

右旋糖苷蔗糖酶基因的克隆及其序列分析*

邵彦春^{1,2} 王建华^{2**} 滕 达² 陈福生¹ 杨雅麟²

(华中农业大学食品科技学院 武汉 430070)¹

(中国农业科学院饲料所基因工程室 北京 100081)²

摘要:以筛选的肠膜明串珠菌的基因组为模板,通过聚合酶链式反应(PCR)分别扩增得到右旋糖苷蔗糖酶的基因片段 *dsr1* 和 *dsr2*,将基因片段克隆到 pUC19 载体上并对基因片段组装得到完整基因序列 *dsrx*。通过限制性酶切分析和核苷酸序列分析鉴定, *dsrx* 的序列全长为 4,566bp、编码 1,522 个氨基酸,与 GenBank 中已注册的 U81374 核苷酸序列同源性达 99%,推导的氨基酸序列与其序列同源性达 98.49%。

关键词:右旋糖苷蔗糖酶,PCR 反应,克隆及序列分析

中图分类号:Q785 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654 (2005) 03-0020-04

Cloning and Sequence Analysis of Gene Coding for Dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* *

SHAO Yan-Chun^{1,2} WANG Jian-Hua^{2**} TENG Da² CHEN Fu-Sheng¹ YANG Ya-Lin²

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)¹

(Gene Engineering Lab of the Feed Research Institute, CAAS, Beijing 100081)²

Abstract: The desired DNA product of *dsr1* and *dsr2* was amplified from the total DNA of the L0309 screened in this lab by PCR with two pairs of gene specific primers. The segment of *dsr1* and *dsr2* was inserted into pUC19 vector and integrated into the entire gene of *dsrx*. The result of restriction endonuclease mapping and sequencing shows that 4,566 bp of *dsrx* covers the entire open reading frame, encoding 1,522 amino acid residues. There is an identity of 99% between the gene of U81374 and *dsrx* about their nuclear acid sequences. The homology of the deduced amino acid level amount to 98.49% with that of U81374.

Key words: Dextranucrase, PCR, Cloning and sequence analysis

右旋糖苷蔗糖酶是葡萄糖基转移酶(GFT)的一种,它能催化裂解蔗糖合成右旋糖酐和果糖。右旋糖苷蔗糖酶可以直接加入发酵食品中改善产品质构,其产物右旋糖酐在医药、食品、分析、饲料等领域中有广泛的应用,因此获得高纯度的右旋糖苷蔗糖酶有重要的意义。国外对该酶的性质、功能、基因结构、蛋白质结构预测等方面开展了研究,国内尚未见有关于该酶的详细报道。

本文通过 PCR 的方法分段克隆到 pUC19 载体上,进行基因组装,并分析完整序列,为今后深入研究基因结构与功能及体外的表达奠定基础。

* 国家高技术研究发展计划项目(“863”项目)(No. 2001AA246041)

Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 2001AA246041)

中国农业科学院饲料研究所 2004 年度所长基金

作者还有:张 帆² 谢笔钧¹

** 通讯作者 Tel: 010-62145735, E-mail: wangjianhua@mail.caas.net.cn

收稿日期:2004-07-27, 修回日期:2004-10-10

1 材料与方法

1.1 菌种

本实验室筛选的肠膜状明串珠菌 L0309。

1.2 主要试剂

限制性内切酶购自 NEB ; PCR 扩增用试剂购自 TaKaRa 公司; 引物由上海生工合成; PCR 产物及凝胶回收试剂盒购自 QIAgen 公司; 连接酶购自 Promega 公司。

1.3 模板 DNA 提取

参照文献 [1] 和文献 [2] CTAB 法提植物基因组方法, 将两者结合起来略做改进。

1.4 引物的设计合成

根据文献 [3] 报道的右旋糖酐蔗糖酶基因序列设计两对引物分别为:

pf1.7: 5' GCTCTAGAGCTAATGCCATTTACAGAAAAAG, 含 *Xba*I 酶切位点;

pr1.7: 5' GGGGTACCCCCATGGTTAATTGATTGCTTCCTTG, 含 *Kpn*I 酶切位点;

pf2.8: 5' GCTCTAGAGCCCATGGATGATTATGTGCACACAC 3', 含 *Xba*I 酶切位点;

pr2.8: 5' GGGGTACCCCTTATGCTGACACAGCATTTCATTATTATC3', 含 *Kpn*I 酶切位点和终止子。

1.5 多聚酶链式反应 (PCR)

参考文献 [2] 有关章节, 以本实验室筛选的菌株 L0309 基因组为模板进行 PCR 扩增, *dsr1* 和 *dsr2*, PCR 条件为: 94℃ 预变性 5min, 进入热循环: 94℃ 变性 30s, 55℃ 复性 30s, 72℃ 延伸 1min 40s 和 2min 40s, 最后 72℃ 延伸 10 min。

1.6 PCR 产物回收、纯化重组子鉴定

PCR 产物回收参考 Qiagen PCR 纯化试剂盒操作手册; PCR 产物经 *Xba*I 和 *Kpn*I 双酶切并定向克隆到 pUC19 载体上, 采用蓝白斑筛选和 Amp 抗性筛选重组子。分别在含 *dsr1* 和 *dsr2* 的转化子平板上各随机挑取 5 个白色菌落, 37℃ 振荡培养, 小量提取质粒, 重组质粒分别命名为 pUC19*dsr1* 和 pUC19*dsr2*, 然后用 *Kpn*I、*Xba*I 和 *Nco*I 分别进行单双酶切鉴定。

1.7 右旋糖酐蔗糖酶全基因序列的克隆

将鉴定为含 1.7kb、2.8kb 的阳性重组子大量培养参照文献 [4] 提质粒, 并以 *Kpn*I 和 *Nco*I 双酶切 pUC19*dsr1* 和 pUC19*dsr2*。用 QIAgen 凝胶纯化回收试剂盒分别回收大约 1.7 和 5.5kb 的片段, 将回收的片段按适当比例在 T4DNA 连接酶作用下进行基因的组装, 转化 DH5 α , 涂布含 Amp、X-gal 平板挑取白色菌落进行小量培养, 以便进行酶切鉴定。

1.8 核苷酸序列分析

含完整基因 *dsrx* 的克隆子由上海博亚生物技术公司测序, 测序结果用 BLAST 和 GenBank 数据库进行同源性分析。

1.9 氨基酸序列分析

利用 EMBOSS 软件及其它生物信息学网站工具进行氨基酸序列分析。

2 结果

2.1 基因 PCR 扩增结果

以本实验室筛选的肠膜状明串珠菌基因组为模板, 利用两对引物进行 PCR, 分别扩增得到约 1.7kb 和 2.8kb 片段 (图 1, 2), 片段大小与预期结果相符, 说明所设计的引物特异性较高。

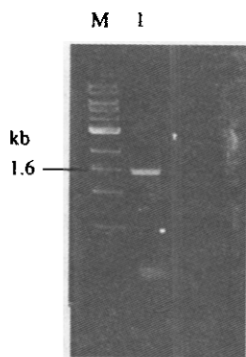


图 1 1.7kb PCR 产物电泳图

M N3232Vmarker, 1 1.7kb PCR 产物

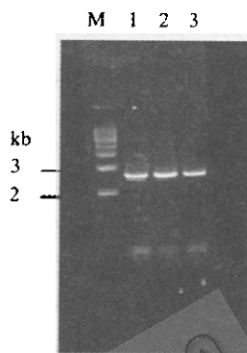


图 2 2.8kb PCR 产物电泳图

M MD016marker, 1、2、3 2.8kb PCR 产物

2.2 重组质粒酶切鉴定

过夜培养重组子, 提取质粒, 分别进行单、双酶切鉴定, 参照 Marker, 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 含 1.7kb、2.8kb、4.5kb 外源片段的重组子是正确的 (图 3、4、5), 初步表明基因的分段克隆与完整基因组组装过程是成功的。

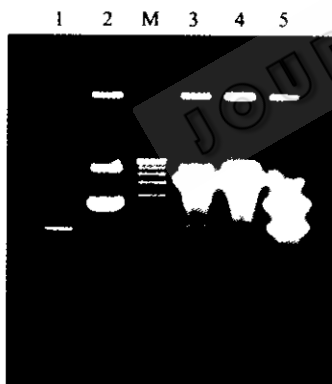


图 3 pUC19dsr1 酶切电泳图

1 pUC19, 2 pUC19dsr1,
3、4 *Kpn*I、*Nco*I 酶切图谱 4.4kb,
5 *Kpn*I + *Xba*I 双酶切图谱 4.4kb、
2.7kb、1.7kb

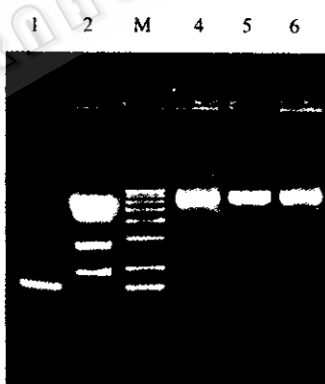


图 4 pUC19dsr2 酶切电泳图

1 pUC19, 2 pUC19dsr2,
3、4、5 *Kpn*I、*Xba*I、*Nco*I 酶切图
谱 5.5kb

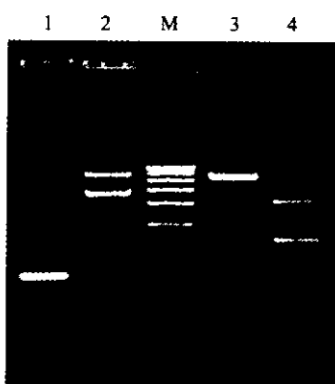


图 5 pUC19dsrx 酶切电泳图

1 pUC19, 2 pUC19dsrx,
3、4 *Nco*I 酶切图谱 7.2kb,
5 *Kpn*I + *Xba*I 双酶切图谱 4.5kb、
2.7kb

2.3 目的基因 *dsrx* 测序与已报道的右旋糖苷蔗糖酶基因同源性分析

将含有完整外源片段的质粒由博亚生物技术公司测序, 拼接每个测序结果, 得到该基因的全序列 (GenBank 登录号为 AY743959), 该序列包含 4,566bp, 编码 1,522 个氨基酸, 通过 BLAST 同源性分析, 同 GenBank 登录的右旋糖苷蔗糖酶 U81374 编码基

因比较, 结果表明, 目的基因与已报道的 U81374 同源性高达 99%。

2.4 *dsrx* 基因的氨基酸序列推导及氨基酸序列的同源比较分析

利用 EMBOSS 软件包将测序后拼接的 *dsrx* 基因的 ORF 翻译成氨基酸序列, 其与 U81374 的氨基酸序列同源性达 98.49%。根据 EMBOSS 软件包的使用方法, 预测二级结构, 有 305 个残基形成螺旋结构, 470 个残基形成折叠结构, 324 个残基形成转角结构, 380 个残基形成卷曲结构。理论预测分子量为 169kD, pI 值为 4.27 (<http://kr.expasy.org>) 利用 BLASTp 在线分析, 该蛋白属于葡萄糖基水解酶 70 家族中的葡萄糖基转移酶或蔗糖-6-葡萄糖基转移酶 (GTF-S), 催化转移蔗糖分子的葡萄糖基到受体分子, 氨基端为催化域, 羧基端为葡萄糖结合域。

3 讨论

肠膜状明串珠菌生长缓慢, 并且菌体与产物右旋糖苷结合在一起, 造成模板提取的困难, 本实验将 Hajahmad Y 等报道的方法和 CTAB 法结合起来缩短提取时间且得到高纯度的模板, 有利于 PCR 反应进行。

肠膜状明串珠菌分泌的右旋糖苷蔗糖酶属于诱导型酶, 该酶天然活力很低, 并且酶与细菌及其粘性产物右旋糖苷结合在一起, 因此分离纯化过程复杂, 本实验采用 PCR 方法从产右旋糖苷蔗糖酶菌株克隆到 *dsrx* 基因, 以期通过构建工程菌为解决实际生产应用中的问题奠定基础。

尝试 *dsrx* 基因在 *Pichia pastoris* 系统中的表达, 取发酵上清液进行 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色和银染均无预期的蛋白条带, 浓缩发酵液 1,000 倍测定酶活, 结果显示有微弱酶活, 表明蛋白表达量很低, 由于该蛋白分子量较大, 影响表达的因素较多, 因此该基因表达过程有待进一步研究。

参考文献

- [1] Hajahmad Y, Ansari M, Santini M, et al. Biotechniques, 1994, 16 (3): 390 ~ 392.
- [2] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 (第三版). 北京: 科学出版社, 2002.
- [3] Wilkedouglas M, Perchorowicz J, Houck C, et al. PCT Patent W089/12386.
- [4] 李永明, 赵玉琪. 实用分子生物学方法手册. 北京: 科学出版社, 1998.