

单宁酶基因在黑曲霉 ST31 中的克隆与表达

黄小凤¹ 韦宇拓^{1,2} 韦传东¹ 杜丽琴¹ 庞宗文^{1,2} 黄日波^{1,2*}

(1 广西大学生命科学与技术学院 南宁 530005 2 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室 南宁 530005)

摘要 利用 PCR 扩增得到米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 单宁酶 (tannase) 基因的编码序列, 经 DNA 测序证实单宁酶基因已成功克隆, 然后将其连接到黑曲霉的表达载体 ANED2-SP2 上构建单宁酶基因表达载体。将构建好的单宁酶基因表达载体通过原生质转化法导入黑曲霉菌株 ST31 中进行表达研究。结果表明重组菌株的单宁酶活力最高为 104.02 U/ml 发酵液, 比原始出发菌株米曲霉提高 2~3 倍。研究构建了黑曲霉的高效转化体系, 提高了黑曲霉表达系统的应用水平, 为其它新酶的研究提供有价值的参考。

关键词 单宁酶 黑曲霉 克隆 表达

单宁酶 (tannase, EC3. 1. 1. 20) 全称单宁酰基水解酶, 广泛应用于茶业、饮料、食品、化妆品、皮革工业等行业^[1]。单宁酶能水解没食子酸单宁中的酯键和缩酚酸键^[2], 生成没食子酸和其他化合物, 其中没食子酸是食品工业中合成没食子酸丙酯的一个重要底物, 也是制药业中合成三甲氧苄二氮嘧啶 (一种抗菌素, 用以治疗疟疾及呼吸道或尿路感染) 的重要底物^[3]。美国食品与药物管理局 (FDA) 已确定单宁酶为安全产品, 在日本单宁酶也通过批准应用于食品工业。

由于单宁酶有巨大的应用潜力和安全性, 研究人员长期以来通过诱变育种选育和改良上游工程的生产菌株、分离纯化或固定化下游工程酶、以及优化发酵条件等途径来提高酶活及产量^[4~6]。但是利用传统的发酵法生产单宁酶的产量还是比较低且成本较高。目前, 单宁酶的生产主要是通过曲霉属的发酵获得, 并且曲霉属易于大规模的培养和生产、可避免许多原核表达系统重组蛋白生产相关工艺专利的限制, 因此曲霉属可能是最理想的单宁酶表达系统, 且利用曲霉工程菌生产单宁酶具有生产工艺简单、成本低廉、副产物少、产物分离简单等优点, 因而具有广阔的应用前景, 目前国内外尚无利用黑曲霉表达单宁酶基因的报道。此外, 黑曲霉已被美国 FDA 和世界卫生组织认定为是安全的生产菌株, 为表达医用蛋白质的优先可接受的

宿主菌^[7], 因此, 运用它作为外源基因的表达受到国内外研究人员的很大重视。本研究从米曲霉克隆单宁酶基因, 构建单宁酶基因穿梭表达载体 ANEP2_SP2-tan, 然后通过原生质转化法导入黑曲霉菌株 ST31 中进行表达。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒和培养基

1.1.1 质粒 表达载体 ANED2-SP2 是一个穿梭载体 (图 1), 载体上的 *PyrG* 基因为转化子选择性标记。表达载体的表达盒采用葡萄糖化酶启动子 (*GlaPr*) 和终止子 (*GlaT*), 其中含有 *AscI* 和 *FseI* 两个可克隆位点。载体和宿主都是由李晓明博士 (加拿大) 提供。米曲霉是由本实验筛选获得, 为单宁酶基因来源。

1.1.2 菌株 黑曲霉 ST31 是 *PyrG* 缺陷型菌株。

1.1.3 培养基 CM 培养基 (1L: 6.00g NaNO₃, 0.50g KCl, 0.80g KH₂PO₄, 1.04g K₂HPO₄, 10g 葡萄糖, 0.52g MgSO₄, 1ml TE, 2g Peptone, 1g Yeast Extract, 1g 酪蛋白氨基酸, 5mmol/L 尿苷。100ml TE: 2.2g ZnSO₄ · 7H₂O, 1.1g H₃BO₃, 0.5g MnCl₂ · 4H₂O, 0.5g FeSO₄ · 7H₂O, 0.16g CoCl₂ · 6H₂O, 0.16g CuSO₄ · 5H₂O, 0.11g (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O, 6.5g EDTA 二钠盐; 0.77g EDTA 四钠盐) 培养。黑曲霉重组子用 MM 培养基 (1L: 6.00g NaNO₃, 0.50g KCl, 0.80g KH₂PO₄, 1.04g K₂HPO₄, 10g 葡萄糖, 0.52g MgSO₄, 1ml TE) 筛选。原

收稿日期: 2005-05-25 修回日期: 2005-07-12

* 通讯作者, 电子信箱: riboh@public.nn.gx.cn

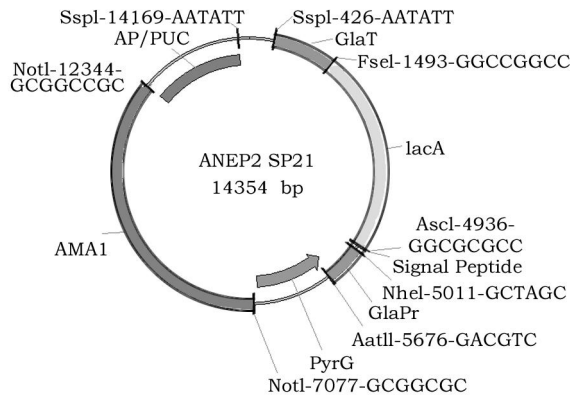


图 1 ANEP2-SP2质粒图谱

Fig 1 Plasmid figure of ANEP2-SP2

生质体再生培养基为 CM + 20.54%蔗糖。

1.2 方法

1.2.1 DNA的操作与重组转化 参考文献 [8,9]

1.2.2 Tannase 基因的 PCR 克隆 Hatamoto 等^[11]发现,米曲霉单宁酶的基因中没有内含子,因此可以直接通过 PCR 扩增得到单宁酶基因。根据 GenBank 中公布的米曲霉单宁酶基因 (D63338),设计以下 PCR 引物:

TanSen: 5'-CTAACGCGTAGCTTCTTTACCGATGTGTG3',

TanAnt: 5'-gCgACgCgTTAAC TTCACTAAgAAgCTAA3'。

在上游和下游引物都设计了限制性酶切位点 Mlu I 方便插入表达载体。以米曲霉总 DNA 为模板,用 Pfu 试剂盒进行 PCR: 95℃, 2min; 94℃, 40s; 46℃, 3min40s; 72℃, 10min, 共计 35 循环。将扩增得到的目的片段连接到 pGEM-3zf 载体进行测序分析。

1.2.3 Tannase 基因表达载体的构建 将扩增得到单宁酶基因的 DNA 片段用 Mlu I 酶切后与同样经 Mlu I 酶切并去磷酸化的 ANEP2-SP2 载体连接,连接产物转化大肠杆菌感受态细胞,然后提取质粒 DNA,进行酶切验证和 PCR 鉴定筛选重组子。

1.2.4 原生质体的制备与转化 接种黑曲霉 ST31 于 CM 培养基 (附加 5mmol/L 的 Uridine),振荡培养 (30℃, 250r/min) 16h 后收集菌丝,用 NaCl + 蔗糖 (在 200ml 的 pH 值为 5.8 的磷酸钠盐缓冲液加 2g 的蔗糖和 8.18g 的 NaCl) 配制混合酶 (2%纤维素酶 + 2%蜗牛酶) 的酶解液,酶解 2.5h 后经脱脂棉过滤,纯化后得到原生质体,然后用聚乙二醇 / 氯化钙方法进行外源 DNA 转化实验^[10]。

1.2.5 单宁酶基因的诱导表达 用孢子悬液收集孢子,计数,用孢子悬液调制相同的浓度 3.5×10^4 个 / ml,

接种 500μl 于装有 100ml 麸皮培养基的三角瓶 (容量为 500ml) 中,重组菌株和宿主菌株用过滤灭菌过的 1% 麦芽糖诱导,30℃、250r/min 培养 3d 后,直接取培养液作为粗酶液进行酶活测定。

1.2.6 酶活的测定 单宁酶酶活性测定方法采用紫外分光光度法,参考文献 [11],有所改动。对照管和测定管各加 100μl 柠檬酸缓冲液 (pH5.5) 和 100μl 粗酶液;在对照管中先加入 400μl 90% 的乙醇使酶失活,对照管和测定管再各加入 100μl 没食子酸丙酯溶液 (浓度为 0.35%),40℃ 反应 10min 后,在反应管中各加入 400μl 90% 的乙醇使酶失活;每管各取 50μl 反应液稀释至 2ml,测定其在 270nm 处的光吸收值。酶活力的定义:在 pH 值为 5.5,温度为 40℃ 的条件下,100μl 酶液每分钟使没食子酸丙酯溶液在 270nm 处减少 0.01 个光吸收值定义为 1 个酶活力单位。

2 结果与分析

2.1 Tannase 基因的克隆

PCR 产物电泳结果如图 2 所示,PCR 产物出现为预期 1800bp 的大小相符,PCR 产物经测序分析与 GenBank 中公布的米曲霉单宁酶基因序列 (D63338) 一致,说明了本实验已经成功克隆到米曲霉单宁酶基因。

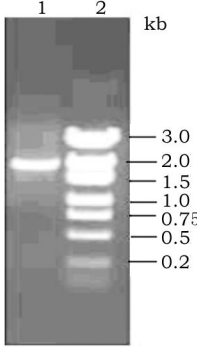


图 2 Tannase 基因的 PCR 产物电泳图

1: PCR 产物; 2: DNA Marker DL2000

Fig 2 Electrophoresis of the PCR production of tannase gene

2.2 Tannase 表达载体的构建

由于采用单酶切进行克隆,外源基因可能以正向或方向连接到载体上,如果是正接上 tannase 基因,重组载体经 Bam H I 酶切后的产物应该为约 14kb 和 1800bp 的片段。重组载体的酶切结果如图 3,结果表明与预期相符,说明 tannase 基因已经以正确方向连接到载体上。

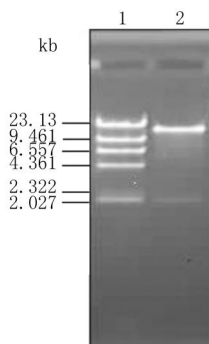


图 3 ANEP2-SP2-tan 的酶切验证

1: DNA Marker Hind III; 2: ANEP2 - SP2 - tan BamH I 酶切产物

Fig 3 Enzyme digestion of ANEP2-SP2-tan

2.3 转化子的 PCR 验证

提取重组菌株和宿主菌株的总 DNA,以它们为模板作 PCR 验证。将 PCR 产物电泳验证,结果如图 4 所示,进一步说明重组质粒已经成功转化入宿主菌。

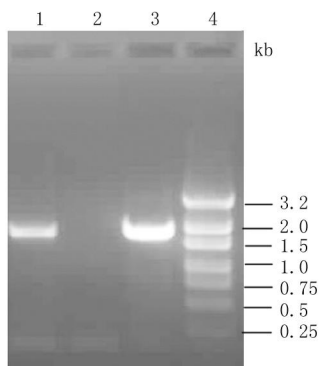


图 4 转化子的 PCR 鉴定

1: 重组菌株总 DNA 的 PCR 产物; 2: 宿主菌株 ST31 总 DNA 的 PCR 产物; 3: 重组质粒 DNA 的 PCR 产物; 4: DNA marker DL2000

Fig 4 The PCR identification of transformants

2.4 酶活的测定

提取粗酶液测定重组菌株的单宁酶酶活,其中一株重组菌株在诱导 72h 后,酶活最高达 104.02 U/ml。重复 5 次实验,宿主菌株和对照菌株 (ST31/ANEP2-SP2) 都没有酶活,重组菌株的平均酶活为 84.53 U/ml,比原始菌株米曲霉提高了 2~3 倍,说明已经得到具有单宁酶酶活的表达产物。

3 讨论

单宁酶是一种糖蛋白。不同来源的单宁酶,其糖的含量有所差异,但是酶的糖基化与酶的功能关系还未见有相关报道^[12]。单宁酶这些复杂的特性可能给利

用工程菌表达有活力的单宁酶带来一定的困难,直至 2004 年,才首次报道了利用甲醇酵母 (*Pichia pastoris*) 工程菌成功表达了米曲霉单宁酶基因,并获得有活力的单宁酶,重组菌株单宁酶的酶活比原始菌株提高了 3 倍^[13]。目前,单宁酶的主要生产菌种是曲霉和青霉^[13],尤其曲霉属的黑曲霉作为外源基因,特别是外源真核蛋白基因的表达宿主,本身具有高分泌性能、有完善地翻译后加工功能及成熟的发酵工艺等优点,因此从理论上推测曲霉属是单宁酶较理想的表达宿主,于是利用黑曲霉表达外源的单宁酶基因是一条可尝试的途径。本研究成功地将米曲霉单宁酶基因导入黑曲霉中并获得高效表达,重组菌株的单宁酶酶活比原始菌株提高了 2~3 倍。但本研究的单宁酶基因总体表达水平还不是很高,还未能达到工业化生产应用的要求,其原因可能是由于 ANEP2-SP2 表达载体使用的启动子是糖化酶启动子,而黑曲霉受体菌株 ST31 是一株高产糖化酶的菌株,具有内源糖化酶启动子,重组菌株很有可能因糖化酶启动子拷贝数增加而导致正调控蛋白的滴定效应和能量、营养的分流,从而降低了外源单宁酶基因的表达水平;此外,丝状真菌的蛋白分泌是发生在菌丝体的顶端或接近顶端的地方,并且本实验的单宁酶基因的诱导表达是采用液体摇瓶培养法,生成的菌丝体绝大多数形成包裹严密的球状,这也可能是外源基因在丝状真菌表达产量低的主要原因之一^[14]。

针对各种影响外源单宁酶基因表达及其酶活性的原因,本实验将通过改善宿主菌株、更换启动子、优化表达载体和发酵条件^[15]等多种途径来提高单宁酶的活性及其产量,为进一步提高黑曲霉表达系统的应用水平探索最佳表达的条件。

参考文献

- [1] Hatamoto O, Watarai T, Kikuchi M, et al Cloning and sequencing of the gene encoding tannase and a structural study of the tannase subunit from *Aspergillus oryzae* Gene, 1997, 175 (1-2): 215~222
- [2] Aoki K, Shinke R, Nishira H. Purification and some properties of yeast tannase. Agri Biol Chem, 1976, 40 (1): 79~85
- [3] Zhou X F, Peng L S, Zheng S L, et al Secretion, purification, and characterization of a recombinant *Aspergillus oryzae* tannase in *Pichia pastoris* Protein Expression and Purification, 2004, 36 (2): 165~169
- [4] 郭鲁宏,杨顺楷.黑曲霉单宁酶高活性菌株的诱变选育.微生物学通报, 2000, 27 (2): 105~108

- Guo L H, Yang SH K. *Acta Microbiologica Sinica*, 2000, 27 (2): 105 ~ 108
- [5] 刘如石, 谢达平, 李清明, 等. *Asp niger* Na 3 液态发酵生产单宁酶条件的研究. *食品科学*, 2001, 22 (2): 28 ~ 32
- Liu R SH, Xie D P, Li Q M, et al. *Food Science*. 2001, 22 (2): 28 ~ 32
- [6] 龚加顺, 肖琳, 姚建铭. 单宁酶高产菌株发酵条件研究. *西南农业大学学报*, 1999, 21 (5): 433 ~ 436
- Gong J SH, Xiao L, Yao JM. *Journal of Southwest Agricultural University*. 1999, 21 (5): 433 ~ 436
- [7] 李育阳. 基因表达技术. 北京: 科学出版社, 2002
- Li Y Y. *Gene Expression Technology*. Beijing: Science Press, 2002
- [8] 何月秋. 真菌菌丝体培养和提取 DNA 方法的改进. *菌物系统*, 2000, 19 (3): 434 ~ 434
- He Y Q. *Mycosystema*, 2000, 19 (3): 434 ~ 434
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1996
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ed. Beijing: Science Press 1996
- [10] Contreras R, Carrez D, Kinghom J R, et al. Efficient KEX2 - like processing of a glucoamylase - interleukin - 6 - fusion protein by *Aspergillus nidulans* and secretion of mature interleukin - 6. *Biotechnology*, 1991, 9: 378 ~ 381
- [11] 王征, 谢达平. 单宁酶活力测定方法的研究. *生物技术*, 2000, 10 (6): 40 ~ 42
- Wang ZH, Xie D P. *Chinese Biotechnology*, 2000, 10 (6): 40 ~ 42
- [12] 苏二正, 夏涛, 张正竹. 单宁酶的研究进展. *茶业通报*, 2004, 26 (1): 16 ~ 21
- Shu E ZH, Xia T, Zhang ZH Z. *Journal of Tea Business*, 2004, 26 (1): 16 ~ 21
- [13] Batra A, Saxena R K. Potential tannase producers from the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. *Process Biochemistry*, 2005, 40 (5): 1553 ~ 1557
- [14] Conesa A A, Punt J P, Cees A M J J, et al. The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. *Fungal Genetics and Biology*, 2001, 33: 155 ~ 171
- [15] Aguilar C N, Augur C, Favela-Torres E, et al. Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid - state fermentation: influence of glucose and tannic acid. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2001, 26 (5): 296 ~ 302

Cloning and Expressing of Tannase Gene from *Aspergillus oryzae* in *Aspergillus niger* ST31

HUANG Xiao-feng¹ WEI Yu-tuo^{1,2} WEI Chuan-dong¹ DU Li-qin¹
PANG Zhong-wen^{1,2} HUANG Ri-bo^{1,2}

(1 Life Science and Technology Academy of Guangxi University Nanning 530005, China)

(2 Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bioresource Conservation and Utilization Nanning 530005, China)

Abstract It is the first time to research about expression of heterologous tannase gene using *Aspergillus niger* expression system. The gene encoding Tannase was cloned from *A. oryzae* by PCR. After tannase was sequenced, expression vector ANEP2-SP2 - tan was constructed and was transformed into *A. niger* ST31 by protoplast transformation. Then, assaying of recombinant tannase activity were done. So, a novel recombinant *Aspergillus* strain containing tannase gene was obtained. Maximal tannase activity was 104.02 U/ml. It is as 2 to 3 times as the original strain. Based on the study, high efficient transformation system of *A. niger* is constructed and applied latitude of *A. niger* expression system was broadened. It is also useful for further working in research of new enzymes.

Key words Tannase *Aspergillus niger* ST31 Cloning Expression