 R-10 的酶液组合 II 进行原生质体的分离,比较这 2 种酶液组合对原生质体的酶解时间、产量及活性氧含量的影响。结果表明,酶液组合 II 所需的酶解时间均短于酶液组合 I;酶液组合 II 所获得的原生质体产量均高于酶液组合 I,在愈伤组织中前者产量是后者的 9.09 倍,在叶片中前者产量是后者的 5.29 倍,差异显著;酶液组合 I 的愈伤组织原生质体的活性氧水平是酶液组合 II 的 1.96 倍,且差异显著,而对于叶肉原生质体,2 种酶液组合之间的差异不显著。由此可见,酶液组合 II 更适合用于桧柑原生质体的分离。

**关键词:**桧柑;原生质体;酶液组合;纤维素酶 R-10;纤维素酶 Worthington

**中图分类号:**S666.101 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)21-0045-03

原生质体指采用酶解法或机械法去掉细胞壁的裸露活细胞,在一定条件下可以发育成完整的植株,同时,原生质体也是一种理想的单细胞系统<sup>[1]</sup>。因此,原生质体可以为现代生物技术研究等诸多方面提供有利的试验材料,已被广泛地应用于植物基础理论研究和遗传改良中<sup>[2-3]</sup>。然而,原生质体技术应用的首要前提是分离出高质量的原生质体。由目前的研究现状可知,影响原生质体分离的因素主要有分离起始材料、预处理、酶液组合和浓度、酶解时间、渗透压等。其中,酶液组合是影响原生质体分离成败的关键因素之一<sup>[4-5]</sup>。

目前,人们广泛使用的酶液组合为纤维素酶 + 离析酶或纤维素酶 + 果胶酶,已被成功地用于小麦、马铃薯、油菜、柑橘等植物的原生质体分离<sup>[6]</sup>。另外,值得注意的是,不同来源的纤维素酶对原生质体分离也有影响。研究发现,相对于非

纯化的纤维素酶,纯化的纤维素酶用于烟草和葡萄原生质体分离时,可降低活性氧水平,提高分离效果<sup>[7-8]</sup>。柑橘原生质体主要由愈伤组织和叶片分离而来,所使用的酶液组合皆为纤维素酶 R-10 + 离析酶 R-10,然而纤维素酶 R-10 是一种非纯化的纤维素酶。本研究拟采用纯化的纤维素酶 Worthington + 离析酶 R-10 的酶液组合与常规酶液组合进行桧柑原生质体的分离,比较它们在原生质体酶解时间、产量及活性氧含量上的差异,从而分析纤维素酶纯化与否对桧柑原生质体分离的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

将桧柑(*Citrus reticulata* Blanco)胚性愈伤组织保存于 MT 基本培养基中,每 20 d 继代 1 次;将愈伤组织用悬浮培养基(MT + 0.5 mg/L ME + 1.5 mg/L 谷胺酰氨 + 50 g/L 蔗糖)悬浮培养 4 代后用于原生质体的分离。

取新鲜桧柑果实,去掉果肉,将种子用水冲洗干净,用 1 mol/L NaOH 浸泡 10 min,去掉果胶,转入超净工作台内,用无菌蒸馏水冲洗后,再用 75% 乙醇浸泡 10 min,然后用 1% NaClO 溶液消毒 20 min,再然后用无菌蒸馏水冲洗 3 次,每次

268(26):19364-19368.

[13] Mandels M, Parrish F W, Reese E T. Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride* [J]. Journal of Bacteriology, 1962, 83 (2): 400-408.

[14] Saloheimo M, Kuja - Panula J, Ylosmaki E, et al. Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei* beta - glucosidase BGLII (Cel1A) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(9): 4546-4553.

[15] Fowler T, Brown R Jr. The *bglI* gene encoding extracellular beta - glucosidase from *Trichoderma reesei* is required for rapid induction of the cellulase complex [J]. Molecular Microbiology, 1992, 6(21): 3225-3235.

[16] Zhou Q X, Xu J T, Kou Y B, et al. Differential involvement of  $\beta$  -

glucosidases from *Hypocrea jecorina* in rapid induction of cellulase genes by cellulose and cellobiose [J]. Eukaryotic Cell, 2012, 11 (11): 1371-1381.

[17] Shida Y, Yamaguchi K, Nitta M, et al. The impact of a single - nucleotide mutation of *bgl2* on cellulase induction in a *Trichoderma reesei* mutant [J]. Biotechnology for Biofuels, 2015, 8(1): 230-247.

[18] 江 洁, 杜连祥, 路福平, 等. 基因工程菌里氏木霉染色体 DNA 的提取方法 [J]. 生物技术, 2004, 14(2): 24-26.

[19] 朱小燕. 对重叠延伸 PCR 技术原理解及举例分析 [J]. 生物学通报, 2013, 48(3): 16-17.

[20] 魏 薇, 李 凡, 陈海如. 利用重叠延伸 PCR 技术扩增长片段 DNA [J]. 云南大学学报(自然科学版), 2008, 30(增刊 1): 86-88.

收稿日期: 2017-07-03

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31372025)。

作者简介: 周一鹏(1991—), 男, 江苏灌云人, 硕士, 主要从事果树生物技术研究。E-mail: ypzhou0823@qq.com。

通信作者: 徐小勇, 博士, 副教授, 主要从事果树生物技术研究。E-mail: xyxu@yzu.edu.cn。