

宇佐美曲霉木聚糖酶在哺乳动物细胞中的分泌表达

张茂¹, 邹娴², 林纯², 刘德武², 吴珍芳², 蔡更元¹

(1. 广东省农业科学院畜牧研究所 畜禽育种国家重点实验室 广东省动物育种与营养公共实验室, 广东广州 510640;

2. 华南农业大学动物科学学院, 广东广州 510642)

摘要:本试验旨在从宇佐美曲霉菌株 GIM3.36 中克隆得到木聚糖酶基因 *xyn* 的成熟肽编码序列(555 bp), 并将其克隆到真核表达载体 pcDNA6/HisTM A 中的不同位置, 分别得到重组质粒 pcDNA-spna 和 pcDNA-spnb, 重组质粒经过酶切、测序鉴定其读码框的正确性。在脂质体介导下将重组质粒转染猪肾细胞(PK15), 通过 RT-PCR 证实其在 PK15 细胞中表达, 并在细胞培养液中测定木聚糖酶酶活, 结果显示, 重组质粒 pcDNA-spna 转染细胞后表达的酶活力最高为 8.53 U/mL, 较 pcDNA-spnb 表达的酶活(6.87 U/mL)高 24%, 实现了微生物基因在哺乳动物细胞的分泌表达, 为 *xyn* 基因在转基因方面的利用提供了依据。

关键词:宇佐美曲霉; 木聚糖酶; 哺乳动物细胞; 分泌表达

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1671-7236(2012)01-0023-05

植物细胞壁主要是由纤维素(cellose)、半纤维素(hemicellose)和木质素(lignin)等物质组成, 半纤维素是仅次于纤维素含量第二丰富的可利用自然资源, 其主要成分是木聚糖(Lutting 等, 1997), 它是仅次于纤维素含量的第二丰富的可再生多糖(Collins 等, 2004; Ruanglek 等, 2007; Zhou 等, 2008), 约占植物细胞干重的 15%~35%(崔罗生, 2008)。木聚糖酶是一种分解木聚糖的酶, 可将木聚糖分解为木糖, 木聚糖酶在饲料、食品、造纸、纺织和能源等工业中显示出广阔的应用前景(周晨妍等, 2005), 其中一个较重要的用途是作为饲料添加剂应用于饲料行业。半纤维素的主要成分木聚糖是一种非淀粉多糖(NSP), 不能被单胃动物消化; 具有可溶性, 可导致单胃动物的小肠黏度提高, 最终使消化受阻。木聚糖酶能破坏植物的细胞壁, 将木聚糖分解成木糖, 为动物利用; 并降低肠内的黏度, 提高饲料利用率。因此, 在用于饲料的酶制剂中, 该酶扮演重要角色(侯炳炎, 2002)。目前使用的木聚糖酶主要是利用米曲霉、黑曲霉、芽孢杆菌和酵母菌等发酵后, 经提取、浓缩等工艺加工而成(Zhou 等, 2008)。宇佐美曲霉木聚糖酶属酸性木聚糖酶, 具有高比活性, 最适 pH 4.2, 最适反应温度 50 °C(孙军亭等, 2008)。

本研究从宇佐美曲霉菌株(GIM3.36)中克隆出 β -1,4-内切木聚糖酶基因 *xyn* 的成熟肽编码序列,

通过重叠 PCR 方法与猪腮腺分泌蛋白(parotid secretory protein, PSP)基因的信号肽序列进行拼接, 将得到的拼接片段插入到真核表达载体 pcDNA6/HisTM A 的不同位置, 在脂质体介导下成功将带有目的基因的真核表达质粒转入 PK15 细胞, 并通过提取 PK15 细胞中的 RNA, 检测到了 *xyn* 基因的表达, 采用 DNS 法在细胞培养液上清中检测到有木聚糖酶活性, 实现了异源基因分泌表达, 同时比较了两种构建方式的表达差异, 表明宇佐美曲霉 *xyn* 基因能够在哺乳动物细胞中进行分泌表达, 为 *xyn* 基因在转基因方面的利用提供了依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 宇佐美曲霉(*Aspergillus usamii*) GIM3.36, 购自广东省微生物研究所微生物菌种保藏中心; 基因工程菌 DH5 α , 购自宝生物(大连)有限公司。

1.1.2 载体 pMD18-T Vector, 购自宝生物(大连)有限公司; pcDNA6/HisTM A 表达载体, 由华南农业大学动物遗传育种与繁殖实验室保存。

1.1.3 酶类和主要试剂 PrimeScriptTM One Step RT-PCR Kit, PrimeSTAR HS DNA Polymerase, LA TaqTM, DNA Ligation Kit Ver 2.0, Ex TaqTM, 均购自宝生物工程(大连)有限公司; PCR 检测用 Taq 酶, 购自广州东盛生物科技有限公司; 限制性内切酶 BamH I, Xba I, Nhe I 和 Xho I, 购自 Fermentas 公司; RNA 抽提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒, 均购自 Omega 公司(美国); LipofectamineTM 2000 脂质体转染试剂盒, 购自 Invitrogen 公司。木聚糖、D-木糖, 购自 Sigma 公司

修回日期: 2011-06-21

作者简介: 张茂(1985-), 男, 云南人, 硕士, 研究方向: 动物转基因育种。

通信作者: 蔡更元, 研究员, 从事猪育种方面的研究。E-mail: cgy0415@163.com

基金项目: 国家重大专项(2008ZX08006004, 2009ZX08006-012B)。

(美国)。引物合成及测序均由上海生工生物技术有限公司完成。

1.2 宇佐美曲霉菌株的液体培养及总 RNA 的提取 配制液体培养基:蔗糖 30 g, NaNO₃ 3 g, Mg-SO₄ · 7H₂O 0.01 g, K₂HPO₄ 1 g, 蒸馏水 1000 mL, 调 pH 至 6.8, 高压, 冷却, 接种宇佐美曲霉到无菌液体培养基, 30 °C 条件下 200 r/min 培养 3 d; 收集菌体进行 RNA 抽提(参照 Omega 总 RNA 提取试剂盒说明提取)。

1.3 *xyn* 基因成熟肽编码序列的 RT-PCR 扩增 参照 GenBank 中发表的宇佐美曲霉 *xyn* 基因(DQ114485)的成熟肽序列设计 2 条特异引物。正向引物 *xynF*: 5'-AGTGCCGGTATCAACTATG-3'; 反向引物 *xynR*: 5'-TTAAGAAGATATCGTGACAC-3'。以宇佐美曲霉提取的 RNA 为模板, 用 RT-PCR Kit 直接进行 PCR 扩增, 取 RNA 8 μL, 2×1 Step Buffer 25 μL, 上、下游引物各 1 μL, PrimeScript 1 Step Enzyme Mix 2 μL, 双蒸水 13 μL, 反应条件为: 50 °C 30 min, 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 51 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。取 PCR 产物用

1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收纯化 PCR 产物, 将回收产物连接到 pMD18-T 载体上, 再将连接产物转化感受态细胞 DH5α, 挑选白色菌落, 进行菌液 PCR, 选择 PCR 检测为阳性的菌液送上海生工生物工程技术有限公司测序, 进行正反两个方向测定。

1.4 融合片段的重叠延伸 PCR 利用猪腮腺分泌蛋白基因的信号肽序列, 分别与木聚糖酶基因成熟肽编码序列进行重叠延伸 PCR 得到融合片段, 以达到 *xyn* 基因能够分泌表达的目的。设计两组重叠延伸 PCR 引物, 第一组在融合片段 *spna* 两端加入酶切位点 *Bam*H I 和 *Xba* I (表 1), 并且在起始密码子 ATG 前加上 Kozak 序列(ACC)以达到提高表达的效果; 第二组引物设计在融合片段 *spnb* 两端加入酶切位点 *Nhe* I 和 *Xho* I (表 2); 分别将最后得到的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 然后用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行回收纯化。方法同 1.3, 同样回收产物连接到 pMD18-T 载体上, 筛选阳性克隆送上海生工生物工程技术有限公司进行正反两个方向测定。

表 1 *spna* 重叠延伸 PCR 引物序列

引物编号	引物序列
spn1	5'-CTGGGATCCACCATGTTTCAAC-3' (<i>Bam</i> H I)
spn2	5'-CTGGGATCCACCATGTTTCAACTTTGGAAACTGTTTTCTGTGCGGTCTGCTCATTGGGA-3'
spn3	5'-TCTGCACATAGTTGATACCGGCACTAGATGCTGAGGTCCCAATGAGCAGACCGCACAAGAAAAC-3'
spn4	5'-AGTGCCGGTATCAACTATG-3'
spn5	5'-GCCTCTAGATTAAGAAGATATCGTGACAC-3' (<i>Xba</i> I)

表 2 *spnb* 重叠延伸 PCR 引物序列

引物编号	引物序列
xyn1	5'-CTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGC-3' (<i>Nhe</i> I)
xyn2	5'-CACAAGAAAACAAGTTTCCAAAGTTGAAACATGGTAAGCTTAAGTTTAAACGCTAGCCA-3'
xyn3	5'-AACTTTGGAAACTTGTCTTCTGTGCGGTCTGCTCATTGGGACCTCAGCATCT-3'
xyn4	5'-TCTGCACATAGTTGATACCGGCACTAGATGCTGAGGTCCCAATGAGCAGACCGCACAAGAAAAC-3'
xyn5	5'-AGTGCCGGTATCAACTATG-3'
xyn6	5'-GCCCTCGAGTTAAGAAGATATCGTGAC-3' (<i>Xho</i> I)

1.5 *xyn* 真核表达载体的构建 分别用 *Bam*H I、*Xba* I 和 *Nhe* I、*Xho* I 酶切 *spna* 和 *spnb*, 纯化回收目的片段, 定向克隆到经同样处理的 pcDNA6/HisTM A 载体中, 构建重组表达质粒 pcDNA-*spna* 和 pcDNA-*spnb*, 转化 DH5α 后挑选白色菌落, 直接以菌液为模板进行 PCR、琼脂糖凝胶电泳。按质粒提取试剂盒说明提取重组质粒, 以质粒为模板再进行 PCR 扩增、*Bam*H I + *Xba* I 和 *Nhe* I + *Xho* I 双酶切、琼脂糖凝胶电泳检测和鉴定。选择酶切和

PCR 鉴定为阳性的重组质粒上海生工生物工程技术有限公司测序, 验证重组质粒读码框的正确性。

1.6 转染猪肾细胞 PK15 及其表达 将重组质粒 DNA 在脂质体介导下转染 PK15 细胞, CO₂ 培养箱内 37 °C 培养 2 h 后用含血清培养基补充至 10 mL, 继续培养 48 h 后可进行酶活测定。将转染后的 PK15 细胞进行刮取, 6000 r/min 离心 3 min, 提取 PK15 细胞总 RNA, *xynF* 和 *xynR* 为引物, 进行 RT-PCR 扩增。收集细胞培养液, 12000 r/min 离心 3 min 后, 取上清,

采用 DNS 法测定重组木聚糖酶的酶活,以 1%木聚糖为底物,反应时间为 10 min,pH 5.0,温度为 40 °C,波长为 550 nm(费笛波等,2004)。一个酶活单位(U)定义为在给定的反应条件下,以 1 μmol/min 的速度释放出木糖所需的酶量。

2 结果与分析

2.1 *xyn* 基因的 RT-PCR 扩增 RT-PCR 扩增产物进行凝胶电泳结果可见有 1 条大约 555 bp 的特异条带,与预期的相符(图 1)。

2.2 *xyn* 基因的克隆及测序鉴定 将测序结果拼接得到 555 bp 的核苷酸序列,含有一个完整的阅读框,编码 184 个氨基酸,读码框完整。与 GenBank 中发表的宇佐美曲霉 *xyn* II (DQ114485)基因的序列进行比对,核苷酸相似性为 99.8%;对宇佐美曲

霉菌株(GIM3.36)木聚糖酶 *xyn* 基因序列与 GenBank 下载的其他菌种木聚糖酶基因序列进行系统进化树分析,结果图 2。从系统进化树可以看出,宇佐美曲霉菌株(GIM3.36)木聚糖酶 *xyn* 基因与 XM 001401324.1 亲缘关系较近。

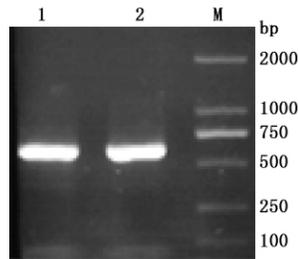


图 1 *xyn* 的 RT-PCR 扩增结果

注:M 为 DNA Marker DL2000;1、2 为 *xyn* 基因 RT-PCR 产物。

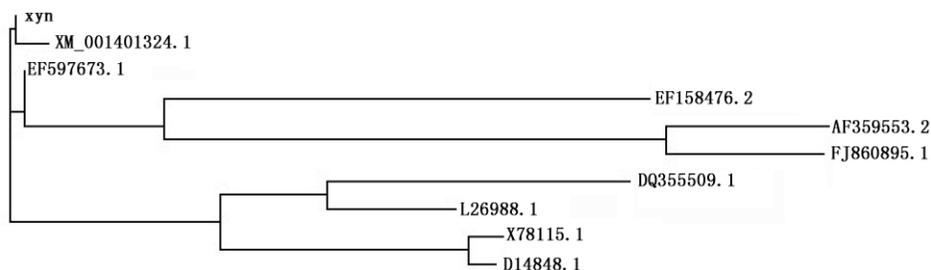


图 2 不同菌种木聚糖酶进化树

2.3 融合片段序列的克隆及测序鉴定 对 PCR 扩增产物进行回收纯化后进行测序,测序结果得到 630 bp 的 *spna* 和 649 bp 的 *spnb* 的核苷酸序列,*spna* 含有 PSP 基因的信号肽序列、*xyn* 基因的成熟肽编码序列,*spnb* 含有 PSP 基因的信号肽序列、*xyn* 基因的成熟肽编码序列以及 pcDNA6/His A 载体上的一部分序列。测序结果与目的序列进行比较,相似性为 100%,证明重叠延伸片段正确。

2.4 重组表达载体的构建 分别以菌液为模板进行 PCR 扩增得到的产物进行琼脂糖凝胶电泳出现约 600 bp 的特异性条带;重组质粒 pcDNA-*spna* 经

*Bam*H I + *Xba* I 酶切、电泳出现 1 条大约 5000 bp 的质粒带和 618 bp 的带为 *spnb*;重组质粒 pcDNA-*spnb* 经 *Nhe* I + *Xho* I 酶切电泳出现一条约 5000 bp 的带为载体质粒,另一条为 *spnb* 片段,约 637 bp (图 3、4)。测序结果表明该转化菌的质粒含有目的基因片段,且读码框正确。

2.5 转染细胞 RT-PCR 结果 以提取的 PK15 细胞 RNA 为模板进行 RT-PCR 扩增出约 555 bp 的 *xyn* 基因编码成熟肽序列片段(图 5),说明在转录水平有 *xyn* 基因表达。

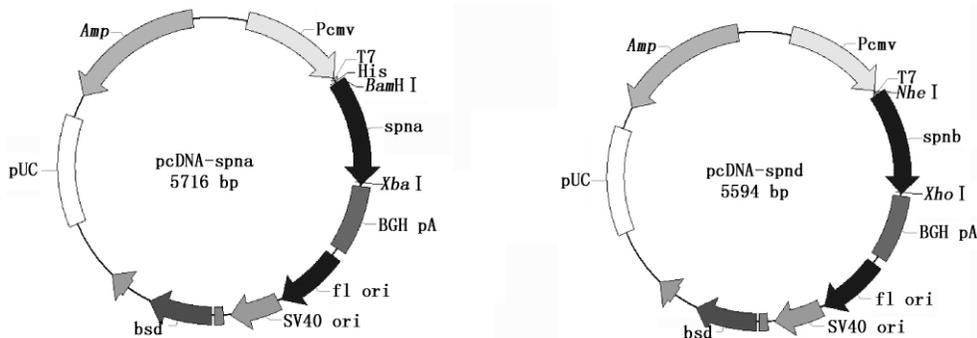


图 3 重组质粒图谱

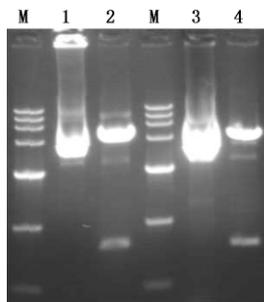


图4 重组表达质粒图谱及酶切鉴定

注: M为DNA Marker DL15000; 1,重组质粒 pcDNA-spna; 2,重组质粒 pcDNA-spna 的 *Bam*H I、*Xba*I 双酶切; 3,重组质粒 pcDNA-spnb; 4,重组质粒 pcDNA-spnb 的 *Nhe*I、*Xho*I 双酶切。

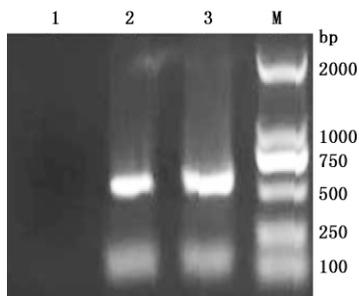


图5 RT-PCR 检测 *xyn* mRNA 在 PK15 细胞中的表达

注: M, DNA Marker DL2000; 1 为未转染 PK15 的 RT-PCR; 2, 3 分别为重组质粒 pcDNA-spna、pcDNA-spnb 转染 PK15 的 RT-PCR 产物及 β -actin 的 RT-PCR 产物。

2.6 重组质粒分泌表达蛋白酶活的测定 采用 DNS 法测定细胞培养液上清的酶活, 检测到 pcDNA-spna 表达的木聚糖酶活力最高为 8.53 U/mL, pcDNA-spnb 的最高为 6.87 U/mL, 第一个质粒酶活高出第二个质粒 24%(图 6)。测定过程中为保证试验结果的准确性, 进行多次测定, 在测定过程中设立了对照并进行了酶活测定, 对照组没有检测到酶活, 说明重组质粒分泌表达成功。

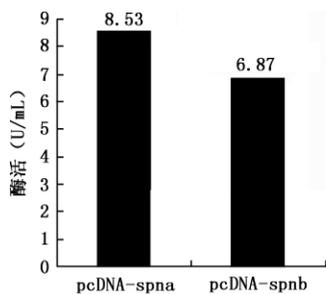


图6 酶活测定结果

3 讨论

随着基因工程、蛋白质工程等生物技术的发展及应用, 人们对木聚糖酶基因的研究不断深入。本试验克隆的宇佐美曲霉 β -1,4-内切木聚糖酶 *xyn* 基

因成熟肽编码序列 555 bp, 编码 184 个氨基酸, 与 NCBI 发表的宇佐美曲霉 *xyn*(DQ114485) 基因的序列相似性为 99.8%, 发生了一个碱基突变由 G 变为 A, 导致氨基酸也发生改变, 由 V 变为 I, 其变异对蛋白的生物学活性影响还有待进一步的研究。根据催化结构域氨基酸的同源性和疏水簇分析法将木聚糖酶分为 F/10 和 G/11 家族 (Collins 等, 2005; Zhou 等, 2008), F/10 家族的木聚糖酶来源有植物、真菌、细菌并且在结构是不同的, G/11 家族的木聚糖酶来源主要有真菌和细菌的酶 (Zhou 等, 2008), 本试验克隆出宇佐美曲霉木聚糖酶基因属于 G/11 家族, 使其在真核细胞里面进行表达, 该基因编码的酶在弱酸性条件下具有降解木聚糖的作用, 可作为制作转基因动物的候选基因。

本试验第一个质粒 pcDNA-spna 的构建是在插入片段起始密码子前加上了 Kozak 序列, 然后克隆到表达质粒的多克隆位点, 保留了原来的 6 个组氨酸标签; 第二个质粒 pcDNA-spnb 的构建去除了组氨酸标签, 使表达的蛋白为单一木聚糖酶; 转染细胞表达酶活测定结果来显示 pcDNA-spna 的表达酶活高于 pcDNA-spnb 表达的酶活, 分析原因可能受到 Kozak 序列影响, Kozak 序列是在很多哺乳动物细胞中均能提高基因表达的一个上游调控元件 (马艳娇等, 2010), 在蛋白质翻译水平再次提高基因的表达量 (谢庆军等, 2008; 杜明梅等, 2008)。目前, 宇佐美曲霉克隆的木聚糖酶基因在大肠杆菌 (白剑宇等, 2006; Wang 等, 2007) 和毕赤酵母 (周晨妍等, 2008) 进行了表达, 大肠杆菌表达产物主要是以包涵体和胞内可溶性蛋白存在, 而毕赤酵母表达借助了毕赤酵母的分泌信号肽序列进行的分泌表达, 在哺乳动物细胞的表达还未见报道。本试验为了保证 *xyn* 能够进行分泌表达, 将 PSP 基因信号肽序列与 *xyn* 成熟肽编码序列的拼接片段 *spna*、*spnb* 分别插入真核表达载体并实现了在哺乳动物细胞的表达, 对下一步对 *xyn* 基因进行密码子优化, 提高 *xyn* 基因表达量提供数据基础, 同时对构建消化道特异表达载体, 制备组织特异性表达的转基因猪具有重要意义。

本试验在 pH 5、温度 40 °C 的环境下测定其酶活, 此条件接近猪消化道内环境, 测定结果表明细胞分泌的木聚糖酶能在消化道内的环境中发挥活性。在测定酶活的过程中设立了对照和平行样测定, 保证了数据的准确性。此外本试验还进行了空质粒转染猪肾细胞的酶活测定, 结果显示空质粒转染细胞的细胞液没有酶活, 确保了试验结果的可靠性。来

源于微生物的木聚糖酶能够在哺乳动物细胞内合成、分泌且表现出功能活性,证明生产能够内源性降解半纤维素木聚糖的动物是可行的(Hall等,1999),为转基因猪的制备奠定基础。

猪 PSP 基因在腮腺高表达,颌下腺低表达(伊海芳等,2004),而且表达量的变化在可接受的范围内,可以利用猪 PSP 基因的调控区作为转基因生物反应器的转基因平台。据估计,一头猪每天可产生 15 L 的唾液(李宁等,2003),利用转基因技术在动物唾液腺分泌外源木聚糖酶,分解饲料中的木聚糖,促进营养物质的吸收,提高单胃动物的消化能力,减少饲料成本,促进畜禽健康、减少动物粪便对环境的污染等将有很大的应用前景。

参 考 文 献

- 马艳娇,李鹏,欧阳红生,等. Kozak 序列对 TIMP1 基因在人乳腺癌细胞 MCF 7 中表达的影响[J]. 中国生物制品学杂志,2010,23(7):687~690.
- 邓萍,曹云鹤,陆文清,等. 黑曲霉木聚糖酶基因 *xynB* 在大肠杆菌中的表达及重组木聚糖酶性[J]. 农业生物技术学报,2006,14(5):774~778.
- 孙军亭,李文静,邬敏辰. S179C 突变提高宇佐美曲霉木聚糖 Xyn II 热稳定性的研究[J]. 食品与工业发酵,2008,34(7):55~58.
- 杜明梅,叶玲,杨立娜,等. Kozak 序列+4G 提高绿色荧光蛋白在 HEK293 细胞中的表达[J]. 生物工程学报,2008,24(3):491~494.
- 周晨妍,邬敏辰. 木聚糖酶的酶学特性与分子生物学[J]. 生物技术,2005,15(3):89~92.
- 周晨妍,邬敏辰,王武,等. 宇佐美曲霉木聚糖酶基因 *xynII* 在不同毕赤酵母中的分泌表达[J]. 生物加工过程,2008,6(2):38~42.
- 侯炳炎. 木聚糖酶及其应用[J]. 动物科学与动物医学,2002,19(4):52~54.
- 费笛波,冯观泉,袁超. 饲用木聚糖酶活性测定方法的研究[J]. 浙江农业学报,2004,16(2):53~58.
- 崔罗生,祝茂生,张志明,等. 黑曲霉木聚糖酶基因(*xynA*)在大肠杆菌中的表达及酶学分析[J]. 华中农业大学学报,2009,28(1):48~53.
- 谢庆军,范凌云,胡晓燕,等. Kozak 序列引导的人 *p53* 基因重组智能腺病毒载体的构建与表达[J]. 中国生物制品学杂志,2008,21(2):107~110.
- Conllint T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29:3~23.
- Fontes C M G A, Ali S, Hall J, et al. Bacterial xylanase expression in mammalian cells and transgenic mice[J]. Journal of Biotechnology, 1999, 72:95~101.
- Luttig M, Pretorius I S, Zyl W H. Cloning of two β -xylanase-encoding genes from *Aspergillus niger* and their expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology Letters,1997, 19(5):411~415.
- Ruanglek V, Sriprang R, Eurwilaichitr L, et al. Cloning, expression, characterization, and high cell-density production of recombinant endo-1,4- β -xylanase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007,41:19~25.
- Wang Y, Zhang H L, Yao B, et al. Characterization, gene cloning, and expression of a novel xylanase XYNB from *Streptomyces olivaceoviridis* A1[J]. Aquaculture, 2007,267:328~334.
- Yin H F, Fan B L, Li N, et al. cDNA cloning, genomic structure, chromosomal mapping, and expression analysis of parotid secretory protein in pig[J]. Genomics,2004, 83:9~18.
- Yin H F, Fan B L, Li N, et al. Analysis of cDNA sequence, protein structure and expression of parotid secretory protein in pig [J]. Chinese Science Bulletin, 2003,48 (13): 1358~1363.
- Yin H F, Fan B L, Li N, et al. Cloning of pig parotid secretory protein gene upstream promoter and the establishment of a transgenic mouse model expressing bacterial phytase for agricultural phosphorus pollution control[J]. Anim Sci, 2006, 84:513~519.
- Zhou C Y, Bai J Y, Wang W, et al. Cloning of a xylanase gene from *Aspergillus usamii* and its expression in *Escherichia coli* [J]. Bioresource Technology,2008,99:831~838.

Aspergillus usamii Xylanase Secrete Expression in Mammalian Cells

ZHANG Mao¹, ZOU Xian², LIN Chun², LIU De-wu², WU Zhen-fang², CAI Geng-yuan¹

(1. State Key Laboratory of Animal Breeding, Guangdong Public Laboratory of Animal Breeding and Nutrition, Institute of Animal Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;
2. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The mature peptide coding sequence of xylanase gene *xyn* (555 bp) was amplified by RT-PCR from *Aspergillus niger* GIM 3.36 total RNA extracts. It was subcloned into different locations of the eukaryotic expressing plasmid vector pcDNA6/HisTM A. The recombinant plasmid pcDNA-spna and pcDNA-spnb was identified by PCR, enzyme digestion and DNA sequencing. The result showed that the recombinant plasmids were constructed correctly. Meanwhile, the PK15 cells were transfected with pcDNA-spna and pcDNA-spnb by cationic liposome, and the mRNA of the target gene was determined by RT-PCR. The maximum yield of the recombinant xylanase (transfected pcDNA-spna) in cell culture medium was 8.53 U/mL and higher 24% the recombinant xylanase 6.87 U/mL (transfected pcDNA-spnb). To achieve the purpose that microbiology secrete expression in mammalian cells and provided basis for using *xyn* gene to transgenic.

Key words: *Aspergillus usamii*; xylanase; mammalian cells; secrete expression