

# 基因组改组技术快速提高扩展青霉碱性脂肪酶产量 Rapid Improvement of Lipase Production in *Penicillium expansum* by Genome Shuffling

林峻 施碧红\* 施巧琴 何云霞 王明兹

LIN Jun, SHI Bi-Hong\*, SHI Qiao-Qin, HE Yun-Xia and WANG Ming-Zi

福建师范大学教育部工业微生物工程研究中心,福州 350018

Engineering Research Centre of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Fujian Normal University, Fuzhou 350018, China

**摘要** 应用基因组改组技术快速提高扩展青霉碱性脂肪酶的产量。采用经过多代诱变的碱性脂肪酶产生菌扩展青霉 (*Penicillium expansum*) FS8486 以及分离自新疆火焰山口土样的溜曲霉 (*Aspergillus tamarii*) FS-132 作为出发菌株,经过两轮基因组改组,得到数株优良子代。其中一株酶活较出发菌株 FS8486 提高 317%。对亲本与子代菌株的形态型、RAPD(随机扩增多态性 DNA)多态性和脂肪酸组成分析初步确定筛选获得的菌株为亲本的改组子代。首次将基因组改组技术成功应用于真核微生物基因组改造,短期内使目标代谢产物获得提高,这对于在真核微生物育种中进一步推广该技术具有重要意义。

**关键词** 基因组改组,扩展青霉,碱性脂肪酶,溜曲霉

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0672-05

**Abstract** In the present study, the genome shuffling was used to improve lipase production of *Penicillium expansum*. A lipase producing mutant strain-*Penicillium expansum* FS8486 and a wild type of *Aspergillus Tamarii* FS-132 isolated from soil of a volcano in Xinjiang were used as the parental strains. After two rounds of genome shuffling, several elite daughter strains were screened. The lipase activity in one of the daughter strains was increased 317% over the starting strain FS8486. Comparisons of the morphology, RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) polymorphism and the fatty acid compositions between the daughter and the parental strains suggested that the filial generation were generated by genome shuffling. In this study, the genome shuffling used successfully first time in eukaryotic microorganism and increases the production of the desired metabolite in short time, the study will be useful to spread the genome shuffling in eukaryotic microbial breeding.

**Key words** genome shuffling, *Penicillium expansum*, alkaline lipase, *Aspergillus tamarii*

菌种选育技术作为现代发酵工业的基础,一直以来都受到高度的重视,其发展经历了自然选育、诱变育种、代谢控制育种、杂交育种和分子育种等几个重要阶段<sup>[1]</sup>。

美国加州 Maxgen 公司的 Cardayré 等人于近期

提出了基因组改组(Genome shuffling)技术的概念,它通过细胞工程的手段,对多个遗传性状不同的亲本细胞进行递推式多次融合(recursive protoplast),使它们杂交,产生新的复合子代<sup>[2]</sup>。最后筛选出正向进化的目标菌株。与其他分子育种技术相比,基因组

Received: December 5, 2006; Accepted: January 18, 2007.

This work was supported by the grants from the Natural Science Foundation of Fujian Province of China (No. 2006J0073), the Innofund for Talented Youth of Fujian Province (No. 2004J013) and the Class A Fund of Education Committee in Fujian Province (No. JA050200).

\* Corresponding author. Tel: +86-591-22868220; Fax: +86-591-83442620; E-mail: shihb@fjnu.edu.cn

福建省自然科学基金资助(No. 2006J0073)福建省青年人才创新基金(No. 2004J013)福建省教育厅 A 类项目(No. JA050200)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

改组技术不需要昂贵的仪器设备,花费少,操作简单,能广泛推广,具有强大的生命力。此技术的育种效果显著,已有成功应用的报道<sup>[2-6]</sup>,其中最为成功的是 Cardayré 等人运用基因组改组技术快速提高泰乐菌素产生菌 *Streptomyces fradiae* 的产量,通过两轮改组,提高泰乐菌素产量将近 4 倍,仅花费一年时间就取得了相当于他人此前 20 年工作的成果<sup>[2]</sup>;但是到目前为止,此技术仅成功地应用于原核微生物,还未见在真核微生物中应用的报道。

本试验采用的初始菌株为碱性脂肪酶产生菌 *Penicillium expansum* 的突变菌株和脂肪酶产生菌溜曲霉(*Aspergillus tamaris*)。期望通过对它们进行基因组改组,提高该菌产酶量,以探究此方法在工业微生物育种领域中的应用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:**扩展青霉(*Penicillium expansum*) FS8486、耐热溜曲霉(*Aspergillus Tamaris*) FS-132,均为本实验室保藏菌种。

**1.1.2 试剂和设备:**Taq 酶、PCR 试剂和 250bp DNA Ladder Marker 均购自 TaKaRa 公司;RAPD 随机引物购自上海生工生物工程技术有限公司;RNase A 购自 Huagene;其他试剂均为国产或进口分析纯。

**1.1.3 培养基:**斜面培养基(%):蔗糖 3,NaNO<sub>3</sub> 0.2,KCl 0.05,麸皮 1.0,琼脂 2.0,pH 自然。菌丝生长培养基:同斜面培养基。等渗再生培养基:同斜面培养基。高渗再生培养基:以高渗溶液(0.6mol/L NaCl + 0.3% CaCl<sub>2</sub>)代替自来水配制菌种斜面培养基,采用双层琼脂培养基。发酵培养基(%):黄豆饼粉 4.0,玉米淀粉 0.8,NaNO<sub>3</sub> 0.4,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3。

### 1.2 方法

**1.2.1 不同遗传性状的菌株获得:**将菌株 FS8486 以 NTG 诱变处理后获得 5 株突变株,此 5 株突变株的菌落形态和生长特性与 FS8486 基本相同,产酶酶活与 FS8486 相比提高 108% ~ 128%。另加 *Aspergillus Tamaris* FS-132 共 6 株作为亲本出发菌株。

**1.2.2 原生质体的制备:**参考文献[7]的方法制备。

**1.2.3 原生质体的融合:**将制备所得 6 个亲本的原生质体等量混合,加入 30% PEG 处理 10min 后以 1500r/min 离心 10min,收集沉淀,用高渗溶液洗涤 3 次,再用高渗溶液稀释原生质体,分离于高渗双层培养基平板上,培养至单菌落形成。通过琼脂块法、摇

管法和摇瓶法筛选,选出表型优良的数个菌株。将第一轮获得的优良菌株重复以上步骤,进行第二轮融合。

**1.2.4 初筛(琼脂块法):**用灭菌的打孔器将培养基制成单个小琼脂块,排放在灭菌培养皿内,随机挑选高渗双层培养基平板上生长的菌落,用灭菌牙签接种到小琼脂块上,30℃ 恒温培养,使其充分生长和产酶,然后再将小琼脂块转移到橄榄油乳化液鉴定板(含有 5% 橄榄油乳化液的琼脂板)上,于 30℃ 培养 1 ~ 3d,观察各菌落周围水解圈的大小,将水解圈大的菌落移接到斜面培养基中。

**1.2.5 一次复筛(摇管法):**将初筛得到的菌种接种于事先加入 0.5mL 发酵培养基的 10mm × 75mm 小试管,250r/min 摇床摇瓶发酵 60h,取发酵液,同时以灿烂绿法和水解圈法初步测定产酶情况。

**灿烂绿法:**将灿烂绿滴入发酵液,静置一段时间,含脂肪酶者显绿色,显色越深越快者酶活越高。

**水解圈法:**将发酵液滴入橄榄油乳化液鉴定板,恒温培养 24 ~ 48h,观察并记录水解圈的大小,圈越大者酶活越高。

**1.2.6 二次复筛(常规摇瓶法):**用常规摇瓶法进一步筛选,振荡培养。取发酵液,用水解圈法,测定产酶情况,然后使用以下的 NaOH 滴定法测定确认。

**1.2.7 碱性脂肪酶活性测定:**采用 NaOH 滴定法进行脂肪酶活性测定<sup>[8]</sup>。

### 1.2.8 RAPD 分析:

(1)菌体基因组 DNA 的提取:采用改良 CTAB (十六烷基三甲基溴化铵)法<sup>[9]</sup>提取菌体基因组 DNA:从斜面上挑取少量孢子接种到培养基平板上,培养 20h,刮取菌体。将获得的菌丝置于研钵中,加入液氮,迅速研磨。将得到的粉末移入灭菌 50mL 离心管,加入 65℃ 预热的 CTAB 提取液,充分混匀,置 65℃ 水浴中轻微摇荡 1h。冷却后分装入 1.5mL Ep 管中,加入等量预冷氯仿,轻缓颠倒,4℃ 静置 8min,12000r/min 4℃ 离心 15min。吸取上清液,加入 RNaseA 37℃ 保温作用 30 min。再用氯仿抽提蛋白质,直至界面清晰为止。取上清液,加入一倍体积 4℃ 预冷的异丙醇,旋转混匀,4℃ 放置 20min。12000r/min 4℃ 离心 10min,弃上清。沉淀用预冷的 70% 乙醇低速离心洗涤两次。将 Ep 管倒置,室温干燥后,加入 TE 轻微吹打,-20℃ 保存备用。

(2)RAPD 多态性分析<sup>[10]</sup>:以 *Penicillium expansum* 的 DNA 为模板,从 300 条随机引物中筛选出 24 条扩增产物稳定、重复性好的有效引物(表

1),对亲本及部分改组后菌株进行 RAPD 扩增。PCR 体系定为:反应体积 25 $\mu$ L,内含模板 DNA 50ng, 25mmol/L MgCl<sub>2</sub> 溶液 1.5 $\mu$ L,引物 1 $\mu$ L, 2.5mmol dNTP 2 $\mu$ L, Taq 酶 1.5 $\mu$ L, 10 $\times$  PCR buffer 2.5 $\mu$ L,加超纯水补足到 25 $\mu$ L。扩增程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min;随后 94 $^{\circ}$ C 变性 1min,37 $^{\circ}$ C 退火 1min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5min,循环 40 次;最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。反应结束后,取 5 $\mu$ L 反应液在 1.4% 琼脂糖凝胶上电泳检测。

对 24 条引物产生的 RAPD 图谱进行统计分析,按琼脂糖凝胶同一位置上 DNA 带的有无进行统计,有带(包括弱带)的记为“1”,无带的记为“0”,形成 RAPD 表型数据矩阵供进一步分析,使用软件 Phylip 的 Fitch 算法构建进化树。

表 1 本试验所用 RAPD 随机引物序列  
Table 1 The random primers used in this study

Code	PRIMER SEQUENCE	Code	PRIMER SEQUENCE
1	GGTGACGCAG	13	ACGCCAACC
2	CTGCTGGGAC	14	GGTACTGTG
3	AGGGAACGAG	15	CAGCGACAAG
4	CCACAGCAGT	16	GGTGGTGATG
5	CAATCGCCCT	17	TGCCGAGCCT
6	TCTGTGCTGG	18	CTACTGCGCT
7	GTCGCCGTCA	19	CAGAGGTCCC
8	AGGGCCTAAG	20	TCCGATGCTG
9	CTCTCCGCCA	21	TCCTGGTCCC
10	ACGACCGACA	22	ACTCGGTGG
11	GGAAGTCGCC	23	TGGGACCAC
12	GGTGCGGGAA	24	GACTCAGCAG

1.2.9 脂肪酸组成分析:使用高效气相色谱(GC)法测定各个受检菌株的脂肪酸组成。

## 2 结果分析

### 2.1 基因组改组

2.1.1 第一次改组:将由 *Penicillium expansum* FS8486 得到的 5 株变株及能产少量的胞外脂肪酶耐热野生 *Aspergillus tamarii* FS-132<sup>[11]</sup>作为亲本进行第一次基因组改组,从平皿上挑选约 1000 株进行初筛、复筛,结果如图 1 所示。第一次改组后得到 5 株

优良的变株 as9、as22、as29、as50、as73。其中 as50 酶活单位比出发菌株 FS8486 提高 2.6 倍。

2.1.2 第二次改组:将第一次基因组改组得到的 5 株优良菌株 as9、as22、as29、as50、as73 作为亲本进行第二次基因组改组,经过初筛、复筛,结果如图 2 所示。第二次基因组改组得到 6 株优良菌株 B50、B64、B84、B91、B109、B-888。其中 B91 酶活比出发菌株 FS8486 提高 3.17 倍。

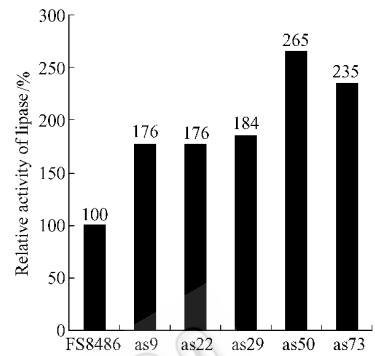


图 1 第一次改组所得菌株酶活情况  
Fig. 1 Lipase activities after first round genome shuffling

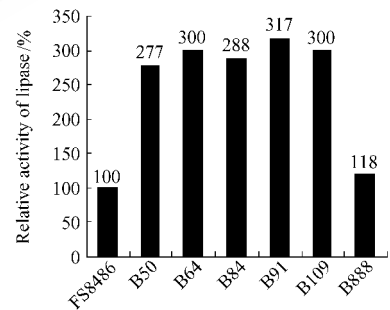


图 2 第二次改组所得菌株酶活情况  
Fig. 2 Lipase activities after second round genome shuffling

### 2.2 亲本与改组子代的形态比较

比较了出发亲本菌株与部分改组子代的形态区别(表 2),可知通过筛选得到的子代菌株与亲本在形态上既有一定的联系,又有明显区别。其中 B-888 斜面正面的颜色与 FS-132 相似,但背面产生红色色素,为亲本完全不具备的形态特征。其他菌株也有类似的现象。由此可判断先前以产酶量变化为

表 2 出发菌株与改组子代在形态方面的比较

Table 2 The comparison of morphology between parental strains and daughter strains

		FS-132	FS8486	as50	as29	B91	B-888
Spores	positive	yellow	bottlegreen	breen	breen	breen	wheat
morphology	inverse	wheat	buff	brown	wheat	white	rosiness
Colony	positive	yellow	bottlegreen	breen	breen	celadon	off-white
morphology	inverse	yellow	wheat	tawny	tawny	wheat	red

筛选标志筛选获得的子代菌株在形态也发生了变化。

### 2.3 RAPD 多态性分析

使用 RAPD 随机引物对 FS8486、B-888、B91、FS-132 进行多态性分析(图 3)通过计算机软件计算供试菌间的遗传距离并构建聚类图(图 4),尝试在分子水平分析亲代和改组子代在实验室定向进化过程中的遗传关系。结果表明:子代菌株 B91 与亲本 FS8486 遗传关系最近(遗传距离 0.2912,图 4),子代菌株 B-888 则与亲本 FS-132 聚成一个类群(遗传距离 0.4285,图 4)。可见基因组改组中,由于 DNA 重组的随机性,使得子代菌株与亲本间的遗传关系不一致,但均有一“主效亲本”现象。另外,结果还表明经基因组改组的两供试子代菌株间的遗传距离(0.6593)高于两亲本间的遗传距离(0.544),说明基因组改组可有效提高子代菌株的遗传多样性,这对于保护重要的工业微生物资源具有重大意义。

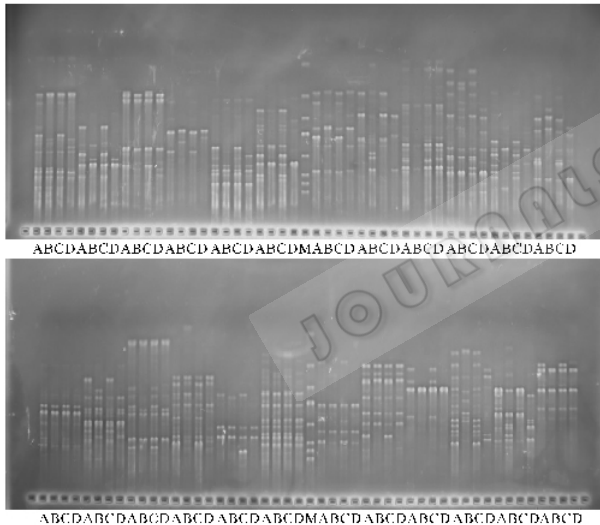


图 3 4 株供试菌株的 24 条引物 RAPD 扩增图谱

Fig. 3 RAPD profiles of 4 test strains before and after genome shuffling using 24 primers

A :FS8486 ;B :B-888 ;C :B91 ;D :FS-132 ;

M :250bp DNA ladder marker

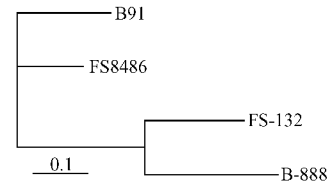


图 4 4 个菌株的 RAPD 聚类分析图

Fig. 4 Dendrogram showing genetic relationships among the 4 test strains based on RAPD data

### 2.4 脂肪酸组成分析

微生物细胞内的脂肪酸组成是相对恒定的,其组成和含量具有很好的种属特异性。通过测定亲代和改组子代细胞的脂肪酸组成,可初步判断各菌株在细胞生理生化水平上的关系。各受检菌种脂肪酸组成 GC 图谱由 sherlock MIDI 全自动微生物鉴定系统检测。表 3 总结了各受检菌种 GC 图谱的结果:两株亲本在保留时间 2.5 ~ 10.6min 之间都有数个峰值,而子代均缺失这些峰值;在保留时间 10.6min 附近,各菌株都有单一峰值,为棕榈酸。菌株 FS-132 与 B-888 棕榈酸含量相近,分别为 15.84%, 16.64%,菌株 FS-8486 与 B91 棕榈酸含量相近,分别为 12.62% 与 12.11%;在保留时间 13.7min 附近各菌株均有一亚油酸峰值,FS-132(50.40%)与 FS8486(52.27%)亚油酸含量相近,但子代 B-888(43.53%)与 B91(64.23%)亚油酸相差 20% 以上;在保留时间 13.7min 附近紧邻亚油酸峰值之后各菌株均有一峰值:其中菌株 FS132 在此处脂肪酸为 18:1 CIS 9( $\omega$ 9),含量 23.79%;菌株 FS8486 为 18:1 CIS 9( $\omega$ 9),含量 9.02% 和 18:1( $\omega$ 8),含量 10.70%;菌株 B-888 为 18:1 CIS 9( $\omega$ 9),含量 33.27%;菌株 B91 则为 18:1( $\omega$ 8),含量 23.66%。说明子代菌株继承了亲代菌株的一些脂肪酸组成特性,但是与亲代又有一定的区别,形态与产酶量均有很大不同的两株子代 B-888 与 B91 之间脂肪酸组成差别明显,但与各自的“主效亲本”的脂肪酸组成有较大的相似性(表 3)。结合 RAPD 结果及形态型变化可初步确定基因组改组成功地作用于亲代与子代之间的遗传信

表 3 由 GC 图谱获得的亲、子代菌株脂肪酸组成及其含量差异汇总

Table 3 Summary of fatty acid compositions and their contents of the test strains by gas chromatographic analysis

Retain time/min	B-888	B91	FS8486	FS-132
2.5 ~ 10.6	None	None	Several peaks	Several peaks
10.6	palmitic acid 16.64%	palmitic acid 12.11%	palmitic acid 12.62%	palmitic acid 15.84%
13.7	linoleic acid 43.53%	linoleic acid 64.23%	linoleic acid 52.27%	linoleic acid 50.40%
13.7 ~ 14.2	18:1 CIS 9( $\omega$ 9) 33.27%	18:1( $\omega$ 8) 23.66%	18:1 CIS 9( $\omega$ 9)9.02% 18:1( $\omega$ 8)10.70%	18:1 CIS 9( $\omega$ 9) 23.79%

息传递,子代由亲代经实验室定向进化而产生。

### 3 讨论

基因组改组技术能在较短的时间内提高生产菌种的产量,改良表型<sup>[2-4]</sup>。本试验将此技术用于改良脂肪酶产生菌扩展青霉,改组子代菌株脂肪酶酶活水平比亲本提高了3.17倍。比较分析了子代菌株与亲本在形态型、DNA多态性和脂肪酸组成的差异,发现改组子代菌株与亲本菌株在表型和基因型上都有明显的区别,可判定基因组改组成功地作用于亲代和子代之间的遗传信息传递,改造了菌株的遗传物质。

常规的原生质体融合一般要求亲代具有遗传标记,以方便融合子的筛选和鉴定。但诸如营养缺陷型等遗传标记一般会对菌体的生理代谢造成一定的影响,使融合子代“先天不足”,无法发挥最大生产性能。本试验的基因组改组技术源于原生质体融合技术,但两者最大区别在于基因组改组技术使用多亲本,而非双亲本,并且进行多轮递推式融合,这将大大增加子代筛选群体内遗传多样性,从而提高了获得优良性状的菌株的几率<sup>[2]</sup>。同时为了最大限度提高碱性脂肪酶产量,发挥基因组改组的效能,我们在构建改组文库的过程中没有采用传统的遗传标记技术,而是在筛选过程中以琼脂块法、平板透明圈法、灿烂绿法等结合进行,获得较好的筛选效果。事后的试验分析结果均证明我们获得了高产的正向进化改组子,子代在产量、形态、RAPD多态性、脂肪酸组成分析上与亲本菌株均有明显的区别,有力说明了基因组改组在工业微生物育种上的可行性和先进性。

本试验还发现基因组改组能有效提高子代菌株的遗传多样性,这与Zhang等的发现一致<sup>[2]</sup>。这为进一步改良菌株提供丰富的资源。而采用传统的诱变育种,往往以单一出发菌株为亲本,经连续多代诱变,筛选优良菌株,这种育种方式往往导致后代菌株间遗传多样性降低<sup>[12]</sup>,从而使进一步提高目标产物出现困难。这可能是基因组改组技术比传统育种技术更具有生命力的重要原因。

基因组改组技术能在短时间内提高目标代谢产物的产量。使用传统育种技术,需要几年甚至十几年才能达到同样的效果。应用该技术的费用低廉,对设备要求不高,一轮基因组改组的费用略相当于一轮理化诱变的费用,同时该技术易于实施,对实验仪器设备的依赖性小,能够在国内的大多数实验室

推广,应用前景广阔。此前国内外已有少量关于基因组改组的报道,但仅限于在原核微生物方面的应用。本试验在国内外首次证明了基因组改组可成功应用于真核微生物,但是否在真核微生物中具有应用的普遍性,还有待于进一步深入的研究。

### REFERENCES (参考文献)

- [1] Shi QQ(施巧琴), Wu SG(吴松刚). Industrial Microbiology Breeding(工业微生物育种学). 2<sup>nd</sup> eds, Beijing: Science Press(科学出版社). 2003.
- [2] Zhang YX, Perry K, Victor C, et al. Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. *Nature*, 2002, **415**: 644-646.
- [3] Patnaik R, Louie S, Gavrilovic V, et al. Genome shuffling of *Lactobacillus* for improved acid tolerance. *Nature Biotechnology*, 2002, **20**: 707-712.
- [4] Dai MH, Copley SD. Genome shuffling improves degradation of the anthropogenic pesticide pentachlorophenol by *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(4): 2391-2397.
- [5] Wang YH(王玉华), Li Y(李岩), Pei XL(裴晓林), et al. Improved acid tolerance of *Lactobacillus casei* for production of L-lactic acid by genome-shuffling. *China Biotechnology*(中国生物工程杂志) 2006, **26**(2): 53-58.
- [6] Chen T(陈涛), Wang JY(王靖宇), Zhou SQ(周世奇), et al. Trait improvement of riboflavin-producing *Bacillus subtilis* by genome shuffling and metabolic flux analysis. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)*(化工学报), 2004, **55**(11): 1842-1848.
- [7] Huang W(黄文树), Shi QQ(施巧琴), Wu SQ(吴松刚), et al. Protoplast formation and regeneration of the alkaline lipase producing strain *Penicillium expansum* K40. *Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition)*(福建师范大学学报(自然科学版)), 2000, **16**(3): 77-82.
- [8] Shi QQ(施巧琴). Studies on alkaline lipase I. Isolation and Screening of the strain. *Microbiology*(微生物学通报), 1981, **8**(3): 108-110.
- [9] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. Short Protocols in Molecular Biology. 4th ed. USA: John Wiley & Sons, Inc, 1999.
- [10] Wang MQ(王鸣刚), Tu ZK(涂智杰), Qiu XK(丘小军), et al. Genetic diversity of *Castanopsis hystrix* by RAPD analysis. *Journal of Xiamen University (Natural Science Edition)*(厦门大学学报(自然科学版)), 2006, **45**(4): 570-574.
- [11] Zeng LQ(曾丽清), Shi BH(施碧红), Zhou XL(周晓兰), et al. Preliminary optimization of the culture conditions for lipase producing strain *Aspergillus* sp. FS132 and comparative analysis of its 18S rRNA gene. *Industrial Microbiology*(工业微生物), 2007, **37**(2): 11-15.
- [12] Zeng Q(曾琦), Shi BH(施碧红), Luo XZ(罗秀针), et al. Genetic polymorphism among the alkaline lipase producing mutants of *Penicillium expansum*. *Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition)*(福建师范大学学报(自然科学版)),