

植酸酶酵母工程菌的构建*

李桂兰^{1,2} 祝建洪¹ 孙建¹ 陈佳¹ 李明刚^{1**}

(南开大学分子生物学研究所 天津 300071)¹ (河北科技师范学院 昌黎 066600)²

摘要: 从无花果曲霉 (*Aspergillus ficuum*) 3.4322 中用 RT-PCR 方法扩增出一条约 1.4 kb 的特定性条带, DNA 序列测定表明, 目的片段为不含信号肽的植酸酶编码序列, 全长 1347 bp。无花果曲霉 (*Aspergillus ficuum*) 3.4322 *phyA* 基因序列已在 GenBank 注册 (注册号为: AF537344)。将该基因克隆到酵母表达载体 pYES2 中, 构建成不带信号肽 *phyA* 基因的重组表达载体 pYPA2。用醋酸锂法将 pYPA2 转进 Ura 缺陷型的酿酒酵母 (*S. cerevisiae* INVSc1), 筛选获得含植酸酶基因的酵母转化子。经半乳糖诱导表达后, 用磷钼蓝显色 (AMES) 法对酵母菌体进行酶活测定, 测出了明显的植酸酶活性, pYPA2 胞内植酸酶活性约 11.55 IU/mL, 表明无花果曲霉 (*Aspergillus ficuum*) 3.4322 *phyA* 基因能在酿酒酵母中表达。

关键词: 无花果曲霉, *phyA* 基因, 酿酒酵母, 表达

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 06-0011-05

The Construction of a Transgenic Yeast Strain Expression Phytase*

LI Gui-Lan^{1,2} ZHU Jian-Hong¹ SUN Jian¹ CHEN Jia¹ LI Ming-Gang^{1**}

(Institute for Molecular Biology, Nankai University, Tianjin 300071)¹

(Hebei Normal University of Science & Technology, Changli 066600)²

Abstract: A *phyA* gene was cloned from *Aspergillus ficuum* 3.4322 by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The amplified fragment was cloned into pMD18 T-vector and sequenced. Nucleotide sequence analysis of the *phyA* gene showed that it comprises 1347 bp without the signal peptide sequence. The *phyA* sequence has been deposited in GenBank (accession number: AF537344). The expression vector pYPA2 was constructed by cloning the *phyA* gene of without the signal peptide sequence into the yeast expression vector pYES2. The recombinant plasmid was transformed into *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 by the method of LiAc. Then, the yeast clone containing *phyA* gene was screened to test the phytase activity by AMES method. The phytase activity (about 11.55 IU/mL) was found in pYPA2 endocellular fluid by galactose inducing. The results demonstrated that the *phyA* gene had been expressed in *Saccharomyces cerevisiae*.

Key words: *Aspergillus ficuum* 3.4322, *phyA*, *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1, Expressed

植酸盐 (Phytin) 是一种肌醇六磷酸的复合盐, 是磷的重要贮藏形态。在谷物、油料等作物籽实中其含量高达 1% ~ 3%, 它占植物总磷量的 60% ~ 80%。因单胃动物体内都缺少内源性植酸酶, 食物中植酸磷的利用率仅在 0 ~ 40%, 大部分磷未能有效吸收就从粪便中排出, 不仅造成磷资源的浪费, 而且导致对土壤和水源的污染^[1]。另外植酸磷还是一种抗营养因子, 它在动物肠胃中与多种金属离子如钙、锌、铁、钾等以及蛋白等螯合成不溶性复合物, 降低了动物对这些营养物质的利用^[2]。

植酸酶能将植酸水解成肌醇和磷酸, 从而解除植酸的抗营养作用, 提高食品及饲

* 国家高技才研究发展计划项目 (863 项目) (No. 2002AA213061)

国家转基因植物研究和产业化专项 (No. J00-B-003-05)

** 联系人

收稿日期: 2004-01-29, 修回日期: 2004-03-29

料中矿物元素和蛋白质的营养有效性以及能量平衡能力。已发现植物、多种微生物包括酵母、曲霉细菌、等都能产生植酸酶^[3]。目前研究最多的是微生物产生的植酸酶,他们可能是饲用植酸酶的最佳来源,但是天然菌株产酶量低,成本较高,影响了植酸酶的推广应用。随着现代分子生物学的飞速发展,采用基因工程技术手段改造产植酸酶生物,构建植酸酶基因工程菌,提高产酶量,进行大规模的发酵生产,已成为研究的热点。

本文利用 RT-PCR 技术已从无花果曲霉 3.4322 中克隆了植酸酶 *phyA* 基因,进行序列测定,并在酿酒酵母中表达出有正常生物学活性的植酸酶,为植酸酶的进一步开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验菌株及载体

无花果曲霉 (*Aspergillus ficuum*) 3.4322 (购自中国科学院微生物研究所);酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 (南开大学真菌实验室赠送)。

载体: pMD18-T (购自 TakaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd); pYES2 (南开大学真菌实验室赠送)

1.2 无花果曲霉总 RNA 的提取

将无花果曲霉菌丝接种于液体查氏培养基上, 28℃, 100 r/min 摇床培养 2~3 d, 收集白色菌球, 异硫氰酸胍法提取无花果曲霉总 RNA^[4]。

1.3 植酸酶 *phyA* 基因的克隆

1.3.1 引物设计: 从 GenBank 中查到 *A. ficuum* 的 DNA 全序列, 从信号肽下游开始设计引物拟得到不含信号肽的 *phyA* 基因, 总长为 1,347 bp, 上游引物引入 *Xba*I 酶切位点, 下游引物引入 *Kpn*I 酶切位点。为了表达时翻译的需要, 在上游引物的起始处加上了“ATC”起始密码子, 在下游引物的末尾加上了“TAG”终止密码子。

上游引物: 5'ATGTCTAGACTGGCAGTCCCCGCCTCGAGA-3'

下游引物: 5'-CTAGGTACCCTAAGCAAAACACTCCGCCCAATC-3'

1.3.2 *phyA* 基因 RT-PCR 扩增: RT 反应: 10 μL 体系, dNTP 200 μmol/L, RAV-2 10 U, 下游引物 1 μmol/L, RNA 模板 6.0 μL (2 μg), 反应体系于 42℃保温 45 min。然后 95℃保温 5 min 灭活 RAV-2。

PCR 反应体系 (20 μL): 2 μL RT 反应产物, dNTP 200 μmol/L, 上游、下游引物终浓度 1 μmol/L, pfu DNA 聚合酶 3 U。反应参数: 94℃预变性 5 min, 进入循环, 94℃变性 45 s, 55℃退火 45 s, 72℃延伸 75 s, 30 个循环, 72℃最后延伸 10 min。

1.4 *phyA* 基因 PCR 产物的克隆

采用 PCR 回收试剂盒 (购自 TakaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd) 进行目的 DNA 片段的纯化, 克隆到 pMD18-T 载体上, 转化 JM103 大肠杆菌感受态细胞 (氯化钙法制备), 蓝白斑筛选阳性克隆菌株, 碱法小量提取法提取重组质粒, 酶切鉴定^[4]。

1.5 克隆 *phyA* 基因的序列测定

阳性克隆菌株质粒 DNA 由上海生物工程技术服务有限公司测序。

1.6 重组质粒 pYPA2 转化酵母、*phyA* 基因的诱导表达及植酸酶活性测定

1.6.1 酿酒酵母转化: 醋酸锂转化法^[5]。

1.6.2 *phyA* 基因的诱导表达: 将培养过夜的 pYPA2 酵母菌落在加 2% 半乳糖的培养液中 30℃ 诱导表达培养 36 h。

1.6.3 植酸酶活性测定: 磷钼兰显色法 (AMES 法)^[6]。

植酸酶活性是以底物植酸钠被水解时释放的无机磷酸的量来表征。一个酶活力单位 (U) 定义为在 pH5.0 和 37℃ 条件下每分钟释放 1 μmol 无机磷酸所需要的酶量 (1U = 1 × 10³ IU)。

2 结果与分析

2.1 植酸酶基因的分离及克隆

用所设计引物, 以无花果曲霉 (*A. ficuum*) 3.4322 的总 RNA 为模板通过 RT-PCR, 扩增出了一条约 1.4 kb 的特异性片段, 符合预期片断的大小。回收 RT-PCR 目的片段, 经过加 A 处理, 与 pMD18-T 载体连接过夜, 转化大肠杆菌 JM103, 在含 X-gal、IPTG 和 Amp 的培养基上挑取白色菌落, 获得含阳性克隆质粒的菌株。为了后续载体构建, 用限制性内切酶 *Xba*I 进行酶切鉴定出如图 1 插入方向的转化子, 进行测序。测序结果表明, RT-PCR 产物全长 1,347 bp, 不含信号肽编码序列。

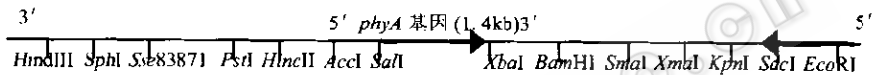


图 1 *phyA* 基因插入 pMD18 T-vector 多克隆位点

2.2 酵母表达载体的构建和转化

在引物设计时, 上游引物起始处加上了起始密码子 “ATG”, 下游引物 5' 端加上了终止密码子 “TAG”。选择 *Hind*III 与 *Eco*RI 双酶切, 以正确的阅读框架将 *phyA* 基因克隆到 pYES2 载体上, 构建酵母表达载体 pYPA2 (图 2, 3, 4)。

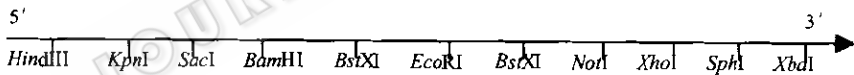


图 2 pYES2 质粒载体的多克隆位点

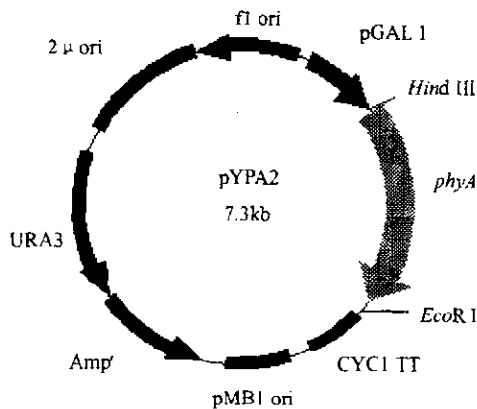


图 3 构建的 pYPA2 表达载体

2.3 *phyA* 基因在酵母中的表达

用醋酸锂法将 pYPA2 转化到酿酒酵母 *S. cerevisiae* INVSc1 尿嘧啶缺陷型菌株中。在

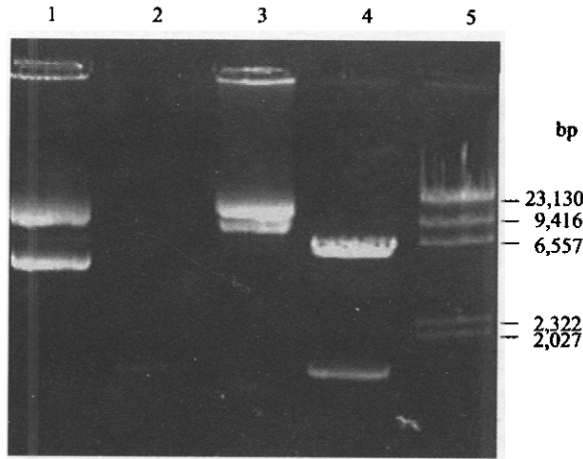


图 4 重组质粒 pYPA2 酶切鉴定图

1 pYES2 质粒, 2 *phyA* 基因的 PCR 产物, 3 重组质粒 pYPA2, 4 pYPA2 *Hind*III + *Eco*RI 酶切, 5 λ DNA/ *Hind*III marker;

Ura 培养基上筛选出阳性克隆, 并进一步在加入半乳糖的培养基上进行诱导表达。

pYPA2 表达载体中 *phyA* 基因不带信号肽, 其表达产物只能存留在酵母体内。收集阳性克隆的酵母菌体, 采用冻融研磨破碎菌体, 细胞破碎液中检测到植酸酶活性为 11.55 IU/mL (表 1)。

表 1 pYPA2 酵母菌细胞内植酸酶活性 (IU/mL)

样品	OD _{620nm} *	无机磷含量 (mmol/L)	酶单位 (IU)	植酸酶活性 (IU/mL)
pYPA2	0.131	0.0365	0.577	11.55

* 以酶液对照 (在加入提取酶液之前先加入 10% 高氯酸 0.3mL) 作为参照调零

2.4 讨论

研究克隆了 *A. ficuum* 3.4322 的 *phyA* 基因 (cDNA), 不含信号肽编码序列, 全长 1,347 bp。将该基因克隆到酵母表达载体 pYES2 中, 转化 Ura 缺陷型的酿酒酵母 (*S. cerevisiae* INVSc1), 植酸酶活性分析, 胞内植酸酶活性为 11.55 (IU/mL), 证明我们应用 RT-PCR 方法从无花果曲霉 3.4322 中克隆的 *phyA* 基因能够在酿酒酵母中被正确的转录、表达和加工, 该植酸酶基因编码区具有正常的生物学功能。

正确的糖基化修饰是植酸酶具有生物学活性所必须的^[7,8], 本研究中, 重组酵母的胞内获得具有活性植酸酶, 说明了在胞内翻译后的植酸酶蛋白能进行糖基化修饰。

虽然在胞内合成有活性的植酸酶, 但是表达活性和表达量偏低, 仅达 11.55 IU/mL。分析其原因可能有以下几方面:

(1) 可能密码子偏好不同。Sharp 等对酵母中 110 个基因的密码子偏爱情况进行了研究, 发现大量在酵母表达的基因中, 编码 Arg 的 6 个密码子 (CGT、CGA、CGC、CGG、AGA 和 AGG) 中, AGA 的使用频率为 86.6%, 而根本不使用 CGA 和 CGG 这两种密码子^[8]。姚 斌等对来源于 *A. niger* 963 的植酸酶基因 *phyA2* 的 4 个编码 Arg 的密码子 (3 个 CGG 和 1 个 CGA 分别位于 85, 146, 446, 159 位) 进行了突变改造, 改造后的植酸酶基因 mRNA 水平上没有明显差异, 但表达量比没有改造的提高了近 37 倍, 这说明造成表达量的差异是发生在翻译水平上的^[9]。在本研究中克隆的无花果曲霉 (3.4322) 植酸酶基因 *phyA* 中, 一共有 17 个密码子编码 Arg, 而其中编码 Arg 的密码子

2个是CGA, 分别位于127位和140位; 2个是CGG, 分别位于66位和427位, 并且, 第66位的CGG位于植酸酶的活性位点之内, 很有可能位于活性位点内的密码子CGG影响了植酸酶的活性。酵母中的这种密码子偏好也许是造成植酸酶活性不高的一个重要原因。

(2) 表达系统的差别。一个外源基因的表达直接受所在系统中基因表达调控系统的影响, 真核生物和原核生物基因结构上的差异必然引起调控机制的不同, 转录起始及其发生频率是基因表达中最基本的环节, 转录调控是通过顺式作用元件与反式作用因子的相互作用来实现的。酿酒酵母(*S. cerevisiae* INVSc1)系统有可能对该基因的表达不太适宜, 我们正在改换表达系统进行该基因的表达研究。

(3) 启动子的影响。本实验表达载体应用的GAL1启动子是一种诱导表达型启动子, 在葡萄糖存在的情况下, 该启动子受到抑制, 而通过添加半乳糖能促进其启动基因的转录, GAL1启动子的效率直接受培养基成分中碳源的影响, 培养基中葡萄糖浓度为0.1%时基因的表达量降低50%。葡萄糖与半乳糖的混合使用对GAL1启动子的阻遏作用最大^[11,12]。本研究所用的YEPD完全培养基中, 葡萄糖的含量为2%, 并加入2%的半乳糖进行诱导表达, 这可能在一定程度上抑制了基因的表达。今后对影响该植酸酶基因表达的因素将进一步研究, 以获得植酸酶产量高的表达系统。

参考文献

- [1] Nelson T S. Poults Sci, 1967, 46: 862~871.
- [2] Sharma C B, Goel M. Phytochemistry, 1978, 47: 201~204.
- [3] 王红宇, 吴琦, 谢晶, 等. 四川农业大学学报, 2000, 18(1): 84~88.
- [4] J 萨姆布鲁克, E F 佛里奇, T 曼曼尼阿蒂斯著(金东雁, 黎孟枫译). 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学出版社, 1996.
- [5] A 业当斯, D E 特施林, C A 凯译, 等. (刘子译译). 酵母遗传学方法实验指南. 北京: 科学出版社, 2000. 81~82, 86.
- [6] Ames B N. Methods enzymol, 1966, 8: 115~118.
- [7] 黄遵锡, 赵明哲, 李凤梅, 等. 云南师范大学学报, 2001, 21(4): 46~53.
- [8] Cregg J M, Vedrick T S, Raschke W C. Bio/Technology, 1993, 7: 197~201.
- [9] Sharp P M, Tuohy T M F, Mosurski K R. Nucleic Acids Res, 1986, 14(13): 5125~5142.
- [10] 姚斌, 张春义, 王建华, 等. 中国科学(C辑), 1998, 28(3): 238~243.
- [11] 刘巍峰, 王祖农. 菌物系统, 1998, 17(3): 256~261.
- [12] 刘巍峰, 高东, 鲍晓明. 山东大学学报, 1998, 33(3): © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>