

来源黑曲霉 WP1 的两种植酸酶基因的克隆及序列比较

柯晓静, 郭润芳, 于宏伟, 贾英民

(河北农业大学 食品科技学院, 河北 保定 071001)

摘要: 为了获得高产植酸酶菌株, 利用 PCR 技术, 从黑曲霉 WP1 中克隆出 2 种植酸酶基因 *phyA* 和 *phyB*, 分别命名为 *phyA₁*、*phyB₁*。*phyA₁* 长 1 346 bp, 成熟肽序列不含内含子, 共编码 448 个氨基酸; *phyB₁* 基因长 1 560 bp, 基因序列含有 3 段内含子, 共编码 460 个氨基酸。*phyA₁* 和 *phyB₁* 序列同源性很低, 只有 21.12%。二者都含有 1 个植酸酶基因保守序列 RHGXRP; 但 *phyA₁* 含 2 个 HD 保守序列, *phyB₁* 只含有 1 个。将黑曲霉 WP1 植酸酶 *phyA₁* 和 *phyB₁* 的基因序列在国际基因库中注册, 注册号分别为: DQ650711; DQ836360。

关键词: *phyA*; *phyB*; PCR; 序列同源性

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)02-0022-05

Cloning and Sequence Analysis of the *phyA* and *phyB* Gene of *Aspergillus niger* WP1

KE Xiao-jing, GUO Run-fang, YU Hong-wei, JIA Ying-min

(College of Food Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: In order to get a high phytase activity strain, the *phyA₁* and *phyB₁* encoding phytase of *Aspergillus niger* WP1 were amplified by the polymerase chain reaction (PCR) with primers designed according to the sequences in Gene Bank. The amplified fragments were cloned and sequenced. The results showed that the coding region were 1 346 bp and 1 560 bp in size, there was no intron in *phyA₁* gene, encodes a peptide of 448 amino acids; but *phyB₁* includes 3 introns, and encodes a peptide of 460 amino acid residues. The area of highest homology RHGXRP was found in the two sequences. There were two HD in *phyA₁* and only one in *phyB₁*. The *phyA₁* and *phyB₁* of *A. niger* WP1 strain in this paper their sequences have been accessed by Gene Bank (Accession: DQ650711; DQ836360).

Key words: *phyB*; *phyA*; PCR; Sequence homology

植酸酶是将植酸及其盐类水解为肌醇和无机磷酸盐的一类酶的总称。近年来, 随着饲料业、畜牧养殖业的迅猛发展, 植酸酶作为新型饲料添加剂已引起国内外的普遍关注。将植酸酶添加到植物性饲料中, 不但可以促进单胃动物对植物磷的吸收利用, 而且可以降解植酸盐蛋白质络合物, 从而提高植物蛋白的利用率, 提高植物饲料的营养价值, 同时还可以降低动物粪便中磷对大自然的污染。

但由于天然植酸酶酶活低, 热稳定性差, 其应用受到了一定限制。近年来, 通过构建产植酸酶工程菌株, 降低生产成本, 提高植酸酶产量已成为植酸酶研究的热点。在液体发酵中, 基因工程菌有非常好

的表现。*phyA* 基因的克隆已有报道^[1], 国内姚斌等^[2]将植酸酶基因导入异源表达系统, 并使其高效表达。

据 Ullah 等^[3]报道: NRRL3135 *phyA* 的最佳 pH 为 5.0, 但 *phyB* 的最佳 pH 是 2.5, 并且在 pH 5.0 时没有或者只有很少的活性。经本实验室测得, 黑曲霉 WP1 分别在 pH 2.5 和 pH 5.5 处有 2 个酶活高峰, 因此, 预测黑曲霉 WP1 可能含有 2 种植酸酶基因。本研究根据文献报道, 设计筛选出 2 对引物, 从一株黑曲霉 WP1 中克隆出 2 种植酸酶基因: 一种与报道的植酸酶 *phyA* 序列同源性较高, 命名为 *phyA₁*; 另一种与 *phyB* 同源性较高, 在国内还未见报道, 命

收稿日期: 2008-11-20

基金项目: 河北省“十一五”科技攻关项目资助(06220106D)

作者简介: 柯晓静(1980-), 女, 河北张家口人, 硕士, 主要从事酶工程及食品资源开发研究。

通讯作者: 贾英民(1961-), 男, 河北唐县人, 教授, 博士生导师, 主要从事食品微生物研究。

名为 *phyB₁*; 植酸酶基因 *phyB* 的克隆成功, 为进一步丰富我国植酸酶基因资源以及植酸酶的深入研究提供了试验材料。

1 材料和方法

1.1 试验菌株、质粒

黑曲霉(*Aspergillus niger*)WP1 为本实验室自行分离鉴定的产植酸酶菌株。*E. coli* JM109 和 pMD18-T 载体均购于上海 Sangon 公司。

1.2 酶及生化试剂

所用限制性内切酶 *EcoR* I、*Not* I、*Taq* DNA 聚合酶均为 TaKaRa 公司产品, 异丙基β-D 硫代半乳糖苷(IPTG)、X-Gal、氨苄青霉素(Amp)均为上海 Sangon 公司产品, 琼脂糖(进口 Spanish)、胰化蛋白胨(进口 BBI)、酵母粉(进口 BBI), 其他药品试剂均为国产分析纯。

UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒为上海 Sangon 公司产品, DNA Marker 为大连 TaKaRa 公司产品。

1.3 黑曲霉基因组 DNA 提取

将自行筛选的黑曲霉 WP1 孢子接种于察氏斜面培养基中, 28℃培养 4 d, 待完全产孢后, 无菌挑取斜面孢子接种 50 mL 察氏液体培养基于 250 mL 三角瓶里, 30℃恒温振荡培养 72 h, 收集菌丝体用蒸馏水冲洗干净后备用。黑曲霉基因组 DNA 提取采用研磨-CTAB 法^[4]。

1.4 PCR 引物的设计

从国际基因库(Gene Bank)中下载多条植酸酶基因序列, 经过序列的同源性比较, 并结合 Pidding-ton 等^[3]和 Ehrlich K C 等^[6]的报道, 利用 Primer5.0 软件, 设计、分析、筛选出 2 对 PCR 扩增引物, 在上下游引物中分别引入 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切位点(下划线为酶切位点序列)。引物由上海 Sangon 公司产品合成。

phyA₁: 上游引物(P₁): 5'-CTGAATTCGCATC-CGCTTCTC-3'; 下游引物(P₂): 5'-TGCGGCCGCTCT-GCATCTAGTCCAT-3'; *phyB₁*: 上游引物(F₁) 5'-CT-GAATTCGCGCATCCGCTTCTC-3'; 下游引物(R₁) 5'-TGGCGGCCGCTCTCCATCTAGTCCAT-3'。

1.5 植酸酶基因的 PCR 扩增及产物克隆

以黑曲霉 WP1 总 DNA 为模板, 分别以 P₁/P₂、F₁/R₁ 为上下游引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为: ddH₂O 37.5 μL, 10×PCR Buffer 5 μL, dNTP(各 2.5 mmol/L)4 μL, 引物(20 pmol/μL)各 1 μL, 模板(1 μg/μL)1 μL, *Taq* 聚合酶(5 μL/μL)0.5 μL, 总体积 50 μL。 *phyA₁* PCR 反应参数为: 94℃预变性 10 min, 然

后进入循环, 94℃变性 1 min, 60℃复性 45 s, 72℃延伸 2 min, 经过 35 个循环后, 72℃延伸 10 min 结束反应; *phyB₁* PCR 反应参数为: 94℃预变性 5 min, 然后进入循环, 94℃变性 1 min, 58℃复性 45 s, 72℃延伸 2 min, 经过 35 个循环后, 72℃延伸 10 min 结束反应。扩增产物用 1%TAE 琼脂糖凝胶电泳检测。

PCR 产物用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收并纯化; 将纯化基因的 PCR 产物和 pMD-18T 载体 16℃连接过夜。转化 JM109 感受态细胞, 筛选阳性克隆, 酶切鉴定。具体方法见《分子克隆实验指南》, 参照 Sambrook 等^[7]的方法。

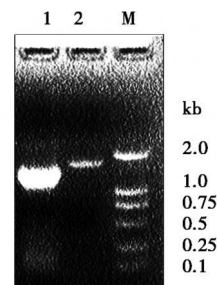
1.6 PCR 产物测序及序列分析

将筛选的阳性克隆菌株送大连 TAKARA 公司测序, 并用 cluster 等软件对测序结果进行分析。

2 结果与分析

2.1 2 种植酸酶基因的 PCR 扩增

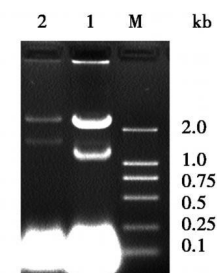
PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测, 结果各出现一条约 1.4 kb 和 1.5 kb 的条带(图 1), 与预期的片断大小一致。将大量扩增得到的 PCR 产物, 胶回收纯化后, 直接与 pMD18-T 载体连接,



1. *phyA₁*; 2. *phyB₁*; M. DNA Marker DL 2000.

图 1 *phyA₁* 和 *phyB₁* PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of products from *phyA₁* and *phyB₁*



1. *phyA₁* 重组质粒酶切产物(*EcoR* I 和 *Not* I); 2. *phyB₁* 重组质粒酶切产物(*EcoR* I 和 *Not* I); M. DNA Marker DL2000.

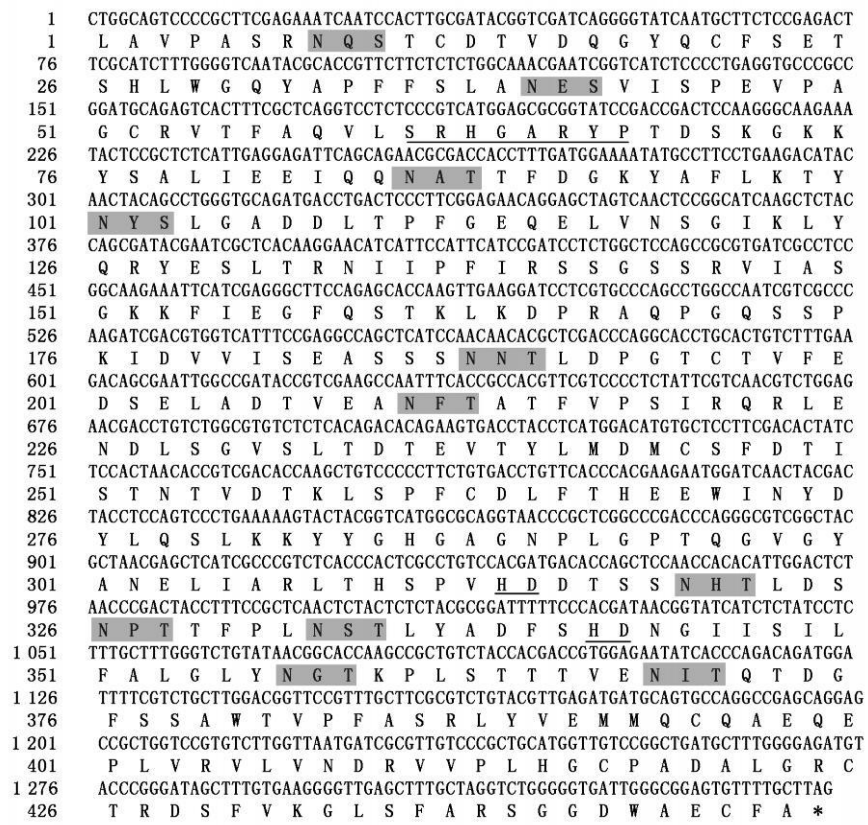
1. Recombinant plasmid of *phyA₁* digested by *EcoR* I and *Not* I; 2. Recombinant plasmid of *phyB₁* digested by *EcoR* I and *Not* I; M. DNA Marker DL2000.

图 2 *phyA₁* 和 *phyB₁* 重组质粒的酶切图谱

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmids digested by restriction enzyme

然后转化 *E. coli* JM109, 通过 α -互补法进行蓝白斑筛选, 挑取白色阳性克隆菌, 提取质粒并做酶切鉴定(图2)。从图2可以看出, 经双酶切后, 得到约1.4 kb和1.5 kb的条带及2.7 kb左右的条带, 切出的DNA片段与插入的片段大小一致。初步证明阳性

克隆质粒构建成功, 可以进行测序。
2.2 克隆片段的DNA测序结果与分析
将验证正确的阳性克隆送交大连 TAKARA 公司测序, 测得的核苷酸序列及推导的氨基酸序列结果如图3和4。



阴影部分为潜在的糖基化位点; 下划线为氨基酸活性位点。
The potential N-glycosylation sites are shady; the active site amino acid sequences are underlined.

图3 *phyA1* 基因的DNA序列及推导的氨基酸序列

Fig. 3 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *phyA1*

分析测序结果见表1。分析可知: *phyA1* 基因长1 346 bp, 共编码448个氨基酸, 不含内含子, 有11潜在的N-糖基化位点(Asn-X-Ser/Thr, X为任意氨基酸); *phyB1* 基因全长1 560 bp, 共编码460个氨基酸, 存在8个潜在的N-糖基化位点。分析二者基因序列, 发现 *phyA1* 不含内含子, 而 *phyB1* 含有3个内含子。 *phyA1* 与 *phyB1* 基因G+C含量、氨基酸第三位G+C含量都较高, 这种密码子第3位高频出现G和C碱基, 是曲霉高效表达蛋白编码序列所具有的

一种特征^[8]。另外, 我们还发现二者均含有植酸酶活性位点RHCXRYP和HD序列, 这是微生物来源的植酸酶活性位点中最保守的序列^[9]。RHCXRYP序列分别位于 *phyA1* 的第62~68位, *phyB1* 的第65~71位氨基酸, 此序列被认为是氨基酸的结合部位; *phyA1* 基因含有2个HD序列, 分别为313, 341位氨基酸, *phyB1* 基因只含有1个HD序列, 位于321位氨基酸。

表1 *phyA1* 和 *phyB1* 基因比较

Tab. 1 The comparison of *phyA1* and *phyB1* sequence

	基因长度/ bp Length of sequences	氨基酸个数 Number of amino acids	理论分子量/ Da Molecular weight	G+ C 含量/% Composition of G+ C	氨基酸第三位 G+ C 含量/% The composition of the third site G+ C of amino acids
<i>phyA_I</i>	1 346	448	49 249	55. 0	68
<i>phyB_I</i>	1 560	460	50 800	56. 6	73

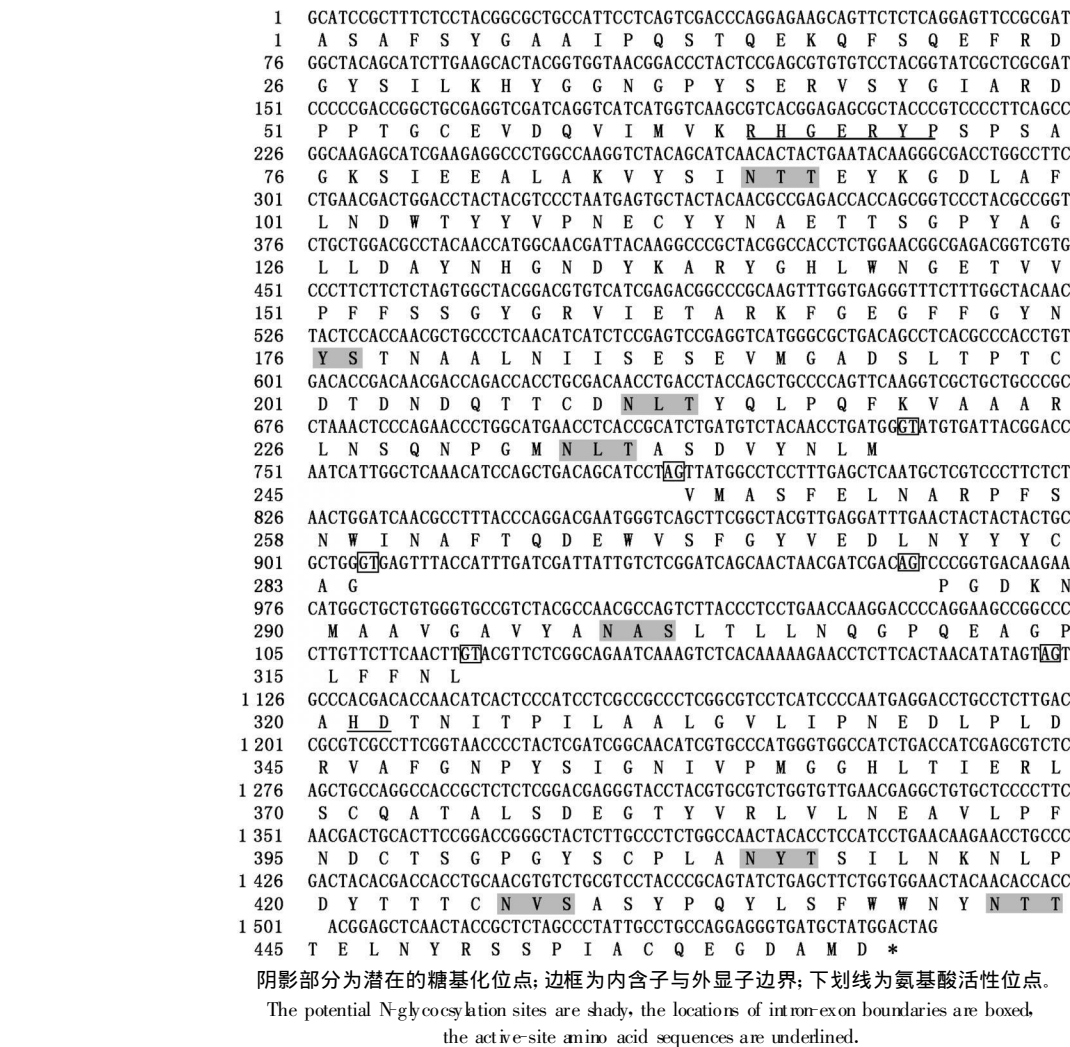


图 4 *phyB1* 基因的 DNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 4 Nucleotide and deduced amino-acid sequences of *phyB1*

将推导的两种植酸酶氨基酸序列在 GeneBank 中进行 BLAST, 并与黑曲霉的种植酸酶基因 Alignment。可知本试验克隆的 *phyA* 基因与多株曲霉植酸酶基因序列 (Accession: AB022700、AE005804、AB042805、AF218813、Z16414、L02421) 均具有较高同源性, 其中 *phyA1* 基因与产植酸酶酶活最高的天然黑曲霉标准菌株 NRRL3135 (Accession: M94550) 氨基酸同源性达 97.77%, 因此命名为 *phyA1*。*phyB1* 基因与已报道的植酸酶 *phyB* 基因 (Accession: L02420)

氨基酸同源性高达 99.13%, 因此命名为 *phyB1*。分别将 *phyA1* 和 *phyB1* 两种基因在 GeneBank 注册, 注册号分别为: DQ815852、DQ836360。

2.3 *phyA1* 与 *phyB1* 氨基酸序列同源性比较

将推导的 *phyA1* 与 *phyB1* 氨基酸序列在 Gene Bank 中利用 cluster 软件进行 BLAST, 并与黑曲霉的种植酸酶基因 Alignment, 氨基酸序列比较结果见图 5。



图 5 *phyA1*、*phyB1* 基因与其他黑曲霉植酸酶基因的序列比较

Fig. 5 Alignment of the *phyA1* and *phyB1* with other protein sequences from *Aspergillus niger*

氨基酸序列同源性比较结果发现, *phyB1* 与 *phyA1* 基因同源性较低, 其同源性为 21.12%。*phyB1*

虽然与 *phyA1* 基因的氨基酸序列相似性较低, 但与 *phyA1* 含有相同的催化活性位点特征: 1 个

RHGERYP 序列和 1 个 HD 序列, 因此, 同属于组氨酸酸性磷酸家族。据 Golovan 等^[10]报道: 黑曲霉植酸酶基因 *phyA* 为肌醇六磷酸水解酶基因, 而 *phyB* 为具有植酸酶活性的、最适 pH 值为 2.5 的酸性磷酸酶基因。它们之间的进化关系较远。

3 讨论

到目前为止, 已经从细菌、酵母、霉菌、植物中分离出多种植酸酶基因, 而研究最多的有植酸酶活性的微生物是真菌, 其中以曲霉(*Aspergillus*)为最。现关于植酸酶的分类没有统一的标准。根据基因及氨基酸序列比较, 结合酶学性质研究, 目前将植酸酶大致分为五类: 霉菌及部分细菌来源的 *phyA* 与 *phyB*、*Bacillus subtilis* 来源的 *phyC*、玉米植酸酶、其他类植酸酶^[11]。最先分离到的植酸酶基因是 *phyA*, 如: Ullah 等^[3]从黑曲霉 NRRL3135 中扩增出植酸酶 *phyA* 基因; 姚斌等^[2]采用异源受体—毕赤酵母作为生物反应器, 高效表达出了来源于 N963 的植酸酶基因 *phyA*。但国内还未发现有关 *phyB* 基因克隆的报道。

本研究克隆出的两种植酸酶基因 *phyA₁* 和 *phyB₁*, 为进一步深入研究植酸酶的类型及多种植酸酶的相互作用提供了基础, 期望能够在微生物异源受体菌中表达, 获得酶活更高的植酸酶产生菌株, 将避免基因工程菌种酶系单一的问题; 尤其是 *phyB₁* 基因的克隆成功, 丰富了植酸酶基因资源。从 WP1 中克隆出 2 种植酸酶基因, 也为今后植酸酶资源的开发与利用提供了优良菌株。

参考文献:

[1] Van Hatingsveldt W, Van Zeijl C M, Harteveld G M, *et al.*

characterization and overexpression of the Phytase-encoding gene (*phyA*) of *Aspergillus niger* Cloning [J]. *Gene*, 1993, 127: 87—94.

[2] Yao B Zhang C Y, Wang J H, *et al.* Recombinant *Pichia Pastoris* overexpressing bioactive phytase [J]. *Science in China Ser C*, 1998, 28(3): 237—243.

[3] Ullah A H J, Gibson D M. Extracellular phytase from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: Purification and characterization [J]. *Prep Biochem*, 1987, 17: 63—71.

[4] Graham G C, Mayers P, Henry R T. A simplified method for the preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis [J]. *Biotechniques* 1994, 14(1): 48—50.

[5] Piddington C S, Houston C S, Paloheimo M, *et al.* The cloning and sequencing of the genes encoding phytase (*phy*) and pH 2.5-optimum acid phosphatase (*aph*) from *Aspergillus niger* var. *awamori* [J]. *Gene*, 1993, 133: 55—62.

[6] Ehrlich Kenneth C, Beverly G, Montalbano, *et al.* Identification and cloning of second phytase gene *phyB* from *Aspergillus Niger* (*ficuum*) [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1993, 5(1): 53—57.

[7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual* [M]. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[8] Lloyd A T, Sharp P M. Codon usage in *Aspergillus nidulans* [J]. *Mol Gen Genet*, 1991, 230: 288—294.

[9] Rudy J W, Ullah A H J. Phytase [J]. *Advances in Applied Microbiology*, 1996, 42: 263—302.

[10] Golovan S, Wang G, Zhang J, *et al.* Characterization and overproduction of the *Escherichia coli appA* encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities [J]. *Can J Microbiology*, 2000, 46(1): 59—71.

[11] 鲁晓岩. 植酸酶的研究进展 [J]. *北方园艺*, 2002, 5: 10—11.