

宇佐美曲霉中 β -甘露聚糖酶基因调控序列的克隆

唐存多¹, 赵顺阁², 邬敏辰^{*3}, 史红玲³

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 医药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 建立了一种利用限制性内切酶酶切、pUCm-T 载体连接和巢式 PCR 技术, 基于部分已知 DNA 序列测定其两侧翼未知 DNA 序列的新方法, 命名为 T 载体介导的 PCR 技术, 并将此技术应用用于宇佐美曲霉(*Aspergillus usamii*) E001 的 β -甘露聚糖酶基因(*Aus man5A*) 5' 和 3' 端调控序列的克隆。结果表明: 该 PCR 技术具有操作简便、引物特异性强、结果验证简捷、操作限制少等特点; 借助于 T 载体介导的 PCR 技术、分子克隆和序列测定等手段, 成功地测定了 *Aus man5A* 两侧翼的调控序列。

关键词: 宇佐美曲霉; β -甘露聚糖酶; 基因; 调控序列; T 载体介导的 PCR

中图分类号: Q 78 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2012)02-152-07

Cloning of the Regulatory Sequences of β -mannanase Gene from *Aspergillus usamii*

TANG Cun-duo¹, ZHAO Shun-ge², WU Min-chen^{*3}, SHI Hong-ling³

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this manuscript, a novel T vector-mediated PCR technique was developed by using restriction enzyme digestion, pUCm-T vector ligation and nested PCR technique. This novel method can be used to determine two flanking unknown DNA sequences of a partial known DNA sequence. And this method was applied to clone the 5'- and 3'-end regulatory sequences of β -mannanase gene (*Aus man5A*) from *Aspergillus usamii* E001. The results showed that this method exhibited many advantages, for example, simplicity of operation, high specificity of primers, rapidness of result verification, and few restrictions for operation. By means of T vector-mediated PCR amplification, molecular cloning and DNA sequencing, the flanking regulatory sequences of the *Aus man5A* was successfully determined.

Key words: *Aspergillus usamii*, β -mannanase, gene, regulatory sequence, T vector-mediated PCR

β -甘露聚糖酶(β -mannanase, EC 3. 2. 1. 78)是一种从甘露聚糖和异甘露聚糖(如葡甘露聚糖等)

的主链内部切割 β -1, 4-D-甘露糖苷键的水解酶, 属于半纤维素酶类^[1-2]。近年来, 随着对自然界半纤维

收稿日期: 2011-03-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(20776061)。

* 通信作者: 邬敏辰(1962-), 男, 江苏无锡人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酶工程与基因工程研究。

E-mail: bioch@163. com

素资源的开发、饲料中甘露聚糖“抗营养因子”的消除及甘露寡糖生理功能的发现, β -甘露聚糖酶在食品、医药、饲料、造纸、纺织和石油开采等领域中得到了广泛应用^[3-4]。作者在前期的研究中,通过对微刺曲霉(GenBank accession: L35487)、硫曲霉(GenBank accession: DQ328335)和里氏木霉(GenBank accession: L25310)等丝状真菌 β -甘露聚糖酶氨基酸序列的同源性分析,找出了两段约10个氨基酸的保守序列;基于保守序列设计了两条简并引物,并以宇佐美曲霉(*Aspergillus usamii*)基因组DNA为模板进行PCR扩增,获得了*A. usamii* β -甘露聚糖酶基因的部分DNA序列(GenBank accession: HQ611963);生物信息学分析表明*A. usamii* β -甘露聚糖酶属于糖苷水解酶第5家族,命名为Aus Man5A,其相应的基因命名为Aus man5A。

现有的基于PCR技术测定已知DNA序列两侧翼未知DNA序列的方法主要有3类:反向PCR^[5]、衔接头介导的PCR^[6]和随机引物PCR^[7],其技术核心是在序列未知的情况下如何解决引物设计问题,而上述3种方法代表不同的解决途径,应根据不同的实验特点和要求进行选择^[8]。作者在此基础上,发明了一种操作简便、引物剪剪性强、结果验证简捷、操作限制少、T载体介导的PCR技术(发明专利申请号:201010550843.0),能基于部分已知DNA序列确定其两侧翼未知DNA序列,并利用此技术成功地测定了Aus man5A的调控序列,为进一步研究Aus man5A的表达和调控打下基础。有关T载体介导的PCR技术以及Aus man5A两侧翼调控序列的测定,国内外尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

宇佐美曲霉(*A. usamii*)E001为Aus man5A的供体菌;作者所在研究室保藏;大肠杆菌(*E. coli*)JM109用作基因克隆、质粒转化的受体菌;作者所在研究室保藏;pUCm-T质粒(氨苄青霉素抗性);购自上海生工公司。

1.2 试剂和试剂盒

EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit, EZ-10 Spin Column Plasmid Mini-Preps Kit;购自上海生工公司;250 bp DNA Ladder Marker、各种限制性内切酶、T4 DNA连接酶、*Taq*和*Ex Taq* DNA聚合酶、X-Gal、IPTG;购自大连TaKaRa公司;其它试剂均为国产或进口分析纯。

1.3 培养基

1.3.1 宇佐美曲霉培养基 蛋白胨10 g/L,酵母提取物5 g/L,葡萄糖10 g/L,魔芋粉5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, CaCl_2 1 g/L, MgSO_4 1 g/L, pH 6.0。

1.3.2 L-Broth培养基 蛋白胨10 g/L,酵母提取物5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.4。对于固体平板LB培养基,在L-Broth的基础上添加18 g/L的琼脂粉。

1.4 宇佐美曲霉基因组DNA的提取

参照Garber等的方法并略作修改^[9]。

1.5 引物设计及合成

根据获得的Aus man5A部分DNA序列(GenBank accession: HQ611963)和pUCm-T载体上T/A克隆位点两侧的已知序列,采用引物设计软件Oligo7设计6条特异性引物(表1),由上海生工公司合成。

表1 T载体介导的PCR扩增的引物序列

Tab. 1 The sequences of primers for T vector-mediated PCR amplification

基因片段	引物名称	引物序列(5'-3')
5'端调控序列	T-PrimerF	ACGACTCACTATAGGGCGACA
	Man5A-R1	ATTGTCGATTTGCCGTCCTG
	Man5A-R2	GCAGTTGGTACCAGACTGTG
3'端调控序列	T-PrimerR	CTATGACCATGATTACGCCA
	Man5A-F1	GGGAATACTATCTACTATGGG
	Man5A-F2	GTGATTATCAGTGCCTGGTG

1.6 Aus man5A 5'端调控序列的克隆

1.6.1 Aus man5A 5'端调控序列 PCR 模板构建

分析已知 DNA 序列中的限制性内切酶位点, 选用从 Man5A-R1 到 5'端未知序列之间没有酶切位点且常用的 *Bam*H I 和 *Eco*R V 双酶切 *A. usamii* 基因组 DNA; 10×K Buffer 2 μ L, *Bam*H I 1 μ L, *Eco*R V 1 μ L, 基因组 DNA 10 μ L, 无菌水 6 μ L, 37 °C 反应 4 h。酶切产物的 *Taq* 酶末端补齐和 3'端加 A 反应: 酶切产物 20 μ L, 10×PCR Buffer 2.5 μ L, dNTP 0.5 μ L, *Taq* 酶 0.25 μ L, 无菌水 1.75 μ L, 72 °C 反应 10 min, 目的产物命名为 man5AP。man5AP 与 pUCm-T 的连接: 50% PEG4000 1 μ L, 10×T4 DNA Ligase Buffer 1 μ L, man5AP 6 μ L, pUCm-T 1 μ L, T4 DNA Ligase 1 μ L, 16 °C 连接过夜, 目的产物 (PCR 模板) 命名为 pUCm-T-man5AP。

1.6.2 Aus man5A 5'端调控序列巢式 PCR 扩增

Aus man5A 5'端调控序列的第一轮 PCR: 10×PCR Buffer 5 μ L, dNTP 3 μ L, pUCm-T-man5AP 5 μ L, T-PrimerF 1 μ L, Man5A-R1 1 μ L, 无菌水 34.5 μ L, *Taq* 酶 0.5 μ L; 94 °C 4 min, 30 个循环 (94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s), 72 °C 10 min; PCR 产物命名为 man5AP-Out。第二轮 PCR: 10×PCR Buffer 5 μ L, dNTP 3 μ L, man5AP-Out 1 μ L, T-PrimerF 1 μ L, Man5A-R2 1 μ L, 无菌水 38.5 μ L, *Taq* 酶 0.5 μ L; 94 °C 4 min, 30 个循环 (94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 45 s), 72 °C 10 min; 目的产物命名为 man5AP-In。

1.7 Aus man5A 3'端调控序列的克隆

1.7.1 Aus man5A 3'端调控序列 PCR 模板构建

选用 *Pst* I 和 *Eco*R V 双酶切 *A. usamii* 基因组 DNA; 10×H Buffer 2 μ L, *Pst* I 1 μ L, *Eco*R V 1 μ L, 基因组 DNA 10 μ L, 无菌水 6 μ L, 37 °C 反应 4 h。酶切产物的 *Ex* *Taq* 酶末端补齐和 3'端加 A 反应: 酶切产物 20 μ L, 10×*Ex**Taq* Buffer 2.5 μ L, dNTP 0.5 μ L, *Ex* *Taq* 酶 0.25 μ L, 无菌水 1.75 μ L, 72 °C 反应 10 min, 目的产物命名为 man5A3T。man5A3T 与 pUCm-T 的连接: 体积分数 50% PEG4000 1 μ L, 10×T4 DNA Ligase Buffer 1 μ L, man5A3T 6 μ L, pUCm-T 1 μ L, T4 DNA Ligase 1 μ L, 16 °C 连接过夜, 目的产物 (PCR 模板) 命名为 pUCm-T-man5A3T。

1.7.2 Aus man5A 3'端调控序列巢式 PCR 扩增

3'端调控序列的第一轮 PCR: 10×PCR Buffer 5 μ L, dNTP 3 μ L, pUCm-T-man5A3T 5 μ L, Man5A-F1 1 μ L, T-PrimerR 1 μ L, 无菌水 34.5 μ L, *Taq* 酶 0.5 μ L; 94 °C 4 min, 30 个循环 (94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 90 s), 72 °C 10 min; PCR 产物命名为 man5A3T-Out。第二轮 PCR: 10×PCR Buffer 5 μ L, dNTP 3 μ L, man5A3T-Out 1 μ L, Man5A-F2 1 μ L, T-PrimerR 1 μ L, 无菌水 38.5 μ L, *Taq* 酶 0.5 μ L; 94 °C 4 min, 30 个循环 (94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s), 72 °C 10 min; 目的产物命名为 man5A3T-In。

2 结果与分析

2.1 Aus man5A 5'端调控序列 PCR 模板的构建

在挑选多种限制性内切酶进行预实验的基础上, 最终采用 *Bam*H I 和 *Eco*R V 双酶切 *A. usamii* 基因组 DNA 以构建 5'端调控序列 PCR 扩增模板。具体流程如图 1 所示。

2.2 Aus man5A 5'端调控序列的克隆和序列分析

将巢式 PCR 扩增产物用体积分数 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析, 结果如图 2 所示。第一轮 PCR 产物分别在约 280 bp 和 740 bp 处出现条带 (图 2, 泳道 1), 而第二轮 PCR 产物仅在约 720 bp 处可见特异性目的条带 (图 2, 泳道 2)。将目的条带 man5AP-In 与 pUCm-T 连接 (pUCm-T-man5AP-In), 转化 JM109, 经酶切鉴定正确后送上海生工测序获得了已知 DNA 序列 5'端侧翼序列, 长度为 509 bp (见图 3)。

参照张慧敏等的方法^[10]对 *Aspergillus usamii* β -甘露聚糖酶基因 (Aus man5A) 5'端调控序列进行生物信息学分析。采用 PLACE 软件 (www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html) 预测的 Aus man5A TATA box (TATAAA) 位于图 3 第 255 ~ 260 位^[11]; 采用 NNPP 软件 (www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) 预测的 Aus man5A 转录起始点位于第 272 位的 C (胞苷酸); 采用 ORF Finder 程序 (www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html) 预测的 Aus man5A 翻译起始密码子 ATG 位于第 326-328 位。

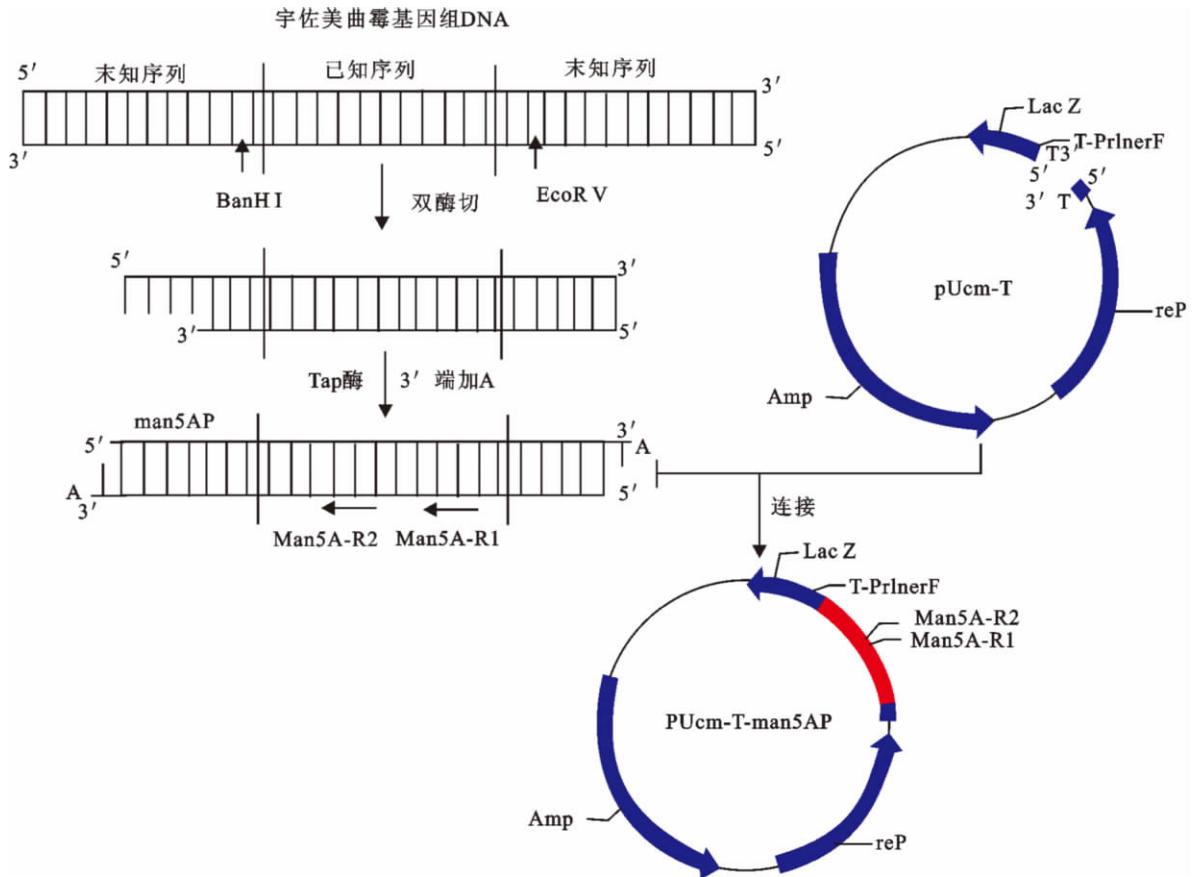
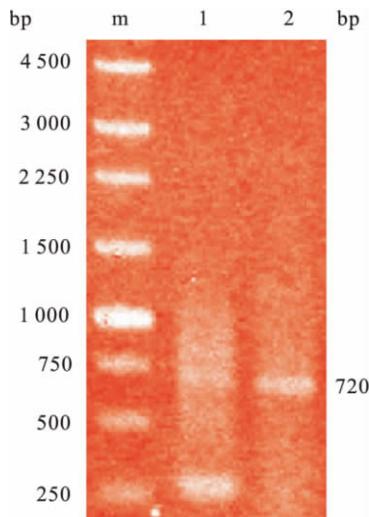


图1 PCR扩增 Aus man5A 5'端调控序列的模板构建的流程图

Fig. 1 Flow chart of the template construction for PCR amplification of Aus man5A 5'-end regulatory gene



M. DNA marker; 1. First-round PCR product with primers T-PrimerF and Man5A-R1; 2. Second-round PCR product with primers T-PrimerF and Man5A-R2

图2 Aus man5A 5'端调控序列 PCR 产物的电泳分析

Fig. 2 Electrophoresis of the PCR products of Aus man5A 5'-end regulatory sequence

2.3 Aus man5A 3'端调控序列 PCR 模板的构建

在挑选多种限制性内切酶进行预实验的基础上,最终采用 *Pst* I 和 *EcoR* V 双酶切 *A. usamii* 基因组 DNA 以构建 3'端调控序列 PCR 扩增模板。具体流程如图 4 所示。

2.4 Aus man5A 3'端调控序列的克隆和序列分析

将巢式 PCR 扩增产物用 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳分析,结果如图 5 所示。第一轮 PCR 产物出现了多条非特异性条带(图 5,泳道 1),而第二轮 PCR 产物仅在约 680 bp 处可见特异性目的条带(图 5,泳道 2)。将目的条带 man5A3T-In 与 pUcm-T 连接(pUcm-T-man5A3T-In),转化 JM109,经酶切鉴定正确后送上海生工测序获得了已知 DNA 序列 3'端侧翼序列,长度为 562 bp(图 6)。

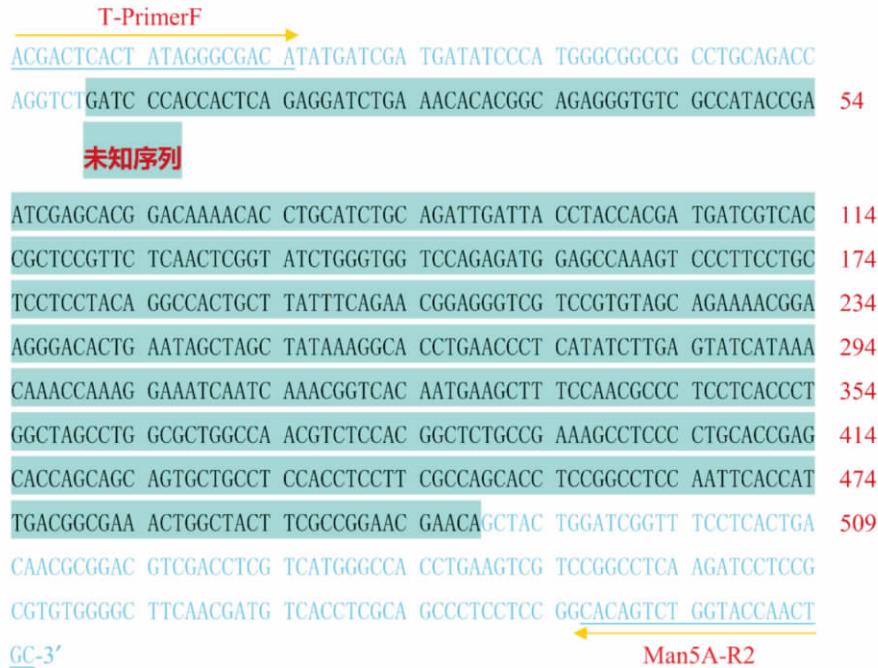


图 3 Aus man5A 5'端调控序列的测序结果
 Fig. 3 The sequence of Aus man5A 5'-end regulatory gene

宇佐美曲霉基因组DNA

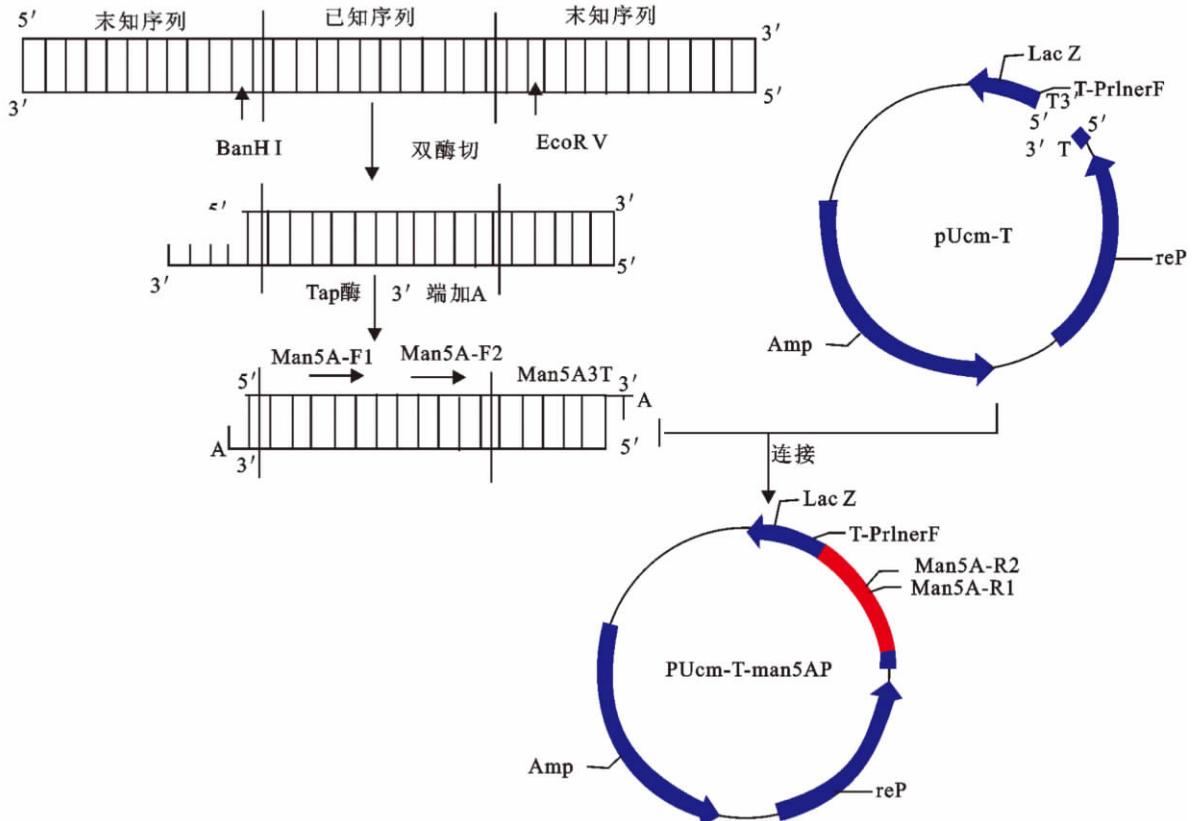
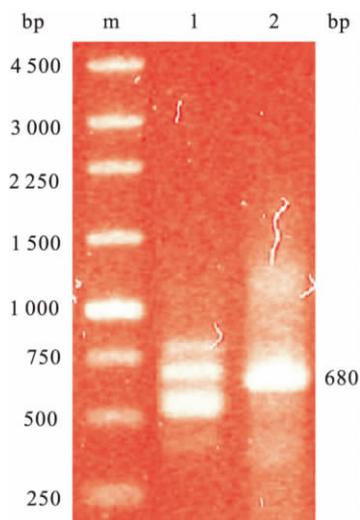


图 4 PCR 扩增 Aus man5A 3'端调控序列的模板构建的流程图

Fig. 4 Flow chart of the template construction for PCR amplification of Aus man5A 3'-end regulatory gene



M. DNA marker; 1. First-round PCR product with primers Man5A-F1 and T-PrimerR; 2. Second-round PCR product with primers Man5A-F2 and T-PrimerR

图5 Aus man5A 3'端调控序列 PCR 产物的电泳分析
Fig. 5 Electrophoresis of the PCR products of Aus man5A 3'-end regulatory sequence

由图 6 可见, Aus man5A 的 poly(A) 加尾信号 AATTTAAA 位于第 184-190 位; 另外, 从 266 bp 至 433 bp 的一段 168 bp 长的 DNA 序列中富含 C(胞苷酸), 表明 Aus man5A 的转录终止是一种典型的依赖于 Rho 因子的转录终止^[12]。

3 结 语

1) 建立了一种 T 载体介导的 PCR 新技术, 能够基于部分已知 DNA 序列确定其两侧翼的未知 DNA 序列, 具有操作简便、引物特异性强、结果验证简捷、操作限制少等特点。

2) 利用 T 载体介导的 PCR 技术, 成功地克隆了宇佐美曲霉-甘露聚糖酶基因(Aus man5A) 5' 和 3' 端的调控序列, 并进行了序列测定。

3) 借助于生物信息学分析的各种软件, 分析了宇佐美曲霉-甘露聚糖酶基因(Aus man5A) 5' 和 3' 端调控序列中的各种调控元件或调控序列。

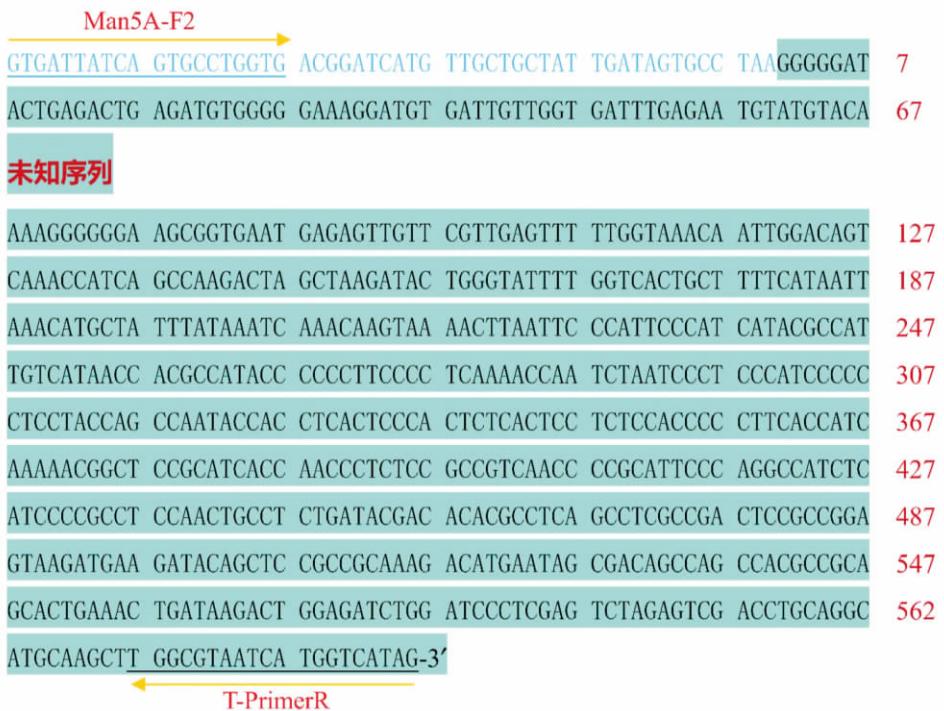


图 6 Aus man5A 3'端调控序列的测序结果
Fig. 6 The sequencing result on Aus man5A 3'-end regulatory sequence

参考文献(References):

[1] Benech R O, Li X M, Patton D, et al. Recombinant expression, characterization, and pulp prebleaching property of a Phanerochaete chrysosporium endo- β -1,4-mannanase[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2007, 41 : 740-747.

[2] Zhang S F, Song J H, Wu M C, et al. Mutation breeding of Aspergillus niger strain LW-1 for high-yield β -mannanase

- production[J]. *Chinese J Agric Biotechnol*, 2008, 5 : 153–158.
- [3] 邬敏辰, 徐春梅, 李剑芳. β -甘露聚糖酶固态发酵的产业化生产技术[J]. *食品与生物技术学报*, 2008, 27 : 64–67.
WU Min-chen, XU Chun-mei, LI Jian-fang. Industrial production technology of the β -mannanase with solid-state fermentation by *Aspergillus niger*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2008, 27 : 64–67. (in Chinese)
- [4] 徐春梅, 邬敏辰, 李剑芳. 魔芋葡甘露聚糖的酶水解工艺条件[J]. *食品与生物技术学报*, 2008, 27 : 120–124.
XU Chun-mei, WU Min-chen, LI Jian-fang. Study on hydrolytic conditions of konjak glucomannan by β -mannanase[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2008, 27 : 120–124. (in Chinese)
- [5] 刘森. PCR 聚合酶链反应[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.
- [6] Wu M C, Wang J Q, Zhang H M, et al. Cloning and sequence analysis of an acidophilic xylanase (XynI) gene from *Aspergillus usamii* E001[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2010.
- [7] Wang S M, He J, Cui Z L, et al. Self-formed adaptor PCR: a simple and efficient method for chromosome walking[J]. *Appl environ microbiol*, 2007, 73 : 5048–5051.
- [8] 洪登峰, 万丽丽, 杨光圣. 侧翼序列克隆方法评价[J]. *分子植物育种*, 2006, 4 : 280–288.
HONG Deng-feng, WAN Li-li, YANG Guang-sheng. Estimation of techniques about cloning the flanking DNA sequence [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2006, 4 : 280–288. (in Chinese)
- [9] Zhou C Y, Bai J Y, Deng S S, et al. Cloning of a xylanase gene from *Aspergillus usamii* and its expression in *Escherichia coli*[J]. *Biores Technol*, 2008, 99 : 831–838.
- [10] 张慧敏, 李剑芳, 邬敏辰. 圆弧青霉脂肪酶基因序列的生物信息学分析[J]. *食品与生物技术学报*, 2010, 29 : 602–608.
ZHANG Hui-min, LI Jian-fang, WU Min-chen. Bioinformatics analysis on the sequence of lipase gene from *Penicillium cyclopium*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2010, 29 : 602–628. (in Chinese)
- [11] Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database[J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27 : 297–300.
- [12] 周爱儒. 生物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004.

2012 中国食品与农产品质量安全检测技术应用国际论坛暨展览会

会议背景介绍:为配合农业部《农产品质量安全发展“十二五规划”》和《全国农产品质量安全检验检测体系第二期建设规划》的实施,配合工信部加强对 45 万多家食品生产企业质量安全检测能力建设、包括启动 4~5 个“检测技术示范中心”建设,配合质检总局对进出口农产品和食品监管的进一步加强,配合卫生部全力加强对食品安全综合协调和管理,配合工商部门加强食品流通环节的监管,经研究,中国仪器仪表学会分析仪器分会和中国仪器仪表学会农业仪器应用技术分会将于 2012 年 6 月 4 日—6 日在北京国际会议中心举办“2012 中国食品与农产品质量安全检测技术应用国际论坛暨展览会”。

本届论坛会将围绕“为构建我国食品安全保障体系,进一步推动食品、农产品检测新技术的广泛应用,完善食品与农产品质检体系建设”的主题来开展论坛和展示活动。论坛的主会场将邀请我国食品、农产品各监管部门的领导和食品质检领域的著名学者做主题报告,同时依据食品与农产品质量安全检测的诸要素,设立几个专题论坛,以确保食品与农产品质检领域的科技人士和仪器设备生产企业的专家能得到充分的交流和互动。