



嗜热毁丝霉菌多糖裂解单加氧酶基因的克隆 及生物信息学分析

鞠 酒^{1,2}, 张付云¹, 李 倩^{1,2}, 谭海东², 尹 恒²

(1. 大连海洋大学 食品科学与工程学院, 辽宁 大连 116023; 2. 中国科学院 大连化学物理研究所/辽宁省碳水化合物重点实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要:多糖裂解单加氧酶(LPMO)是近来发现的一类裂解结晶多糖(如纤维素和几丁质)的氧化酶,它通过单加氧的形式断裂多糖底物之间的糖苷键。为研究 LPMO 的功能和结构特性,采用基因工程技术从嗜热毁丝霉菌中克隆出 LPMO 基因(*MtLPMO9F*)并构建重组表达载体和重组表达菌株,采用生物信息学在线工具和软件分析 *MtLPMO9F* 基因编码的蛋白质 MtLPMO9F 的理化性质、亲/疏水性、信号肽、结构域及空间结构等。结果表明:成功构建了 MtLPMO9F 真核表达载体及毕赤酵母表达菌株。生物信息学分析结果表明, MtLPMO9F 的预测分子量约 35.19 kDa,理论等电点为 5.13,有 4 个潜在的 N-糖基化位点和 16 个 O-糖基化位点。系统进化分析显示 MtLPMO9F 与嗜热子囊菌(*Thermoascus aurantiacus*)的同家族酶 TaLPMO9A 有亲缘关系,序列相似性为 43%。

关键词:纤维素;多糖裂解单加氧酶;嗜热毁丝霉菌;生物信息学分析

随着经济的高速发展和人口的迅速增长,传统的化石能源如煤、石油等不可再生资源已经不能满足当今世界的经济发展需求^[1]。寻找可再生的替代能源成为各国关注的焦点,我国的林业和农作物秸秆等木质纤维素资源丰富,以其为原料开发和生产生物质燃料与化学品对我国能源和化学工业的可持续发展具有重要意义。

木质纤维素是由木质素、纤维素和半纤维素聚合形成的复杂共聚物,其主要成分纤维素是由 D-吡喃葡萄糖环彼此以 β -1,4-糖苷键连接而形成的线形高分子化合物^[2]。采用生物酶完全降解纤维素需要至少 3 种不同的酶系:内切纤维素酶、外切纤维素酶和 β -1 和 4-D-葡萄糖苷酶^[3-4]。这些水解酶在降解惰性木质纤维素上存在水解效率低、酶活力不稳定等问题,而且利用水解酶所带来的高额成本也阻碍了木质纤维素转化产业的发展^[5-6]。因此发现更高效稳定的降解纤维素的酶成为研究纤维素降解的重要方向。

LPMO 是一类能通过氧化作用来降解生物

质多糖(纤维素、几丁质和淀粉等)的氧化酶,它通过单加氧的形式断裂生物质多糖之间的糖苷键从而产生氧化的糖链末端和非氧化还原糖链末端^[7-9]。它能直接作用于结晶生物质多糖,破坏难溶性多糖的结晶区产生较为疏松开放的底物结构,为之后的糖苷水解酶提供作用基础^[10],与多糖水解酶协同作用提高底物的降解效率。根据氨基酸序列同源性,LPMO 可以分为 AA9、AA10、AA11 和 AA13 家族^[11];根据作用底物的不同可分为降解纤维素的 LPMO、降解几丁质的 LPMO 和降解淀粉的 LPMO^[12];根据反应机理可以分为 C-1 氧化、C-4 氧化和 C-6 氧化的 LPMO^[13]。LPMO 氧化生物质多糖需要分子氧,电子供体酶(例如纤维二糖脱氢酶,CDH)或非酶(例如抗坏血酸、没食子酸,多酚类化合物)电子给体的参与^[14]。

虽然近几年科学家对 LPMO 展开了深入的研究,一些 LPMO 的活性被确定和少量的 LPMO 晶体结构被解析^[15-17],但仍存在一些难题需要解决,如已经发现的 LPMO 降解效率水平不一,反应中的电子传递机制有待阐明等。所以发现更多的 LPMO 并研究其反应机制与特性对实现生物质多糖的高效转化和缓解当今的能源危机具有重要意义。

嗜热毁丝霉菌是一种嗜高温的子囊真菌,其基因组在 2011 年已经测序完成^[18],对其转录学

收稿日期:2018-01-26

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31670803);中国科学院 STS 资助项目(KFJ-SW-STS-143);中国科学院青年创新促进会资助项目(2015144)。

第一作者简介:鞠酒(1993-),男,在读硕士,从事微生物和酶工程研究。E-mail:jujuan1993@126.com。

通讯作者:尹恒(1982-),男,博士,研究员,从事糖工程及糖生物学研究。E-mail:yinheng@dicp.ac.cn。

的研究显示该真菌在一定诱导条件下能分泌大量的多糖化合物降解酶系^[19],其中包括大量的LPMO。工业上纤维素的转化需经过糖化处理,提高反应温度能缩短糖化时间和减小反应器受污染几率,提高糖化效率^[18]。研究显示嗜热真菌的基因在异源宿主中表达的成熟酶通常保留其热稳定性特征^[20-21],据CAZy数据库中注释嗜热毁丝霉菌富含22个AA9家族基因(<http://www.cazy.org/e1842.html>),这为耐高温的LPMO的研究提供了丰富的酶源。本研究以嗜热毁丝霉菌MtLPMO9F为研究对象,对其进行生物信息学分析,构建了毕赤酵母表达菌株,为后续深入研究LPMO的功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

嗜热毁丝霉菌(*Thermothelomyces thermophila* ATCC 42464):美国菌种保藏中心(ATCC);大肠杆菌(*Escherichia coli* Top10)及表达载体pPICZαA:Novagen公司;毕赤酵母X-33(*Pichia pastoris* X-33):美国Invitrogen公司。Prime STAR HS DNA聚合酶、rTaq DNA聚合酶、逆转录试剂盒:宝生物工程有限公司;DNA分子质量标准BM 5000、5000+ Marker:北京博迈德科技发展有限公司;Xho I、Not I、Sac I限制性内切酶,T4 DNA连接酶及博莱霉素(ZeocinTM):美国Thermo Fisher公司;基因克隆及通用鉴定引物:北京六合华大基因科技股份有限公司;真菌总RNA提取试剂盒:生工生物工程有限公司;DNA凝胶回收纯化试剂盒以及质粒提取试剂盒:美国Axygen公司;培养基成分如蛋白胨、酵母提取物、葡萄糖和琼脂糖以及蛋白纯化试剂氯化钠等均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 培养基配方 低盐LB培养基:酵母提取物0.5%,胰蛋白胨1%,氯化钠0.5%,固体培养时加入2%琼脂,用于转化子筛选时加入0.025 g·L⁻¹的ZeocinTM。马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)固体培养基:马铃薯20%,葡萄糖2%,琼脂2%。酵母粉蛋白胨葡萄糖/ZeocinTM固体培养基(YPDZ):酵母提取物1%,胰蛋白胨2%,葡萄糖2%,ZeocinTM 0.1 g·L⁻¹,琼脂2%;酵母粉蛋白胨葡萄糖/ZeocinTM固体活化培养基(YPDSZ):酵母提取物1%,胰蛋白胨2%,

葡萄糖2%,山梨醇1 M, ZeocinTM 0.1 g·L⁻¹,琼脂2%。

1.2.2 总RNA的提取及第一链cDNA链的合成 将嗜热毁丝霉菌接种在PDA培养基上,45℃培养4 d后收集新鲜菌丝,使用RNA提取试剂盒提取总RNA,然后用逆转录试剂盒合成第一链cDNA。

1.2.3 嗜热毁丝霉菌多糖裂解单加氧酶基因MtPMO9F的克隆 根据嗜热毁丝霉菌MtPMO9F基因在NCBI登录的基因序列(登录号XP_003663657.1),同时保证得到含有天然N端的MtLPMO9F,设计去除了信号肽且C-末端融合了6×His-tag基因的一对引物,MtLPMO9F-F: 5'-GAC CTCGAGAAAAGACACTCCCACCTC GGGTACATC-3'; MtLPMO9F-R: 5'-CTTGCG-GCCGCCCGCGAAAGTTCTCCG-3' (下划线为酶切位点)。以嗜热毁丝霉菌第一链cDNA为模板,克隆MtPMO9F。PCR反应体系(50 μL): dd H₂O 32.5 μL, 5×buffer 10 μL, dNTP 4 μL, 引物终浓度为1.0 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹, Prime STAR HS DNA聚合酶0.5 μL, 模板cDNA 1 μL。PCR反应条件:98℃预变性2 min;98℃变性10 s, 60℃退火5 s, 72℃延伸1 min,共30个循环;72℃延伸5 min。PCR扩增产物经1%(w/v)琼脂糖凝胶电泳分离、DNA胶回收试剂盒进行胶纯化。

1.2.4 表达载体的构建、鉴定及转化 胶回收纯化的PCR产物经限制性内切酶Xho I和Not I在37℃双酶切消化16 h后,消化产物与经过限制性内切酶Xho I和Not I同样酶切消化处理的pPICZαA酵母表达载体在T4 DNA连接酶作用下22℃连接过夜,随后将连接产物转化E. coli Top10感受态细胞,在低盐LB/ZeocinTM平板上生长12 h后,挑取若干单菌落利用通用引物5'-AOX(GACTGGTTCCAATTGACAAGC)和3'-AOX(GCAAATGGCATTCTGACATCC)进行菌落PCR验证MtLPMO9F基因是否成功插入。经验证正确后挑取阳性克隆在低盐LB/ZeocinTM液体培养基中过夜培养,提取质粒后用限制性内切酶Xho I和Not I双酶切消化鉴定,鉴定符合预期的重组质粒送华大基因(北京)测序,采用Vector NTI软件分析测序结果。将测序正确的质粒命名为pPICZαA-MtLPMO9F。pPICZαA-MtLPMO9F经限制性内切酶Sac I线性化10 h,

随后电击转化毕赤酵母 X-33 感受态细胞,涂布在 YPDSZ 平板上,4 d 后长出转化子,提取转化子的基因组,采用通用引物 5'-AOX 和 3'-AOX 进行 PCR 鉴定,检测 pPICZ α A-MtLPMO9F 是否整合进转化子的毕赤酵母基因组中。

1.2.5 生物信息学分析 多糖裂解单加氧酶基因 MtLPMO9F 编码的氨基酸理化性质预测通过 ExPASyProtparam (<https://web.expasy.org/protparam/>)完成;疏水性/亲水性预测通过 ExPASyScale (<https://web.expasy.org/protscale/>)完成;其编码蛋白的信号肽在 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测完成;在 NCBI 网站对其结构域进行预测分析;在糖基化预测网站 NetNGlyc 1.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)和 NetOGlyc 4.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>)上分别预测该蛋白中存在的 N-糖基化位点和 O-糖基化位点;利用 NetPhos3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)预测其磷酸化位点;在蛋白序列分析平台 PSIPRED(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)上对其二级结构进行预测;在 NCBI 数据库中对 MtLPMO9F 的蛋白序列进行 Blast 检索;采用结构预测网站 SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)预测 MtLPMO9F 的晶体结构,并利用 ESPript 3.0 服务器(<http://esprpt.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi/>)将 MtLPMO9F 与另外 7 个晶体结构已知的 AA9 家族 LPMO 进行基于二级结构的序列比对^[22-23];通过 MEGA 7.0 软件进行系统进化的分析^[24]。

2 结果与分析

2.1 嗜热毁丝霉菌总 RNA 的提取

采用真菌总 RNA 试剂盒提取 RNA,成功提取到嗜热毁丝霉菌的总 RNA(图 1)。

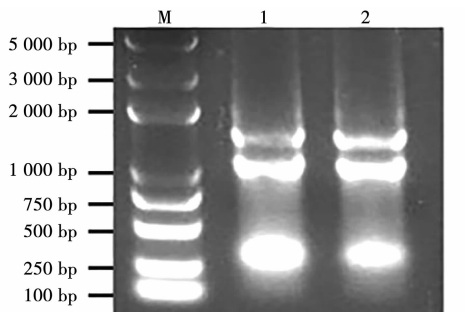
2.2 MtLPMO9F 基因的克隆

以嗜热毁丝霉菌 cDNA 为模板,通过 PCR 反应,扩增除去信号肽且 C-末端融合了 6×His-tag 的 MtLPMO9F 基因。扩增出一条为 1 000 bp 左右的条带(图 2),符合 MtLPMO9F 基因全长 1 017 bp 大小,将其切胶回收。

2.3 表达载体的构建

切胶回收的 MtLPMO9F 基因经限制性内切酶 Xho I 和 Not I 双酶切处理后与经过同样酶切

处理的 pPICZ α A 质粒在 T4 DNA 连接酶作用下连接后转入 *E. coli* Top10 感受态细胞,将转化的感受态细胞涂布在低盐 LB/ZeocinTM 平板上,12 h 后挑选若干转化子用 5'-AOX 和 3'-AOX 进行菌落 PCR 鉴定,选取正确的阳性转化子提取质粒用限制性内切酶 Xho I 和 Not I 双酶切消化,得到一条 1 000 bp 左右大小和 3 500 bp 左右大小的条带(图 3),这两条带分别与 MtLPMO9F 基因全长 1 017 bp 和 pPICZ α A 质粒全长 3 593 bp 相符,将酶切结果匹配的重组质粒送测序,测序结果匹配的重组质粒命名为 pPICZ α A-MtLPMO9F。



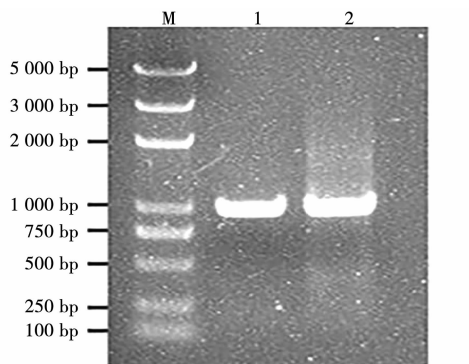
M:BM5 000 DNA marker; 1~2: 嗜热毁丝霉菌总 RNA。

M:BM5 000 DNA marker;

1~2: Total RNA of *Thermotheomyces thermophila*.

图 1 嗜热毁丝霉菌总 RNA 琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of the *Thermotheomyces thermophila* ATCC 42464 RNA



M:BM5 000 DNA marker; 1~2: MtLPMO9F PCR 产物。

M:BM5 000 DNA marker;

1~2: Amplification product of MtLPMO9F PCR.

图 2 多糖裂解单加氧酶基因 MtLPMO9F 扩增产物的电泳检测

Fig. 2 Agarose gel analysis of PCR amplification products of MtLPMO9F gene

2.4 表达载体 pPICZ α A-MtPMO9F 的转化及重组菌株 PCR 鉴定

测序正确的重组质粒 pPICZ α A-MtLPMO9F 经限制性内切酶 Sac I 线性化后,电转入毕赤酵母 X-33 中,空载体 pPICZ α A 作为对照电转化进

毕赤酵母 X-33,在 YPDSZ 平板上挑取单菌落,分别提取它们的基因组,以 5'-AOX 和 3'-AOX 为引物,进行重组子 PCR 鉴定,筛选阳性重组子;空酵母 X-33 在 2 200 bp 左右处出现一条泳带,空载体在 2 200 和 580 bp 左右处出现一条亮条带,阳性重组子在 2 200 和 1 600 bp 左右处各出现清晰单一的条带(图 4)。2 200 bp 处的条带为毕赤酵母基因组醇氧化酶基因启动子 AOX1 克隆产物,1 600 bp 处的条带为导入的 pPICZ α A-MtLPMO9F 重组质粒克隆产物,580 bp 处左右为导入的 pPICZ α A 质粒克隆产物,说明成功构建了重组毕赤酵母表达菌株。

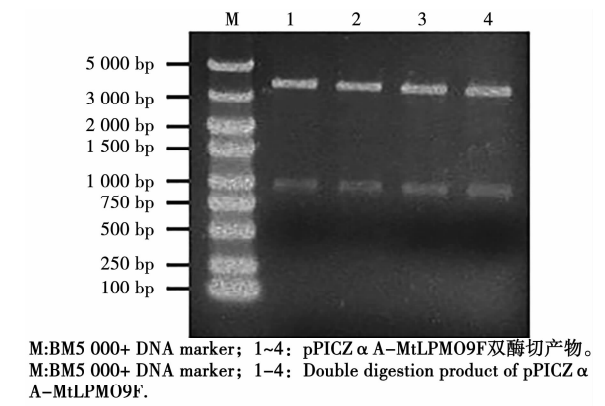


图 3 嗜热毁丝霉菌多糖裂解单加氧酶基因重组质粒 pPICZ α A-MtLPMO9F 双酶切鉴定

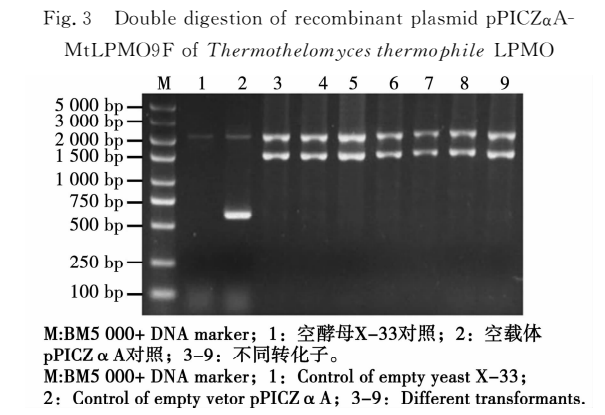


图 4 毕赤酵母转化子菌落 PCR 鉴定

2.5 嗜热毁丝霉菌多糖裂解单加氧酶 MtLPMO9F 基因的生物信息学分析

2.5.1 MtLPMO9F 基因及其编码氨基酸序列分析 对嗜热毁丝霉菌多糖裂解单加氧酶 MtLPMO9F 基因进行分析,基因全长 1 017 bp,其编码的多糖裂解单加氧酶 MtLPMO9F 由 338 个氨基酸组成,理论分子量为 35.19 kDa,等电点

为 5.13,分子式为 C₁₅₅₇H₂₃₉₈N₄₄₄O₄₇₇S₇,总平均亲水性为-0.196,不稳定指数为 49.19,预测为不稳定蛋白。在 NCBI 网站对其结构域进行预测分析表明,MtLPMO9F 只有 1 个 AA9 结构域。通过 SignalP 软件分析得知 MtLPMO9F 的信号肽切割位点位于 22 位的甘氨酸与 23 位的组氨酸之间。通过分析网站 NetNGlyc 1.0 Server 和 NetOGlyc 4.0 Server 对多糖裂解单加氧酶 MtLPMO9F 进行 N-糖基化和 O-糖基化位点预测,结果表明:该氨基酸序列在 68、192、265 和 293 位共存在 4 个潜在的 N-糖基化位点,分别在 55、165、170、173、279、285、295、296、302、307、309、310、312、316、320 和 324 位存在 16 个潜在的 O-糖基化位点。用 NetPhos 3.1 在线分析软件对其磷酸化位点进行预测,结果显示当阈值为 0.5 时,其氨基酸序列存在 37 个潜在的磷酸化位点(22 个丝氨酸位点、13 个苏氨酸位点和 2 个酪氨酸位点)。在分析平台 PSIPRED 上对其二级结构进行预测,结果显示 MtLPMO9F 以 α -螺旋、 β -折叠为主要结构元件,不规则盘绕和延伸链围绕蛋白散布于整个蛋白质中,并且存在两个潜在的二硫键结构。

2.5.2 不同真菌来源的 LPMO 的二级结构比对分析 在 SWISS-MODEL 服务器上对 MtLPMO9F 晶体结构进行预测,结果得到以 TaLPMO9A 为模板建立的晶体结构模型,Q-MEAN 值较高,说明预测结果可信。将预测的结构模型与另外 7 个晶体结构已解析的 LPMO 建立基于二级结构的序列比对。比对结果显示:MtLPMO9F 存在一个 AA9 家族保守的二硫键外,还有另一个二硫键(图 5 中 \triangle S-S 标注)存在,且该二硫键在 C-1/C-4 氧化的 LPMO 分支中有一定的保守性。这些 LPMO 均属于 AA9 家族,都存在 3 个高度保守的氨基酸(图 6 中 * 号标注的 2 个组氨酸和 1 个酪氨酸),这 3 个氨基酸构成的铜离子结合位点是该家族酶的活性位点^[25]。在 AA9 催化区段内,MtLPMO9F 存在明显不同于其它 7 个 LPMO 的片段(图 5 中灰色底色标注),TaLPMO9A 的结构模拟显示,这个片段(图 6 中 chain a 标注)在靠近铜离子催化位点(图 6 中 H1、H84、Y207 标注)的一侧向外延伸,这段序列造成的不同于其它 LPMO 结构的差异可能会影响 MtLPMO9A 的活性和对底物的结合能力。

2.5.3 不同真菌来源的 LPMO 的同源性比对及系统进化分析 根据 NCBI 数据库 Blast 检索结

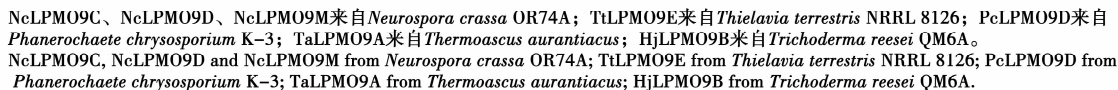


Fig. 5 The amino acid sequence comparison of MtLPMO9F and other LPMOs in AA9 family

A: TaLPMO9A结构模型;

B: 基于TaLPMO9A预测的MtlPMO9F结构模型。

A: The structural model of TaLPMO9A; B: The predicted model of MtlPMO9F.

图 6 MtLPMO9F 的预测模型与 TaLPMO9A 比较
Fig. 6 The comparison between the predicted model of MtLPMO9F and model of TaLPMO9A

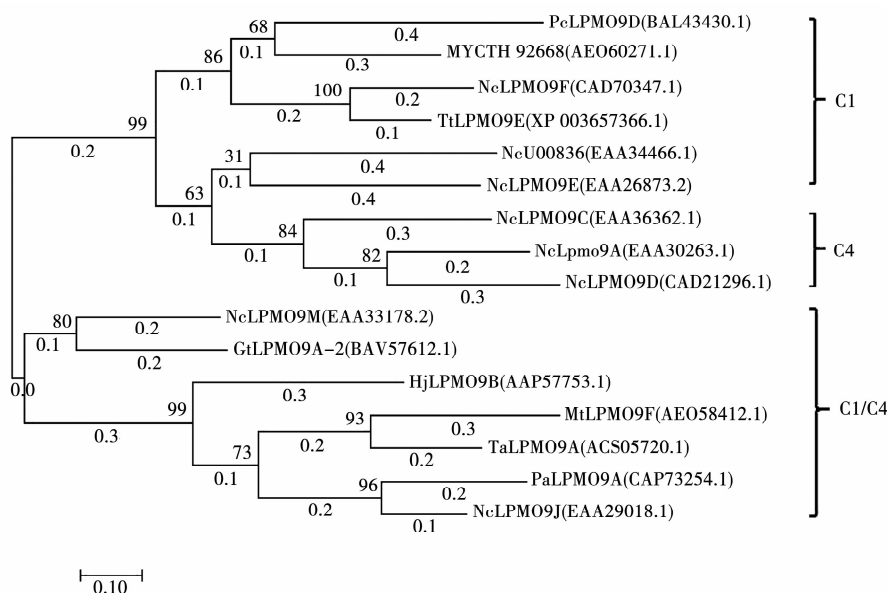


图 7 嗜热毁丝霉菌 MtLPMO9F 与其它真菌来源 LPMO 的系统进化树

Fig. 7 The phylogenetic tree analysis of MtLPMO9F from *Thermothelemyces thermophila* with other fungus

3 结论与讨论

通过分析 CAZY 数据库中 AA9 家族菌株信息,选择基因组已测序且 LPMO 基因丰富的嗜热毁丝霉菌作为研究对象。采用 RT-PCR 技术从嗜热毁丝霉菌中成功克隆到一个 LPMO 基因,利用基因工程技术将目标基因构建到表达载体 pPICZαA 上,成功构建了毕赤酵母真核表达菌株。生物信息学分析显示 MtLPMO9F 与同家族酶同源性较低,编码催化域的序列中具有不同于 AA9 家族 LPMO 的特殊片段,模型预测结果显示 MtLPMO9F 在结构上表现出特异性,具有一定的研究潜力。

生物质多糖的转化是实现能源可持续发展的重要方向,采用生物催化的方法对木质纤维素等多糖实现高效的降解转化需要研究和发掘更稳定高效的酶,利用 AA9 家族 LPMO 对木质纤维素结晶区的破坏作用在一定程度上能缓解木质纤维素的前处理带来的高昂经济成本,另一方面耐热的 LPMO 与纤维素水解酶在高温条件下协同作用可以提高纤维素的转化效率。嗜热毁丝霉菌富含丰富的 LPMO,研究每个 LPMO 的酶性质并比较它们之间的差异,对进一步阐明嗜热毁丝霉菌降解纤维素的机制和早日实现纤维素多糖的高效转化具有重要意义。

参考文献:

[1] 娄喜艳,丁锦平. 生物质能源发展现状及应用前景[J]. 中国

农业文摘-农业工程,2017(2):12-14.

- [2] 张景强,林鹿,孙勇,等. 纤维素结构与解结晶的研究进展[J]. 林产化学与工业,2008(6):109-114.
- [3] Klemanleyer K M, Siikaaho M, Teeri T T, et al. The cellulases endoglucanase i and cellobiohydrolase ii of trichoderma reesei act synergistically to solubilize native cotton cellulose but not to decrease its molecular size[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(8): 2883-2887.
- [4] Jorgensen H, Kristensen J B, Felby C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: Challenges and opportunities[J]. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2007, 1(2): 119-134.
- [5] Chylenski P, Forsberg Z, Stahlberg J, et al. Development of minimal enzyme cocktails for hydrolysis of sulfite-pulped lignocellulosic biomass[J]. Journal of Biotechnology, 2017, 246: 16-23.
- [6] Himmel M E, Ding S Y, JOHNSON D K, et al. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production[J]. Science, 2007, 315(5813): 804-807.
- [7] Dimarogona M, Topakas E, Christakopoulos P. Recalcitrant polysaccharide degradation by novel oxidative biocatalysts[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(19): 8455-8465.
- [8] Hu J, Arantes V, Pribovo A, et al. The synergistic action of accessory enzymes enhances the hydrolytic potential of a "cellulase mixture" but is highly substrate specific[J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6(1): 112.
- [9] Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Horn S J, et al. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides[J]. Science, 2010, 330(6001): 219-222.
- [10] Hemsworth-Glyn R, Davies-Gideon J, Walton P H. Recent insights into copper-containing lytic polysaccharide mono-

- oxygenases[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2013, 23(5): 660-668.
- [11] Horn S J, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose[J]. Biotechnol Biofuels, 2012, 5(1): 45.
- [12] Agger J W, Isaksen T, Varnai a, et al. Discovery of lpmo activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 2014, 111(17): 6287-6292.
- [13] Vu V V, Beeson W T, Phillips C M, et al. Determinants of regioselective hydroxylation in the fungal polysaccharide monooxygenases[J]. Journal of the American Chemical Society, 2014, 136(2): 562-5.
- [14] Kracher D, Scheiblbrandner S, Felice A K G, et al. Extracellular electron transfer systems fuel cellulose oxidative degradation[J]. Science, 2016, 352(6289): 1098-1101.
- [15] Johansen K S. Discovery and industrial applications of lytic polysaccharide mono-oxygenases[J]. Biochemical Society Transactions, 2016, 44(1): 143-149.
- [16] Span E A, Marletta M A. The framework of polysaccharide monooxygenase structure and chemistry[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2015, 35: 93-99.
- [17] Morgenstern I, Powlowski J, Tsang A. Fungal cellulose degradation by oxidative enzymes: From dysfunctional gh61 family to powerful lytic polysaccharide monooxygenase family[J]. Brief Funct Genomics, 2014, 13(6): 471-481.
- [18] Berka R M, Grigoriev I V, Otillar R, et al. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *myceliophthora thermophila* and *thielavia terrestris*[J]. Nature Biotechnology, 2011, 29(10): 922-927.
- [19] Kolbusz M A, Difalco M, Ishmael N, et al. Transcriptome and exoproteome analysis of utilization of plant-derived biomass by *myceliophthora thermophila*[J]. Fungal-genetics and biology, 2014, 72: 10-20.
- [20] Berka R M, Rey M W, Brown K M, et al. Molecular characterization and expression of a phytase gene from the thermophilic fungus *thermomyces lanuginosus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(11): 4423-4427.
- [21] Zhao J, Guo C, Tian C, et al. Heterologous expression and characterization of a gh3 beta-glucosidase from thermophilic fungi *myceliophthora thermophila* in *pichia pastoris*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 177(2): 511-527.
- [22] Borisova A S, Isaksen T, Dimarogona M, et al. Structural and functional characterization of a lytic polysaccharide monooxygenase with broad substrate specificity[J]. Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(38): 22955-22969.
- [23] Robert X, Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new endsript server[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(W1): W320-W324.
- [24] 张鑫, 赵勇, 谭海东, 等. 稻瘟病菌单加氧酶 lpmo m1 基因的克隆及生物信息学分析[J]. 中国酿造, 2015(11): 35-40.
- [25] Vaaje-Kolstad G, Forsberg Z, Loose J S, et al. Structural diversity of lytic polysaccharide monooxygenases[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2017, 44: 67-76.

Cloning of *MtLPMO9F* Gene from *Thermothelomyces thermophila* and Bioinformatic Analysis

JU Jiu^{1,2}, ZHANG Fu-yun¹, LI Qian^{1,2}, TAN Hai-dong², YIN Heng²

(1. College of Food Science and Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China; 2. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Key Laboratory of Carbohydrates in Liaoning Province, Dalian 116023, China)

Abstract: Lytic polysaccharide monooxygenases (LPMO), an oxidase, has been recently found to degrade crystalline polysaccharides- such as cellulose and chitin, which cleaves glycosidic bonds of polysaccharide substrates by oxidized reaction. In order to study the function and structural characteristics of the LPMO encoded by *MtLPMO9F*, the Cloning of *MtLPMO9F* gene from *Myceliophthora thermophila* and the construction of recombinant expression vector and *Pichia pastoris* expression strain were implemented by using genetic engineering. The results showed that the protein consisted of 338 amino acids, its theory molecule weight was predicted as 35.19 kDa, and the isoelectric point was 5.13. There were 4 potential N-glycosylation sites and 16 O-glycosylation sites in the LPMO. The phylogenetic analysis results showed that *MtLPMO9F* had a most closed phylogenetic relationship with *TaLPMO9A* from *Thermoascus aurantiacus*, and the highest sequence identity between *MtLPMO9F* and *TaLPMO9A* was 43%.

Keywords: cellulose; Lytic polysaccharide monooxygenases; *Thermothelomyces thermophila*; bioinformatic analysis