

黑曲霉 N25 植酸酶 *phyA* 基因的克隆及序列分析*

王红宁¹ 吴琦² 刘世贵¹ 谢晶² 马孟根²

(¹ 四川大学生命科学院 成都 610064) (² 四川农业大学动物科技学院 雅安 625014)

摘 要:通过对黑曲霉 N25 植酸酶 *phyA* 基因 PCR 扩增,获得了一条长约 1.6kb 的特异性 PCR 产物,并进行了酶切鉴定。然后在 pUC18 质粒中构建了含有目的基因片段的克隆质粒 pFNP-1。DNA 序列测定表明,目的基因片段含有植酸酶 *phyA* 基因的完整序列,*phyA* 基因全长 1506bp,其中包含一段长 102bp 的内含子,编码 467 个氨基酸,5' 端有一段编码 19 个氨基酸的信号肽序列。黑曲霉 N25 与产植酸酶酶活最高的天然黑曲霉标准菌株 NRRL3135 的植酸酶 *phyA* 基因(GenBank Accession: M94550)相比较,其同源性为 96.746%,编码的氨基酸序列同源性为 97.64%。将黑曲霉 N25 植酸酶 *phyA* 基因序列及其相应的氨基酸序列在国际基因库中注册(注册号分别为: AF218813, AAF25481.1),此基因是目前中国在国际基因库中注册的第一个植酸酶 *phyA* 基因。

关键词: 黑曲霉, 植酸酶, *phyA* 基因, PCR, 序列分析

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 03-0310-05

猪、禽饲料主要来源的玉米、豆饼粕、谷糠、棉籽饼粕所含的磷约 40% ~ 70% 以植酸磷的形式存在。猪、禽等单胃动物,消化道内缺乏能分解消化植酸磷的酶,仅能利用玉米中磷的 10% ~ 20%、豆饼中磷的 25% ~ 35%,典型猪日粮中磷的利用率只有 15%,其余 85% 左右的磷从粪便中排出^[1,2]。一些国家从环保的角度对集约化畜牧场已提出了限制排磷的要求^[3]。此外,植酸盐通过螯合作用还可降低动物对锌、锰、铁、钙、钾等主要微量元素的利用率;通过与蛋白质结合成植酸复合体而降低动物对蛋白质的消化吸收率,从而使整个饲料的利用率降低^[1-3]。

植酸酶(Phytase)是催化植酸及植酸盐水解成肌醇与磷酸(或磷酸盐)的一类酶的总称^[4]。大量研究表明,在猪、禽日粮中添加植酸酶,可使饲料中磷的利用率提高 40% ~ 60%,粪便中磷的排出量减少 30% ~ 50%^[5-7]。通过植酸酶菌株筛选,特别是通过植酸酶基因工程菌的研究,提高植酸酶的产量,降低生产及应用成本,已成为研究热点。姚兵等^[8-9]进行了黑曲霉 963 植酸酶 *phyA2* 基因的序列测定和在毕赤酵母中的表达研究。

本试验拟对从我国自行分离、筛选出的植酸酶高产黑曲霉菌株 N25,进行植酸酶 *phyA* 基因的 PCR 扩增,*phyA* 植酸酶基因的克隆和序列测定,为黑曲霉 N25 植酸酶 *phyA* 基因高效表达载体的构建,最终降低植酸酶的生产成本提供基础材料和科学依据。

*“九五”国家重点科技攻关项目(96-009-02-06)

作者简介:王红宁(1963-),女,四川省西昌市人,四川农业大学教授,动物传染病与预防兽医学、微生物学专业硕士研究生导师,主要从事现代遗传与生物工程研究。

收稿日期:2000-08-14, **修回日期:**2000-10-20

1 材料和方法

1.1 试验菌株

黑曲霉 (*Aspergillus niger*) N25 为我国自行分离鉴定的产植酸酶菌株。

1.2 黑曲霉细胞总 DNA 的提取

将黑曲霉 N25 孢子接种于马铃薯培养基中, 28℃ 培养, 待完全产孢后, 用无菌 0.2% 吐温-80 溶液制成孢子悬液。将孢子悬液接种到 200mL 的玉米浸提液培养基内, 28℃ 水浴 180r/min 摇瓶培养 18~24h, 收集菌丝体, 按 Ehrlich 等^[10] 的方法提取黑曲霉细胞总 DNA。

1.3 黑曲霉植酸酶 *phyA* 基因的 PCR 扩增及其产物的酶切分析

1.3.1 引物设计: 根据从基因库下载的多条黑曲霉植酸酶 *phyA* 基因序列 (Accession: M94550, L02421, A19451, Z16414, A19452), 结合已报道的黑曲霉植酸酶 *phyA* 基因 PCR 引物, 用 OLIGO 软件设计、分析、筛选出下列 1 对 24mer 引物, 与模板配对均有 16 个碱基, 且与 *phyA* 基因有部分重合, 在上下游引物中引入 *EcoR* I 和 *Kpn* I 酶切位点。

上游引物——P₁ 5' CGGAATTCTCTCATAGGCATCATG3';

下游引物——P₂ 5' CTGGTACCGTARTTCAGCTAAGCA3'。

1.3.2 植酸酶 *phyA* 基因的 PCR 扩增: 黑曲霉细胞总 DNA 模板 750mg, MgCl₂ 终浓度为 2.5mmol/L, dNTPmixture 终浓度各为 0.25mmol/L, 上、下游引物终浓度各为 0.4μmol/L, Taq 酶 4.0U, 反应总体积 100μL。PCR 反应参数: 94℃ 预变性 7min, 然后进入循环: 94℃ 变性 1min, 55℃ 复性 1min, 72℃ 延伸 1.5min, 经过 35 个循环后, 在 72℃ 延伸 10min 结束反应。

1.3.3 植酸酶 *phyA* 基因 PCR 扩增产物的酶切分析: 根据对基因库下载的黑曲霉植酸酶 *phyA* 基因序列的酶切位点分析, *phyA* 基因含有 *Bam*H I *Sac*I、*Sal*I 等限制性内切酶的单一酶切位点, 不含有 *Hind* III、*Xba* I、*Kpn* I、*Pst* I 等限制性内切酶的酶切位点, 用这些限制性内切酶对经纯化后的 PCR 扩增产物进行酶切图谱分析。

1.4 *phyA* 基因 PCR 产物的克隆

采用 DNA 纯化试剂盒进行目的 DNA 片段 (植酸酶 *phyA* 基因 PCR 产物) 的纯化, 采用碱法抽提 pUC18 质粒 DNA。将纯化的 DNA 和 pUC18 质粒 DNA 分别用 *EcoR* I 和 *Kpn* I 进行双酶切。按《分子克隆实验指南》^[11] 采用氯化钙法制备大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 进行连接反应、转化、阳性克隆菌株的筛选及电泳鉴定。

1.5 克隆片段的 DNA 序列测定

阳性克隆菌株质粒 DNA 由宝生生物工程(大连)有限公司进行克隆片段的 DNA 序列测定, 并对测序结果进行分析。

2 结果和讨论

2.1 *phyA* 基因 PCR 扩增及其产物的酶切

酶切结果见图 1。从图 1 可以看出, 在此 PCR 反应条件下, 获得了一条长约 1.6kb 的特异性 PCR 扩增条带, 符合 *phyA* 基因的理论长度。扩增片段不被 *Hind* III、*Xba* I 和 *Pst* I 所酶切, 而被 *Bam*H I 酶切为约 700bp 和 900bp 的两个片段、被 *Sac* I 酶切为约 500bp 和

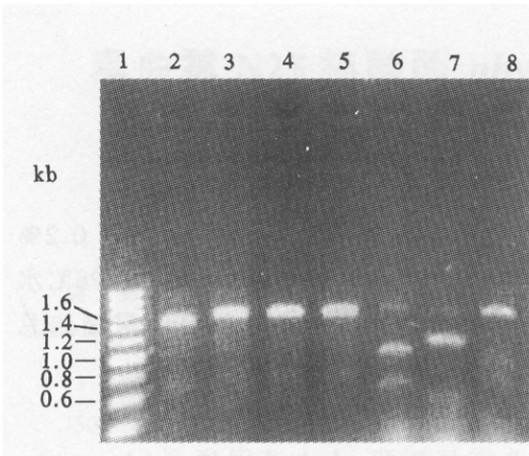


图1 植酸酶 *phyA* 基因 PCR 扩增及其产物的酶切分析

Fig.1 Enzyme digestion of the PCR product of phytase *phyA*

1. 200bp DNA ladder; 2. PCR product; 3. PCR product/*Hind* III; 4. PCR product/*xba* I; 5. PCR product/*Pst* I; 6. PCR product/*Sal* I; 7. PCR product/*Sal* I; 8. PCR product/*Bam* HI.

1100bp 的两个片段、被 *Sal* I 酶切为约 600bp 和 1000bp 的两个片段。此结果与已知的黑曲霉植酸酶 *phyA* 基因的酶切图谱基本一致,结合 PCR 产物的特异性,初步判断此 PCR 产物含有 *phyA* 基因。

2.2 植酸酶 *phyA* 基因 PCR 产物的克隆

在含有 X-gal 和 Amp 的培养基上,挑取白色菌落,获得含有阳性克隆质粒的菌株 pFNP-1。经电泳检测,阳性克隆质粒 DNA 比 pUC18 质粒 DNA 长约 1.6kb。

2.3 克隆片段的 DNA 序列测定及分析

测序结果表明:PCR 产物全长 1562bp,其中包含 1506bp 植酸酶 *phyA* 基因全序列,GenBank 注册号为 AF218813,蛋白质编号为 AAF25481 (图 2)。从图 2 可以看出,PCR 扩增产物中的黑曲霉 N25 植酸酶 *phyA* 基因全序列,其结构基因全长 1506bp,其中 +45bp ~ +146bp 的 102 个核

苷酸序列是一典型的真菌内含子序列,基因含有真菌内含子的特征保守序列^[12]:供体序列(Donor)—GTATGC、套索序列(Lariat)—GCTGAC 及受体序列(Acceptor)—CAG。黑曲霉 N25 *phyA* 基因中的 G + C 含量较高,达到 52%,而密码子第三位碱基的 G + C 含量更高达 62.7%。在密码子第三位碱基上高频使用 G 和 C 碱基是曲霉中高效表达蛋白编码序列所具有的特征之一^[13]。从上图可以看出,黑曲霉 N25 *phyA* 基因相应的氨基酸序列共有 467 个氨基酸,其中,根据 Von Heijne^[14] 的信号肽切割位点的预测原则并结合已知的植酸酶氨基酸序列分析,信号肽切割位点位于第 19 个氨基酸残基之后,其余的 448 个氨基酸残基为成熟植酸酶的氨基酸序列。从氨基酸序列上还找到了植酸酶的活性位点序列(Active-site sequence)^[4]:CRVTFAQVLSRHGARYPTDSK GK,它位于氨基酸序列的 +71 ~ +93。其中 RHGARYPT 是微生物来源的植酸酶活性位点中最保守的序列。

与目前报道的产植酸酶酶活最高的天然黑曲霉标准株 NRRL3135(来源于 *Aspergillus niger* (ficcum) var. *awamori*) 的 *phyA* 基因(GenBank Accession: M94550) 的序列比较,二者在结构基因的长度、所编码氨基酸的长度、信号肽编码序列、内含子序列及其位置等均相同,在 DNA 序列上仅有 49 个位置上的碱基不相同,同源性达到 96.75% (1457/1506)。二者植酸酶 *phyA* 基因相应的氨基酸序列,在氨基酸残基个数、信号肽及其位置、植酸酶活性位点序列及其位置均完全相同,仅有 11 个氨基酸残基不同,同源性高达 97.64% (456/467)。来源于黑曲霉的植酸酶 *phyA* 是一种糖基化蛋白,Yanming 等^[15,16] 的研究表明,糖基化对表达的 *phyA* 的生物合成和热稳定性至关重要。在黑曲霉 N25 *phyA* 基因编码的氨基酸序列上,发现了 10 个潜在的 N-糖基化位点(Asn-Xaa-Ser/Thr, X 为任意氨基酸),与黑曲霉 NRRL3135 株 *phyA* 基因编码的氨基酸序列上的 N-糖基化位点个数的位置完全相同。

```

DNA:  ATG GGC GTC TCT GCT GTT CTA CTT CCT TTG TAT CTC CTG TCT GG gta tgc taa gca cca 59
aa :   M  G  V  S  A  V  L  L  P  L  Y  L  L  S  G                               15
cta tca aag tct aat aag gac cct ctc tgc cga ggg ccc ctg jag ctc gga ctg tgt ggg act act gat cgc tga cca tct 140
gtg cag A GTC ACC TCC GGA CTG GCA GTC CCC GCC TCG AGA AAT CAA TCC ACT TGC GAT ACG 201
      V  T  S  G  I  L  A  V  P  A  S  R  N  Q  S  S  C  D  T  33
GTC GAT CAG GGG TAT CAA TGC TTC TCC GAG ACT TCG CAT CTT TGG GGT CAA TAC GCA CCG 261
      V  D  Q  G  Y  Q  C  F  S  E  T  S  H  L  W  G  Q  Y  A  P  53
TTC TTT TCT CTG GCA AAC GAA TCG GCC ATC TCT CCT GAG GTG CCC GCC GGA TGC CGA GTC 321
      F  F  S  L  A  N  E  S  V  I  S  P  E  V  P  A  G  C  R  V  73
ACT TTC GCT CAG GTC CTC TCC CGT CAT GGA GCG CGG TAT CCG ACC GAC TCC AAA GGC AAG 381
      T  F  A  Q  V  L  S  R  H  G  A  R  Y  P  T  D  S  K  G  K  93
AAA TAC TCC GCT CTC ATT GAG GAG ATC CAG CAG AAT GCG ACC ACC TTT GAC GGG AAA TAT 441
      K  Y  S  A  L  I  E  E  I  Q  Q  N  A  T  T  F  D  G  K  Y  113
GCC TTC CTG AAG ACA TAC AAC TAC AGC CTG GGT GCA GAT GAC CTG ACT CCT TTC GGA GAA 501
      A  F  L  K  T  Y  N  Y  S  L  G  A  D  D  L  T  P  F  G  E  133
CAG GAG CTA GTC AAC TCC GGC ATC AAG TTC TAT CAG CGA TAC GAA TCG CTC ACA AGA AAC 561
      Q  E  L  V  N  S  G  I  K  F  Y  Q  R  Y  E  S  L  T  R  N  153
ATC ATT CCA TTC ATC CGA TCC TCT GGC TCC AGC GCG GTG ATC GCC TCC GGC AAG AAA TTC 621
      I  V  P  F  I  R  S  S  G  S  S  R  V  I  A  S  G  K  K  F  173
ATC GAG GGC TTC CAG AGC ACC AAG CTG AAG GAT CCT CGT GCC CAG CCC GGC CAA TCG TCG 681
      I  E  G  F  Q  S  T  K  L  K  D  P  R  A  Q  P  G  Q  S  S  193
CCC AAG ATC GAC GTG GTC ATT TCC GAG GCC AGC TCA TCC AAC AAC ACT CTC GAC CCA GGC 741
      P  K  I  D  V  V  I  S  E  A  S  S  S  N  N  T  L  D  P  G  213
ACC TGC ACT GTC TTC GAA GAC AGC GAA TTG GCC GAT GCC GTC GAA GCC AAT TTC ACC GCC 801
      T  C  T  V  F  E  D  S  E  L  A  D  A  V  E  A  N  F  T  A  233
ACG TTC GTC CCC ACC ATT CGT CAA CGT CTG GAG AAC GAC CTG TCT GGC GTG TCT CTC ACA 861
      T  F  V  P  S  I  R  Q  R  L  E  N  D  L  S  G  V  T  L  T  253
GAC ACA GAG GTG ACC TAC CTC ATG GAC ATG TGC TCC TTC GAC ACC ATC TCC ACC AGC ACC 921
      D  T  E  V  T  Y  L  M  D  M  C  S  F  D  T  I  S  T  S  T  273
GTC GAC ACC AAG CTG TCC CCC TTC TGT GAC CTG TTC ACT CAT GAC GAA TGG ATC AAC TAC 981
      V  D  T  K  L  S  P  F  C  D  L  F  T  H  D  E  W  I  N  Y  293
GAC TAC CTC CAG TCC CTG AAA AAG TAC TAC GGC CAT GGC GCG GGT AAC CCG CTC GGC CCG 1041
      D  Y  L  Q  S  L  K  K  Y  Y  G  H  G  A  G  N  P  L  G  P  313
ACC CAG GGC GTC GGC TAC GCT AAC GAG CTC ATC GCC CGT GTC ACC CAC TCG CCT GTC CAC 1101
      T  Q  G  V  G  Y  A  N  E  L  I  A  R  L  T  H  S  P  V  H  333
GAT GAC ACC AGC TCC AAC CAC ACA TTG GAC TCT AAC TCG GCT ACC TTT CCG CTC AAC TCT 1161
      D  D  T  S  S  N  H  T  L  D  S  S  P  A  T  T  F  P  L  N  S  353
ACT CTC TAC GCG GAC TTT TCC CAC GAT AAC GGC ATC ATC TCT ATT CTC TTT GCT TTA GGT 1221
      T  L  Y  A  D  F  S  H  D  N  G  I  I  S  I  L  F  A  L  G  373
CTG TAT AAC GGC ACC AAG CCG CTG TCT ACC ACG ACC GTG CAG AAT ATC ACC CAG ACA GAT 1281
      L  Y  N  G  T  K  P  L  S  T  T  T  V  E  N  I  T  Q  T  D  393
GGA TTC TCG TCT GCT TGG ACG GTT CCG TTT GCT TCG CTG TAC GTC GAG ATG ATG CAA 1341
      G  F  S  S  A  W  T  V  P  F  A  S  R  L  Y  V  E  M  M  Q  413
TGT CAG GCG GAG CAG GAG CCG CTG GTC CGT GTC TTG GTT AAT GAT CGC GTT GTC CCG CTG 1401
      C  Q  A  E  Q  E  P  L  V  R  V  L  V  N  D  R  V  V  P  L  433
CAT GGG TGT CCG GTT GAT GCT TTA GGG AGA TGT ACC CGA GAT AGC TTT GTG AAG GGG TTG 1461
      H  G  C  P  V  D  A  L  G  R  C  T  R  D  S  F  V  R  G  L  453
AGC TTT GCT AGA TCT GGG GGT GAT TGG GCG GAG TGT TTT GCT TAG 1506
      S  F  A  R  S  G  G  D  W  A  E  C  F  A  *  467

```

图 2 黑曲霉 N25 植酸酶 *phyA* 基因 DNA 序列及推导出的氨基酸序列

Fig.2 The DNA sequence of *phyA* and deduced amino acid sequence of *A. niger* N25 strain

Note: The intron is indicated by lower-case letters; Signal peptide cleavage site is indicated by arrow; The active-site amino acids sequence is underlined; Potential N-glycosylation sites are indicated by amino acids N underlined doubly.

由此可见,黑曲霉 N25 黑曲霉 NRRL3135 植酸酶 *phyA* 基因具有高度同源性,且该菌株是作者分离的 100 多株丝状真菌中产植酸酶酶活最高的黑曲霉菌株,可作为进一步构建植酸酶 *phyA* 基因表达载体的材料。现已构建成 *phyA* 基因的 pPICqk 表达载体,并在巴斯德毕赤酵母中获得高效表达,详细内容将另文报道。

参 考 文 献

- [1] 王红宁,黄 勇,陈 惠,等.国外畜牧学——饲料,1999,3:9~10.
- [2] Cantor A H.中国饲料,1993,1:40~43.
- [3] 罗绪刚,刘 彬.荷兰猪饲粮种微生物植酸酶应用研究及相关环境问题.见:饲料营养研究进展.北京:亚洲中医药杂志社,1998.77~86.
- [4] Rudy J W,Ullah A H J *Advances in applied microbiology*.1996,42:263~302.
- [5] 黄遵锡,章克昌.食品与发酵工业.1999,25(2):54~58.
- [6] 蒋守群,吴天星.动物营养学报,1999,11(3):1~11.
- [7] 武素平.中国饲料,1996,18:25~26.
- [8] 姚 斌,张春义,王建华,等.农业生产技术学报,1998,6(1):1~6
- [9] 姚 斌,张春义.中国科学(C辑),1998,28(3):237~243.
- [10] Ehrlich K C,Helly V R,Conneely O M, et al. *J Ind Microbiol*,1995,14:396~402.
- [11] J 萨姆布鲁克,E F 弗里奇,T 曼尼阿蒂斯著(金冬雁,黎孟枫等译).分子克隆实验指南.第二版.北京:科学出版社,1998.
- [12] Rambosek J,Leach J. *Crit Rev Biotechnol*,1987,6:357~393.
- [13] Lloyd A T,Sharp P M. *Mol Gen Genet*,1991,230:288~294.
- [14] Von Heijing G. *Nucleic Acide Res*,1986,14:4683~4690.
- [15] Yanming Han,David B,Wilson, et al. *Applied and Environmental Microbiology*.1999,65(5):1915~1918.
- [16] Han Yanming,Lei Xingen *Archives Biochemistry Biophysics*.1999,364(1):83~90.

CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF THE PHYTASE *PHYA* GENE OF *ASPERGILLUS NIGER* N25 *

Wang Hongning¹ Wu Qi² Liu Shigui¹ Xie Jing² Ma Menggen²

(¹ College of Life Science, Sichuan University, Chengdu, 610064 China)

(² College of Animal Technology and Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: The *phyA* encoding phytase of *Aspergillus niger* N25 was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) with primers designed according to the sequences of the *phyA* in GenBank. The amplified fragment was cloned and sequenced. The results show that: the coding region is 1506bp in size, includes a 102bp intron, and encodes a peptide of 476 amino acid residues, in which there is a signal peptide with 19 amino acids and a mature peptide of 448 amino acids. Comparison of this sequence with the *phyA* of the natural *A. niger* NRRL3135 (GenBank Accession: M94550), the most highly secreting-phytase strain, shows that the nucleotide homology is as high as 96.746%, and the amino acid homology comes up to 97.64%. The *phyA* of *A. niger* N25 strain in this paper is appropriate to be used to construct the phytase gene-engineering bacteria. The *phyA* and its amino acid sequence have been accessed by GenBank (Accession: AF218813, AAF25481.1).

Key words: *Aspergillus niger*, Phytase, *phyA*, PCR, Sequence analysis

* Project of Chinese National Programs for Science and Technology Development(96-009-02-06)