

# 毛柄金钱菌 *gpd* 启动子驱动福寿螺纤维素酶基因在灰盖鬼伞菌中的表达

杨培周<sup>1,2</sup>, 郭丽琼<sup>1</sup>, 林俊芳<sup>1,\*</sup>

(1. 华南农业大学食品学院, 广东 广州 510640; 2. 合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009)

**摘要:** 为研究毛柄金钱菌 *gpd* 启动子驱动福寿螺纤维素酶基因(*mfc*)在大中型丝状真菌中的表达效果, 本实验通过构建毛柄金钱菌 *gpd* 启动子驱动的 *mfc* 基因的真核表达载体, 采用 PEG(polyethylene glycol)介导法将目的基因重组进色氨酸营养缺陷型灰盖鬼伞菌染色体, 对转化子进行 PCR、Southern blotting、RT-PCR 等分子鉴定, 通过测定滤纸酶、CMC 酶和木聚糖酶的活力考察 *mfc* 的表达效果。结果表明: 多功能纤维素酶基因整合入灰盖鬼伞基因组中, 毛柄金钱菌 *gpd* 启动子能够高效驱动 *mfc* 基因的表达, 其中酶活力最高的工程菌株为 Cfv1m9, 其滤纸酶活力、CMC 酶活力和木聚糖酶活力分别为 21.5、44、235U/mL, 分别是对照的 1.79 倍、1.6 倍和 2.97 倍。

**关键词:** 纤维素酶基因; 福寿螺; 毛柄金钱菌; *gpd* 启动子

## Expression of *Ampullarium crossean* Cellulase Gene in *Corprinus cinereus* Driven by *gpd* Promoter from *Flammulina velutipes*

YANG Pei-zhou<sup>1,2</sup>, GUO Li-qiong<sup>1</sup>, LIN Jun-fang<sup>1,\*</sup>

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China;  
2. School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

**Abstract:** In order to investigate the expression of multifunctional cellulase gene of *Ampullarium crossean* (*mfc*) in large filamentous fungi driven by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*) promoter (*Fvl*) of *Flammulina velutipes*, a new eukaryotic expression vector containing *F. velutipes gpd* promoter (*Fvl*) and *A. crossean* cellulase gene (*mfc*) was constructed. The expression vector was inserted into the chromosome of tryptophan auxotrophic *Corprinus cinereus* by polyethylene glycol (PEG) mediation. The transformants were selected by PCR and Southern blotting. The transcription of *mfc* was confirmed by RT-PCR and the expression of *mfc* was further determined by measuring the activities of filter paper enzyme, carboxymethylcellulase and xylanase. The results showed that *mfc* driven by *F. velutipes gpd* promoter exhibited highly effective expression in engineered *C. cinereus*, and the strain with the highest cellulase activity was Cfv1m9, in which the filter paper enzyme, carboxymethylcellulase and xylanase activities were 21.5, 44 U/mL and 235 U/mL, respectively with 1.79, 1.6 and 2.97 fold increase as compared to the control strain.

**Key words:** cellulase gene; *Ampullarium crossean*; *Flammulina velutipes*; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter

中图分类号: Q789

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)15-0209-05

纤维素酶是能将纤维素降解为葡萄糖的酶的总称, 广泛应用于酿造、保鲜以及饮料加工等食品工业中。纤维素酶能够加快柿子<sup>[1]</sup>、黄花梨<sup>[2]</sup>的成熟, 提高废水的回收利用率<sup>[3]</sup>和出酒率<sup>[3]</sup>, 增大饮料的透光率<sup>[4]</sup>; 降低薯浆的黏度, 提高淀粉产率<sup>[5]</sup>。

通过物理化学诱变等传统方法选育产纤维素酶的生物菌株, 表达的纤维素酶受到酶活力较低、酶系组分不合理、成本较高的限制。通过遗传工程技术开发新型高效的纤维素酶表达工程菌是开发高产纤维素酶菌株的一个重要方向。福寿螺纤维素酶基因(*mfc*)具有高活

收稿日期: 2010-11-21

基金项目: 国家“863”计划项目(2006AA10Z301); 华南农业大学“211工程”项目(2009C010500001)

作者简介: 杨培周(1976—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为酶工程。E-mail: yangpeizhou@163.com

\* 通信作者: 林俊芳(1962—), 男, 教授, 博士, 研究方向为酶工程。E-mail: junfanglin2003@yahoo.com.cn

性,同时具有内切- $\beta$ -1,4-葡萄糖苷酶、外切- $\beta$ -1,4-葡萄糖苷酶以及木聚糖酶的多功能性<sup>[6]</sup>。高等大型真菌是一种良好的高效分泌外源基因产物的宿主菌<sup>[7]</sup>。利用遗传工程技术,研究毛柄金钱菌 *gpd* 启动子驱动下的 *mfc* 基因在大型真菌灰盖鬼伞菌中的表达,为构建新型纤维素酶工程菌提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 目的基因与启动子基因

本课题组前期从福寿螺(捕捉自广州华南农业大学教学实验农场)的胃组织中分离出纤维素酶基因(*mfc*),其开放阅读框为 1185bp<sup>[8]</sup>;从毛柄金钱菌(购自华中农业大学菌种厂)的基因组中分离出 *gpd* 启动子 *fv1*,基因片段长度为 1412bp<sup>[9]</sup>。

### 1.2 试剂与仪器

T4 DNA 连接酶 美国 Promega 公司; *Taq* 聚合酶、*EcoR* I 和 *Spe* I 限制性内切酶 上海生工生物工程技术有限公司;实验所用引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成;RT-PCR 操作试剂盒 美国 Invitrogen 公司;杂交试剂盒 瑞士 Roche 公司;其他化学试剂均为分析纯。

PCR 扩增仪 德国 Biometra 公司;低温冷冻离心机 德国 Eppendorf 公司;紫外凝胶成像系统 美国 Bio-Rad 公司;Elga 超纯水仪 英国 Ultra Bioscience 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 表达质粒 pgFv1-*mfc* 的构建和鉴定

首先用限制性内切酶 *Sac* II 和 *Spe* I 双酶切质粒 pgLes-*mfc*<sup>[10]</sup>,回收含有 *mfc* 基因的载体大片段,然后再同样用这两种限制性内切酶双酶切载体 pGEM-*fv1*<sup>[9]</sup>,胶回收 *gpd* 启动子 *fv1* 基因,最后采用 DNA 连接酶将回收的载体大片段和 *gpd* 启动子 *fv1* 基因连接,得到重组质粒 pgFv1-*mfc*。酶切及 DNA 连接反应参照所购酶说明书进行。

#### 1.3.2 测序鉴定

根据 *mfc* 基因的序列与重组质粒构建的 DNA 序列特点,在距离 *mfc* 的上游 60bp 的位置设计一段反向引物,序列为 5'-CAGTCGGTCGATCTCGCTGG-3',该引物片段与 *mfc* 上游的一部分载体片段互补,通过扩展能够向下扩展延伸到链接目的片段部分,通过扩增、测序、检测 *mfc* 基因上游片段的序列。

#### 1.3.3 遗传转化及鉴定

将已构建的含有 *mfc* 基因的重组质粒和含有灰盖鬼伞菌恢复基因的辅助质粒 pCc1001 利用 PEG(polyethylene glycol)介导法共转化灰盖鬼伞菌色氨酸营养缺陷型菌株 LT2,菌株通过溶壁酶去壁生成原生质体,重组质粒在

PEG 的介导下转化原生质体<sup>[11]</sup>,转化质粒 pCc1001 后的缺陷型菌株能够在无色氨酸的营养缺陷性固体平板培养基上生长。通过转化筛选拟转化子,然后以目的基因 *mfc* 为引物扩增鉴定, Southern blotting 杂交鉴定采用地高辛荧光标记法,探针的引物来自 *mfc* 基因片段,筛选出真实的阳性灰盖鬼伞工程菌株。转化子基因组 DNA 提取采用 CTAB(hexadecyltrimethylammonium bromide)法,RT-PCR 鉴定 *mfc* 基因的引物为:Primer R: 5'-GCTTCAGTCAAGCGCATGCC-3'(20bp);Primer F: 5'-GTCGCGCGGTGTGCGATACG-3'(21bp)。

#### 1.3.4 纤维素酶及木聚糖酶活力的测定

通过测定阳性转化子和对照的纤维素酶活力和木聚糖酶活力,研究 *mfc* 基因的表达。将转化子与对照菌株接种于灰盖鬼伞菌再生培养基上,30℃培养 3d,然后采用打孔器取等量的菌丝体接种到含 50mL 液体发酵培养基的 250mL 三角瓶中,30℃、150r/min 摇瓶培养。从第 5 天开始,隔天测一次酶活力,每次取 3mL 菌液。

再生培养基配制<sup>[11]</sup>:称取 10g 葡萄糖、2g 天冬酰胺、0.1g 腺嘌呤硫酸盐,加入 25mL Stock A 缓冲液、1mL Stock B 缓冲液、10mL Stock C 缓冲液和适量蒸馏水,充分溶解后定容至 1000mL,加入 14g 琼脂粉,121℃高压灭菌 15min;液体发酵培养基配制:硝酸铵 1%、磷酸二氢钾 0.8%、磷酸氢二钠 0.2%、七水硫酸镁 0.5%、酵母抽提物 2%、3% 香蕉皮粉, pH6.0, 121℃高压灭菌 15min。

采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定底物还原糖的释放量,推算出滤纸酶活力、CMC 酶活力和木聚糖酶活力。酶活力单位的定义为:每分钟由底物生成 1 $\mu$ mol 葡萄糖(或木糖)所需的酶量为一个酶活力单位(U)<sup>[12]</sup>。

$$\text{CMC 酶活力}/(\text{U}/\text{mL}) = \frac{m \times V_0 \times 5.56}{V \times t} \quad (1)$$

式中: *m* 为葡萄糖质量/mg; *V*<sub>0</sub> 为酶液定容体积/mL; *V* 为反应体系中酶液加入体积/mL; *t* 为反应时间/min。滤纸酶活力计算公式同 CMC 酶活力。

$$\text{木聚糖酶活力}/(\text{U}/\text{mL}) = \frac{m \times V_0 \times 6.67}{V \times t} \quad (2)$$

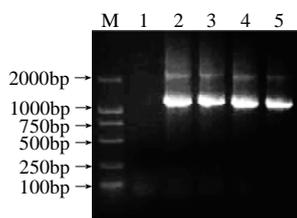
式中: *m* 为木糖质量/mg; *V*<sub>0</sub> 为酶液定容体积/mL; *V* 为反应体系中酶液加入体积/mL; *t* 为反应时间/min。

## 2 结果与分析

### 2.1 载体构建

*Sac* II 和 *Spe* I 双酶切质粒 pgLes-*mfc* 和 pGEM-*fv1*,分别回收目的 DNA 片段,连接、转化、得到重组质粒 pgFv1-*mfc*,PCR 扩增鉴定,得到一条带约为 1200bp

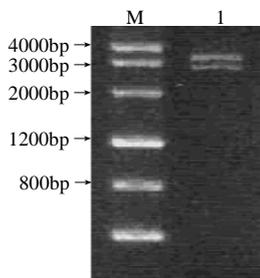
的DNA片段(图1), *Sac* II和*Bsr*G I酶切重组质粒, 得到一条带约为2800bp, 一条带约为3100bp(图2)。 *Sac* II和*Spe* I双酶切重组质粒, 酶切的两个目的DNA片段大小分别约为4000bp和1400bp(图3), 与预期结果一致。测序鉴定的结果见图4, *mfc*上游紧靠*gpd-Fv1*基因, 证明重组质粒构建成功。重组质粒的框架图表明总大小为5711bp, 其中*gpd-vFv1*大小为1412bp, *mfc*大小为1185bp, 表达质粒的主框架为3114bp, 在限制性内切酶*Sac* II、*Spe* I和*Bsr*G I的黏性末端互补作用下, 通过DNA连接酶将各片段链接成整体, 毛柄金钱菌*gpd*启动子和*mfc*基因已经连接入重组质粒中(图5)。



M. 分子质量标准; 1.空白对照(水); 2~5. 扩增产物。

图1 重组质粒pgFv1-mfc的PCR扩增鉴定

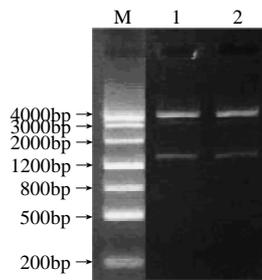
Fig.1 Identification of recombinant expression vector pgFv1-mfc by PCR amplification



M. 分子质量标准; 1. 酶切产物。

图2 重组质粒pgFv1-mfc的*Sac* II和*Bsr*G I酶切鉴定

Fig.2 Identification of recombinant expression vector pgFv1-mfc by double enzyme digestion with *Sac* II and *Bsr*G I



M. 分子质量标准; 1、2. 酶切产物。

图3 重组质粒pgFv1-mfc的*Sac* II和*Spe* I酶切鉴定

Fig.3 Identification of recombination expression vector pgFv1-mfc by double enzyme digestion with *Sac* II and *Spe* I

```
CCTTTCTAGACTCTTGGCTGGTACTGGACGACCAATCACGAGGTGCCTGTGGCGCACA
TTATGGCTCTCCGTGTGCTCCAGCCAATTAGGTTCCGGGGAGGGGTTATGCAITAGAAA
CGATCTGTTTCATCTGAAAGGTGGTATCGCGTTTGTGTGTGGATGACCCACCTAGATGA
GGCCTGGATGATACTGCCTTAAAATTGGAGGCGCGTCCAGGGCGCGTCTCTCCGAG
TCTGTTCCGCTGATGAATTTGCTGCTCGACATCGTTCTGCGGACATCGCATCGACG
AGATCTTTGCGTTAGACGCGCTTGGGAAAAGGACTCGGAGGTGGGTTAGACCTGCGTGC
GTAGAA GAATGGGACGAGTATATGAGTAGAGTACC GCGTGGATACC GCGTAACCGTGC
ATGTGCTACTACTCCTTGACCGCTGATTGGTTGCGAACTCGACATGATCTAGGTCGTCC
TCGTCGGACTCCTAATCAA GAGAGACAAGAGAATGGTTGAGGAGCTGCTCAAATTTT
GGCGGATAACGTCGTCGGTATCCTATGAATCTACGTTGTGTATCTCTAATGCTTTGTACC
TCTTTGACCGCGTAAGAATTTAGCACCGCAATCCAGACGAAATGACACCGCATCACGCTAA
CATCCGATTATCAGCCGACAGTATAAAAAGCCGCAAAATTTTGCATCTCTCTCTTCTC
CAACCGCCATCTTCTCACTTCAATCTCTTTACCATCTCCTCATACAATCAATCACTA
GTGATTCGTCGACGCTCAATCAAGCCG
```

下划线为*gpd-Fv1*序列; 波浪线为*mfc*序列。

图4 重组质粒pgFv1-mfc的测序鉴定

Fig.4 Identification of recombinant expression vector pgFv1-mfc by sequencing

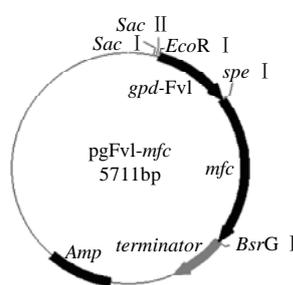


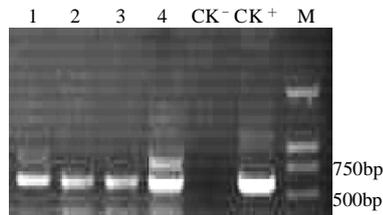
图5 表达质粒pgFv1-mfc的构建

Fig.5 Construction of recombinant expression vector pgFv1-mfc

## 2.2 转化子分子鉴定

### 2.2.1 PCR 鉴定结果

通过遗传转化以及色氨酸营养缺陷型菌株筛选, 获得60个pgFv1-mfc拟转化子, 将部分转化子进行基因组PCR扩增鉴定(图6), 结果表明, 该4个转化子都扩增出一条约600bp明亮特异的条带, 与阳性质粒扩增的结果一致, 且都与预期的扩增基因片段(600bp)相符。初步确定*mfc*已经整合入转化子的DNA中, 共有20个转化子的基因组中同时插入了*mfc*和*trp1*, 共转化率为33%。



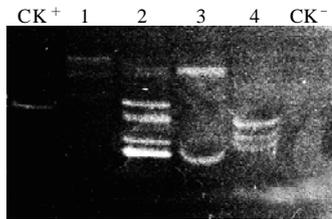
M. 分子质量标准; 1~4. 分别为拟转化子Cfv1m4、Cfv1m6、Cfv1m9、Cfv1m10; CK<sup>-</sup>. 阴性(未转化的营养缺陷型原菌株); CK<sup>+</sup>. 阳性(扩增带有*mfc*的质粒)。

图6 拟转化子的PCR扩增鉴定

Fig.6 Identification of putative *C. cinereus* transformants by PCR amplification

### 2.2.2 Southern blotting 鉴定结果

选择4个PCR扩增鉴定稳定且电泳条带亮度较强的拟转化子,液体大量培养后,抽取基因组DNA,通过酶切、电泳、转膜、与地高辛标记的目的基因 *mfc* 探针杂交(图7)。结果表明:4个转化子的基因组DNA和阳性对照与 *mfc* 探针杂交后,杂交膜中出现明显信号条带,该结果与PCR鉴定相一致,进一步证明目的基因已经稳定整合进转化子染色体上。各转化子杂交信号条带数量存在差异,可能原因是外源重组质粒整合如灰盖鬼伞基因组DNA的拷贝数存在差异,多个杂交信号条带也可能是基因的分离整合以及基因组染色体DNA的重排引起的,此外,在同一泳道转化子的杂交信号的明亮强度不同,可能是由外源载体DNA不完全整合入宿主染色体DNA中,产生“边界序列”引起的<sup>[13]</sup>。



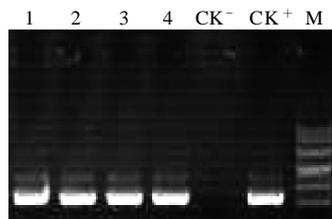
CK<sup>+</sup>:阳性质粒; CK<sup>-</sup>:阴性对照(转化的原菌株); 1~4.分别为拟转化子 Cfvlm4、Cfvlm6、Cfvlm9、Cfvlm10。

图7 灰盖鬼伞拟转化子的 Southern blotting 鉴定

Fig.7 Identification of putative *C. cinereus* transformants by Southern blotting

### 2.2.3 RT-PCR 鉴定结果

通过抽取总RNA,消化基因组DNA,分离mRNA,合成cDNA,以设计的引物进行PCR扩增,结果见图8。各拟转化子的RT-PCR泳道中出现一条明亮的约为600bp的DNA条带,与阳性对照一致,证明已经整合进宿主染色体中的目的基因实现正确转录,毛柄金钱菌 *gpd* 启动子能够驱动目的基因 *mfc* 的表达。



M.分子质量标准; 1~4.分别为拟转化子 Cfvlm4、Cfvlm6、Cfvlm9、Cfvlm10; CK<sup>-</sup>.阴对照性(没有转化的营养缺陷型原菌株); CK<sup>+</sup>.阳性对照(扩展含有目的基因 *mfc* 的质粒)。

图8 转化子的 RT-PCR 鉴定

Fig.8 Identification of putative *C. cinereus* transformants by RT-PCR

### 2.3 转化子纤维素酶和木聚糖酶的表达

#### 2.3.1 转化子表达的滤纸酶活力

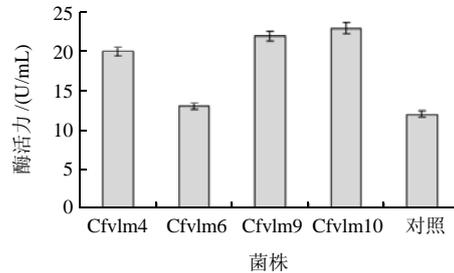


图9 转化子的滤纸酶活力

Fig.9 Filter paper enzyme activity of transformants

以仅转化含有灰盖鬼伞菌恢复基因的辅助质粒 pCc1001 的转化子为对照,测定转化子(含有辅助质粒 pCc1001 和目的基因 *mfc*, 下同)的滤纸酶活力,研究目的基因在灰盖鬼伞工程菌株中的表达。由图9可见,各转化子的滤纸酶活力都比对照有了一定的提高,但各转化子间的酶活力存在较大的差异,酶活力最高的为 Cfvlm10,达到23U/mL,约是对照的2倍; Cfvlm9 的酶活力稍低;酶活力最小的为 Cfvlm6(13U/mL)。

#### 2.3.2 CMC 酶活力

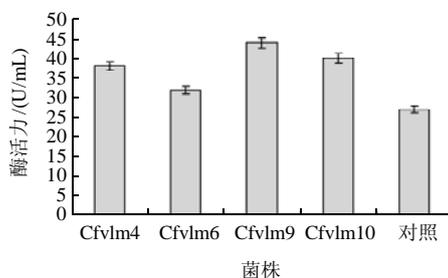


图10 转化子的 CMC 酶活力

Fig.10 Carboxymethylcellulase activity of transformants

由图10可知,各转化子的CMC酶活力都比对照有了较大的提高,其中酶活力最高的为 Cfvlm9,CMC酶活力达到44U/mL,比对照提高40%;转化子最低的CMC酶活力为32U/mL,稍高于对照菌株(27U/mL)。

#### 2.3.3 木聚糖酶活力

测定各转化子的木聚糖酶活力,考察多功能纤维素酶的表达。由图11可见,转化子的木聚糖酶活力比对照显著提高,对照的木聚糖酶活力为79U/mL, Cfvlm9 的木聚糖酶活力达到235U/mL,是对照的近3倍;木聚糖酶表达最低的转化子为 Cfvlm6,酶活力约是对照的2倍。显示出转化子具有较高的木聚糖酶活性。

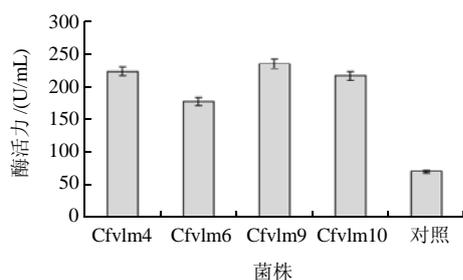


图 11 转化子的木聚糖酶活力  
Fig.11 Xylanase activity of transformants

### 3 结论与讨论

本实验构建出毛柄金钱菌 *gpd* 启动子驱动的 *mfc* 基因的真核表达载体, 并将其遗传转化入大型真菌灰盖鬼伞染色体中, *mfc* 在灰盖鬼伞菌中实现了转录和表达。与对照菌株比较, 各工程菌株的滤纸酶活力、CMC 酶活力和木聚糖酶活力都得到不同程度的提高, 其中酶活力提高最高的工程菌株为 Cfv1m9, 其滤纸酶活力、CMC 酶活力和木聚糖酶活力分别为对照的 1.79 倍、1.6 倍和 2.97 倍。

针对纤维素酶工程菌株的构建策略, 目前主要研究思路: 一方面是通过提高  $\beta$ -葡萄糖苷酶、内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶的某一个酶表达量; 另一方面是通过构建具有以上 3 种酶融合基因的工程菌株, 提高各酶系协同降解纤维素的效果。纤维素酶的一些不足促使人们开发新的纤维素酶酶源, 试图从其他生物中寻找更具有应用前景的纤维素酶, 动物纤维素酶逐渐成为研究的重点<sup>[14]</sup>。最初人们普遍认为动物自身不含有纤维素酶, 那些食木性的节肢动物以及草食性动物是通过体内共生生物来利用纤维素的, 但是随着研究的深入, 人们逐渐发现动物体内的纤维素酶与其体内的生物并没有直接关系<sup>[15]</sup>。对线虫<sup>[16]</sup>、甲虫<sup>[17]</sup>和白蚁<sup>[18]</sup>等体内纤维素酶基因进行克隆, 进一步证实了内源性动物纤维素酶的存在。

### 参考文献:

- [1] 童斌, 饶景萍, 周会玲. 柿子成熟过程中几种生理代谢及细胞膜透性的变化[J]. 西北植物学报, 1999, 19(3): 482-486.
- [2] 林河通, 席芳, 陈绍军. 黄花梨果实采后软化生理基础[J]. 中国农业科学, 2003, 36(3): 349-352.
- [3] 张礼星, 唐湘华, 唐胜, 等. 里氏木霉纤维素酶在大曲酒丢糟中的应用[J]. 酿酒科技, 2000, 99(3): 52-53.
- [4] 陈渝, 李远志. 果胶酶和纤维素酶对菠萝汁澄清效果的研究[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(6): 61-64.
- [5] 丁长河, 鲁慧芳, 张建华, 等. 果胶酶与纤维素酶对马铃薯浆黏度的影响[J]. 食品科技, 2006, 31(2): 55-57.
- [6] 王骥, 丁明, 李燕红, 等. 福寿螺内源性多功能纤维素酶基因的克隆[J]. 生物化学与生物物理学报, 2003, 35(10): 941-946.
- [7] 郭丽琼, 林俊芳, 熊盛, 等. 抗冷冻蛋白基因遗传转化草菇的研究[J]. 微生物学报, 2005, 41(1): 39-43.
- [8] 杨培周, 郭丽琼, 王艺红, 等. 福寿螺(*Ampullaria crosseana*)*mfc* 基因的分子克隆和序列分析[J]. 中国食品学报, 2008, 8(4): 21-27.
- [9] 杨培周, 郭丽琼, 王艺红, 等. 毛柄金钱菌 *gpd-Fv* 启动子的克隆及序列分析[J]. 工业微生物, 2008, 38(3): 33-37.
- [10] CHENG Shujie, YANG Peizhou, GUO Liqiong, et al. Expression of multi-functional cellulase gene *mfc* in *Coprinus cinereus* under control of different basidiomycete promoters[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(19): 4475-4480.
- [11] 郭丽琼, 王秀旭, 舒薇, 等. 灰树花 *gpd-Gf* 启动子的功能分析[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(6): 76-81.
- [12] GHOSE T K. Measurement of cellulase activities[J]. Pure Appl Chem, 1987, 59(2): 257-268.
- [13] JIA Jianhua, JOHN A, BUSWELL J, et al. Transformation of the edible fungi *Pleurotus ostreatus* and *Volvariella volvacea*[J]. Mycological Research, 1998, 102(7): 876-880.
- [14] SANDERS D A, BELYEA R L, TAYLOR T A. Degradation of spent casings with commercial cellulases[J]. Bioresource Technology, 2000, 71(2): 125-131.
- [15] BHAT M K. Cellulases and related enzymes in biotechnology[J]. Biotechnology Advances, 2000, 18(5): 355-383.
- [16] YAN Yitang, SMANT G, STOKKERMANS J, et al. Genomic organization of four  $\beta$ -1,4-endoglucanase genes in plant-parasitic cyst nematodes and its evolutionary implications[J]. Gene, 1998, 220(1/2): 61-70.
- [17] GIRARD C, JOUANIN L. Molecular cloning of cDNAs encoding a range of digestive enzymes from a phytophagous beetle *Phaedon cochleariae* insect[J]. Biochem Mol Biol, 1999, 29(12): 1129-1142.
- [18] WATANABE H, NODA H, TOKUDA G, et al. A cellulase gene of termite origin[J]. Nature, 1998, 394: 330-331.