

黑曲霉 H1 的 cDNA 文库构建及其溶磷相关基因的筛选

唐超西^{1,3}, 龚明波^{2*}, 李顺鹏¹, 朱昌雄^{3*}

¹南京农业大学生命科学学院, 农业部农业环境微生物重点实验室, 南京 210095

²中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081

³中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所, 北京 100081

摘要: 【目的】构建溶磷黑曲霉 H1 的 cDNA 文库, 并从中筛选溶磷相关基因。【方法】利用 SMART 技术合成黑曲霉 H1 的双链 cDNA 并将其连接于 pBluescript II SK(+) 载体上, 将重组质粒转化 *E. coli* HST08, 得到黑曲霉的初级 cDNA 文库。利用难溶磷培养基筛选具有溶磷能力的克隆子, 测序并利用 Blast 分析基因序列。在难溶磷液体培养基中, 进行克隆子对溶液 pH 值、可溶磷含量的影响和产有机酸实验。【结果】成功构建了黑曲霉 H1 的 cDNA 文库, 其初级库容量约为 5.65×10^6 cfu/mL, 重组率约为 99.15%; 通过难溶磷固体培养基筛选, 得到具有溶磷圈的克隆子 61 个, 其中克隆子 H-54 的 cDNA 序列长 839 bp, 基因编码氨基酸残基序列长 179 nt。克隆子 *E. coli* HST08 H-54 在液体难溶磷培养基中培养, 提高了有机酸的表达量, 并增加了有机酸的种类, 在培养 12 h 后, 溶液中开始产生甲酸和乙酸, 在 24 h 后, 溶液中产生苹果酸和 α -酮戊二酸, 培养 36 h, 溶液 pH 值由 6.32 降到 3.93, 可溶磷含量达到 0.105 mg/mL。【结论】从黑曲霉 H1 中获得 1 个溶磷相关基因, 将其命名为 *psgA*。

关键词: 黑曲霉, cDNA 文库, 基因 *psgA*, 有机酸

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 03-0311-07

磷是植物生长所必需三大营养元素之一, 施用磷肥一直是保证农业生产增产的重要手段之一, 但磷肥当季利用率不足 20%^[1-2], 很大一部分或被土壤固定为难溶磷, 或随着雨水冲洗而流失, 造成严重的水环境污染。同时, 土壤中存在大量难溶性无机态和有机态磷^[3], 植物难以利用, 因此, 如何挖掘土壤潜在的磷库资源, 提高磷肥利用率是目前国内外科学家的研究热点。溶磷微生物在转化土壤自身难溶磷和阻止磷肥的固定方面发挥的重要作用尤为引人注目, 研究证明溶磷菌在

转化土壤难溶磷、提高磷肥利用率和促进作物生长等方面都具有显著的作用^[4-7]。而溶磷微生物的应用受到如菌株的退化、作物种类、土壤特性、气候条件、溶磷菌与其它微生物间的交互作用等影响而效果不稳定^[8-9]。如何解决这一问题成为溶磷微生物的研究重点, 高效利用溶磷微生物产生有机酸或者通过异源表达克隆到的溶磷相关基因产生有机酸是提高土壤磷素利用率最有效的一种方式^[10-12]。目前关于溶磷相关基因克隆以细菌为主, 其主要机制是将葡萄糖直接氧化产生葡

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (2011-10); 国家重大水专项巢湖项目农业面源课题 (2009ZX07103-002)

作者简介: 唐超西 (1987-), 女, 安徽宣城人, 硕士研究生, 研究方向为环境微生物。E-mail: tangchaoxi240@163.com

* 通信作者。Tel: +86-10-82108689; E-mail: gongcaas@163.com, zhucx120@163.com

收稿日期: 2011-09-27; 修回日期: 2012-01-04

葡萄糖(GA),其中葡萄糖的合成是由葡萄糖脱氢酶(GDH)和协同因子吡咯喹啉奎宁(PQQ)完成^[13]。而真菌溶磷相关基因的克隆主要是以黑曲霉和草酸青霉为主,其基因都能在*E. coli*中表达产生有机酸而溶解难溶磷^[14],但其主要机制不明确。本文拟通过构建黑曲霉 H1 的 cDNA 文库,利用磷酸三钙为唯一磷源筛选溶磷相关基因,并对其在*E. coli*中产酸能力和种类进行研究,以期通过分子生物学手段提高土壤难溶磷的利用效率。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和载体:菌株 H1 来自本实验室筛选的一株黑曲霉,载体 pBluescript II SK(+) 购自 TAKARA。

1.1.2 培养基:难溶无机磷固体/液体培养基、PDA 斜面培养基、LB 培养基等均参照文献^[15]配制。

1.1.3 主要试剂和仪器:RNAiso plus、DEPC 水购自 Takara 公司;文库构建试剂盒购自 Clontech 公司;Taq 酶、质粒提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒均购自全式金公司;T4 连接酶、*EcoRI* 和 *XhoI* 购自 NEB;其它试剂均为国产分析纯;PCR 引物由上海生物工程有限公司合成。PCR 仪为 GeneAmp PCR system 9700,高速冷冻离心机为 Heraeus 的 Sorvall Biofuge stratos,光学显微镜为 OLYMPUS BH-2,紫外分光光度计为天美科技有限公司的 UV-7501,pH 仪为 EUTECH pH510,离子色谱为美国戴安公司 ICS-3000 离子色谱仪。

1.2 黑曲霉 H1 的 cDNA 文库构建

1.2.1 黑曲霉 H1 的总 RNA 提取:将黑曲霉 H1 接种到 PDA 固体培养基上培养 3-5 d,再接入液体 PDA 培养基,30℃,200 r/min 培养 20-24 h。真空抽滤收集菌丝体,无菌水洗涤 3 次,滤纸吸干。取 0.2 g 左右菌丝,液氮研磨充分,提取总 RNA 并用 1% 琼脂糖电泳检测,具体方法参照文献进行^[16]。

1.2.2 cDNA 的合成及纯化:取 1 μg mRNA 作为合成 cDNA 第一链的模板,通过 SMARTscript™ 逆转录酶逆转录合成第一链 cDNA。以 2 μL 第一链 cDNA 产物为模板,通过 LD-PCR 合成并扩增第二链 cDNA,电泳检测 cDNA 第二链合成效果。利用

CHROMA SPIN + TE-1000 纯化 cDNA,去除小于 500 bp 的片段,沉淀回收 cDNA。

1.2.3 cDNA 的修饰:用 T4 DNA 聚合酶补平 cDNA 的末端后,在其两端连接 *EcoRI/XhoI* 定向接头,并用 *EcoRI/XhoI* 对接头进行酶切,得到 5'端为 *EcoRI*、3'端为 *XhoI* 酶切位点的双黏性末端 cDNA。

1.2.4 cDNA 初级文库的建立:纯化后的 cDNA 片段通过 T4 DNA 连接酶连接到经过 *EcoRI/XhoI* 双酶切的 pBluescript SK(+) 载体上,将连接产物电转化到宿主菌 *E. coli* HST08^[17]。将转化后的宿主菌接种在 2 mL LB 液体培养基中 37℃ 温浴 2 h,得到初级 cDNA 文库 4℃ 保存备用。

1.2.5 cDNA 文库的鉴定:取 2 μL cDNA 文库细菌培养液按 1:10 梯度稀释,均匀涂布于含氨苄青霉素(100 μg/mL)和 IPTG(0.1 mmol/L)的 LB 平板上 37℃ 培养过夜。根据菌落计数法推断文库浓度。随机挑取 50 个克隆子,用通用引物 T3(5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3' 和 T7(5'-AGCGGATAATTCACACAGG-3') 进行 PCR 扩增,检测插入片段长度及重组率。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测分子量大小。

1.3 基因 *psgA* 的筛选及生物信息学分析

将 cDNA 文库细菌培养液稀释涂布到含有氨苄青霉素(100 μg/mL)难溶磷无机盐培养基上,37℃ 培养 3-4 d,观察是否有透明溶磷圈产生,将产生溶磷圈的克隆子转代培养,以确定其稳定性,将功能稳定的克隆子提取质粒送上海生工生物技术有限公司测序后,将获得的 DNA 序列输入 GenBank,用 Blast 程序与数据库中的序列进行比较分析,利用 DNAMAN 6.0 进行开放阅读框分析。

1.4 克隆子培养过程中溶液 pH 和可溶磷含量的变化

在 150 mL 的三角瓶中装入 50 mL 带抗性的 LB 培养基和难溶磷无机盐培养液,接种携带基因 *psgA* 的克隆子菌液 1 mL,37℃,200 r/min 培养 48 h,同时以不含有该基因的菌作为对照,设置 3 个重复,在第 12、16、20、24、36 和 40 h 用 EUTECH pH510 测定溶液的 pH 值,同时测量溶液可溶磷的含量。

1.5 克隆子表达胞外产物分析

试验设计同 1.4 的方法。在第 12、16、20、24 和 36 h 利用离子色谱分析溶液中有机的含量。

2 结果和分析

2.1 黑曲霉 H1 的 cDNA 文库构建

从黑曲霉 H1 中提取总 RNA 电泳检测(图 1), 由图可知提取的总 RNA 为 3 条带型整齐, 无拖尾带, 分别为 28S、18S 和 5.8S RNA, 其 OD_{260}/OD_{280} 为 1.962, 说明提取的总 RNA 结构完整, 可以作为 cDNA 双链合成的模板。

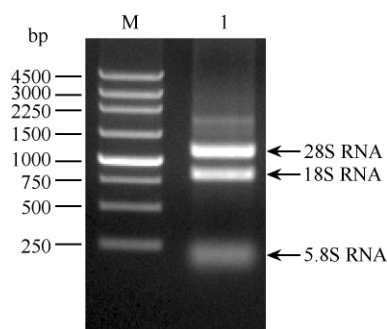


图 1 黑曲霉 H1 的总 RNA。

Fig. 1 Total RNA of *Aspergillus niger* H1. M: 250 bp Ladder DNA marker; 1: total RNA of *Aspergillus niger* H1.

以黑曲霉 H1 的 mRNA 为模板通过 SMARTscript™ 逆转录酶逆转录合成第一链 cDNA, 再通过 LD-PCR

合成并扩增第二链 cDNA, 双链 cDNA 整个条带呈弥散状, 大小为 200 - 4500 bp, 其大小符合真菌 cDNA 长度, 利用 CHROMA SPIN + TE-1000 纯化收集 500 - 4500 bp 大小的片段。由此看出, 扩增的双链 cDNA 产物能保证黑曲霉溶磷相关基因的完整性, 可用于构建反映溶磷相关基因表达状况的代表性 cDNA 文库。

将纯化后的 cDNA 与载体连接, 电击转化后, 根据菌落计数法推断 cDNA 文库库容量为 5.29×10^6 cfu/mL, 根据蓝白斑比率计算重组率为 99.24%。随机挑取转化子, 提取质粒, 通用引物扩增后, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测插入片段的大小(图 2), 文库随机插入外源 cDNA 片段的平均长度从 500 - 4500 bp, 主要分布在 1 - 2 kb 之间, 表明该 cDNA 文库保证了黑曲霉 H1 的 cDNA 文库的完整性。

2.2 基因 *psgA* 的筛选及生物信息学分析

将克隆子涂布到具有氨苄抗性的磷酸三钙无机盐培养基上, 37℃ 培养 3 d, 共筛选到能够产生明显透明圈的克隆子 61 个。将这些克隆子转接到难溶磷无机盐培养基上转代培养 3 d, 其中克隆子 H-54 仍能够产生明显的透明圈, 表明其功能稳定(图 3)。

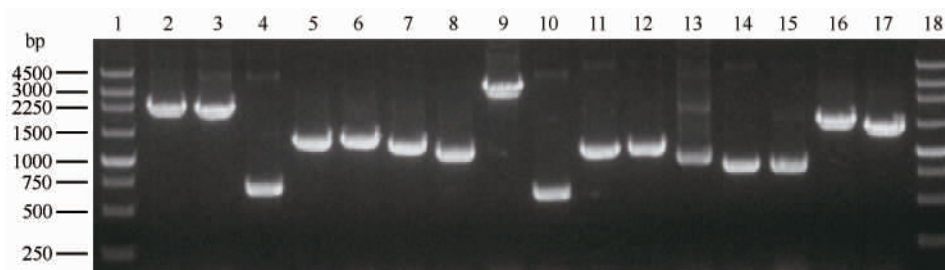


图 2 随机挑取克隆的 PCR 产物电泳分析

Fig. 2 Analysis of PCR products from randomly picked clones. 1 and 18: 250bp Ladder DNA marker; 2-17: PCR products.

提取克隆子 H-54 的质粒测序, 结果表明克隆子 H-54 的 cDNA 片段全长 839 个核苷酸 (n. t) (GenBank 登录号为 JN716317), 在 NCBI 上进行序列比对分析, 结果表明, 该序列与 *Aspergillus niger* CBS 513.88 和 *Aspergillus niger* contig An13c0090 的 mRNA 同源性达到 99%, 与目前已知的其它序列同源性很低, 将其命名为 *psgA*。根据 cDNA 片段翻译成蛋白后分析, 其中 5'-端非编码区长 96 n. t, 编码区(从起始密码子 ATG 到终止密码子 TAG)长 540

n. t, 编码的蛋白含 179 个氨基酸残基, 3'-端非编码区长 203 n. t。氨基酸在 NCBI 上进行序列比对分析, 结果表明, 该氨基酸序列与 hypothetical protein ANI_1_758114 (*Aspergillus niger* CBS 513.88) 的同源性为 100%, 而与 hypothetical protein CCM_04721 (*Cordyceps militaris* CM01)、conserved hypothetical protein (*Penicillium marneffeii* ATCC 18224) 以及 hypothetical protein SS1G_08851 (*Sclerotinia sclerotiorum* 1980) 等其它蛋白的同源性都在 65% 以

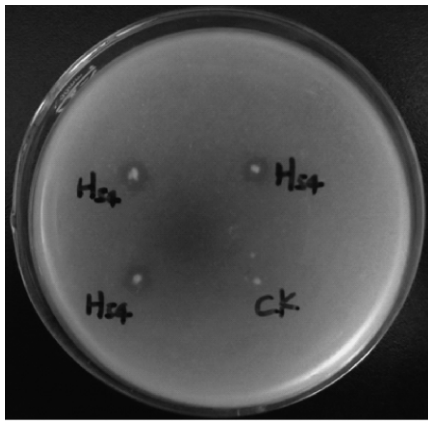


图3 克隆子 H-54 的溶磷效果

Fig. 3 The phosphate-dissolving effect of H-54.

下。

2.3 携带基因 *psgA* 克隆子对溶液 pH 值以及可溶磷含量的影响

将活化后的克隆子 H-54 和不携带 *psgA* 的克隆子分别接入到具有有氨苄抗性的难溶磷无机盐培养基中,测定溶液 pH,结果(图4)表明,接种克隆子 H-54 后,12 h 时溶液的 pH 值显著减低,在 36 h 时,溶液的 pH 值降到最低,达到 3.93,之后溶液的 pH 值保持稳定。而对照的 pH 值只降低至 5.9 不再变化。

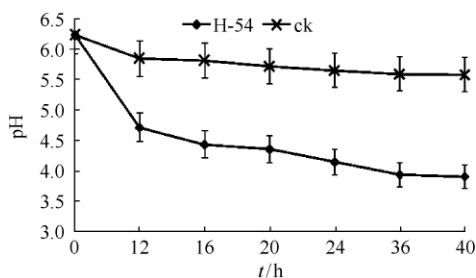


图4 接种克隆子 H-54 和 CK 后溶液的 pH 值变化

Fig. 4 The pH value changes of culture media by H-54 and CK during incubation. H-54: The clone with *psgA*; CK: The clone without *psgA*.

可溶性磷含量与溶液中 pH 值变化趋势相反,随着培养时间延长,pH 值逐渐减低,可溶磷含量逐渐升高,36 h,接种克隆子 H-54 的溶液中可溶磷含量升到最高,达到 0.105 mg/mL(图5),而对照溶液可溶磷含量几乎没有变化。

2.4 克隆子 H-54 胞外产物分析

克隆子 H-54 活化后接入到含有氨苄抗生素的难溶磷无机盐培养基中,利用离子色谱测定溶液中

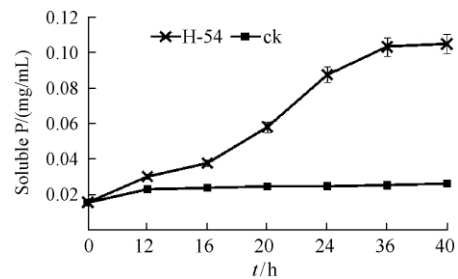


图5 接种克隆子 H-54 和 CK 后溶液可溶磷含量的变化

Fig. 5 The content changes of soluble phosphorus in culture media by H-54 and CK during incubation. H-54: The clone with *psgA*; CK: The clone without *psgA*.

有机酸。结果表明,不含 *psgA* 的 *E. coli* HST08 只产生少量甲酸和乙酸,其含量分别为 1.82 - 10.54 $\mu\text{g/mL}$ 和 14.35 - 50.43 $\mu\text{g/mL}$,而克隆子 H-54 产生了 4 种有机酸:甲酸、乙酸、苹果酸和 α -酮戊二酸(表1)。甲酸和乙酸在培养 12 h 时产生,随着时间延长,其含量逐渐升高,溶液的 pH 值逐渐降低,36 h 时,甲酸和乙酸的含量分别达到 50.26 $\mu\text{g/mL}$ 和 346.53 $\mu\text{g/mL}$ 。苹果酸和 α -酮戊二酸在培养 24 h 时产生,36 h 时,其含量可分别达到 62.53 $\mu\text{g/mL}$ 和 175.48 $\mu\text{g/mL}$ 。

表1 克隆子 H-54 培养过程中产生的有机酸种类和含量
Table 1 The types and contents of organic acids produced by H-54 during incubation

t/h	Organic acid / ($\mu\text{g/mL}$)			
	methanoic acid	acetic acid	malic acid	α -ketoglutaric acid
12	27.43	180.60	-	-
16	29.65	276.85	-	-
20	32.20	308.65	-	-
24	35.60	311.42	57.11	156.84
36	50.26	346.53	62.53	175.48

3 讨论

溶磷菌广泛存在于自然界中^[18],其中黑曲霉是一类常见的溶磷菌^[19-20],本实验出发菌株黑曲霉 H1 在 PDA 培养液中培养 18 h 能将溶液 pH 值从 7.0 降低到 1.65^[6],其产生有机酸主要为乳酸,含量达到 372.5 $\mu\text{g/mL}$,具有很强的溶磷能力。利用该菌株为出发菌,根据真菌 mRNA 的 3'末端带 Oligo(dG)和 5'末端真核 mRNA 特有的“帽子结构”,采用 SMART 技术,成功构建了黑曲霉 H1 的全长

cDNA 文库。同时,利用克隆子在难溶磷无机盐培养基上产生透明圈的现象,成功筛选到溶磷相关基因 *psgA*。

微生物的溶磷机理大致分为 5 种:有机酸、氢质子($\text{NH}_4\text{-N}$ 供应)、磷酸酶(蛋白质)、螯合作用和氧化还原^[21],其中产生有机酸是一种主要的溶磷方式^[22-24],有机酸能与铁、铝、钙等离子螯合,从而使难溶磷转化为有效磷^[25]。溶磷微生物产生比较常见的有机酸有琥珀酸、柠檬酸、 α -酮戊二酸、苹果酸、丙酮酸、乳酸、乙酸、甲酸、丙酸、富马酸和草酸^[26-29]。本实验选用的 *E. coli* HST08 和克隆子都能产生有机酸,其中不携带 *psgA* 的 *E. coli* HST08 能产生少量甲酸和乙酸,而携带 *psgA* 的克隆子 H-54 产生了 4 种有机酸甲酸、乙酸、苹果酸和 α -酮戊二酸,一方面其携带的 *psgA* 促进了甲酸和乙酸合成,另一方面诱导合成了苹果酸和 α -酮戊二酸,说明 *psgA* 能够使 *E. coli* HST08 分泌更多种类的有机酸,能在固体和液体状态下溶解磷酸三钙。

Aspergillus niger CBS 513.88 作为模式菌株研究^[30-31],已经进行了全基因组的测序。本实验克隆的 cDNA 片段和翻译后的蛋白与其对应的 cDNA 片段和翻译后的蛋白具有 99% 的同源性,表明其为同一个基因和蛋白,hypothetical protein ANI-1-758114 是根据 cDNA 片段翻译后得到,目前该蛋白还没有进行功能鉴定,本实验通过在 *E. coli* HST08 胞外产物分析,表明该基因能够使 *E. coli* HST08 分泌更多种类的有机酸,对其功能进行了初步的鉴定。实验克隆的 cDNA 片段和翻译后的蛋白与其它蛋白同源性都低于 65%,表明与其它蛋白不是同一类蛋白。

参考文献

- [1] 邵玉芳,樊明寿,乌恩,郑红丽,邵金旺. 植物根际解磷细菌与植物生长发育. 中国农学通报 (*Chinese Journal of Agricultural*), 2007, 23(4): 241-244.
- [2] Lu QM, Liao ZW. Comparative study on characteristics of P fixation by Mn, Fe, and Al. *Pedosphere*, 1997, 7: 325-330.
- [3] Stevenson FJ, Cole MA. Cycles of Soil Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients. the first edition. New York: John Wiley and Sons, 1986.
- [4] 范丙全,金继运,葛诚. ³²P 示踪法研究溶磷真菌对磷肥转化固定和有效性的影响. 应用生态学报 (*Chinese Journal of Applied Ecology*), 2004, 15(11): 2142-2146.
- [5] Kucey RM. Increased phosphorus uptake by wheat and field beans inoculated with a phosphorus-solubilizing *Penicillium bilai* strain and with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, 53(12): 2699-2703.
- [6] 龚明波,范丙全,金振国,魏国才,王洪媛. 适应玉米生产的溶磷真菌的筛选及其应用研究. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2010, 50(12): 46-53.
- [7] Singh B, Satyanarayana T. Microbial phytases in phosphorus acquisition and plant growth promotion. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2011, 17(2): 93-103.
- [8] Domey S, Lippmann G. Interrelationships between microorganisms and plants in soil. *Soil Science*, 1988, 18:457-461.
- [9] Loganathan P, Nair S. Crop-specific endophytic colonization by a novel, salt-tolerant, N₂-fixing and phosphate-solubilizing *Gluconacetobacter* sp. from wild rice. *Biotechnology Letters*, 2003, 25(6): 497-501.
- [10] Sperber JL. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. *Australian Journal of Agricultural Research*, 1958, 9: 782-787.
- [11] López-Bucio J, Vega OM, Guevara-García A, Herrera-Estrella L. Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. *Nat. Biotechnol.*, 2000, 18: 450-453.
- [12] Oburger E, Jones DL, Wenzel WW. Phosphorus saturation and pH differentially regulate the efficiency of organic acid anion-mediated P solubilization mechanisms in soil. *Plant and Soil*, 2011, 341(1): 363-382.
- [13] Goldstein AH, Braverman K, Osorio N. Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) rhizobacterium. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 30(4): 295-300.
- [14] Lü J, Gao XR, Dong ZM, An LJ. Expression of mitochondrial malate dehydrogenase in *Escherichia coli*

- improves phosphate solubilization. *Annals of Microbiology*, 2011, DOI 10.1007/s13213-011-0297-3.
- [15] 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法. 北京: 科学出版社, 1985.
- [16] 张璘, 鱼红闪, 金凤夔. 真菌中 RNA 的提取方法. 大连轻工业学院学报 (*Journal of Dalian Institute of Light Industry*), 2004, 23(1): 22-24.
- [17] 韦晓明, 苏明权, 杨安钢, 赵晶, 温伟红, 郝晓柯. 电转化条件对大肠杆菌 XL1-Blue 菌株转化效率的影响. 生物技术通讯 (*Biotechnology*), 2003, 14(6): 566-568.
- [18] Yu X, Liu X, Zhu TH, Liu GH, Mao C. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from walnut and their effect on growth and phosphorus mobilization. *Biology and Fertility of Soils*, 2011, 47(4): 437-446.
- [19] Abd-Alla MH, Omar SA. Survival of rhizobia/bradyrhizobia and a rock phosphate-solubilizing fungus *Aspergillus niger* on various carriers from some agro-industrial wastes and their effects on nodulation and growth of faba bean and soybean. *Journal of Plant Nutrition*, 2001, 24(2): 261-272.
- [20] Xiao CQ, Chi R, Li XH, Xia M, Xia ZW. Biosolubilization of Rock Phosphate by Three Stress-Tolerant Fungal Strains. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2011, published online 31 May 2011.
- [21] Altomare C, Norvell WA, Bjorkman T, Harman GE. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(7): 2926-2933.
- [22] Sperber JI. Solution of mineral phosphate by soil bacteria. *Nature*, 1957, 180: 994-995.
- [23] Rashid M, Khalil S, Ayub N. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2004, 7(2): 187-196.
- [24] Kim KY, Jordan D, McDonald GA. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biology-and-Fertility-of-Soils*, 1997, 26(2): 79-87.
- [25] 冯月红, 姚拓, 龙瑞军. 土壤解磷菌研究进展. 草原与草坪 (*Grassland and Turf*), 2003, (1): 3-7.
- [26] Banik S, Dey BK. Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing micro-organisms. *Plant and Soil*, 1982, 69(3): 353-364.
- [27] Goldstein AH, Liu ST. Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola*. *Biotechnology*, 1987, 5: 72-74.
- [28] Kim KY, Jordan D, Krishnan HG. Expression of genes from *Rahnella aquatilis* that are necessary for mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 159: 121-127.
- [29] Kim KY, Hwangbo H, Kim YW, Kim HJ, Park KH. Organic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedium* 60-2G. *J Kor Soc Soil Fertil*, 2002, 35: 59-67.
- [30] Pel HJ, Winde JH, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G, Schaap PJ. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology*. 2007, 25: 221-231.
- [31] Machida M, Asai K, Sano M, Tanaka T, Kumagai T. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*. 2005, 438(7071): 1157-1161.

Construction of cDNA library of *Aspergillus niger* H1 and screening of phosphate-dissolving related gene

Chaoxi Tang^{1,3}, Mingbo Gong^{2*}, Shunpeng Li¹, Changxiong Zhu^{3*}

¹College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Key Laboratory for Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China

²Chinese Academy of Agricultural Sciences, Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Beijing 100081, China

³Chinese Academy of Agricultural Sciences, Institute of Agricultural Environment and Sustainable Development, Beijing 100081, China

Abstract: [Objective] To obtain phosphate-dissolving genes from cDNA library of *Aspergillus niger* H1. [Methods] The double-stranded cDNA was synthesized using switching mechanism at 5' end of RNA transcript technique and ligated to the vector pBluescript II SK (+). We transformed recombinant plasmid into *E. coli* HST08, resulting in a primary cDNA library. We screened clones with phosphate-dissolving activities on the insoluble phosphate medium and blasted the sequence in National Center for Biotechnology Information (NCBI). To study the phosphate dissolving mechanisms of the cloned gene, we analyzed the changes of the pH value, the soluble phosphate content and the production of organic acids in the insoluble phosphate liquid medium inoculated with the clones harboring the phosphate-dissolving gene. [Results] A cDNA library of *A. niger* H1 was successfully constructed. Titer tests showed that the content of constructed *A. niger* H1 cDNA library reached 5.65×10^6 cfu/mL, in which the percentage of recombinant clones was 99.15%. We screened 61 clones with phosphate-dissolving activities on the solid medium with insoluble phosphate. The corresponding gene in one of these clones was identified. The full length cDNA of clone H-54 was 839 bp, encoding a predicted protein with 180 amino acid residues. The expression of phosphate-dissolving gene in *E. coli* enhanced organic acids secretion and improved the phosphate solubilizing activity. Formic acid and acetic acid were found in 12 h, and malic acid and α -ketoglutarate were secreted in 24 h. The clone H-54 decreased the pH value of medium from 6.32 to 3.93 and released soluble phosphate up to 0.105 mg/mL in 36 h. [Conclusion] We had obtained a phosphate-dissolving gene designated *psgA* from *Aspergillus niger* H1.

Keywords: *Aspergillus niger*, cDNA library, gene *psgA*, organic acid

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund (2011-40) and by the Chaohu Project of National Special Water Project (2009ZX07103-002)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-82108689; E-mail: gongcaas@163.com; zhucx120@163.com

Received: 27 September 2011 / Revised: 4 January 2012