

# 黑曲霉糖化酶高产株糖化酶cDNA的合成、克隆和序列分析

唐国敏 徐雁漪\* 龚辉 钟丽婵 杨开宇

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

从黑曲霉糖化酶高产株T21分离总Poly(A)<sup>+</sup>RNA, 经反转录合成cDNA, 建立cDNA库。以糖化酶基因片段为探针从cDNA库进行筛选, 阳性率达1.6%。由限制酶酶切图谱确定30%的阳性克隆携带全长的糖化酶cDNA。序列分析结果表明, 菌株T21虽经多次诱变获得, 但糖化酶基因编码区序列与文献报道的黑曲霉糖化酶基因编码区序列一致。从菌株T21构建的cDNA库中含糖化酶cDNA插入片段的克隆的高比率充分证明, 菌株T21中稳态糖化酶mRNA含量很高, 显然这是突变株T21糖化酶高产的重要原因之一。

**关键词** 黑曲霉; 糖化酶; cDNA合成; 序列测定; mRNA含量

黑曲霉是重要的工业用丝状真菌, 它所产生的糖化酶比较耐热、耐酸和稳定, 可溶性淀粉水解率达100%。因此, 国际上已有把曲霉糖化酶基因引入酒精酵母, 构建能水解淀粉的酵母工程菌的报道<sup>[1]</sup>。此外, 近10年丝状真菌转化系统的建立, 为研究丝状真菌基因表达调控提供了技术上的可能, 1990年发表了第一篇在分子水平上研究糖化酶基因表达调控的初步报道<sup>[2]</sup>。本文叙述黑曲霉糖化酶高产株糖化酶cDNA的合成、克隆及其序列分析。

## 材料与 方法

### (一) 菌株和质粒

黑曲霉T21(*Aspergillus niger* T21)为本所经连续诱变黑曲霉获得的糖化酶高产菌株。大肠杆菌DH5和大肠杆菌JM101均为本组保存。噬菌体M13 mp19由本所技术室提供。检测糖化酶cDNA的探针质粒pCAMG91系丹麦NOVO公司惠赠。

### (二) 试剂和酶

异硫氰酸胍为Merck产品, 盐酸胍为

Sigma产品。限制酶分别为华美生物工程有限公司、Promega、Biolabs和Boehringer Mannheim产品。Oligo(dT)-纤维素、cDNA合成试剂盒、切口平移试剂盒、末端转移酶、牛肠碱性磷酸酯酶均为Boehringer Mannheim公司产品。带polydG尾pBR322为BRL产品, T4DNA连接酶为Biolabs产品,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP为Dupont产品。

### (三) 方法

1. Poly(A)<sup>+</sup>RNA的分离: 淀粉诱导的*A.niger* T21培养物在液氮下用石英砂研磨, 然后用修改的Chirgwin法抽提总RNA<sup>[3]</sup>, 再按Maniatis等的方法分离poly(A)<sup>+</sup>RNA<sup>[4]</sup>。

2. cDNA库构建: cDNA合成按Boehringer Mannheim cDNA合成试剂盒产品说明书推荐的方法进行, 双链cDNA加polydC尾、与含polydG尾的

本文于1992年1月28日收到。

\* 北京师范大学生物系代培硕士研究生。

本所技术室王永力等同志协助序列分析, 苑兰翠同志协助照片拍摄和洗印, 毛仁焱、扈芝香等同志协助部分实验工作, 一并致谢。

pBR 322 退火、转化 *E. coli* DH 5 建立 cDNA 库等一系列操作均按文献〔4〕进行。

3. 探针制备: DNA 片段回收按文献〔4〕进行, 标记<sup>32</sup>P 按 Boehringer Mannheim 切口平移试剂盒产品说明书推荐的方法进行。

4. Northern 印迹试验, 菌落原位杂交, 质粒 DNA 抽提, 限制酶酶切图谱分析均按文献〔4〕进行。

5. DNA 序列测定: 按 Sanger 等的双脱氧核苷酸法, 在 ABI 公司 DNA 序列分析仪 Model 370 A 上进行。

6. RNA 变性电泳和银染: RNA 的乙二醛变性按文献〔4〕进行。变性电泳按 Peacock 文献报道在 2.5% 聚丙烯酰胺和 0.5% 琼脂糖的混合胶上进行〔5〕, 硝酸银染色按文献〔6〕进行。

## 结果与讨论

### (一) Poly(A)<sup>+</sup>RNA 的分离

从 6.5g 湿菌体分离到 7.3mg 总 RNA, 经 oligo(dT)-纤维素柱层析得到 113μg 总 poly(A)<sup>+</sup>RNA。紫外扫描结果,  $OD_{260}/OD_{280} = 2.14$ ,  $OD_{260}/OD_{230} = 2.28$ , 表明所分离的 poly(A)<sup>+</sup>RNA 具有相当高的纯度。总 RNA 和总 Poly(A)<sup>+</sup>RNA 经变性电泳和硝酸银染色所得图谱呈现不连续的狭窄的核酸区带, 表明样品中 RNA 没有被 RNase 降解。Northern 印迹试验看出只在 18S 和 28S 之间靠近 18S 处有一条阳性带(图 1), 与文献报道的糖化酶 mRNA 的试验结果一致, 由此判断所分离的 poly(A)<sup>+</sup>RNA 中含有完整的糖化酶 mRNA。

### (二) cDNA 的合成和克隆

1ml poly(A)<sup>+</sup>RNA (~2, 2μg), 以

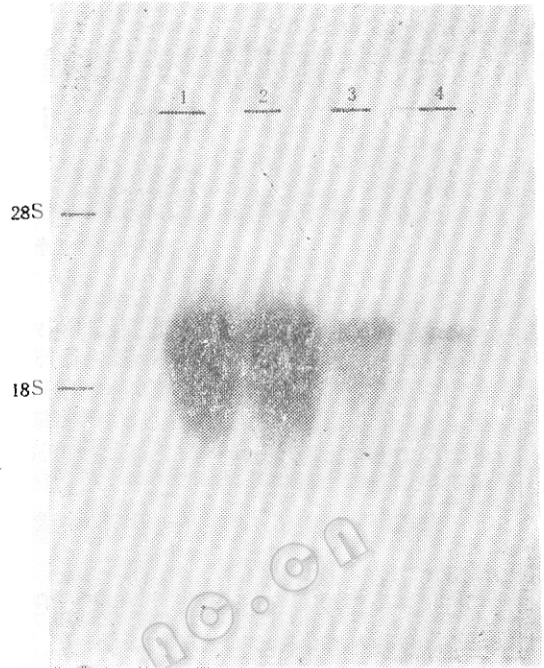


图 1 总 RNA 和 poly(A)<sup>+</sup>RNA 的转移杂交分析  
Fig.1 Northern transfer hybridization of total RNA and poly(A)<sup>+</sup>RNA  
1.and 2.Poly(A)<sup>+</sup>RNA; 3.and 4.Total RNA

oligo(dT)<sub>12-15</sub> 为引物经反转录酶作用合成单链 cDNA, 再经 DNA 聚合酶 I 和 RNaseH 作用合成双链 cDNA。按 TCA 沉淀中同位素掺入计算, 单链和双链 cDNA 的合成效率分别为 23.8% 和 100%。碱性电泳和放射自显影结果表明合成的单链 cDNA 长度从约 300nt 到 5000nt 以上, 并在近 2300nt 处有一条明显的显影带(图 2)。以上合成的双链 cDNA 经末端转移酶作用添加 poly(dC) 后, 直接克隆到在 PstI 位点上带有 poly(dG) 的 pBR322 上。

### (三) 糖化酶 cDNA 克隆的筛选和限制酶酶谱分析鉴定

用从质粒 pCAMG91 分离回收的糖化酶结构基因中部 PstI-BamHI 片段为探针, 从第一批近 1200 个 Tet<sup>r</sup> 转化子中筛选到 20 个阳性克隆。根据 PstI 和 KpnI 酶

切结果，参照已知的黑曲霉糖化酶基因序列，确定其中 6 个阳性克隆携带全长的糖化酶cDNA的插入片段，约为 2.2kb (图 3)。取重组质粒pGLA5作了详细的限制酶谱分析，结果表明所有酶切产生的片段数和片段长均与预期的相符(图 4)。进一步用PstI酶切，分离插入片段，由于糖化酶cDNA本身含有一个PstI切点，因此回收得到 5' 端和 3' 端两个片段。分别对两个回收片段作酶谱分析，所有结果又均与预期的一致(图略)，由此进一步证明 pGLA5含有全长的曲霉糖化酶 cDNA。

**(四)两种糖化酶cDNA的存在**

Boel 等曾从 *A.niger* 的 poly(A)<sup>+</sup> RNA 合成了两种cDNA，并认为它们分别对应于糖化酶同功酶 I 和糖化酶同功酶

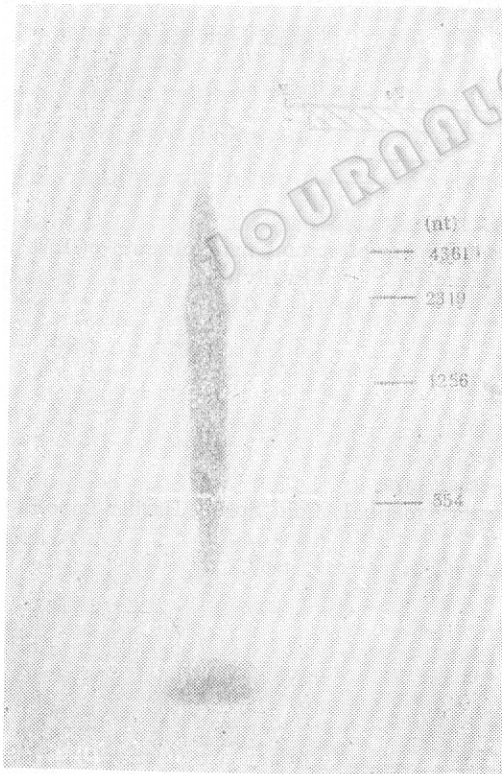


图 2 从总RNA合成的单链cDNA链的放射自显影图

Fig.2 Autoradiogram of single stranded cDNA synthesized from total RNA

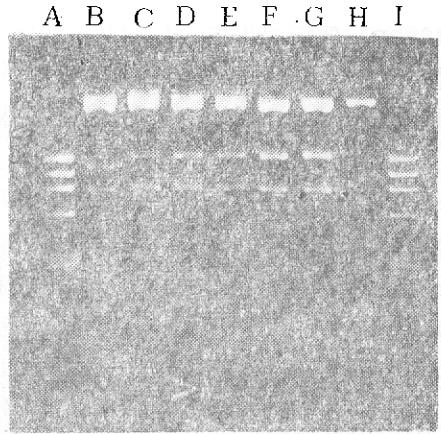


图 3 6个重组质粒DNA用PstI酶解的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of PstI digested recombinant plasmid DNA  
A.and I.  $\phi$ X174-HaeIII Digest;  
B.pGLA1-PstI-digest; C.pGLA3-PstI digest;  
D.pGLA5-PstI digest; E.pGLA6-PstI digest;  
F.pGLA9-PstI digest; G.pGLA12-PstI digest;  
H.pBR322-PstI digest

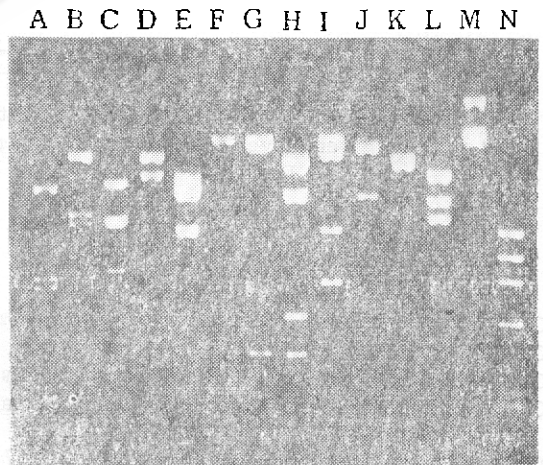


图 4 重组质粒pGLA5的限制酶图谱

Fig.4 Restriction endonuclease map of the recombinant plasmid pGLA5

A.Markers:2319,931,879bp;  
B.Markers:3985,2670,1692,1545,1125,377bp;  
C.Accl digest; D.BamHI digest; E.BglII digest;  
F.HindIII digest; G.KpnI digest; H.NruI digest;  
I.PstI digest; J.PvuII digest; K.Sall digest;  
L.SnaI digest; M.XmnI digest; N. $\phi$ X174-HaeIII digest

II, 因两种cDNA 仅在编码区近C端处相差169bp, 他们提出假设糖化酶II mRNA是糖化酶I mRNA经转录后加工产生的, 即把糖化酶I mRNA中169bp的一段作内含子剪切掉后生成的<sup>[7]</sup>。我们从*A.niger* T21的总 poly(A)<sup>+</sup>RNA也合成了两种cDNA, 用BamHI-SalI双酶切时, 较长的cDNA产生约370bp的片段, 但较短的cDNA链产生约200bp的片段, 且短型cDNA丢失了结构基因中唯一的PvuII酶切点, 与Boel报道的结果类似。序列分析结果(数据资料略)进一步证明我们所合成的糖化酶短型cDNA与Boel所报道的完全一致。这为下一步研究黑曲霉糖化酶同功酶形成机制及糖化酶结构与生淀粉水解功能的关系提供了素材。

#### (五) 糖化酶cDNA的序列分析

pGLA5插入片段的序列测定按图5

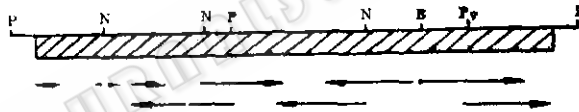


图5 重组质粒pGLA5中PstI插入片段的序列测定方案

Fig.5 Strategy employed to sequence the inserted fragment of recombinant plasmid pGLA5  
P, PstI; N, NruI; B, BamHI; Pv, PvuII

#### 参 考 文 献

- [1] Cole, G. E. et al.: *Bio/Technology*, 6:417-421, 1988.
- [2] Fowler, T. et al.: *Curr. Genet.*, 18:537-545, 1990.
- [3] Chirgwin, J. M. et al.: *Biochemistry*, 24:5294-5299, 1979.
- [4] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [5] Peacock, A. C. and Dingman, C. W.: *Biochemistry*, 7:668-674, 1968.
- [6] Merrill, C. R.: *Science*, 211:1437-1438, 1981.
- [7] Boel, E. et al.: *EMBO J*, 3:1097-1102, 1984.

所示的方案进行。由序列测定结果看出:  
1. 黑曲霉糖化酶高产菌株T21虽经多次诱变, 但糖化酶基因的编码区序列与Boel等报道的黑曲霉糖化酶基因编码区序列完全一致; 2. Boel的糖化酶基因的翻译终止密码是TGA, 在T21中糖化酶基因翻译终止序列为TAGA..., 即在T和G间增加了一个A, 这一改变有否意义尚不清楚。

我们从总 poly(A)<sup>+</sup>RNA构建的cDNA库中获得含糖化酶cDNA插入片段的克隆的比率高达1.6%, 这一事实充分证明, *A.niger* 突变株T21中稳态糖化酶mRNA含量非常高, 显然这是菌株T21糖化酶高产的重要原因之一。至于造成菌株中很高的糖化酶mRNA含量的原因是突变株T21中糖化酶基因拷贝数增加, 还是糖化酶基因转录水平提高, 或两个因素同时存在, 这个问题我们正在研究中。

## Synthesis, Cloning and Sequencing of Glucoamylase cDNA from *Aspergillus niger* T21

Tang Guomin Xu Yanyi Gong Hui Zhong Lichan Yang Kaiyu  
(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Poly(A)RNA was isolated from *Aspergillus niger* T21, a glucoamylase overproducing strain and was used as template to synthesize double stranded cDNA. A cDNA bank was then constructed. The *E. coli* transformants were screened for the glucoamylase cDNA by in situ colony hybridization with  $^{32}\text{P}$ -labeled fragment of glucoamylase gene as probe. The positive rate was 1.6% and 32% of the positive clones were identified by restriction analysis to carry the inserts of full length, 2.1kb, glucoamylase cDNA. Sequence of the glucoamylase cDNA was determined and the result showed that the sequence of glucoamylase gene of the mutant *A. niger* T21 was the same with that reported previously. The high rate of glucoamylase cDNA containing clones in the cDNA bank of strain T21 provided evidence of high steady state level of glucoamylase mRNA in mycelium of mutant T21. Obviously, it is one of the major reasons for the high glucoamylase productivity of mutant T21.

**Key words:** *Aspergillus niger*; glucoamylase; cDNA synthesis; sequencing; mRNA level