文章编号: 1673-1689(2011)01-0124-07

分枝犁头霉 WL511 热稳定 α-半乳糖苷酶基因克隆及序列分析

李 荷[1,2], 游 娟[1], 顾取良[1], 刘玉焕[2]
(1. 广东药学院 基础学院, 广东 广州 510006; 2. 中山大学 生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 构建并筛选耐热分枝犁头霉 cDNA 文库获得 639 bp 热稳定 α-半乳糖苷酶基因片段, 并以 5′-RACE 和 3′- RACE 技术获得上下游片段 1 817 bp 和 1 092 bp, 拼接得 α-半乳糖苷酶全长序列 2 228 bp, 其完整开放读码框为 2 142 bp, 编码 713 个氨基酸, G+ C 含量 43 %; 产物预测等电点 5.2, 预测相对分子质量 81 000。该基因(GenBank No. DQ234280)属 α-半乳糖苷酶 36 家族, 与其他来源的 α-半乳糖苷酶基因同源性较低, 与链霉菌 *Streptomyces avermitilis* MA-4680 的 α-半乳糖苷酶同源性最高为 38%。

关键词: 热稳定 α-半乳糖苷酶基因; 克隆; 序列分析
中图分类号: Q 78 文献标识码: A

Cloning and Sequence Analysis of a Thermostable α-Galactosidase Gene of *Absidia ramose* WL511

LI He[1,2], YOU Juan[1], GU Qu-liang[1], LIU Yu-huan[2]
(1. School of Basic Courses, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. College of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: A DNA clone containing α-galactosidase gene fragment (639 bp) was isolated from the constructed cDNA library of Absidia ramose WL511. The 5'-RACE and 3'-RACE techniques confirmed this gene' s upstream and downstream sequences (1817 bp, 1092 bp) Sequences analysis revealed that this gene with the full length of 2228 bp made a complete open reading frame of 2142 bp encoding a polypeptide of 713 amino acid residues with predicted molecular mass of 81 kDa and predicted pI of 5.2. This gene (GenBank No. DQ234280), belonging to α-galactosidase 36 family, showed a very low homology with other sources of α-galactosidase genes. The most similarity was 38 % between the α-galactosidases of *Streptomyces avermitilis* MA-4680 and *A. ramose* WL511.

Key words: thermostable α-galactosidase gene, cloning, sequence analysis

收稿日期: 2010-03-24
基金项目: 国家自然科学基金项目(30570055); 广东省科技攻关项目(2009B020313005); 广东省自然科学基金博士启动基金项目(9451022401003873); 广东药学院博士启动项目(2006JCX06)。
作者简介: 李荷(1968-), 女, 黑龙江绥化人, 理学博士, 副教授, 主要从事微生物分子生物学的研究。Email: li-he32@163.com

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

α-半乳糖苷酶(α-galactosidase, EC3.2.1.22), 也称蜜二糖酶, 是催化 α-半乳糖苷键水解的酶类, 催化移除不同底物中 α-连接的末端非还原性 D-半乳糖, α-半乳糖苷存在于豆科植物中, 主要包括棉子糖、水苏糖和毛蕊花糖。这些寡糖不能被单胃动物消化道内的内源酶降解, 只有经过肠道内产气微生物发酵后才能被利用, 易引起胀气等疾病, 影响动物对营养物质的消化与吸收。添加 α-半乳糖苷酶是去除豆粕中 α-半乳糖苷寡糖类抗营养因子的首选[1-2], 此外, α-半乳糖苷酶还广泛应用于制糖、食品和医疗卫生行业[3-5]。

α-半乳糖苷酶在微生物、植物、动物和人体内广泛存在, 获得的这些性质各异的半乳糖苷酶, 不仅具有在不同领域的实际应用价值, 也为研究其结构和功能提供了良好的材料。目前, 微生物来源的 α-半乳糖苷酶研究得比较深入, 特别是丝状真菌 α-半乳糖苷酶, 因其具有合适的 pH 值、良好的稳定性、胞外分泌和高表达量的特点而成为研究热点。其中黑曲霉、木酶、青霉、被包霉等来源的 α-半乳糖苷酶已被分离纯化和鉴定分析。[6-8]

作者从发酵的豆粕中筛选到一株产热稳定 α-半乳糖苷酶的分枝犁头霉菌株, 并构建 cDNA 文库成功筛选到 α-半乳糖苷酶基因 *aga*[9], 在此基础上对基因序列进行分析。

1　材料和方法

1.1　材料

1.1.1　菌种和质粒　分枝犁头霉 *A. ramosa* WL511 由本实验室筛选保存; 大肠杆菌 *E. coli* DH5α, 大肠杆菌 TG1 为作者所在实验室保存。

1.1.2　试剂与培养基　Trizol: GIBCO-BRL 公司产品; Creator™ SMART™ cDNA 文库构建试剂盒: Clontech 公司产品; Invitrogen GeneRacer kit, 感受态细胞 DH10B: Invitrogen 公司产品; 随机引物标记试剂盒: Gibco 公司产品; 真菌 DNA 提取试剂盒: Qiagen 公司产品; Taq™ DNA 聚合酶、*LA* Taq DNA 聚合酶和 pGEM-T 载体: Promega 公司产品; 质粒提取试剂盒: Takara 公司产品; 基因特异引物: 上海博亚生物技术有限公司合成。

LB 液体及固体培养基: 质量分数 1% 胰蛋白胨, 质量分数 0.5% 酵母粉, 质量分数 0.5% NaCl, 调 pH 至 7.0。

1.2　方法

1.2.1　耐热分枝犁头霉 cDNA 文库的构建　根据 Invitrogen 公司 Concert Plant RNA kit 说明书提取耐热分枝犁头霉 RNA, 进行 RT-PCR 之前, 用无 RNase 的 DNase I 处理, 确保总 RNA 中无 DNA 的污染。依据 Clontech SMART™ Library 说明书的方法合成 cDNA, 并连接到相应的载体, 进行文库转化、效价测定和文库扩增。参照 TaKaRa 公司质粒提取试剂盒说明书提取文库中的质粒, 并对其进行 PCR 鉴定, 随机抽取一部分插入不同片段的质粒测序。

1.2.2　RT-PCR 和 RACEs　基于已获得的热稳定 α-半乳糖苷酶基因部分保守区域序列, 设计一对有重叠序列的基因特异引物, 其内部设计了两个特异引物(GSP), GSP1: 5′-TGGACT-GAAGGGTCGTGTCAACCT-3′ 和 GSP2: 5′-CCAGCCATCATCAATAACAAACA-3′, 两引物间的重叠区域为 640bp。5′-PCR 引物(5′-AAG-CAGTGGTATCAACGCAGAGT-3′, SMART™ Library Construction Kit 提供)和 GSP2 引物用于扩增 cDNA5′- 端, CDS ㊈3′- PCR 引物和 GSP1 引物用于扩增 cDNA 3′- 端, 然后以重叠延伸法将 cDNA 5′-和 3′- 端连接(图 1)。

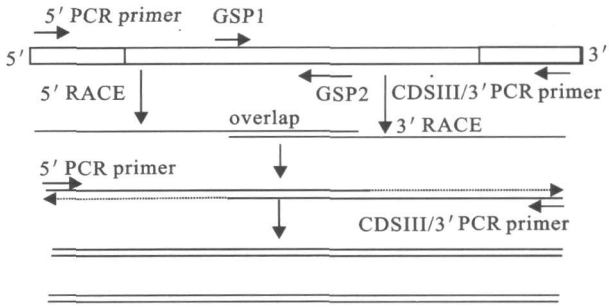


图 1　**RACE** 与重叠延伸结合克隆全长 **cDNA** 策略

Fig. 1　Strategies for cloning the full-length cDNA by RACE and splicing overlap extension PCR

提取目的 RNA, 按 Invitrogen GeneRacer kit 方法对 RNA 进行去磷酸化, 并除去 mRNA 的帽子结构, 再与 RNA Oligo 连接, 进行反转录, cDNA 末端扩增, 5′ RACE 及 3′ RACE 扩增, 重叠延伸扩增获得目的基因的全长 cDNA, 按照 Promega Kit 方法进行 PCR 产物的克隆和测序。

1.2.3　重组克隆的筛选和鉴定　挑选生长良好的菌落, 接种于 5 mL LB 液体培养基(Amp 100 μg/mL), 37 ℃ 震荡培养过夜。提取质粒 DNA 再进一步鉴定。将有目的带的质粒送到上海博亚公司测序。

1.2.4　利用测序结果设计引物扩增基因组　根据已获得耐热 α-半乳糖苷酶基因序列设计特异引物 F: aag cat ccc tct ttc gag aca tg, R: CAC ATT TAA TCG TAT GAC TCT。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2 结果与分析

2.1 分枝犁头霉 cDNA 文库的构建

2.1.1 分枝犁头霉总 RNA 提取 采用 Invitrogen 公司的 RNA 提取试剂盒提取分枝犁头霉总 RNA，经电泳检测，18 S 和 28 S RNA 带型清晰可辨(图 2)。

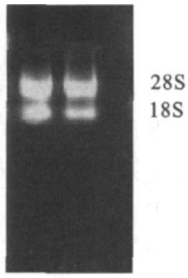
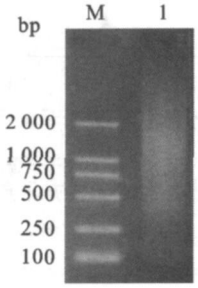


图 2 分枝犁头霉总 RNA 电泳

Fig. 2 Total RNA of Absidia ramose WL511

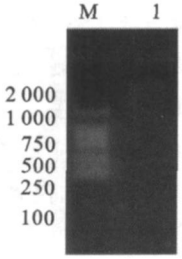
2.1.2 双链 cDNA 合成及片段大小分离 文库构建中，合成高质量全长双链 cDNA 是建库的一个关键。作者采用 SMART 技术和 LD-PCR 技术直接由总 RNA 合成全长 cDNA，LD-PCR 法合成的双链 cDNA 经电泳检测，大小约分布在 200~ 3 000 bp，表明 cDNA 合成质量较好(图 3)。合成的总 cDNA 过层析柱以除去小片段，有利于文库筛选到理想大小的片段(图 4)。



1: Double strands cDNA; M1: DL-2000; M2: λDNA/*Hind*III

图 3 分枝犁头霉 LD-PCR 法合成的双链 cDNA

Fig. 3 Double stranded cDNA of *Absidia ramose* WL511 by LD-PCR Synthesis



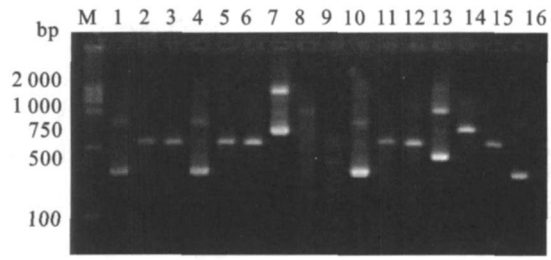
M: DL2000

图 4 分枝犁头霉过柱分级后的双链 cDNA 电泳图

Fig. 4 Double stranded cDNA by column chromatography

2.1.3 文库质量检测 DNA 合成后用 SfiIA/B 酶切两个接头，切出不对称粘性末端，过层析柱除去小于 400 bp 的片段，然后与 pDNR-LIB 载体臂连接。3 个连接体系连接产物经电激转化，得到耐热分枝犁头霉质粒文库。

3 个连接体系得到的原始文库滴度，分别为 3.68×10^5、6.53×10^5 和 5.64×10^5 克隆，总的原始文库滴度为 1.49×10^6 克隆数。PCR 筛选法测定文库重组率为 97 %。随机挑取 16 个原始文库单菌落，PCR 法鉴定插入片段的大小，电泳显示插入片段大小在 40~ 2 000 bp 左右，平均约在 500~ 1 200 bp 之间(图 5)。用滴度为 1.49×10^6 pfu/mL 的原始文库进行扩增，最后测得扩增文库的滴度为 1.28×10^{10} pfu/mL。



1-7, 9-15: inserted fragment; 8-16: DL2000 DNA Marker

图 5 分枝犁头霉 cDNA 文库插入片段大小检测

Fig. 5 Detection of sizes of inserted fragment in cDNA library from Absidia ramose WL511

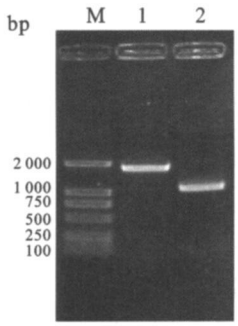
2.1.4 EST 序列测定结果的分析 共扩增并测序了 48 个克隆，用 BLASTX 程序与 GenBank 数据库比较，获得了和 α-半乳糖苷酶基因同源性片段 639 bp，为进一步获得 α-半乳糖苷酶全长基因提供重要信息。

2.2 RACE 扩增

RACE 扩增后电泳显示 5′-RACE 和 3′-RACE 产物长度分别为 1.8 kb 和 1.0 kb (图 6)，而重叠延伸产物长 2.2 kb。为验证克隆序列正确性，不仅克隆了重叠延伸产物，并分别克隆 5′- RACE 和 3′-RACE 产物(图 7)，测序证明是全长基因的序列(图 8)与 5′-RACE 和 3′- RACE 产物的序列相一致。

为使测序结果相互验证，同时将重叠延伸 PCR 产物和 5′-RACE 和 3′-RACE 产物进行测序，结果显示，重叠延伸 PCR 扩增产物序列与 5′-RACE 和 3′-RACE 分别测序后拼接序列结果一致。

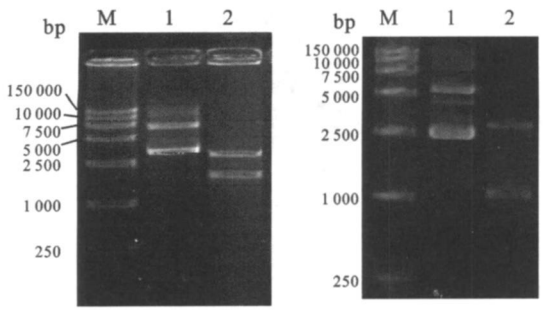
© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



M: DL2000 DNA Marker; 1: 5′-RACE; 2: 3′-RACE

图 6　分枝犁头霉α-半乳糖苷酶基因 5′-RACE 和 3′-RACE 结果

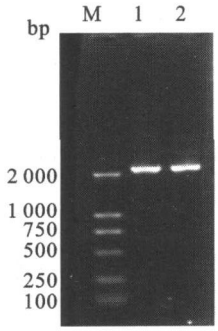
Fig. 6　Amplification of 5′-RACE and 3′-RACE aga of *Absidia ramose* WL511



M: DL15000 DNA Marker; 1: plasmid; 2: 5′- RACE(左); 3′-RACE(右)

图 7　重组质粒 5′-RACE 和 3′-RACE 酶切分析

Fig. 7　Digestion and identification of recombinant 5′-RACE and 3′- RACE



M: DL2000 DNA Marker; 1, 2: Products of overlap

图 8　重叠延伸扩增全长 cDNA

Fig. 8　Splicing overlap extension amplification of full-length cDNA

2.3　重叠延伸后重组子 pGEM-aga 的构建及鉴定

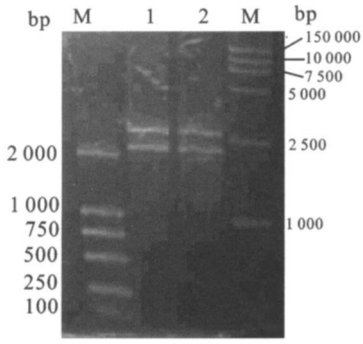
经重叠延伸拼接 PCR 产物, 经割胶回收后, 纯化产物与 pGEM-T-载体连接, 产物命名为 pGEM-aga。酶切鉴定该重组子(图 9), 并将序列送上海博亚公司测序。与预期结果相符。

2.4　基因组 PCR 扩增

基因组 PCR 扩增见图 10。

2.5　基因组与载体连接

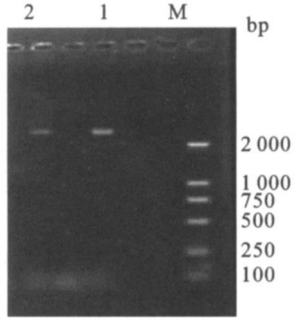
根据获得的α-半乳糖苷酶的全长基因设计引物, 利用基因组进行 PCR 扩增, 获得 2.6 kb 的 PCR 产物, 纯化回收与 pGEM-T 连接, 鉴定后测序。



M: DL2 000 DNA Marker; M: DL 15 000 DNA Marker; 1-2: pGEM-aga (EcoR iv)

图 9　重组克隆载体 pGEM-aga 的酶切鉴定

Fig. 9　Digestion and identification of the vector pGEM-aga



M: 2000 marker; 1-2: The fragments of amplification

图 10　分枝犁头霉基因组 PCR 扩增

Fig. 10　PCR amplification of Absidia ramose WL511 genome

2.6　内含子分析

对获得的耐热分枝犁头霉 WL511 的α-半乳糖苷酶基因 cDNA 序列(全长 2 228 bp)与基因组 DNA(2 623 bp), 在 NCBI 网站在线比对分析, 发现该基因有 6 个内含子, 分别在 WL511α-半乳糖苷酶基因 cDNA 序列的以下位点引入: 第一个内含子在 cDNA 序列的 566 个碱基处引入, 位于基因组序列 621-681 碱基位置, 第二个内含子在 cDNA 的 1093 个碱基处引入, 基因组位置是 1205-1069, 第三个内含子在 cDNA 的 1233 位碱基处引入, 基因组位置 1209-1465, 第四个内含子在 cDNA 的 1304 位碱基处引入, 基因组位置 1533-1593, 第五内含子在 cDNA 的 1440 位碱基处引入, 基因组位置 1724-1793, 第六个内含子在 cDNA 的 1704 位碱基处引入, 基因组位置 2060-2117。

© 1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.7 α-半乳糖苷酶基因的分子特征

克隆的α-半乳糖苷酶的 cDNA 序列(GenBank accession number DQ234280)共 2 228 bp，开放读码框为2 142 bp，可编码区编码 713 个氨基酸，G+C 含量 43%，其产物的等电点预测为 5.2，预测分子量约为81 000。和已发表的α-半乳糖苷酶序列进行比对，显示该基因和α-半乳糖苷酶的第 36 家族序列较为相似性[11-13]，与 27 家族的 Coffen bean[14]，Saecharomyce scerevisiae[14]，Aspergillus niger(AglA)[15] 没有相似性，结果显示 Absidia ramosa WL511 的α-半乳糖苷酶属于 36 家族(图 11 和 12)。

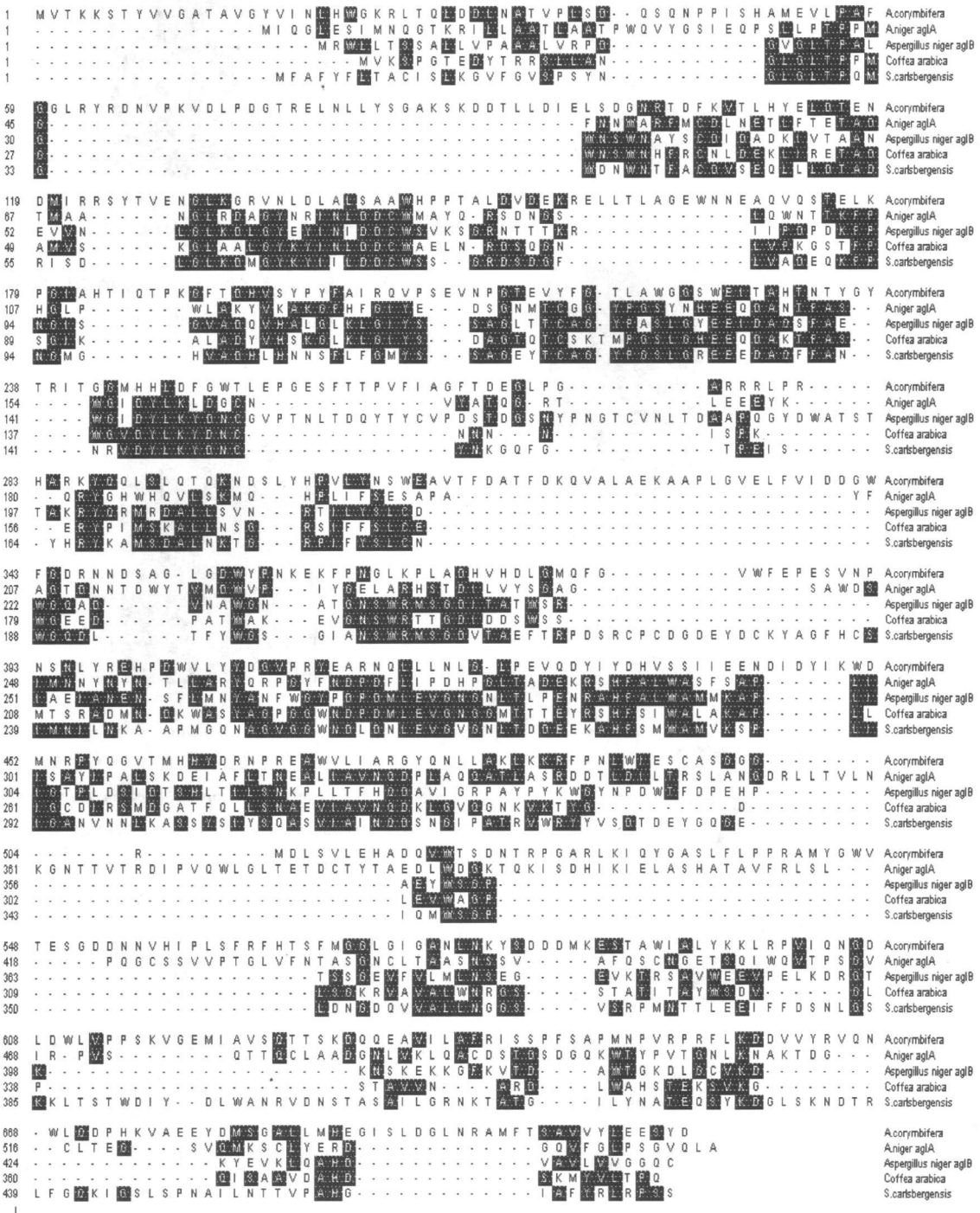


图 11 分枝犁头霉 α-半乳糖苷酶氨基酸序列与 27 家族的比对(以 DNA Star 软件比对)

Fig. 11 Comparison of the amino acid sequences of α-galactosidases with those of family 27. Selected species of family 27 for comparison of amino acid sequence: *Aspergillus niger* aglA, *Aspergillus niger* aglB, *S carlsbergensis* and Coffea arabica

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

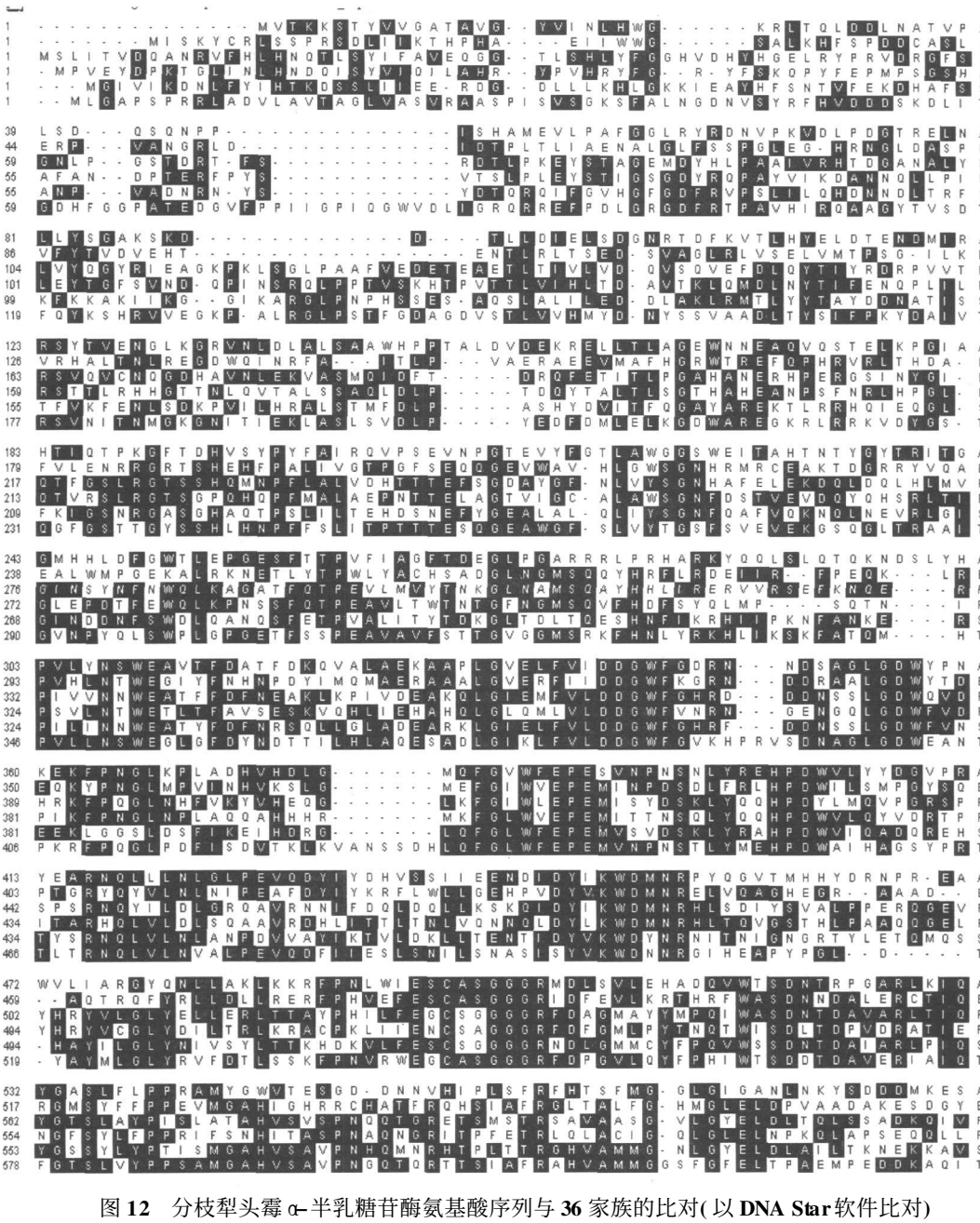


图 12　分枝犁头霉 α-半乳糖苷酶氨基酸序列与 36 家族的比对(以 DNA Star 软件比对)

Fig. 12　Comparison of the amino acid sequence of α-galactosidases with those of family 36 Selected species of family 36 for comparison of amino acid sequence: *T. reesei* agl, *P. pentosaceus* aga1, *S. mutans* and *E. coli* rafA (以 DNA Star 软件比对)

3　结　语

利用 cDNA 文库筛选及 RACE 技术获得 WL511 的α-半乳糖苷酶的全长基因。根据酶的初级结构相似性和疏水性的分析, 编码 α-半乳糖苷酶的基因已经被分类为 3 个不同的糖基水解酶家族[12], 大部分真核来源的 α-半乳糖苷酶包括 A. niger AglA[15] 和 AglB[16] 属于第 27 家族, 第 36 家族主要包含了细菌来源的 α-半乳糖苷酶, 而源于第 4 家族 α-半乳糖苷酶目前为止仅在细菌中被发现。对比 36 家族和 27 家族的结果表明二者具有较远的亲缘关系, 从而形成超级家族[17]。本文克隆了α-半乳糖苷酶基因, 经过 DNA star 软件比对, 显示该酶属于第 36 家族, 它的氨基酸序列和第 36 家族的 *Trichoderma reesei* AGL11、*P. pentosaceus* aga1 and *S. mutans*, and *E. coli* rafA[13] 有同源性。大部分 36 家族的 α-半乳糖苷酶都是由四个亚基组成的大分子量的酶蛋白[18-19], 在第 36 家族中两个真菌来源的 α-半乳糖苷酶, 包括 *T. reesei* AGL11[8] 和 *A. niger* α-gal[16], 对蜜二糖和绵子糖类的寡糖具

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

有特异性, 对多聚合体底物则活性较少或没有活性, 其它一些 36 家族 α-半乳糖苷酶仅对小分子的寡糖有催化活性。在今后的研究中, 第 36 家族和 27 家族的 α-半乳糖苷酶在底物偏好性上的差异, 是否具有普遍意义, 有待于进一步验证。

参考文献(References):

[1] 郑爱娟, 郑树贵, 杨桂芹. 大豆抗营养因子及其消除方法[J]. 畜牧业, 2002, 1: 29- 31.
ZHENG Ai-juan, ZHENG Shu-gui, YANG Gui-qin. Soybean antinutritional factors and the way of getting rid of it[J]. **Livestock and Poultry Industry,** 2002, 1: 29- 31.

[2] 于桂阳. α-半乳糖苷酶在猪日粮中的应用[J]. 畜禽业, 2006, 203: 22- 25.
YU Gui-yang. Application of α-Galactosides enzyme in pigs feed[J]. **Livestock and Poultry Industry,** 2006, 203: 22- 25.

[3] 梁素钰, 郑学勤. 具血型转换功能的咖啡 α-半乳糖苷酶基因的克隆与表达[J]. 遗传, 2005, 27: 759- 764.
LIANG Su-yu, ZHENG Xue-qin. Cloning and expression of α-D-galactosidase with B→O seroconversion from coffee bean (*Coffea liberica* & *Coffea canephora*)[J]. **Hereditas,** 2005, 27: 759- 764.

[4] 崔玉, 杨军, 詹林盛. 咖啡豆 α-半乳糖苷酶基因在大肠杆菌 JM83 中可溶性表达、纯化及活性检测[J]. 感染、炎症、修复, 2007, 8: 75- 78.
CUI Yu, YANG Jun, ZHAN Lin-sheng. Soluble expression, purification and bioactivity assay of coffee bean α-galactosidase in *E. coli* JM83[J]. **Infection Inflammation Repair,** 2007, 8: 75- 78.

[5] Dhananjay S K, Mulimani V H. Purification of α-galactosidase and invertase by three-phases partitioning from crude extract of *Aspergillus oryzae* specificities[J]. **Biotechnol Lett,** 2008, 30: 1565- 1569.

[6] King M, Yernool D, Eveleigh D, et al. Thermostable alpha-galactosidase from *Thermologa neapolilana*: cloning, sequencing and expression[J]. **FEMS Microbiol Lett,** 1998, 163: 137- 142.

[7] King M, Yernool D, Eveleigh D, et al. Thermostable alpha-galactosidase from *Thermologa neapolilana*: cloning, sequencing and expression[J]. **FEMS Microbiol Lett,** 1998, 163: 137- 142.

[8] Ramalingam, Saraswathy N, Sadasivam S, et al. Purification and properties of alpha-galactosidase from white-rot fungus Pleurotus florid[J]. **Indian J Biochem Biophys,** 2007, 44(2): 76- 81.

[9] Li H, Liang W, Wang Z, et al. Enhanced production and partial characterization of thermostable α-galactosidase by thermotolerant *Absidia sp*. WL511 in solid-state fermentation using response surface methodology[J]. **World J Microbiol Biotechnol,** 2006, 22: 1- 7.

[10] Henrissat B, Romeu A. Families, superfamilies, and subfamilies of glycosyl hydrolase[J]. **Biochem J,** 1995, 311: 350- 361.

[11] Henriddat B, Bairoch N. A New families in the classification of glycosy hydrolase based on amino acid sequence similarties[J]. **Biochem, J,** 1993, 293: 781- 788.

[12] Margolles C E, Tenkanen M, Luonteri E, et al. Three α-galactosidase genes of Trichoderma ressei cloned by expression in yeast[J]. **Eur, J Biochem,** 1996, 240: 104- 111.

[13] Zhu A, Monahan C, Zhang Z, et al. High-level expression and purification of coffeebean alpha-galactosidase produced in the yeast Pichia pastoris[J]. **Arch Biochem Biophys,** 1995, 324: 65- 70.

[14] Summner-Smith M, Bozzato RP, Skipper N, et al. Analysis of the inducible MeL1 gene of Saccharomyces carlsbergensis and its secreted product, α-galactosidase(melibiase) [J]. **Gene,** 1985, 36: 333- 340.

[15] Den H, Rosell IF, Zullen CM, et al. Cloning and expression of a member of the *Aspergillus niger* gene family encoding α-galactosidase[J]. **Mol Gen Genet,** 1992, 233: 404- 410.

[16] De Vries RP, van den Broeck HC, Deckers E, et al. Differential expression of three Aspergilus niger[J]. **Appl Environ Microbiol,** 1999, 65: 2453- 2460.

[17] Dagnall BH, Paulsen IT, Saier MH. The DAG family of glycosyl hydrolases combines two previously identified protein families[J]. **Biochem J,** 1995, 311: 349- 50.

[18] Aduse-Opoku FJ, Russell R. Biochemical and genetic analysis of streptococcus mutans R-galactosidase[J]. **J Gen Microbiol,** 1991, 137: 757- 764.

[19] Fridjonsson O, Watzlawick H, Gehweiler A, et al. Cloning of the gene encoding a novel thermostable α-galactosidase from thermus brockianus ITI360[J]. **Appl Environ Microbiol,** 1999, 65: 3955- 3963.

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net