

# 产植酸酶菌株的筛选及其植酸酶基因的克隆\*

王 严 高晓蓉 苏 乔 王静云 安利佳\*\*

(大连理工大学环境与生命科学学院生物工程系 大连 116024)

**摘要** :从土壤中筛选到产植酸酶活性较高的烟曲霉菌株 WY-2, 其植酸酶最适 pH 为 5.5, 最适温度为 55 ℃。通过对烟曲霉 WY-2 植酸酶基因进行 PCR 扩增, 获得了一个 1.5 kb 大小的特异性产物, 将其克隆到载体 pMD18-T 中。测序结果分析表明, 该基因片段含有植酸酶基因完整的阅读框架(ORF), 基因全长 1459 bp, 其中包含一个 61 bp 的内含子, 编码 465 个氨基酸, 有 7 个潜在的糖基化位点, 5'端有一编码 26 个氨基酸的信号肽序列。该基因与已报道的烟曲霉 ATCC34625 植酸酶基因有 91% 同源性, 编码的氨基酸序列同源性为 91%。

**关键词** :烟曲霉, 植酸酶基因, 克隆

中图分类号 :Q786 文献标识码 :A 文章编号 :0253-2654(2007)04-0719-04

## Screening of Phytase-producing Strain and Cloning of Phytase Gene from the Selected Strain\*

WANG Yan GAO Xiao-Rong SU Qiao WANG Jing-Yun AN Li-Jia\*\*

(Department of Bioscience and Biotechnology, School of Environment and Life, Dalian University of Technology, Dalian 116024)

**Abstract** :A strain with relative higher phytase-producing ability, *Aspergillus fumigatus* WY-2 was screened from soil. The optimal pH and temperature for activity of the phytase from *A. fumigatus* WY-2 were 5.5 and 55 ℃, respectively. The gene encoding the phytase was amplified from genomic DNA of the strain by PCR, and a 1.5 kb DNA fragment was obtained and then was cloned into vector pMD18-T. The sequencing analysis revealed that the DNA fragment contained a whole open reading frame(ORF) of phytase gene. The phytase gene was 1459 bp in length included with a 61 bp intron and encoded 465 amino acids. A signal peptide encoding 26 amino acids was found at 5' end of the gene. There were 7 potential glycosylation sites in the phytase. The present phytase showed 91% identity in nucleotide sequence and 91% identity in deduced amino acids sequence to the previously reported *A. fumigatus* ATCC34625 phytase.

**Key words** :*Aspergillus fumigatus*, Phytase gene, Cloning

植酸酶是一类能将植酸及其盐类水解成肌醇和无机磷酸的酶, 目前主要用于饲料工业和食品工业, 以提高植物性饲料(或食品)中磷的利用率, 减少动物粪便中排出的磷对环境的污染, 解除植酸的抗营养作用, 提高机体对蛋白及多种微量元素的利用率<sup>[1]</sup>。植酸酶广泛存在于微生物中, 但产酶量很低, 因此导致植酸酶的生产成本较高。随着基因工程技术的发展, 这个缺点已经通过构建植酸酶基因工程菌株的方法予以解决。目前, 植酸酶工业化生产中存在的主要问题是当前商业植酸酶的耐热性欠佳, 不能完全满足饲料加工的要求<sup>[2]</sup>。因此, 从

自然界寻找或者通过随机突变筛选耐热植酸酶成为植酸酶研究的热点。

瑞士罗氏公司的 Pasamontes 等从烟曲霉 ATCC34625 中分离出一个植酸酶基因, 将其表达在工程菌中, 所获表达产物具有很高的耐热能力, 100℃处理 20min 后仍保持 90% 的残余酶活力<sup>[3]</sup>。鉴于该酶的巨大市场潜能, 许多国内外学者对这一来源的植酸酶基因进行了研究<sup>[4-8]</sup>。虽然所用烟曲霉菌种不同, 但克隆出的植酸酶基因却具有高度的保守性, 几乎均与 Pasamontes 等人所报道的基因序列完全相同。多样化烟曲霉植酸酶基因的获得对

\* 辽宁省科技攻关项目资助(No. 2001101001)

\*\* 通讯作者 Tel : 0411-84706356, E-mail : anlijia@gmail.com

收稿日期 : 2006-11-29, 修回日期 : 2007-03-09

于了解植酸酶结构与功能的关系及进一步利用蛋白质工程技术提高其它植酸酶的耐热性都是非常有益的。本研究从土壤中新分离了一株产植酸酶的烟曲霉菌,从该菌株中克隆出植酸酶基因并对其进行了序列分析,结果表明该基因可能是一个具有新颖特性的烟曲霉植酸酶基因。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  为本实验室保存材料。载体 pMD18-T, LA Taq DNA 聚合酶, DNA 分子量标记及 DNA 回收试剂盒购于 TaKaRa(大连)分公司。植酸钠为 Sigma 公司产品。其余试剂为国产分析纯。

### 1.2 产植酸酶菌株的筛选

土样按常规稀释后涂布 PDA 平板上, 30℃ 培养 3 d 后, 挑取菌落转接到筛选平板(0.2% 植酸钙, 0.3% 葡萄糖, 0.5%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0.05% KCl, 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.003%  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.003%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.5% 琼脂, pH 5.5)上, 30℃ 培养 3 d, 挑取有透明消解圈的菌株。

### 1.3 植酸酶活性的测定

将上述获得的菌株接种于液体产酶培养基(1.5% 葡萄糖, 0.3% 蛋白胨, 2% 可溶性淀粉, 0.2%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.05% KCl, 0.003%  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.003%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH 5.5), 30℃, 200 r/min 培养 3 d 后, 离心收集培养液, 进行植酸酶活性的测定。植酸酶的活性测定方法参照文献进行<sup>[9]</sup>, 酶的活性单位(U)定义为: 37℃, pH 5.5 条件下每分钟水解植酸释放 1  $\mu\text{mol}$  的无机磷所需要的酶量为 1 个酶活性单位 U。

### 1.4 植酸酶 pH 适性和温度适性的测定

筛选菌株经液体培养 3 d 后, 离心收集上清液, 用 10 kD 的滤膜进行超滤, 这个过程中不断加入缓冲液 A(10 mmol/L HAc-NaAc, pH 5.5), 消耗体积约为原溶液体积的 3 倍, 然后将滤液浓缩至适当体积, 在 37℃、不同 pH 条件下及在 pH 5.5、不同温度条件下进行 pH 适性和温度适性的测定。

### 1.5 筛选菌株的菌种鉴定

按照标准方法对筛选菌株进行表型鉴定及分子生物学鉴定, 该工作由中国工业微生物菌种保藏中心完成。

## 1.6 植酸酶基因的克隆与分析

**1.6.1 基因组 DNA 的提取:**按照张莉莉等所描述的方法<sup>[10]</sup>提取菌株 WY-2 基因组 DNA。

**1.6.2 引物设计:**由于本研究所筛选的菌株为烟曲霉菌, 因此根据 Pasamontes 等报道的烟曲霉 ATCC34625 植酸酶基因序列设计引物。

上游引物: 5' ATGGTGACTCTGACTTTCTGCTT3' ;

下游引物: 5' TCAACTAAAGCACTCTCCCCAGTTG-CC3'。

**1.6.3 植酸酶基因的 PCR 扩增与回收:**以烟曲霉 WY-2 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增植酸酶基因。PCR 扩增的反应体系为: Buffer 5  $\mu\text{L}$ , dNTP 8  $\mu\text{L}$ , DNA (50 ng/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物(20 pmol/ $\mu\text{L}$ )各为 1  $\mu\text{L}$ , ddH $_2\text{O}$  33.5  $\mu\text{L}$ 。反应条件为: 94℃ 预变性 3min, 进入循环, 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1min, 进行 35 个循环后, 再 72℃ 延伸 10min 结束反应。扩增产物用 DNA 回收试剂盒回收。

**1.6.4 植酸酶基因的克隆:**将回收产物与载体 pMD18-T 相连, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 涂布含有 Amp、X-gal 和 IPTG 的 LB 平板, 37℃ 培养过夜。采用碱裂解法抽提质粒 DNA 进行电泳检测和 PCR 鉴定。

**1.6.5 植酸酶基因的序列测定与分析:**所获阳性转化子的质粒 DNA 由 TaKaRa(大连)分公司进行序列测定。采用相关软件对序列进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 产植酸酶菌株的筛选

利用植酸钙平板的筛选方法从土壤中共筛选出 84 个产透明圈的菌, 进一步摇瓶培养发现有 72 个菌具有胞外植酸酶活力, 其中菌株 WY-2(图 1)产酶性能较为稳定, 且具有较高的植酸酶活力(0.14 U/mL), 选为进一步研究对象。经中国工业微生物菌种保藏中心鉴定, 菌株 WY-2 为烟曲霉, 其菌种收录号为 CICC 40699。

### 2.2 烟曲霉 WY-2 植酸酶的 pH 适性和温度适性

烟曲霉 WY-2 的发酵液经超滤处理后, 用于植酸酶 pH 适性和温度适性的测定。pH 适性的测定表明, 烟曲霉 WY-2 植酸酶在 pH 4~7 的范围内均具有较高的酶活力, 其中 pH 5.5 为其最适 pH(图 2)。

温度适性的测定表明,该酶在 55℃ 表现了最高的酶活力,在 37℃ 时保持了 53.6% 的残余酶活力(图 3)。

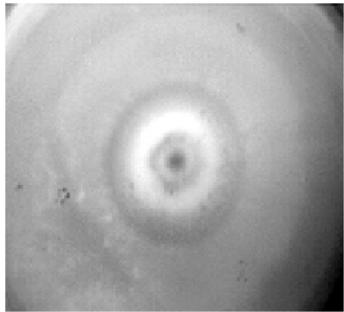


图 1 菌株 WY-2 在植酸钙平板上形成的透明圈

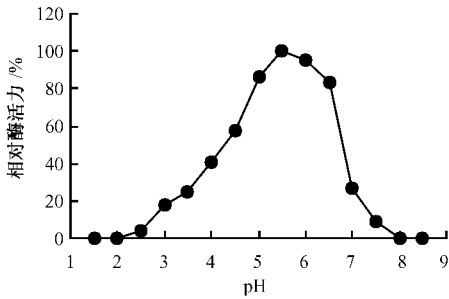


图 2 烟曲霉 WY-2 植酸酶的 pH 曲线

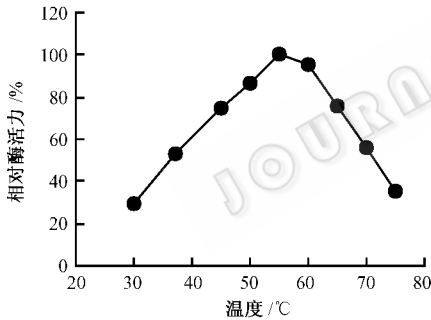


图 3 烟曲霉 WY-2 植酸酶的温度曲线

2.3 烟曲霉 WY-2 植酸酶基因的 PCR 扩增

用 Taq DNA 聚合酶进行 PCR 扩增,得到一条长约 1.5 kb 的特异性条带(图 4),与报道的烟曲霉 ATCC34625 植酸酶基因大小基本一致。

2.4 植酸酶基因的克隆

挑选含 Amp、X-gal 和 IPTG 平板上的白色菌落,获得含有阳性克隆质粒的转化子。以重组质粒为模板进行 PCR 扩增,扩增产物在 1.5 kb 处出现特异性条带,说明已成功克隆了植酸酶基因。

2.5 烟曲霉 WY-2 植酸酶基因的序列分析

测序结果表明,烟曲霉 WY-2 植酸酶基因全长 1459 bp,其中 +48 ~ +108 的 61 个核苷酸序列为真细菌内含子序列,基因序列中的 GC 含量为 57.8%。

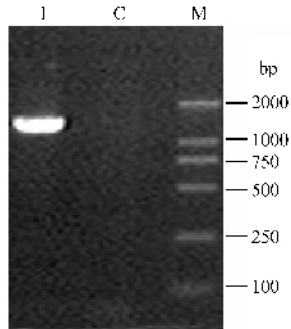


图 4 扩增自烟曲霉 WY-2 基因组 DNA 的 PCR 产物电泳图

1 PCR 产物 C 阴性对照 M DNA 分子量标记

该基因共编码 465 个氨基酸,根据信号肽切割位点的预测原则并结合已知的植酸酶基因序列分析,N 端的 26 个氨基酸为信号肽(+1 ~ +47 和 +109 ~ +139 位核苷酸所编码氨基酸),信号肽切割后的为成熟植酸酶的氨基酸序列(+140 ~ +1459 位核苷酸所编码氨基酸)。由该基因所推导的氨基酸序列上具备真菌植酸酶的活性中心保守序列 RHGARYPT 和催化中心保守序列 HD。该基因已经在 GenBank 登陆,编号为 AY745738。

2.6 与烟曲霉 ATCC34625 植酸酶基因的同源比较

烟曲霉 WY-2 植酸酶基因与烟曲霉 ATCC34625 植酸酶基因(GenBank Accession No. U59804)的 DNA 序列同源性为 91%;编码的氨基酸序列同源性为 91%,二者之间存在 40 个氨基酸位点上差别,其中有 38 个氨基酸位于成熟植酸酶的编码序列中(图 5)。进一步利用 EXPASY 蛋白分析工具 Scanprosite 分析表明,烟曲霉 WY-2 植酸酶基因编码的氨基酸序列中存在 7 个潜在糖基化位点,其位置及数量均与烟曲霉 ATCC34625 植酸酶相同,该酶的理论 pI 值为 5.95,大大低于烟曲霉 ATCC34625 植酸酶的理论 pI 值 7.04。

3 讨论

植酸酶作为一种绿色的饲料添加剂,其饲喂效果已经得到世界范围内的公认。目前,植酸酶在工业化生产中存在的主要问题是其耐热能力不能完全抵抗饲料加工过程中的高温处理,因此获得一个高耐热的植酸酶将是解决此问题的根本方法。

来源于烟曲霉的植酸酶具有较强的耐热能力,是目前为止最耐热的植酸酶之一。自瑞士罗氏公司的 Pasamontes 等人首次分离了烟曲霉植酸酶基

WY-2	MVTLTFLLSVAYLLSGRVSGAPSSAGSKSCDVTYELGYQCSPATSHLWQQYSPFFSLDDEL	60
ATCC34625	MVTLTFLLSAAYLLSGRVSAAPSSAGSKSCDVTYDLGYQCSPATSHLWQQYSPFFSLDDEL	60
WY-2	SVSSKLPKDCRVTFFVQMLSRHGARYPTSSSKSKYKOLVTAIQANATSPFGKFAFLKITYNY	120
ATCC34625	SVSSKLPKDCRITLVQVLSRHGARYPTSSSKSKYKOLVTAIQANATDFRGKFAFLKITYNY	120
WY-2	TLGADDLTFFGEQQQVHNSGIKFYQRYKALAKSVVPFIRASGS DRVIASGEKFTIEGFQQAQ	180
ATCC34625	TLGADDLTFFGEQQQLVNSGIKFYQRYKALAKSVVPFIRASGS DRVIASGEKFTIEGFQQAQ	180
WY-2	LADSGATNRAAPVISVIIPESETFNNTLDHSVCTHFEASLGDEVAANFTALFAPAIRAR	240
ATCC34625	LADPGATNRAAPAISVIIPESETFNNTLDHGVCCTHFEASLGDEVAANFTALFAPDIRAR	240
WY-2	AEKHLFGVKTLDIDVVS LMDMCSFDI VARTSDASQLSPFCALFTHNEWKKYDY LQSLGKY	300
ATCC34625	AEKHLFGVTLIDEDVVS LMDMCSFDI VARTSDASQLSPFCQLFTHNEWKKYDY LQSLGKY	300
WY-2	YGYGAGNALGPAQGGIGFTNELIARLT RSPVQDHTSTNSTLDSNPATFFLNATITYVDFSKD	360
ATCC34625	YGYGAGNFLGPAQGGIGFTNELIARLT RSPVQDHTSTNSTLDSNPATFFLNATITYVDFSKD	360
WY-2	NGMIPIFFAAGLYNGTEPLSLTSVESYKDS DGYSASWAVPFAARAYFTMQCKSEKEPLV	420
ATCC34625	NSMYSIFFALGLYNGTEPLSLTSVESAKELDGYSASWVVPFGARAYFTMQCKSEKEPLV	420
WY-2	RALINDRVVFLHGCAVDKLGRC KLND FVWGLS WARS GGNWGECS	485
ATCC34625	RALINDRVVFLHGCDVDKLGRC KLND FVWGLS WARS GGNWGECS	485

图5 烟曲霉 WY-2 植酸酶与烟曲霉 ATCC34625 植酸酶的氨基酸序列比对

因<sup>[3]</sup>以来,国内外已有多名研究人员从不同的烟曲霉菌种中克隆植酸酶基因<sup>[4-8]</sup>,但所获得的基因序列基本与 Pasamontes 所报道的完全相同。本实验室也对筛选获得的其它烟曲霉植酸酶产生菌进行了植酸酶基因克隆,得到的植酸酶基因序列也几乎与 Pasamontes 所报道的完全一致。到目前为止,包括本研究所克隆的烟曲霉 WY-2 植酸酶基因在内的天然烟曲霉植酸酶基因在 GenBank 上登录的仅有 3 个,并且相关于第三个烟曲霉植酸酶基因的研究还未见报道。烟曲霉 WY-2 植酸酶基因与烟曲霉 ATCC34625 植酸酶基因具有 91% 的氨基酸序列同源性,二者成熟植酸酶编码序列之间存在 38 个氨基酸位点上的差异,导致了这两个酶的分子性质如理论 pI 值等具有较大的差别,而这些改变均有可能对植酸酶的性质产生影响,如烟曲霉 WY-2 植酸酶仅在酸性范围内具有酶活性,在中性范围内几乎不表现酶活性,最适作用 pH 为 5.5,最适作用温度为 55℃,在 37℃ 时保持了 53.6% 的残余酶活力,而烟曲霉 ATCC34625 植酸酶在酸性和中性范围都表现有酶活性,最适作用 pH 为 6.0~6.5<sup>[3]</sup>,最适作用温度为 60℃,在 37℃ 时保持了 45% 的残余酶活力<sup>[5]</sup>。这些性质上的差异表明烟曲霉 WY-2 植酸酶基因可能是一个具有新颖特性的植酸酶基因,但这还需要进一步的研究证实。该基因的获得为利用蛋白质工程技术在分子水平上改造植酸酶基因提供了新依据,也为进一步开发我国耐热型植酸酶提供了基础材料。

烟曲霉植酸酶的高耐热性主要源自于其超强的复性能力,即该酶在高温变性后可在常温下重新正确折叠<sup>[10]</sup>。由于该酶在高温下极易受到蛋白酶的 attack,因此蛋白酶的存在对该酶的耐热效果影响极大<sup>[10-12]</sup>。作者曾尝试对天然烟曲霉 WY-2 植酸酶进行纯化,但是由于野生菌株产酶量太低且产物成分复杂,纯化效果不理想。目前,作者已经将烟曲霉 WY-2 植酸酶基因表达在毕赤酵母菌中,表达产物在发酵液中就具有很高的耐热能力,现正在进行表达酶的纯化和性质研究,结果将另文报道。

### 参考文献

- [1] Wodzinski R J, Ullah A H J. *Adv Appl Microbiol*, 1996, **42**: 263~302.
- [2] Kim Y, Kim H, Bae K, *et al.* *Enzyme Microbiol Technol*, 1998, **22**: 2~7.
- [3] Pasamontes L, Haiker M, Wyss M, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 1696~1700.
- [4] Mullaney EJ, Daly C B, Sethumad-havan K. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **275**(3): 759~763.
- [5] Rodriguez E, Mullaney J, Lei X G. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **268**: 373~378.
- [6] Martin J A, Murphy R A, Power R F G. *Micro Biotech*, 2003, **30**: 568~576.
- [7] 李 佳, 刘钟滨. *同济大学学报(医学版)*, 2004: 461~468.
- [8] 张桂敏, 张晓鸣, 何国帮, 等. *华中农业大学学报*, 2003, **22**: 529~532.
- [9] Murphy J, Riley J P. *Analytica Chimica Acta*, 1962, **27**: 31~36.
- [10] 张莉莉, 张苓花, 史剑斐, 等. *大连轻工业学院学报*, 2000, **19**(1): 45~47.
- [11] Wyss M, Pasamontes L, Rémy R, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 4446~4451.
- [12] Brugger R, Nunes C S, Hug D, *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **63**(4): 383~389.
- [13] Martin J A, Murphy R A, Power R F G. *Bioresour Technol*, 2005, **97**: 1703~1708.