

短小芽孢杆菌葡聚糖内切酶基因的克隆及序列测定*

杨智源 陈荣忠 杨 丰 徐 洵**

(国家海洋局第三海洋研究所 厦门 361005)

摘 要 :从台湾海峡潮间带的红树林土壤中分离到一株产纤维素酶的短小芽孢杆菌 S-27,该菌只产生葡聚糖内切酶。对该酶的研究显示其作用最适温度为 55℃,最适 pH 为 5~7,在 pH9 的条件下仍具有 79.0% 的活力。用 pBluescript II 为载体, *E. coli* DH10B 为受体,克隆到该酶的基因,并对其进行测序。测序结果显示其全长为 1980bp,推测其含 660 个氨基酸。比较 GenBank 中的已知葡聚糖内切酶,发现该酶的氨基酸序列与嗜纤维杆菌(*Clostridium cel-lulovorans*) 的 EngC 及 *Bacillus* sp. KSM-522 的 EG-IV 同源性极高。

关键词 :短小芽孢杆菌 S-27 菌株,葡聚糖内切酶,基因克隆

中图分类号 :Q87 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2001)01-0076-06

生物转化纤维素物质成为有用产物一直是纤维素酶研究的主要动力,但由于纤维素底物的高度复杂性等原因,纤维素的生物转化与利用与实际应用一直有相当的距离。随着分子生物学的发展及生物工程技术的兴起,纤维素酶的应用又出现了新的转机。

近年来,纤维素酶的一个新的应用领域是成功地应用于洗涤剂工业,它改变了传统的去污机理,被认为是洗涤剂工业上的一次革命^[1]。洗涤剂中添加的纤维素酶能使棉纤维的非结晶区结构膨松,使被封闭在纤维间隙的污垢易被洗出,从而提高了洗涤效果。由于洗涤剂的水溶液为碱性,因此适用于洗涤剂添加剂的纤维素酶必须在碱性条件下有较高活性。本文报道对一株来源于海洋潮间带的短小芽孢杆菌所产纤维素内切酶的研究及其基因的克隆。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*) S-27 为本实验室自台湾海峡潮间带红树林土壤中分离。

1.1.2 分离平板培养基 :羧甲基纤维素钠(CMC-Na)20g,蛋白胨 2.5g,酵母膏 0.5g, KH₂PO₄1.5g, Na₂HPO₄2.5g, pH8.0,定容到 1L。

1.1.3 发酵培养基 :CMC-Na5g, NH₄NO₃1g, KCl 0.5g, 酪蛋白 3g, 酵母膏 1g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, 1% MnCl₂·4H₂O 0.2mL, 10mg/mL CaCl₂ 1mL, 1/15mol/L 磷酸盐缓冲液

* 国家海洋局海洋生物工程重点实验室开放基金项目(HY9803)

** 通讯联系人

作者简介 杨智源(1968-)男,福建省福州市人,国家海洋局第三海洋研究所攻读博士,1999年赴美柏克利大学研修,主要从事微生物分子生物学研究。

收稿日期:1999-05-08,修回日期:1999-08-02 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

(pH6.8)100mL 蒸馏水定容至 1L。

1.2 方法

1.2.1 粗酶制备 S-27 接种发酵培养基 37℃ 200r/min 培养 48h,将培养物于 4℃、10000 ×g 离心 30min,取上清液,加硫酸铵至 90% 饱和度,−4℃ 冰箱过夜。离心取沉淀,加 10mmol/L 醋酸盐缓冲液 (pH5.0) 溶解,对 10mmol/L 醋酸盐缓冲液 (pH5.0) 透析过夜,得粗酶液。

1.2.2 纤维素酶活力测定 酶活力测定按文献 [2] 中羧甲基纤维素酶 (CMCase) 活力测定法进行。酶活力单位定义为每分钟催化底物产生 1 μ mol 葡萄糖为一个活性单位。

1.2.3 染色体 DNA 的提取与纯化 参考 Sumitomo 等人的方法 [3] 进行。

1.2.4 质粒 DNA 的提取与纯化、DNA 的酶切、连接和琼脂糖凝胶电泳 等均按文献 [4] 进行。

1.2.5 重组质粒的构建和转化 S-27 菌株染色体 DNA 经 *Sau*3AI 部分酶切后,从琼脂糖凝胶电泳上分离适当大小的片段,载体质粒 pBluescript II 经 *Bam*HI 酶切后去磷酸化,二者按 1:3 的比例混合,T4DNA 连接酶 16℃ 连接过夜,连接产物经乙醇沉淀、纯水溶解后电转化受体菌 DH10B,涂布生长于分离平板培养基 (100 μ g/mL Amp) 上。

1.2.6 产生内切纤维素酶的重组子的检测 参照 Teather 等人的刚果红染色法 [5] 进行,将重组子生长的平板影印至另一新鲜分离平板上,37℃ 培养过夜,0.1% 刚果红溶液染色母板 15min,弃染液后用 1mol/L NaCl 溶液洗涤平板 15min,纤维素酶的活性可凭借清晰透明圈的出现来判定,在相应位置从子板挑出阳性克隆。

2 结果

2.1 S-27 菌株所产生 CMCase 的酶学特征

2.1.1 温度对酶活力的影响 将 0.5mL 粗酶液与 0.5mL 含 1.0% CMC-Na 的醋酸盐缓冲液 (0.1mol/L pH5.0) 混合,于不同温度下测定酶活力,结果显示 (图 1) 酶作用的最适温度为 55℃。

2.1.2 温度对酶稳定性的影响 把 0.5mL 粗酶液分别在不同温度下保温 60min,再与 0.5mL 含 1.0% CMC-Na 醋酸盐缓冲液 (0.1mol/L pH5.0) 混合,于 55℃ 反应 30min,测定残余酶活。结果显示 (图 1),分别于 30℃、40℃、50℃ 保温 60min 后,残余酶活分别为 82.8%、79.7% 和 25.5%。

2.1.3 pH 对酶活力的影响 将 0.5mL 粗酶液与 0.5mL 含 1.0% CMC-Na 的一系列不同 pH 的缓冲液混合,55℃ 反应 30min,测定酶活力。结果显示 (图 2) 酶作用的最适 pH 范围在 pH5.0~7.0,在 pH9.0 时,该酶仍有 79.0% 的活性。

2.1.4 pH 对酶稳定性的影响 将 0.5mL 粗酶液与 0.25mL 不同 pH 的缓冲液混合,在 4℃ 放置 60min,加入 0.25mL 含 2.0% CMC-Na 的醋酸盐缓冲液 (0.2mol/L pH5.0),55℃

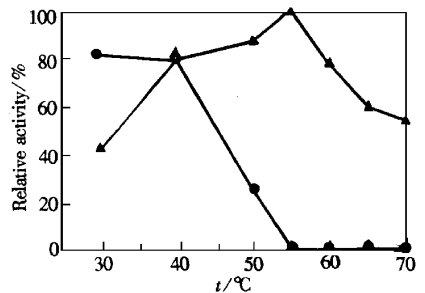
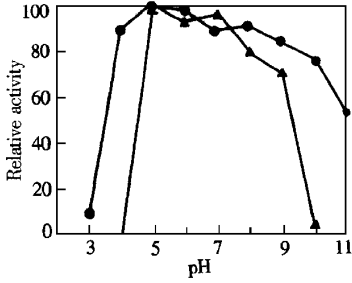


图 1 温度对酶活力(▲)及稳定性(●)的影响

Fig.1 Effect of temperature on the enzyme activity (▲) and the stability of enzyme (●)



反应 30min, 测定残余酶活。图 2 显示, 该酶在 pH4.0~8.0 之间较稳定, 在 pH11.0 下放置 60min, 仍有 52.7% 的活性。

2.2 短小芽孢杆菌 S-27 菌株的 CMCCase 基因克隆

用限制性内切酶 *Sau*3AI 部分消化短小芽孢杆菌 S-27 菌株的染色体, 回收大于 4kb 的酶切片段, 与经 *Bam*HI 酶切的 pBluescript II 质粒载体连接, 连接产物电转化至 *E. coli*DH10B 中, 采用刚果红染色法从近一万个转化子中检测出 3 株具有 CMCCase 活性的阳性克隆, 其中 K5 阳性克隆子的纤维素酶 (CMCCase) 活性能经多次传代后稳定遗传。从 K5 阳性克隆细胞中抽提得到重组质粒, 命名为 pBluescript-CMCCase (简称 pBC)。

图 2 pH 对酶活力(▲)及稳定性(●)的影响

Fig. 2 Effect of pH on the enzyme activity (▲) and the stability of enzyme (●)

重组质粒经 *Xba*I, *Pst*I, *Sac*I 和 *Eco*R I 等内切酶酶切后电泳显示, 其含有 44kb 的外源 DNA 片段, 根据限制性酶切分析结果, 含 CMCCase 基因片段的限制性内切酶图谱及酶切位置示意图如图 3、4 所示。

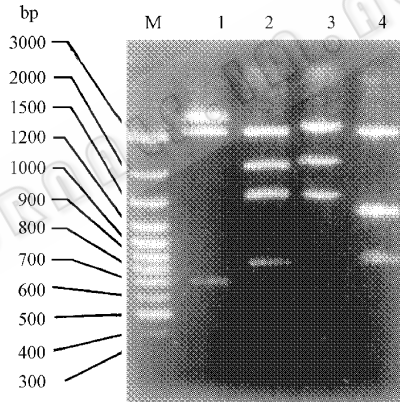


图 3 pBC 酶切鉴定图谱

Fig. 3 Restriction analysis of pBC

M: 100bp Ladder marker; 1: pBC digested by *Pst*I and *Xba*I; 2: Digested by *Eco*R I and *Xba*I; 3: Digested by *Hind*III; 4: Digested by *Hind*III, *Eco*R I and *Xba*I.

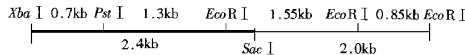


图 4 含 CMCCase 基因片段的限制性内切酶图谱

Fig. 4 Restriction map of the fragment containing the CMCCase gene

The thick line indicates the subcloned fragment containing *Sac*I-*Xba*I 2.4kb fragment.

2.3 亚克隆

根据含 CMC_{ase} 基因片段的限制性内切酶图谱,用相应的内切酶将该片段 DNA 的两端逐步分别切除,与载体重新连接,得到重组质粒,命名为 pBC-XS,再转化受体菌 *E. coli* DH10B。亚克隆显示,携带有外源 DNA *Xba* I -*Sac* I 2.4kb 片段的亚克隆具有稳定的 CMC_{ase} 活性,而切除了 *Pst* I -*Xba* I 0.7kb 的亚克隆则无 CMC_{ase} 活性。

2.4 测序及序列分析

利用 pBluescript II 载体上的测序引物对 *Sac* I 2.4kb 片段进行测序,测得序列长 2363bp(图 5)

```

1  GATCATTTTGGGTACAGTCACATGAAGAATCAGGAAAAACCCCTCGGTGAGCGTCAAGCTGATGGCTGTTACTATGCACATTTTGAACACGGCTGATCTTTTCAACACTGTACAA
1  M H I F E T R L I L F N T V Q
120 AACACGAACCGAATGACAAGGAGGTGGTCATTTCTGTTCAATGTTCCAGCTTTAAGAAAAAAGAGGGGTGAGAAGTAGGTACATGTCAGATTACAACATATGTAGAGGTGCTCAAAA
16 N T N G M T R R W S F L V Q C F T F K K K E G V R S R Y M S D Y N Y V E V L Q K
240 TCCATTTTGTTTACGAAGCCAGGGTCCGAAAAGCTTCCTGAAAGCA/TCGTCTTAAGTGGCGAGGGGATTCGGACTAGAGGATGGGAAGATGTTGGTCATGATTAAACAGCGCGC
56 S I L F Y E A Q R S G K L P E S N R L N W R G D S G L E D G K D V G H D L T G G
360 TGGTAGGATGCTGGTGATCATGTGAAGTTCGGACTCCGACTGGCCTACT( GGCAGCCGCTGCTGCGATGGACAGCTA/TAGTACCGGAGAAGCTTACGAAGCGCAGAGCTGCTTGATGAT
96 W Y D A G D H V K F G L P M A Y S A A V L A W T V Y E Y R E A Y E E A E L L D D
480 ATGTTAGATCAATCAAGTGGGCAACCGATATTTTGAAGAGCCGATA: AGGTCCAAATGAATTTTGGGCACAAGTAGCCGATGGGAACCGGGATCATGCTGGTGGGTCCAGCAGAA
136 M L D Q I K W A T D Y F L K A H T G P N E F W A Q V G D G N A D H G W W G P A E
600 GTGATCCGATGAACCGCCAGCATTAAAAATGATGAACATTTGCCAG/ AACAGAAGTAGCCCGCCAAAGTGCAGCCGCTTATAGCAGCAGGTTCAATATTTTAAAGAAAACAGACGGC
176 V M P M N R P A F K I D E H C P G T E V A A Q T A A A L A A G S I I F K E T D A
720 CCATATGACGCAAACTTCTCACCATGCAAAAACAGCTTTATGCAATTTG: TGACCAATATGGCGGTGAGTATACAGATTGTTGACCAATGCTCAGCCATTTTATAATCTCGGATGGC
216 P Y A A K L L T H A K Q L Y A F A D Q Y R G E Y T D C V T N A Q P F Y N S W S G
840 TATATGATGAGCTCATTGGGGTGGAAATAGGCTCTACTTGGCGACAATGACCAGACTATTTAAACAAAGCCATAAAGACACTAGAGAAGATCGCCAGGATGGGACTATACGTTT
256 Y I D E L I W G G I W L Y L A T N D Q T Y L N K A L K A V E E W P K D W D Y T F
960 ACGATGCTGGGCAACCTTTTTTGTCTCGCAAAATTTACTTGGCA/ AATCACAAGGAGAAAAGTTTATCGAATCGACGGAGCTAATCTCGATTACTGGTCGACGGGTTTGT
296 T M S W D N T F F A S Q I L L A R I T K E K R F I E S T E R N L D Y W S T G F V
1080 CAAATGAAAAGTAGAAGAATCACTTATACGCTGGCGGACTAGCT( GTTAGATCAATGGGGTCACTTCCTTATACAGCAAAATGCTGCATTTTTAGCCGTTTGTGACGAGATGG
336 Q N G K V E R I T Y T P G G L A W L D Q W G S L R Y T A N A A F L A F V Y A D W
1200 GTCCTGATCAAGAAAAAAGATCGATACCAACGTTTGGCATGAGC/ AACACACTATATGTTAGGCGAATAATCGCAAAATAGAAGCTATGTCGTTGGCTTTGGCAAAAATCCGCGC
376 V S D Q E K K N R Y Q T F A I R Q T H Y M L G D N P Q N R S Y V V G F G K N P P
1320 ATGCATCCACACCATCGAAGTCCGACATGGCTCATGGTCTAATCAGTCA/ AACCTCTTCTTCATCGGCACACCGCTTATGAGGCGCTTGTGGCGGCCCTAATGCAGAGGATCAGTAT
416 M H P H H R T A H G S W S N Q L T T P S S H R H T L Y G A L V G G P N A Q D Q Y
1440 ACCGATGACATCTCTGACTATGTATCAACGAGGTAGCAACAGACTATA/TGCCGCTTACTGGAATATGAGCAAAAATGTTACAGCTGTTTGGTCAGGGGCGTCAAAACTGCCGAAT
456 T D D I S D Y V S N E V A T D Y N A A P T G N V A K M V Q L F G Q G Q S K L P N
1560 TTTCCGCTAAGAAAAAGTGAAGATGAGTTTTTTGTAGAGGCGAGT( CATGAGTAAACATACAACACTACTCAGATCAAAAGCATTCTATAACAATCGATCAGGCTGGCCGGCCAGA
496 F P P K E K V E D E F F V E A A V M S N D T T S T Q I K A I L Y N R S G W P A R
1680 AGTAGTCAATCACTTTCTTAGATATTAATGTCAGTCTGAGCGAGATA/TTCGCAAGGGATCAGTGAATAAAGATTAACAAGTCTGCTACAATGAAGCGCTTCTYATCTCCG
536 S S S L S F R Y Y L N S E I F A K G F T D K D I Q V T A V Y N E G A C C L S P
1800 TTAACGGTGTATGACGCTCATCCCATCTATATTTTACAGAAATCGATT/ TACTGGGCTAGCTATTTTTCAGGAGGGCAATCGCTTCATAGAAGAAATACAGTTCGGGTATCTCGG
576 L T V Y D A S S H I Y F T E I D F T G V A I F P G G E S L H K K E I Q F R L S A
1920 CCAATGGTGGCAATATATGGGATGCTCAATGATTATCTCTTCAAGATT/ AACATCCAATATGCAAAAACAGCGAGAATTCCTGTTTTGATCAAGTGATTAGTATTTGCTAGC
616 P N G A N I W D A S N D Y S F Q G L T S N M Q K T A R I P V F D Q G D L V P G T
2040 CTTCCGAATAAATAAAGGGTGAGGACATGACAAAATAAGAACGGT/ TTAACACTTATCATCAATGAAAACGATGCGAATGGATATTTTCAAAGAAAGCAATCCGATAC
656 L P N K *
2160 ATTCCGTTGAAACACTCATTGTGAGGCACCTGATTACGGGCATATGACA/ CTGAGAAGCTTACAGCTATGGTTATGGCTGAAGCATTGATGGTCACTACACAGCGCATGGAGCA
2280 AACTAGAAGCGGCTCGGATAATATGGAGAAGTTTATCATTCCAGTAA/ CAGAATGGACATGACGAACGCCGATATGAGCT

```

图 5 短小芽孢杆菌 S-27 菌株的 CMC_{ase} 基因核苷酸全序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 5 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Bacillus pumilus* CMC_{ase} gene

序列分析显示, *Sac* I -*Xba* I 2.4kb 片段上仅含有一个开放阅读框, 位于第 75 位至 2054 位核苷酸之间, 长 1980bp, 该阅读框编码 660 个氨基酸, 推测其分子量为 74.8kD, 等电点为 5.31。与 GenBank 中的已知氨基酸序列比较发现, 该 CMC_{Case} 氨基酸序列与 *Clostridium cellulovorans* 中的纤维素内切酶基因 EngC^[6] 及 *Bacillus* sp. KSM-522 的纤维素内切酶基因 EG-IV^[7] 极为相似, 同属纤维素酶 E2 族, EngC 编码 554 个氨基酸, 而 EG-IV 编码 636 个氨基酸。三种酶的氨基酸序列的主要不同在于 CMC_{Case} 的第 479 至 489 位的氨基酸及 EngC 的 C 末端 (图 6)。

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
S-27. AMI	MHIFETRLIL	FNTVQNTNGM	TRRWSFLVQC	FTFKKKEGVR	SRYSMDYNYV	EVLQKSLIFY	EAQRSGKLPE	SNRLNWRGDS	GLEDGKDVGH
ENG. C. AMI	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
EG-IV. AMI	-----*	-----*	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	100	110	120	130	140	150	160	170	180
S-27. AMI	DLTGGWVDAG	DHWKFLPMA	YSAAVLAWTV	YEYREAYEEA	ELDDMLDQI	KWATDYFLKA	HTGPNFEWAQ	VGDCNADHW	WGPAEVMFPM
ENG. C. AMI	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
EG-IV. AMI	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	190	200	210	220	230	240	250	260	270
S-27. AMI	RPAFKLDEHC	PGTEVAAQTA	AALAAGSLIF	KETDAPYAAK	LLTHAKQLYA	FADQYRGEYT	DCVTNAQPHY	NSWSGYIDEL	IWGGIWLVLA
ENG. C. AMI	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
EG-IV. AMI	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	280	290	300	310	320	330	340	350	360
S-27. AMI	TNDQTYLNKA	LKAVEEWPDK	WDYFTMSWD	NTFFASQILL	ARITKEKRFI	ESTERNLDYW	STGFVQNGKV	ERITYTPGGL	AWLDQWGSRL
ENG. C. AMI	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
EG-IV. AMI	*****	*****	*****	****_*****	*****	*****	*****	*****	*****
	370	380	390	400	410	420	430	440	450
S-27. AMI	YTANAALFLAF	VYADVVDQEQ	KKNRYQTFAI	RQTHYMLGDN	PQNRSYVVG	GKNPPMHPHH	RTAHGSWSNQ	LTTPSSSRHT	LYGALVGGPN
ENG. C. AMI	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****P*****
EG-IV. AMI	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****P*****
	460	470	480	490	500	510	520	530	540
S-27. AMI	AQDQYTDNIS	DYVSNEVATD	YNAAFTGNVA	KMVQLFGQGG	SKLPNFPKPE	KVEDEFVVEA	AVMSNDTST	QIKAILYNRS	GWPARSSQSL
ENG. C. AMI	R*****	*****	*****G*	*****AVWS*	*****	*****	*****	*****	*****
EG-IV. AMI	R*****	*****	*****G*	----AVWS*	*****	*****	*****	*****	*****
	550	560	570	580	590	600	610	620	630
S-27. AMI	SPRYYNLSE	IFAKGFTDKD	IQTVAVYNEG	ASLSPLTYVD	ASSHIYFTEI	DFTGVALFPG	GESLHKKEIQ	FRLSAPNGAN	IWDASNDYSF
ENG. C. AMI	*****	*****	***CE*IH...	*****	*****	*****	*****	*****	*****
EG-IV. AMI	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	640	650	660						
S-27. AMI	QGLTSMQKT	ARIPVFDQGD	LVFGTLPNK*						
ENG. C. AMI	*****	*****	*****						
EG-IV. AMI	*****	*****	*****						

图 6 S-27 的 CMC_{Case} 与 engC 及 EG-IV 氨基酸序列的比较

Fig. 6 Comparison of the amino acid sequence of CMC_{Case} from S-27 with EngC and EG-IV

3 讨论

纤维素酶包括多种水解酶成员, 构成了一个复杂的纤维素酶家族, 一般将纤维素酶分为三类 (1) 葡聚糖内切酶 (endo-1, 4-β-D-glucanase, EC3.2.1.4), 这类酶作用于纤维素分子内部的非结晶区, 产生大量带非还原性末端的小分子纤维素; (2) 葡聚糖外切酶 (exo-1, 4-β-D-glucanase, EC3.2.1.91), 这类酶作用于纤维素线状分子末端, 每次切下一个纤维二糖分子; (3) β-葡萄糖苷酶 (β-glucosidase, EC3.2.1.21), 这类酶将纤维二糖水解开成葡萄糖分子。S-27 菌株不能利用天然纤维素作为碳源生长, 其发酵液中检测不到葡聚糖外切酶及 β-葡萄糖苷酶的活性, 只有葡聚糖内切酶的活性, 这是该菌的特点之一。已发现及克隆的大多数葡聚糖内切酶水解纤维素底物时, 一般为酸性或中性偏酸性, 而近年来, 纤维素

酶成功应用于洗涤剂工业,则要求所添加的纤维素酶为碱性纤维素酶或耐碱性的纤维素酶。S-27 菌株所分泌的葡聚糖内切酶在较广的 pH 范围内均有很高活性,在 pH9 条件下,仍具有 79.0% 的活性,在 pH11.0 下放置 60min,仍具有 52.7% 的活性。

本文首次报道了短小芽孢杆菌中葡聚糖内切酶基因的全序列。该酶的氨基酸序列与 *C. cellulovorans* 的 EngC 及 *Bacillus* sp. KSM-522 的 EG-IV 极为相似,三者除 C 末端及 CMCase 的第 479 至 489 位的氨基酸不同外,其余序列基本相同,然而三种酶的酶学性质均不相同,因此序列的差异对所编码酶的影响有待进一步的研究,该研究也将有助于对短小芽孢杆菌葡聚糖内切酶的进一步改造。

参 考 文 献

- [1] 宋桂经,王 冬,孙彩云.微生物学报,1995,35(1):38~44.
- [2] 齐义鹏.纤维素酶及其应用.成都:四川人民出版社,1980.
- [3] Sumitomo N, Ozaki K, Kawai S, et al. *Biosci Biotech Biochem*, 1992, 56: 872~877.
- [4] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T 著.金冬雁等译.分子克隆实验指南(第二版).北京:科学出版社, 1992.
- [5] Teather R M, Wood P J. *Appl Environ Microbiol*, 1982, 43: 777~780.
- [6] Shoseyov O, Hamamoto T, Foong F, et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 169(2): 667~672.
- [7] Hitomi J, Hatada Y, Kawaminami S, et al. *Biosci Biotech Biochem*, 1997, 61(2): 2004~2009.

CLONING AND DNA SEQUENCING OF *BACILLUS PUMILUS* ENDO-1 α - β -GLUCANASE GENE

Yang Zhiyuan Chen Rongzhong Yang Feng Xu Xun
(Third Institute of Oceanography, SOA, Xiamen 361005, China)

Abstract: *Bacillus pumilus* S-27 screened from marine environment produces an extracellular endo-1 α - β -glucanase. The enzyme has its optimal activity at pH 5.0~7.0 and 55°C and still retained 79.0% of it at pH9.0. The gene encoded this endo-1 α - β -glucanase was cloned and sequenced. The structural gene contained an open reading frame of 1980bp, corresponding to 660 amino acids, the amino acid sequence of this enzyme is very close to that of an EG of *C. cellulovorans* and an EG of *Bacillus* sp. KSM-522, all belong to the cellulase family E2.

Key words: *Bacillus pumilus* S-27, Endo-1 α - β -Glucanase, DNA cloning