

来源于 *Aspergillus candidus* 的乳糖酶基因的克隆及序列分析

张 伟¹ 姚 斌² 王 磊¹ 范云六^{1*}

¹(中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

²(中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081)

摘 要 从一株产乳糖酶的亮白曲霉(*Aspergillus candidus*)中克隆到了乳糖酶基因组 DNA 及 cDNA 序列(EMBL ACCESSION No. AJ431643), 序列分析表明, 乳糖酶基因组 DNA 序列长 3458bp, 其中含有 8 个内含子, cDNA 编码区长 3015bp, 共编码 1005 个氨基酸, 前 19 个氨基酸为信号肽序列, 氨基酸序列中共含有 11 个潜在的糖基化位点。将此基因与不同来源的乳糖酶基因序列进行比较发现, 该基因与绝大多数乳糖酶基因同源性较低。虽与米曲霉 ATCC 20423 的乳糖酶序列同源性较高, 但其在酶学性质上更优于后者, 亮白曲霉的乳糖酶基因可能是一个具有更广阔的生产应用前景的新基因。

关键词 *Aspergillus candidus*, 乳糖酶基因, 序列分析比较

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)05-0566-06

牛乳含有多种营养成分, 是一种有利于人体健康的营养完善的食品。然而, 牛乳中含有约 5% 的乳糖, 一部分有色人种体内缺乏能将乳糖分解为葡萄糖和半乳糖的乳糖酶(EC 3.2.1.23, 又名 β -半乳糖苷酶), 饮用牛乳后会起消化不良、腹胀、腹泻、呕吐等症状, 称为乳糖不耐受症。此外, 乳糖酶还有可改良含乳糖制品的品质、生产低聚半乳糖等作用^[1]。因而, 乳糖酶的研究和开发日益受到食品及乳制品工业的重视。

乳糖酶广泛存在于植物、动物器官及微生物中。目前, 商品化的乳糖酶主要来源于黑曲霉、米曲霉、克鲁维乳酸酵母和克鲁维脆壁酵母等^[2,3]。但来源于这些菌种的乳糖酶均存在一些如 pH 范围较窄、稳定性差等缺点, 在乳制品生产中有一定局限性。同时, 目前商品化的酶制剂因生产工艺繁杂、产量低而价格昂贵, 因而需要进一步筛选酶学性质更为优良的乳糖酶, 并通过构建高效生产菌株来廉价生产乳糖酶。

本文克隆、分析了来源于亮白曲霉(*Aspergillus candidus*)的乳糖酶的基因组 DNA、cDNA 及推导的氨基酸序列, 将其与不同来源的乳糖酶基因进行比较, 并将该酶与同源性最高的米曲霉的乳糖酶的酶学性

质进行比较发现, 二者的酶学性质有显著差异。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种和质粒 :亮白曲霉(*Aspergillus candidus*) 为本实验保存; pGEM-T Easy 载体, Promega 公司; 大肠杆菌 JM109 为本实验室保存。

1.1.2 实验材料 :总 RNA 提取试剂盒, 购自 Promega 公司产品; 限制酶、连接酶等购自 Promega 及 Biolab 公司; Taq DNA 聚合酶、反转录酶等购自 GIBCO 公司; ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside) 购自 Pierce 公司; 其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 亮白曲霉总 DNA 的提取^[4] 将在 1% 麸皮培养基 (10g 麸皮 + 1L 自来水, 121 $^{\circ}$ C, 15 磅条件下处理 20min, 待冷却后用 8 层纱布过滤, 补水至 1L, 121 $^{\circ}$ C, 15 磅灭菌 20min) 中培养了 72h 的菌体离心, 称取 300mg 湿菌体在液氮中研磨成粉末, 加入到冰预冷的 0.4mL 提取液中 (50mmol/L Tris-HCl pH8.0, 150mmol/L NaCl, 100mmol/L EDTA pH8.0), 振荡混匀, 加入 50 μ L 10% SDS, 37 $^{\circ}$ C 保温 1h, 再加入 75 μ L

5mol/L NaCl, 轻轻混匀, 然后加入 65 μ L CTAB/NaCl 混合液(10% CTAB, 0.7mol/L NaCl), 65 $^{\circ}$ C 下保温 10 ~ 20min, 依次用等体积的酚:氯仿(1:1)氯仿抽提, 上清液用终浓度 75% 的异丙醇沉淀, 沉淀用 70% 乙醇洗 2 次后, 真空干燥, 溶于 TE 中备用。

1.2.2 乳糖酶基因组 DNA 片段的扩增及重组质粒的构建:根据已发表^[5]的米曲霉(*Aspergillus oryzae*) 的乳糖酶基因序列设计合成 PCR 引物, 并在两个引物的 5' 端分别引入 *Sna*BI、*Not*I 位点。以亮白曲霉的总 DNA 为模板, PCR 扩增乳糖酶的基因组 DNA。扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 4min, 94 $^{\circ}$ C 1min, 57 $^{\circ}$ C 1.5min, 72 $^{\circ}$ C 3.5min, 共 35 个循环后, 于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。扩增到的 DNA 片段克隆到 pGEM-T Easy 克隆载体上, 构建 p*Tlacb*-DNA 重组质粒。

Primer1 5'TACGTAATGAAGCTCCTCTCTGTGCT 3'

*Sna*BI

Primer2 5'GCGGCCGCTTAGTATGCTCCCTTCCGCTG 3'

*Not*I

1.2.3 乳糖酶 cDNA 的获得及重组质粒的构建:利用 Promega 总 RNA 提取试剂盒提取亮白曲霉的总 RNA。将在 1% 麸皮培养基中培养 54 h 的菌体离心, 称取 100mg 湿菌体, 用 1mmol/L 的磷酸缓冲液(pH7.0)洗 3 次, 在液氮中研磨成粉末, 加入冰预冷的 600 μ L 变性液(26mmol/L 醋酸钠, 0.5% 十二烷基肌氨酸, pH4.0, 0.125mol/L β -巯基乙醇, 4mol/L 硫氰酸胍)中, 然后依次加入 60 μ L 2mol/L 醋酸钠(pH4.0), 混匀, 加入 600 μ L 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1, pH4.7), 剧烈振荡, 在冰上放置 15min, 4 $^{\circ}$ C 下 10 000g 离心 20min, 将上清吸出, 加入等体积的异丙醇, -20 $^{\circ}$ C 放置 30min, 4 $^{\circ}$ C 下 10 000g 离心 10min, 弃去上清, 沉淀加入 1mL 冰预冷的 75% 乙醇洗涤后, 沉淀 RNA 自然干燥, 用 Nuclease-free 水溶解后备用。紫外测定 RNA 的含量及纯度, 取 5 μ g 的总 RNA 做反转录获得 cDNA 的一链。采取分段 PCR 的方法获得 cDNA 的第二链, 两对引物(Primer1 和 3; Primer4 和 2)如下:

Primer1 5'TACGTAATGAAGCTCCTCTCTGTGCT 3'

*Sna*BI

Primer3 5'CAGCCTTCACAATAATGGAGG 3'

Primer4 5'CTCTGCTTACAACACTACTGGG 3'

Primer2 5'GCGGCCGCTTAGTATGCTCCCTTCCGCTG 3'

*Not*I

扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 4min, 94 $^{\circ}$ C 1min, 57 $^{\circ}$ C 1min, 68 $^{\circ}$ C 2min, 共 35 个循环后, 68 $^{\circ}$ C 延伸 10min。扩增

到的两片段长度分别为: 5' 端片段长 1.7kb、3' 端片段长 1.3kb, 将它们分别克隆到 pGEM-T Easy 克隆载体上构建重组质粒 p*Tlacb*-1.7、p*Tlacb*-1.3, 再根据两片段的重叠序列分别用 *Sma*I、*Pst*I 双酶切处理重组质粒 p*Tlacb*-1.7、p*Tlacb*-1.3, 将 1.7kb cDNA 片段亚克隆到 p*Tlacb*-1.3 质粒上, 构建 p*Tlacb*-3.0 重组质粒。

1.2.4 乳糖酶基因组 DNA 及 cDNA 序列测定、同源性比较:将经鉴定无误的连有亮白曲霉的乳糖酶基因组 DNA、cDNA 片段的重组质粒进行测序(上海博亚公司), 并将该基因的 cDNA 序列、推导的氨基酸序列在 NCBI 的 GENE BANK 中搜索比较同源性。

2 结 果

2.1 乳糖酶基因组 DNA 的克隆及鉴定

如图 1 所示, 以亮白曲霉的总 DNA 为模板, PCR 扩增乳糖酶的基因组 DNA。得到的片段长 3.5kb, 将其连接到 pGEM-T Easy 载体上, 得到 p*Tlacb*-DNA 重组质粒。利用 *Not*I 对重组质粒进行单酶切鉴定(图 3), 在琼脂糖凝胶电泳上可看到切出一条 3.5kb DNA 片段和一条 3.0kb 载体片段。

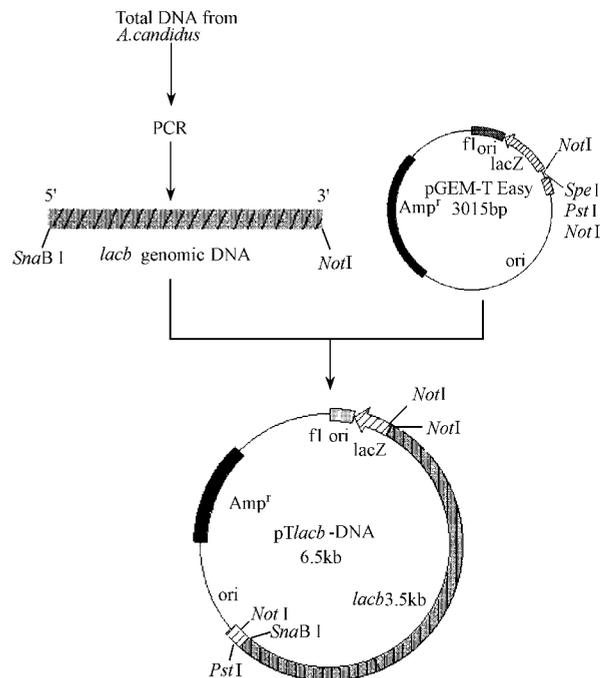


图 1 重组质粒 p*Tlacb*-DNA 的构建

Fig. 1 The scheme for construction of recombinant plasmid p*Tlacb*-DNA

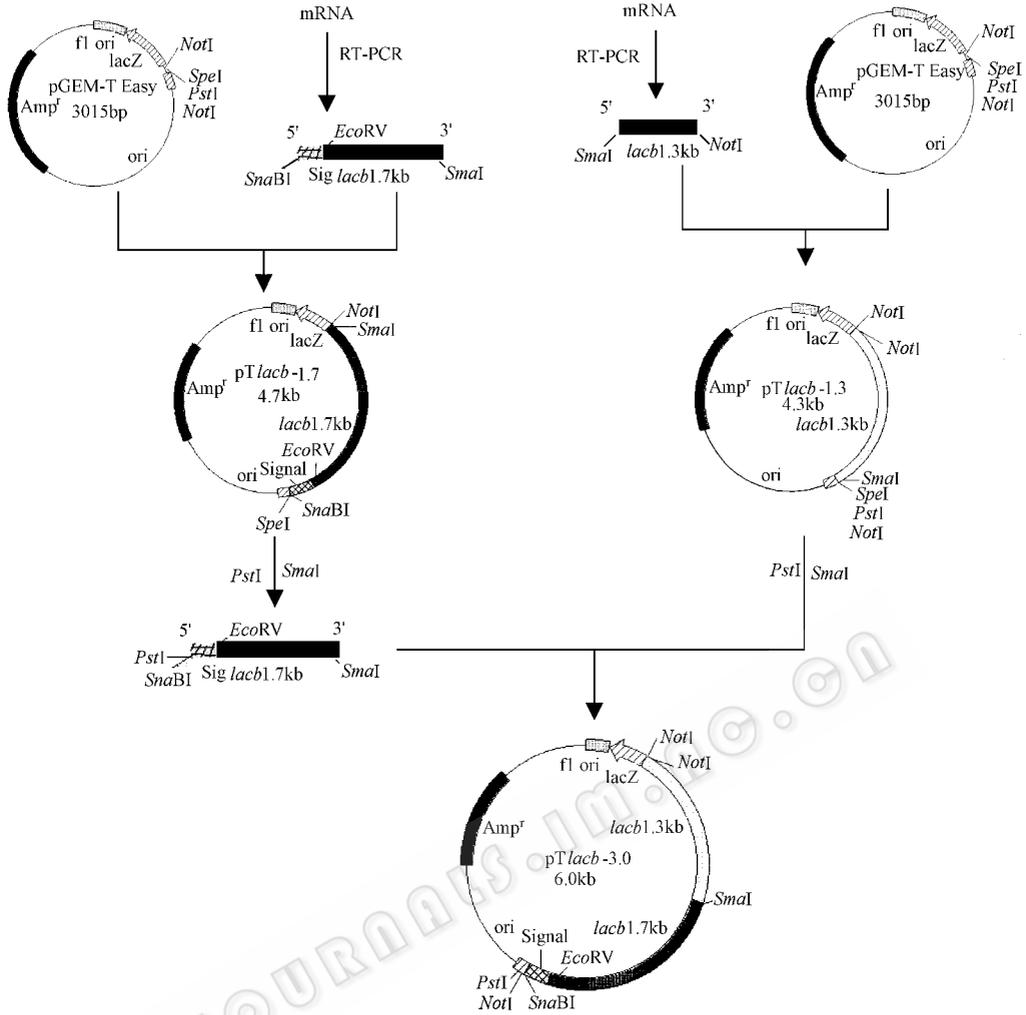


图 2 重组质粒 pTlacb-3.0 的构建

Fig.2 The scheme for construction of recombinant plasmid pTlacb-3.0

2.2 亮白曲霉 cDNA 的克隆及鉴定

利用总 RNA 提取试剂盒从 *A. candidus* 中提取的总 RNA 经紫外分光光度计测定其 $OD_{260} / OD_{280} = 1.8$, 达到纯度要求。在琼脂糖凝胶上可见明显的 28S、18S 条带(图 4), 提取的总 RNA 可用于 RT-PCR。以 $5\mu\text{g}$ 总 RNA 为模板合成 cDNA 的一链, 再进行分段 PCR 反应, 获得 cDNA 片段。两段的片段长分别为 1.7kb、1.3kb, 分别克隆到 pGEM-T Easy 载体上构建重组质粒 pTlacb-1.7、pTlacb-1.3, 再根据两片段的重叠序列用 *Sma*I、*Pst*I 处理, 将 1.7kb cDNA 片段亚克隆到 pTlacb-1.3 质粒上, 构建 pTlacb-3.0 重组质粒。利用 *Not*I 分别对 pTlacb-1.3、pTlacb-1.7 重组质粒, *Pst*I 对 pTlacb-3.0 重组质粒进行单酶切鉴定(图 3)。

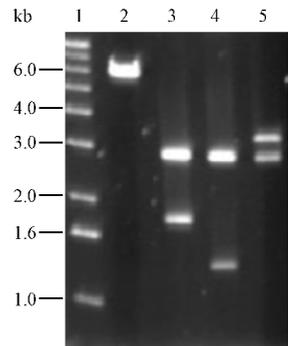


图 3 重组质粒的酶切鉴定

Fig.3 Identification of recombinant plasmid by restriction digestion

1. 1kb ladder
2. pTlacb-3.0 / *Pst*I ;
3. pTlacb-1.7/ *Not*I
4. pTlacb-1.3/ *Not*I ;
5. pTlacb-DNA/ *Not*I

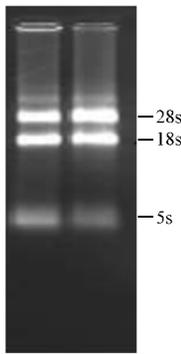


图 4 亮白曲霉总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig.4 Agarose Gel electrophoresis of total RNA from *Aspergillus candidus*

2.3 乳糖酶基因组 DNA、cDNA 及推导的氨基酸序列分析

2.3.1 乳糖酶基因组 DNA、cDNA 及推导的氨基酸序列分析 对基因组 DNA、cDNA 进行序列测定结果表明, DNA 和 cDNA 序列除内含子外完全一致。序列分析结果表明, 其基因组 DNA 长 3458bp, GC 含量为 50.28%, cDNA 长 3015bp, GC 含量为 51.73%, 基因组 DNA 中共有 8 个内含子。

由此 cDNA 序列推导出的氨基酸序列共有 1005 个氨基酸, 信号肽长 57bp, 编码 19 个氨基酸: MKLLSVA AVALLAAQAAGA。在乳糖酶的氨基酸序列中推测有 11 个潜在的 N-糖基化位点(Asn-X-Ser 或 Asn-X-Thr, X 除 Pro 外的氨基酸): 478 NVS, 156

NGT, 373 NVT, 402 NLT, 453 NLT, 522 NVT, 622 NAT, 760 NET, 777 NST, 805 NWT, 914 NNT。我们已将此基因在 GenBank 中登录, 登录号为: EMBL ACCESSION No. AJ431643。

2.3.2 乳糖酶基因同源性的比较 我们将亮白曲霉的 cDNA 及推导的氨基酸序列在 GenBank 中与不同来源的乳糖酶进行了同源性的比较(表 1)。A. 该基因与来源于酵母、各类细菌、拟南芥及人的乳糖酶基因、氨基酸序列同源性均较低, 最低仅为 1.9%。B. 一些原核来源的乳糖酶氨基酸序列有一些保守序列如: GXN(R/K)HE、RXSHYP、LCDXXG、RDXNHP、WSXXNE^[3], 而亮白曲霉的氨基酸序列中均无这些保守序列。但其与来源于人、苹果、小鼠等一些真核生物的氨基酸序列比较发现了一些保守序列^[6]: NGGPVILYQPENEY、SGEVHPFR、NLYMTFGGT、TSYDY、AEVSGGGFPGWL(黑体字为保守序列), 其中 TSYDY 序列在几种不同来源的乳糖酶中都十分保守。C. 亮白曲霉与同一属的黑曲霉的同源性也只有 60% 左右。虽然它与商业化应用的米曲霉 ATCC 20423 的乳糖酶氨基酸同源性达到 99.5%, 但我们通过对二者的酶学性质的研究发现, 它们的酶学性质有显著差异(有关酶的纯化及性质测定详情将另文发表)亮白曲霉的乳糖酶其酶学性质无论在热稳定性、金属离子稳定性, 还是比活、 K_m 均优于目前商业化的米曲霉的乳糖酶(表 2)。

表 1 不同来源的乳糖酶基因及氨基酸序列同源性的比较

Table 1 Alignment of various Lactase sequences and acid amino

Source	DNA(bp)	Identity	Acid amino	Identity	ACCESSION No.
<i>Aspergillus candidus</i>	3015	-	1005	-	AJ431643
<i>Aspergillus niger</i>	3192	57.9%	1006	64.8%	A00968
<i>Aspergillus oryzae</i>	3015	99.0%	1005	99.5%	E12172
<i>Kluyveromyces lactis</i>	3703	18.1%	1025	2.3%	M84410
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	2016	19.1%	672	2.5%	E01232
<i>Dianthus caryophyllus</i> (carnation)	2631	20.7%	731	4.9%	X57171
<i>Malus domestica</i> (apple)	2616	20.9%	731	4.1%	L29451
<i>Bacillus circulans</i>	1758	23.3%	586	5.2%	D88750
<i>Mus musculus</i> (mouse)	2364	23.5%	647	4.4%	M75122
<i>Thermotoga maritima</i>	3114	20.3%	1037	1.9%	AJ001072
<i>Closteridium thermosulfurogenes</i>	2723	18.5%	716	3.3%	M57579
<i>Xanthomonas manihotis</i>	2499	20.0%	598	5.3%	L35444
<i>Pyrococcus woesei</i>	1533	20.6%	510	2.7%	AF043283
<i>Streptococcus thermophilus</i>	3234	20.2%	1026	2.5%	M63636
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1887	19.3%	628	2.5%	AB004868
<i>Arobidopsis thaliana</i>	2478	22.3%	856	5.6%	AY056285
<i>Vitis vinifera</i> (grape)	2855	22.6%	854	3.7%	AY043231
<i>Lycopersicon esculentum</i>	2532	22.2%	724	4.4%	AF020390
<i>Homo sapiens</i> (human)	1812	21.0%	480	3.1%	XM_009489

表 2 亮白曲霉与米曲霉 ATCC 20423 的乳糖酶的酶学性质比较

Table 2 Comparison of Enzymatic Characteristics from *Aspergillus candidus* and *Aspergillus oryzae*

	<i>Aspergillus candidus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 20423
Optimum pH	5.2	5.2
Optimum temperature	60°C	55°C
pH stability	The enzyme activity did not decrease in the pH range from 4.0~9.0 ,the enzyme relative activity was above 80% in the pH range from 3.0~3.6	The enzyme activity did not decrease in the pH range from 4.0~9.0 ,the enzyme relative activity was above 20% in the pH range from 3.0~3.6
Thermal stability	62% of the enzyme activity was remained after heating at 60°C for 30 min	2.5% of the enzyme activity was remained after heating at 60°C for 20 min
Effect of metal ion and some re-agents on the enzyme activity	Ca ²⁺ 、K ⁺ 、Mg ²⁺ 、Pb ²⁺ 、EDTA、Zn ²⁺ 、SDS have no effects on the enzyme activity ,the enzyme activity was slight inhibited by Cu ²⁺ 、Fe ²⁺	Ca ²⁺ 、K ⁺ 、Mg ²⁺ 、Pb ²⁺ 、EDTA have no effects on the enzyme activity ,the enzyme activity was heavy inhibited by Cu ²⁺ 、Fe ²⁺ 、Zn ²⁺ 、SDS
Specific activity(u/mg)	706	531.8
K _m (mmol/L)	1.67	3.67
V _{max} (μmol/min)	3.33	3.33

3 讨 论

在亮白曲霉的乳糖酶基因 cDNA 序列的获得过程中,乳糖酶 mRNA 的获得至关重要,关键要采用能够诱导该曲霉产乳糖酶的培养基,在合适的时间下提取总 RNA。实验过程中我们观察到,若采用含有乳糖的合成培养基培养该曲霉,虽然可以利用乳糖正常生长,但在发酵液中未检测到乳糖酶活性。通过乳糖酶的产酶曲线我们发现:选用含有 1% 天然麸皮的培养基培养 54h 时,发酵液中乳糖酶活性最高,因此选用该条件下培养的菌体来提取总 RNA。

通过比较不同来源的乳糖酶序列发现,亮白曲霉的乳糖酶 cDNA 及推导出的氨基酸序列与绝大多数的不同来源的乳糖酶序列的同源性均较低,虽然亮白曲霉的乳糖酶基因的同源性商业化的米曲霉 ATCC 20423 的乳糖酶同源性高,二者的氨基酸序列仅有 3 个氨基酸不同 {211, T(*A. oryzae*)→P(*A. candidus*) ;420, K(*A. oryzae*)→M(*A. candidus*) ;989, N(*A. oryzae*)→D(*A. candidus*)},但实验证实二者在酶学性质上有显著差异,亮白曲霉的乳糖酶的酶学性质在热稳定性、比活、金属离子稳定性及 K_m 上均优于商品化的米曲霉的乳糖酶,这表明亮白曲霉的乳糖酶基因可能是一个新基因,其酶学性质上的优越性更有益于商业化的应用。至于由这 3 个氨基酸的不同而引起的酶学性质上的显著变化,其机理还有待于进一步的研究。

直接从曲霉提纯乳糖酶蛋白成本高、提纯工艺

繁杂,这无疑对乳糖酶的开发、应用造成影响,而毕赤酵母表达系统是近十年来发展起来的一种成功的真核表达系统,该系统具高表达、遗传性质稳定、杂蛋白少、适于大规模发酵等优点^[7]。我们已将亮白曲霉的乳糖酶基因在毕赤酵母中高效表达,表达量可达到 6mg/mL 发酵液(详情另文发表)。通过该系统高效表达具优越酶学性质的乳糖酶基因无疑可增加产量、降低生产成本,对于乳糖酶的大规模工业化生产起到较大推动作用。

致谢 本工作 RNA 提取部分得到了本实验室赵军副研究员的帮助,在此特致谢。

REFERENCES(参考文献)

- [1] QIN Y(秦燕),NING Z X(宁正祥),HU X Y(胡新宇). Synthesis of Galacto-oligosaccharides with immobilized β -galactosidase. *Food and Fermentation Industries*(食品与发酵工业),2001,27(11):12~16
- [2] PARK Y K, De SANTI M S S *et al.* Production and characterization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of food science*, 1979,44(1):100~103
- [3] Olivier Poch, Herve L'Hote, Vincent Dallery *et al.* Sequence of the *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase: comparison with prokaryotic enzymes and secondary structure analysis. *Gene*,1992,118:55~63
- [4] Peter T Borgia, Lanie E Eagleton, Yihong Miao. DNA preparations from *Aspergillus* and other filamentous Fungi. *Biotechniques*,1994,17(3)431~432
- [5] Ito Y, Sasaki T, Gomi K *et al.* β -galactosidase gene, Patent: JP 1996275780-A 1 22-OCT-1996

gene encoding a novel β -galactosidase from *Bacillus circulans*. *Biosci Biotech Biochem*, 1997 **61**(8):1270 ~ 1276

[7] ZHANG R A(章如安), YANG C(杨晟), QIU R D(邱荣德) et

al. Advances and reacher in the *Pichia pastoris* expression system.

Microbiology(微生物学通报) 2000 **27**(5) 371 ~ 373

Cloning and Sequencing of Lactase Gene from *Aspergillus candidus*

ZHANG Wei¹ YAO Bin² WANG Lei¹ FAN Yun-Liu^{1*}

(¹ Biotechnology Research Institute, ² Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract Genomic DNA and cDNA sequences of lactase from *Aspergillus candidus* were cloned. Sequences analysis revealed that the genomic DNA was 3458bp containing eight introns, cDNA was 3015bp and encoding a polypeptide of 1005 amino acid residues. Signal peptide was 19 amino acid residues, eleven potential N-glycosylation sites were assumed. Comparing the gene cDNA and amino acid sequences with other lactase sequences from various sources, it showed a very low homology with most of other sequences. Although the gene had a higher homology to *Aspergillus oryzae* lactase sequence, characterization of both enzymes exhibited obvious difference. The gene from *Aspergillus candidus* was a promising new gene for food industry.

Key words *Aspergillus candidus*, lactase gene, sequence analysis

Received: 02-28-2002

* Corresponding author. Tel: 86-10-68919844; Fax: 86-10-68975402; E-mail: fan_yunliu@hotmail.com