

文章编号:1673-1689(2007)02-0062-05

日本曲霉 β -呋喃果糖苷酶基因克隆及在 酿酒酵母中的表达

王立梅¹, 齐斌¹, 周惠明²

(1. 常熟理工学院 生物与食品工程系, 江苏 常熟 215500; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 通过反转录 PCR 法成功地扩增出日本曲霉 β -呋喃果糖苷酶基因, 基因片段长度为 1 917 bp, 编码 638 个氨基酸。将所得片段定向克隆到 pYX212 载体上, 并转化至酿酒酵母中, 通过酵母菌落 PCR 检验后, 确定该基因在酿酒酵母中获得表达, 转化子平均酶活为 26.4 U/mg。

关键词: 日本曲霉; β -呋喃果糖苷酶; cDNA; 克隆; 酿酒酵母

中图分类号: Q 93

文献标识码: A

Cloning and Expression of β -Fructofuranosidase cDNA from *Aspergillus japonicus* in *Saccharomyces cerevisiae*

WANG Li-mei¹, QI Bin¹, ZHOU Hui-ming²

(1. Department of Biotechnology and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China; 2. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A β -fructofuranosidase gene of 1 917 bp was cloned from *Aspergillus japonicus*, and the ORF sequence predicted a protein of 638 amino acids. A expression plasmid pYX212 carrying the gene was under the control of the triose phosphate isomerase gene (TPI) promoter was transformed into *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A, and β -fructofuranosidase gene was successfully expressed in the recombinant strains. The enzyme activity was about 26.4 U/mg.

Key words: *Aspergillus japonicus*; β -fructofuranosidase; cDNA; clone; *Saccharomyces cerevisiae*

低聚果糖是蔗糖的果糖基以 β -1,2 糖苷键连接 1~3 个果糖基而形成的果糖寡聚体, 具有独特的保健功能, 被广泛应用于食品、饲料和医药工业^[1]。

工业上一般以蔗糖为原料, 利用微生物 β -呋喃果糖苷酶(fructofuranosidase)生产低聚果糖。能够产生 β -呋喃果糖苷酶的微生物包括细菌、酵母和丝状真

收稿日期: 2006-07-09.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30471155).

作者简介: 王立梅(1964-), 女, 吉林长春人, 工学博士, 副教授, 主要从事食品生物技术研究. E-mail: wlmqb@hotmail.com

周惠明(1957-), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 主要从事谷物科学及功能食品研究. Email: hm_zhou@sytu.edu.cn

菌,其中对丝状真菌 β -呋喃果糖苷酶的研究较多,并对一些编码 β -呋喃果糖苷酶基因进行了克隆^[2-4]。作者以 *Aspergillus japonicus* JN19 mRNA 反转录获得的产物为模板,扩增到了编码 β -呋喃果糖苷酶 cDNA 的结构基因,通过表达载体构建后,转化到酿酒酵母中并获得表达,为构建具有高效表达能力的工程菌株,以及进一步利用工程菌进行低聚果糖的生产奠定了基础(该序列在 GenBank 登记号为 DQ439972)。

1 材料与方法

1.1 菌种与质粒

日本曲霉(*Aspergillus japonicus* JN19)由作者所在实验室筛选^[5,6]; *E. coli* JM109,酿酒酵母宿主菌株 *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A, pYX212 (细菌酵母穿梭载体,带有 TPI 强启动子),由江南大学生物工程学院柳志强博士惠赠; pMD18-T 克隆载体,购自大连宝生物公司。

1.2 培养基、酶及试剂

产酶培养基参照文献^[5], LB 培养基参照文献^[7]; EcoRI、SalI 内切酶、T4DNA 连接酶、RNaseA、PCR 试剂、DNA 纯化试剂盒、胶回收试剂盒,均为大连宝生物公司产品;酵母提取物和蛋白胨为 Qx-iod 公司产品; mRNA 分离试剂盒,购自 Promega 公司; cDNA 合成试剂盒,购自 BD Clontech 公司;其它试剂为国产分析纯。

1.3 总 RNA 的制备及 mRNA 的分离

取 0.4 g 菌丝体,液氮速冻并研磨(加入少量石英砂)成粉末,快速将粉末移入 50 mL 的离心管中,加 12 mL 变性液(异硫氢酸胍 6 mol/L,柠檬酸 37.5 mmol/L,十二烷基肌酸钠 0.75 mmol/L, β -巯基乙醇 0.15 mol/L),充分摇匀后按文献^[8]方法提取总 RNA,利用核酸、蛋白质测定仪测定其在不同波长的吸光度,同时进行甲醛变性电泳,确定总 RNA 的完整性。然后参照 Promega 公司 mRNA 分离试剂盒说明书,分离提取 mRNA。

1.4 cDNA 第一链的合成

利用 BD Clontech 逆转录试剂盒,以 1.3 中分离得到的 mRNA 为模板,合成 cDNA 第一链。

1.5 β -呋喃果糖苷酶 cDNA 结构基因的扩增

利用 BLAST 软件对 NCBI 上公布的 β -呋喃果糖苷酶基因进行同源分析并设计下列引物:

引物 1: AAGCTCACCCTACCCCTG

引物 2: CTAATTTCTCTCCGGCC

利用引物 1、引物 2 以 cDNA 第一链为模板,扩增 β -呋喃果糖苷酶 cDNA 基因。PCR 反应参数为: 94 °C 30 s, 52 °C 1.5 min, 68 °C 2.5 min, 重复 35 个循环,于 72 °C 继续延伸 10 min。用 0.8 g/dL 的琼脂糖电泳鉴定 PCR 产物。

1.6 目的片断的回收

取 50 μ L PCR 产物,用 1 g/dL 的琼脂糖电泳回收目的片断。利用 DNA 胶回收试剂盒进行回收。

1.7 克隆载体的构建与鉴定

将回收目的片断同载体 pMD18-T 进行连接,构建重组质粒 pMD18-T-FTA。然后按文献^[7]的方法将重组质粒电转化到 *E. coli* JM109 宿主菌中。将转化后的菌液涂布到含 24 μ g/mL 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、40 μ g/mL 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷(X-gal)、100 μ g/mL 氨苄青霉素(Amp)的 LB 琼脂平板上,37 °C 培养过夜。利用蓝白斑筛选,从平板上挑取白色菌落,提取质粒后用自动序列仪进行测序(由大连宝生物公司完成),并用 DNAMAN 软件分析测序结果。

1.8 表达载体的构建与鉴定

1.8.1 β -呋喃果糖苷酶 cDNA 结构基因的扩增 参照 1.7 序列测定结果设计引物,引物序列为:

引物 3: AGGGGATCCATGAAGCTCACCAC TACC,划线区域为 *Bam*H I 酶切位点。

引物 4: AGGAAGCTTCTAAATTTCTCTCC GGCC,划线区域为 *Hind* III 酶切位点。

利用引物 3 和引物 4,以 pMD-18-T-FTA 为模板扩增 β -呋喃果糖苷酶 cDNA 基因。PCR 反应参数为: 94 °C 30 s, 58 °C 60 s, 68 °C 90 s, 重复 30 个循环后,于 72 °C 延伸 10 min。用 1 g/dL 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

1.8.2 目的片断的回收 方法同 1.6。

1.8.3 表达载体的构建 纯化后的 β -呋喃果糖苷酶 cDNA 基因用 *Bam*H I 和 *Hind* III 于 37 °C 酶解 3 h,用 DNA 回收试剂盒回收。将回收的目的片断和载体质粒连接,构建表达载体 pYX212-FTA。

1.8.4 阳性克隆菌的筛选 将构建好的表达载体电转化至 *E. coli* JM109 受体菌中并涂布到含 100 μ g/mL Amp 的 LB 琼脂平板上,37 °C 培养过夜,从平板上筛选阳性菌落,接种于含 100 μ g/mL Amp 的 LB 液体培养基中,37 °C 振荡培养过夜。按文献^[7]的方法从菌液中提取质粒,用 *Bam*H I、*Hind* III 于 37 °C 酶解 3 h,对酶解产物电泳。

1.9 诱导表达

挑取阳性克隆单菌落并接种于4 mL含100 $\mu\text{g/mL}$ Amp的LB液体培养基中,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min振荡过夜。取1 mL培养物,将其转接于50 mL含100 $\mu\text{g/mL}$ Amp的LB液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min振荡至菌体浓度 OD_{600} 约为0.6~0.8左右。向培养物中加入IPTG至终浓度为3 mmol/L,诱导培养。收集菌体供电泳分析及酶活力测定。

1.10 酿酒酵母转化

将经过酶切验证的重组表达载体pYX212-FTA,用电穿孔转化法转化尿嘧啶营养缺陷型实验室酿酒酵母菌株*S. cerevisiae* W303-1A,以不含尿嘧啶的YBG平板筛选阳性重组子^[11]。

1.11 酶活测定

1) 粗酶液的制备:将分离的酵母转化子单菌落接种于20 mL YNB(不含尿嘧啶)液体培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min摇床培养至静止期,离心,菌体加入1倍体积醋酸-醋酸钠缓冲液(0.1 mol/L, pH 5.0),置冰浴,超声波破碎细胞20 min(工作5 s,间歇5 s)。4 $^{\circ}\text{C}$ 下8 000 g离心20 min,上清液为粗酶液。以未经转化的*S. cerevisiae* W303-1A菌株作为对照。

2) β 呋喃果糖苷酶活测定:参照文献[5]。

1.12 菌体蛋白质含量的测定

按Bradford法测定^[9]。

2 结果与分析

2.1 RNA的提取及PCR扩增

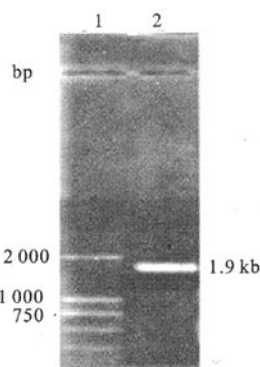
将分离后的总RNA充分溶解于DEPC水中,吸取适量溶解液用DEPC水稀释一定倍数,利用核酸测定仪测定总RNA在不同波长下的吸光度,计算总RNA的浓度。取50 μL 总RNA溶液,进行琼脂糖-甲醛变性电泳^[10],观察RNA的质量及完整性。提取的总RNA经检测,质量及浓度达到要求后进行mRNA的分离。

以mRNA为模板,Oligo(dT)₁₅为引物,在反转录酶的作用下合成cDNA第一链,并利用置换合成法获得了双链cDNA。用双链cDNA混合物为模板,利用特异引物1、引物2进行PCR扩增。扩增产物进行1 g/dL琼脂糖电泳,与标准相对分子质量对照,在1.9 kb处出现明亮的特异性带,见图1。

将扩增后回收的PCR产物与pMD18-T载体连接,构建克隆载体pMD18-T-FTA并转化至*E. coli* JM109受体菌,涂布于含Amp、IPTG、X-gal

的LB琼脂平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜后,平板上长出许多蓝色、白色菌落。随机挑取白色克隆菌落,提取质粒并进行测序,利用软件DNAMAN对测序结果进行分析,见图2。

利用Blast软件进行同源性分析,发现该序列同Genebank数据库中公布的编码 β 呋喃果糖苷酶cDNA序列(AB046383)同源性为97.5%。该序列已提交到Genebank数据库(登记号为:DQ439972)。



1. DL 2000 DNA marker; 2. β -fructosyltransferase cDNA的PCR产物

图1 β -fructofranosidase cDNA基因PCR扩增 agarose电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR product

2.2 酵母表达载体的构建

将PCR产物及载体pYX212用BamH I和Hind III进行酶切处理,酶切产物纯化后进行连接,构建表达载体pYX212-FTA,转化至*E. coli* JM109受体菌,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,随机挑取10个转化子接种到含100 $\mu\text{g/mL}$ Amp的LB培养基中,提取重组质粒,用限制酶对重组质粒进行鉴定,抽提的重组载体用BamH I和Hind III双酶切释放出约1.9 kb大小的片段,与PCR扩增得到的目的片段的大小一致,见图3。从图3可以看出,通过定向克隆,成功地将 β 呋喃果糖苷酶cDNA基因插入到了质粒pYX212中,证明已经成功构建了 β 呋喃果糖苷酶cDNA基因在酿酒酵母中进行表达的重组载体。

2.3 β 呋喃果糖苷酶cDNA结构基因的表达及重组子酶活测定

将经过酶切验证的重组表达载体pYX212-FTA,用电穿孔转化法转化尿嘧啶营养缺陷型实验室酿酒酵母菌株*S. cerevisiae* W303-1A,以不含尿嘧啶的YBG平板筛选阳性重组子。随机挑选YBG

平板上的阳性重组子,经酵母菌落 PCR 鉴定后,重新划线分离,挑取两个单菌落重组子 *S. cerevisiae* W303-1A/pYX212-FTA-1 和 *S. cerevisiae* W303-1A/pYX212-FTA-2,测定其酶活。酶活测定结果见表 1,结果表明平均酶活为 26.4 U/mg。

1 ATGAAGCTCACCCTACCACCTGGCGCTCGCCACCGCGCAGCAGCAGAGAAGCCTCA
61 ACCACCTGGCACACCACGGCCCCGCGCGGACCAACCTCAGCACCTCCCCAACAAACACC
121 CTCTTCCACGTGTGGCGGCCGCGCGCGCACATCTGCCCCGCGAGGGCCAGATCGGCGAC
181 CC CTG CGCGCACTACACCGACCCATCCACCGCCTCTTCCACGTGGGGTTCTGTCACGAC
241 GGGGACGGCATCGCGGGCGCCACCACGGCCAACCTGGCCACCTACACCGATACTCTCGAT
301 AACTTCTGATCCAGCCGGCGGGAAGAACGACCCCGTCGCCGTGTTTCGACGGCGCCGTC
361 ATC CCCGTCGGCGTCAACAACACCCCCACC T TACTCTACACCTCCG T CTCCTTCCTG CCC
421 ATCTGGTCCATCCCCTACACCCGCGGCAGCGAGACGCAGTCGT T GGCCGTCG CGCGCGAC
481 GGCGGCCGCCGCTTCGACAAGCTCGACAGGGCCCCGTCATCGCCGACCACCCCTTCGCC
541 GTCGACGTACCCGCC T TCCGCGATCCG TTTG TCT TCCGCAGTGCCAAGT TGGATGTGCTG
601 TTGGATGAGGAGGTGGCGCGGAATGAGACGGCCGTGCAGCAGGCCGTCGATGGCTGGACC
661 GAGAAGAACGCCCCCTGGTATGTCGCGGTCTCTGGCGGGGTGCACGGCGTCGGGCCGCG
721 CAGT TCCTCTACCGCCAGAACGGCGGGAACGCTTCCGAGTT CCAGTACTGGGAGTACCTC
781 GGGGAGTGGTGGCAGGAGGCGACCAACTCCAGCTGGGGCGACGAGGGCACCTGGGCCGGG
841 CGCTGGGGGTTCAACTTCGAGACGGGAATGTGCTCTTCCTCACCGAGGAGGGCCATGAC
901 CCCCAGACGGGCGAGGTGTTCTGTCACCTCGGCACGAGGGGTCTGGCCTGCCACCGCAG
961 GTCTCCAGTATCCACGATATGCTGTGGGCGGCGGGTGAGGTTCGGGGTGGGCAGTGAGCAG
1021 GAGAAGGTCGAGTTCTCCCCCTCCATGGCCGGGTTTCTGGACTGGGGGTTCAGCGCCTAC
1081 GCTGCGGCGGGCAAGGTGCTGCCGGCCAGCTCGGCGGTGTCGAAGACCAGCGCGTGGAG
1141 GTGGATCGGTATGTCTCGTTCTGCTGTTGACGGGCGACCACTACGAGCAGGCGGACGGG
1201 TTCCCCACGGCCCAGCAGGGGTGGGGGTGCTGCTGCTGCCGCGCGAGCTGAAGACGGTG
1261 GAGAACGTCGTCGACAACGAGCTGGTGCAGAGGAGGGCGTGTCTGGGTGGTGGGGGAG
1321 TCGGACAACCAGACGGCCAGGCTGCGCACGCTGGGGATCACGATCGCCCCGGGAGACCAAG
1381 GCGGCCCTGCTGGCCAAACGGCTCGGTGACCGCGGAGGAGACCGCACGCTGCAGACGGCG
1441 GCGGCCCTGCTGGCCAAACGGCTCGGTGACCGCGGAGGAGACCGCACGCTGCAGACGGCG
1501 GACGCGAGCGCGCGCTCGTCCCCGCTCCAGTCCGGGTTTCGAAATCCTGGCGTCGGAGCTG
1561 GAGCGCACGGCCATCTACTACCAGTTCAGCAACGAGTCGCTGGTCTGTCACCGCAGCCAG
1621 ACTAGTGCAGCGCGGCCACGAACCCCGATAGCTTTACTGAGTCCGGCAAGTTGCGGTTG
1681 TTCGACGTGATCGAGAACGGCCAGGAGCAGGTCGAGACGTTGGATCTCACTGTCGTCGTG
1741 GATAACCGGTTGTGCGAGGTGTATGCCAACGGGCGCTTTGCGTTGAGCACCTGGGCGAGA
1801 TCGTGGTACGACAATCCACCCAGATCCGCTTCTTCCACAACGGCGAGGGCGAGGTGCAG
1861 TTCAGGAATGTCTCCGTGTCGGAGGGGCTCTATAACGCCTGGCCGAGAGAAATTAG

图 2 β -fructofranosidasecDNA 结构基因

Fig. 2 Nucleotides sequence of fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus* JN19

表 1 β -fructofranosidase 酶活力测定结果

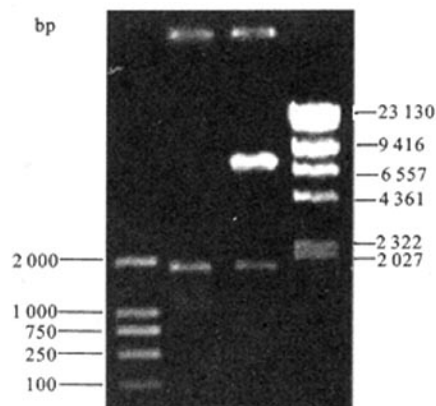
Tab. 1 The activity of fructosyltransferase

菌株/质粒	酶活力/(U/mg)
<i>S. cerevisiae</i> W303-1A	0
<i>S. cerevisiae</i> W303-1A/pYX212-FTA-1	24.6
<i>S. cerevisiae</i> W303-1A/pYX212-FTA-2	28.2

3 讨 论

产 β -呋喃果糖苷酶的微生物菌株主要有黑曲霉、出芽短梗霉、日本曲霉、枯草芽孢杆菌及酿酒酵母,其中黑曲霉和出芽短梗霉已被应用于工业化生产低聚果糖。但目前对 β -呋喃果糖苷酶的研究大

多停留在产酶条件及酶催化条件的优化等方面,缺乏对 β 呋喃果糖苷酶在分子水平上的研究和了解。作者参考文献[2-3],并根据NCBI中公布的编码 β 呋喃果糖苷酶cDNA基因序列,设计了一对引物,成功扩增到了编码 β 呋喃果糖苷酶cDNA的结构基因,并将该基因构建到表达载体pYX212中,构建出携带 β 呋喃果糖苷酶基因的重组体pYX212-FTA。表达载体pYX212是一种穿梭质粒,既可以在大肠杆菌中扩增,又可以在酿酒酵母中诱导表达。 β 呋喃果糖苷酶基因的克隆及在酿酒酵母中的活性表达,为研究该酶催化机制及提高该酶在工业化应用中的适应性奠定了基础,也为 β 呋喃果糖苷酶在基因水平上的研究及改造提供了理论依据。



1. DL2000 DNA Marker; 2. β -fructofuranosidase cDNA 结构基因; 3. pYX212-FTA/BamH I 和 Hind III 样品; 4. λ DNA/Hind III DNA 相对分子质量标准

图3 阳性克隆酶切 agarose 胶电泳图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of positive clone treated with restriction endonuclease

参考文献(References):

- [1] Hidaka H, Hirayama M, Sumi N. A fructo-oligosaccharides producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC20611[J]. *Agric Biol Chem*, 1988, 52: 1181-1187.
- [2] Koji Yanai, Akitaka Nakane, Akemi Kawate. Molecular cloning and characterization of the fructooligosaccharide-producing β -fructo-furanosidase gene from *Aspergillus niger* ATCC20611[J]. *Biosci Biotech Biochem*, 2001, 65: 766-773.
- [3] Rehm J, Willmitzer L, Heyer A G. Production of 1-kestose in transgenic yeast expressing a fructosyltransferase from *Aspergillus foetidus*[J]. *J Bacteriol*, 1998, 180: 1305-1310.
- [4] Somiari R I, Brzeski H, Tate R, et al. Cloning and sequencing of an *Aspergillus niger* gene coding for β -fructofuranosidase[J]. *Biotechnol Lett*, 1997, 19: 1243-1247.
- [5] Wang L M, Zhou H M. Isolation and identification of novel *Aspergillus japonicus* JN19 production β -fructofuranosidase and characterization of the enzyme[J]. *J of Food Biochemistry*, 2006, 30: 641-658.
- [6] 王立梅, 周惠明. 一株曲霉果糖转移酶的发酵条件及转果糖基活性[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(2): 52-55.
WANG Li-mei, ZHOU Hui-ming. Study on fermentation conditions for the production of Fructosyltransferase and trans-fructosylation from *Aspergillus niger*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(2): 52-55. (in Chinese)
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [8] Shimizu S, Kataoka M. Optical resolution of pantolactone by a novel fungal enzyme, lactonohydrolase[J]. *Annals New York of Sciences*, 1996, 34: 650-658.
- [9] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E. Short Protocols in Molecular Biology[M]. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1995.
- [10] Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction[J]. *Anal Biochem*, 1987, 162: 156-159.
- [11] 叶玲, 刘建伟, 刘静. 酿酒酵母感受态细胞的低温保存及酵母菌落 PCR 快速筛选鉴定[J]. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30(6): 956-959.
YE Ling, LIU Jian-wei, LIU Jing. Frozen storage of competent yeast cells and simple procedure for PCR screening yeast recombinant clones[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2003, 30(6): 956-959. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)