

谷氨酸棒杆菌麦芽寡糖基海藻糖水解酶基因的克隆与表达

常敏, 乔宇, 丁宏标

(中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081)

摘要:从谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)基因组中克隆到麦芽寡糖基海藻糖水解酶基因(*treZ*), 将其插入大肠杆菌表达载体 pRSET-B 并转化宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) pLysS 获得重组基因工程菌。经 IPTG 诱导表达, 得到麦芽寡糖基海藻糖水解酶, 溶解表达的目的蛋白约占胞内总蛋白的 40%, 有部分目的蛋白形成包涵体。经薄层层析与离子色谱共同检测证实, 该麦芽寡糖基海藻糖水解酶(MTHase)与麦芽寡糖基海藻糖合成酶(MTSase)共同作用于糊精溶液, 可得到产物海藻糖, 具有工业应用前景。

关键词:麦芽寡糖基海藻糖水解酶; 糊精; 重组表达

doi:10.3969/j.issn.1008-0864.2011.03.08

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1008-0864(2011)03-0047-06

Cloning and Expression of Maltooligosyltrehalose Trehalohydrolase Gene from *Corynebacterium glutamicum*

CHANG Min, QIAO Yu, DING Hong-biao

(Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: A DNA fragment encoding maltooligosyl trehalose trehalohydrolase (*treZ*) was cloned from *Corynebacterium glutamicum*. It was inserted into prokaryotic expression vector pRSET-B and then was introduced into the host *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS. A recombinant enzyme was obtained by IPTG induction. In cell disruption supernatant, the soluble recombinant enzyme accounted for about 40% of the total cell proteins, but some of the recombinant protein expressed as inclusion bodies. The activity of the recombinant enzyme was analyzed by thin layer chromatography and ion chromatography. It was proved that the soluble enzyme together with maltooligosyl trehalose synthase was capable of decreasing dextrin to produce trehalose. The result showed applied prospect in industry.

Key words: maltooligosyl trehalose trehalohydrolase; dextrin; recombinant expression

自然界的海藻糖是由两个吡喃葡萄糖环分子以 $\alpha, \alpha-1, 1$ 糖苷键连接而成的一种非还原二糖, 广泛存在于生物体内, 包括细菌、酵母、真菌、昆虫、无脊椎动物、低等和高等植物等^[1]。在不同的生物体内, 海藻糖可以作为碳源、能源等贮存性糖类, 或作为生物体的结构组分以及应急代谢物质等^[2]。海藻糖可以保护生物体抵抗各种环境压力, 如干燥、热、冷冻、高渗透压、氧化、辐射等等。在各种极端环境下, 海藻糖对于稳定膜、蛋白质等生物活性物质具有重要作用, 并且当极端因子去掉时, 可帮助生物体复活^[3]。海藻糖的这些

优良特性使其在食品、医药、农业、生物制品等领域有了广泛应用, 特别是在发达国家。海藻糖添加于饲料, 将有助于饲料中蛋白质、益生菌等各种活性物质的保鲜或存活; 少量海藻糖的沉积还将有利于提高肉产品的品质并延长其货架期^[4]。但是, 海藻糖目前的生产价格偏高, 将其广泛推广到饲料行业还受到限制。国内外市场上的海藻糖主要利用生物酶法合成。多种生物可以利用体内的一系列酶生成海藻糖, 至少有五种不同途径已被证实^[5], 其中有两种途径可用于工业生产海藻糖: ①利用来源于细菌的海藻糖合酶将麦芽糖转

收稿日期: 2011-01-07; 接受日期: 2011-03-10

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(22060302); 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所基本科研业务费项目(2010QY03)资助。

作者简介: 常敏, 硕士研究生, 主要从事饲料生物技术研究。E-mail: changminwy@yahoo.com.cn。通信作者: 丁宏标, 研究员, 博士生导师, 主要从事饲料生物技术研究。Tel: 010-82106071; E-mail: dinghongbiao@mail.caas.net.cn

化成海藻糖^[6];②利用来源于细菌的麦芽寡糖基海藻糖合成酶(MTSase)和麦芽寡糖基海藻糖水解酶(MTHase)联合作用于直链淀粉生成海藻糖。后者又称 TreY-TreZ 途径,最初实现海藻糖工业化生产的日本林原公司以及我国的南宁中诺公司利用的就是该途径^[7,8]。

TreY-TreZ 途径使淀粉降解生成海藻糖的原理如下^[9]:首先,MTSase 作用于麦芽糊精或直链淀粉的还原端,将葡萄糖间的 α -1,4 糖苷键转变为 α -1,1 糖苷键,使糖链的末端连有海藻糖基,接着 MTHase 特异识别临近 α -1,1 糖苷键的 α -1,4 糖苷键,并将其切开,释放一分子海藻糖,同时产生少两个葡萄糖分子的带有还原末端的寡糖链以供下一轮降解。谷氨酸棒杆菌中存在该途径,并且海藻糖是棒杆菌属细菌细胞壁糖脂的基本组分^[10],推测该菌具有较强的海藻糖合成能力,所以本试验选择谷氨酸棒杆菌来源的 MTSase、MTHase 进行研究并进行异源表达,希望能进一步提高 TreY-TreZ 途径的转化效率。张文德等^[11,12]已经成功实现了 MTSase 在大肠杆菌中的活性表达,但 MTHase 基因的克隆和表达都遇到困难,得到的带有突变的蛋白也几乎都以包涵体形式存在。本研究改进了基因克隆过程中模板的选择,得到正确的目的基因,并根据文献报道,使用表达载体 pRSET-B^[13],实现了 MTHase 在大肠杆菌中的溶解表达。希望能降低海藻糖的生产价格,使海藻糖的应用能从食品领域拓展到饲料领域,从而推动海藻糖在我国的大范围应用。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032(ACCC10202)购自中国农业微生物菌种保藏管理中心;大肠杆菌 TOP10、BL21(DE3) pLysS 由本实验室保存;表达质粒 pRSET-B 由德国亥姆赫兹传染病研究所的 Herbert 教授馈赠;pMD-18T 购自 TaKaRa 公司。

1.2 工具酶和试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;pfu DNA 聚合酶、蛋白 marker Protein Ruler III 购自全式金生物技术有限公司,细菌基因组提

取试剂盒购自天根生化科技有限公司;薄层层析硅胶板型号为 merck 60 F₂₅₄;离子色谱系统为 Dionex 2500,柱子为 CarboPac™-2;大肠杆菌培养基为 LB、SOB 培养基;化学试剂为国产或进口分析纯。

1.3 谷氨酸棒杆菌麦芽寡糖基海藻糖水解酶基因的克隆和大肠杆菌表达载体的构建

1.3.1 谷氨酸棒杆菌麦芽寡糖基海藻糖水解酶基因 *treZ* 的克隆

在蛋白数据库 UniprotKB 中,被预测为 *C. glutamicum* ATCC 13032 菌株麦芽寡糖基海藻糖水解酶(MTHase)的蛋白序列有两个^[11,14],分别为 Q6M3U9(包含 566 个氨基酸)和 Q8NNR1(包含 595 个氨基酸)。这两个蛋白序列实际由同一个基因编码,只是 Q8NNR1 编码序列的起始密码子向前延伸了 87 bp。经 BLAST 比对,这 87 个碱基对于 MTHase 来说并不保守,推测其不会影响酶活,所以选择克隆到 Q6M3U9 或 Q8NNR1 任一编码序列作为 MTHase 的编码基因 *treZ*。但以 Q6M3U9 和 Q8NNR1 编码基因为基础设计的扩增引物均难以直接从谷氨酸棒杆菌基因组上克隆到目的序列,本实验采取两步 PCR 法扩增目的片段:①在 Q8NNR1 起始密码子上游约 300 bp 处和终止密码子下游约 100 bp 处,以谷氨酸棒杆菌基因组序列为基础设计一对扩增引物 PFL: 5'-GCCACGCAACGCCTCTAGCA-3' 及 PRL: 5'-CCGGG-CACCCCTGAGTACGA-3',用此对引物以谷氨酸棒杆菌基因为组模板,PCR 扩增一段包含 Q8NNR1 编码基因的长片段;②将长片段稀释 100 倍作为模板,用引物 PF: 5'-GAAGATCT-AGCTCGCCAACCGGCAGCAT-3'(Kpn I),PR: 5'-GGGGTACCATTAGTTTCGGGTCAAGATCG-3'(Bgl II)进行第二轮目的序列 Q8NNR1 PCR 克隆。PF 起始于 Q8NNR1 编码基因的第 25 位,PR 起始于 Q8NNR1 编码基因的终点,将终止密码子改为大肠杆菌偏爱使用的终止密码子 TAA,并在其后连上一个 T 形成 TAAT 四联核苷酸,进一步增强转录终止^[15]。谷氨酸棒杆菌基因组的提取方法按天根公司细菌基因组提取试剂盒说明操作。PCR 反应体系为: ddH₂O 32.5 μ L, 5 \times pfu buffer 10 μ L, dNTPs 4 μ L, 引物各 1 μ L, 模板 1 μ L, pfu DNA 聚合酶 0.5 μ L, 共 50 μ L, 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环;

72℃ 7 min。PCR 结束后,向反应体系加入 0.2 μL *Taq* DNA 聚合酶,0.5 μL 10 mmol/L dATP,72℃ 20 min,进行加 A 反应,以产生粘性 A 末端,便于与 T 载体连接。

PCR 产物经回收纯化后,与克隆载体 pMD-18T 连接,产生 pMD18T-*treZ*,转化大肠杆菌 TOP10,经菌落 PCR 鉴定后挑阳性克隆测序鉴定 *treZ* 的正确性。

1.3.2 大肠杆菌表达载体的构建 将 pMD18T-*treZ* 载体经 *Kpn* I 和 *Bgl* II 双酶切后,回收 *treZ* 片段,与经同样双酶切的表达载体 pRSET-B 进行连接,产生重组质粒 pRSET-B-*treZ*,用该重组表达载体转化大肠杆菌 TOP10,经菌落 PCR 和酶切验证后,用 pRSET-B-*treZ* 转化宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3)pLysS 得到重组菌。

1.3.3 重组菌的诱导表达 将重组菌单克隆接种于 3 mL SOB 培养基 (Amp 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Cm 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$),37℃ 摇床 200 r/min 过夜培养,转接菌液于新鲜 SOB 培养基至 $\text{OD}_{600} = 0.1$,37℃ 摇至 $\text{OD}_{600} = 0.4 \sim 0.6$,加 IPTG (终浓度 0.5 mmol/L),24℃,摇床 200 r/min 诱导培养 4 h。

1.3.4 目的蛋白的检测及定量 收集 1.5 mL 诱导后的菌体细胞,重悬于 300 μL 缓冲液 (20 mmol/L, KH_2PO_4 - K_2HPO_4 , pH 7.0),超声破碎细胞 (功率 300 W,工作时间 3 s,间歇 8 s,总时间 3 min),分别收集细胞破碎液的上清和沉淀,用 SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达情况。

重组菌胞内总蛋白的定量参照天根公司 Bradford 蛋白定量试剂盒操作。目的蛋白含量用 imageQyabtTL 软件分析。

重组蛋白纯化参照上海博彩生物科技有限公司的 BBST NTA Resin 使用方法进行。

1.3.5 重组 MTHase 粗酶液酶活的检测 含有 MTSase 编码基因 *treY* 的重组菌 pET30a-*treY*-*E. coli* BL21 (DE3)pLysS 由本实验室构建保存,将其与本研究构建的含基因 *treZ* 的重组菌分别诱导表达后,收集细胞破碎后的上清液作为粗酶液。先取含 MTSase 的粗酶液 100 μL 与 200 μL 9% 的糊精溶液混合,35℃,pH 7.0 反应 12 h。反应结束后 99℃ 加热反应液 10 min,再加入含 MTHase 的粗酶液 100 μL ,35℃,pH 7.0 反应 8 h 后 99℃ 加热反应液 10 min,离心取上清作为反应液 1。取 100 μL 反应液 1 用醋酸调至 pH 4.5,50℃ 用糖

化酶糖化 15 h,99℃ 加热反应液 10 min,离心取上清作为反应液 2。同时平行做两个对照:对照 1 底物与等量水作用,对照 2 底物与含空载体的重组菌破碎后的上清液作用。用薄层层析 (TLC) 法对反应液 2 进行定性分析,展开剂为正丁醇:乙醇:水 = 5:3:2^[13]。分别对反应液 1 和 2 进行离子色谱分析以确定海藻糖的生成量以及 MTHase 的相对活性。

2 结果与分析

2.1 谷氨酸棒杆菌 *treZ* 的克隆及表达载体的构建

以谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 基因组 DNA 为模板,先扩增出含 *treZ* 基因的片段,再以此片段为模板扩增 MTHase 的编码基因 *treZ*,大小约为 1.8 kb (图 1),与理论值相符。将目的基因连入 T 载体测序,结果除 1 252 位碱基 C 突变为 A 外,其余序列与 GenBank 中 gi:58036263-CgI2125 的序列完全一致。该碱基的突变使 418 位氨基酸由 Leu 突变为 Ile,考虑到是同类氨基酸之间的突变,并且突变位置不十分保守,所以该突变不影响 MTHase 的酶活,该扩增片段可以用于后续分析。

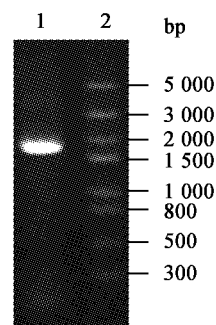


图 1 谷氨酸棒杆菌 *treZ* 的克隆

Fig.1 Cloning of *treZ* from *Corynebacterium glutamicum*.

1:目的片段; 2:Trans DNA marker III

1:Target fragment; 2:Trans DNA marker III.

利用双酶切位点 *Bgl* II 和 *Kpn* I 将克隆到的 *treZ* 连入大肠杆菌表达载体 pREST-B,得到重组表达载体 pRSET-B-*treZ*,转化 *E. coli* TOP10 后重提质粒用 *Bgl* II、*Kpn* I 双酶切验证,得到大小约 3.0 kb、1.8 kb 两个线性片段 (图 2),与空表达载体、目的基因的理论大小一致,证明已将目的片段成功插入表达载体。

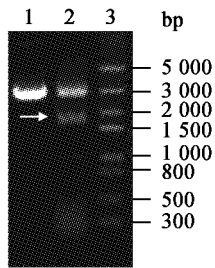


图2 pRSET-B-treZ 的双酶切验证

Fig.2 pRSET-B-treZ digested with *Bgl* II and *Kpn* I.

1: 双酶切空质粒 pRSET-B; 2: 酶切重组质粒 pRSET-B-treZ 后的片段; 3: Trans DNA marker III。箭头所指为目的片段

1: The empty plasmid pRSET-B digested with *Bgl* II and *Kpn* I; 2: The fragments getting from digesting the recombinant plasmid pRSET-B-treZ; 3: Trans DNA marker III. The arrow shows target fragment.

2.2 重组菌的诱导表达及表达产物分析

重组菌经 IPTG 诱导表达后, 收集菌体并重悬于磷酸钾缓冲液, 超声破碎细胞后, 分别收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE 检测。由图3可见,

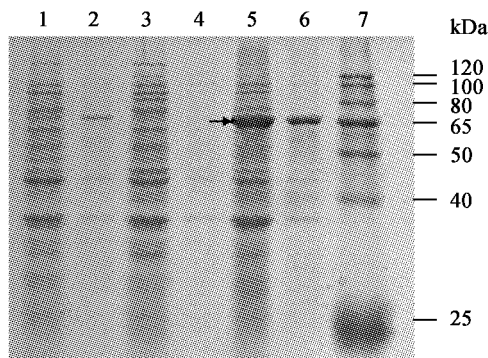


图3 SDS-PAGE (12.5%) 检测重组菌中 MTHase 的表达

Fig.3 Detection of MTHase expression by SDS-PAGE in recombinant strains.

1,2: 分别为重组菌 *E. coli* BL21 (DE3) plysS-pRSET-B-treZ 在 IPTG 诱导之前, 破碎菌体的上清及沉淀中的总蛋白; 3,4: 分别为含空载体的重组菌 *E. coli* BL21 (DE3) plysS-pRSET-B 经 IPTG 诱导 4 h 后, 破碎菌体的上清及沉淀中的总蛋白; 5,6: 分别为重组菌 *E. coli* BL21 (DE3) plysS-pRSET-B-treZ 经 IPTG 诱导 4 h 后, 破碎菌体的上清及沉淀中的总蛋白; 7: 蛋白标准分子量 Protein ruler III

1,2: Total cell proteins of *E. coli* BL21 (DE3) plysS-pRSET-B-treZ in supernatant, and in deposit respectively when the strains was broken, before inducing by IPTG; 3,4: Total cell proteins of *E. coli* BL21 (DE3) plysS-pRSET-B in supernatant, and in deposit respectively when the strains was broken, inducing for 4 hours by IPTG; 5,6: Total cell proteins of *E. coli* BL21 (DE3) plysS-pRSET-B-treZ in supernatant, and in deposit respectively, when the strains was broken, after inducing for 4 hours by IPTG; 7: Protein molecular weight marker Protein ruler III.

与含空载体的宿主菌菌体蛋白(3泳道)相比, 含目的基因的重组菌表达出大小约 68 kDa 的特异蛋白, 与谷氨酸棒杆菌 MTHase 该表达载体表达的理论大小接近, 并且大部分目的蛋白为可溶性表达(5泳道), 部分目的蛋白聚集形成包涵体(6泳道)溶解表达的目的蛋白约占重组菌胞内总蛋白的 40%, 达到 0.27 mg/mL, 经镍柱纯化后得到单一蛋白条带(图4)。

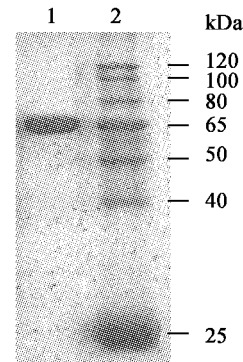


图4 目的蛋白的纯化

Fig.4 Purification of the target protein.

1: 镍柱纯化后的目的蛋白; 2: 蛋白标准分子量 Protein ruler III

1: Recombinant proteins purified on nickel column; 2: Protein molecular weight marker Protein ruler III.

2.3 通过 MTSase 与 MTHase 联合作用于底物产生海藻糖鉴定重组 MTHase 的酶活

菌体破碎后, 将含 MTSase、MTHase 的粗酶液作用于 9% 的糊精溶液, 反应结束后彻底糖化以去除产物中其他二糖的干扰, 反应产物用 F_{254} 硅胶板进行 TLC 分析(图5)。可以看出, 粗酶液与糊精溶液作用后, 海藻糖的相应位置有产物生成, 图中 2,3 道处显示的弱阳性为底物糊精中含有的二糖(麦芽糖, 异麦芽糖)未被糖化彻底所致, 为排除产物中混有其他二糖造成假阳性, 进一步对 MTSase、MTHase 作用后的产物(反应液 1)以及将反应液 1 彻底糖化后的产物(反应液 2, 图 5 中 4 道)进行离子色谱检测(色谱图以及检测数据见附图)。其中, 仅由含 MTSase、MTHase 的粗酶液作用后产生海藻糖 92.3 $\mu\text{g/mL}$, 经糖化酶进一步分解后, 释放出更多的海藻糖, 反应产物中海藻糖总含量为 1 028.4 $\mu\text{g/mL}$, 由此可见, 该 MTHase 的活性不高, 反应时间内并未将 MTSase 产生的海藻糖基全部释放。计算结果显示, 每毫升发酵液表达的重组 MTHase 是 MTSase 的 9 倍^[11], 但水解

释放海藻糖的速度是 MTSase 合成麦芽寡糖基海藻糖速度的 1/7.43, 所以推测谷氨酸棒杆菌 MTHase 的催化过程为 TreY-TreZ 途径的限速步骤, 这一结论与已知 *Sulfobobus sokfatoricus* Gxx 菌株来源的 MTSase、MTHase 的催化情况一致^[8]。

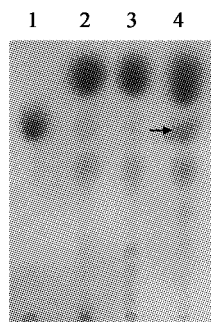


图 5 反应液 2 的薄层层析图谱

Fig. 5 TLC analysis of reaction solution 2 products.

注:1:海藻糖标准样;2:底物糊精糖化液;3:底物糊精与含空载体的大肠杆菌破碎上清液作用并糖化后的反应液;4:底物糊精与 MTSase、MTHase 粗酶液分别作用并糖化后的反应液(反应液 2)。箭头所指为层析后产物的位置。

Note: 1; Trehalose standards; 2; Dextrin digested by glucoamylase; 3; Reaction solution of dextrin and supernatant of broken *E. coli* BL21 (DE3) pLysS-pRSET-B and digested by glucoamylase; 4; Reaction of dextrin and crude MTSase & MTHase and digested by glucoamylase (solution 2). The arrow shows position of the product.

以上研究证明,以 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 为宿主细胞, pRSET-B 为表达载体,能溶解表达谷氨酸棒杆菌来源的 MTHase,并且该酶具有相应的酶活。

3 讨论

应用 TreY-TreZ 途径降解直链淀粉或麦芽糊精生成海藻糖需要麦芽寡糖基海藻糖合成酶 (MTSase) 和麦芽寡糖基海藻糖水解脱酶 (MTHase) 共同作用。一些不同来源的 MTSase 已经在大肠杆菌中实现了异源表达^[12], 并且较少形成包涵体, 但 MTHase 在大肠杆菌中的溶解表达一直较难实现^[11,16]。本研究使用一种较小的大肠杆菌表达载体——pRSET-B, 成功将谷氨酸棒杆菌来源的 MTHase 在大肠杆菌中溶解表达, 并且异源表达出的目的蛋白具有相应的酶活性, 能与 MTSase 共同作用于糊精生成海藻糖, 但仍有一部分酶蛋白聚集形成无活性的包涵体, 所以用大肠杆

菌表达系统来表达 MTHase 产量仍然有限, 并且所得重组酶的酶活不高。为将其应用于大规模海藻糖生产, 后续工作应集中于如何提高酶的产量和活性。黄日波等^[8]曾在汉斯多形酵母中成功表达了硫矿硫化叶菌来源的 MTHase, 苟兴华等^[17]优化了 132 个芝田硫化叶菌来源的 MTHase 密码子后, 使其在毕赤酵母中成功表达并提高了产量。所以尝试在酵母等真核表达系统中表达不同来源的 MTHase, 实现高密度发酵, 将有望提高 MTHase 的表达量。目前, 国外科学家已经解析出耐辐射异常球菌、硫矿硫化叶菌的 MTHase 晶体结构并推测了其作用机制^[18,19], 谷氨酸棒杆菌 MTHase 与其相似性分别为 54% 和 59%, 据此尝试通过结构比对及基因改造, 推测谷氨酸棒杆菌 MTHase 的活性位点和作用原理, 将有助于探索从根本上解决 MTHase 限速 TreY-TreZ 途径合成海藻糖的问题。

参 考 文 献

- [1] Higashiyama T. Novel functions and applications of trehalose [J]. *Pure Appl. Chem.*, 2002, 74(7):1263-1269.
- [2] Elbein A D, Pan Y T, Pastuszak I, et al. New insights on trehalose: a multifunctional molecule [J]. *Glycobiology*, 2003, 13(4):17-27.
- [3] Richards A B, Krakowka S, Dexter L B, et al. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies [J]. *Food Chem. Toxicol.*, 2002, 40:871-898.
- [4] 吴信, 林波, 黄瑞林, 等. 海藻糖及其在饲料中的应用探讨 [J]. *中国饲料*, 2007, 7:26-28.
- [5] Paul M J, Primavesi L F, Jhurreea D, et al. Trehalose metabolism and signaling [J]. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2008, 59:417-441.
- [6] 吴秀丽, 岳明, 丁宏标. 海藻糖合酶的研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2009, 36(7):1067-1072.
- [7] Schiraldi C, Lermia I D, Rosa M D. Trehalose production: exploiting novel approaches [J]. *Trends Biotechnol.*, 2002, 20(10):420-425.
- [8] 黄日波, 蒙健宗, 陈宇. 海藻糖—21 世纪的新型糖类 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2010, 45-47.
- [9] Maruta K, Nakada T, Kubota M, et al. Formation of trehalose from maltooligosaccharides by a novel enzymatic system [J]. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1995, 59:1829-1834.
- [10] Tzvetkov M, Klopprogge C, Zelder O, et al. Genetic dissection of trehalose biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*: inactivation of trehalose production leads to impaired growth and an altered cell wall lipid composition [J]. *Microbiology*, 2003, 149:1659-1673.
- [11] 张文德. 谷氨酸棒杆菌海藻糖合成相关酶基因的克隆与表达 [D]. 北京: 中国农业科学院, 硕士学位论文, 2009.

- [12] 张文德, 乔宇, 丁宏标. 谷氨酸棒杆菌麦芽寡糖基海藻糖合成酶基因的克隆与表达[J]. 中国农业科技导报, 2009, 11(1):68-72.
- [13] Kim Y H, Kwon T K, Park S, *et al.*. Trehalose synthesis by sequential reactions of recombinant maltooligosyltrehalose synthase and maltooligosyltrehalose trehalohydrolase from *Brevibacterium helvolum* [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2000, 11:4620-4624.
- [14] Carpinelli J, Kr mer R, Agosin E. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for trehalose overproduction: role of the TreYZ trehalose biosynthetic pathway [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2006, 5:1949-1955.
- [15] 吴乃虎. 基因工程原理(下册)[M](第二版). 北京:科学出版社, 2001, 119.
- [16] 许雅琴. 玫瑰微球菌麦芽寡糖基海藻糖水解酶基因在大肠杆菌中的表达[D]. 北京:北京化工大学, 硕士学位论文, 2007.
- [17] 苟兴华, 王卫, 刘达玉, 等. 麦芽寡糖基海藻糖水解酶基因在巴斯德酵母中的表达及遗传稳定性[J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(3):408-411.
- [18] Timmins J, Leiros S, Leonard G, *et al.*. Crystal structure of maltooligosyltrehalose trehalohydrolase from deinococcus radiodurans in complex with disaccharides [J]. J. Mol. Biol., 2005, 02(11):1-15.
- [19] Feese M D, Kato Y, Tamada T, *et al.*. Crystal structure of glycosyltrehalose trehalohydrolase from the hyperthermophilic archaeum *Sulfolobus solfataricus* [J]. J. Mol. Biol., 2000, 301:451-464.

第四届全国农业环境科学学术研讨会

“全国农业环境科学学术研讨会”是由《农业环境科学学报》编辑部发起,由中国农业生态环境保护协会、农业部环境保护科研监测所、农业部产地环境与农产品安全重点开放实验室主办的学术年会,旨在为我国农业环境科学领域的学术界提供一个交流的平台。拟于2011年7月中下旬在内蒙古呼和浩特市召开。大会将对我国近年来农业环境科学领域的最新研究成果进行交流,本次会议仍采取大会主题报告与专题研讨相结合的形式,届时将邀请有关院士、知名专家作特邀报告。

一、会议组织:

主办单位: 中国农业生态环境保护协会
农业部环境保护科研监测所
农业部产地环境与农产品安全
重点开放实验室

承办单位: 内蒙古农业大学

二、会议时间、地点:

2011年7月中下旬,内蒙古呼和浩特市

三、会议主题:

“十一五”农业环境研究回顾与展望

四、会议议题:

1. 污染生态研究;
2. 土壤污染与修复研究;
3. 农业面源污染与治理方面研究;
4. 农业温室气体减排潜力与技术评估等研究;
5. 农药环境行为及快速测定技术的研究及应用;
6. 农业废弃物资源化利用研究;
7. 农业环境风险评价与预警体系等研究;
8. 生态农业、生物多样性保护及转基因环境安全等方面研究;
9. 其他有关农业环境科学领域内的新理论、新技术及新方法研究等。

五、联系方式:

联系人: 李无双, 潘淑君

电话: 022-23674336

邮箱: caep@vip.163.com

地址: 天津市南开区复康路31号

《农业环境科学学报》编辑部

邮编: 300191