

# 菊粉酶酶源菌株筛选及其基因克隆

张苓花 王运吉\* 叶淑红 张福琪

(大连轻工业学院 食品科学与生物工程系 大连 116001)

**摘 要** 筛选出一株产菊粉酶酶源菌株 AF10 鉴定为黑曲霉(*Aspergillus niger*)。PCR 扩增 AF10 的内切菊粉酶基因 *inuA1* 并进行核苷酸序列分析。结果表明 *inuA1* 全长 1551bp, 没有内含子, 所编码的氨基酸序列中, 存在 4 个潜在的 N-糖基化位点, 其中存在菊粉酶的保守序列 WMNEPN。以 pUC118 为克隆载体, 以 *E. coli* JM109 为受体菌株, 获得菌粉酶基因克隆。

**关键词**: 黑曲霉, 菊粉酶, 基因克隆

中图分类号: Q812 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2002)03-0321-05

菊粉酶(Inulinase or Inulase)可分为两类<sup>[1,2]</sup>, 一类是内切菊粉酶(Endoinulinase, EC 3.2.1.7), 主要水解产物是寡聚糖; 另一类为外切菊粉酶(Exoinulinase, EC 3.2.1.80), 水解产物主要是果糖。菊粉酶广泛存在于植物和微生物中。利用菊粉酶水解菊粉生产寡聚果糖或超高果糖浆, 具有巨大的工业应用潜力。野生型微生物菊粉酶表达量比较低, 利用基因工程技术构建菊粉酶基因工程菌, 有望提高菊粉酶的表达量。国外已报道了来源于节杆菌(*Arthrobacter* sp.) 克鲁维酵母(*Kluyveromyces*) 青霉(*Penicillium*) 黑曲霉(*Aspergillus niger*) 及无花果曲霉(*Aspergillus ficuum*) 等内切菊粉酶基因的分子克隆<sup>[3-6]</sup>。本文报道菊粉酶酶源菌株的筛选及其内切菊粉酶基因的克隆和序列分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 菊粉酶产生菌分离样品

菊芋根部土壤。

### 1.2 菊芋

采自野生菊芋。

### 1.3 培养基

1.3.1 初筛培养基 菊粉 20g, 蛋白胨 10g, 酵母膏 10g, 琼脂 20g, 定容至 1L。(菊粉单独灭菌, 加入已熔化并冷却到 50℃的琼脂培养基中, 混匀制平板)。

1.3.2 复筛培养基 菊芋 10g, 酵母膏 5g, 氯化钠 5g, 磷酸氢二钾 3g, pH6.0, 定容至 1L。

1.3.3 察氏培养基 按文献[7]方法配制。

1.3.4 LB 培养基 按文献[8]方法配制。

### 1.4 菌种和质粒

*E. coli* JM109、质粒 pUC118 购自日本宝生物工程(大连)有限公司。

\* 通讯作者

作者简介 张苓花(1957-), 女, 辽宁省大连市人, 大连轻工业学院教授, 主要从事微生物和分子生物学教学及科研工作。

收稿日期 2001-07-23, 修回日期 2001-11-26 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

## 1.5 试剂

DNA 提取液 :在 60mL 水中加入 20mL 500mmol/L Tris-HCl (pH9.0) 和 8mL 500mmol/L EDTA (pH8.0) 加水定容至 100mL。菊粉为 sigma 公司产品 ,DNA 聚合酶、PCR 产物回收试剂盒等购自日本宝生物工程(大连)有限公司。

## 1.6 菊粉酶酶源菌株的筛选

**1.6.1 初筛** :取分离样品于无菌生理盐水中 ,30℃ ,180 r/min 振荡 30min ,按不同稀释度涂布于初筛培养基上 ,培养 2~3d ,挑选透明圈直径与菌落直径之比较大的菌株。

**1.6.2 复筛** :初筛得到的菌株 ,接种于 30 mL 发酵培养基中 ,30℃ ,150 r/min 摇床发酵 ,跟踪测定菊粉酶活性 ,从中筛选高产菌株。

**1.6.3 菊粉酶活性测定**<sup>[9]</sup> :菊粉酶活性单位定义 :pH5.5、55℃ 条件下每分钟水解底物生成 1 $\mu$ mol 还原糖所需的酶量为一个酶活单位。酶活性测定 :以 2% 菊粉为底物 ,pH4.6 ,50℃ 水解 15min ,用 3,5-二硝基水杨酸测定产生的还原糖量。

## 1.7 菊粉酶酶源菌株的鉴定<sup>[7]</sup>

**1.7.1 菌落形态观察** :将待鉴定菌株涂布于察氏培养基平板上 ,28℃ 培养 ,2 周内跟踪观察菌落形态。镜下形态观察 :在涂有察氏培养基的盖玻片上接种待鉴定菌 ,置于培养皿中 ,加入甘油保湿 ,28℃ 培养 4 天内跟踪观察其镜下形态。

## 1.8 菊粉酶基因克隆

**1.8.1 提取黑曲霉 AF10 基因组 DNA**<sup>[10]</sup> :AF10 活化后接种于 200mL 马铃薯液体培养基中 ,28℃、135r/min 摇床培养 2h ,离心并洗涤菌丝体。无菌研钵中 ,用液氮将菌丝体迅速研磨成粉末状。在 1.5mL 离心管中加入约 0.1g 菌体和 500 $\mu$ L DNA 提取液 ,振荡使之充分混合 ,再加入 100 $\mu$ L 10% SDS、氯化苄 300 $\mu$ L ,剧烈振荡使管内混合物成乳状 ,在 50℃ 保温 1h。然后加入 300 $\mu$ L 3mol/L NaAc (pH5.2) 混匀 ,冰水浴 15min ,6 000r/min 离心 15min ,收集上清液。加入等体积无水乙醇室温沉淀 20min。10 000r/min 室温离心 15min ,沉淀用 70% 乙醇洗一次 ,室温尽量挥发残留的痕量乙醇 ,TE 缓冲液溶解 DNA。每个离心管加入 1 $\mu$ g/ $\mu$ L 的 RNase 酶 ,37℃ 恒温 30min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定 ,以  $\lambda$ DNA/*Hind*III 作为 DNA 分子量标记 ,10V/cm 电压下电泳 30min。

**1.8.2 PCR 扩增菊粉酶基因 *inuA1*** :以 AF10 基因组 DNA 为模板 ,以文献 [3] 报道的 *A. niger* 菊粉酶基因序列为参考设计并合成 PCR 引物 ,用 *Pyrobest* DNA 聚合酶 ,扩增 *inuA1*。

引物 :F<sub>1</sub> : 5'-ATGAATCGTTGAATCCGAAGGT -3' ; R<sub>1</sub> : 5'-TCCCCGGGATTCAAGTGAACACTCC-3' ,引物由日本宝生物工程(大连)有限公司合成。

PCR 反应 :Buffer 5 $\mu$ L ,dNTP 4 $\mu$ L ,F<sub>1</sub> 0.5 $\mu$ L ,R<sub>1</sub> 0.5 $\mu$ L ,AF10DNA 2 $\mu$ L ,*Pyrobest* DNA 聚合酶 0.25 $\mu$ L ,dH<sub>2</sub>O 37.75 $\mu$ L 反应条件 :94℃ 1min ,然后以 98℃ 15s、55℃ 30s、72℃ 2min 为一个循环 ,共运行 35 个循环。并对 PCR 产物按文献 [8] 方法精制、回收。

**1.8.3 PCR 产物核苷酸序列测定及分析** :PCR 产物核苷酸序列由日本宝生物工程(大连)有限公司测定 ,序列分析按文献 [11] 方法进行。

**1.8.4 菊粉酶基因 *inuA1* 的克隆** :为了使上述 PCR 产物与平滑末端的载体 pUC118 连接 ,首先用 'TaKaRa BKL Kit' 对 PCR 产物进行 3' 末端的平滑化和 5' 末端的磷酸化。向 Eppendorf 中加入 Blunting Kination Enzyme 10 $\times$  Blunting Kination Buffer 2 $\mu$ L ,PCR 反应液

7 $\mu$ L dH<sub>2</sub>O 10 $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C, 10min。产物用 TaKaRa Micropure EZ 精制。加入 1 $\mu$ L 经“ TaKaRa BAP, CIAP”脱磷酸化处理的具有平滑末端的载体 pUC118, Ligation solution A 6 $\mu$ L, 充分混合, 16 $^{\circ}$ C 过夜, 全部反应液用热冲击法转化 *E. coli* JM109<sup>[8]</sup>, 涂布于含有 Amp 和 X-gal/IPTG 的 LB 培养基平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养 24h, 挑选白色菌落做质粒的酶切分析和 PCR 鉴定。

## 2 结果和讨论

### 2.1 菊粉酶酶源菌株的筛选

初筛获得 18 株产菊粉酶的霉菌, 复筛, 测定发酵液菊粉酶活性, 其中 5 株酶活性较高, 结果见表 1。由表 1 可见, 5 株霉菌, 显示不同程度的酶活性, 其中 AF10 酶活性最高, 为 48.0U/mL, 以下以菌株 AF10 为研究对象。

### 2.2 菊粉酶酶源菌株的鉴定

对 AF10 菌株进行菌落形态观察鉴定: 察氏培养基上 28 $^{\circ}$ C 培养 2 周, 菌落直径达 2.5cm ~

3.0cm, 表面扁平且有放射性皱纹, 全缘绒毛状, 中心部分略有突起, 起初白色, 常出现黄色区域, 后转为黑色, 反而无色或在中央部分略带黄褐色。显微镜下形态观察鉴定, 培养 4d 的菌体分生孢子穗球形, 常在周围裂开成放射性的柱状物, 一般为 700 $\mu$ m ~ 800 $\mu$ m; 分生孢子梗长短不一, 大部分无色光滑壁厚; 顶囊为球形, 45 $\mu$ m ~ 75 $\mu$ m, 双层小梗, 梗基较短, 有时具横隔; 分生孢子为球形, 4 $\mu$ m ~ 5 $\mu$ m, 褐色; 菌丝有时可见横隔。由文献 [5] 鉴定菌株 AF10 为曲霉属的黑曲霉群 (*Aspergillus niger*), 命名为 *A. niger* AF10。

### 2.3 *A. niger* AF10 菊粉酶基因的克隆

**2.3.1 *A. niger* AF10 基因组 DNA 的提取:**按文献 [10] 方法提取 *A. niger* AF10 基因组 DNA, 在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳检测, 在约 23kb 处呈现特异条带(图 1)。

**2.3.2 PCR 扩增 *A. niger* AF10 菊粉酶基因:**PCR 扩增 *A. niger* AF10 菊粉酶基因, 对 PCR 产物做琼脂糖凝胶电泳分析, 在约 1.6 kb 处呈现特异条带(图 2)。

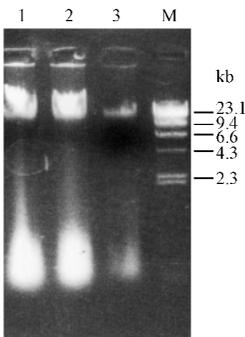


图 1 *A. niger* AF10 基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agarose electrophoresis of *A. niger* AF10 genomic DNA

1 2 3. AF10 genomic DNA; 4. Marker  $\lambda$ DNA/*Hind* III.

表 1 菊粉酶酶源菌株筛选结果

Table 1 The results of screening

<i>A. niger</i>	AF01	AF02	AF04	AF10	AF16
Activity(U/mL)	46.2	47.0	29.8	48.0	32.4

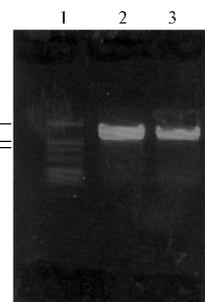


图 2 PCR 扩增菊粉酶基因琼脂糖凝胶电泳

Fig.2 PCR amplification of Inulinase gene

1. Marker DL-2000 2 3. AF10 *inuA1* as a template.

**2.3.3 PCR 产物序列分析** 分别对 3 个 PCR 产物进行核苷酸序列测定,它们的核苷酸序列完全相同。序列分析表明:阅读框架全长 1551bp,其中 G + C 含量为 54.3%,没有内含子序列,与已报道的菊粉酶基因核苷酸有不同程度的同源性(表 2)<sup>[12-15]</sup>,将所获得的基因命名为 *inuA1*。*inuA1* 的核苷酸序列及其结构已在 GenBank 上登录,登录号为 AF369388。

表 2 *inuA1* 与其它菌株菊粉酶基因的核苷酸同源性

Table 2 The homologous between AF10 *inuA1* and inulinase gene from other stains

Gene	Identities/%	Source
<i>InuK</i> ( <i>A. niger</i> )	97.2	[ 13 ]
<i>InuA</i> ( <i>A. niger</i> )	98.0	[ 14 ]
<i>inuX</i> ( <i>Aspergillus ficuum</i> )	98.0	[ 15 ]
<i>InuX</i> ( <i>Penicillium</i> sp. TN-88)	98.0	[ 16 ]

用 EXPASY 中 ProtParam 分析工具<sup>[11]</sup>分析 *inuA1* 推导的氨基酸序列,*A. niger* AF10 菊粉酶由 516 个氨基酸组成,其中存在 4 个潜在的 N-糖基化位点,第 40 ~ 45 位氨基酸为菊粉酶的保守序列 WMNEPN。*A. niger* AF10 菊粉酶的氨基酸成分如表 3 所示,其中酸性氨基酸有 56 个,碱性氨基酸有 39

个。分子量为 55851.9,分子式为 C<sub>2474</sub>H<sub>3770</sub>N<sub>658</sub>O<sub>790</sub>S<sub>15</sub>。理论 pI 为 4.58。负电荷氨基酸残基(Asp + Glu)有 56 个,正电荷氨基酸残基(Arg + Lys)有 28 个。

表 3 氨基酸组成分析

Table 3 Composition of amino acid

Amino acid	Sum	Content/%	Amino acid	Sum	Content/%	Amino acid	Sum	Content/%
Ala (A)	38	7.4	Arg (R)	14	2.7	Asn (N)	24	4.7
Asp (D)	35	6.8	Cys (C)	3	0.6	Gln (Q)	23	4.5
Glu (E)	21	4.1	Gly (G)	46	8.9	His (H)	11	2.1
Ile (I)	22	4.3	Leu (L)	39	7.6	Lys (K)	14	2.7
Met (M)	12	2.3	Phe (F)	19	3.7	Pro (P)	27	5.2
Ser (S)	51	9.9	Thr (T)	51	9.9	Asx (B)	0	0.0
Tyr (Y)	12	2.3	Val (V)	37	7.2	Asx (B)	0	0.0
Glx (Z)	0	0.0	Xaa (X)	0	0.0			

**2.3.4 *inuA1* 的克隆** 将 AF10 菊粉酶基因 *inuA1* 重组至克隆载体 pUC118 中,获得菊粉酶基因重组质粒 *p<sub>inuA1</sub>*。*inuA1* 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞,挑选在 LB 筛选培养基上生长的白色菌落提取质粒,用 *EcoR* I 和 *Sma* I 酶切,酶切产物做琼脂糖凝胶电泳分析,分别在约 2.7kb 和 1.6kb 处呈现特异条带(图 3)。以所提取的质粒为模板做 PCR,PCR 产物做琼脂糖凝胶电泳分析,在 1.6kb 处呈现特异条带(图 4),获得了推有 *A. niger* AF10 菊粉酶基因重组质粒 *p<sub>inuA1</sub>* 的 *E. coli* JM109,即 JM109/*inuA1*。

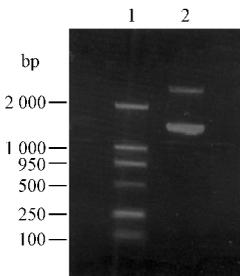


图 3 重组质粒 *p<sub>inuA1</sub>* 酶切鉴定

Fig.3 Digestion pattern of recombinant plasmid of *inuA1*

1. Marker DL-2000 2. Recombinant plasmid of *inuA1*.

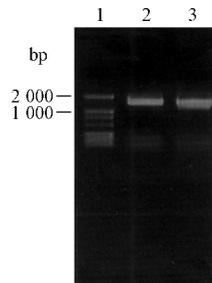


图 4 JM109/*inuA1* 的 PCR 检测

Fig.3 PCR analysis of JM109/*inuA1*

1. Marker DL-2000 2. PCR product of JM109/*inuA1*.

## 2.4 讨论

目前,果糖的生产是以淀粉为原料,经过三步酶促反应生成果葡糖浆,其中果糖含量仅有 42% ~ 45%,转化率低、工艺复杂。利用外切菊粉酶直接水解菊芋粉生产果糖或超高果葡糖浆(UHFGS),水解产物中果糖含量可达 90% ~ 95%,而且生产工艺简单。如果内切菊粉酶和外切菊粉酶联合使用,可进一步提高水解速率。另外可用内切菊粉酶水解菊芋粉,生产寡聚果糖。因此通过基因工程技术高效表达内切菊粉酶具有重要意义。本文对 AF10 菌株内切菊粉酶基因的克隆和测序,为进一步研究其异源高效表达奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Henrissat B. *Biochem J* ,1991 **280** 309 ~ 316.
- [ 2 ] Gunasekaran P , Karunakaran T , Cami B , et al . *J Bacteriol* ,1990 **172** 6727 ~ 6735.
- [ 3 ] Ohta K , Akimoto H , Astuda S , et al . *Biosci Biotechnol Biochem* ,1998 **62** ( 9 ) :1731 ~ 1738.
- [ 4 ] Kang S I , Kim S I . *Biotechnol Lett* ,1999 **21** 569 ~ 574.
- [ 5 ] Laloux O , Cassart J P , Van Beeumen J , et al . *FEBS Lett* ,1999 **289** 64 ~ 68.
- [ 6 ] Kim H S , Lee D W . *Biotechnol Lett* ,1999 **21** 621 ~ 623.
- [ 7 ] 周德庆 . 微生物实验手册 . 上海 : 科技出版社 ,1983.253 ~ 258.
- [ 8 ] 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.
- [ 9 ] Uhm T B . *Biotechnol Lett* ,1986 **8** ( 4 ) 287 ~ 290.
- [ 10 ] 张莉莉 , 张苓花 , 史剑斐 , 等 . 大连轻工业学院学报 ,2000 **1** 45 ~ 47.
- [ 11 ] Wang J T L , Shapiro B A , Shasha D . *Paattern Discovery in Biomolecular Data : Tools , Techniques , and Applications* . Oxford university press ,1999.
- [ 12 ] Ohta K , Akimoto H , Atsuda S , et al . *Biosci Biotechnol Biochem* ,1998 **62** ( 9 ) :1731 ~ 1738.
- [ 13 ] Nucleotide sequence ( EMBL accession number ABO12772 , ABO12771 ).
- [ 14 ] Nucleotide sequence ( EMBL accession number AJ006951 ).
- [ 15 ] Nucleotide sequence ( EMBL accession number E08802 ).

## Screening Strains Producing Inulinase and Cloning of Inulinase Gene

Zhang Linghua Wang Yunji Ye Shuhong Zhang Fuqi

( Department of Food Science and Bioengineering , Dalian Institute of light Industry , Dalian 116001 , China )

**Abstract** : A wild-type strain AF10 producing inulinase was screened from soil samples , the strain is identified to be a *A. niger* . A endoinulinase gene *inuA1* from *A. niger* AF10 was wequenced and analyzed , after PCR amplification . The results shows *inuA1* is 1551 bp in length without any intron and contains 4 potential N-glycosylation sites . The conservative sequence is WMNEPN from the N-terminus . The *inuA1* was cloned to pUC118 and the recombinant vector *pinuA1* was obtained and transformed into *E. coli* JM109 . The recombinant JM109/*inuA1* included *inuA1* was obtained .

**Key words** : *Aspergillus niger* , Inulinase , Gene cloning