

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*

钟丽婵 唐国敏 杨开宇

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 从糖化酶高产菌株(*Aspergillus niger*)T21 中分离出染色体 DNA。Southern 印迹分析表明糖化酶结构基因位于约 2.5kb 的 EcoR I-EcoR V 片段中。该染色体 DNA 经 EcoR I、EcoR V 完全酶切后,用琼脂糖凝胶电泳分离,回收 2.0-3.0kb 的片段,与载体 pBR322 连接后转化宿主菌大肠杆菌 DH5,获得转化子。通过原位杂交,从转化子中筛选出 4 个阳性克隆。阳性克隆的进一步酶切鉴定及序列分析表明,黑曲霉 T21 糖化酶结构基因大小为 2.3kb,含有 4 个内含子。

关键词 黑曲霉,糖化酶结构基因,序列分析

丝状真菌是许多酶制剂和抗生素等工业的生产菌。因此,丝状真菌基因表达调控的研究可为丝状真菌工业育种提供必要的理论依据。外源基因的丝状真菌表达系统的研究表明,作为遗传工程受体菌,丝状真菌比其它宿主菌有独特的优越性。1987 年以来,已有牛凝乳酶基因等十多种外源基因在丝状真菌,主要在曲霉中表达^[1,2]。已有的研究表明,构建载体时,采用糖化酶基因启动子,分泌信号肽序列和糖化酶基因与外源目的基因的融合是提高外源基因表达和表达产物分泌的有效方法。但目前大多数外源基因的表达水平远不及内源基因在同一启动子作用下的表达水平。主要问题在于对内源基因的表达调控规律还缺乏认识。迄今为止,有关该领域的报道为数不多^[3]。我们选择黑曲霉糖化酶基因为材料来研究丝状真菌基因表达调控的分子机制。通过阐明黑曲霉糖化酶基因的调控元件和转录水平上的调控规律,为构建外源基因在丝状真菌中的表达——分泌系统和开辟丝状真菌育种新途径打下基础。为此,获得黑曲霉糖化酶基因和分离糖化酶基因 5' 和 3' 端非编码序列是必须的第一步。本文报道黑曲霉糖化酶基因的分离及其核苷酸序列分析的结果。

1 材料和方法

1.1 菌株及质粒

1.1.1 黑曲霉(*Aspergillus niger*)T21 为中科院微生物研究所糖化酶研究小组经多次诱变所获得的糖化酶高产菌株,用于制备染色体 DNA。

1.1.2 大肠杆菌 DH5 及 JM101 用作宿主菌。

* 本课题为国家自然科学基金资助项目。

本文于 1993 年 2 月 24 日收到。

1.1.3 质粒 pBR322 及噬菌体 M13mp19 分别用作克隆糖化酶结构基因及该基因分析中亚克隆的载体。质粒 pGla5 带有糖化酶 cDNA,由本组构建,用作制备 Southern 印迹分析及原位杂交试验中所用的探针。

1.2 培养基

1.2.1 LB 培养基用于种子培养、感受态细胞及质粒的制备等。

1.2.2 M9 培养基用于制备保存 JM101 的平板培养基。

1.2.3 *A. niger* T21 的摇瓶培养基(%) :可溶性淀粉 6,聚脲 2, KH_2PO_4 0.5,玉米粉 0.5,豆饼粉 0.5,自然 pH, $1.05\text{kg}/\text{cm}^2$ 灭菌 30 分钟。

1.3 酶及其他试剂

限制性内切酶、连接酶、碱性磷酸酯酶为 Boehringer Mannheim、Promaga、New England Biolabs、华美生物工程、中国医学科学院基础医学研究所友谊生物制品等公司产品,并按公司产品说明书进行酶促反应;切刻平移 Kit、序列分析用的酶及其他试剂分别为 Boehringer Mannheim 及 Promaga 公司产品;同位素 ^{32}P 及 ^{35}S 为 Du Pont 公司产品。

1.4 染色体 DNA 的制备

染色体 DNA 的制备基本上参照文献[4]及[5]的方法进行。将查氏斜面上的 *A. niger* T21 孢子接种于两瓶 50ml 的摇瓶培养基中, 30°C , 280r/min 下培养 72 小时。过滤收集菌丝体,并用无菌水洗净、压干,置 -70°C 下冷冻。取 4g 冷冻菌丝体在液氮下研磨后,加入 10ml RSB(pH8.0),再加入 SDS 至终浓度为 1%。混合物经蛋白酶 K 处理、酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)抽提及乙醇沉淀后,沉淀物溶于 10ml TE(pH8.0)中。再经 RNase 处理、酚-氯仿-异戊醇抽提、乙醇沉淀后,加 1ml TE 溶解沉淀。测定染色体 DNA 溶液的 A_{260} 及 A_{280} ,最终得到约 1mg DNA, $A_{260}/A_{280} = 1.7$,凝胶电泳结果表明, DNA 分子大小超过 2.3kb。

1.5 质粒抽提、感受态细胞的制备及 DNA 分离回收

均按文献[5]中所述方法进行, DNA 片段电泳分离后用 DEAE81 滤纸回收。

1.6 Southern 印迹分析

A. niger T21 糖化酶 cDNA 的 Bgl I -Sal I 片段用切刻平移法标记制成探针。*A. niger* T21 染色体 DNA 用 EcoR I、EcoR V 完全酶切后在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳分离,按文献[5]所述方法将 DNA 转印到硝酸纤维素膜上,并与探针在 42°C 下杂交。膜洗净后在 -70°C 下放射自显影 2—3 天。

1.7 转化

染色体 DNA 用 EcoR I、EcoR V 完全酶切,酶切反应物在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳分离,回收 2.0—3.0kb 片段并与经 EcoR I、EcoR V 酶切的 pBR322 载体连接。按文献[5]的方法将连接物转化大肠杆菌 DH5,选择氨苄抗性的转化子。

1.8 原位杂交

从质粒 pGla5 中分离并回收 cDNA 片段,用切刻平移法标记后作为探针按文献[5]所述方法进行原位杂交,从克隆子中筛选杂交阳性转化子。

1.9 核酸序列分析

将糖化酶基因经适当酶切后的各片段分别亚克隆到噬菌体 M13mp19 中,挑选有插

入片段的重组子。参照文献[5],制备单链模板,用双脱氧核苷酸末端终止法测定其序列。测定按 Promaga 公司产品说明书的步骤进行。

2 结果和讨论

2.1 Southern 印迹分析

文献报道 *Aspergillus niger* 与 *A. awamori* 的糖化酶基因编码序列基本上一致,且已知 *A. niger* 和 *A. awamori* 的完整糖化酶结构基因均在 2.5kb 的 *EcoR* I - *EcoR* V 染色体 DNA 片段上^[6,7],故我们把 *A. niger* T21 的染色体 DNA 用 *EcoR* I、*EcoR* V 完全酶切后作 Southern 印迹分析(图版 1-A)。仅在 2.3kb 左右有一条杂交带,因此很可能该大小约 2.3kb 的 *EcoR* I - *EcoR* V 片段同样含有 T21 的完整糖化酶结构基因。

2.2 转化及重组质粒的筛选

根据 Southern 印迹分析结果,采用 *EcoR* I、*EcoR* V 完全酶切染色体 DNA,并从双酶切反应物中回收 2.0—3.0kb 片段,转化受体细胞,从而大大提高了含目的基因重组子出现的几率。我们用原位杂交法从 2400 个氨苄抗性转化子中筛选出 4 个阳性克隆。图版 1-B 为用糖化酶 cDNA 作为探针对转化子筛选的结果。

2.3 重组质粒酶切图谱分析

从 4 个阳性克隆中分别提取出重组质粒 pGD92-1, pGD92-2, pGD92-3, pGD92-4。4 个重组质粒及其 *EcoR* I、*EcoR* V 双酶切的琼脂糖凝胶电泳结果如图版 1-C 所示。4 个质粒均比 pBR322 增大。其中 pGD92-3 和 pGD92-4 经 *EcoR* I、*EcoR* V 双酶切后产生 4.1kb 和 2.5kb 二个片段。因此,可以初步认为 pGD92-3 和 pGD92-4 为携带含糖化酶基因的 *EcoR* I - *EcoR* V 插入片段的重组质粒。为了进一步验证,根据糖化酶基因序列^[6,7]选取了 10 个限制性内切酶用来鉴定糖化酶基因的完整性。表 1 列出了预期结果,图版 1-C 和 D 则反映了实测的结果,二者完全一致,表明糖化酶基因位于 pGD92-4 重组质粒 *EcoR* I - *EcoR* V 片段上。

表 1 鉴定完整糖化酶基因的限制性内切酶及酶切后应产生的片段

Table 1 Restriction endonucleases used for examining intact glucoamylase gene and the expected fragments after digesting with corresponding enzyme(s)

质粒 Plasmid	限制性内切酶 Restriction endonuclease	切点数 Sites	片段大小(bp) Size of fragments (bp)
pGD92-4	<i>EcoR</i> I + <i>EcoR</i> V	2	2516, 4176
	<i>EcoR</i> I + <i>Bam</i> H I	3	734, 1972, 3986
	<i>EcoR</i> I + <i>Sal</i> I	3	638, 2344, 3710
	<i>EcoR</i> V + <i>Pst</i> I	3	1375, 1895, 3422
	<i>Pvu</i> I	2	2253, 4439
	<i>Hinc</i> I	4	638, 684, 2116, 3254
	<i>EcoR</i> V + <i>EcoR</i> I + <i>Bgl</i> I	3	992, 1524, 4176
	<i>Bgl</i> I	4	234, 2073, 2068, 2317
	<i>Nru</i> I	4	562, 689, 1540, 3901

GAATTCAAGC TAGATGCTAA GCGATATTGC ATGGCAATAT GTGTTGATGC
 ATGTGCTTCT TCCTTCAGCT TCCCCTCGTG CAGATGAAGG TTTGGCTATA
 AATTGAAGTG GTTGGTCGGG GTTCCGTGAG GGGCTGAAGT GCTTCCTCCC
 TTTTAGACGC AACTGAGAGC CTGAGCTTCA TCCCCAGCAT CATTACACCT
 CAGCA ATG TCG TTC CGA TCT CTA CTC GCC CTG AGC GGC CTC
 GTC TGC ACA GGG TTG GCA AAT GTG ATT TCC AAG CGC GCG ACC
 TGG GAT TCA TGG TTG AGC AAC GAA GCG ACC GTG GCT CGT ACT
 GCC ATC CTG AAT AAC ATC GGG GCG GAC GGT GCT TGG GTG TCG
 GGC GCG GAC TCT GGC ATT GTC GTT GCT AGT CCC AGC ACG GAT
 AAC CCG GAC T gtatgtttcg agctcagatt tagtatgagt gtgtcattga
 ttgattgatg ctgactggcg tgtegtttgt tgtag AC TTC TAC ACC
 TGG ACT CGC GAC TCT GGT CTC GTC CTC AAG ACC CTC GTC GAT
 CTC TTC CGA AAT GGA GAT ACC AGT CTC CTC TCC ACC ATT GAG
 AAC TAC ATC TCC GCC CAG GCA ATT GTC CAG GGT ATC AGT AAC
 CCC TCT GGT GAT CTG TCC AGC GGC GCT GGT CTC GGT GAA CCC
 AAG TTC AAT GTC GAT GAG ACT GCC TAC ACT GGT TCT TGG GGA
 CGG CCG CAG CGA GAT GGT CCG GCT CTG AGA GCA ACT GCT ATG
 ATC GGC TTC GGG CAA TGG CTG CTT gtatgttctc ccccccttg
 cgtctgatct gtgacatatg tagctgactg gtcag GAC AAT GGC TAC
 ACC AGC ACC GCA ACG GAC ATT GTT TGG CCC CTC GTT AGG AAC
 GAC CTG TCG TAT GTG GCT CAA TAC TGG AAC CAG ACA GGA TAT
 G gtgtgtttgt tttattttaa atttccaaag atgcgccage agagctaaac
 cgcgategca g AT CTC TGG GAA GTC AAT GGC TCG TCT TTC TTT
 ACG ATT GCT GTG CAA CAC CGC GCC CTT GTC GAA GGT AGT GCC
 TTC GCG ACG GCC GTC GGC TCG TCC TGC TCC TGG TGT GAT TCT
 CAG GCA CEC GAA ATT CTC TGC TAC CTG CAG TCC TTC TGG ACC
 GGC AGC TTC ATT CTG GCC AAC TTC GAT AGC AGC CGT TCC GCC
 AAG GAC GCA AAC ACC CTC CTG GGA AGC ATC CAC ACC TTT GAT
 CCT GAG GCC GCA TGC GAC GAC TCC ACC TTC CAG CCC TGC TCC
 CCG CGC GCG CTC GCC AAC CAC AAG GAG GTT GTA GAC TCT TTC
 CGC TCA ATC TAT ACC CTC AAC GAT GGT CTC AGT GAC AGC GAG
 GCT GTT GCG GTG GGT CGG TAC CCT GAG GAC ACG TAC TAC AAC

GGC AAC CCG TGG TTC CTG TGC ACC TTG GCT GCC GCA GAG CAG
 TTG TAC GAT GCT CTA TAC CAG TGG GAC AAG CAG GGG TCG TTG
 GAG GTC ACA GAT GTG TCG CTG GAC TTC TTC AAG GCA CTG TAC
 AGC GAT GCT ACT GGC ACC TAC TCT TCG TCC AGT TCG ACT TAT
 AGT AGC ATT GTA GAT GCC GTG AAG ACT TTC GCC GAT GGC TTC
 GTC TCT ATT GTG gtaagtcctac gctagacaag cgctcattgtt gacaga
 gggt gcgtaactaac agaagtag GAA ACT CAC GCC GCA AGC AAC
 GGC TCC ATG TCC GAG CAA TAC GAC AAG TCT GAT GGC GAG CAG
 CTT TCC GCT CGC GAC CTG ACC TGG TCT TAT GCT GCT CTG CTG
 ACC GCC AAC AAC CGT CGT AAC GTC GTG CCT TCC GCT TCT TGG
 GGC GAG ACC TCT GCC AGC AGC GTG CCC GGC ACC TGT GCG GCC
 ACA TCT GCC ATT GGT ACC TAC AGC AGT GTG ACT GTC ACC TCG
 TGG CCG AGT ATC GTG GCT ACT GGC GGC ACC ACT ACG ACG GCT
 ACC CCC ACT GGA TCC GGC AGC GTG ACC TCG ACC AGC AAG ACC
 ACC GCG ACT GCT AGC AAG ACC AGC ACC AGT ACG TCA TCA ACC
 TCC TGT ACC ACT CCC ACC GCC GTG GCT GTG ACT TTC GAT CTG
 ACA GCT ACC ACC ACC TAC GGC GAG AAC ATC TAC CTG GTC GGA
 TCG ATC TCT CAG CTG GGT GAC TGG GAA ACC AGC GAC GGC ATA
 GCT CTG AGT GCT GAC AAG TAC ACT TCC AGC GAC CCG CTC TGG
 TAT GTC ACT GTG ACT CTG CCG GCT GGT GAG TCG TTT GAG TAC
 AAG TTT ATC CGC ATT GAG AGC GAT GAC TCC GTG GAG TGG GAG
 AGT GAT CCC AAC CGA GAA TAC ACC GTT CCT CAG GCG TGC GGA
 ACG TCG ACC GCG ACG GTG ACT GAC ACC TGG CCG TAGACAATCA
 ATCCATTTCG CTATAGTTAA AGGATGGGGA TGAGGGCAAT TGCTTATATG
 ATCATGTATG TAGTGGGTGT GCATAATAGT AGTGAAATGG AAGCCAAGTC
 ATGTGATTGT AATCGACCGA CGGAATTGAG GATATC

图1 含有 *A. niger* T21 糖化酶基因的 2.5kb
EcoR I -EcoR V 片段的核苷酸序列

Fig.1 Nucleotide sequence of 2.5kb EcoR I -EcoR V
fragment containing the *A. niger* T21 glucoamylase gene

2.4 糖化酶基因的序列分析

以 M13mp19 为载体,采用双脱氧核苷酸末端终止法测定序列。所得的 2.5kb EcoR

I-EcoR V 片段的 DNA 序列如图 1 所示,与文献[6]所报道的 EcoR I-EcoR V 序列完全相同,与我们已测定的 *A. niger* T21 糖化酶基因的 cDNA 序列^[8]比较,长度增加 0.2kb (全长为 2.3kb),其中包括 4 个内含子序列。

有关曲霉糖化酶基因文献虽已有报道,但所用的菌株与本文有所不同。我们以经过诱变后产酶量增加 10 倍的 T21 菌株为研究对象,从中克隆了全长为 2.5kb 的染色体 DNA 片段,其中不仅含有完整的糖化酶结构基因,并有部分旁侧序列,为在基因水平上分析高产机制提供了必要的前提。有关旁侧序列的特征分析正在进行中。

参 考 文 献

- [1] Berka R M, Barnett C C. *Biotech Adv.* 1989, 7: 127—154.
- [2] Davies R W. *Molecular Industrial Mycology*, 1991, 45—81.
- [3] Fowler T, Berka R M, Ward M. *Curr Genet*, 1990, 18: 537—545.
- [4] Davis L G, Dibner M D, Battey J F. 分子生物学基本实验方法. 张钰, 李凌衡, 赵寿元译. 上海: 上海复旦大学出版社出版, 1986. 40—43.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*, 1989.
- [6] Nunberg J H, Meade J H, Cole G *et al.* *Molecular and Cellular Biology*, 1984, 4(11): 2306—2315.
- [7] Boel E, Hansen M T, Hjort I *et al.* *The EMBO Journal*, 1984, 3(7): 1581—1585.
- [8] 唐国敏, 徐雁满, 龚辉等: 生物工程学报, 1993, 9(2): 117—121.

ISOLATION AND SEQUENCING OF GLUCOAMYLASE GENE FROM A GLUCOAMYLASE OVER PRODUCING STRAIN

Zhong Lichan Tang Guomin Yang Kaiyu

(Institute of Microbiology Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract Chromosomal DNA was isolated from the mycelia of *Aspergillus niger* T21, a strain producing glucoamylase at a high level. Southern blot analysis indicated that the glucoamylase gene is situated on a 2.5kb EcoR I-EcoR V fragment. Chromosomal DNA was digested completely with EcoR I, EcoR V. The fragments in the range of 2.0—3.0kb were isolated through electrophoresis in agarose gel. The pooled fragments were ligated onto pBR322 vector prior to transformation into *E. coli* DH5. Four glucoamylase-specific recombinants were screened by in situ hybridization from the transformants. Restriction mapping and sequencing for one of the four were performed. Data show that the glucoamylase gene from *A. niger* T21 is a 2.3kb fragment containing four intervening sequences in the coding region.

Key words *Aspergillus niger*, Glucoamylase gene of *Aspergillus niger*, Sequencing