

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
49(2) 262-268; 4 February 2009  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 黑曲霉 $\alpha$ -葡萄糖苷酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达

童星<sup>1,2,3</sup>, 唐秋嵩<sup>1</sup>, 吴玉飞<sup>1</sup>, 吴敬<sup>1,2\*</sup>, 陈坚<sup>1,2,3</sup>

(江南大学<sup>1</sup>; 食品科学与技术国家重点实验室<sup>2</sup>; 工业生物技术教育部重点实验室<sup>3</sup>; 环境与土木工程学院, 无锡 214122)

**摘要** 【目的】以毕赤酵母(*Pichia pastoris*) KM71 为宿主菌表达黑曲霉(*Aspergillus niger*) SG136  $\alpha$ -葡萄糖苷酶( $\alpha$ -glucosidase)。【方法】以实验室保藏的 *A. niger* SG136 总 DNA 为模板, 根据 NCBI 数据库中 *A. niger* CBS 513.88  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的 cDNA 序列(*aglu*) 设计引物, 通过 PCR 和重叠延伸 PCR(overlap-PCR) 方法, 扩增得到 *aglu*, 将其克隆到载体 pMD18-T simple vector, 测序结果表明, *aglu* 编码 960 个氨基酸。与 *A. niger* CBS 513.88  $\alpha$ -葡萄糖苷酶相比仅有一个氨基酸的差异。将得到的 *aglu* 亚克隆到质粒 pPIC9K, 构建表达载体 pPIC9K-*aglu*, 经 *Bgl* II 线性化后电转化 *P. pastoris* KM71, 经过 MD、YPD/G418 平板筛选表型, PCR 方法验证, 获得分泌表达重组 *P. pastoris* KM71/pPIC9K-*aglu*。摇瓶培养中通过添加终浓度为 1% 的甲醇诱导  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的分泌。【结果】SDS-PAGE 显示表达蛋白的大小亚基分子量分别为 98 kDa 和 33 kDa, 阴性对照中没有出现此条带, 非变性电泳检验为一条带。制备的粗酶液的酶学性质表明, 转苷反应最适 pH 为 5, 最适温度为 55℃。在最适 pH 和温度下, 反应 24 h 时低聚异麦芽糖的总含量达到最大为 26.0%。【结论】黑曲霉  $\alpha$ -葡萄糖苷酶在 *P. pastoris* 中获得可溶性表达, 并证明有一定的转糖苷活性。

**关键词**: 黑曲霉;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶; 克隆; overlap-PCR; 毕赤酵母; 表达

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)02-0262-07

$\alpha$ -葡萄糖苷酶( $\alpha$ -glucosidase, EC 3.2.1.20), 又名  $\alpha$ -D-葡萄糖苷水解酶, 它可以从低聚糖的非还原末端切割  $\alpha$ -1,4 糖苷键, 释放出葡萄糖, 并将游离的葡萄糖基以  $\alpha$ -1,6 糖苷键形式转移到其他糖底物上, 形成具有非发酵性的功能性低聚糖—低聚异麦芽糖(简称 IMO, 主要包括异麦芽糖、潘糖、异麦芽三糖等)<sup>[1]</sup>。低聚异麦芽糖作为功能性食品及添加剂, 被摄入人体后不会被消化道吸收, 也不能被有害菌利用, 但可以被肠道的益生菌如双歧杆菌作为碳源利用<sup>[2]</sup>, 故其具有良好的双歧因子作用, 可以改善人体肠道的功能。此外, 由于低聚异麦芽糖的甜度只有普通糖的一半, 适宜糖尿病人食用<sup>[3]</sup>, 可以作为饮料糖果和保健品的添加剂。在饲料工业中, 低聚异麦

芽糖被认为可以在提高家禽存活率的同时, 又不会存在合成饲料带来对人体的副作用, 据报道, 日本 50% 左右的饲料中都含有低聚异麦芽糖。目前, 低聚异麦芽糖已经在食品、医药和饲料加工行业有了很广泛的应用。

市场上低聚异麦芽糖产品根据有效成分的含量多少可分为两种规格 IMO-500(低聚异麦芽糖含量大于 50%) 和 IMO-900(低聚异麦芽糖含量大于 90%)。目前国内生产低聚异麦芽糖用  $\alpha$ -葡萄糖苷酶主要依赖于进口, 多为日本天野酶制剂公司提供, 该制品从黑曲霉(*Aspergillus niger*) 发酵制取, 它可以催化水解和转糖苷反应。

虽然 *A. niger* 是优良的产  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的菌

基金项目: 国家杰出青年基金(20625619); 食品科学与技术国家重点实验室科研基金(SKLF-MB-200802); 国家 973 项目(2007CB 714036)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-510-85327802; E-mail: jingwu@jiangnan.edu.cn

作者简介: 童星(1985-), 女, 安徽芜湖人, 硕士研究生, 主要从事环境生物技术的研究。E-mail: tongxing293@hotmail.com

收稿日期: 2008-09-24; 修回日期: 2008-11-12

株<sup>[4]</sup>,但野生 *A. niger* 产酶水平低,难以提取纯化。国外研究者们开始进行基因工程菌生产  $\alpha$ -葡萄糖苷酶。近年来,日本研究人员分别以 *Aspergillus nidulans* 和 *Emericella nidulans* 为宿主菌表达了有活性的 *A. niger*  $\alpha$ -葡萄糖苷酶<sup>[5-6]</sup>。国内目前对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的研究还主要在  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的生产菌种选育和酶学性质方面<sup>[7]</sup>,虽然广西大学的于岚通过 RT-PCR 方法扩增得到 *A. niger*  $\alpha$ -葡萄糖苷酶 cDNA,构建重组质粒并尝试在大肠杆菌中表达,但酶表达量偏低,而且重组蛋白是胞内酶,分离纯化的成本相对较高<sup>[8]</sup>。

选用毕赤酵母真核表达系统表达 *A. niger*  $\alpha$ -葡萄糖苷酶,其中选用的酵母表达载体 pPIC9K 含有分泌型信号肽,利于胞外表达<sup>[9]</sup>。通过抗生素浓度梯度筛选得到高拷贝数的基因整合到染色体 DNA 上,在提高表达量的基础上也保证后代的遗传稳定性。而且酵母系统的后修饰能力有可能满足  $\alpha$ -葡萄糖苷酶糖基化需要<sup>[10]</sup>。

本实验通过 PCR 和 overlap-PCR 方法扩增得到黑曲霉  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的 cDNA,亚克隆构建表达载体 pPIC9K-*aglu*,获得重组毕赤酵母 KM71/pPIC9K-

*aglu*, SDS-PAGE 和非变性电泳显示发酵液中有目标蛋白表达,其转苷活性由 HPLC 法检测验证。本研究表明黑曲霉  $\alpha$ -葡萄糖苷酶在毕赤酵母中得到可溶性表达,为进一步获取一定量高纯度酶进行酶学定性,研究催化分子机理、以及大规模酶制品的大规模制备提供了坚实的基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:**黑曲霉 (*Aspergillus niger*) SG136,大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM 109,毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) KM71 表达质粒 pPIC9K,为实验室保藏。质粒 pMD18-T simple vector 购自 TaKaRa 公司。

**1.1.2 培养基:**LB、SOB、SOC 培养基,细菌常规通用培养基。YPD、BMGY、BMMY 培养基,重组酵母常用培养基。

**1.1.3 引物:**根据 NCBI 数据库中 *A. niger* CBS 513.88 的成熟 *aglu* 基因序列(登录号:4991096),采用 Primer Premier 软件方法设计了 P1-P8 共 8 个引物,其中 P2 和 P3、P4 和 P5、P6 和 P7 都有 15 bp 左右的序列首尾互补,利于片段延伸(表 1)。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

Primer	Sequence (5'→3')	Size/ bp	Restriction site
P1	ATTAATGCGGCCGCTCCACCACTGCCCTTCG	33	Not I
P2	CCGTAGAGGTTTGTCAATAGGTGTTC	28	
P3	ACCTATGACCAAAACCTCTACGGCCA	27	
P4	TCAATATCGGTCCAGATATATTCCAAC	27	
P5	GAATATATCTGGACCGATATTGACTACATGCACG	34	
P6	CGTAGCGTAGGCATCAGAGGCATTTTC	27	
P7	GCCTCTGATGCCTACGCTACGTATGACA	28	
P8	AGCACTAGCGGCCGCGCATTCCAATACCCAGTTTTCC	37	Not I

**1.1.4 主要试剂和仪器:**质粒小量提取试剂盒购自上海生工生物工程公司,胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司,氨苄青霉素,CIAP 购自华美生物工程公司, *Eco*R I, *Not* I, T4 连接酶, *Ex* HS *Taq* 酶购自 Takara 公司。酵母无氨基基本氮源培养基(YNB),遗传霉素 G418 购自上海生工生物工程公司。其他试剂为分析纯。PCR 仪,凝胶成像仪,蛋白电泳仪购自美国 BIO-RAD 公司, DYY-6C 型电泳仪购自北京六一仪器厂。

### 1.2 PCR 扩增目的基因

**1.2.1 DNA 的提取:***A. niger* SG136 基因组 DNA 的提取参照真菌 DNA 提取方法<sup>[11]</sup>

**1.2.2 PCR 扩增目的基因:**PCR 和 over-lap PCR 反

应采用 50  $\mu$ L 体系,常规 PCR 程序从基因组 DNA 中克隆出各段外显子,再用 over-lap PCR 方法将各段外显子连接起来,具体步骤如图 1 所示。第一轮 PCR 分别用引物 P1 和 P2、P3 和 P4、P5 和 P6、P7 和 P8,以基因组 DNA 为模板,通过 PCR 得到 exon 1、exon 2、exon 3、exon 4,第一轮 overlap-PCR,以 exon 2 和 exon 3 为模板,P3 和 P6 为引物,扩增得到 exon 2-3;第二轮 overlap-PCR,以 exon 2-3 和 exon 4 为模板,P3 和 P8 为引物,扩增得到 exon 2-3-4;第三轮 overlap-PCR,以 exon 1 和 exon 2-3-4 为模板,P1 和 P8 为引物,扩增出 exon 1-2-3-4,将其克隆到 pMD18-T simple vector (pMD18-T-*aglu*)送至上海生工生物工程有限公司测序。

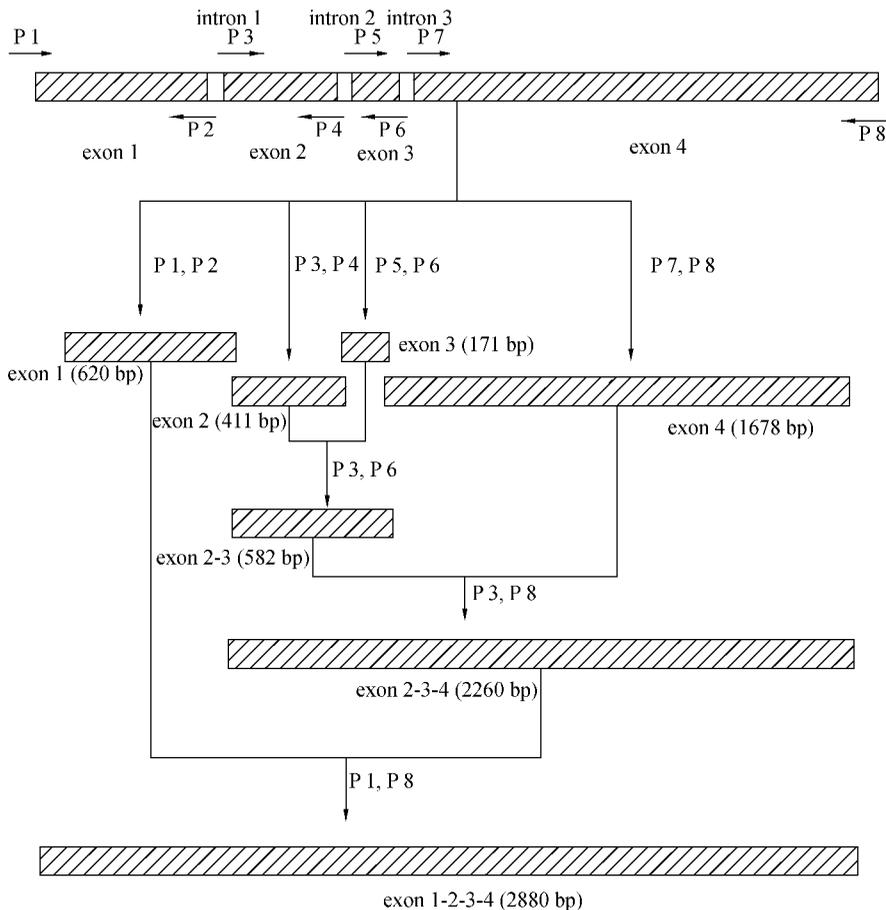


图1  $\alpha$ -葡萄糖苷酶基因结构示意图与 overlap-PCR 过程

Fig.1 Scheme of gene encoding  $\alpha$ -glucosidase and overlap-PCR process.

### 1.3 表达载体的构建

*Not* I 酶切 pMD18-T-*aglu* 和质粒 pPIC9K, 分别胶回收基因和载体片段, 然后连接过夜, 转化 *E. coli* JM109 感受态细胞<sup>[12]</sup>, 涂布 LB/Amp 抗性平板培养过夜, 挑取单菌落于 10 mL LB/Amp 抗性的液体培养基中, 培养 8 h 左右, 抽提质粒, 酶切验证与测序, 得到正确的表达载体命名为 pPIC9K-*aglu*。

### 1.4 转化与筛选

*Bgl* II 酶切表达载体 pPIC9K-*aglu*, 线性化电转化毕赤氏酵母 KM71 感受态细胞, 山梨醇重悬涂布 MD 平板, 30°C 培养 72 h 至长出单菌落<sup>[13]</sup>。挑取回复突变菌株接种于 YPD/G418 平板上, 30°C 培养 48 h 至长出单菌落(为获得多拷贝的 *aglu* 基因的菌株, G418 浓度筛选梯度依次为 0.5 mg/mL、1 mg/mL、2 mg/mL、4 mg/mL)。

pPIC9K 空质粒处理同上, 转化菌作为阴性对照。

### 1.5 重组毕赤酵母 KM 71/pPIC9K-*aglu* 的 PCR 鉴定

选取 YPD/G418(4 mg/mL) 上单菌落, 以 P1, P8 作为引物, 常规 PCR 方法, 检验是否能够扩增得到

全长 exon 1-2-3-4 片段。重组毕赤酵母 KM 71/pPIC9K 的 PCR 鉴定作为对照。鉴定后获得重组毕赤酵母 KM 71/pPIC9K-*aglu* 用于后续实验。

### 1.6 重组毕赤酵母 KM 71/pPIC9K-*aglu* 的培养

将鉴定正确的单菌落接种至 10 mL YPD 培养基 30°C 培养 24 h, 1 mL 培养液接入 50 mL BMGY, 30°C 培养 24 h, 至 OD 约为 4.0, 离心收集菌体, 用 25 mL BMMY 培养基重悬培养, 甲醇诱导表达。分别于 24 h、48 h、72 h、96 h 取样, 每次取样 200  $\mu$ L, 离心收集上清, 同时补加 250  $\mu$ L 甲醇至终浓度为 1%。阴性对照重组毕赤酵母 KM 71/pPIC9K 培养方法同上。

### 1.7 SDS-PAGE 和非变性电泳检验表达产物

SDS-PAGE 采用碧云天蛋白电泳试剂盒操作, 分离胶浓度 12%, 浓缩胶 5%。发酵液加入 5 $\times$  上样缓冲液, 沸水浴 5 min 后上样 6  $\mu$ L 进行电泳。

非变性电泳, 选用 pH 8.5 的电泳缓冲液, 配制 8% 凝胶浓度, 凝胶中不含 SDS, 发酵液加入 5 $\times$  上样缓冲液(其中不含 SDS 和巯基乙醇), 混匀上样 6  $\mu$ L, 冰水浴电泳系统。

## 1.8 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的转苷反应

收集毕赤酵母发酵培养的上清液,硫酸铵沉淀,透析,制成粗酶液,测定转苷活性方法<sup>[14]</sup>如下:用柠檬酸缓冲液配制不同 pH 条件 10% 的麦芽糖溶液,加入 0.5% 粗制的浓缩酶液,不同反应温度下反应一段时间,隔时间取样,然后煮沸 5 min,0.22  $\mu$ m 微孔过滤,HPLC 检测产物<sup>[15]</sup>。

高效液相色谱分析的条件:示差折光检测器,色谱柱(I):钙型强碱性离子交换树脂 SugarPak1 1300 mm  $\times$  6.5 mm;柱温:85 $^{\circ}$ C;池温(检测器):30 $^{\circ}$ C;流动相:水;流速:0.5 mL/min;进样量:10  $\mu$ L。色谱柱(II):Hypersil NH<sub>2</sub>,250 mm  $\times$  4.6 mm;柱温:30 $^{\circ}$ C;池温(检测器):30 $^{\circ}$ C;流动相:乙腈/水(75/25 V/V);流速:1 mL/min;进样量:10  $\mu$ L。

## 2 结果

### 2.1 *A. niger* SG136 *aglu* 的 cDNA 的获得

*A. niger* SG136 的 *aglu* 基因含有 4 个外显子和 3 个内含子,本实验尝试先提取 *A. niger* SG136 的基因组 DNA,采用 PCR 方法从基因组中克隆出各个外显子,再用 over-lap PCR 方法将各个外显子两两连接,获得 cDNA 序列。扩增得到的各段外显子、两两连接外显子片段均与理论值相符,将最终得到的 cDNA 克隆到 pMD18-T simple vector(图略)。测序结果表明 *aglu* 的基因全长 2880 bp,共编码 960 个氨基酸,与 *A. niger* CBS 513.88 *aglu*(登录号:4991096)编码蛋白质序列相比在第 898 位氨基酸有差异,*A. niger* CBS 513.88 是脯氨酸,而 *A. niger* SG136 是丝氨酸。

### 2.2 表达载体 pPIC9K-*aglu* 的构建

将 pMD18-T-*aglu* 和载体质粒 pPIC9K 分别经 *Not*I 单酶切,胶回收、连接、转化 *E. coli* JM109,抽提质粒。为区别单一酶切后载体与基因连接的方向性,本实验中选择 *Eco*R I 酶切所得质粒进行验证。在基因的 2221,2320 位和载体质粒 1223 位存在 *Eco*R I 酶切位点,当选择 *Eco*R I 酶切时,如果载体自连,则得到一条 9300 bp 的条带;如果基因与载体正向连接,则会得到 2200 bp 左右和 10000 bp 左右的条带;如果基因与载体反向连接,则会得到 800 bp 左右和 11500 bp 左右的条带。将抽提的质粒经 *Eco*R I 酶切,得到了 2200 bp 左右和 10000 bp 左右的条带,验证正确,将其命名为 pPIC9K-*aglu*。

### 2.3 重组毕赤酵母 KM 71/pPIC9K-*aglu* 的构建与筛选

将表达载体 pPIC9K-*aglu* 线性化电转毕赤酵母

KM 71 感受态细胞,涂布 MD 平板,YPD/G418 平板筛选浓度梯度为 0.5 mg/mL,1 mg/mL,2 mg/mL,4 mg/mL,从 4 mg/mL YPD/G418 平板上挑取单菌落,以 P1 和 P8 为引物,菌落 PCR 验证,扩增得到的全长基因片段与理论值(2880 bp)相符,而阴性对照没有对应的条带。

### 2.4 SDS-PAGE 和非变性电泳检验表达产物

挑取表达菌株接种于 50 mL BMYG 的培养基中,30 $^{\circ}$ C 振荡培养约 24 h,离心收集菌体,用含 1% 的甲醇的 BMMY 培养基重悬菌体,诱导表达。不同时间取样,蛋白经浓缩后溶于 5  $\times$  上样缓冲液,72 h 时出现目标条带,SDS-PAGE 检验结果见图 2-A。从图中可见两条主要条带,分别为 98 kDa 和 33 kDa,其与天然的 *A. niger*  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的大小亚基理论分子量相符。而阴性对照中没有相应条带。同样样品经非变性电泳结果见图 2-B,显示仅为一条带。

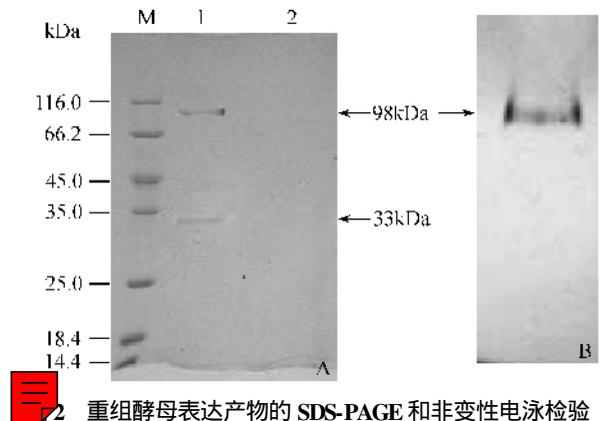


图2 重组酵母表达产物的 SDS-PAGE 和非变性电泳检验

Fig.2 SDS-PAGE and native PAGE of recombinant *P. pastoris* culture supernatant. A: SDS-PAGE analysis. M: Marker; 1: Supernatant of *P. pastoris* KM 71/pPIC9K-*aglu*; 2: Supernatant of *P. pastoris* KM 71/pPIC9K. B: Native-PAGE analysis.

### 2.5 pH、温度和反应时间对转苷反应的影响

收集 72 h BMMY 发酵液浓缩,硫酸铵沉淀,沉淀复溶,透析,得到粗酶液。考虑到低聚异麦芽糖的生产中主要利用  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的转苷作用,本实验采用以麦芽糖为底物,考察 pH、温度以及反应时间对酶生成主要转苷产物异麦芽糖,异麦芽三糖和潘糖的影响。酶反应按照方法 1.2.8 进行,首先选取反应温度为 55 $^{\circ}$ C,pH 分别为 4,5,6,隔时间取样,HPLC 检测异麦芽糖,潘糖和异麦芽三糖的含量,结果表明反应的最适 pH 是 5(表 2)。

再考察 pH 为 5,反应温度分别为 45 $^{\circ}$ C,55 $^{\circ}$ C,65 $^{\circ}$ C 时,不同时刻异麦芽糖,潘糖和异麦芽三糖的生成情况,结果表明反应的最适温度为 55 $^{\circ}$ C(表 3)。

表 2 重组酶转苷反应的 pH 条件研究

Table 2 The effect of pH on the transglucosidation of recombinant enzyme

pH	Contents/%	Reaction time/h										
		2	4	6	8	12	16	20	24	28	32	36
4	I <sub>2</sub>	6.1	6.8	6.9	6.5	7.2	8.6	9.1	10.2	10.1	9.5	9.7
	P	5.2	4.3	5.1	5.9	6.2	6.1	5.8	6.2	5.3	4.8	4.9
	I <sub>2</sub>	2.5	2.6	2.2	3.1	3.6	2.8	3.2	3.5	3.6	3.0	3.0
	I <sub>2</sub> + P + I <sub>2</sub>	13.8	13.7	14.2	14.5	17.0	17.5	18.1	19.9	19.0	17.3	17.6
5	I <sub>2</sub>	7.2	8.0	8.8	10.5	11.2	12.0	12.2	14.0	13.5	13.8	13.8
	P	6.1	6.3	7.5	8.1	8.2	8.2	8.8	8.6	8.0	7.1	5.8
	I <sub>2</sub>	2.6	2.8	3.0	3.3	3.1	3.1	3.4	3.4	3.7	3.1	3.2
	I <sub>2</sub> + P + I <sub>2</sub>	15.9	17.1	19.3	21.9	22.5	23.3	24.4	26.0	25.2	24.0	22.8
6	I <sub>2</sub>	7.0	7.5	7.7	7.0	7.8	9.2	10.0	12.4	12.0	10.7	11.0
	P	5.2	5.4	5.1	5.2	5.2	5.7	5.8	6.0	5.4	4.8	5.0
	I <sub>2</sub>	3.0	2.8	3.1	3.3	3.1	3.2	2.9	3.0	3.1	2.8	2.7
	I <sub>2</sub> + P + I <sub>2</sub>	15.2	15.8	15.9	15.5	16.1	18.1	18.7	21.4	20.5	18.3	18.7

I<sub>2</sub>, P, I<sub>2</sub> represent isomaltose, panose and isomaltotriose respectively.

表 3 重组酶转苷反应的温度条件研究

Table 3 The effect of temperature on the transglucosidation of recombinant enzyme

Temperature/ °C	Contents/ %	Reaction time/h										
		2	4	6	8	12	16	20	24	28	32	36
45	I <sub>2</sub>	6.2	6.5	6.8	7.2	8.3	9.0	10.9	12.0	10.8	10.5	10.0
	P	4.7	4.8	5.0	5.4	5.8	6.1	6.4	6.5	6.5	5.9	5.8
	I <sub>2</sub>	2.4	2.5	2.8	2.7	3.0	3.0	3.3	3.2	2.8	2.8	2.7
	I <sub>2</sub> + P + I <sub>2</sub>	13.3	13.8	14.6	15.3	17.1	18.1	20.6	21.7	20.1	19.2	18.5
55	I <sub>2</sub>	7.2	8.0	8.8	10.5	11.2	12.0	12.2	14.0	13.5	13.8	13.8
	P	6.1	6.3	7.5	8.1	8.2	8.2	8.8	8.6	8.0	7.1	5.8
	I <sub>2</sub>	2.6	2.8	3.0	3.3	3.1	3.1	3.4	3.4	3.7	3.1	3.2
	I <sub>2</sub> + P + I <sub>2</sub>	15.9	17.1	19.3	21.9	22.5	23.3	24.4	26.0	25.2	24.0	22.8
65	I <sub>2</sub>	6.5	6.5	6.6	7.1	9.2	10.8	11.0	11.5	11.2	10.9	10.8
	P	5.1	5.2	5.5	5.9	5.9	6.8	6.7	7.0	6.8	6.8	6.1
	I <sub>2</sub>	2.6	2.7	3.0	3.1	3.0	3.0	3.2	3.1	2.9	2.6	2.5
	I <sub>2</sub> + P + I <sub>2</sub>	14.2	14.4	15.1	16.1	18.1	20.6	21.9	21.6	20.9	20.3	19.4

I<sub>2</sub>, P, I<sub>2</sub> represent isomaltose, panose and isomaltotriose respectively.

在最适条件 pH 5.55°C 下,反应 24 h 时三糖总量达到最大 26.0%。其中异麦芽糖的增长幅度最大,且在总产物中占有的比例也最大,潘糖和异麦芽三糖的变化较小。这些实验结果表明重组毕赤酵母 KM 71/pPIC9K-*aglu* 能够表达一定量的有活性的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶。

### 3 讨论

低聚异麦芽糖是一种功能性低聚糖,随着人类生活品质的改善,对它的需求正在日益增长。国内生产低聚异麦芽糖所用  $\alpha$ -葡萄糖苷酶目前还几乎完全依赖进口,多为日本天野酶制剂公司提供的来源于 *A. niger* 的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶制品。

本研究是采用 PCR 和 overlap-PCR 克隆出不含自身信号肽的 *A. niger* SG136 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的 cDNA,测序结果与 NCBI 数据库中 *A. niger* CBS 513.88  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的序列相比有一个氨基酸的差

异,这可能是不同菌株之间差异造成。构建的重组毕赤酵母 KM 71/pPIC9K-*aglu* 表达产物经电泳检验和转糖苷活性测定表明实现黑曲霉  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的可溶性表达。

据资料报道,天然黑曲霉  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的总基因全长 3124 bp,包括 4 个外显子和 3 个内含子,编码由 25 个氨基酸构成的典型真核生物信号肽和含有 960 个氨基酸的成熟肽<sup>[5]</sup>,又有研究显示,对成熟蛋白的 N 端测序发现,成熟蛋白的序列与基因翻译序列比较,在 253~266 位缺失了 14 个氨基酸,断裂成两个亚基,推测这是由于某种蛋白酶水解形成<sup>[16]</sup>。本研究中的表达产物具备酶功能,非变性电泳为一条带以及 SDS-PAGE 显示两条分子量分别为 98 kDa 和 33 kDa 的蛋白条带,这表明实验所克隆的一个阅读框架编码的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶在翻译后修饰加工中被水解为与文献报道相符的天然黑曲霉  $\alpha$ -葡萄糖苷酶两个亚基的分子量是相符的,说明在宿主菌

毕赤酵母中存在相应的蛋白水解酶。

此外, Lee SS 等<sup>[17]</sup>通过 5-fluoro- $\alpha$ -D-glucopyranosyl fluoride (5F $\alpha$ GlcF) 鉴定出在酶活性中心中存在 Asp-224。Nakamura A 的研究<sup>[5]</sup>还发现,天然黑曲霉  $\alpha$ -葡萄糖苷酶是一种糖基化程度很高的酶,含有 25.5% ~ 27.6% 的糖类物质,有多达 15 处的天冬酰胺糖基化位点,能否被有效的糖基化很大程度地影响其活性。而本实验中的毕赤酵母表达系统具有一定程度糖基化修饰能力。

关于  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的测定方法,有测定葡萄糖的生成量<sup>[4]</sup>和测定最后的转苷产物的量<sup>[18]</sup>。工业上,以淀粉为原料生产低聚异麦芽糖时,需要先经淀粉酶水解积累大量的麦芽糖, $\alpha$ -葡萄糖苷酶在以麦芽糖为底物时,先将其水解成葡萄糖,再将葡萄糖分子以  $\alpha$ -1,6 键转移到其他糖受体分子,生成低聚异麦芽糖,故转苷活性是  $\alpha$ -葡萄糖苷酶工业应用的重要基础。本文中表达产物的活性测定是以麦芽糖做为底物,采用 HPLC 测定转苷反应的产物低聚异麦芽糖,较全面评价了该酶的性能。转糖苷反应的结果表明,最适反应 pH 是 5,最适反应温度是 55 $^{\circ}$ C,在此条件下反应 24 h,低聚异麦芽糖产物达到最大,该结果与天然酶的报导相一致。资料还报道,天野公司的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶可以生成四糖以上的糖,但在本实验中,四糖以上的成分还没有出现,我们会在今后的实验中详细考察酶反应的条件因素,研究产物中有效成分变化。

本研究为今后  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的生化性质研究,发酵条件优化,酶的转糖苷反应的条件研究,工业化生产该酶制剂,定点突变技术改造酶的特异性准备了条件。

## 参考文献

- [ 1 ] 岳振峰, 陈小霞, 彭志英.  $\alpha$ -葡萄糖苷酶研究现状及进展. 食品与发酵工业( *Food and Fermentation Industries* ), 2000, 26( 3 ) : 63 - 67.
- [ 2 ] 邹耀洪, 吴定, 王云, 等. 多酶协同制备低聚异麦芽糖研究. 食品科学( *Food Science* ) 2002, 23( 6 ) : 38 - 40.
- [ 3 ] 金其荣, 王晓晴.  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的初步研究及其在异麦芽糖低聚糖浆生产中的应用. 食品科学( *Food Science* ), 1995, 16( 4 ) : 20 - 24.
- [ 4 ] 柯雪琴, 刘继强, 郭敏辰. 产  $\alpha$ -葡萄糖苷酶菌株的筛选及其培养条件的研究. 安徽农业科学( *Journal of Anhui Agricultural Sciences* ) 2007, 35( 8 ) : 2201 - 2203.
- [ 5 ] Nakamura A, Nishimura I, Yokoyama A, et al. Cloning and sequencing of an  $\alpha$ -glucosidase gene from *Aspergillus niger* and its expression in *A. nidulans*. *Journal of Biotechnology*, 1997, 53 : 75 - 84.
- [ 6 ] Ogawa M, Nishio T, Minoura K, et al. Recombinant  $\alpha$ -glucosidase from *Aspergillus niger*. Overexpression by *Emmericella nidulans*, purification and characterization. *Journal of Applied Glycoscience* 2006, 53 : 13 - 16.
- [ 7 ] 陈必成, 扈芝香. 转移葡萄糖苷酶生产异麦芽糖的研究——产转移葡萄糖苷酶菌株的筛选和诱变选育. 食品与发酵工业( *Food and Fermentation Industries* ), 1999, 25( 4 ) : 1 - 4.
- [ 8 ] 于岚, 张云开, 苏艳, 等. 黑曲霉  $\alpha$ -葡萄糖苷酶 cDNA 的克隆及表达. 生物技术( *Biotechnology* ) 2006, 16( 2 ) : 5 - 8.
- [ 9 ] 刘文平, 曾洪梅, 刘延锋, 等. 细极链格孢菌 peaT2 基因在毕赤酵母中的表达及蛋白功能确定. 微生物学报( *Acta Microbiologica Sinica* ) 2007, 47( 4 ) : 593 - 597.
- [ 10 ] 赵明明, 黎明, 韩振林, 等. 蚓激酶基因的克隆及在毕赤酵母中的表达. 微生物学报( *Acta Microbiologica Sinica* ) 2006, 46( 4 ) : 581 - 585.
- [ 11 ] 朱衡, 瞿峰, 朱立煌. 利用氯化苄提取适于分子生物学分析的真菌 DNA. 菌物学报( *Mycosystema* ), 1994, 13( 1 ) : 34 - 40.
- [ 12 ] 任增量, 张东旭, 俞梅英, 等. *Streptomyces hygroscopicus* 谷氨酰胺转胺酶酶原基因的鉴定及在大肠杆菌中的表达. 微生物学报( *Acta Microbiologica Sinica* ) 2008, 48( 4 ) : 480 - 485.
- [ 13 ] 徐钰, 孙钧铭, 张莲芬, 等. 人 GCSF-白蛋白融合蛋白的构建及在毕赤酵母中的表达. 药物生物技术( *Pharmaceutical Biotechnology* ) 2008, 15( 2 ) : 109 - 114.
- [ 14 ] 毕金峰, 李春红, 陈天金.  $\alpha$ -转移葡萄糖苷酶的纯化及酶学特性研究. 食品与发酵工业( *Food and Fermentation Industries* ) 2004, 30( 8 ) : 60 - 63.
- [ 15 ] 杨连生, 扶雄, 何小维, 等. 以  $\alpha$ -葡萄糖苷酶为主酶制备异麦芽低聚糖. 食品科学( *Food Science* ), 1999, 20 : 20 - 22.
- [ 16 ] Kimura A, Takata M, Sakai O, et al. Complete amino acid sequence of crystalline  $\alpha$ -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1992, 56( 8 ) : 1368 - 1370.
- [ 17 ] Lee SS, He S, Witters SG. Identification of the catalytic nucleophile of the Family 31  $\alpha$ -glucosidase from *Aspergillus niger* via trapping of a 5-fluoroglycosyl-enzyme intermediate. *Biochemical Journal* 2001, 359 : 381 - 386.
- [ 18 ] 毕金峰, 刘长江. 高纯度低聚异麦芽糖的研究进展和应用前景. 粮油深加工及食品( *Cereal & Feed Industry* ) 2002( 3 ) : 35 - 37.

## Cloning of the gene encoding $\alpha$ -glucosidase from *Aspergillus niger* and its expression in *Pichia pastoris*

Xing Tong<sup>1,2,3</sup>, Qiusong Tang<sup>1</sup>, Yufei Wu<sup>1</sup>, Jing Wu<sup>1,2\*</sup>, Jian Chen<sup>1,2,3</sup>

(<sup>1</sup>State Key Laboratory of Food Science and Technology of China, <sup>2</sup>Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Education Ministry, <sup>3</sup>School of Environment And Civil Engineering Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract [ Objective ]**  $\alpha$ -glucosidase from *Aspergillus niger* SG136 was expressed in *Pichia pastoris*. **[ Methods ]** cDNA of mature  $\alpha$ -glucosidase (*aglu*) was amplified from the total DNA of *A. niger* SG136 by PCR and overlap-PCR with primers designed based on the sequence of *A. niger* CBS 513.88 in NCBI database. The gene was cloned into pMD18-T simple vector. The sequencing result showed that the gene encoded for a protein of 960 amino acids residues, which was 1 amino acid different from that of *A. niger* CBS 513.88. The expression vector pPIC9K-*aglu* was constructed by subcloning the gene into plasmid pPIC9K and then transformed into *P. pastoris* through electroporation after linearized by *Bgl* II digestion. The recombinant *P. pastoris* KM71/pPIC9K-*aglu* were screened in MD and YPD/G418 plates and identified by PCR. In shaking culture condition, methanol was added to a final concentration of 1% to induce the secretion of  $\alpha$ -glucosidase. **[ Results ]** Electrophoresis analysis of KM71/pPIC9K-*aglu* culture supernatant showed that there were two major protein bands corresponding to 98 kDa and 33 kDa respectively in SDS-PAGE and there was only one band in Native PAGE; while in the control experiment of KM71/pPIC9K, there were no visible bands. Transglucosidation reaction from crude enzyme revealed that contents of isomaltooligosaccharides were up to 26.0% under the optimal conditions of pH 5 and 60°C at 24 h. **[ Conclusion ]** *A. niger*  $\alpha$ -glucosidase was expressed in *P. pastoris* with transglucosidation activity.

**Keywords :** *Aspergillus niger*;  $\alpha$ -glucosidase; cloning; overlap-PCR; *Pichia pastoris*; expression

( 本文责编 : 王晋芳 )

Supported by the National Science Foundation for Distinguished Young Scholars (20625619), the Research Program of State Key Laboratory of Food Science and Technology (SKLF-MB-200802) and the Major Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2007CB 714036)

\*Corresponding author. Tel/Fax : +86-510-85327802; E-mail : jingwu@jiangnan.edu.cn

Received 24 September 2008/ Revised :12 November 2008



### 科学出版社新书推介(2008-12)

#### 精编免疫学实验指南(精装)(译)

(美) J. E. 科利根 B. E. 比勒 D. H. 马古利斯 E. M. 舍瓦奇 W. 斯特罗贝尔 编著  
曹雪涛等 译

978-7-03-021997-8 ¥158.00 2008年12月出版

内容简介 本书是国际权威的生命科学实验方法学丛书之《现代免疫学方法》的精华版,共15章。分别介绍了多克隆抗体和单克隆抗体的制备、纯化和鉴定,人和小鼠T细胞、B细胞、NK细胞和树突细胞、巨噬细胞等及其亚群的分离、鉴定和各种功能分析,T细胞、B细胞克隆和T细胞杂交瘤的构建,细胞因子及其受体和分泌细胞因子细胞的检测,免疫细胞活化的信号分子分析,用分子生物学方法制备Fv、构建噬菌体抗体库和研究TCR等免疫分子等。还介绍了构建自身免疫病、炎症性疾病和感染性疾病等的动物模型的方法。本书内涵涵盖目前免疫学常用实验技术的基本原理、标准方案和最新进展,具有简明规范、步骤清晰、可行性强等特点。

本书可供免疫学、医学基础研究工作者以及临床实验工作者参考使用。