

反刍动物消化道微生物 CAZymes 基因资源的挖掘与功能分析

Mining and Functional Characterization of CAZymes Derived from Gastrointestinal Microbiota in Ruminants

王谦*, 王佳莹, 孙小宝, 曹佳雯

奶业科学研究所, 动物科学学院, 浙江大学, 杭州, 浙江

*通讯作者邮箱: emirate14@zju.edu.cn

摘要: 木质纤维素作为一种可再生的生物质资源具有极大的应用潜力。碳水化合物活性酶 (carbohydrate-active enzymes, CAZymes) 能有效解聚木质纤维素底物成为可利用的寡糖与单糖。研究基于宏转录组技术从反刍动物消化道微生物中筛选获得的碳水化合物活性酶序列, 克隆候选基因并在大肠杆菌中进行异源表达, 对重组酶进行分离纯化, 进一步表征其生化特性。

关键词: 反刍动物, 消化道微生物, 宏转录组, CAZyme, 功能分析

材料与试剂

1. 0.22 μ m 无菌针孔过滤器 (Sangon Biotech, catalog number: F513134-0001)
2. 高保真 DNA 聚合酶 (2 \times Phanta Max Master Mix, Vazyme, catalog number: P515-02)
3. DNA 聚合酶 (Taq Master Mix (Dye Plus), Vazyme, catalog number: P112-02)
4. DNA Marker (Fermentas, GeneRuler™ 100 by Plus DNA Ladder)
5. 蛋白 Marker (Fermentas, PageRuler™ Prestained Protein Ladder)
6. T4 DNA 连接酶 (TransGen Biotech, catalog number: FL101-01)
7. 限制性内切酶 *EcoRI* (TaKaRa, catalog number: 1040BH); *HindIII* (TaKaRa, catalog number: 1060B)
8. 质粒提取试剂盒 (Omega, Plasmid Mini Kit I (200) 200T)
9. PCR 产物纯化试剂盒 (Corning, Axygen, catalog number: AP-PCR-50)
10. 割胶回收试剂盒 (Corning, Axygen, catalog number: AP-GX-50)
11. 反转录试剂盒 (Toyobo, ReverTra Ace Kit)
12. 试剂: 酵母膏、胰蛋白胨、氨苄青霉素、卡那霉素、IPTG (BBI)

- 31 13. Ni-NTA agarose (Sangon Biotech, catalog number: C600033)
- 32 14. 40%丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺 (29:1) 溶液 (Sangon Biotech, catalog number:
- 33 B546012-0500)
- 34 15. EDTA-2H₂O (Sangon Biotech, catalog number: A500838-0500)
- 35 16. Tris (Sangon Biotech, catalog number: A610195-0500)
- 36 17. 冰醋酸 (国药, catalog number: 64-19-7)
- 37 18. 3,5-二硝基水杨酸 (3,5-Dinitrosalicylic acid, DNS) (Sangon Biotech, catalog
- 38 number: A500420-0100)
- 39 19. NaOH (国药, catalog number: 10019718)
- 40 20. 酒石酸钾钠 (Sangon Biotech, catalog number: A500881-0500)
- 41 21. NaCl (Sangon Biotech, catalog number: A501218-0001)
- 42 22. KCl (Sangon Biotech, catalog number: A100395-0500)
- 43 23. Na₂HPO₄ (Sangon Biotech, catalog number: A501727-0500)
- 44 24. KH₂PO₄ (Sangon Biotech, catalog number: A100781-0500)
- 45 25. SDS (Sangon Biotech, catalog number: A500228-0001)
- 46 26. 甘氨酸 (Sangon Biotech, catalog number: A610235-0005)
- 47 27. 过硫酸铵 (Sangon Biotech, catalog number: A500857-0100)
- 48 28. 溴酚蓝 (Sangon Biotech, catalog number: A500922-0025)
- 49 29. 甘油 (Sangon Biotech, catalog number: A100854-0500)
- 50 30. β-巯基乙醇 (Macklin, catalog number: M6230-25ml)
- 51 31. 甲醇 (国药, catalog number: 10014118)
- 52 32. 考马斯亮蓝 R-250 (Sangon Biotech, catalog number: A100472-0025)
- 53 33. LB (Luria-Bertani) (见溶液配方)
- 54 34. 0.5 mol/L EDTA (见溶液配方)
- 55 35. 50 × TAE 母液 (见溶液配方)
- 56 36. 100 mg/ml Kan (见溶液配方)
- 57 37. IPTG 储存液 (见溶液配方)
- 58 38. 3,5-二硝基水杨酸溶液 (见溶液配方)
- 59 39. PBS 缓冲液 (pH 7.4) (见溶液配方)
- 60 40. 1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8) (见溶液配方)

- 61 41. 1 mol/L Tris-HCl (pH 6.8) (见溶液配方)
- 62 42. 10% SDS (w/v) (见溶液配方)
- 63 43. 50%甘油 (v/v) (见溶液配方)
- 64 44. 5 × SDS-PAGE 缓冲液 (见溶液配方)
- 65 45. 10%过硫酸铵 AP (w/v) (见溶液配方)
- 66 46. 1%溴酚蓝 (w/v) (见溶液配方)
- 67 47. 5 × SDS 上样缓冲液 (见溶液配方)
- 68 48. R250 染色液 (见溶液配方)
- 69 49. SDS-PAGE 脱色液 (见溶液配方)
- 70 50. NaH₂PO₄ 母液 (500 mmol/L) (见溶液配方)
- 71 51. NaCl 母液 (3 mol/L) (见溶液配方)
- 72 52. 1 mol/L 咪唑 (见溶液配方)
- 73 53. Washing buffer 1 (含 20 mmol/L 咪唑) (见溶液配方)
- 74 54. Washing buffer 2 (含 50 mmol/L 咪唑) (见溶液配方)
- 75 55. Eluent buffer (含 50 mmol/L 咪唑) (见溶液配方)
- 76 56. 转膜缓冲液 (见溶液配方)
- 77 57. TBST (见溶液配方)
- 78 58. 封闭液 (见溶液配方)

79

80 仪器设备

- 81 1. 离心机 (Eppendorf, model: Centrifuge MiniSpin)
- 82 2. PCR 仪 (Eppendorf, model: Mastercycler Pros)
- 83 3. 电子分析天平 (梅特勒-托利多, model: EL204)
- 84 4. 微波炉 (格兰仕, model: D80D23NTP-7T)
- 85 5. 空气恒温摇床 (宁波科技园区新江南仪器有限公司, model: KYC-100B)
- 86 6. 生化培养箱 (宁波东南仪器有限公司, model: LRH-50)
- 87 7. 洁净工作台 (苏州市金净净化设备科技有限公司, model: JJ-CJ-ETD)
- 88 8. 水平脱色摇床 (苏州威尔实验用品有限公司, model: ZD-9560)
- 89 9. 凝胶成像系统 (Molecular imager, model: GeL.Dcode XR+)

10. 立式压力蒸汽灭菌器 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂, model: YXQ-75SII)

11. 超声波破碎仪 (浙江宁波/新芝, model: JY98-IIIDN)

软件和数据库

1. dbCAN HMMdb v9 (<http://bcb.unl.edu/dbCAN2/index.php>)

2. Carbohydrate-Active enZymes Database (<http://www.cazy.org>)

3. Pfam Database (<http://pfam.xfam.org/search#tabview=tab0>)

4. Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

5. Oligo 6.0

实验步骤

1. CAZymes 功能注释

将前期通过测序组装得到的 unigenes 基因, 通过在线软件 dbCAN HMMdb v9 (<http://bcb.unl.edu/dbCAN2/index.php>) 进行分析注释, 该分析网站是基于 CAZy 数据库 (version: 20200730), 根据 CAZy 数据库, CAZy 中一个家族通常包含多种酶, 从功能注释的结果中筛选出属于至少包含一种纤维素酶家族 (Glycoside Hydrolases, GHs—GH1、GH3、GH5 等; GlycosylTransferases, GTs: GT1, GT2, GT3 等; Polysaccharide Lyases, PLs—PL1, PL2, PL3 等; Carbohydrate Esterases, CEs—CE1, CE2, CE3 等; Auxiliary Activities, AAs—AA1, AA2, AA7 等) 的 unigenes。将所有预测 ORFs 的氨基酸序列与 Pfam 数据库 (version 4.0) (<http://pfam.xfam.org/search#tabview=tab0>) 在线比对, 分析结构域, 进一步预测其蛋白功能, 筛选出能够比对到纤维素酶家族功能域的序列作为后续研究对象 (王谦, 2020) (He *et al.* 2019)。

2. 克隆目的基因

2.1 引物的设计: 以步骤 1 中筛选出的基因为模板, 通过 Oligo 6.0 进行引物设计, 加上相应的酶切位点, 并送至 Sangon Biotech 进行合成。

2.2 cDNA 合成: 以消化道微生物总 RNA 为模板, 逆转录合成 cDNA, 反应体系与条件如下:

Random Primer (25 pmol/μl)	1 μl
总 RNA	~1 μg

加 RNase Free Water 至 12 μ l

65 °C 孵育 5 min 使 RNA 热变性，立即置于冰上。

第一步变性后的 RNA 溶液 12 μ l

5x RT Buffer 4 μ l

dNTP Mixture (各 10 mM) 2 μ l

RNase Inhibitor (10 U/ μ l) 1 μ l

ReverTra Ace 1 μ l

加 RNase Free Water 至 20 μ l

将反应液于 30°C 孵育 10 min；42 °C 孵育 20 min；99 °C 孵育 5 min；4 °C 孵育 5 min，然后瞬时离心得到 cDNA。

2.3 目的基因 PCR 扩增：以合成的 cDNA 为模板，利用自行设计的特异性引物 PCR 扩增目的基因，扩增体系如下：

2x Phanta Max Master Mix 25 μ l

Forward primer (10 mM) 2 μ l

Reverse primer (10 mM) 2 μ l

cDNA 模板 2 μ l

加 ddH₂O 至 50 μ l

涡旋振荡混匀，稍离心后放入 PCR 仪中。扩增条件如下：

Step	程序
1: 95 °C	预变性 3 min
2: 95 °C	变性 30 s
3: 65 °C	退火 15 s
4: 72 °C	延伸 30 s
Steps 2~4 循环 29 次	
5: 72 °C	继续延伸 5 min
6: 16 °C	保存

2.4 琼脂糖凝胶电泳检测：用 1.0%琼脂糖凝胶 (1 g 琼脂糖，溶于 100 ml 1 × TAE，再加入 3 μ l GoldViewer I 染料) 对目的基因进行检测。取 3 μ l PCR 产物加 0.5 μ l 6 × DNA 上样缓冲液，混匀取 3 μ l 上样；120 V，电流 400 mA，30 min；

观察图像。

2.5 目的条带回收纯化：参照 Marker 条带分子量，根据目的基因实际大小，在紫外发光仪上切取目的条带胶块，参照胶回收试剂盒说明书回收纯化目的基因片段。

3. 原核表达载体的构建

3.1 目的基因和载体双酶切：以 pET-30a(+)载体为例，酶切体系及条件如下：

目的基因片段/pET-30a(+)	1 µg
10 × buffer	5 µl
酶 1/酶 2	各 1 µl
加 ddH ₂ O 至	50 µl

混匀离心，37 °C，3 h。通过产物纯化试剂盒纯化基因片段，并通过割胶回收试剂盒回收载体片段（具体方法参照试剂盒说明书）。

3.2 双酶切目的基因和载体连接：连接反应体系如下：

目的片段	8 µl
载体	2 µl
5 × ligation buffer	3 µl
T4 DNA 连接酶(200 U/µl)	1 µl
加 ddH ₂ O 至	15 µl

混匀离心，24 °C 保温 2 h。

3.3 热激转化

- 1) 将上述的连接产物与 100 µl 大肠杆菌 BL21 感受态细胞混合，轻弹管壁，使样品混匀，冰浴 30 min；
- 2) 42 °C 下热激 60 s，立即冰浴 5 min；
- 3) 加入 500 µl 37 °C 预热的液体 LB，37 °C 下 150 rpm 培养复苏 1 h；
- 4) 6,000 rpm 离心 2 min，弃上清，剩余 100 µl LB 悬菌，将所有转化后的细菌液涂于含有 50 µg/ml Kan LB 平板上，在 37 °C 下培养 12~16 h 后，观察平板上的细菌密度。挑取单菌落进行培养，在 37 °C，200 rpm，12~16 h 后提取质粒，PCR 产物电泳后，若存在预期大小的 DNA 片段，并将该质粒送至 Sangon Biotech 进行测序验证，将测序拼接后结果通过 Clustal

Omega 在线软件进行序列比对 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), 测序验证成功的质粒为阳性质粒, 该菌株为阳性菌株。

4. 阳性菌株的诱导表达及蛋白纯化

4.1 种子液制备: 取阳性菌液在操作台中, 接种于 5 ml 含 50 µg/ml Kan 的 LB 中, 37 °C, 200 rpm 培养 12~16 h。

4.2 目的蛋白诱导表达: 取 2 ml 种子液接种至 200 ml LB 培养基, 37 °C 培养至 OD₆₀₀ = 0.5~1.0 (约 3~5 h)。加入 200 µl 1 mol/L 的 IPTG, 16 °C 100 rpm 诱导 16~20 h。诱导表达后, 6,000 × g, 4 °C, 离心 8 min 收集菌体, 用事先预冷的 1× PBS (pH 7.4) 重新悬浮菌体。超声波破碎 (开 3 s, 关 5 s, 工作时间 15 min), 4 °C, 10,000 × g, 离心 15 min, 取上清; 4 °C, 10,000 × g, 15 min, 重复离心一次, 所得上清即为粗酶液。

4.3 蛋白纯化

- 1) 取 50 ml 粗酶液, 加入 Ni-NTA 树脂填料 1 ml, 并加入咪唑使终浓度为 20 mmol/L, 于冰上 60 rpm 缓慢孵育, 使镍离子与目的蛋白的 6×His 标签充分结合。
- 2) 孵育 1~2 h 后, 于空层析柱纯化, 并收集滤液 (Flow-through, 记为 FT), 可将穿透液重复上柱 2~3 次。
- 3) 加 10~20 倍柱床体积的 Washing buffer 1 重复清洗填料并收集, 记为 W1。
- 4) 加 1 ml washing buffer 2, 收集清洗液, 记为 W2。
- 5) Washing buffer 2 洗涤后, 每次用 1 个柱床体积的 Elution buffer 约 1 ml 洗脱目的蛋白, 重复洗脱 4 次, 收集洗脱液, 记为 E1、E2、E3、E4 (加入 Elution buffer 时沿着管壁加, 防止将填料冲起)。
- 6) 加入 20%乙醇冲洗填料, 回收填料, 4 °C 保存。

5. SDS-PAGE 蛋白电泳

5.1 样品制备: 超声破碎后, 离心管于 10,000 × g, 4 °C, 离心 15 min 取 80 µl 粗酶液、沉淀、FT、W1、W2、E1、E2、E3、E4, 加 5 × 蛋白上样缓冲液, 混匀后煮沸 5 min, 冷却至室温, 10,000 × g, 室温离心 10 min, 备用。

5.2 制胶: SDS-PAGE 配方如下:

组成	12%分离胶 (ml)	4%浓缩胶 (ml)
ddH ₂ O	8.6	4.38
40% Acr-Bis	6.0	0.75
1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8)	5.0	
1.0 mol/L Tris-HCl (pH 6.8)		0.75
10% SDS	0.2	0.06
10% AP	0.2	0.06
TEMED	0.008	0.006
总计	20	6

5.3 电泳：90 V，20 min，待条带迁移至分离胶与浓缩胶分界处，再转换电压至120 V，电泳 1.5 h 左右。待溴酚蓝迁移至凝胶的底部大约 1 cm 时，电泳停止。

5.4 染色与脱色：将凝胶剥落到塑料盒中，倒入 R250 染料，使胶完全浸没于染料中。水平震荡摇床染色 30 min 左右，回收染料，并用 ddH₂O 洗去表面的染料，加脱色液脱色（脱色液没过凝胶表面），直至出现清晰条带。并通过标准蛋白质 Marker 计算蛋白分子量。

5.5 Western-blot

1) 以上述 SDS-PAGE 相同方式进行电泳，小心剥下凝胶置于转膜缓冲液中，并浸湿 NC 膜，以 (-) 极-三层滤纸-胶-NC 膜-三层滤纸 (+) 极的方式，于转膜缓冲液中，60 V 进行湿转，转膜时间为 60 min (具体的转膜时间要根据目的蛋白的大小而定，目的蛋白的分子量越大，需要的转膜时间越长，目的蛋白的分子量越小，需要的转膜时间越短。在转膜过程中，特别是高电流快速转膜时，通常会有非常严重的发热现象，最好把转膜槽放置在冰浴中进行转膜)。

2) 封闭：转膜完毕后，立即把蛋白膜放置到预先准备好的 TBST 中，漂洗 1-2 min，以洗去膜上的转膜液。吸尽洗涤液，加入 Western 封闭液，在摇床上缓慢摇动，室温封闭 60~120 min (对于一些背景较高的抗体，可以 4 °C 封闭过夜，从转膜完毕后所有的步骤，一定要注意膜的保湿，避免膜的干燥，否则极易产生较高的背景)。

3) 一抗孵育：参考一抗说明书，按照适当比例稀释一抗。吸尽封闭液，立即加入稀释好的一抗，室温或 4 °C 在侧摆摇床上缓慢摇动孵育一小时。如

- 果一抗孵育一小时效果不佳，可以 4 °C 缓慢摇动孵育过夜或根据抗体说明书选择适当的稀释倍数，回收一抗。加入 TBST，在侧摆摇床上缓慢摇动洗涤 5~10 min。吸尽洗涤液后，再加入洗涤液洗涤 5-10 分钟。共洗涤 3 次 (如果结果背景较高可以适当延长洗涤时间并增加洗涤次数)。
- 4) 二抗孵育：吸尽洗涤液，立即加入稀释好的二抗，室温或 4 °C 在侧摆摇床上缓慢摇动孵育一小时，回收二抗。加入 TBST，在侧摆摇床上缓慢摇动洗涤 5~10 min。吸尽洗涤液后，再加入洗涤液洗涤 5~10 min。共洗涤 3 次 (如果结果背景较高可以适当延长洗涤时间并增加洗涤次数)。
- 5) 蛋白检测：参考相关说明书，使用 ECL 试剂来检测蛋白。

6. 蛋白活性测定

注：具体不同的蛋白其活性测定方法不同，这里以纤维素酶为例。

吸取 60 µl 1%羧甲基纤维素钠底物加入 1.5 ml 离心管中，37 °C 预热 5 min 后，加入 15 µl 稀释到合适浓度的酶液，混匀后 37 °C 反应 10 min，立即加入 75 µl DNS 混匀，100 °C 煮沸 15 min。冷却至室温后测定 OD₅₄₀ 值。(Miller, 1959)

溶液配方

1. LB (Luria-Bertani)

酵母膏 (Yeast extract) 5 g

胰蛋白胨 (tryptone) 10 g

NaCl 10 g

加 ddH₂O 定容 1,000 ml，分装，121 °C，20 min，4 °C 放置

LB 固体加入 2.0%的琼脂

2. 0.5 mol/L EDTA

取 1.861 g EDTA·2H₂O 加入 8.0 ml ddH₂O，用 NaOH 调 pH 值到 8.0，定容至 10 ml

3. 50× TAE 母液

Tris 242 g，冰醋酸 57.1 ml，0.05 mol/L EDTA (pH 8.0) 100 ml，加 ddH₂O 至 1,000 ml，1×为使用液

4. 100 mg/ml Kan

配制终浓度为 100 mg/ml，0.22 µm 无菌针孔滤膜过滤除菌，-20 °C 备用

- 227 5. IPTG 储存液
- 228 将 IPTG 溶于灭菌 ddH₂O, 配制成 1 mol/L, 0.22
- 229 μm 无菌针孔滤膜过滤, -20 °C 存放备用
- 230 6. 3,5-二硝基水杨酸溶液
- 231 50.0 g 3,5-二硝基水杨酸, 加入 400 ml ddH₂O 中, 缓慢加入 80 g NaOH, 加入 150
- 232 g 酒石酸钾钠, 45 °C 溶解, 冷却后定容至 5,000 ml, 室温避光保存
- 233 7. PBS 缓冲液 (pH 7.4)
- 234 8.0 g NaCl
- 235 0.2 g KCl
- 236 1.42 g Na₂HPO₄
- 237 0.27 g KH₂PO₄
- 238 加 800 ml ddH₂O 溶解, 调 pH 至 7.4, 定容至 1,000 ml, 灭菌后室温保存
- 239 8. 1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8)
- 240 称取 24.2 g Tris, 加 50 ml ddH₂O, 盐酸调 pH 至 pH 8.8, 加 ddH₂O 至 100
- 241 ml, 4 °C 保存
- 242 9. 1 mol/L Tris-HCl (pH 6.8)
- 243 称取 12.1 g Tris, 加 50 ml ddH₂O, 盐酸调 pH 至 pH 6.8, 加 ddH₂O 至 100
- 244 ml, 4 °C 保存
- 245 10. 10% SDS (w/v)
- 246 称取 10 g SDS, 加 ddH₂O 至 100 ml
- 247 11. 50%甘油 (v/v)
- 248 50 ml 甘油, 加 ddH₂O 50 ml
- 249 12. 5× SDS-PAGE 缓冲液
- 250 15.1 g Tris
- 251 94 g 甘氨酸
- 252 5 g SDS
- 253 加 ddH₂O 定容至 1,000 ml, 在室温下长期保存, 稀释到 1×作为工作液使用
- 254 13. 10%过硫酸铵 AP (w/v)
- 255 称取 0.1 g 过硫酸铵, 加 1 ml ddH₂O, 新鲜配制
- 256 14. 1%溴酚蓝 (w/v)

- 257 称取 100 mg 溴酚蓝溶于 10 ml ddH₂O 中，过滤
- 258 15. 5× SDS 上样缓冲液
- 259 0.6 ml 1 mol/L 的 Tris-HCl (pH 6.8)
- 260 5 ml 50%甘油
- 261 2 ml 10% SDS
- 262 0.5 ml β-巯基乙醇
- 263 1 ml 1%溴酚蓝
- 264 0.9 ml ddH₂O
- 265 4 °C 放置
- 266 16. R250 染色液
- 267 ddH₂O 400 ml 与冰乙酸 100 ml，甲醇 500 ml，0.25 g 考马斯亮蓝，过滤
- 268 17. SDS-PAGE 脱色液
- 269 冰乙酸 100 ml，甲醇 100 ml，用 ddH₂O 定容至 1,000 ml
- 270 18. NaH₂PO₄ 母液 (500 mmol/L)
- 271 称取 78 g NaH₂P₀₄·2H₂O 溶于 800 ml ddH₂O，定容至 1,000 ml
- 272 19. NaCl 母液 (3 mol/L)
- 273 称取 174 g NaCl 溶于 800 ml ddH₂O，定容至 1,000 ml
- 274 20. 1 mol/L 咪唑
- 275 称取 68 g 咪唑溶于 800 ml ddH₂O，定容至 1,000 ml
- 276 21. Washing buffer 1 (含 20 mmol/L 咪唑)
- 277 NaH₂PO₄ 母液 4 ml
- 278 NaCl 母液 4 ml
- 279 1 mol/L 咪唑 800 μl
- 280 NaOH 调 pH 至 8.0，用 ddH₂O 定容至 40 ml
- 281 22. Washing buffer 2 (含 50 mmol/L 咪唑)
- 282 NaH₂PO₄ 母液 4 ml
- 283 NaCl 母液 4 ml
- 284 1 mol/L 咪唑 2 ml
- 285 NaOH 调 pH 至 8.0，用 ddH₂O 定容至 40 ml

23. Eluent buffer (含 50 mmol/L 咪唑)

NaH₂PO₄ 母液 4 ml

NaCl 母液 4 ml

1 mol/L 咪唑 2 ml

NaOH 调 pH 至 8.0, 用 ddH₂O 定容至 40 ml

24. 转膜缓冲液

称取甘氨酸 2.9 g

Tris 5.8 g

SDS 0.37 g

溶于 500 ml ddH₂O, 加入 200 ml 甲醇, 定容至 1,000 ml 室温储存

25. TBST

称取 8.8 g NaCl, 溶于 800 ml ddH₂O, 加入 20 ml 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)

和 0.5 ml Tween-20, 定容至 1,000 ml, 4 °C 储存

26. 封闭液

称取 2.5 g 脱脂奶粉溶于 50 ml TBST, 现配现用

致谢

国家重点研发计划重点专项子课题“农副产品利用与饲料资源开发技术集成与应用”(2018YFD0501903)。

参考文献

- 王谦. (2012). [木聚糖酶基因的体外定向进化及其高拷贝重组酵母的构建](#). 杭州, 浙江大学博士论文.
- He, B., Jin, S., Cao, J. W., Mi, L. and Wang, J. K. (2019). [Metatranscriptomics of the Hu sheep rumen microbiome reveals novel cellulases](#). *Biotechnol Biofuels* 12: 153.
- Miller, G. L. (1959). [Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar](#). *Anal Biochem* 31(3): 426-428.