

黑曲霉木聚糖酶基因 *xynA* 的克隆 及真核表达载体的构建*

张茂¹ 刘德武¹ 林纯¹ 贺晓燕¹
孟繁明¹ 周庆丰² 杜云平² 吴珍芳^{1**}

1. 华南农业大学动物科学学院, 广州 510642; 2. 广东省温氏食品集团研究院, 新兴 527400

摘要 从黑曲霉(*Aspergillus niger*) GIM3.452 中克隆得到木聚糖酶基因 *xynA* 的成熟肽编码序列。通过重叠延伸 PCR 将不带原基因信号肽编码序列的 *xynA* 基因片段和猪腮腺分泌蛋白(parotid secretory protein, PSP) 基因的信号肽进行拼接得到融合片段 SPA, 并将其克隆到真核表达载体 pcDNA6/HisTM A 中, 得到重组质粒 pcDNA-SPA, 重组质粒经过酶切、测序鉴定其读码框的正确性, 在脂质体介导下将重组质粒 pcDNA-SPA 转染猪肾细胞(PK15), 通过 RT-PCR 证实其在 PK15 细胞中表达, 并在细胞培养液中检测到木聚糖酶活性为 7.6 IU/mL。

关键词 黑曲霉; 木聚糖酶; *xynA* 基因; 真核表达

中图分类号 S 813 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)05-0588-05

木聚糖属于半纤维素, 广泛存在于植物细胞壁中, 含量仅次于纤维素的第二丰富的天然多糖, 是半纤维素主要组分^[1], 约占细胞干质量的 35%, 是谷物籽实中的主要非淀粉多糖(NSP)之一。木聚糖酶(β -1,4-xylanase)包括外切木聚糖酶(EC3.2.1.7)和内切木聚糖酶(EC3.2.1.8)两大类, 内切木聚糖酶是指通过内切方式专一降解不同结构的木聚糖的一组酶的总称^[2]。木聚糖酶(EC3.2.1.8)在食品、饲料、医药、能源、生物转化、造纸纺织^[3]等行业中有着广泛的应用, 具有很大的商业开发价值。目前使用的木聚糖酶主要是利用米曲霉、黑曲霉、芽孢杆菌和酵母菌等发酵后, 经提取、浓缩等工艺加工而成^[4]。黑曲霉产生的木聚糖酶具有良好的耐酸性, 动物胃肠道内的温度和 pH 值对该木聚糖酶的活性影响不明显, 这使其在畜禽及水产动物饲料中的应用有独特的优势^[5]。

本研究从黑曲霉菌株 GIM3.452 中克隆出 β -1,4-内切木聚糖酶基因 *xynA* 的成熟肽编码序列, 通过重叠 PCR 方法与猪腮腺分泌蛋白(parotid secretory protein, PSP) 基因的信号肽序列进行拼接, 将得到的拼接片段插入到真核表达载体 pcDNA6/

HisTM A 中, 在脂质体介导下成功将带有目的基因的真核表达质粒转入 PK15 细胞, 并通过提取 PK15 细胞中的 RNA, 检测到了 *xynA* 基因的表达, 采用 DNS 法在细胞培养液上清中检测到有木聚糖酶活性, 实现了异源基因分泌表达。现报道如下。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1) 菌株。黑曲霉(*Aspergillus niger*) GIM3.452 购自广东省微生物研究所微生物菌种保藏中心, 基因工程菌 DH5 α 购自宝生物(大连)有限公司。

2) 载体。pMD18-T Vector 购自宝生物(大连)有限公司, pcDNA6/HisTM A 表达载体由广东省温氏集团研究院生物技术研究中心保存。

3) 酶类和主要试剂。PrimeScriptTM One Step RT-PCR Kit、PrimeSTAR HS DNA Polymerase、LA TaqTM、DNA Ligation Kit Ver 2.0、Ex TaqTM 均购自宝生物工程(大连)有限公司; PCR 检测用 Taq 酶购自广州东盛生物科技有限公司; 限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Xho* I 购自 Fermentas 公司; RNA 抽提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒均购

收稿日期: 2009-10-24; 修回日期: 2010-03-26

* 国家“863”项目(2008AA101008)和国家重大专项(2008ZX08006004、2009ZX08006-012B)资助

** 通讯作者。E-mail: wzfemail@163.com

张茂, 男, 1985 年生, 硕士研究生。研究方向: 动物转基因育种。E-mail: zhangmao198518@yahoo

自北京天根生化科技有限公司; Lipofectamine™ 2000 脂质体转染试剂盒购自 Invitrogen 公司。木聚糖、D-木糖购自 Sigma 公司(美国)。引物合成及测序均由上海生工生物技术有限公司完成。

1.2 黑曲霉的液体培养及总 RNA 的提取

配制液体培养基: Sucrose(蔗糖) 30 g, NaNO₃ 3 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.01 g, K₂HPO₄ 1 g, 蒸馏水 1 000 mL, 调 pH 至 6.8, 高压, 冷却, 接种黑曲霉到无菌液体培养基, 30 °C、200 r/min 培养 3 d; 收集菌体进行 RNA 抽提(参照天根植物总 RNA 提取试剂盒说明提取)。

1.3 *xynA* 基因成熟肽编码序列的 RT-PCR 扩增

参照 GenBank 中发表的黑曲霉 *xynA* (XM001389959) 的成熟肽序列设计 2 条特异引物。正向引物 F: 5'-GAGCCATTGAACCCCT-3'; 反向引物 R: 5'-CTAGAGAGCATTTGCGAT-3'。以黑曲霉提取的 RNA 为模板, 用 RT-PCR kit 直接进行 PCR 扩增, 取 RNA 16 μL, 2 × 1 Step Buffer 25 μL, 上下游引物各 1 μL, PrimeScript 1 Step Enzyme Mix 2 μL, 蒸馏水 5 μL, 反应条件为: 50 °C 30 min, 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 1 min 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。取 PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收纯化 PCR 产物, 将回收产物连接到 pMD18-T 载体上, 再将连接产物转化感受态细胞 DH5α, 挑选白色菌落, 进行菌液 PCR, 选择 PCR 检测为阳性的菌液送上海生物工程技术有限公司测序, 进行正反 2 个方向测定。

1.4 融合基因 SPA 的重叠延伸 PCR

猪腮腺分泌蛋白(PSP)基因在唾液腺中特异性高表达^[6], 猪 PSP 基因是研制猪腮腺转基因反应器及进行抗病育种研究的最佳候选基因^[7], 利用猪腮腺分泌蛋白基因的信号肽序列, 与木聚糖酶基因成熟肽编码序列进行重叠延伸 PCR 得到融合基因(命名为 SPA), 以达到 *xynA* 基因能够分泌表达的目的。设计重叠延伸 PCR 引物, 并且在 A1 和 A6 加入酶切位点 *Nhe* I 和 *Xho* I (表 1), 将最后得到的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 然后用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行回收纯化。方法同本文“1.3”, 同样回收产物连接到 pMD18-T 载体上, 筛选阳性克隆送上海生工生物工程技术有限公司进行正反 2 个方向测定。

表 1 重叠延伸 PCR 引物序列
Table 1 Primers of overlap extension PCR

引物编号 Primer No.	引物序列 Primer sequence
<i>Nhe</i> I A1	5'-CTGGCTAGCGTTTAACTTAAGC-3'
A2	5'-CACAAAGAAAACAAGTTTCCAAAGTTGAAACATGGTAAGCTTAAGTTTAAACGCTAGCCA-3'
A3	5'-AACTTTGGAACTGTTTTCTGTGTGCG-GTCTGCTCATTGGGACCTCAGCAGAGCCATT-3'
A4	5'-GCCTGACGGGGTTCAATGGGCTCTGCT-GAGGT-3'
A5	5'-TCAGCAGAGCCATTGAACCCC-3'
<i>Xho</i> I A6	5'-ATACTCGAGCTAGAGAGCATTTGCG-3'

1.5 *xynA* 真核表达载体的构建

用 *Nhe* I 和 *Xho* I 将 SPA 片段释出, 定向克隆到经同样处理的 pcDNA6/His™ A 载体中, 构建重组表达质粒 pcDNA-SPA, 转化 DH5α 后挑选白色菌落, 直接以菌液为模板进行 PCR、琼脂糖凝胶电泳。按质粒提取试剂盒说明提取重组质粒, 以质粒为模板再进行 PCR 扩增、*Nhe* I 单酶切和 *Nhe* I + *Xho* I 双酶切、琼脂糖凝胶电泳检测和鉴定。选择酶切和 PCR 鉴定为阳性的重组质粒送上海生工生物工程技术有限公司测序, 验证重组质粒读码框的正确性。

1.6 阳性重组质粒转染猪肾细胞 PK15 及其表达

将重组质粒 DNA 在脂质体介导下转染 PK15 细胞, CO₂ 培养箱内 37 °C 培养 48 h 后可进行酶活测定。刮取转染后的 PK15 细胞, 12 000 r/min 离心 3 min, 提取 PK15 细胞总 RNA, 以 A5 和 A6 为引物, 进行 RT-PCR 扩增。收集细胞培养液, 12 000 r/min 离心 3 min 后, 取上清, 采用 DNS 法测定重组木聚糖酶的酶活, 以 1% 木聚糖为底物, 反应时间为 10 min, pH 5.0, 温度为 40 °C, 波长为 550 nm^[8]。1 个酶活单位 (IU) 定义为在给定的反应条件下, 以 1 μmol/min 的速度释放出木糖所需的酶量。

2 结果与分析

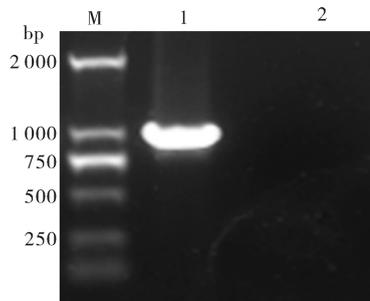
2.1 *xynA* 基因的 RT-PCR 扩增

对 RT-PCR 扩增产物进行凝胶电泳, 结果可见有 1 条大约 927 bp 的特异条带, 与预期的相符。

2.2 *xynA* 基因的克隆及测序鉴定

将测序结果拼接得到 927 bp 的核苷酸序列, 含有 1 个完整的阅读框, 编码 308 个氨基酸, 读码框完

整。与 GenBank 中发表的黑曲霉 *xynA* (XM001389959) 基因的序列进行比对,核苷酸相似性为 99.5%。将测序得到的序列与 GenBank 下载的黑曲霉 β -1,4-内切木聚糖酶的氨基酸序列同源性分别达到 98.7%(XP001389996)、97.7%(ACJ26381)、96.4%(P33559)、96.4%(ACR83565)。



M. DNA marker DL 2 000; 1. *xynA* 基因 RT-PCR 产物 RT-PCR product of *xynA*; 2. 阴性对照 Negative control.

图 1 *xynA* 的 RT-PCR 扩增结果

Fig.1 Amplified product of *xynA* by RT-PCR

对黑曲霉 GIM3.452 木聚糖酶 *xynA* 基因序列与 GenBank 下载的读取的黑曲霉木聚糖酶基因序列进行系统进化树分析,结果如图 2 所示。从系统进化树可以看出,黑曲霉 GIM3.452 木聚糖酶 *xynA* 基因与 XP001389996 亲缘关系最近。

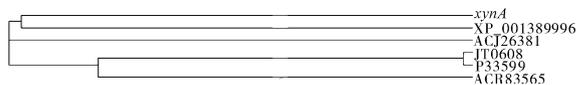
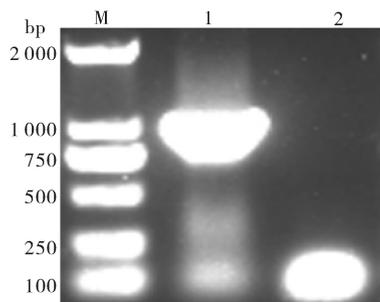


图 2 黑曲霉木聚糖酶基因进化树

Fig.2 Homology tree based on amino acids sequences of *Aspergillus niger* xylanases gene

2.3 融合基因 SPA 序列的克隆及测序鉴定

菌液 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳出现 1 条约 1 021 bp 条带,与预期的片段相符(图 3),测序结



M. DNA marker DL 2 000; 1. SPA 重叠延伸 PCR 产物 Overlap extension PCR product of SPA; 2. 阴性对照 Negative control.

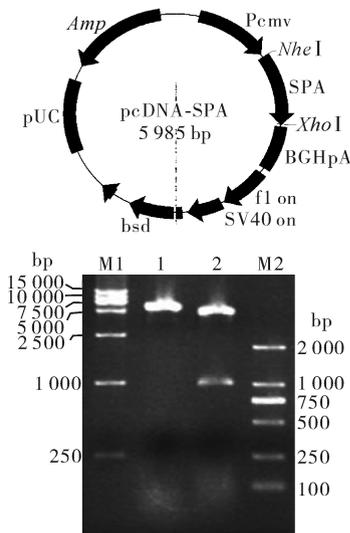
图 3 SPA 的 PCR 扩增结果

Fig.3 Amplified product of SPA by PCR

果得到 1021 bp 的核苷酸序列,含有 PSP 基因的信号肽序列、*xynA* 基因的成熟肽编码序列以及 pcDNA6/His A 载体上的一部分序列。测序结果与目的序列进行比较,相似性为 100%,证明重叠延伸片段正确。

2.4 pcDNA-SPA 重组表达载体的构建

以菌液为模板进行 PCR 扩增得到的产物进行琼脂糖凝胶电泳出现 1 条约 1 021 bp 的特异性条带;重组质粒经 *Nhe* I 酶切、电泳出现 1 条大约 6 000 bp 的带;经 *Nhe* I + *Xho* I 酶切电泳出现 2 条带;其中 1 条为载体质粒,约 5 000 bp,另 1 条为 SPA 片段,约 1 009 bp(图 4)。测序结果表明该转化菌的质粒含有目的基因片段,且读码框正确。



M1. DNA marker DL 15 000; M2. DNA Marker DL 2 000; 1. 重组质粒 pcDNA-SPA 的 *Nhe* I 单酶切 pcDNA-SPA digested by *Nhe* I; 2. 重组质粒 pcDNA-SPA 的 *Nhe* I、*Xho* I 双酶切 pcDNA-SPA digested by *Nhe* I and *Xho* I.

图 4 重组表达质粒 pcDNA-SPA 图谱及酶切鉴定

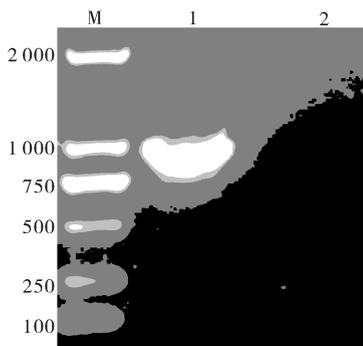
Fig.4 Map of recombinant expression plasmid pcDNA-SPA and identification of recombinant plasmid pcDNA-SPA by enzyme digestion

2.5 转染细胞 RT-PCR 结果

以提取的 PK15 细胞 RNA 为模板进行 RT-PCR 扩增出约 927 bp 的 *xynA* 基因编码成熟肽序列片段(图 5),说明在转录水平有 *xynA* 基因表达。

2.6 重组质粒分泌表达蛋白酶活性的测定

采用 DNS 法测定细胞培养液上清的酶活,检测到木聚糖酶活力最高为 7.6 IU/mL。而对对照组没有检测到酶活,说明重组质粒分泌表达成功。



M. DNA marker DL2 000; 1. 重组质粒 pcDNA-SPA 转染 PK15 的 RT-PCR 产物 RT-PCR product of PK15 transformed by pcDNA-SPA; 2. 未转染 PK15 的 RT-PCR product of untransformed PK15 cells.

图5 RT-PCR 检测 *xynA* mRNA 在 PK15 细胞中的表达

Fig. 5 RT-PCR analysis of *xynA* mRNA expression in PK15 cells

3 讨论

随着基因工程、蛋白质工程等生物技术的发展及应用,人们对木聚糖酶基因的研究不断深入。内切木聚糖酶(EC3. 2. 1. 8)是木聚糖水解酶系中最重要的酶^[9],本试验克隆的黑曲霉 β -1,4-内切木聚糖酶 *xynA* 基因成熟肽编码序列 927 bp,编码 308 个氨基酸,与 NCBI 发表的黑曲霉 *xynA*(XM 001389959)基因的序列相似性为 99.5%,与其他发表的黑曲霉 β -1,4-内切木聚糖酶基因的氨基酸的同源性分别为 98.7%(XP 001389996)、97.7%(ACJ26381)、96.4%(P33559)、96.4%(ACR83565),故推测黑曲霉 β -1,4-内切木聚糖酶基因具有多态性,其变异对蛋白的生物学活性影响还有待进一步的研究。据研究报告^[8]黑曲霉产木聚糖酶对 pH 不敏感,在不同 pH 值(2~11)缓冲液中 30 °C 保温 3 h,其残余酶活力均在 89.55%以上;保温 6 h,其残余酶活力均在 75%以上;保温 12 h,其残余酶活力仍在 68.01%以上,这说明,该酶可以在较为广泛的 pH 条件下发挥作用,能够耐受动物消化道中 pH 值的变化,本试验克隆出黑曲霉木聚糖酶基因,使其在真核细胞里面进行表达,该基因编码的酶在酸性条件下具有降解木聚糖的作用,可作为制作转基因动物的候选基因。

本研究采用的真核表达载体 pcDNA6/HisTM A 是一种在哺乳动物细胞系内过量表达重组蛋白的载体,在大多数哺乳动物细胞中进行稳定高水平的瞬时表达。木聚糖酶基因表达的研究主要是在大肠杆菌和毕赤酵母进行的,大肠杆菌表达产物主要是以

包涵体和胞内可溶性蛋白存在,而毕赤酵母表达借助了毕赤酵母的分泌信号肽序列进行的分泌表达。本试验为了保证 *xynA* 能够进行分泌表达,将 PSP 基因信号肽序列与 *xynA* 成熟肽编码序列的拼接片段 SPA 插入真核表达载体进行分泌表达,对下一步构建消化道特异表达载体,制备组织特异性表达的转基因猪具有重要意义。其次,酶活测定与底物浓度、反应时间、反应温度、pH 值等因素有关,所以采用多次重复测定,减少了测定误差。

近年来,人们对碱性木聚糖酶的研究较多,对嗜酸性木聚糖酶的研究相对较少,然而嗜酸性木聚糖酶在畜牧业生产中具有重要的应用价值^[9]。木聚糖酶作为一种饲料添加剂在动物的消化道中发挥作用,可降低肠道内食糜粘度,消除木聚糖带来的抗营养作用,提高饲料利用率,减少粪便对环境污染^[10-11]。动物消化道是处于一种强酸及弱碱状态,这要求饲料中木聚糖酶要有较好的酸稳定性。黑曲霉产生的木聚糖酶在酸性环境下较稳定,并且通过重叠延伸 PCR 的方法使猪腮腺分泌蛋白基因的信号肽序列与 *xynA* 基因的成熟肽编码序列进行拼接,构建到真核表达载体转染 PK15 进行表达,其最高酶活力可达 7.6 IU/mL,实现了异源基因在哺乳动物细胞中分泌表达。由于饲料酶是在畜禽消化道(通常温度 40~41 °C, pH 5~6)内进行催化反应,其体外测定条件应尽可能接近酶在动物体内的消化环境,因此本试验在 pH 5、温度 40 °C 的环境下测定其酶活,此条件接近猪消化道内环境,测定结果表明细胞分泌的木聚糖酶能在消化道内的环境中发挥活性。在测定酶活的过程中设立了对照跟平行样测定,保证了数据的准确性。此外本试验还进行了空质粒转染猪肾细胞的酶活测定,结果显示空质粒转染细胞的细胞液没有酶活,确保了试验结果的可靠性。来源于微生物的木聚糖酶能够在哺乳动物细胞内合成、分泌且表现出功能活性,证明生产能够内源性降解半纤维素木聚糖的动物是可行的^[12],为转基因猪的制备奠定基础。

猪 PSP 基因在不同发育期的腮腺中高效表达,而且表达量的变化在可接受的范围内,可以利用猪 PSP 基因的调控区作为转基因生物反应器的转基因平台。利用转基因技术在动物内源性消化道来生产外源木聚糖酶,分解饲料中的木聚糖,促进营养物质的吸收,提高单胃动物的消化能力,减少饲料成本,促进畜禽健康、减少动物粪便对环境的污染等将有很大的应用前景。

参 考 文 献

- [1] COLLIN T, GERDAY C, FELLER G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29: 3-23.
- [2] 崔罗生, 祝茂生, 张忠明, 等. 黑曲霉木聚糖酶基因(*xynA*)在大肠杆菌中的表达及酶学分析[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(1): 48-53.
- [3] LUTTIG M, PRETORIUS I S, VAN-ZYL W H. Cloning of two β -xylanase-encoding genes from *Aspergillus niger* and their expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology Letters, 1997, 19(5): 411-415.
- [4] 郭志强, 顾维智, 李佩建, 等. 木聚糖酶的研究进展[J]. 畜禽业, 2008(230): 18-20.
- [5] 聂国兴, 李春喜, 李用芳, 等. 黑曲霉产木聚糖酶稳定性的研究[J]. 华北农学报, 2003, 19(1): 112-114.
- [6] YIN H F, FAN B L, LI N, et al. Cloning of pig parotid secretory protein gene upstream promoter and the establishment of a transgenic mouse model expressing bacterial phytase for agricultural phosphorus pollution control[J]. Anim Sci, 2006, 84: 513-519.
- [7] 田兴华, 李宁, 吴常信, 等. 猪腮腺分泌蛋白在腮腺生后发育过程中表达特性研究[J]. 中国畜牧杂志, 2005, 41(10): 15-17.
- [8] 费笛波, 冯观泉, 袁超. 饲用木聚糖酶活性测定方法的研究[J]. 浙江农业学报, 2004, 16(2): 53-58.
- [9] 邓萍, 曹云鹤, 陆文清, 等. 黑曲霉木聚糖酶基因 *xynB* 在大肠杆菌中的表达及重组木聚糖酶性[J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(5): 774-778.
- [10] 禹慧明, 林勇, 徐有良, 等. 木聚糖酶高产菌株选育[J]. 工业微生物, 2002, 32(1): 43-44.
- [11] 钟茂, 谢和芳. 饲料木聚糖酶的开发[J]. 饲料天地, 2006(5): 49-50.
- [12] FONTES C M G A, ALI S, GILBERT H J, et al. Bacterial xylanase expression in mammalian cells and transgenic mice[J]. Journal of Biotechnology, 1999, 72: 95-101.
- [13] RUANGLEK V, SRIPRANG R, RATANAPHAN N, et al. Cloning, expression, characterization, and high cell-density production of recombinant endo-1,4- β -xylanase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 41: 19-25.
- [14] KRISANA A, RUTCHADAPORN S, JARUPAN G, et al. Endo-1,4- β -xylanase B from *Aspergillus niger* BCC14405 isolated in Thailand: purification, characterization and gene isolation[J]. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 38(1): 17-23.
- [15] 郑兰兰, 崔保安, 陈红英, 等. 猪白细胞介素 18 全基因的克隆、真核表达质粒的构建及在猪肾细胞中的表达[J]. 中国兽医学报, 2009, 29(1): 30-35.

Cloning of Xylanase Gene *xynA* from *Aspergillus niger* and Construction of Eukaryotic Expression Vector

ZHANG Mao¹ LIU De-wu¹ LIN Chun¹ HE Xiao-yan¹

MENG Fan-ming¹ ZHOU Qing-feng² DU Yun-ping² WU Zhen-fang¹

1. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Institute of Wen's Group, Guangdong Province, Xinxing 527400, China

Abstract The mature peptide coding sequence of xylanase gene *xynA* was amplified by RT-PCR from *Aspergillus niger* GIM3. 452 total RNA extracts. The result suggested that the mature peptide sequence of *xynA* was consisted of 927 bp, and encoded 308 amino acids. Then, the mature peptide sequence and signal peptide sequence of pig parotid secretory protein gene were splicing by overlap extension PCR (SOE-PCR). *SPA* was subcloned into the eukaryotic expressing plasmid vector pcDNA6/HisTM A. The recombinant plasmid pcDNA-*SPA* was identified by PCR, enzyme digestion and DNA sequencing. The result showed that the recombinant plasmid of pcDNA-*SPA* was constructed correctly. Meanwhile, the PK15 cells were transfected with pcDNA-*SPA* by cationic liposome, and the mRNA of the target gene was determined by RT-PCR. The maximum yield of the recombinant xylanase in cell culture medium was 7.6 IU/mL.

Key words *Aspergillus niger*; xylanase; *xynA* gene; eukaryotic expression

(责任编辑:边书京)