

纤维素结合域的酿酒酵母表面展示 及其黏附位点初探

张玉杰 王佳堃* 叶均安 刘建新

(浙江大学奶业科学研究所, 杭州 310029)

摘要: 利用酿酒酵母表面展示系统表达产琥珀酸丝状杆菌 S85 纤维素结合域家族 2 (CBD2), 分析其纤维黏附位点。将 CBD2 基因插入质粒 pYD1 的 AGA2 3' 端, 构建 pMCBD2 重组质粒, 化学转化 pMCBD2 至酿酒酵母 EBY100 中, 2% 半乳糖诱导 CBD2 表达于酿酒酵母表面。利用免疫组化技术检测重组酵母细胞在稻草茎细胞壁上的黏附位点。结果表明: 利用酿酒酵母表面展示系统可成功表达产琥珀酸丝状杆菌 S85 的 CBD2 基因; 重组 CBD2 的 pMCBD2-EBY100 与稻草茎孵育后, 经抗 V5 异硫氰酸荧光素标记抗体处理可在稻草茎的薄壁、厚壁和维管组织均检测到荧光。产琥珀酸丝状杆菌 S85 的 CBD2 黏附稻草多个组织。结果提示: 酿酒酵母表面展示技术与免疫组化技术联用研究瘤胃细菌 CBD 的黏附位点是可行的。

关键词: 纤维素结合域; 酵母表面展示系统; 黏附位点; 产琥珀酸丝状杆菌

中图分类号: S852.6

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2011)06-0976-07

反刍动物通过瘤胃微生物发酵纤维素、半纤维素等结构性碳水化合物满足机体的能量需要。瘤胃微生物对纤维物质的黏附是降解纤维的首要条件^[1-2]。因此, 微生物对纤维物质的黏附一直是反刍动物营养研究的热点之一。微生物对纤维物质的黏附包括非特异性黏附和特异性黏附 2 种形式, 特异性黏附又以酶的纤维素结合域 (cellulose-binding domain, CBD) 研究得相对深入^[3]。CBD 是碳水化合物活性酶内具有纤维素结合能力的高度折叠的一段氨基酸序列, 目前的研究致力于 CBD 的应用^[4-7]、蛋白质和碳水化合物结合机制^[8]等, 较少涉及瘤胃优势纤维分解细菌。产琥珀酸丝状杆菌 (*Fibrobacter succinogenes*) 是瘤胃内主要的三大纤维分解细菌之一^[9-11]。CAzy (<http://www.cazy.org>) 数据库显示, 产琥珀酸丝状杆菌 S85 的 CBD 分属于家族 2、6、11 和 30, 而这 4 个家族在微生物中的分布并不均衡, 很多细菌酶

都具有 CBD2 结构域, 突显了 CBD2 的重要性。CBD 是高度折叠的氨基酸序列, 传统的研究方法难以应用于其研究。酵母表面展示技术是近年来发展较快的一种真核蛋白表达系统, 其基本原理是将外源靶蛋白基因与特定的载体基因序列融合后导入酵母细胞, 利用酵母细胞内蛋白转运系统转运到膜表面, 从而使靶蛋白固定化表达在酵母细胞表面^[12-13]。酿酒酵母对表达蛋白翻译后修饰加工, 易于培养、传代稳定^[13], 在研究 CBD 的过程中无需分离、纯化操作, 而且表达的蛋白可通过特异性免疫组化进行灵敏而方便地检测和筛选。为此, 本试验利用酿酒酵母展示技术展示产琥珀酸丝状杆菌的 CBD2, 并通过特异性免疫组化反应分析 CBD2 纤维物质的黏附位点, 探讨其重要性, 为后续深入研究 CBD 与瘤胃细菌特异性纤维黏附位点的关系研究奠定基础。

收稿日期: 2011-01-08

基金项目: 国家自然科学基金 (30800786)

作者简介: 张玉杰 (1986—), 男, 安徽阜阳人, 硕士研究生, 从事瘤胃微生物研究。E-mail: huigezyj@163.com

* 通讯作者: 王佳堃, 副教授, 硕士生导师, E-mail: jiakunwang@zju.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒、外源靶蛋白基因和植物材料

酿酒酵母 EBY100 和质粒 pYD1 均由杭州师范大学陈振明副教授馈赠。Trans5 α 感受态细胞购于北京全式金生物技术有限公司。产琥珀酸丝状杆菌 S85 的 CBD2 与 pUC57 质粒的合成由上海捷瑞生物工程有限公司完成。稻草取自浙江大学试验牧场。

1.1.2 酶与试剂

限制性内切酶 *Bam* H I 和 *Xho* I 及 T4 DNA 连接酶购于 Fermentas 公司。核糖核酸酶 A (RNase A)、核酸分子质量标准 (500 ~ 15 000 和 100 bp) 和割胶回收试剂盒购自于 TaKaRa 公司。二甲基亚砜 (DMSO)、聚乙二醇 - 3350 (PEG-3350)、鲑鱼精 DNA 购于 Sigma 公司。抗 V5 异硫氰酸荧光素标记抗体 (Anti-V5-FITC) 购于 Invitrogen 公司。其它生化试剂为国产分析纯级。

1.1.3 培养基和缓冲液

LB 培养基: 蛋白胨 10 g/L、酵母膏 5 g/L、NaCl 10 g/L、琼脂粉 15 g/L, 用于 Trans5 α 培养。

LB 氨苄青霉素固体选择性培养基: LB 培养基中加入氨苄青霉素 (ampicillin) 100 mg/L、琼脂粉 15 g/L, 用于重组质粒的筛选。

酵母膏胨葡萄糖 (YPD) 培养基: 蛋白胨 20 g/L、酵母膏 10 g/L、葡萄糖 20 g/L、琼脂粉 15 g/L, 用于酿酒酵母 EBY100 培养。

无氨基酸酵母氮源 - 酸水解酪素 (YNB-CAA) 培养基: YNB 6.7 g/L、CAA 5 g/L、葡萄糖 20 g/L、琼脂粉 15 g/L, 用于转化子的转接或诱导。

MD 转化培养基: YNB 6.7 g/L、亮氨酸 0.1 g/L、葡萄糖 20 g/L、琼脂粉 15 g/L, 用于酵母转化子的筛选。

PEM 缓冲液: 哌嗪 - N, N' - 双 (2 - 乙磺酸) (PIPES) 50 mmol/L、乙二胺四乙酸 (EDTA) 5 mmol/L、MgSO₄ 5 mmol/L, pH 6.9, 用于稻草片固定。

磷酸盐缓冲液 (10 mmol/L): NaCl 8 g/L、KCl 0.2 g/L、Na₂HPO₄ 1.44 g/L、KH₂PO₄ 0.24 g/L, pH 7.4, 用于稻草片的制备和孵育等。

1.2 重组质粒 pMCBD2 的构建

在 LB 氨苄青霉素固体选择性培养基上划线培养, 获得含 CBD2 基因的大肠杆菌 Trans5 α 单菌落。挑取单菌落 37 °C, 200 r/min 过夜扩增, 十二烷基硫酸钠 (SDS) 碱裂解法抽提质粒^[14], *Bam* H I 和 *Xho* I 双酶切质粒, 电泳后割胶回收获得 CBD2 基因序列。用同样的方法获得开环 pYD1 序列。将 2 段序列经 T4 DNA 连接酶连接后, 连接产物转化大肠杆菌 Trans5 α , 活化后涂布于 LB 氨苄青霉素固体选择性培养基。挑取筛选出的单菌落经液体选择性培养基扩增后, 抽提质粒, 通过限制性酶切分析和测序 (上海桑尼公司) 验证重组质粒构建是否成功。

1.3 酵母转化及诱导表达

采用醋酸锂法^[15]将构建成功的质粒 pMCBD2 转化酿酒酵母细胞 EBY100, 转化后涂布于 MD 培养基。挑取筛选出的单菌落, 接种于 10 mL YNB-CAA 培养基中, 30 °C、200 r/min 培养过夜。待菌体生长到 OD_{600 nm} 在 2 ~ 5 时, 5 000 × g 离心 5 min 收集菌体。用 2% 半乳糖的 YNB-CAA 培养基重新悬浮菌体, 使菌液 OD_{600 nm} 为 0.5 ~ 1.0, 20 °C 条件下 200 r/min 摇床培养 6 h 诱导基因表达。

1.4 稻草片的制备与酵母细胞孵育

改进 Wang 等^[16]和 McCartney 等^[17]的方法制备植物材料, 并对其进行酵母细胞孵育。具体做法如下: 取整株稻草, 剥离茎、叶片和叶鞘, 在茎的第二节上缘, 节下 2 厘米处截取长为 3 厘米的茎片断, 纵切为 6 份, 水浸过夜后切割 100 ~ 300 μ m 的横切片断。在含 4% 多聚甲醛的 PEM 缓冲液中固定 1 h 后, 用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液冲洗。取 1.5 mL 诱导表达的重组酵母细胞菌液, 5 000 × g 离心 5 min 获得重组酵母细胞, 用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液洗涤细胞后, 加入 250 μ L 上述磷酸盐缓冲液制得细胞悬液, 与稻草片一起室温条件下孵育 1.5 h。

1.5 免疫组化反应

孵育后的稻草片用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液清洗 3 次, 以除去非特异黏附的酵母细胞。随后用 1:300 稀释的抗 V5 异硫氰酸荧光素标记抗体处理稻草片 1.5 h, 再用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液清洗 3 次后, 荧光显微镜 (尼康 ECLIPSS 80i) 下检测。

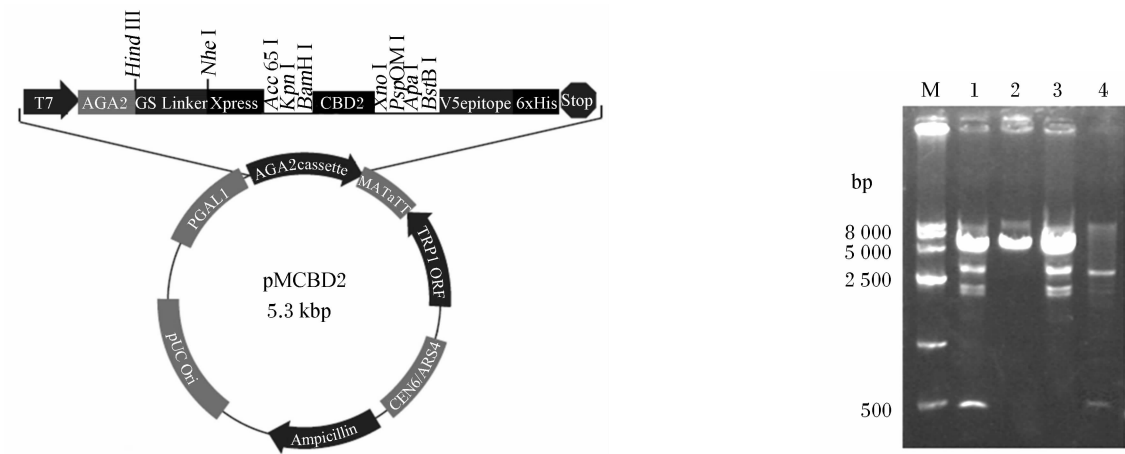
2 结 果

2.1 重组质粒 pMCBD2 和重组菌株 pMCBD2-EBY100 的构建

pYD1 是 5 009 bp 的环状 DNA,CBD2 长为 322 bp 通过 pUC57 携带。利用 *Bam* H I 和 *Xho* I 将目标 CBD2 序列克隆至表面展示载体 pYD1 的

AGA2 3'端,使 AGA2-CBD2 融合基因处于 *GAL*1 启动子下游,构建载体 pMCBD2,以实现半乳糖诱导下的高效表达(图 1A)。

pMCBD2 和 pYD1 双酶切图谱均出现多个条带,表明酶切不完全,但 2 者比对可看到 pMCBD2 携带了约 500 bp 的片段(图 1B)。



A: pMCBD2 重组质粒的构建示意图

A: construction of the recombinant plasmid pMCBD2

B: pMCBD2 重组质粒的鉴定

B: identification of the recombinant plasmid pMCBD2

M:核酸分子质量标准,1:pMCBD2 经 *Bam* H I 和 *Xho* I 双酶切后的产物,2:pMCBD2 经 *Xho* I 单酶切后的产物,3:pYD1 经 *Xho* I 单酶切后的产物,4:pUC57-CBD2 经 *Bam* H I 和 *Xho* I 双酶切后的产物。

M: DNA marker, 1: pMCBD2 digested by *Bam* H I and *Xho* I, 2: pMCBD2 digested by *Xho* I, 3: pYD1 digested by *Xho* I, 4: pUC57-CBD2 digested by *Bam* H I and *Xho* I.

图 1 pMCBD2 重组质粒的构建及鉴定

Fig. 1 Construction and identification of the recombinant plasmid pMCBD2

pMCBD2 单酶切仅获得开环序列,测序分析的结果(图 2)进一步证实重组质粒构建成功。

2.2 重组菌株 pMCBD2-EBY100 纤维黏附位点分析

因为 pYD1 含有 V5 抗原表位,所以重组的 pMCBD2-EBY100 酵母细胞在诱导表达后,可借助免疫组化,通过荧光监测 CBD2 的纤维黏附位点。免疫组化结果显示,未重组 CBD2 的 pYD1-EBY100 不具有黏附稻草的能力(图 3A),而重组的 pMCBD2-EBY100 对稻草的厚壁组织、薄壁组织和维管组织均有黏附。黏附程度随稻草组织结构的变化而不同,细胞相对致密的厚壁和维管组织的荧光强度大于细胞相对疏松的薄壁组织(图 3B)。

3 讨 论

酿酒酵母细胞壁蛋白 a 凝集素有 2 个亚基,其中 1 个是 AGa2,AGa2-CBD2 融合蛋白通过二硫键与酿酒酵母细胞壁蛋白 a 凝集素的另一亚基 AGa1 蛋白结合,然后 AGa1 蛋白通过糖基磷脂酰肌醇(GPI)共价结合到细胞壁上。因为酿酒酵母 EBY100 基因组中被整合了启动子 *gall-AGal* 开放阅读框,所以 AGa2-CBD2 融合蛋白能与充足的 AGa1 蛋白结合,使 CBD2 在酿酒酵母细胞表面展示。

稻草的细胞壁在细胞发育过程中,由于原生质体代谢活动不断改变,所形成的壁物质存在组成种类、数量、比例以及物理性质的差异,使其在显微镜下呈现出自外而内的胞间层、初生壁和次

生壁的 3 层结构^[18]。纤维素约占稻草细胞壁的 60%,分布于初生壁和次生壁,且主要以微纤维组成的结晶形状存在。半纤维素则主要是以木聚糖和葡萄糖醛酸的缩合物形式存在,且随初生壁向次生壁木质化程度减弱而减少^[19]。基于结构和功能差异,CBD2 可划分为 A 和 B 2 种类型。A 型为黏附结晶纤维素,B 型为黏附多聚糖链^[8]。图 4 序列比对及图 5 利用 SWISS-MODEL/SWISS-Pdb-Viewer^[20-22]预测的蛋白质三级结构结果显示产琥珀酸丝状杆菌的 CBD2 具有 3 个暴露于空间结构外侧的色氨酸(图 4 中黑框标出的“W”),且与第 1 个色氨酸相隔 2 个位置的氨基酸为甘氨酸(图 4

中“*”标出的“G”)。依据这一结果理论推测产琥珀酸丝状杆菌的 CBD2 可能属于类型 A^[23],即该 CBD 特异性地黏附结晶纤维素,而对木聚糖无黏附能力。这一推测与显微镜下观察到产琥珀酸丝状杆菌的 CBD2 对厚壁、薄壁和维管组织细胞均有黏附,且荧光强度与细胞壁的厚度一致相吻合(图 3)。Blake 等^[24]以烟草茎为底物证实 CBD2A 细胞壁黏附范围和强度高于 CBD1、CBD3A、CBD10 等,尤其是 CBD2A 可黏附木质部的次生壁。上述结果表明利用酵母表面展示系统和免疫组化分析技术可研究瘤胃微生物 CBD 的黏附特性。

pMCBD2 CBD2	CCTACTTCTA	CATTTTCAAT	TAAGATGCAG	TTACTTCGCT	GTTTTTCAAT	ATTTTCTGTT	ATTGCTTCAG	70 1
pMCBD2 CBD2	TTTTAGCACA	GGAAC TGACA	ACTATATGCG	AGCAAATCCC	CTCACCAACT	TTAGAATCGA	CGCCGTACTC	140 1
pMCBD2 CBD2	TTTGTCACG	ACTACTATTT	TGGCCAACGG	GAAGGCAATG	CAAGGAGTTT	TTGAATATTA	CAATCAGTA	210 1
pMCBD2 CBD2	ACGTTTGTCA	GTAATTGCGG	TTCTCACCCC	TCAACGACTA	GCAAAGGCAG	CCCCATAAAC	ACACAGTATG	280 1
pMCBD2 CBD2	TTTTTAAGCT	TCTGCAGGCT	AGTGGTG GTG	GTGGTTCTGG	TGGTGGTGGT	TCTGGTGGTG	GTGGTTCTGC	350 1
pMCBD2 CBD2	TAGCATGACT	GGTGGACAGC	AAATGGGTCTG	GGATCTGTAC	GACGATGACG	ATAAGGTACC	AGGATCCACG	420 1
pMCBD2 CBD2	CCTGACCCGA	CGCCTGACCC	GACGCCTGAC	CCCACGCCGA	GCGAACCGAC	CGACCCAAACC	ACCCCGACCG	490 1
pMCBD2 CBD2	ACCCCAACCGA	GCCGAGCGAT	CCGCAGACCA	CAACCACCGG	GCTGACCGTC	GAAGCGAAAG	TCAGCAACGA	560 44
pMCBD2 CBD2	TTGGGGTATG	GGTGCGAACG	TTAACGTGAC	CGTCAGCAAC	CCATCCGACG	CCACGTACAA	GGCGGGCTGG	630 114
pMCBD2 CBD2	AAGGTTGAGT	TCGACCTGGC	AGGCACCATC	ACCAACCTGT	GGTGTGGCAA	AGTCGTGAGC	CATACCGGCA	700 184
pMCBD2 CBD2	ATCATTACGT	TGTCTCCGAT	GCCTGCTGGA	ACGCTTCGAT	CGCCCCGAAG	CAGAGCACTT	CCTTCGGATT	770 254
pMCBD2 CBD2	CGGTGTGTCTG	AAGACGCCGA	CGAGCAGCGC	GCTGCCGACA	AATCTGACGG	TGAACGGTAT	TGCCGCGGGT	840 322
pMCBD2 CBD2	GCTTCGGGTG	ATTCTCTGAA	GCTCGAGTCT	AGAGGGCCCT	TCGAAGGTAA	GCCTATCCCT	AACCCCTCTCC	910 322
pMCBD2 CBD2	TCGGTCTCGA	TTCTACGCGT	ACCGGTCATC	ATCACCATCA	CCATTGAGTT	TAAACCCGCT	GATCTGATAA	980 322
pMCBD2 CBD2	CAACAGTGTA	GATGTAACAA	AAATCGACTT	TTGTTCAC	ACTGTAGCTC	TTTTAGCGTC	GTTACGCA	1048 322

图 2 pMCBD2 与 CBD2 序列比对结果

Fig. 2 A comparison between sequences of pMCBD2 and CBD2



A: 未重组菌株 pYD1-EBY100
A: pYD1-EBY100 strain without recombination
B: 重组菌株 pMCBD2-EBY100
B: pMCBD2-EBY100 recombination strain
E: 表皮,S: 厚壁组织,V: 维管组织,P: 薄壁组织。
E: epidermis, S: sclerenchyma, V: vascular, P: parechyma.

图 3 免疫组化观测 CBD2 在稻草茎横切面上的黏附位点

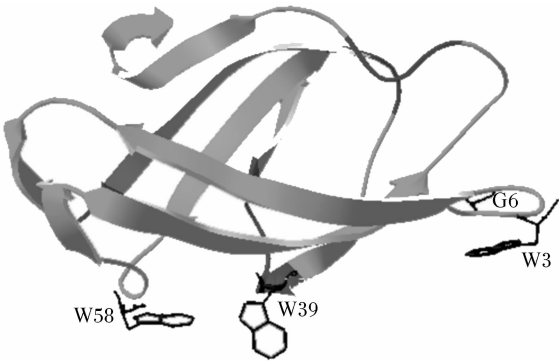
Fig. 3 Immunohistochemistry detection of CBD2 binding locus on transverse sections of straw stem

F.succCBD2	-----NDWGMGANVNVTVSNPSDATYKGGWKVEFDLAG--TITNLWCCKVVSHT	47
CfiCenA	APGCRVDYAVTNCWPGGFGANVTITNLG-DPVSS-WKLDWYTAGQRIQQIWNGTAS-TN	57
PflXynA	--TATCSYNITNEWNTGYTGDITITNRGSSAING-WSVNWQYAT-NRLSSSWNANVS-GS	55
F.succCBD2	GNHYVVSDAQWNASIAPKQSTSFSGFGVSKTPTSSALPTNLTVNGIA---	93
CfiCenA	GGQVSVTSLFWNGSIPTGGTASFGFNGSWA-GSNPTPASFSLNGTTCTG	105
PflXynA	N-PYSASNLSWNGNIQPGQSVSFGFQVNKN-GGSAERP--SVGGSSICSG	100

F. succCBD2: 产琥珀酸丝状杆菌 S85,CfiCenA: 粪肥纤维单胞菌内切葡聚糖酶 A,PflXynA: 荧光假单胞杆菌木聚糖酶 A。
F. succCBD2: *F. succinogenes* S85, CfiCenA: *C. fimi* endoglucanase A, PflXynA: *P. fluorescens* xylanase A.

图 4 CBD2A 多序列比对

Fig. 4 Sequence alignment of CBD2A



W: 色氨酸,G: 甘氨酸。
W: tryptophan, G: glycine.
图 5 预测的产琥珀酸丝状杆菌 CBD2 三维结构
Fig. 5 A prediction of three dimensional structure
of CBD2 of *F. succinogenes*

4 结 论

本试验利用酿酒酵母表面展示系统成功表达了产琥珀酸丝状杆菌 CBD2,免疫组化分析显示产琥珀酸丝状杆菌 CBD2 的黏附位点广泛,可黏附薄壁/厚壁和维管组织。酿酒酵母表面展示技术与免疫组化技术联用研究瘤胃细菌 CBD 的黏附位点是可行的。

参考文献:

[1] GONG J, FORSBERG C W. Factors affecting adhesion *Fibrobacter succinogenes* S85 and adherence defective mutant to cellulose[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55:3039 – 3044.
[2] FORSBERG C W, FORANO E, CHESSON A. Microbial adherence to the plant cell wall and enzymatic hydrolysis[C]//CRONJE P D. *Ruminant physiolo-*

- gy: digestion, metabolism, growth and reproduction. Proceeding of the 9th ISRP. UK: CAB International, 2000, 79-97.
- [3] MIRON J, BEN-GHEDALIA D, MORRISON M. Invited review: adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria[J]. Journal of Dairy Science, 2001, 84:1294-1309.
- [4] FUJITA Y, KATAHIRA S, UEDA M, et al. Construction of whole-cell biocatalyst for xylan degradation through cell-surface xylanase display in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002, 17:189-195.
- [5] FUKUDA T, ISHIKAWA T, OGAWA M, et al. Enhancement of cellulase activity by clones selected from the combinatorial library of the cellulose-binding domain by cell surface engineering[J]. Biotechnology Progress, 2006, 22:933-938.
- [6] MURAI T, UEDA M, KAWAGUCHI T, et al. Assimilation of celooligosaccharides by a cell surface-engineered yeast expressing β -glucosidase and xarboxymethylcellulase from *Aspergillus aculeatus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64: 4857-4861.
- [7] NAM J M, FUJITA Y, ARAI T, et al. Construction of engineered yeast with the ability of binding to cellulose[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002, 17:197-202.
- [8] BORASTON A B, BOLAM D N, GILBERT H J, et al. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition [J]. Biochemical Journal, 2004, 382:769-781.
- [9] FORSBERG C W, CHENG K J, WHITE B A. Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine [M]//MACKIE R I, BRUCE A. WHITE R E, et al. Isaacson gastrointestinal microbiology. New York: Chapman and Hall, 1997, 319-379.
- [10] LATHAM J, BROOKER B E, PETIPHER G L, et al. *Ruminococcus flavefaciens* cell coat and adhesion to cotton cellulose and cell walls in leaves of perennial ryegrass[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1978, 35:156-165.
- [11] DINSDALE D, MORRIS E J, BACON J S D. Electron microscopy of the microbial populations present and their modes of attack on various cellulosic substrates undergoing digestion in the sheep rumen[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1978, 36: 160-168.
- [12] KONDO A, UEDA M. Yeast cell-surface display-applications of molecular display[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64:28-40.
- [13] SHIBASAKI S, MAEDA H, UEDA M. Molecular display technology using yeast-arming technology [J]. Analytical Sciences January, 2009, 25: 41-49.
- [14] SAMBROOK J, RUSSELL D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂,王栋樑,周晓巍,等,译. 北京: 科学出版社,2002.
- [15] ITOH, FUKUDA Y, MURATA K, et al. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations [J]. Journal of Bacteriology, 1983, 153(1):163-168.
- [16] WANG J K, LIU J X, LI J Y, et al. Histological and rumen degradation changes of rice straw stem epidermis as influenced by chemical pretreatment [J]. Animal Feed Science and Technology, 2007, 136: 51-62.
- [17] MCCARTNEY L, BLAKE A W, FLINT J E, et al. Differential recognition of plant cell walls by microbial xylan-specific carbohydrate-binding modules[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(2):4765-4770.
- [18] WANG J K, CHEN X L, LIU J X, et al. Histological changes of tissues and cell wall of rice straw influenced by chemical pretreatments[J]. Asian-Australian Journal of Animal Sciences, 2008, 21:824-830.
- [19] 王佳堃,叶丹妮,李文婷,等. 化学预处理对稻草硅化程度的影响及其与稻草降解率的关系研究[J]. 动物营养学报,2008,20(2):170-175.
- [20] ARNOLD K, BORDOLI L, KOPP J, et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modeling [J]. Bioinformatics, 2006, 22:195-201.
- [21] SCHWEDE T, KOPP J, GUEX N, PEITSCH M C. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31:3381-3385.
- [22] GUEX N, PEITSCH M C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling [J]. Electrophoresis, 1997, 18: 2714-2723.
- [23] SIMPSON P J, XIE H, BOLAM D N, et al. The structural basis for the ligand specificity of family 2

carbohydrate-binding modules[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275:41137–41142.

[24] BLAKE A W, MCCARTNEY L, FLINT J E, et al. Understanding the biological rationale for the diversity

of cellulose-directed carbohydrate-binding modules in prokaryotic enzymes[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2006, 281:29321–29329.

Cell Surface Display of Cellulose Binding Domain on *Saccharomyces cerevisiae* and Analysis of Its Adhesion Sites

ZHANG Yujie WANG Jiakun* YE Jun'an LIU Jianxin

(Institute of Dairy Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: To analyze the adhesion sites of cellulose binding domain (CBD) family 2 of *Fibrobacter succinogenes* S85 on fiber using a cell surface display system of *Saccharomyces cerevisiae* strain EBY100, the CBD2 encoding fragment was inserted into the 3' terminal of AGA2 fragment in pYD1 vector to construct a recombinant plasmid, pMCBD2. Then pMCBD2 was transformed into strain EBY100 chemically. The 2% galactose was used to induce the expression of CBD2 on the cell surface of EBY100. The adhesion sites of the recombinant strain EBY100 to cell wall of rice straw stem were detected using immunohistochemistry. The results showed that CBD2 can potentially be expressed on the surface of strain EBY100. After incubating EBY100-pMCBD2 with rice straw stem slice, fluorescence was detected on the sclerenchyma, parenchyma and vascular tissues of rice straw stem with Anti-V5-FITC. It suggests that CBD2 can potentially adhere to most tissues of rice straw stem. Cell surface display system of *S. cerevisiae* along with immunohistochemistry can be suitable for the study on the adhesion sites of rumen bacterial CBD. [Chinese Journal of Animal Nutrition, 2011, 23 (6):976-982]

Key words: cellulose binding domain; yeast cell surface display system; adhesion sites; *Fibrobacter succinogenes* S85

* Corresponding author, associate professor, E-mail: jiakunwang@zju.edu.cn