

# 米曲霉 *pyrG* 基因克隆及其同源转化系统的建立

王金良, 陈宏文\*

(华侨大学 工业生物技术福建省高等学校重点实验室, 福建 泉州 362021)

**摘要:** 建立以乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶基因(*pyrG*)为选择标志, 以米曲霉为宿主菌的同源转化系统。以米曲霉基因组为模板, 通过 PCR 扩增获得 *pyrG* 基因, 将该片段与表达载体 pMD18-T 相连, 转化大肠杆菌 DH 5 $\alpha$ , 经蓝白斑筛选、PCR 快速筛选、酶切和测序验证, 获得重组质粒 pMD-*pyrG*, 完成 *pyrG* 基因的克隆。序列分析表明该基因与米曲霉 KBN616 的 *pyrG* 基因编码序列的同源性为 99.9%, 两者经推导的氨基酸的同源性为 99.6%。以米曲霉 *pyrG* 营养缺陷株为受体菌, 通过 PEG/CaCl<sub>2</sub> 诱导的原生质体转化方法, 将重组质粒导入该受体菌, 使米曲霉 *pyrG* 缺陷株发生基因转化, 成为 *pyrG*<sup>+</sup>, 由此成功建立了以 *pyrG* 为筛选标记基因、同型米曲霉 *pyrG* 基因缺陷株为受体菌的基因转化系统。

**关键词:** 重组质粒; 克隆; 同源转化系统

## *pyrG* Gene Cloning and Establishment of Homologous Transformation System for *Aspergillus oryzae*

WANG Jin-liang, CHEN Hong-wen\*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Fujian Province University, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

**Abstract :** The present paper reports the establishment of homologous transformation system for *Aspergillus oryzae* based on *pyrG* gene as the selective marker. *pyrG* gene was amplified by PCR with *A. oryzae* genome as a template and connected with pMD-18T vector. The product was transformed into *E. coli* DH 5 $\alpha$ . Recombinant plasmid pMD-*pyrG* was verified according to blue-white screening, PCR fast screening, enzyme digestion and sequence identification. Sequence analysis exhibited 99.9 % homology with the *pyrG* gene of *A. oryzae* KBN 616. The deduced homology for amino acids was 99.6 %. Transformation of *A. oryzae pyrG*<sup>-</sup> mutant with recombinant plasmid pMD-*pyrG* by PEG/CaCl<sub>2</sub> method could result in its genetic transformation to become *pyrG*<sup>+</sup> mutant. The establishment of homologous transformation system for *A. oryzae* makes it possible to introduce exogenous gene and analyze its function in the future.

**Key words:** recombinant plasmid; cloning; homologous transformation system

中图分类号: Q785

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)11-0202-04

丝状真菌中的米曲霉, 生长迅速、易于培养, 且有着很高的蛋白质分泌能力, 能够正确进行各种翻译后加工, 并且与高等真核生物类似。米曲霉又是公认的食品安全生产菌株, 发酵及后处理技术成熟, 因此它除了在发酵工业中被用于生产初级、次级代谢产物及酶类产品外, 常常成为进行基因表达和蛋白分泌研究的理想对象<sup>[1-2]</sup>。

为了将待表达的基因导入米曲霉中, 首先需要建立一个稳定有效的基因转化系统。建立米曲霉基因转化系统主要从受体细胞、遗传转化法和选择性标记选择等方面考虑。米曲霉坚硬的细胞壁是遗传转化的主要障碍,

所以转化时一般以原生质体作为受体细胞, 制备原生质体的材料包括幼嫩菌丝、分生孢子和担孢子<sup>[3]</sup>。通常用于米曲霉遗传转化的方法有 PEG/CaCl<sub>2</sub> 法、电击转化及基因枪转化法等<sup>[4]</sup>, 其中 PEG/CaCl<sub>2</sub> 法由于操作难度小、原生质体做为受体细胞具有群体数量大、容易获得纯合性转化子的特点最为常用; 电击法虽操作简便, 但转化效率比较低; 基因枪法的优势在于操作迅速、简单及受体材料广泛且不需制备原生质体, 但其价格昂贵、转化率低、嵌合体不易排除, 因此对于米曲霉采用后两种方法的研究比较少。米曲霉转化的选择性标记有 3 类: 营养缺陷型标记基因、药物抗性标记基因及功能标

收稿日期: 2009-10-13

基金项目: 福建省自然科学基金项目(D0810015); 福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划项目(07FJRC03)

作者简介: 王金良(1984—), 男, 硕士研究生, 研究方向为生物工程、基因工程。E-mail: beisimai@hqu.edu.cn

\* 通信作者: 陈宏文(1969—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为生物工程、基因工程。E-mail: chenhw@hqu.edu.cn

记基因,其中营养缺陷型互补基因转化系统以其低背景生长的特性相比于其他系统更为有效<sup>[5]</sup>,以乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶基因(*pyrG*)作为选择标记并以该基因的缺陷株真菌作为受体的转化系统在国外已被证明是一种十分有效的基因转化系统<sup>[6-7]</sup>,而国内至今鲜有这方面的报道。

米曲霉遗传转化系统的建立为人们从基因水平研究米曲霉的遗传背景和进一步改造菌株提供了条件。通过转化,把外源基因导入丝状真菌,利用基因互补、基因破坏和基因替换等原理,可以研究基因的结构与功能、改良工业生产菌株甚至是改造次生代谢产物合成途径。本实验在完成米曲霉 *pyrG* 基因克隆的基础上,建立以 *pyrG* 为选择标记的基因转化系统,为以后外源基因的导入及其功能研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

野生型菌株 *Aspergillus oryzae* CICC2120 中国微生物工业菌种保存中心;米曲霉 *pyrG* 营养缺陷菌(*pyrG*<sup>-</sup>)、克隆用宿主菌 *E.coli* DH 5 $\alpha$  本实验室保存;载体 pMD18-T Takara 有限公司。

### 1.2 试剂

*Taq* Plus DNA polymerase BBI 公司; *Bam*H I restriction endonuclease、*Hind* III restriction endonuclease Takara 公司;蜗牛酶、纤维素酶 厦门太阳马生物工程有限公司;EZ Spin Column DNA Gel Extraction KIT、EZ Column Plasmid Mini-Preps Kit 上海生工生物工程技术服务有限公司;电泳所用分子质量标准为 Takara 公司与 Fermentas 公司产品。

### 1.3 培养基

大肠杆菌培养及转化分别 LB 和 SOC 培养基;米曲霉培养、米曲霉菌丝体培养、米曲霉再生分别用 2g/100mL G-P、0.5g/100mL G-P、2g/100mL G-P(葡萄糖含量分别为 2、0.5、2g/100mL 的 G-P)高渗再生培养基。

培养基组成成分如下:LB(g/L):蛋白胨 10、酵母膏 5、氯化钠 10;SOC(g/L):蛋白胨 20、酵母提取物 5、氯化钠 0.5、氯化钾 2.5mmol/L、氯化镁 10mmol/L、葡萄糖 20mmol/L;2g/100mL G-P(g/L):蛋白胨 10、葡萄糖 20、磷酸二氢钾 5、硝酸钠 1、硫酸镁 0.5、尿嘧啶、尿核苷各 3mmol/L(尿嘧啶、尿核苷为米曲霉 *pyrG*-所需);0.5g/100mL G-P:葡萄糖含量为 0.5g/100mL 的 G-P;2g/100mL G-P 高渗再生培养基:用 0.8mol/L 氯化钠溶液配制的 G-P 培养基。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 米曲霉基因组提取

米曲霉 CICC2120 基因组的提取采用石英砂研磨法。在参考文献[8]的基础上稍做改动:酚:氯仿:异戊醇抽提除去杂蛋白后,向含样品的离心管中加入 1/10 体积的 3mol/L NaAc(pH5.2)及两倍体积无水乙醇进行沉淀。

#### 1.4.2 *pyrG* 目的基因的获得

通过 Premier Premier 5.0 设计两条引物: *pyrG* 上游引物 P1: 5'-AAATATTCTAGACCCAA GCCGC-3'; *pyrG* 下游引物 P2: 5'-CTATCGTGTGGGAGCCTTATCAG-3'。

以米曲霉基因组为模板,PCR 扩增 *pyrG* 目的基因。PCR 反应体系:10 $\times$  PCR Buffer 2 $\mu$ L, dNTP Mixture(各 2.5mmol/L)0.5 $\mu$ L, 上、下游引物 P1、P2(均为 25pmol/ $\mu$ L)0.2 $\mu$ L, 基因组模板(<0.5 $\mu$ g): 3 $\mu$ L, *Taq* Plus Polymerase (5U/ $\mu$ L)0.5 $\mu$ L, 补加灭菌去离子水至 20 $\mu$ L。PCR 扩增条件:预变性(94 $^{\circ}$ C, 5min), 变性(94 $^{\circ}$ C, 30s), 退火(58 $^{\circ}$ C, 30s), 延伸(72 $^{\circ}$ C, 2min), 30 个循环, 终延伸(72 $^{\circ}$ C, 10min)。获得长度为 1.8kb 的 DNA 片段,目的条带的回收按照胶回收试剂盒说明书进行操作。

#### 1.4.3 重组质粒 pMD-*pyrG* 的构建

*pyrG* 目的片段与 pMD-18T 载体的连接反应按载体说明书进行操作,连接产物转化大肠杆菌 DH 5 $\alpha$ , 蓝白斑筛选与菌液 PCR 初筛后,阳性克隆子用质粒提取试剂盒提取质粒, *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切验证。

#### 1.4.4 重组质粒 pMD-*pyrG* 的序列测定

将酶切验证正确的菌株进行测序,测序由广州英骏生物技术有限公司完成。

#### 1.4.5 米曲霉原生质体的制备

米曲霉 *pyrG*<sup>-</sup>斜面培养 6~7d 至长出孢子,灭菌去离子水洗下孢子,经 4 层擦镜纸过滤制成孢子悬液,接种于 50mL 0.5g/100mL G-P 菌丝体培养基,30 $^{\circ}$ C 静置培养 23~25h,过滤收集菌丝体,用无菌水与 0.8mol/L NaCl 溶液各洗涤 1 次,菌体置于灭菌培养皿中,加入 15mL 酶解液(2g/100mL 纤维素酶、1g/100mL 蜗牛酶、3mmol/L DTT),置 30 $^{\circ}$ C 摇床(80r/min)酶解 3h 左右,每隔 30min 在显微镜下观察原生质体释放情况,待酶解完全后,用 4 层擦镜纸过滤,离心收集原生质体,用 0.8mol/L NaCl 溶液洗涤两次,0.8mol/L NaCl-50mmol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液洗涤 1 次,最后重悬于 100 $\mu$ L 0.8mol/L NaCl-50mmol/L CaCl<sub>2</sub> 中。

#### 1.4.6 米曲霉原生质体 PEG/CaCl<sub>2</sub> 法转化

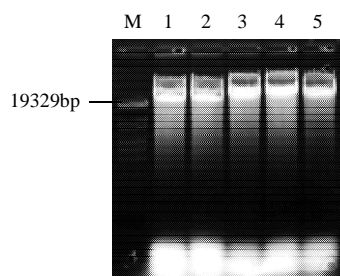
转化过程参考文献[9]进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 米曲霉基因组提取结果

按 1.4.1 节方法提取米曲霉基因组,产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,结果如图 1 所示。电泳图 1 中

基因组 DNA 条带拖带现象说明在提取过程中一部分基因组 DNA 因机械力作用断裂或 DNase 的作用降解弥散了。前沿出现亮带, 说明基因组中残留大量 RNA, 可能是由于加入的 RNase 未能使 RNA 完全去除。但 PCR 对模板 DNA 纯度要求不高, 部分 DNA 降解、断裂对后续 PCR 无影响, 挑选 4 号管基因组 DNA 稀释 60 倍后, 作为 PCR 反应的模板。



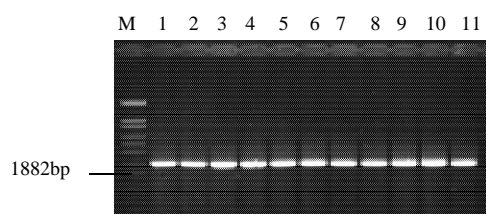
泳道 M.  $\lambda$ -EcoT14 I digest DNA Marker; 泳道 1~5. 米曲霉基因组 DNA。

图 1 *Aspergillus oryzae* CICC2120 基因组 DNA 电泳结果

Fig.1 Electrophoresis results of *Aspergillus oryzae* CICC2120 genome

## 2.2 PCR 扩增获得 *pyrG* 目的片段

由于目的片段在回收过程中会损失一部分, 考虑到后续与载体相连时需要一定量的目的片段, 故添加 11 管反应体系, 进行 PCR 反应, 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 2), 获得长约 1.8kb 的片段, 大小与预期的 1828bp 相符。

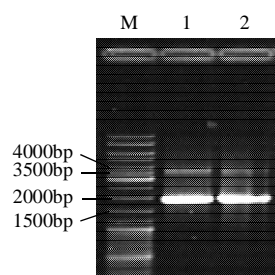


泳道 M.  $\lambda$ -EcoT14 I digest DNA Marker; 泳道 1~11. PCR 产物。

图 2 PCR 扩增 *pyrG* 目的片段电泳结果

Fig.2 Electrophoresis results of PCR amplified *pyrG* gene

## 2.3 *pyrG* 目的片段回收



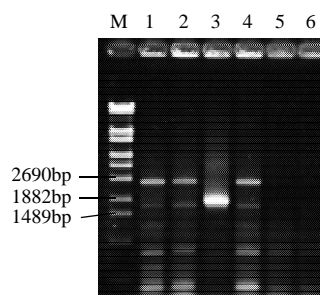
泳道 M. MSM11731 DNA ladder; 泳道 1、2. 回收的 *pyrG* 片段。

图 3 *pyrG* 片段回收的电泳结果

Fig.3 Electrophoresis results of recycled *pyrG* fragment

PCR 扩增产物用胶回收试剂盒回收, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳结果(图 3)除了目的条带外, 在 3500~4000bp 位置处有非特异性条带出现, 经分析, 原因为 DNA 质量浓度过高时在琼脂糖电泳中会出现 1 条二聚体的带, 而非回收过程污染所致, 故回收产物可用于后续与载体相连。

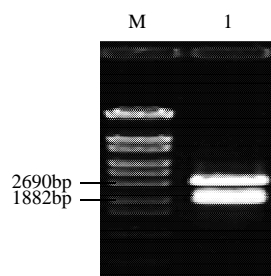
## 2.4 重组质粒 pMD-*pyrG* 的构建



泳道 M.  $\lambda$ -EcoT14 I digest DNA Marker; 泳道 1~4. 白色菌落; 泳道 5、6. 蓝色菌落。

图 4 pMD18-T Vector 与 *pyrG* 连接产物转化子的菌液 PCR

Fig.4 PCR fast screening of ligated product between pMD18-T vector and *pyrG*



泳道 M.  $\lambda$ -EcoT14 I digest DNA Marker; 泳道 1. 质粒 pMD-*pyrG* BamHI 和 Hind III 双酶切。

图 5 pMD-*pyrG* 重组质粒双酶切电泳图

Fig.5 Electrophoresis results of double-digested recombinant plasmid pMD-*pyrG*

*pyrG* 目的片段与 pMD-18T 载体的连接液直接用于转化感受态 *E. coli* DH 5  $\alpha$ , 转化产物涂布 Amp/IPTG/X-Gal 平板, 37℃ 培养 12h, 共长出 6 个单菌落, 4 个白色两个蓝色, 全部进行菌液 PCR, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 4), 结果显示 3 号泳道产物条带位置正确, 初步确定该菌株为阳性克隆, 提取该菌株质粒, 进一步进行双酶切验证, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 5), 产生大小约为 2.69kb 和 1.882kb 两个片段, 与预期的片段大小一致, 进一步说明载体构建正确。

## 2.5 重组质粒 pMD-*pyrG* 序列测定结果

将质粒测序结果提交至 NCBI, NCBI 序列公布号为 GeneBank GQ496621。BLAST 比对显示碱基序列与米曲霉 KBN616 模板序列同源性高达 99.9%。图 6 为米曲霉

CICC 2120 经推导的 *pyrG* 基因编码氨基酸序列结果, 与米曲霉 KBN616 模板氨基酸序列同源性为 99.6%。它仅在一个部位(灰影部位)与米曲霉 KBN616 同源氨基酸存在差异。

```

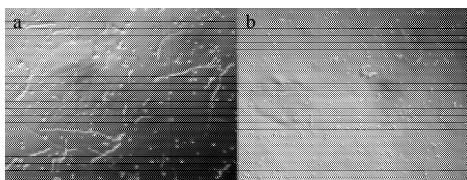
1  MSSKSQLTYSARASKHPNALVKKLFEVAEAKKTNVTVSADVTTTKELLDL
51  ADRLGPYIAVIKTHIDILSDFSEETITGLKALAEKHNFILFEDRKFDIG
101 NTVQKQYHGGTLRISEWAHIINCSILPGEIGIVEALAQTAEDFPYGSE
151  GLLILAEMTSKGLATGQYTTSSVDYARKYKFFVMGFVSTRHLGEVQSEV
201  SSPSEEDFVVFTTGVNLSKGDGLGQQYQTPESAVGRGADFIAGRGIY
251  AAPDPVEAAQYQKEGWDAYLKRVAQ
  
```

图 6 米曲霉 CICC 2120 经推导的 *pyrG* 基因编码氨基酸序列

Fig.6 Results of deduction of amino acid sequence encoded by *pyrG* gene in *A. oryza* CICC 2120

## 2.6 米曲霉原生质体制备

菌丝体酶解 2h 后, 可观察到已有不少原生质体形成, 原生质体的释放方式由菌丝顶端开始逐渐膨大, 内容物由此逸出, 并逐渐脱离菌丝形成原生质体, 随着酶解时间的增加, 大部分菌丝被酶解成为片段(图 7a), 此时原生质体从菌丝顶端及侧面的细胞壁破口处脱出形成、释放, 并以从侧面细胞壁破口释放原生质体为主, 经过滤去除未酶解菌丝体后的原生质体如图 7b 所示。



a. 酶解 3h 时原生质体释放情况; b. 经过滤去除未酶解菌丝体后的原生质体。

图 7 显微镜下观察原生质体释放情况(10 × 16)

Fig.7 Release of protoplasts examined under microscope (the magnitude of cell enlargement: 10 × 16)

## 2.7 米曲霉的同源转化

用构建好的重组质粒 *pMD-pyrG* 转化 *pyrG* 缺陷株 P5, 30℃ 培养 3~5d 后, 在不含尿嘧啶的平板上获得近 200 个转化子, 转化率约为每微克 DNA 70~100 个转子。同时也观察到至少数倍的未成形流产转化子, 对转化子连续传 5 代培养, 它们的生长特性均十分稳定。

## 3 讨论

乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶是尿嘧啶核苷酸合成中

一种关键性酶, 缺乏该酶的 *pyrG* 缺陷株在不含尿嘧啶核苷的培养基上无法生长。通过基因转化, 向其导入含 *pyrG* 基因的质粒, 可使其获得在不含尿嘧啶核苷培养基上生长的能力, 若将需要导入的基因连接在该质粒上, 此时 *pyrG* 可作为该基因是否导入的标志<sup>[10]</sup>。为了在米曲霉中建立一种以 *pyrG* 为筛选标记的同源转化系统, 在完成 *pyrG* 基因的克隆后, 用重组质粒转化 *pyrG* 营养缺陷型菌株, 使其由 *pyrG*<sup>-</sup> 转化为 *pyrG*<sup>+</sup>, 可在不含尿嘧啶核苷的培养基上生长, 在该质粒编码半乳糖苷酶的下流有多克隆位点, 外源基因可插入进行表达。

米曲霉遗传转化系统的建立, 为从分子水平上为研究基因表达调控和蛋白质分泌提供了基础。最近几年来, 真菌遗传转化系统以及选择标记的日趋成熟使得越来越多的丝状真菌被成功的转化, 为研究丝状真菌的分子生物学特征提供了大量有用的信息。准确的分子生物学研究结果必将促进丝状真菌的研究, 对真菌生物工业的发展有着不可估量的作用。

## 参考文献:

- [1] 刘丽萍, 刘丽华. 米曲霉研究进展与应用[J]. 中国调味品, 2008(4): 28-32.
- [2] 李方方, 番丽. 米曲霉基因表达研究进展与应用[J]. 中国酿造, 2008(12): 1-3.
- [3] 李娟, 杨金奎, 梁连铭, 等. 丝状真菌遗传转化系统研究进展[J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(4): 516-520.
- [4] OLMEDO-MONFIL V, CORTÉS-PENAGOS C, HERRERA-ESTRELLA A. Three decades of fungal transformation key concepts and applications[J]. Methods Mol Biol, 2004, 267: 297-313.
- [5] LONG Hao, WANG Tianhong, ZHANG Yingkuan. Isolation of *Trichoderma reesei pyrG* negative mutant by UV mutagenesis and its application in transformation[J]. Chem Res Chinese Universities, 2008, 24(5), 565-569.
- [6] SKROY C D, HOMG J H, PESTKA J J, et al. Transformation of *Aspergillus parasiticus* with a homologous gene (*pyrG*) involved in pyrimidine biosynthesis[J]. Molecular Microbiology, 1990, 56(11): 3315-3320.
- [7] WEIDNER G, d'ENFERT C, KOCH A, et al. Development of a homologous transformation system for the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* based on the *pyrG* gene encoding orotidine 5'-monophosphate decarboxylase[J]. Curr Genet, 1998, 33(1/2): 378-385.
- [8] 袁洪水, 李术娜, 张爱莲, 等. 石英砂研磨法快速提取顶头孢霉染色体 DNA[J]. 河北农业大学学报, 2007, 30(5): 8-11.
- [9] INEKE E M, SHIELA U, JIM R K, et al. Transformation of *Aspergillus oryzae* using the *A. niger pyrG* gene[J]. Mol Gen Genet, 1987, 210(3): 460-461.
- [10] 刘钟滨, JEENES D J, ARCHER D B, 等. 黑曲霉菌为宿主菌的重组表达性质粒的构建[J]. 同济大学学报, 2001, 22(3): 1-3.