

阿拉伯糖苷酶基因的克隆、表达及表达产物的酶稳定性

薛业敏 卢晨 毛忠贵 邵蔚蓝

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214036)

摘要 阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶是木聚糖类半纤维素生物降解和转化所必需的酶类。本文在国内首次报道对该酶的研究:通过 PCR 从产乙醇热厌氧杆菌 *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200 克隆出编码高度热稳定性阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶的基因,与组氨酸标签融合,以高拷贝质粒 pAlter-Ex1 在大肠杆菌中得到高效表达;基因表达产物通过热处理和亲和层析柱纯化后,酶纯度达电泳均一。纯化重组酶稳定性检测表明,得到的阿拉伯呋喃糖苷酶在 pH 4.2~8.2 之间酶活力稳定,75 °C 的半衰期为 1 h;木糖苷酶在 pH 5.0~8.2 之间有较高的稳定性,酶 1 h 半衰期温度为 84 °C。

关键词 阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶;基因表达;重组酶纯化;热稳定性

中图分类号 Q 556.2

文章编号 1007-4333(2003)05-0009-05

文献标识码 A

Cloning and expression of arabinofuranosidase/xylosidase gene of *Thermoanaerobacter ethanolicus* in *Escherichia coli* and stability of expression products

Xue Yemin, Lu Chen, Mao Zhonggui, Shao Weilan

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Jiangsu Wuxi 214036, China)

Abstract *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200 grows between 37~78 °C, and isolated from an alkaline hot spring in Yellowstone Park. The gene of arabinofuranosidase/xylosidase was obtained from a genome DNA of *T. ethanolicus*, cloned and expressed in *E. coli* JM109(DE3). Two primers were designed on the basis of nucleotide sequence of *xar* gene. The *xar* gene fragments were successfully amplified by PCR reaction under the suitable conditions. *E. coli* JM109(DE3) competent cells were transformed by electroporation with the ligated *xar*-pAlter-Ex1 with Pst⁻Xho⁺ site. The translated protein was soluble α -arabinofuranosidase and α -xylosidase activities, and the C-terminal 6-His tag was introduced in the recombinase. The recombinant protein was purified by the heat treatment and immobilized metal affinity chromatography. The purified enzyme presented as a single protein band on SDS-PAGE with a molecular weight of 85 kD. The optimum activity of arabinofuranosidase was found to be at pH 6.0 and 80 °C, at the pH range of 4.2~8.2, the arabinofuranosidase was stable and had 1 h half-life at 75 °C. At the pH range of 5.0~8.2, the α -xylosidase was stable with a half-life of 1 h at 84 °C.

Key words arabinofuranosidase; α -xylosidase; gene expression; purification and characterization; stability

半纤维素是仅次于淀粉和纤维素的一大类可再生资源,其降解物的工业价值使其开发越来越受到关注^[1~3]。目前,木聚糖酶在食品、饲料、纺织、能源工业,特别是在纸浆和造纸工业中已经得到广泛的应用^[2],如将极端嗜热和嗜碱菌的木聚糖酶基因克隆到现有工程菌中生产工业用酶,用于纸浆的生物漂白和饲料加工^[4~7]。但是木聚糖酶只能将木聚糖分解成带有侧枝的不同聚合度片段,它必须与木糖苷酶、葡萄糖醛酸酶,以及 α -阿拉伯呋喃糖苷酶或乙酰酯酶共同作用,才能被进一步降解或彻底降解。我国每年有大量的秸秆成为环保负担,而 94% 的秸

秆半纤维素是阿拉伯糖葡萄糖醛酸木聚糖构成;利用木聚糖酶水解这类农业废弃物时,阿拉伯糖和葡萄糖醛酸侧枝则对木聚糖酶的作用产生空间屏障,使得内切木聚糖酶不能结合和分解邻近这些侧枝的木聚糖而影响水解效率。因此,阿拉伯呋喃糖苷酶、葡萄糖醛酸酶的参与对于低聚木糖的生产、废物的生物处理、食品或饲料养分的提高,以及半纤维素的生物转化起着非常重要的作用。同时, α -阿拉伯糖苷酶能够释放以糖苷键连接的非挥发的单萜类物质而使酒和果汁的香味增加,它的生物技术潜力正越来越受到人们的关注^[7~13]。国外这方面研究相当活

收稿日期:2003-05-28

作者简介:薛业敏,博士,副教授;邵蔚蓝,博士,教授,博士生导师,联系作者,主要从事微生物基因工程和分子代谢工程研究, Tel:0510-5879781, E-mail:w.l.shao@pwb.wx.jsinfo.net

跃,而国内未见报道,本文是国内首次报道对 α -阿拉伯糖苷酶的研究。

嗜热厌氧菌 *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200 能转化木糖、低聚木糖和木聚糖为乙醇生产菌,它产生的 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶具有很高热稳定性,同时,还具有 β -木糖苷酶活性即双重活性^[14,15]。这种双重活性的酶在基因工程和酶工程中具有很高的效益,只要再增加一个 β -葡萄糖醛酸酶或乙酰酯酶就可以与木聚糖酶协同作用而彻底降解木聚糖。选择 *T. ethanolicus* 作为 α -L-阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶(Xar)的基因材料,根据已报道的基因序列,对 α -L-阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶进行基因克隆、表达及表达

产物的研究。本研究为开发其在植物残体的生物转化、清洁生产、食品工业,以及饲料工业的应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 *T. ethanolicus* JW200 由美国乔治亚州大学微生物系惠赠;大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 和 JM109 (DE3)、质粒 pAlter-Ex1 购于 Promega (Wisconsin, WI, USA),其遗传特性见表 1。本实验室用其构建的质粒 pAlter-Ex1-*aguA*-6His 为含有目的基因 *aguA* 和 6 个组氨酸序列的大肠杆菌质粒。

表 1 菌株与质粒

Table 1 Strains or plasmids

菌株与质粒	基因型	来源
JM109	<i>RecA supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi (lac-proAB) F [traD36 proAB⁺ lacI^f lacZ</i>	M15]
JM109 (DE3)	<i>RecA supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi (lac-proAB) F [traD36 proAB⁺ lacI^f lacZ</i>	M15]
	With DE3, a prophage carrying the T7 RNA polymerase gene	Promega
pAlter-Ex1	The expression vector with a strong T7 promoter upstream of the MCS, higher copies and Tet ^r	Promega

1.1.2 主要试剂 限制酶 *Xho*, *Pst*, T4DNA 连接酶和 *Pyrobest* DNA 聚合酶购自华美生物工程和宝生物工程公司, Rapid Affinity Purification Kit 购自 Novagen 公司;蛋白酶 K、溶菌酶、IPTG、对硝基苯酚- α -D-木糖苷和对硝基苯-阿拉伯呋喃糖苷酶购自 Promega 公司;CTAB、DNA 抽提酚(Tris 饱和酚)购自美国 BBST 公司;质粒抽提 QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit 和 QIAquick Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司。

1.1.3 PCR 引物 基因扩增引物按实验要求设计:引物 1: 5'-CGGCTGCAGATGAAGCCATTATATTTA-GATTC-3' 内有 *Pst* 酶切位点和起始密码子;引物 2: 5'-GGGCTCGAGTTTATCTCTACCCCTACTTCC-3' 内有一个 *Xho* 酶切位点,由上海生工生物工程技术服务公司合成。

1.2 方法

1.2.1 培养基和培养条件 大肠杆菌培养在 LB 培养基上,电转化用 SOC 培养基,转化子的选择用含有四环素 ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 LB 培养基^[15]。*T. ethanolicus* JW200 的培养基配方见文献^[14]。

Vitamin solution 的制备:取 biotin 20.0 mg, *p*-aminobenzoic acid 50.0 mg, folic acid 20.0 mg, pantothenic acid calcium salt 50.0 mg, nicotinic acid 50.0 mg, vitamin B₁₂ 1.0 mg, thiamine HCl 5.0 mg, pyridoxine HCl 100.0 mg, thioctic acid 50.0 mg, riboflavin 5.0 mg, 溶于 500 mL 去离子水,冰冻避光保存。

微量元素液的制备:nitritotriacetic acid 1.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 3.0 g, MnSO₄ · H₂O 500.0 mg, NaCl 1.0 g, FeSO₄ · 7H₂O 100.0 mg, Co(NO₃)₂ · 6H₂O 100.0 mg, CaCl₂ (无水) 100.0 mg, ZnSO₄ · 7H₂O 100.0 mg, CuSO₄ · 5H₂O 10.0 mg, AlK(SO₄)₂ (无水) 10.0 mg, boric acid 10.0 mg, Na₂MoO₄ · 2H₂O 10.0 mg, Na₂SeO₃ (无水) 1.0 g。先将 nitritotriacetic acid 溶于 500 mL 去离子水,用 2~3 mol 的 KOH 调 pH6.5,再加入其他成分,定容至 1 L。

T. ethanolicus JW200 的接种与培养:用注射器按 0.5% 接种量接种于预先还原的培养基中,59 静置培养 8 h。菌种于 16 厌氧条件下保存。

1.2.2 基因操作 基因组 DNA 提取、DNA 的内切酶水解和连接、DNA 片段的分离、感受态细胞的制备,以及基因的高效电转化方法均参照文献^[15]。质粒的制备、从琼脂糖凝胶提取 DNA 等操作按照 Qiagen 试剂盒使用指南进行。

PCR 扩增参数:95 变性 5 min 后加 *Pyrobest* DNA 聚合酶;然后 94 变性 50 s, 54 退火 1.5 min, 72 延伸 3 min, 循环 35 次 72 保温 10 min。

1.2.3 *xar* 基因在原核表达载体中的表达 将构建好的重组质粒 pAlter-Ex1-*xar* 转入 *E. coli* JM109 (DE3), 挑选 1~2 个单菌落接入含有四环素 (Tet) 抗性的 LB 培养液中,30 培养过夜;取 100 μL 过夜培养液接入 100 mL 含四环素抗性的 LB 培养液中,30 振荡培养至 OD 值达 0.6~0.8,吸出 1 mL

未诱导的培养物,剩余培养物中加入 IPTG 至浓度 1 mmol L^{-1} ,并继续培养 4 h 后,以 $5\,000 \times g$ 离心 10 min 收集菌体。SDS-PAGE 检测 *xar* 基因在原核表达载体中的表达情况。

1.2.4 酶的纯化 按 1% 接种量将含有质粒 pAlter-Ex1-*xar* 的 *E. coli* JM109 (DE3) 接种于含有四环素抗性的 LB 培养液中,置 30°C , $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养至 OD 达 0.6 ~ 0.8,加入 IPTG 至浓度 1 mmol L^{-1} ,继续培养 4 h,以 $4\,800 \times g$ 离心 10 min 收集细胞。用 Rapid Affinity Purification Kit 中的结合缓冲液 (Binding Buffer) 悬浮细胞,经高压细胞破碎仪 (French Pressure, Thermo) 破碎, $9\,600 \times g$ 离心 20 min,取上清液 70°C 下热处理 20 min, $9\,600 \times g$ 离心 20 min,上清液为粗酶液。酶的亲和层析法快速提取按 Novagen 的产品说明进行;最后将洗脱收集的酶蛋白转入透析袋,外置聚乙二醇进行浓缩,在 $1 \text{ L } 50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Tris} \cdot \text{HCl}$ 缓冲液中透析 2 h, pH 7.0;用 3 mL 缓冲液洗出并加甘油至 20%, -20°C 保存。

1.2.5 重组酶的生物学测定 阿拉伯糖苷酶和 -木糖苷酶活性是以分别从底物对硝基苯-阿拉伯呋喃糖苷 (pNPAF) 和对硝基苯酚- β -D-木糖苷 (pNPX) 释放对硝基苯酚 (pNP) 的量确定。将待测 $10 \mu\text{L}$ 酶液加至 $0.18 \text{ mL } 0.1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ pH } 5.8$ 缓冲液中,再加 $10 \mu\text{L}$ 底物,反应 10 min 后加入 NaCO_3 0.6 mL (1 mol L^{-1}) 终止反应,用 405 nm 分光光度计测定其吸光值。一个酶单位定义为每分钟催化产生 $1 \mu\text{mol}$ 的硝基苯酚产物的酶量。对硝基苯酚作标准曲线^[14]。蛋白质浓度用 Bradford 法测定,以牛血清白蛋白作为标准蛋白^[16]。

纯酶的热稳定性的测定: 分别将酶置于 70°C 、 75°C 、 80°C 、 82°C 、 84°C 和 86°C 下保温 5、10、20、40、60、80、120 min,然后加入底物于 85°C , pH 5.8 测定残留活力,以保存于冰浴中 (未保温) 的酶活力为 100%,作温度稳定性曲线,找到酶活力半衰期的时间。

pH 稳定性的分析: 酶置于不同 pH 值的缓冲液中, 37°C 保温 30 min,加入底物测定残留活力,以冰浴保存的酶在相对应的 pH 条件下的活力为 100%,比较酶在不同 pH 条件下的稳定性。所用缓冲液为 100 mmol L^{-1} 邻苯二甲酸氢钾-咪唑 (pH 4.2 ~ 8.2) 和 $100 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Tris} \cdot \text{HCl}$ (pH 8.5 ~ 9.0)。

2 结果与讨论

2.1 原核表达质粒的构建

以 *T. ethanolicus* JW200 菌的基因组 DNA 为模

板,进行 *xar* 基因片段 PCR 扩增,电泳检测结果 (图 1) 表明,在 2.3 kb 附近有 1 条很亮的扩增带,与报道的 *xar* 基因序列大小一致。将 PCR 产物经 *Pst* 和 *Xho* 双酶切并经纯化,以适当比例与同样双酶切的 pAlter-Ex1-*aguA*-6His 的大片段混合并连接,转化大肠杆菌 JM109 后,在 Tet 抗性平板上得到转化子。然后用限制性内切酶对重组质粒进行鉴定,重组质粒能被 *Pst* 和 *Xho* 酶切出 1 条与 PCR 扩增片段大小一致的片段,同时在 5.8 kb 处存在 1 条片段与线性的 pAlter-Ex1 大小一致 (图 1)。因此,初步证实 *xar* 基因已插入 pAlter-Ex1 载体中,构建出阿拉伯呋喃糖苷酶 Xar 的融合蛋白表达质粒 (图 2)。

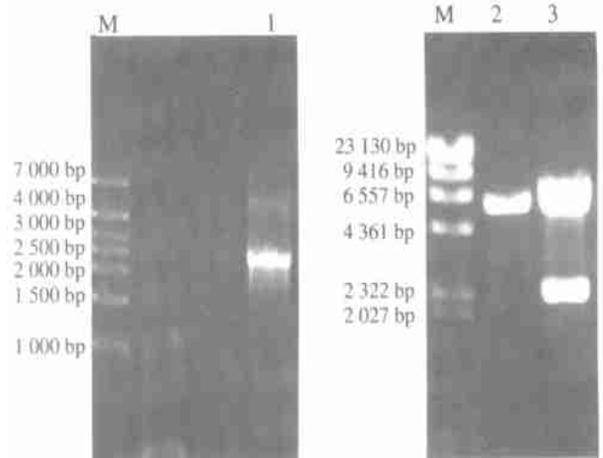


图 1 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of DNA
M DNA marker; 1 PCR amplified fragments; 2 pAlter-Ex1/ *Pst* ;
3 pAlter-Ex1-*xar*/ *Xho*, *Pst* .

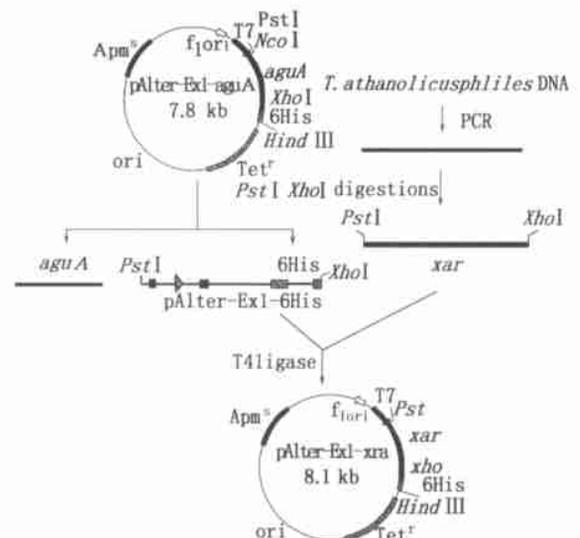


图 2 组氨酸融合表达载体的构建图

Fig. 2 Construction of plasmid pAlter-Ex1-*xar*

2.2 *xar* 基因在大肠杆菌中的表达

重组质粒 pAlter-Ex1-*xar* 转化大肠杆菌 JM109 (DE3), 经 IPTG 诱导 4 h 后, 收集菌体细胞进行 SDS-PAGE 电泳(分离胶浓度为 10%), 考马斯亮蓝染色(图 3)。从电泳图谱上可看出, 经 IPTG 诱导后, 含有质粒 pAlter-Ex1-*xar* 的大肠杆菌在分子量 85 kD 处有明显的蛋白表达带, 表达量约占总蛋白的 8%。

以含质粒 pAlter-Ex1-*xar* 的 JM109 (DE3) 和不含质粒的 JM109 (DE3) 为对照, 2 种菌悬液经 French Pressure 破胞后, 分别进行酶活性检测, 结果重组质粒 pAlter-Ex1-*xar* 的无细胞抽提液中则检测到明显的活性, 阿拉伯呋喃糖苷酶和 α -木糖苷酶活性分别为 3.36 和 2.25 U \cdot mg⁻¹ (总蛋白), 对照菌则均未检测到阿拉伯呋喃糖苷酶和 α -木糖苷酶活性。

2.3 表达蛋白的纯化

利用 His 与金属 Ni²⁺ 的亲合性, 带有 6 个组氨酸标记的融合蛋白经金属螯和柱层析被纯化。将 IPTG 诱导表达的菌体 JM109 (DE3) / pAlter-Ex1-*xar* 裂解, 并经 70 20 min 热处理, 取上清液上 Poly-His 亲和层析柱, 检测不同柱流分中阿拉伯呋喃糖苷酶和 α -木糖苷酶活性。结果表明, 在洗脱缓冲液中检测到较高的阿拉伯呋喃糖苷酶和 α -木糖苷酶活性, 而在结合缓冲液和洗涤缓冲液中均未检测到酶活性。因此, 证明组氨酸融合表达载体已构建正确。同时, SDS-PAGE 电泳结果表明: Xar 重组酶通过热处理和亲和层析柱纯化后, 酶纯度达到电泳均一(图 3)。

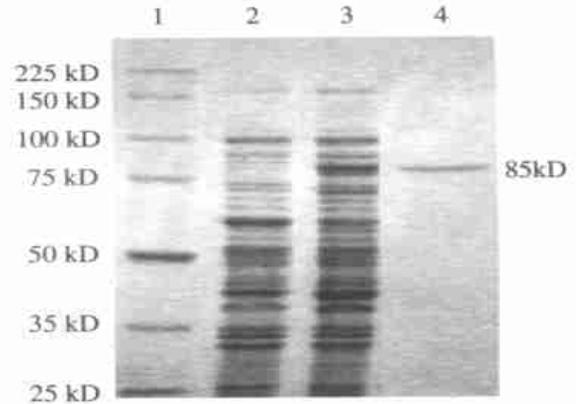


图 3 *xar* 基因表达产物的 SDS-PAGE 图谱
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expression product of *xar* gene

- 1 protein marker;
- 2 Crude extract from *E. coli* JM109 (DE3) / pAlter-Ex1;
- 3 Crude extract from *E. coli* JM109 (DE3) / pAlter-Ex1-*xar*;
- 4 Purified products

2.4 纯化重组酶的酶活性检测

对重组阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶进行酶稳定性研究。温度对酶活力热稳定性影响结果表明(图 4, a, b), 阿拉伯呋喃糖苷酶热稳定性为 75 保温 1 h 酶活力保持在 50%, α -木糖苷酶热稳定性为酶 1 h 半衰期温度为 84; pH 对酶活力稳定性影响表明(图 4, c), 阿拉伯呋喃糖苷酶在 pH4.2 ~ 8.2 之间有较高的稳定性, α -木糖苷酶在 pH5.0 ~ 8.2 之间有较高的稳定性, 来源于 *T. ethanolicus* 的阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶基本一致。证明克隆到的这一基因是热稳定性阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶的编码基因。

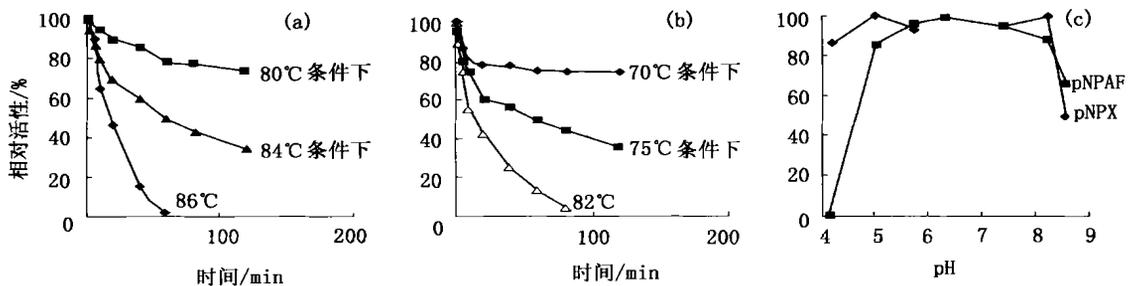


图 4 重组阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶的热稳定性(a)、(b)和 pH 稳定性(c)

Fig. 4 Thermostability of α -xylosidase (a) and arabinofuranosidase (b) and the pH stability, (c) of expressed arabinofuranosidase-xylosidase

2.5 Xar 同源性序列比较

具有双重活性阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶并不多, 主要来自 *T. ethanolicus*, *B. fibrisolvans*, *C. streccorarium* 和 *C. crescentus* CB15^[17,18]。其中来自 *T. ethanolicus* 的阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶是热稳定性最

高的酶。通过 Genbank 数据库的 BLAST 进行序列比对分析表明, *T. ethanolicus* 阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶蛋白的氨基酸序列, 与 *C. crescentus* CB15 的 Xar 的同源性最高, 达 40%, 其余均不超过 4.7%; 相反, 与 *T. brockii*^[19] 木糖-葡萄糖苷酶 XglS 同源性非常高,

为 96%, 与 *T. maritima* 和 *T. neopolitana* 的木糖苷酶 Xyl 同源率为 55%。

3 结 论

产乙醇热厌氧杆菌 *T. ethanolicus*, 最适生长温度 59℃, 是热稳定性酶的重要基因源。从自然界分离产阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶的微生物, 多因着酶系复杂而难于纯化。本室用 PCR 方法从嗜热产乙醇菌 *T. ethanolicus* 克隆出编码高度热稳定性阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶的基因, 与组氨酸标签融合, 以高拷贝质粒 pAlter-Ex1 作为接受载体在大肠杆菌中得到高效表达, 为其应用性研究提供便利; 同时, 基因表达产物融合了一个 6 个组氨酸的标签, 可通过金属离子亲和层析柱纯化, 既简化操作又减少目的蛋白的损失。纯化重组酶稳定性检测表明, 阿拉伯糖苷酶在 pH 4.2~8.2 之间酶活力稳定, 75℃ 的半衰期为 1 h; 木糖苷酶在 pH 5.0~8.2 之间有较高的稳定性, 酶 1 h 半衰期温度为 84℃。因此证明我们克隆到的 *xar* 基因是热稳定性阿拉伯糖苷酶/木糖苷酶的编码基因。

参 考 文 献

- [1] Sunna A, Autranikian G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 1997, 17(1): 39~67
- [2] Beg Q K, Kapoor M, Mahajan L, et al. Microbial xylanases and their industrial applications: a review [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 56: 326~338
- [3] Shao W L, Xue Y M. Molecular biotechnology in exploiting the resource of hemicellulose [J]. J Food Science Biotechnol, 2002, 21(1): 88-93
- [4] Kosugi A, Murashima K, Roy H D. Expression of xylanase activity dependent on growth substrates. J Bacteriology, 2001, 183: 7037~7043
- [5] Chen C C, Adolphson R, Jeffrey F D, et al. Release of lignin from kraft pulp by a hyperthermophilic xylanase from *armita* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1997, 20: 39~2045
- [6] Medeiros R G, Silva F G, Salles B C. The performance of fungal xylan-degrading enzyme preparations in elemental chlorine-free bleaching for Eucalyptus pulp [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1997, 20: 2039~2045
- [7] Clinche F L, Francisco P, Daniel R, et al. -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus terreus* with potential application in enology: induction, purification, and characterization [J]. J Agric Chem, 1997, 45: 2379~2383
- [8] Margolles-clark E, Tenkanen M, Nakari-Setälä T, et al. Cloning of genes encoding -L-arabinofuranosidase and -xylosidase from *Trichoderma reesei* by expression in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 3840~3846
- [9] Crous J M, Pretorius I S, Van Zyl W H. Cloning and expression of the -L-arabinosidase gene (ABF2) of *Aspergillus niger* in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol, 1996, 46: 256~260
- [10] Ioannes P D, Peirano A, Steiner J, et al. An -L-arabinosidase from a *Penicillium Purpurogenum*: production, purification and properties [J]. J Biotechnol, 2000, 76: 253~258
- [11] Takoua D, Nicola C, Ian C, et al. Genetic and biochemical characterization of a highly thermostable -L-arabinosidase from *thermobacillus xylanilyticus* [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 1734~1736
- [12] Ziya G, Jean-Marc B, Stéphane V, et al. Purification and some properties of an -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*. Action on grape monoterpenyl Arabinofuranosylglucosidase [J]. J Agric Chem, 1990, 38: 772~776
- [13] Morales P, Madarro A, Flors A, et al. Purification and characterization of a xylanase and arabinofuranosidase from *Bacillus polymyxa* [J]. Enzyme and Microb Technol, 1995, 17: 424~429
- [14] Shao W, Wiegel J. Purification and characterization of a thermostable -xylosidase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* [J]. J Bacteriol, 1992, 174: 5848~5853
- [15] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. New York: 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [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]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254
- [17] Utt E A, Eddy C K, Keshav K F, et al. Sequenceing and expression of the *Butyrivibrio fibrisolvens xylB* gene encoding a novel bifunctional protein with -D-xylosidase and -L-arabinofuranosidase activities [J]. Appl Environ Micro, 1991, 57: 1227~1234
- [18] Sakka K, Yoshikawa K, Kojima Y, et al. Nucleotide sequence of the *Clostridium. Streccorarium xylA* gene encoding a bifunctional protein with -D-xylosidase and -L-arabinofuranosidase activities and properties of the translated product [J]. Biosci Biotech Biochem, 1993, 57: 268~272
- [19] Breves R, Bronnenmerier K, Wild N, et al. Genes encoding two different-glucosidases of *Thermoanaerobacter brockii* are clustered in a common operon [J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 3902~3910