

# 宇佐美曲霉植酸酶 *phy* A 基因的克隆

王郡美<sup>1,2</sup>, 宋维平<sup>2</sup>, 张 莉<sup>2</sup>

(1. 首都师范大学 生命科学学院, 北京 100037; 2. 北京市农林科学院畜牧兽医研究所, 北京 100089)

**摘要:** 植酸酶是催化植酸及其盐类物质水解成肌醇和磷酸的一类酶的总称, 用其作为动物饲料添加剂既可以达到提高磷利用率的目的, 又可以降低环境中的磷污染。真正具有开发价值的是利用微生物生产植酸酶。直接以宇佐美曲霉菌株 2418 基因组 DNA 为模板, 对植酸酶基因 *phy* A 的成熟肽 (分子长度为 1 347 bp) 进行了 PCR 扩增, 再将 PCR 产物克隆入 pBS-T 载体, 经 DNA 测序鉴定, 与已发表的植酸酶基因同源性达到 99% 以上, 这为进一步获得大量、高活性植酸酶以及研究和开发新型微生态制剂打下了基础。

**关键词:** 植酸酶; 克隆; 宇佐美曲霉

中图分类号: Q556 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006)03-0005-04

## Cloning of Phytase *phy* A from *Aspergillus usamii* 2418

WANG Jun-mei<sup>1,2</sup>, SONG Wei-ping<sup>2</sup>, ZHANG Li<sup>2</sup>

(1. College of Life Science of Capital Normal University, Beijing 100037, China;

2. Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100089, China)

**Abstract:** The phytase gene (*phyA*) of *Aspergillus usamii* 2418 strain, which had been already selected and identified by us in the key laboratory of biomechanics and tissue engineering, was amplified by polymerase chain reaction (PCR) in this study. The PCR fragments were subcloned into the pBS-T vector. Nucleotide sequence analysis of the *phyA* gene showed that it comprised 1 347 bp without the signal peptide sequence and shows over 99% homology in nucleotides. It is the base of obtaining high active phytase and developing new microecological preparation.

**Key words:** Phytase; Cloning; *Aspergillus usamii*

磷和钙是各种动物必需的常量矿物元素, 既是机体重要的结构成分, 又参与许多重要的生理、生化过程, 发挥着不可替代的代谢功能。所以, 动物必须获得足够的磷、钙来维持机体的正常生理活动。在集约化生产的今天, 动物要获得足够的磷和钙, 无外乎来自于饲料, 然而在常规植物性 (谷实类、糠麸类、油饼类) 饲料中, 虽然含磷十分丰富, 但其中 2/3 的磷是以植酸磷形式存在。由于单胃动物胃肠道不分泌或极少分泌植酸酶, 使得植酸中的磷不能被直接利用。

植酸酶即肌醇六磷酸水解酶, 是催化植酸及其盐类物质水解成肌醇和磷酸的一类酶的总称<sup>[1]</sup>, 因

而用其作为动物饲料添加剂既可以达到提高磷利用率的目的, 又可以降低环境中的磷污染。现已经知道植酸酶有 3 种类型: 肌醇六磷酸 3-磷酸水解酶、肌醇六磷酸 6-磷酸水解酶和非特性的正磷酸盐单酯磷酸水解酶。天然植酸酶蛋白活性低、产量小。近年来, 由于饲料工业、畜牧业的发展及植酸酶新用途的不断被发现, 它被广泛用于促进单胃动物的生长发育和提高饲料中磷的利用率方面, 因此, 植酸酶的研究对提高畜牧生产效益及降低环境污染有重要意义<sup>[2]</sup>。

植酸酶有 3 种来源: 微生物、植物和动物。由于动物中植酸酶含量很低, 植物中的植酸酶因加工、贮

收稿日期: 2005-12-24

基金项目: 北京市优秀人才项目资助 (2003-2006)

作者简介: 王郡美 (1976-), 女, 山东泰安人, 在读硕士, 主要从事细胞生物学研究工作; 张莉为通讯作者。

藏等因素被破坏,难以获得大量的植酸酶,所以真正具有开发价值的仅限于利用微生物生产植酸酶。而且,微生物植酸酶具有 pH 范围广(pH 2.10~7.10)、活性高(比植物性植酸酶高 10%)、可耐受较高温度、不被消化道中蛋白酶降解及易于生产等诸多优点,因此植酸酶的研究主要致力于微生物酶的鉴定和开发。经研究发现,自然界中细菌、酵母都分泌一定的植酸酶,但霉菌分泌的植酸酶量相对较高,在实际生产中微生物植酸酶是最主要的来源。目前研究最多的是真菌植酸酶,特别是各种曲霉,如米曲霉(*A. oryzae*)、土曲霉(*A. terreus*)、黑曲霉(*A. niger*)、无花果曲霉(*A. ficuum*)等<sup>[3-4]</sup>。

Shimizu 研究了米曲霉,筛选出高产菌株并对其进行产生的植酸酶进行了纯化;1978 年 Skowronski 等首先研究了黑曲霉所产生的植酸酶。Ullah 等<sup>[5]</sup>检测了来自 25 个种的 84 株产细胞外植酸酶的真菌菌株,筛选到编号为 *Aspergillus ficuum* NRRL3135 的高产菌株。我国的一些研究主要也是采用曲霉类,多数为黑曲霉,未见有宇佐美曲霉的报道。

本研究旨在从宇佐美曲霉 2418 中克隆植酸酶基因 *phy A*,以期构建其新型表达载体,得到大量活性高、产量高、热稳定性好的重组植酸酶以及开发能表达植酸酶的新型微生态制剂。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒和菌株

宇佐美曲霉(*Aspergillus usamii*) 2418 为北京市农林科学院畜牧所高技术室保存的产植酸酶菌株。*E. coli* DH5 $\alpha$  为北京市农林科学院畜牧所高技术室保存。

### 1.2 酶及生化试剂

*Eco*RI, *Kpn*I 限制性内切酶均为 TaKaRa 公司产品。异丙基  $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG), X-gal 均为北京鼎国公司产品。细菌质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、DNA 连接试剂盒、pBS-T 试剂盒均为北京天为时代科技有限公司产品。DNA Marker, PCR 试剂盒均为大连 TaKaRa 公司产品。

### 1.3 引物设计

根据从 GenBank 中下载的多条黑曲霉植酸酶 *phy A* 基因序列<sup>[6]</sup>,结合国内姚斌<sup>[7]</sup>、霍丹群<sup>[8]</sup>、李桂兰<sup>[9]</sup>等的报道,利用 Primer 5.0 软件,针对 pET32a+ 表达载体多克隆位点,设计出一对用于扩增 *phy A* 基因的引物。

引物的序列为:上游引物 P1: 5'-GGGGTACC-CTGGCAGTCCCCGCCTCGA-3',下游引物 P2: 5'-GGAATTCCTAAGCAAAACACTCCGCC-3',引物送英骏生物技术有限公司合成。

### 1.4 宇佐美曲霉细胞总 DNA 的提取

将实验室保存的宇佐美曲霉菌株的斜面孢子接种于 PDA 斜面培养基中,28℃培养 4 d,待完全产孢后,用无菌水洗涤,制成孢子悬液,取适量孢子悬液在无菌条件下涂布在事先铺有一层玻璃纸的 PDA 平板上,玻璃纸用灭过菌的针打孔,30℃恒温培养 24~30 h。收集菌丝体于 1.5 mL 的离心管中,置于一20℃冰箱里冷冻 0.5 h 以上或过夜。用改进的 CTAB 法提取宇佐美曲霉细胞总 DNA。

### 1.5 *phy A* 基因的 PCR 扩增

以宇佐美曲霉细胞基因组总 DNA 为模板,用前面所设计的引物直接 PCR 扩增植酸酶的成熟肽基因(不包含信号肽和内含子)。PCR 扩增反应条件为:94℃变性 40 s,56.5℃退火 40 s,72℃延伸 1.5 min,共 35 个循环。扩增完毕,取 5  $\mu$ L PCR 产物,用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测结果。

### 1.6 *phy A* 基因 PCR 产物的克隆

采用北京天为时代公司的胶回收试剂盒纯化 *phy A* 基因 PCR 产物,将纯化的 *phy A* 基因与 pBS-T 载体直接连接(T 载体末端带有 T 碱基,PCR 产物末端带有 A 碱基)。连接反应体系为:目的 DNA 5  $\mu$ L, pBS-T 载体 1  $\mu$ L, T4-Ligase 1  $\mu$ L, Buffer 1  $\mu$ L, 无菌水 2  $\mu$ L,混匀后 16℃连接过夜。同时,采用氯化钙法制备大肠埃希氏菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞。然后进行转化、阳性克隆菌株的筛选及酶切鉴定。

### 1.7 *phy A* 基因测序与分析

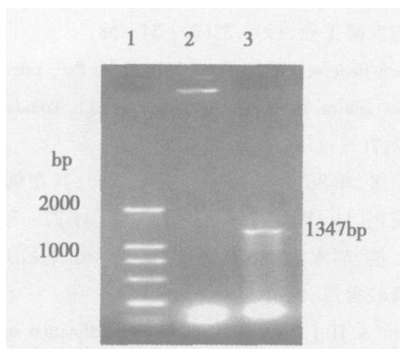
将筛选的带有质粒 pBS-T-*phy A* 的阳性克隆菌株送英骏生物技术有限公司(原上海博亚生物技术有限公司)对克隆片段 *phy A* 基因测序,并对测序结果进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 *phy A* 基因的 PCR 扩增及其产物的酶切鉴定

直接对宇佐美曲霉基因组进行 PCR 扩增鉴定,用 0.8%的琼脂糖凝胶进行检测,电泳结果见图 1。

从图 1 可看出,在此 PCR 反应条件下,扩增到 1 条长约 1.4 kb 的特异性目标带,符合 *phy A* 基因成熟肽的理论长度(1 347 bp),由此初步判断 PCR 扩增 *phy A* 基因成功。



1. DL2000DNA Maker; 2. Negative control; 3. PCR Product

图 1 PCR 产物鉴定

Fig. 1 PCR and cloning of phytase *phy* A

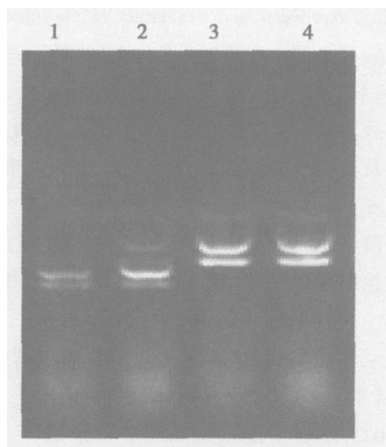


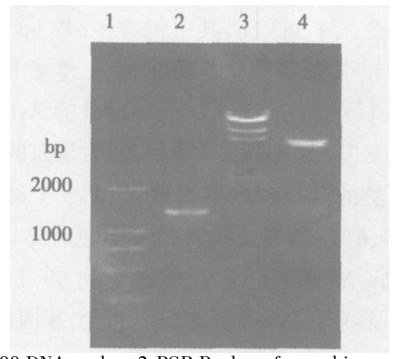
图 2 质粒鉴定

Fig. 2 Analysis of plasmid

2.2 *phy* A 基因 PCR 产物的克隆

将大量 PCR 扩增的 *phy* A 基因, 经过胶回收纯化后, 直接与 pBS-T 载体 (3.0 kb) 连接, 然后转化

*E. coli* DH5 $\alpha$ , 通过  $\alpha$  互补法进行蓝白斑筛选, 挑取 4 个白色阳性克隆菌, 提取质粒, 所提质粒用 0.8% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测, 如图 2 所示。



1. DL2000 DNA marker; 2 PCR Product of recombinant plasmid; 3.  $\lambda$ DNA Hind III Marker; 4 Enzyme digestion product of *Eco*RI + *Kpn*I

图 3 pBS-T-*phy* A 质粒的双酶切鉴定

Fig. 3 Restriction enzyme digestion analysis of recombinant plasmid

从图 2 可以看出, 3, 4 号均为阳性克隆质粒 (pBS-T *phy* A), 并对阳性质粒进行 PCR 鉴定和酶切鉴定 (图 3)。经过双酶切后, 得到约 1.4 kb 的 *phy* A 基因和 3.0 kb 左右的 pBS-T。切出的 1 347 bp 的 DNA 片段与笔者插入的片段大小一致, 初步证明阳性克隆质粒 pBS-T-*phy* A 构建成功。

2.3 *phy* A 基因测序与序列分析

*phy* A 基因成熟肽长 1 347 bp, 将阳性克隆质粒 pBS-T-*phy* A 送英骏生物技术有限公司进行克隆片段序列测定。测序结果见图 4。

CTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATTGG GGTACCCTGCGACGTCCCGCCTCGAGAAGTCAACTCTACTTTCGATACGGTTCGATCAG  
GGGTATCAATGCTTCTCGGAGACTTCGCACTTTGGGGCCAATAAGCGCGGTTCCTTTCTCTGGCAAACAAATCGGCCATCTCCCTGATGCT  
TCCTGCCGGATGCCATGTCATCTTTGGCCAGGTTCCTCCCGCCATGGAGCAAGGTATCCGACCGACTCCAAGGGCAAGAAATACTCCGCT  
CTCATCGAGGAGATCCAGCAGAAACCGACAACTTCGAGGGGAAATGATGCTTCTCTGAGACATACAACTACAGCCTGGCGCGGATGA  
CCTGACTCCCTTCGGAGAGCAGGAGCTGGTCAACTCCGGGCTCAAGTTCTACACCGGATAGAAATCGCTCAACAGAAACATGCTCCCGTT  
CATCCGATCCCTCAGGCTCCAGCCCGGTGATTGCTCTGGCAATAAATTCATCGAGGGCTTCAGAGCACTAAGCTGAAGGATCCTGTCGCC  
CAGCCCGGCCAATGTCGCCCAAGATCGAGCTGGTCAATTCAGAGGCCAGCACATCCAACAACACTCTCGATCCGGGCACCTGCACCGTT  
TTCGAAGATAGCGAATTGGCCGATGACATGAGCCAAATTTCAAGCCACGTTCTGTCCTCCCTCCATTCGTCAACGCTCTGGAGAACGACTTGT  
CTGGCGTGTCTCTCAAGGACACAGAGTGACCTACCTCATGGACATGTGCTCCTTCGACACCATCTCCACCAGCACGTCGACACCAAGCT  
GTCCCCCTTCTGTGACCTGTTCAACCATGAAGAAATGGATCAACTAAGACTACCTCCAGTCCCTGAACAAATACTAAGGCCATGGCGCAGGT  
AACCCGCTCGGCCGACCCAGGGCGTGGCTACGCTAACGAGCTCATCGCCCGTCTCAACCACTCGCCTGTCCAAGATGACACAGCTCC  
AACACACATGTGACTCCAACCGGCTACTTTCCCGCTCAACTCCACTCTCTATGCGGACTTTTCGCGATGATAACGGCATCATCTCTATCCT  
CTTTGCTTTGGGTCTGTACAACGGCACCAAGCCGCTGTCTTCCACGACCGCGGAGAATATCACCAGACCGATGGGTTCTCATCTGCCTGG  
AAGGTTCCTTTTCGCGTCGCGCATGTACGTCGAGATGATGCAATGCCAGTCCGAGCAGGAGCCTTTGGTCCGTGCTTTGGTTAATGATCGTG  
TTGTTCCGCTGCATGGCTGTCCGTTGATGCTTTGGGAAGATGTACGCGGATAGCTTCGTGAAGGGGTTGAGCTTTGCCAGATCTGGCGG  
TGATTGGCGCGAGTGTTTTGCTTAGGAGTTCATC GAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCACTAGTTCTAGACCGGCC

图 4 *phy* A 基因序列

Fig. 4 Nucleotide sequence of phytase gene

### 3 讨论

*phy A* 基因成熟肽序列测定与分析表明, PCR 扩增产物全长 1 363 bp, 其中包含 1 347 bp *phy A* 基因成熟肽和引入的 2 个酶切位点。笔者所克隆的 *phy A* 基因与 Wu J, Yan C Y 所注册的 Ay615712 黑曲霉 *phy A* 基因相比, 二者的成熟肽基因的长度、所编码氨基酸的长度等均相同, 只错配 5 个碱基, 同源性达到 99.6%; 与 Zhang L, An L 等注册的 AY013315 植酸酶 *phy A* 基因比较, 同源性高达 99.7%。目前国内外尚无关于宇佐美曲霉的 *phy A* 基因序列的报道, 因此我们已将该基因序列在 Genbank 上注册成功, 编号为 DQ198163。到目前为止, 我们是第一个成功克隆宇佐美曲霉 *phy A* 基因并将该基因序列公布的研究小组。

综上所述, 宇佐美曲霉 2418 是北京市农林科学院畜牧所高技术室经过一年多时间筛选出的产植酸酶活性最高的菌株, 与黑曲霉 NRRL3135、黑曲霉 N25 的植酸酶 *phy A* 基因高度同源。因此, 可将其转入大肠埃希氏菌 pET32a+ 高效表达系统和真核表达系统进行深入研究。

#### 参考文献:

[1] 黄遵镭, 章克昌. 植酸酶基础与应用研究概况[J]. 食

品与发酵工业, 1999, 25(2): 54—58.

- [2] Brinch-Pedersen H, Sorensen L D, Holm P B. Engineering crop plants: getting a handle on phosphate[J]. Trends Plant Sci, 2002, 7(3): 118—125.
- [3] 马 玺, 单安山. 植酸酶研究进展及其在饲料工业中的应用[J]. 粮食与饲料工业, 2001, 4: 27—30.
- [4] 冯 胜, 胡永松. 植酸酶研究成果、现状及前景[J]. 四川畜牧兽医, 1996, 9(3): 52—54.
- [5] Ullah A H J. Production, rapid purification and catalytic characterization of extracellular phy2 tase from *Aspergillus ficuum* [J]. Prep Biochem, 1998, 18: 443—458.
- [6] Ehrlich K G, Helly V R, Conneely O M, *et al.* Molecular cloning, expression and evaluation of phosphohydrolases for phytase degrading activity [J]. J Ind Microbiol, 1995, 14: 396—442.
- [7] 姚 兵, 张春义, 王建华, 等. 产植酸酶的黑曲霉菌株筛选及其植酸酶基因的克隆[J]. 农业生物技术学报, 1998, 6(1): 1—6.
- [8] 霍丹群, 范守城, 张云茹, 等. *phy A* 基因的克隆及其新型表达载体的构建[J]. 中国兽医科技, 2004, 34(3): 26—30.
- [9] 李桂兰, 祝建洪, 孙 建, 等. 无花果曲霉植酸酶基因 *phy A* 的克隆、序列分析及表达[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(5): 520—524.