

黑曲霉糖化酶 cDNA 的改造及其在酿酒酵母中的表达

李文清 罗进贤 叶若邻 徐柏年

(中山大学生命科学学院 广州 510275)

摘要 应用 PCR 技术扩增黑曲霉糖化酶 cDNA 不含非编码区 50bp 的 5' 端 740bp 的序列与该 cDNA 3' 端 1400bp 的序列连接, 获得切除了 5' 端非编码的糖化酶 cDNA。将改造后的 cDNA 插到质粒 pMA91 的酵母 PGK 基因的启动子和转录终止信号之间, 构建了含黑曲霉糖化酶基因的表达载体 pMAG17。用原生质体转化法将重组质粒 pMAG17 引入酿酒酵母 GRF18。酿酒酵母 GRF18 转化子在淀粉平板上产生水解透明圈, 表明糖化酶已在酵母中表达并分泌至培养基中。测定转化子的胞外酶活力及淀粉水解率。结果表明: 改造后的糖化酶基因在酵母中的表达、分泌水平及水解淀粉的能力都高于未改造的基因。

关键词 黑曲霉糖化酶, 基因改造, 表达和分泌, 酿酒酵母, 淀粉水解

分类号 Q93-933

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 是传统的工业生产菌, 广泛应用于酒精、饮料酒和单细胞蛋白的生产。但由于它缺乏水解淀粉所需的酶类, 不能直接利用淀粉作底物。淀粉需先经糊化、液化和糖化等步骤变成糖后才能被酵母利用, 发酵工艺复杂, 能源消耗较大。采用基

因重组技术构建能直接利用淀粉的酵母菌种将可简化工序, 减少设备投资, 节约能源和酶制剂, 对于充分利用自然界丰富的淀粉资源, 改造

广东省自然科学基金资助

1997-05-19 收稿

传统的发酵产业有重要的意义和应用前景。80年代以来国外多个实验室曾将泡盛曲霉、米根霉、米曲霉等的糖化酶基因引入酿酒酵母获得表达^[1~4]，我们曾将黑曲霉糖化酶 cDNA 引入酿酒酵母，获得表达和分泌^[5~6]，报道采用 PCR 技术改造糖化酶的 cDNA，去除其 5' 端的非编码区后转化酿酒酵母，提高基因的表达和产物的分泌水平及水解淀粉的能力。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: 大肠杆菌 GM119 是甲基化酶缺陷菌株，作为转化受体菌以克服质粒转化 C600 等带甲基化酶菌株后 BclII 识别位点 5'-GATC-3' 上腺嘌呤 N6 原子被甲基化而不能切割的难题。C600 及 GM119 均为本室保藏菌株。酿酒酵母 GRF18 (*leu2*, *his3*, *sta*, *hn*) 由 Hollerburg 博士惠赠。pMA91 是带有酵母磷酸激酶 (Phosphoglycerate Kinase, PGK) 基因启动子和转录终止信号的大肠杆菌-酵母穿梭质粒由广东省微生物研究所提供。pPL2-cDNA 为本课题构建的含黑曲霉糖化酶 GAI cDNA 的大肠杆菌质粒^[5]。

1.1.2 培养基: 大肠杆菌的培养和转化用 LB 培养基，酵母的培养和原生质体转化所用的培养基有 YPD、YPSB、YPGE、YNB、SC、SORB、SOS 及 SSTOP 它们的配方见文献 [6]。

1.1.3 主要试剂: 限制酶 BamHI, BclII, BglII, EcoRI, HindIII, PstI, T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司或华美生物工程公司，低熔点琼脂糖，RNaseA 等为 Sigma 公司产品。Taq DNA 聚合酶为 Promega 公司的产品。

1.2 方法

1.2.1 引物合成: 按实验要求设计，用 DNA 合成仪合成。

1.2.2 PCR 反应: 按文献 [7] 的方法，反应体系先在 94℃ 变性 5min，52℃ 退火 2min，72℃ 延伸 2min 完成第一循环，连续反应共 30 个循环。

1.2.3 质粒的检测和制备: 大肠杆菌质粒的检测和制备按 Sambrook 的方法^[7]，酵母质粒的检

测按文献 [8] 的方法。

1.2.4 DNA 的酶解, 酶解片段的回收, DNA 的连接和大肠杆菌转化: 参照文献 [7] 的方法。

1.2.5 原生质体转化: 按 Burgers 的方法^[9]。

1.2.6 糖化酶阳性菌落的检测和酶活力的测定: 按文献 [5] 的方法进行。一个酶活力单位定义为在 pH6.0, 60℃ 的条件下每小时酶促生成 1mg 葡萄糖的酶量。

1.2.7 剩余淀粉含量及重组质粒稳定性检测: 培养液中剩余淀粉的测定和重组质粒在酿酒酵母工程菌中的稳定性检测参照 Kim 的方法^[10]。

2 结果和讨论

2.1 黑曲霉糖化酶 cDNA 的改造

黑曲霉糖化酶 GAI cDNA 全长 2.1kb 它包括 5' 端及 3' 端的非编码区，编码区及 3' 端的 polyA。为了缩短起始密码 ATG 与启动子之间的距离，减少 5' 端非编码区可能形成的 RNA 二级结构对基因表达造成的影响，设想通过 PCR 除去 5' 端的非编码区对糖化酶 GAI cDNA 进行改造，即采用 PCR 扩增一段不含 50pb 非编码区的 GAI cDNA 5' 端的 0.74kb 序列，然后与 GAI cDNA 3' 端的 1.4kb 序列连接以获得完整的不含 5' 端非编码区的 GAI cDNA。

2.1.1 PCR 引物的合成: 为了扩增不含 5' 端非编码区的一段 740bp 的 GAI cDNA，设计了如下两个引物。

5' 端引物: 5'-CGGGATCC TGATCAATGTCTTC CGA TCT CTA-3'

BamHI BclII
 PstI

3' 端引物: 5'-TCC AGA AGG ACT GCA G GTA-3'

5' 端引物上加了 BamHI 与 BclII 两个酶切位点，便于与 PGK 基因启动子 3' 端的 BglII 位点相连接；3' 端引物则与模板完全配对，图中斜体部分表示与 GAI cDNA 配对序列。

2.1.2 PCR 扩增 GAI cDNA 3' 端 740bp 片段: 以黑曲霉糖化酶 GAI cDNA 作模板，以合成的两段序列作引物，按材料与方法中介绍的条件，

```

          BamH I Bcl I 50          60          70          80
          CCGGATCC TGATCAATGTCGTTCCGATCTCTACTCGCCCTGAGCGGC
          110BssH II 120          130          140          150          160
CTCGTCTGCACAGGGTTGGCAAATGTGATTTCCAAGCGCGACCTTGGATTTCATGGTTGAGCAACGAAGCGACCGTGGC
170          180          190          200          210          220          230          240
TCGTACTCCCATCCTGAATAACATCGGGCCGACGGTGTCTGGCTGTCGGGCGCGGACTCTGGCATTGTCGTTGCTAGTC
250          260          270          280          290          300          310          320
CCAGCAGGATAACCCGGACTACTTCTACACCTGGACTCGGACTCTGCTCTCGTCTCAAGACCCTCGTCGATCTCTTC
330          340          350          360          370          380          390          400
CGAAATGGAGATACCACTCTCCTCTCCAACATTGAGAATACATCTCCGCCAGGCAATTGTCCAGGGTATCAGTAACCC
410          420          430          440          450          460          470          480
CTCTGGTGATCTGTCCAGCGGCTGGTCTCGGTGAACCCAAGTTCAATCTCGATGAGACTGCCTACACTGGTCTTGGG
490          500          510          520          530          540          550          560
GACGGCCGACGAGATGGTCCGGCTCTGAGAGCAACTGCTATGATCGGCTTCGGGCAGTGGCTGCTTGACAATGGCTAC
570          580          590          600          610          620          630          640
ACCAGCACCGCAACGCCATTGTTGGCCCTCGTTAGGAACGACCTGTCGTATGTGGCTCAATACTGGAACCAGACAGG
650          660          670          680          690          700          710          720
ATATGATCTCTGGGAAGAAGTCAATGGCTCGTCTTTCTTTACGATTGCTGTGCAACACCGCCCTTGTGGAAGGTAGTG
730          740          750          760          770          780          790 Pst I
CCTTCGCGACGGCCGTCGGCTCGTCTGCTCTGCTGTTGATTCTCAGGCACCCGAAATCTCTGCTACCTGCAG
    
```

图1 PCR扩增后DNA序列分析结果

用 PCR 反应扩增 GAI cDNA 的 3' 端。反应产物经琼脂糖凝胶电泳分析和 DNA 序列测序证明合成的是一段 740bp 的 DNA 序列, 包括 5' 端的 BamHI, BclII 及 3' 端的 PstI 酶切位点及从 ATG 开始的 GAI cDNA 3' 端的编码序列。DNA 序列分析结果如图 1。

2.1.3 不含 5' 端非编码区的 GAI cDNA 的克隆: 用 BamHI, PstI 消化 PCR 产物, 然后与经 BamHI 和 PstI 双酶切的质粒 pBluescriptskII 连接, 得到含 740bp PCR 片段的重组质粒 pBluescriptskII-GAI, 并从质粒 pPL2-cDNA 上用 EcoRI, PstI 切出约 1.4kb 的糖化酶 cDNA 的 3' 端, 接到 pBluescript-GAI 上的 PstI, EcoRI 位点之间, 获得含完整糖化酶 GAI cDNA 的重组质粒 pBluescript-cDNA。从图 2 的电泳结果显示, pBluescriptskII-GAI 经 BamHI 酶切得到一条 3.6kb 的带, BamHI, EcoRI 双酶切得到 2.9kb 及 0.7kb 的两条带。显示 0.7kb 的 PCR 片段已插入 pBluescript skII(2.9kb), 而 pBluescript-cDNA 经 PstI, EcoRI 双酶切获得 3.6kb 及 1.4kb 的两条带, 证明 1.4kb 的糖化酶 3' 端已插入 pBluescript-GAI。

2.2 含GAI cDNA 的酵母表达载体的构建

为使改造后的黑曲霉糖化酶 GAI cDNA 在酵母中表达, 将其引入大肠杆菌-酵母质粒 pMA91。用 BclII 从质粒 pBluescript-cDNA 上切

下 2.1kb 的 GAI cDNA 与 BglII 酶解的质粒 pMA91 以适当比例混和后用 T4 DNA 连接酶连接, 获得含糖化酶 GAI cDNA 的重组质粒 pMAG17。pMAG17 与载体 pMA91 同时用 HindIII 酶切, 发现 pMA91 产生 4.3, 3.3 及 1.8kb 3 条带, 其中 1.8kb 是 PGK 的启动子和转录终止信号, 重组质粒 pMAG17 也产生 3 条带, 除 4.3 及 3.3kb 两条带外还有一条 3.9kb 的带, 是在启动子和终止信号之间插入了 2.1kb 的 GAI cDNA 的结果(图 2)。

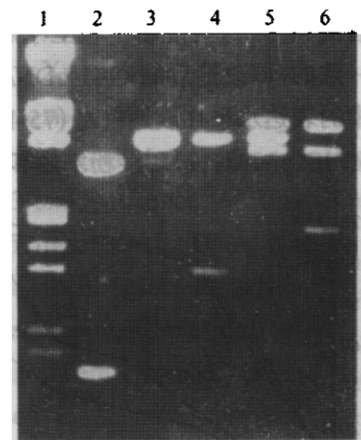


图 2 质粒 pBluescript-GAI, pBluescript-cDNA 及 pMAG17 的酶切电泳图

1.λ / HindIII + EcoRI; 2.pBluescript-GAI / BamHI + PstI; 3.pBluescript-GAI / BamHI; 4.pBluescript-cDNA / PstI + EcoRI; 5.pMAG17 / HindIII; 6.pMA91 / HindIII

2.3 GAI cDNA 在酵母中的表达和产物分泌

采用原生质体转化法,将重组质粒 pMAG17 连同载体 pMA91 分别转化酿酒酵母 GRF18,在不含亮氨酸的 SORB 再生培养基上挑选转化子,转点于含 30% 可溶性淀粉的 YPSB 培养基上,同时点 GRF18 (pMAG69) 及受体菌 GRF18 作对照。于 30℃ 培养 4~6d,4℃ 放置 1~2d 即可在 GRF18 (pMAG17) 及的菌落周围出现透明的淀粉水解圈而在 GRF18 及 GRF18 (pMA91) 菌落周围则看不见透明圈,表明改造后的 GAI cDNA 已在酿酒酵母中表达并向胞外分泌糖化酶,而且 GRF18 (pMAG17) 形成的透明圈比 GRF18 (pMAG69) 大,显示前者分泌的胞外酶可能比后者高。

为了进一步比较糖化酶在构建的酿酒酵母工程菌中的表达和分泌情况,挑取 GRF18 (pMAG17) 单菌落并以 GRF18 (pMAG69) 作对照,接种于含 30μg/ml 组氨酸和 2% 葡萄糖的 SC 培养基中,30℃ 振荡培养 60h,离心收集菌体,经无菌水悬洗两次后转至 YPGE 液体培养基中,30℃ 培养 5d,离心收集上清,用 DNS 法测定胞外糖化酶活力并将沉淀菌体经蜗牛酶-超声波破壁后测定胞内酶活力,图 3 的结果表明 GRF18 (pMAG17) 及 GRF18 (pMAG69) 99% 的表达产物都分泌至胞外,但前者的表达/分泌水平比后者高得多,这与淀粉平板上水解圈大小的差异是一致的,即改造后的 GAI cDNA 在构建的工程菌中的表达水平比改造前高(75:1%)。

2.4 GRF18(pMAG17)对淀粉水解和利用

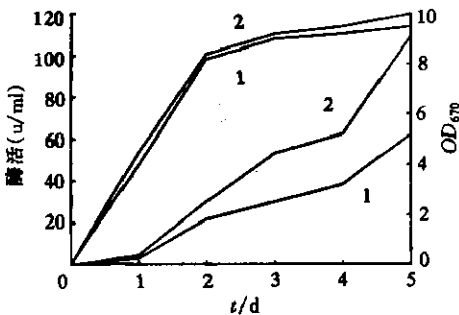


图3 重组酵母的生长和产酶曲线
1.GRF18 (pMAG69); 2.GRF18 (pMAG17)

为了解酿酒酵母 GRF18 (pMAG17) 水解和利用淀粉的能力,挑取 GRF18 (pMAG17) 单菌落并以 GRF18 (pMAG69) 作对照,接种于含 30μg/ml 组氨酸的 SC 培养基中,30℃ 培养 60h 后水解菌体,再转接至含 12% 马铃薯淀粉的 YPS 培养基中,30℃ 振荡培养,定时取样,测 OD₅₇₀ 及淀粉残留量以了解酵母的生长和淀粉的水解情况,发现经 2d 培养,GRF18 (pMAG17) 可水解培养基中 90% 的淀粉,而在相同条件下 GRF18 (pMAG69) 的水解率为 87%。

GRF18 (pMAG17) 在 SC 培养液中培养 40h 后转接含 10% 淀粉的 TPS10 培养基中 2d 后定时取样测定发酵液中的酒精浓度,结果如图 4。从图上可见,GRF18 (pMAG17) 在 10% 淀粉中培养 3d,发酵液中酒精浓度就达到 5.0%,6d 可达 5.6% 而 GRF18 (pMAG69) 为 5.2,提高 7%。

以上结果表明,经过改造的黑曲霉糖化酶 GAI cDNA 在酿酒酵母中不仅表达和酶的分泌水平有所提高,而且水解淀粉和酒精发酵的能力也相应增强。

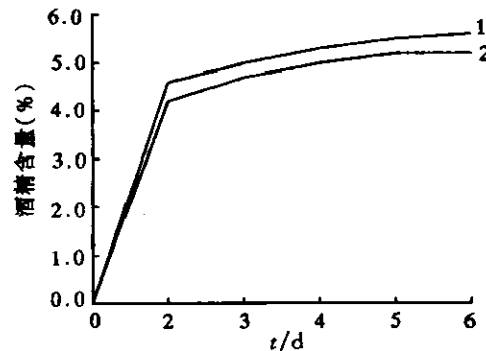


图4 重组酵母的酒精发酵
1.GRF18 (pMAG17); 2.GRF18 (pMAG69)

2.5 重组质粒 pMAG17 在 GRF18 中的稳定性

为了检测构建的酵母工程菌 GRF18 (pMAG17) 的稳定性,取 GRF18 (pMAG17) 单菌落接种于 YPD 完全培养基中在无选择压力的条件下,30℃ 连续培养 5d 后,取样涂平板,分离单菌落点种于不含亮氨酸的 SC 选择培养基中及 YPD 完全培养基上,30℃ 培养 2d,在 YPD 培养基上生长而在 SC 培养基上不能生长者即

为重组质粒丢失的菌落。实验结果显示在386个测试菌落中只有两个丢失质粒,丢失率为0.05%,说明质粒pMAG17可以在构建的工程菌中稳定地存在。

报道应用PCR技术去除黑曲霉糖化酶GAI cDNA 5'端非编码区50bp序列,改造后的GAI cDNA转化酿酒酵母GRF18后,基因表达和产物分泌及淀粉水解水平都有所提高,以12%的马铃薯淀粉作底物,2d内能水解培养基中90%的淀粉。水解产物可被用来发酵酒精,酒精含量达到5.6%。

我们曾将黑曲霉糖化酶GAI的完整cDNA引入酿酒酵母,在酵母PGK基因的启动子及转录终止信号及cDNA本身的信号序列调控下获得表达和产物的分泌。本研究将GAI cDNA用PCR技术改造以后重新引入酿酒酵母,在相同的调控元件的调节下获得较高的表达,同时提高了水解淀粉的能力。改造后的GAI cDNA缺少了ATG前面的50bp长的序列,从而缩短了PGK启动子与ATG之间的距离,有利于基因的转录,此外50bp序列转录成RNA后可能出现的二级结构也可能会给翻译带来不利的影

响。因此,除去ATG上游的非编码区有助于提高GAI cDNA的转录水平。

参 考 文 献

- [1] Innis, M. A., Holland, K. J., McCade, P. C., et al. Science, 1985, 228: 21~26.
- [2] Cole, G. E. Peter C. McCade P. C. et al. Bio/Technology, 1988, 6: 417~421.
- [3] Ashikari T. Nakamura N. Tanaka Y. et al. Agric. Biol. Chem. 1986, 50: 957~964.
- [4] Hata Y. K., Kitamoto K., Gomi K. et al. Agric. Biol. Chem. 1991, 55: 941~947.
- [5] 李文清, 黎杨, 罗进贤. 中山大学学报, 1992, 31(3): 1~7.
- [6] 李文清, 何鸣, 罗进贤. 中国科学(B辑), 1994, 24(9): 943~947.
- [7] Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. J., Mol. Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.
- [8] Kaiser C., Michaelis and Mitchell A. Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Lab. New York, 1994.
- [9] Burges P. M. and Percival K. J. Anal. Biochem. 1987, 163: 391~397.
- [10] Kim K., Chang S. Park and Mattoon J. R. Appl. Environm. Microbiol. 1988, 54: 966~971.

MODIFICATION OF GLUCOAMYLASE GAI cDNA OF *A. NIGER* AND ITS EXPRESSION IN *S. CEREVISIAE**

Li Wenqing Luo Jinxian Ye Ruoling Xu Bainian

(School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou, 510275)

Abstract The 0.74kb 5' end fragment without noncoding region from *A. niger* glucoamylase GAI cDNA was amplified by PCR technique. The 1.4kb 3'end sequence of that cDNA was separated and ligated to the 0.74kb PCR fragment resulting in intact GAI cDNA with the 5' end noncoding region being deleted. The modified cDNA was then inserted between the PGK promoter and terminator on plasmid pMA91, and the recombinant plasmid pMAG17 was transformed to *S. cerevisiae* GRF18. Starch-degrading halos were formed around the yeast transformants, indicating that glucoamylase cDNA was expressed in *S. cerevisiae* and the enzyme secreted into culture medium. The glucoamylase activity and amyolytic were determined. The results show that the expression and secretion level of the modified cDNA and the amyolytic capability of the engineered yeast strain are higher than those of the strain with cDNA.

Key words *A. niger* glucoamylase, gene modification, expression and secretion, *S. cerevisiae*, starch hydrolysis