

玉米赤霉烯酮降解酶优化表达的应用

刘梦然

(东北农业大学 生命科学学院,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:为提高 ZEN 降解酶的表达量,通过利用 PCR 法从具有玉米赤霉烯酮降解酶序列的载体中扩增玉米赤霉烯酮降解酶基因的手段,构建黑曲霉表达载体 pSZHG-ZEN 和带有黑曲霉内源高表达融合蛋白阿魏酸酯酶 faeA 基因的载体 pSZHG-faeA-ZEN。结果表明:酶活检测结果显示载体 pSZHG-ZEN 以及 pSZHG-faz 分泌表达的最高发酵酶活为 383.77 U·mL⁻¹和 1 378.33 U·mL⁻¹,表明构建的融合蛋白表达载体具有更高的活力。

关键词:玉米赤霉烯酮;阿魏酸酯酶;同源重组转化

中图分类号:Q78;Q936 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2017)10-0017-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2017.10.0017

玉米赤霉烯酮(ZEN)是由串珠镰刀菌、三线镰刀菌、禾谷镰刀菌等在谷物里生长出的一种真菌毒素,对人和动物具有极大的危害,主要对玉米、小麦、高粱等粮谷类作物及其制品污染作用大^[1]。本试验通过基因工程的方法,选择黑曲霉内源高表达分泌蛋白阿魏酸酯酶^[2],研究在黑曲霉中融合蛋白对外源基因的蛋白表达水平和活性的影响。同时构建出高效表达异源玉米赤霉烯酮降解酶基因菌株,为生物降解玉米赤霉烯酮提供新的方法和途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及载体 黑曲霉(*Aspergillus niger*)CICC2462 由肇东市日成酶制剂有限公司赠予;大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态 DH5 α 、pMD19-T Simple 载体购于康为世纪公司;农杆菌 AGL1 由实验室保存;载体 pSZHG 为实验室构建。

1.1.2 酶类及主要试剂 Primer STAR supermix、限制性核酸内切酶、T4DNA Ligase、质粒快速提取试剂盒、RNA 提取试剂盒,反转录试剂盒均购于康为世纪生物科技有限公司;潮霉素 B(Hygromycin B)购于西格玛奥德里(Sigma-Aldrich)公司;PCR 引物、基因测序由博仕生物完成;利福霉素(Rif)、卡那霉素(Kan)、氨苄青霉素(amp)、乙酰丁香酮(AS)购于上海生物工程有限公司;化学试剂均为分析纯。

1.1.3 主要实验仪器 Anke TGL-16G 高速离

心机、SensoQuest Labcycler PCR 仪、Alphalmager[®]EC 凝胶成像系统、Spectrumlab 22PC 紫外分光光度计、DHP-9162 电热恒温培养箱、ZF-90 暗箱式紫外透射仪蛋白质电泳系统。

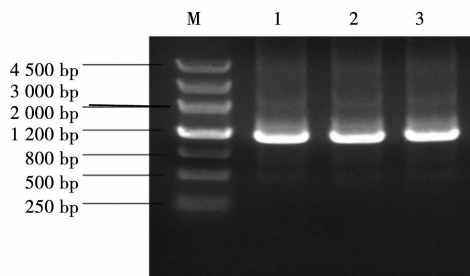
1.2 方法

CTAB 法提取黑曲霉基因组,PCR 技术,大肠杆菌转化,质粒的提取,大肠杆菌转化子的鉴定,测序及序列分析,根瘤农杆菌介导的黑曲霉的遗传转化,重组菌株的 ZEN 降解酶酶活检测,重组菌株的蛋白检测等。

2 结果与分析

2.1 玉米赤霉烯酮目的基因克隆

以带有玉米赤霉烯酮酶基因 ZEN Gen Bank(序列号:EF541122),pSIMPLE-prochymosin 载体为模板,用 P1、P2 引物进行 PCR 扩增,得到大约 1 100 bp 的带,如图 1 所示。对扩增的带进行回收,加 A,连接 pMD19-T Simple 载体,并进行测序,进行 Blast 序列比对分析,比对结果与玉米赤霉烯酮酶基因序列号基因相似性为 100%。



M:DL2000 Marker;1,2,3 为 ZEN 基因 PCR 扩增

M:DL2000 Marker; 1,2,3 are the ZEN gene PCR amplification

图 1 ZEN 基因 PCR 扩增结果

Fig.1 The results of ZEN gene PCR amplification

收稿日期:2017-08-17

作者简介:刘梦然(1996-),女,黑龙江省肇东市人,在读学士,从事生物科学研究。E-mail: 13604841116@163.com。

2.2 玉米赤霉烯酮基因黑曲霉表达载体的构建

用 Nhe I、Hind III 双酶切本实验室的载体 pSZHG 质粒,回收约 15 000 bp 目的片段。将黑曲霉内源高表达融合蛋白基因 *faeA* 与玉米赤霉

烯酮基因连接到 T 载体,即融合蛋白,以下简称 *faz*^[3]。用 Nhe I、Hind III 双酶切 T 载体,构建黑曲霉表达载体 pSZHG-*faz*、pSZHG-ZEN。本文以 pSZHG-*faz* 载体为例,见图 2 至图 3。

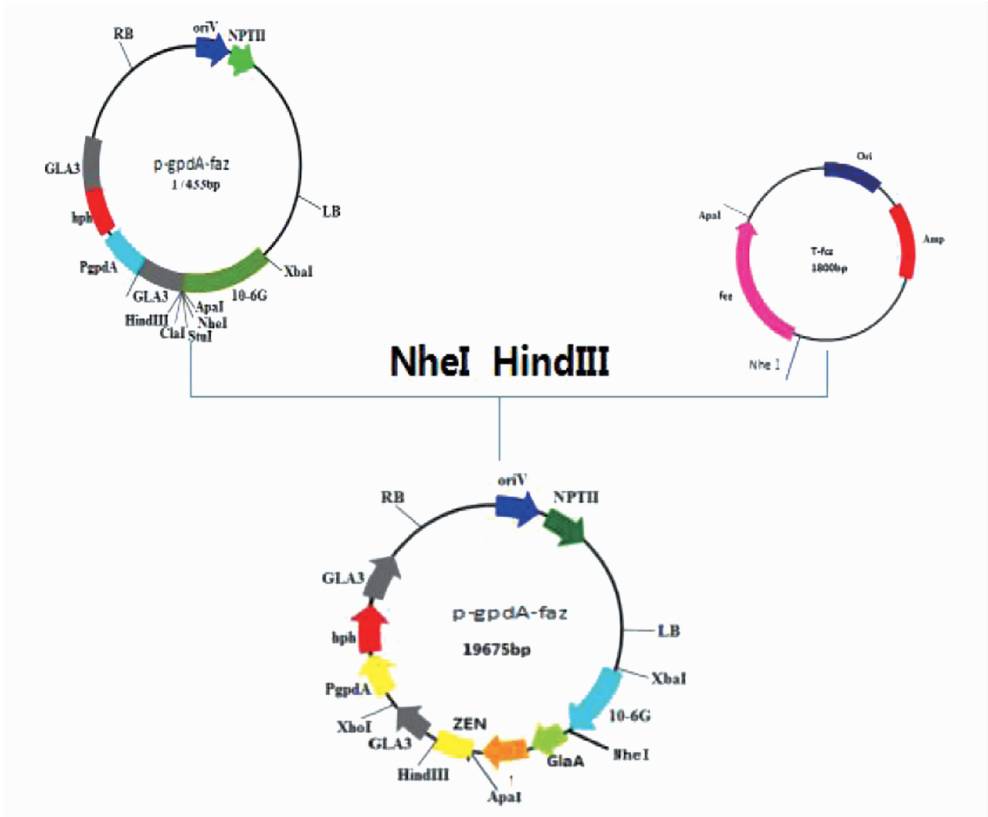
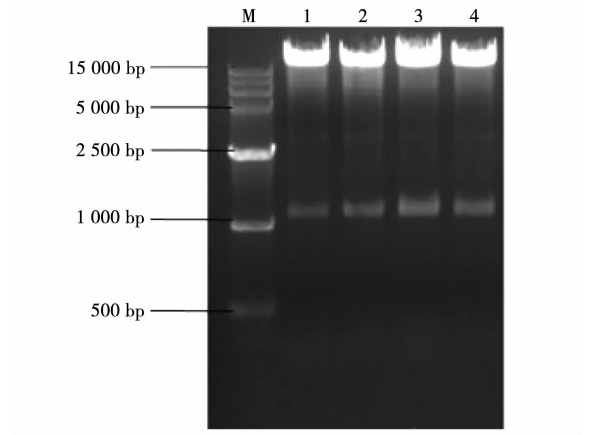


图 2 pSZHG-faz 载体构建

Fig. 2 pSZHG-faz vector construction



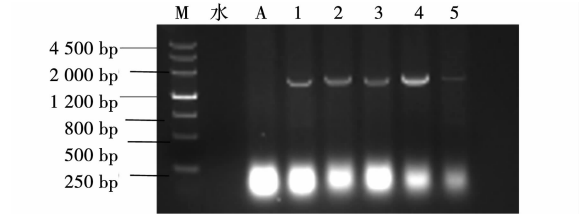
M:DL15000Marker;1,2,3,4 为 NheI、HindIII 酶切鉴定
M:DL15000Marker;1,2,3,4:NheI、HindIII Enzyme Digestion Identification

图 3 pSZHG-faz 载体酶切鉴定

Fig. 3 pSZHG-faz vector enzyme digestion and identification

2.3 同源重组转化子的筛选

选取黑曲霉阳性重组子进行同源重组检测,用 P5、P6 引物对上述 5 株阳性菌株进行 PCR 鉴定,结果全部扩增出 1 700 bp 目的条带(见图 4),



M:DL4500Marker;A 为出发菌株对照;1-5 为 PCR 扩增结果

M:DL4500Marker;A is the contrast of the starting strain;1-5 are PCR amplification results

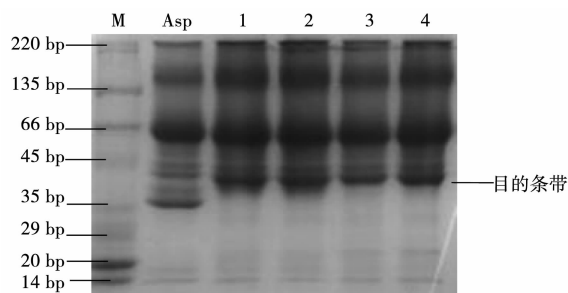
图 4 黑曲霉转化子同源重组鉴定

Fig. 4 Cohomologous recombination identification of *Aspergillus niger*

说明黑曲霉转化子同源重组率达 100%。

2.4 玉米赤霉烯酮降解酶基因重组菌株表达

将发酵液的上清酶液与蛋白 Buffer 混匀煮沸后进行 SDS-PAGE,用黑曲霉出发菌株作为空白对照,将 pSZHG-faz、pSZHG-ZEN 的第 6 天、第 7 天上清液进行 SDS-PAGE 分析(见图 5),从蛋白电泳结果可知,可能由于分泌的目的蛋白大小与出发菌株大小有重叠,但能够明显看出条带浓度明显比出发菌株的条带明亮,因此判定蛋白分泌良好^[4]。



M 为蛋白 Marker; Asp 为出发菌株; 1、2 为 pSZHG-ZEN 第 6、7 天发酵液上清; 3、4 为 pSZHG-faz 第 6、7 天发酵液上清
M is Marker; Asp is the starting strain; 1, 2 are pSZHG-ZEN fermentation liquid for the 6th and 7th day; 3, 4 are pSZHG-faz fermentation liquid for the 6th and 7th day

图 5 pSZHG-faz、pSZHG-ZEN SDS-PAGE

Fig. 5 pSZHG-faz、pSZHG-ZEN SDS-PAGE

SDS-PAGE 的结果,表明 pSZHG-faz 的蛋白表达量微高于 pSZHG-ZEN 的蛋白表达量。

3 讨论与结论

3.1 黑曲霉作为牛凝乳酶表达系统的优势

黑曲霉是丝状真菌的一种,其真核表达系统具有非常良好的特性。本试验采用经改造过的黑曲霉,同时在黑曲霉表达载体的潮霉素抗性基因两侧设计了顺向重复的 1 187 bp 的 3'GLA 序列,可通过这两个 3'GLA 之间的同源重组删除 *hph* 基因,获得符合食品级生产要求的工程菌^[5]。该表达系统的推广应用,可为重组蛋白的工业化生产开辟一条崭新的道路。

3.2 阿魏酸酯酶 *faeA* 融合蛋白对玉米赤霉烯酮降解酶活性的影响

本试验的 pSZHG-faz 表达载体是将玉米赤

霉烯酮降解酶基因与阿魏酸酯酶基因构建在同一载体上,得到两个基因重组后的表达载体,探究阿魏酸酯酶融合蛋白对玉米赤霉烯酮降解酶表达的影响^[6]。试验中将正确的同源重组黑曲霉转化子接入发酵培养基中进行发酵培养,按照 10% 接菌量,在第 3 至 9 天吸取发酵液,计算其酶活力。结果显示 pSZHG-ZEN 载体的 ZEN 降解酶最高发酵酶活力为 383.77 U·mL⁻¹,而融合蛋白表达载体 pSZHG-faz 的 ZEN 降解酶的最高发酵酶活力为 1 378.33 U·mL⁻¹。因此,在现有研究中,如果用以构成融合蛋白的两个酶的编码序列保留完整,则融合蛋白一般均保留所构成的酶分子各自的酶的活性,并且在构建的融合蛋白中,蛋白的正确折叠以及各个酶的活性部位均受到影响,且利用基因融合的方法构成的融合蛋白可对原有基因产生邻近效应,使得融合蛋白酶活力相对于单个基因表达的酶活力提高。

3.3 结论

根据以上结果可以得出结论,阿魏酸酯酶融合蛋白促进了玉米赤霉烯酮降解酶自身分泌,增强了其自身酶活力,即构建融合蛋白的 pSZHG-faz 表达载体表现出更高的表达活力^[7]。本研究为生物降解玉米赤霉烯酮提供了新的方法和途径,具有较强的实践意义和应用价值。

参考文献:

- [1] 熊凯华,程波财,胡威,等.玉米赤霉烯酮降解的研究进展[J].中国粮油学报,2010,25(1):138-142.
- [2] 丁轲,张家宁,韩涛,等.3 种真菌毒素(ZEN、DON 及 T2)完全抗原的合成与鉴定[J].中国食品学报,2015,15(11):170-177.
- [3] 马南.ZEN 降解酶和 DON 降解酶在黑曲霉中的表达[D].哈尔滨:东北农业大学,2016.
- [4] 黎卫强.糖化酶在食品工业中的应用研究进展[J].沿海企业与科技,2010(4):65-66.
- [5] 李学朋,梁琪,师希雄,等.产凝乳酶微生物的研究概况[J].中国酿造,2014(4):13-18.
- [6] Diego Gabriel Nosedá, Matías Recúpero, Martín Blasco, et al. Production in stirred-tank bioreactor of recombinant bovine chymosin B by a highlevel expression transformant clone of *Pichia pastoris*[J]. Protein Expression and purification

cation,2016,65(10):1357-1369.
[7] 杭锋,洪青,王钦博,等.凝乳酶的研究进展[J].食品科学,2016,27(3):273-279.

Application of the Optimized Expression of the Zearalenone Degrading Enzyme

LIU Meng-ran

(College of Life Science,Northeast Agricultural University,Harbin,Heilongjiang 150030)

Abstract: In order to increase the expression quantities of ZEN degrading enzyme,the zearalenone degradation enzyme genes have been amplified by using the PCR method from a zearalenone degradation enzyme sequence and constructed the *Aspergillus niger* expression vector pSZHG-ZEN,vector pSZHG-faeA-ZEN with endogenous fusion protein high expression of ferulic acid esterase gene. The maximal fermentation enzyme activity of pSZHG-ZEN and pSZHG-faeA-ZEN were 383. 77 and 1 378. 33 U·mL⁻¹,it can be inferred that the expression vector of fusion protein has higher vitality.
Keywords: zearalenone; ferulic acid esterase; homologous recombination transformation

(上接第 16 页)

[7] 丁婷,陈丽娟,崔大海.东北夏季降水的年代际特征及环流变化[M].高原气象,2015,34(1):220-229.
[8] 周晓宇,赵春雨,张新宜,等.1961-2009年辽宁省气温、降水变化特征及突变分析[J].干旱区资源与环境,2013,27(10):87-93.
[9] 孙风华,杨素英,任国玉.东北地区降水日数、强度和持续时间年代际变化[J].应用气象学报,2007,18(5):610-618.
[10] 贺伟,布仁仓,熊在平,等.1961-2005年东北地区气温和降水变化趋势[J].生态学报,2013,33(2):519-531.
[11] 李邦东,周旭,赵中军,等.近50年中国东北地区不同类型和等级降水事件变化特征[J].高原气象,2013,32(5):1414-1424.
[12] 梁丰,刘丹丹,王婉昭,等.1961-2013年东北地区夏季降水变化趋势分析[J].水土保持研究,2015,22(5):67-73.

Characteristics of Summer Precipitation Variability in Northeast China in Recent 50 Years

ZHANG Lei

(National Meteorological Information Center,China Meteorological Administration,Beijing 100081)

Abstract: In order to make full use of precipitation resources,the climatological characteristics and trends of precipitation in Northeast China were analyzed,using the monthly precipitation data of 166 meteorological stations from 1961 to 2016. The results showed that the precipitation were 300~400 mm in most of Northeast China,and the spatial distribution characteristics was more in the southeast and less in the northwest. The high values of summer precipitation were in the east of Liaoning province and south of Jilin province,and exceed 600 mm. The summer precipitation in Northeast China had decreased in recent 50 years,which had decreased significantly in the Liaodong Peninsula and southern Changbai Mountain,northwest of Jilin province and central Heilongjiang province,especially part of the region decreased more than -15 mm·(10 a)⁻¹. Summer precipitation increased significantly in southern Jilin province and northeast Liaoning province,with the trends of 10~15 mm·(10 a)⁻¹.
Keywords: precipitation; northeast China; climate change