

黑曲霉果胶裂解酶基因的克隆与原核表达

谢茂芳^{1,2}, 薛保国^{1*}, 吴 坤^{2*}

(1. 河南省农业科学院, 河南 郑州 450002; 2. 河南农业大学, 河南 郑州 450002)

摘要: 根据 NCBI 上果胶裂解酶(PL)基因在黑曲霉基因组上的分布特点设计特异引物, 通过重组 PCR 扩增出黑曲霉编码 PL 的结构基因。将 PL 基因连接到大肠杆菌表达载体 pET-28a 上, 得到重组质粒 pET-28a-PL, 转化大肠杆菌(*E. coli*)BL21 后, 用 IPTG 进行诱导表达。结果表明, PL 基因片段序列全长 1 431 bp, 与已知 PL 基因(XM_001397206.2)核苷酸和氨基酸序列同源性均为 99%。表达产物经 12% SDS-PAGE 电泳, 得到了一条大小约为 50 kD 的条带, 与预期分子量相符, 证明真菌 PL 基因在 *E. coli* BL21 中可以有效表达。

关键词: 黑曲霉; 果胶裂解酶; 重组 PCR; 原核表达

中图分类号: Q557 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)01-0082-04

Cloning and Prokaryotic Expression of Pectin Lyase Gene from *Aspergillus niger*

XIE Mao-fang^{1,2}, XUE Bao-guo^{1*}, WU Kun^{2*}

(1. Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;

2. Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: According to the pectin lyase (PL) gene sequence of *Aspergillus niger* from NCBI, specific primer pairs were designed targeting the conserved regions, and the structure gene encoding PL was amplified by overlap PCR. The PL fragment was cloned into the plasmid pET-28a to construct a recombinant plasmid pET-28a-PL, and then pET-28a-PL was transformed into *E. coli* BL21 to express fusion protein by IPTG induction. The results indicated that the amplified PL fragment was 1 431 bp in length, which shared 99% identity with the known PL gene (access number XM_001397206.2) at nucleotide or amino acid level. SDS-PAGE analysis proved that *E. coli* BL21 harboring the plasmid pET-28a-PL could express a protein with molecular weight of 50 kD, in accordance with the expected size of PL.

Key words: *Aspergillus niger*; pectin lyase; overlap PCR; prokaryotic expression

果胶酶是对能分解果胶质的一类酶的总称, 按作用类型分为原果胶酶、多聚半乳糖醛酸酶(PG)、裂解酶(PL)、果胶酯酶(PE)^[1]。目前, 果胶酶是世界四大酶制剂之一, 广泛应用于食品、酿酒、环保、医药、纺织及洗涤剂等领域^[2-3]。近年来又发现, 其可

用于植物病毒的纯化和功能性寡糖的制取, 随着植物病理学研究的深入, 果胶酶及其水解物应用于诱导植物抗病的研究报道也日益增多^[4]。

果胶酶作为重要的酶制剂, 其产量需求越来越多, 微生物果胶酶的分子生物学研究将有助于更合

收稿日期: 2012-08-03

基金项目: 科技部“十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD19B04)

作者简介: 谢茂芳(1985-), 女, 河南新乡人, 在读硕士研究生, 研究方向: 农业生物技术。E-mail: xmf071541@163.com

* 通讯作者: 薛保国(1957-), 男, 河南驻马店人, 研究员, 博士, 主要从事分子生物学与生物防治研究。

E-mail: xuebbb@gmail.com

吴 坤(1963-), 男, 河南驻马店人, 教授, 博士, 主要从事环境微生物研究。E-mail: wukun63@126.com

理地利用果胶酶^[5]。真菌所产生的果胶酶为诱导酶,只有在果胶质的存在下才会被诱导表达^[6]。在其他碳源如葡萄糖或蔗糖存在的条件下,果胶酶的表达会受到抑制^[7]。通过基因重组进行外源表达是解决葡萄糖或蔗糖等碳源抑制真菌果胶酶表达的有效方法之一。为了探索果胶裂解酶基因的外源表达,本试验以筛选得到的 1 株酶活性很高的黑曲霉为出发菌株,成功克隆出 1 个果胶裂解酶基因,并构建重组质粒使之在大肠杆菌中获得了表达,期望为构建生产用果胶裂解酶基因工程菌提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 黑曲霉(*Aspergillus niger*)、大肠杆菌(*E. coli*) TG1 和 BL21 菌株、质粒 pMD18-T 和 pET-28a 均由河南省农业科学院植物保护研究所分子生物学实验室保存。

1.1.2 培养基 PDA 培养基:土豆 20 g,葡萄糖 20 g,琼脂 15 g,水 1 L;果胶降解菌筛选培养基:果胶 5 g,NH₄Cl 1 g,KH₂PO₄ 1 g,MgSO₄ 0.2 g,蛋白胨 10 g,刚果红 0.2 g,琼脂 15 g,水 1 L;LB 培养基:胰蛋白胨 10 g,NaCl 10 g,酵母浸粉 5 g,水 1 L;含卡那霉素的 LB 固体培养基为 LB 固体培养基冷却到 60℃ 时,加入卡那霉素(100 mg/mL)至质量浓度为 50 μg/mL,倒板,冷却后备用。

1.1.3 酶和试剂 dNTP Mixture(10 mmol/L)、pfu Polymerase(2.5 U/μL)、10× pfu buffer、胶回收试剂盒均购自上海生工生物工程技术服务有限公司;质粒提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司;CTAB 购自北京索莱宝科技有限公司;异戊醇、氯仿均为国产分析纯;pH 值 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)。

1.2 重组 PCR

根据果胶裂解酶(PL)基因在黑曲霉基因组上的分布特点设计 3 对引物^[8]:X1F(5'-AGCT-TACGTAGAATTCATGACCCTCCTTC-3')和 X1R(5'-GGTAACGCTGTGACTGGCTTCG-TATCCGGC-3');X2F(5'-TACGAAGCCAGT-CACAGCGTTACCATTTTCAACAG-3')和 X2R(5'-CTACTGGACTGTTCTCGGATACGGCCAATG-3');X3F(5'-CTACTGGACTTCTCGGATACGGCCACAATG-3')和 X3R(5'-ATTA-ATTCCTCGAGTTAGTAGCCACGGCCGT-3'),

其中引物 X1F 和 X3R 中下划线序列分别表示 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点。

分别以 X1F、X1R 为第 1 对引物,X2F、X2R 为第 2 对引物,X3F、X3R 为第 3 对引物,以黑曲霉基因组 DNA 为模板进行 PCR,扩增 3 个片段 X1、X2、X3。PCR 反应体系(50 μL)为:10× pfu buffer 5 μL,dNTP Mixture 1 μL,pfu Polymerase 1 μL,基因组 DNA 1 μL,引物 X1F/X1R(或 X2F/X2R、X3F/X3R)各 2 μL,去离子水 38 μL。扩增程序:94℃ 5 min;94℃ 30 s,53℃ 30 s,72℃ 90 s,30 个循环;72℃ 7 min。

将 PCR 扩增得到的 3 个片段 X1、X2、X3 分别进行切胶回收,各取回收产物 1 μL 作为混合模板,以 X1F、X3R 为上、下游引物进行重组 PCR。重组 PCR 反应体系(50 μL)为:10× pfu buffer 5 μL,dNTP Mixture 1 μL,pfu Polymerase 1 μL,模板片段 X1、X2、X3 各 1 μL,引物 X1F、X3R 各 2 μL,去离子水 36 μL。扩增程序:94℃ 5 min;94℃ 30 s,53℃ 30 s,72℃ 2 min,30 个循环;72℃ 7 min。采用琼脂糖电泳检测后,切胶回收目的片段。

1.3 重组表达质粒的构建

将扩增得到的 PL 片段连接到 pMD18-T 载体上,构建 pMD18-T-PL 重组质粒,转化 TG1 感受态细胞得到 pMD18-T-PL-TG1 阳性转化子。连接成功的 pMD18-T-PL 质粒由河南省农科院植保所测序室测序。用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 对 pMD18-T-PL 进行双酶切,回收其中的 1.4 kb 片段,连接到以 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切的 pET-28a 表达载体上,转化 *E. coli* BL21 感受态细胞。在含有卡那霉素的 LB 平板上进行阳性克隆子筛选,然后用 *EcoR* I 和 *Xho* I 进行双酶切鉴定,将鉴定正确的阳性克隆子命名为 pET-28a-PL-BL21。

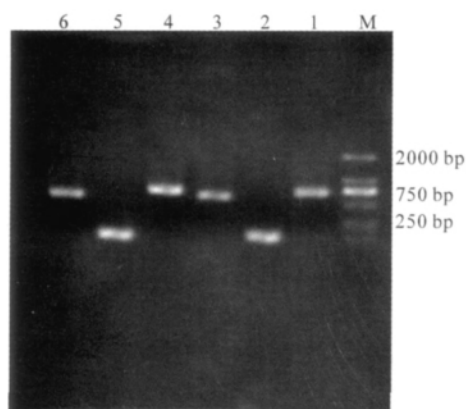
1.4 目的蛋白的诱导表达

将 pET-28a-PL-BL21 阳性转化子置于含有卡那霉素的液体 LB 培养基中,37℃ 下、180 r/min 培养 10 h,加 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L,22℃ 下诱导表达 24 h。诱导完成后,取 1 mL 菌液,12 000 r/min 离心 2 min 收集菌体,用 PBS 缓冲液洗涤菌体 1~2 次,最终将其溶于 500 μL PBS 缓冲液中。测定菌液酶活性,并超声破碎细胞:功率 400 W,每超声 5 s 停 5 s,共 10 min。4℃ 下 12 000 r/min 离心 15 min,取上清进行 SDS-PAGE 电泳。以空载体菌株为对照,分析重组蛋白表达情况。

2 结果与分析

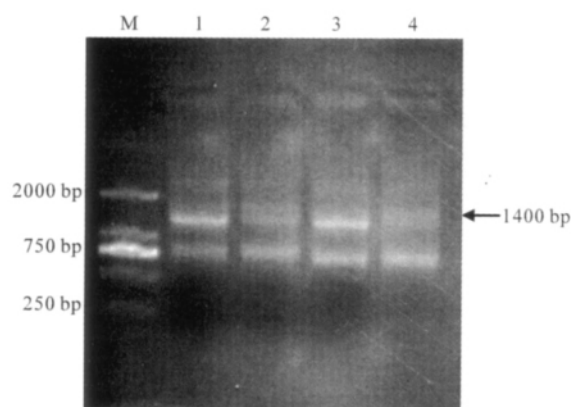
2.1 重组 PCR 扩增目的基因

以 X1F、X1R 为引物扩增出大小为 700 bp 左右的片段 X1,以 X2F、X2R 为引物扩增出大小为 80 bp 左右的片段 X2,以 X3F、X3R 为引物扩增出大小为 600 bp 左右的片段 X3(图 1)。以 X1F、X3R 为引物,通过重组 PCR 将片段 X1、X2、X3 连接起来,扩增出大小为 1 400 bp 左右的片段(图 2)。



M, DL2000 marker; 1, 4, 片段 X1;
2, 5, 片段 X2; 3, 6, 片段 X3

图 1 PCR 扩增的小片段



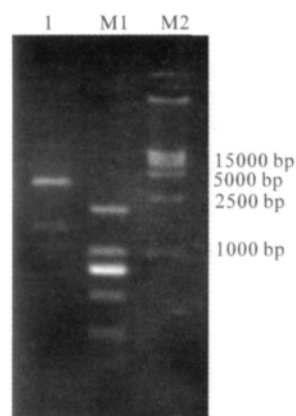
M, DL2000 marker;
1—4, X1、X2、X3 拼接产物

图 2 重组 PCR 将小片段拼接后电泳图谱

2.2 重组表达质粒的鉴定

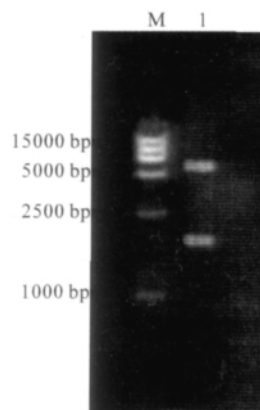
重组克隆 pMD18-T-PL 经 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切后进行电泳,出现 2 条分别与载体 pMD18-T 及目的片段大小相符的条带(图 3),表明重组载体构建成功。

重组表达质粒 pET-28a-PL 经 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切后得到约 5.3 kb 和 1.4 kb 的 2 条带(图 4),与载体 pET-28a 和目的片段大小相符,表明重组表达质粒构建成功。



1, pMD18-T-PL 经双酶切后;
M1, DL2000 marker; M2, DL15000 marker

图 3 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切 pMD18-T-PL 结果



M, DL15000 marker; 1, pET-28a-PL 经双酶切后

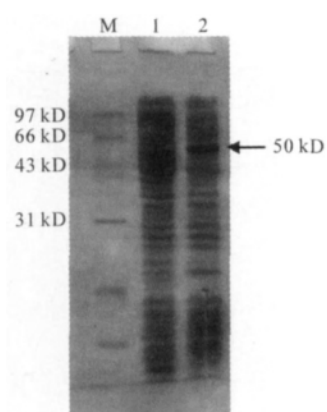
图 4 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切 pET-28a-PL 结果

2.3 PL 基因的序列测定及分析

重组质粒 pMD18-T-PL 的测序结果表明,PL 基因片段全长为 1 431 bp,其中 A 284 个、T 298 个、C 493 个、G 366 个,G+C 为 60%。登录 NCBI 进行 BLAST 比对,结果显示,目的基因序列与登录号为 XM_001397206.2 的核苷酸序列同源性为 99%,其编码氨基酸同源性也为 99%。在线运用 ProtParam tool 对此片段进行预测,结果表明,其可编码 476 个氨基酸,目的蛋白大小预计 52.4 kD,理论 pI 值为 4.91。

2.4 重组蛋白的表达

重组菌及空载体在表达宿主中经过诱导后,分别测定菌液酶活性,结果表明,重组菌及空载体菌液几乎都没有酶活性。将菌体离心后,超声破碎。经 12%SDS-PAGE 电泳,发现诱导后的重组菌体出现了明显加强的蛋白条带,大小在 50 kD 左右(图 5)。说明 PL 重组质粒经过诱导后得到了表达,然而菌液上清几乎测定不出活性,可能是由于 PL 重组蛋白大部分以包涵体的形式存在于沉淀中。



M. 97kD 蛋白 marker; 1. 空载体细胞破碎液;
2. 重组体细胞破碎液

图 5 重组 PL 的 SDS-PAGE 电泳图谱

3 讨论

1) 真菌果胶酶基因的开放阅读框绝大多数被内含子分割^[9]。RT-PCR 是常用的获得真菌基因开放阅读框的方法,然而 RNA 提取繁琐,在操作过程中极易受到 RNA 酶的污染,给基因克隆造成干扰。本研究以基因组 DNA 为模板,采用重组 PCR,将目的基因的几个外显子进行拼接,从而得到了目的基因的开放阅读框,避免了 RT-PCR 的繁琐和 RNA 酶的污染,使基因克隆过程得到了简化。

2) 本研究通过基因重组技术,实现了黑曲霉果胶裂解酶基因在大肠杆菌中的原核表达,为真菌果胶酶的外源表达提供了一定的理论依据。在对菌液上清酶活性测定过程中,没有得到较高的酶活性数值,可能是蛋白在表达过程中以包涵体的形式存在于细胞中,后续工作将通过蛋白的纯化处理来研究外源蛋白表达后的酶活性问题。

3) 近年来,植物纤维伴随物——果胶质的生物降解日益引起国内外学者的关注^[10]。果胶质降解后将破坏植物组织的整体性,使薄壁细胞组织软化。

同时果胶酶还可诱导植物产生抗病性,将其用作生物农药,用于绿色食品生产中,将有利于食品安全和环境保护^[11]。如果将果胶酶产生菌与纤维素降解菌和木质素降解菌联合作用于秸秆,将会加速秸秆的降解,同时也会对秸秆中残留的植物病原菌起到一定的抑制作用。

参考文献:

- [1] Kashyap D R, Vohra P K, Chopra S, *et al.* Applications of pectinases in the commercial sector: A review[J]. *Bioresource Technology*, 2001, 77(3): 215-227.
- [2] Yamada H. Pectic polysaccharides from Chinese herbs: Structure and biological activity[J]. *Carbohydrate polymers*, 1994, 25(4): 269-276.
- [3] 张志军. 果胶酶处理对山楂汁提取及理化指标影响的研究[J]. *天津农业科学*, 2003, 9(4): 18-20.
- [4] 薛长湖, 张永勤, 李兆杰, 等. 果胶及果胶酶研究进展[J]. *食品与生物技术学报*, 2005, 4(6): 94-99.
- [5] 黄俊丽, 李常军, 王贵学. 微生物果胶的分子生物学及其应用研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2006, 17(6): 992-994.
- [6] 疏秀林, 施庆珊, 欧阳友生, 等. 微生物发酵生产果胶酶的研究概述[J]. *发酵科技通讯*, 2010, 39(1): 25-27.
- [7] Alana A, Alkorta I, Dominguez J B, *et al.* Pectin lyase activity in a *Penicillium italicum* strain[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56(12): 3755-3759.
- [8] 王皓, 康现江, 王琦. 重组 PCR 技术发展和应用[J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(5): 153-156.
- [9] 张红霞, 江晓路, 牟海津. 微生物果胶酶的研究进展[J]. *生物技术*, 2005, 15(5): 92-95.
- [10] 苏艳玲, 巫东堂. 果胶研究进展[J]. *山西农业科学*, 2009, 37(6): 82-86.
- [11] 李祖明, 张洪勋, 白志辉. 微生物果胶酶研究进展[J]. *生物技术通报*, 2010(3): 42-46.