

黑曲霉酸性 α -淀粉酶基因和糖化酶基因对 工业酒精酵母的整合及其共表达

王海燕² 秦浚川² 王敖全^{1*} 唐国敏^{1*}

(¹ 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期国家重点实验室 北京 100080)

(² 南京大学 医药生物技术国家重点实验室 南京 210093)

摘 要 用 PCR 合成的黑曲霉(*Aspergillus niger*)酸性 α -淀粉酶(Acid α -amylase)的 cDNA, 构建了由酵母醇脱氢酶(ADH1)启动子和终止子引导表达 酸性 α -淀粉酶自身信号肽序列引导分泌的表达元件, 与黑曲霉糖化酶 cDNA 的表达元件同时插入由酵母 rDNA 序列引导同源整合的酵母 Y1p 型表达载体 pWHY 中, 构成双基因表达分泌质粒 pWAG。采用 pWAG 与酵母 YE_p 型 G418 抗性表达质粒的共转化, 将两个基因表达元件整合到酒精生产酵母菌株 AS2.346 的染色体 rDNA 序列中, 获得同时表达胞外酸性 α -淀粉酶和糖化酶的双功能酒精酵母工程菌。

关键词 酸性 α -淀粉酶 糖化酶 分泌表达 双功能酒精酵母

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2004)04-0483-04

酵母菌在自然界分布甚广, 是发酵工业的重要微生物, 主要用于酒精、啤酒和面包工业。酒精在国民经济中有着广泛的用途, 是化工和制药等的重要原料, 又是轻工业中配制各种饮料酒的原料。酒精燃料作为清洁燃料, 在环境保护上具有特别重要的意义, 获得了世界各国越来越大的关注。我国酒精生产主要使用淀粉质原料。但酒精酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)不具有淀粉水解酶的活性不能直接发酵淀粉。原料淀粉需先经过蒸煮、液化、糖化等工序水解成葡萄糖等可发酵性糖后才能被利用。改良菌种, 获得能分解和利用淀粉的酵母工程菌, 可简化工艺、节省能源和酶制剂、降低成本, 有重要的应用前景。近年来, 利用重组 DNA 技术已将 α -淀粉酶基因和糖化酶基因通过自主复制载体同时引入实验室单倍体酵母, 培育出能直接利用淀粉产生酒精的酵母菌株^[1,2]。本研究将黑曲霉的酸性 α -淀粉酶基因和糖化酶基因整入酒精生产酵母菌株 AS2.346 中, 旨在获得酒精发酵生产条件下能同时行使各自淀粉水解功能的酒精酵母工程菌, 以加快酒精发酵速度并提高淀粉质原料的利用率和出酒率。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α

用于质粒构建, AS2.346 是酒精生产用工业酵母, 本所保存。质粒 pUC19 用作克隆载体。黑曲霉 cDNA 文库由本实验室构建并保存。pUC19-P_{ADH1} 含酵母醇脱氢酶(ADH1)启动子, pGBT9 含 ADH1 终止子, pWHY 含酵母 rDNA 的 *Sma*[-*Bam*H] 序列, pKG1 含有受酵母磷酸甘油激酶(PGK)启动子控制的黑曲霉糖化酶 cDNA 表达元件, pBEJ16 是含有 G418 抗性表达单元的酵母自主复制型质粒, 均由本实验室保存。

1.1.2 培养基 LB 培养基用于 *E. coli* 生长和保存。YPD 培养基(每升含酵母粉 10g, 蛋白胨 20g, 葡萄糖 20g)用于酒精酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的培养; 含 200 μ g/mL G418 的 YPD 培养基用于酵母转化。添加 1% 可溶性淀粉的 YNB 培养基(每升含酵母氮基 6.7g, 葡萄糖 20g)用于筛选和鉴定分泌表达酸性 α -淀粉酶和糖化酶(Glucoamylase, GA)的转化子。

1.1.3 试剂 G418 购自北京鼎国生物技术的发展中心, Pfu DNA Polymerase 为上海 Sangon 生物技术公司产品, 各种限制性内切酶及 T4 DNA Ligase 为 TaKaRa 生物公司产品, 引物由上海生工生物工程技术服务公司合成, 葡萄糖氧化酶试剂系本所产品。

1.2 酵母转化

参照文献[3]方法进行。

1.3 大肠杆菌转化、质粒提取等分子操作

参照文献[4]按常规方法进行。

基金项目: 国家“863 计划”项目(2001AA214151)

* 通讯作者。Tel: 86-10-62629398 E-mail: tgmwaq@yahoo.com.cn

作者简介: 王海燕(1977-), 女, 江苏常州人, 硕士研究生, 主要从事工业微生物菌种改良研究。

收稿日期: 2003-09-02, 修回日期: 2003-12-01

1.4 PCR 引物设计和扩增反应

根据文献 5 发表的 *A. niger* 酸性 α -淀粉酶基因序列,设计一对引物 P1 和 P2 用于从 *A. niger* cDNA 文库中扩增酸性 α -淀粉酶 cDNA 和转化子中酸性 α -淀粉酶基因整合的 PCR 检测。P1: 5'-GCTCTAGACGCAGCGATGAGATTATC-3'; P2: 5'-CAGGATCCACAGTAACCGACCACTCC-3'。两引物中分别引入 *Xba* I 和 *Bam*H I 限制性酶切位点。反应条件: 94℃ 3min, 94℃ 1min, 60℃ 1min, 72℃ 2.5min, 30 个循环; 72℃ 10min。

根据文献 6 提供的 *A. niger* 糖化酶基因序列,设计一对引物 P3 和 P4 用于转化子中糖化酶基因整合的 PCR 检测。P3: 5'-CAATGTCGTTCCGAT-3'; P4: 5'-GTCCAGAAGGACTGC-3'。反应条件: 94℃ 3min; 94℃ 1min, 54℃ 1min, 72℃ 1min, 30 个循环; 72℃ 10min。

1.5 酵母基因组 DNA 的制备

参考文献 7 操作。

1.6 转化子酸性 α -淀粉酶和糖化酶分泌表达的定性测定

从 YPD/G418 转化平板上将酵母转化子用无菌牙签点接在含 1% 可溶性淀粉的 YNB 平板上 30℃ 培养 3d 后,用碘蒸汽熏染,观察是否产生透明水解圈。

1.7 阳性转化子糖化酶表达水平的测定

取 300 μ L 转化子培养上清与 300 μ L 1% 可溶性淀粉溶液(内含 0.02mol/L NaAc-HAc 缓冲液, pH4.6)混匀, 60℃ 反应 1h, 100℃ 水浴煮沸 10min 灭活。用 100℃ 10min 灭活的培养上清同样操作,作为对照。反应液中生成的葡萄糖用葡萄糖氧化酶试剂测定。定义 60℃ 1h 水解淀粉产生 1mg 葡萄糖的酶量为一个酶活力单位。

1.8 阳性转化子酸性 α -淀粉酶表达水平的测定

取 1mL 转化子培养上清,加入 2mL 0.5% 淀粉溶液(用 0.5mol/L 磷酸缓冲液配制, pH6.0)。混匀后立即置 40℃ 水浴保温 20min。吸取反应液 0.2mL,与 5mL 1/3000mol/L 碘液充分混匀后测定 OD_{700} 。定义在上述反应系统中 40℃ 每分钟使反应液淀粉蓝值(OD_{700})下降 0.1 的酶量为一个酶活力单位。

2 结果和讨论

2.1 *A. niger* 酸性 α -淀粉酶 cDNA 的 PCR 扩增

按材料方法 1.4 所述进行 PCR 扩增,获得了约 1.5kb 的特异性条带,并用基因内部的酶切位点进行

行鉴定。*Sma* I 酶切应产生 728bp 和 834bp 两片段;*Hind*III 酶切应产生 308bp 和 1254bp 两片段;*Pvu* II 酶切应产生 273bp、370bp 和 919bp 三片段;*Nco* I 酶切应产生 239bp、306bp 和 1017bp 三片段。实验结果与预期完全一致(图略)。将此 1.5kb 片段用 *Xba* I 和 *Bam*H I 双酶切后,克隆到 pUC19 的相应位点,获得质粒 pUC19-acid-amy。

2.2 酸性 α -淀粉酶和糖化酶共表达的整合型质粒的构建

分别用 *Sph* I 和 *Xba* I 酶切 pUC19-P_{ADH1}, *Xba* I 和 *Bam*H I 酶切 pUC19-acid-amy, *Bam*H I 和 *Sph* I 酶切 pGBT9, 获得 ADH I 启动子 P_{ADH1} 片段(404bp), 酸性 α -淀粉酶 cDNA 片段(1.5kb)和 ADH I 终止子 T_{ADH1} 片段。将这 3 个片段分两步连接成 acid-AMY 表达单元,克隆到质粒 pGBT9 的 *Sph* I 位点。然后用 *Sph* I 将其切下,插入含酵母 rDNA 序列的整合型质粒 pWHY 的 *Sph* I 位点,同时用 *Eco*R I 将 GA 表达单元从质粒 pKG1 中切下,插入 pWHY 的 *Eco*R I 位点,构建成酵母整合型双基因表达质粒 pWAG, pWAG 的物理图谱示于图 1。

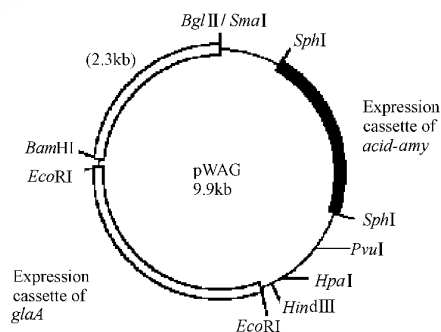


图 1 酵母整合型双基因表达质粒

Fig.1 Physic map of integration type plasmid with two foreign genes' expression cassettes

2.3 双基因整合入酒精工业酵母 AS 2.346

用 *Hpa* I 酶切质粒 pWAG,使其线性化后与 pBEJ16 质粒按克分子比 4:1 混合共转化酒精酵母工业菌株 AS 2.346,在 YPD/G418 平板上筛选含该抗性的转化子。随后,按 1.8 所述对转化子作酸性 α -淀粉酶和糖化酶的分泌表达检测。结果从 600 个转化子中共获得 7 个产生透明水解圈的转化子,分别编号为 No. 1、95、198、229、348、470 和 530。图 2 给出了部分转化子的平板检测结果。随机取 No. 1、348 和 470 三个转化子提取基因组 DNA,按 1.6 所述进行 PCR 结果证实两个外源基因确实已整合到酵母的染色体上(图略)。

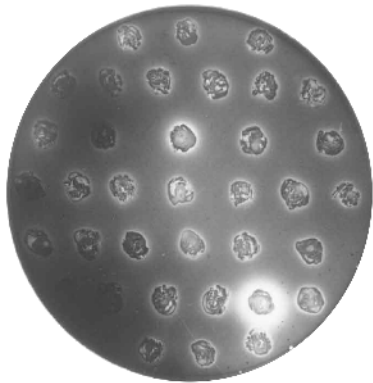


图2 部分转化子的平板鉴定

Fig.2 Plate detection of partial transformants

The forth colony from left in row 4 is negative control ;The second colony from right in row 6 is positive transformant .

2.4 工程菌中酸性 α -淀粉酶和糖化酶的共表达

上述 7 个转化子在 2mLYPD 中 30℃ 振荡培养 72h ,离心取上清 ,测定上清中酸性 α -淀粉酶和糖化酶的酶活(表 1)。

表 1 工程菌酸性 α -淀粉酶和糖化酶分泌酶活性的测定

Table 1 Determination of secreted activities of acid α -amylase and glucoamylase of engineered distiller 's yeast

Transformants	1	95	198	229	348	470	530
α -amylase(U/mL)	1.341	0.563	0.300	0.563	1.268	1.275	0.458
Glicoamylase(U/mL)	2.313	1.617	2.496	2.747	2.652	2.660	1.209

2.5 酵母工程菌分泌的酸性 α -淀粉酶的酶学性质

本实验室前已报道 ,在酿酒酵母中分泌表达的黑曲霉糖化酶能在发酵的低 pH 和低温下发挥功能^[8] ,为此本研究仅就分泌表达的酸性 α -淀粉酶的酶学特性作了考察。结果表明工程菌分泌的酸性 α -淀粉酶在 pH2.0 ~ 5.5 范围内活性较高 ,最适 pH 为 3.0 ~ 4.0 ,与酒精发酵过程的 pH 相一致。该酶的最适作用温度为 65℃ ,在 15℃ 时的酶活力为最适温度下的 20%(图略) 。因此双基因工程菌在酒精发酵的低 pH 和低温下能行使其功能作用。

2.6 双功能工程菌酸性 α -淀粉酶和糖化酶表达的稳定性检测

将 No. 1、348 和 470 三株菌在 YPD 平板上连续转移培养 10 次后 ,分别将原初菌株与转移 5 次和 10 次的菌株接种于 YPD 液体培养基 ,37℃ 振荡培养 72h ,测定上清液中的酸性 α -淀粉酶和糖化酶活性(表 2) 。上述结果表明 ,1 和 348 这两株工程菌原初菌株的酸性 α -淀粉酶和糖化酶酶活与转移 5 次和 10 次的相比 ,无明显的差异。但 470 菌株转移 10 次后 ,酸性 α -淀粉酶酶活部分下降 ,而糖化酶的活性完全丧失。

表 2 双功能工程菌的稳定性试验

Table 2 Stability test of engineered yeast no.1 ,348 and 470

Strain/transfer times	Acid α -amylase(U/mL)	Glucoamylase(U/mL)
Strain 1	1.751	1.170
Strain 1/5 times	0.908	1.023
Strain 1/10 times	1.099	0.752
Strain 348	0.919	0.677
Strain 348/5 times	1.103	0.977
Strain 348/10 times	0.806	0.887
Strain 470	1.478	1.218
Strain 470/5 times	0.495	0.195
Strain 470/10 times	0.653	0

从以上实验结果看 ,酸性 α -淀粉酶和糖化酶 cDNA 引入酒精酵母 AS 2.346 后 ,均能分泌表达。但在传代过程中 ,酵母有可能通过重组机制将其染色体上的外源基因切除或破坏 ,导致酶活性的丧失。因此 ,需就稳定性作进一步筛选。

本实验室在开始构建双功能工业菌株时曾尝试将第二个外源基因整入已整合有第一个外源基因的酵母染色体的 rDNA。可能由于后一个基因的整入影响或者破坏了前一个基因的表达 ,检测时发现 ,前一个基因的表达水平极低或者丢失^[9]。本研究改变策略 ,将两个外源基因同时整入到酵母染色体上 ,获得了两个外源基因都表达的双功能工业酵母菌株。

参 考 文 献

[1] Moraes L P M , Astolfi-Filho S , Oliver S G. Development of yeast strains for the efficient utilization of starch : evaluation of constructs which express α -amylase and glucoamylase separately or as bifunctional fusion proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* , 1995 , **43** :1067 - 1076.

[2] 罗敬贤 ,李政海 ,李文清. 大麦 α -淀粉酶和黑曲霉糖化酶在酿酒酵母中的表达和分泌. *中国科学 (C 辑)* ,1998 ,**28**(1) : 50 - 56.

[3] Ausubel F M , Brent R , Kingston R E , *et al.* 精编分子生物学实验指南. 颜子颖 ,王海林 ,译. 第一版 ,北京 :科学出版社 ,1998 509 - 514.

[4] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989.

[5] Woeldike H. Process for the production of protein products in *Aspergillus* and promoters for use in *Aspergillus* . Patent :WO 8901969-A 1 09-MAR-1989.

[6] 钟丽婵 ,唐国敏 ,杨开宇. 黑曲霉糖化酶高产菌株的糖化酶结构基因的分离及其序列分析. *微生物学报* ,1994 ,**34**(3) : 184 - 190.

[7] Burbe D , Dawson D , Stearns J , *et al.* *Methods in Yeast Genetics : A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 2000.

[8] 唐国敏. 分泌糖化酶的工业啤酒酵母菌的构建. *Fung Sci* , 1997 ,**11**(1 2) :43 - 49.

[9] 汤晓颖 ,秦浚川 ,唐国敏 ,等. 瑞氏木霉内切葡聚糖酶基因在工业啤酒酵母中的整合和表达. *微生物学报* ,2003 ,**43**(5) :586 - 591

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

Integrations and Coexpression of Acid α -amylase and Glucoamylase from *Aspergillus niger* in A Distiller's Yeast AS2.346

WANG Hai-Yan² QIN Jun-Chuan² WANG Ao-Quan^{1*} TANG Guo-Min^{1*}

(¹ State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

(² Department of Biochemistry, State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: The expression cassettes of acid α -amylase and glucoamylase (GA) were constructed by insertion of acid α -amylase cDNA and GA cDNA from *Aspergillus niger* between yeast *ADH1* and *PGK* promoters and terminators respectively. The two expression cassettes were ligated onto the same vector pWHY which contains yeast rDNA sequence resulting the plasmid pWAG. The two foreign genes were integrated into chromosome of a distiller's strain AS2.346 by co-transformation of pWAG and a YEP type plasmid pBEJ16 carrying the selection marker G418^r. The stable double functional engineered distiller's yeast simultaneously expressing extracellular acid α -amylase and GA were obtained.

Key words: Acid α -amylase, Glucoamylase, Secretion expression, Double functional distiller's yeast

Foundation item: Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2001AA214151)

* Corresponding author. Tel 86-10-62629398; E-mail: tgmwaq@yahoo.com.cn

Received date 09-02-2003

科学出版社最新图书推介

《疫苗学》

主 编 张延龄 张 晖

2004-ISBN 7-03-011586-4/Q. 1280

16 开 纸面精装 1500 页 定价 198.00 元

国内第一本全面系统地介绍疫苗学及相关知识的专著,全书分理论管理篇、技术篇和各论三部分,共六十四章。理论管理篇主要介绍了疫苗的基本概念、发展简史、疫苗研制、开发与生产应用等基本知识。技术篇全面系统地介绍了疫苗研制、开发和生产所涉及的各种实验技术、方法和操作过程。各论篇就各种类型疫苗的基本概念、病原学与流行病学原理、病原致病机制以及疫苗的免疫机制与临床应用等内容进行了详细地介绍。

《肿瘤遗传学》

吴 旻

ISBN 7-03-011581-3/Q. 1279

16 开 定价 138.00 元

国内首部大型肿瘤遗传学专著。院士牵头,编著者多为这一研究领域的资深或活跃在研究一线的中青年专家。第一篇为肿瘤遗传学基础;第二篇为肿瘤遗传学各论;第三篇为肿瘤预防、早期诊断和治疗的遗传学对策;第四篇为研究技术。

《基因免疫的原理与方法》

主编 姜勋平

ISBN 7-03-012588-6/Q. 1351

16 开 定价 38.00 元

系统介绍基因免疫的基本原理、研究方法和应用现状,有基因疫苗工作原理、基因疫苗抗原基因的筛选与克隆、基因疫苗的构建、基因疫苗制备、基因疫苗免疫方法等内容,反映了当前国际上基因免疫研究的前沿进展和我国学者的研究成就。

《蛋白质化学与蛋白质组学》

夏其昌 曾嵘 等

ISBN 7-03-012401-4/Q. 1331

定价 75.00

系统论述了蛋白质化学基础理论和实验技巧,也反映了蛋白质组学研究的最新成果。在蛋白质组学领域介绍了基本概念、样品制备、双向凝胶电泳的图像分析和定量分析、质谱等常规方法,并介绍了国际上最新的多维技术在研究中的应用,同时充分体现了生物信息学在蛋白质组研究中的重要性。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)。

邮购地址:100717 北京东黄城根北街 16 号科学出版社 科学分社 联系人 阮芯 联系电话 010-6403462X(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目 010-64012501