

草菇胞外高丰度蛋白质的分离测序 及 cDNA 片段克隆

罗楚平, 邵蔚蓝

(南京师范大学生命科学学院, 210097, 江苏, 南京)

[摘要] 经过柱层析, 从以稻草粉为基质培养的草菇 (*Volvariella volvacea*) 摇瓶发酵液中纯化了 HEP1 (high expressional protein 1) 和 HEP2 (high expressional protein 2) 两个在胞外高丰度存在的蛋白质。SDS-PAGE 电泳和分子筛层析的结果表明 HEP1 和 HEP2 的相对分子质量分别是 52.6×10^3 和 26.2×10^3 , 且都是单亚基。其中 HEP1 经过酶解印迹后对肽段 N 端前 15 个氨基酸进行测序。根据测序结果设计简并引物, PCR 扩增到一条长约 750 bp 特异核酸条带。克隆测序后, 该 cDNA 片段经 GenBank 多序列比对, 未发现其属于某个特定的基因家族。

[关键词] 草菇, 分离纯化, 蛋白质测序, 启动子

[中图分类号] Q522, [文献标识码] A, [文章编号] 1001-4616(2005)03-0074-05

Purification of Two High Expressional Exocellular Proteins From *Volvariella Volvacea* and Cloning one of Cdnd Fragments

Luo Chuping, Shao Weilan

(School of Life Science, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, China)

Abstract: Two exocellular proteins, HEP1 and HEP2 are abundant in fermentation broth, were purified from straw powder culture of *Volvariella volvacea* through protein chromatograph methods. The result of SDS-PAGE and gel filtration indicated that HEP1 and HEP2 are both composed of one polypeptide with the molecular mass of 52.6×10^3 and 26.2×10^3 , respectively. The HEP1's fifteen amino acid residues of N-terminal was determined. Degenerated primers designed according to the N-terminal amino acid, The 750 bp cDNA fragment was amplified with degenerated primers and aligned with GenBank. The orthologous sequences wasn't found.

Key words: *Volvariella volvacea*, protein purification, amino acid residues of N-terminal, promoter

0 引言

丝状真菌由于具有(1)生长基质广泛, 转化能力强, 外泌蛋白质能力强; (2)对合成的外源真核蛋白质比酵母更能正确的进行各种翻译后加工, 包括肽链剪切和糖基化; (3)其发酵工艺及下游加工技术已完善建立起来这为基因工程菌投入工业生产打下基础。因此研究构建丝状真菌成为表达外源蛋白质的宿主是继大肠杆菌和酵母后的又一热点。然而不足的是丝状真菌的遗传背景知识贫乏, 分泌的外源蛋白质容易降解且远不如内源蛋白质含量高, 等缺点严重阻碍了其工业化生产应用的进程^[1-6]。本文研究的对象草菇, 作为食用菌除安全无毒外, 还具有生长温度高、生物转化能力强等优点, 是表达外源蛋白质的理想宿主菌株。目前用于构建转化食用菌的表达载体的启动子主要是从香菇中分离的 *ras* 基因启动子和酿酒酵母中分离的 *gpd* (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 基因分离的启动子^[3], 未见有草菇内源基因调控序

收稿日期: 2004-11-18.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370034)。

作者简介: 罗楚平, 1979-, 硕士研究生, 主要从事微生物学的学习与研究, E-mail: luochuping@163.com

通讯联系人: 邵蔚蓝, 女, 1958-, 教授, 博士生导师, 主要从事微生物分子生物学的教学与研究, E-mail: wlsiao@jmail.com.cn

万方数据

列的研究报道. 由于丝状真菌的启动子具有种属特异性和诱导特异性^[7,8], 研究获得草菇内源的可调控的强启动子, 信号肽序列, 终止子序列不仅是构成草菇成为高效表达体系关键的一步, 而且能够增加对草菇的遗传背景知识和基因调控机理的了解. 本课题假定胞外高丰度存在的蛋白质其基因上游必存在强启动子和信号肽, 本实验纯化了两个草菇发酵液中高丰度存在的蛋白质, 并根据其中一个蛋白质的肽段氨基酸序列设计简并引物, 反向 PCR 得到一条特异核酸序列. 这些工作为下一步从本实验室构建的草菇基因组文库杂交出其全序列和分析其调控序列奠定基础.

1 材料和方法

1.1 主要试剂:

木聚糖、小牛血清白蛋白、DEAE-Sephacel、Acr-Bis 均购于 Sigma 公司. 叠氮化钠(上海博彩生物公司)、SDS-PAGE 低分子质量标准蛋白(Promega 公司)、PVDF 膜(BioRad 公司).

大肠杆菌 *E. coli* JM109 购于 Promega 公司, 限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶和 *ex* Taq 酶购于宝生物公司, Total RNA Purification Kit 购于申能博彩生物科技有限公司, 质粒抽提 QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit 和 Plasmid Gel Extraction Kit 凝胶回收试剂盒购于 Qiagen 公司. PowerScript™ Reverse Transcriptase 购于 CLONETECH 公司.

1.2 菌种和培养

草菇菌株由南京师范大学何强泰教授惠赠.

固体培养基: CMC 和木聚糖各 5 g/L、蛋白胨 2 g/L、磷酸二氢钾 0.6 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L、琼脂粉 1.5 g/L.

1.3 蛋白质浓度测定、蛋白质相对分子质量测定和蛋白质银染

用 Bradford 法测定蛋白浓度, 以小牛血清白蛋白作为标准蛋白.

蛋白质银染根据《精编分子生物学实验指南》的快速银染方法.^[9]

1.4 不同碳源和氮源培养条件下发酵液中蛋白质组分的变化

分别用碳源玉米芯、稻草粉、木聚糖、羧甲基纤维素于不同氮源酵母粉蛋白胨、硫酸铵混合摇瓶培养草菇, 180 r/min, 38 ℃, 4 d, 发酵液中的蛋白质经饱和度为 80% 硫酸铵沉淀, 透析后, 用 10% SDS-PAGE 电泳检测蛋白质组分.

1.5 草菇胞外高丰度蛋白质的分离纯化

经以稻草为碳源培养的草菇发酵液经纱布过滤后, 5 000 r/min 离心 30 min 除去杂质. 所有纯化步骤均在 4 ℃ 进行, 所有缓冲液都加 0.2 g/L 叠氮化钠以防杂菌生长.

1.5.1 硫酸铵沉淀

加固体硫酸铵至饱和度为 80%, 在冰上静置过夜. 10 000 r/min 离心 10 min, 沉淀用 25 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液溶解沉淀物, 再 10 000 r/min 离心 30 min, 最终得到粗酶液 50 mL.

1.5.2 DEAE-Sephacel 阴离子交换柱层析

样品在 25 mmol/L 的 Tris-HCl 中透析 2 次, 每次 4 h. DEAE-Sephacel 阴离子交换柱预先用同样的 Tris-HCl 缓冲液平衡, 然后将透析的酶液注入柱中, 以 0~1 mol/L NaCl 的磷酸缓冲液进行梯度洗脱(流速 2 mL/min)和部分收集(6 mL/tube). 将收集蛋白质峰的管进行 SDS-PAGE 电泳, 银染鉴定合并含目的蛋白质管.

1.5.3 凝胶过滤层析

75% 的硫酸铵沉淀含目的蛋白质样品, 经两次 2 L 含 150 mmol/L NaCl、pH7.0 的磷酸钾缓冲液透析, 每次 4 h, 然后注入柱中. 用同样的缓冲液洗脱(流速 0.5 mL/min), 以每管 2 mL 分部收集. 收集对应蛋白质峰的管做 SDS-PAGE 电泳, 银染确定含目标蛋白质管, 丢弃含杂蛋白质管. 合并超滤浓缩后, 以 SDS-PAGE 电泳检测其纯度.

1.5.4 HTP(羟基磷灰石)柱层析

用 pH 7.5 的 20 mmol/L 的磷酸缓冲液把蛋白质相对分子质量为 5.26×10^4 的样品稀释 1 倍, 柱子用含 1 mmol/L NaCl 的去离子水平衡, 上样. 再以 20 mL、10 mmol/L 的磷酸缓冲液, 120 mL、10~400 mmol/L 万方数据

的磷酸缓冲液, 20 mL、400 mmol/L 的磷酸缓冲液洗脱和部分收集(2 mL/tube)。收集对应蛋白质峰的管做 SDS-PAGE 电泳, 银染确定含目标蛋白质管, 丢弃含杂蛋白质管。合并超滤浓缩后以 SDS-PAGE 电泳检测其纯度。

1.6 蛋白质 N 端序列分析

制备 12% 分离胶 50 V 预电泳 1 h 后制备 4% 的浓缩胶。相对分子质量为 52.6×10^3 蛋白质样品上样 (4 μg /孔), 150 V 电泳 45 min 后进行蛋白质酶解印迹。印迹采用的是 caps 缓冲体系, 100 V 电转 2 h 后, 用 Comaasie-R-252.6 染色 2 min, 50% 甲醇脱色后取出夹在滤膜中, 置密闭塑料袋 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。蛋白质 N 端序列测定在中国协和医科大学基础医学院中心实验室进行。

1.7 草菇总 RNA、mRNA 的提取和第一链 cDNA 合成

将草菇菌丝平板培养 4~5 d, 收获菌体, 用灭菌蒸馏水洗涤菌体, 带手套将其尽量挤干, 称取 100 mg 菌体, 置于研钵中。在液氮存在下研成极细的粉末, 将粉末迅速转移至 40 mL 离心管中, 加入 30 mL 变性液, 混匀。加入 1 mL 2 mol/L NaAc (pH 4.0), 充分混匀。再加入 10 mL 水饱和酚和 2 mL 氯仿/异戊醇 (24:1), 振荡完全 10 s, 冰浴 15 min 后, 在 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 000 r/min 离心 20 min。加入等体积的酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1) 再抽提 1 次, 振荡完全 (10 s), 冰浴 15 min 后, 在 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 000 r/min 离心 20 min。转移上清, 加入等体积的异丙醇, -20 $^{\circ}\text{C}$, 沉淀 60 min 后, 在 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 000 r/min 离心 15 min。弃上清, 将 RNA 沉淀用 3 mL 变性液再溶 1 次, 完全溶解后, 分装, 加入等体积的异丙醇, -20 $^{\circ}\text{C}$, 沉淀 60 min 后, 在 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 000 r/min 离心 15 min。弃上清, 用 75% 的乙醇洗涤沉淀 2 次, 将总 RNA 溶于适量的 DEPC 水中, -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

将 RNA 样品 65 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min, 加入 3 μL Biotinylated-Oligo (dT) 和 13 μL 20 \times SSC 后, 轻柔混合, 放置室温至完全冷却, 注意时间小于 10 min。

洗涤 Streptavidin Paramagnetic Particles (SA-PMPs): 轻弹试管将 SA-PMPs 悬起, 放置于磁架上, 小心移去上清, 用 0.5 \times SSC 洗涤 3 次 (300 μL /次), 将 SA-PMPs 重悬于 100 mL 0.5 \times SSC 中。将 1 中的产物放入 2 中, 室温放置 10 min, 每隔 1~2 min 轻柔倒转, 将管子放于磁架上, 小心移去上清, 用 0.1 \times SSC 洗涤 4 次 (300 μL /次)。用 100 mL \times RNase-free 的水重悬 SA-PMPs, 轻柔混合, 放于磁架上, 将上清转移至干净的管子中, 重复 2 次, 得到约 270 mL mRNA 样品。为了将微量的 SA-PMPs 除去, 将样品在 4 $^{\circ}\text{C}$, 以 12 000 \times r/min 离心 1 min, 将上清转移至一个干净管子中。样品中加入 0.1 体积的乙酸钠 (pH 5.2, 用 DEPC 处理过) 和 1 体积异丙醇, -70 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 取出样品, 在 4 $^{\circ}\text{C}$, 以 12 000 r/min 离心 20 min, 用 75% 乙醇洗涤一次, 同上高速离心, 风干后, 用 10 mL 1 RNase-free 的水重悬。

提取的 mRNA 用 PowerScriptTM Reverse Transcriptase 反转录成第一链 cDNA。

1.8 引物设计, PCR 和 TA 克隆

一对简并引物: 5' CCC AAGCTT GCN AT(T/C) TA(T/C) CCI GA(T/C) AA(A/G)3' 和 5'd(T)30 N1 (A/G/C) N2(A/G/C/T) 3'; PCR 条件: 先在较低的退火温度 36 $^{\circ}\text{C}$ 进行 5 个循环后, 然后退火温度上升为 55 $^{\circ}\text{C}$ 进行 30 个循环。TA 克隆根据宝生物工程公司试剂盒说明书, 测序在生物工程公司进行。

2 结果与分析

2.1 不同碳源和氮源组合的草菇发酵液蛋白组分分析

用不同的碳源氮源组合的培养基摇瓶培养草菇, 在发酵液中 HEP1 (相对分子质量为 52.6×10^3) 和 HEP2 (26.2×10^3) 都选择性高效表达, 在 SDS-PAGE 电泳图中呈现出很粗的条带 (见图 1)。推测 HEP1 和 HEP2 基因的上游序列具有可调控强启动子; 由于其是胞外蛋白质, N 端带有信号肽序列。

2.2 草菇胞外高丰度蛋白质分离纯化及 N 端序列

SDS-PAGE 电泳分析结果表明 (见图 2), 经过柱层析得到了电泳纯 HEP1 和 HEP2 蛋白质。HEP1 肽段 N 端序列测序结果为 AADXX ALLSA IYPDK。

2.3 PCR 结果电泳图、重组子验证 和核酸序列分析

核酸凝胶电泳 (见图 3) 结果表明扩增得到一条长约 750 bp 的特异核酸带。然后对 PCR 产物 TA 克隆 (插入子验证见图 4) 和 C 端测序。根据测序的结果 (见图 5) 和预测的阅读框架 (下划线表示) 翻译成的蛋白质序列经 GenBank 同源性比对未发现其属于某个特定的基因家族。

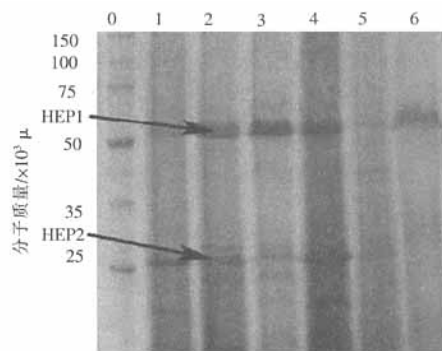


图 1 不同培养基的条件下发酵液中蛋白质凝胶电泳比较图

0. Protein molecular weight marker; 1. straw powder + Peptone; 2. straw powder + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3. corn powder + Peptone; 4. corn powder + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 5. xylan, CMC + Peptone; 6. xylan, CMC + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

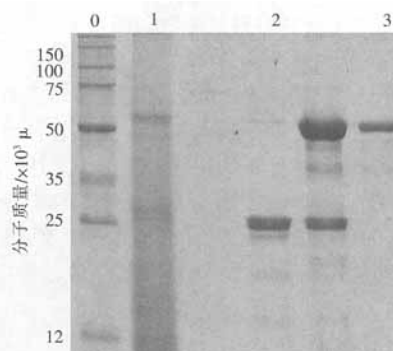


图 2 纯化的 HEP1 和 HEP2 凝胶电泳图

0. Protein molecular weight marker; 1. the exocellular proteins precipitated by ammonium sulfate; 2. the purified HEP2; 3. the purified HEP1

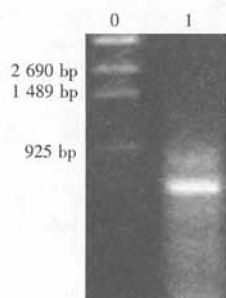


图 3 PCR 产物的凝胶电泳图

0: λ -EcoT14 I digest DNA Marker
1: PCR product

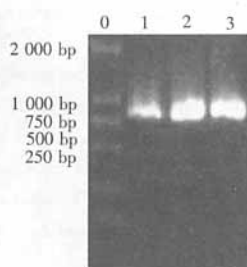


图 4 插入子的 PCR 验证

0: DNA Marker, 1, 2 and, 3: The PCR products from the recombinant plasmid

CAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACGATTCCCAAGCTTGCAAT
TTACCCGGATAAAGACACACCTTCGATTCTTATTCAAGAGTCCCTAACG
CCAAATGAATCCATCTTCCCGCAAACCAGGGAAGGCACTCTATCTGGAC
TGGACTCGTCAACGGGGCACGCATCGCGGGACGTGATCAATGGGTGCGAA
TGACACGGACCTGTTGAACGTTTCGCAGCCGGATGCATATTATGCCTCG
GAAGACAACAACCTCAAGCTCTCAGGCGTTGGTGTATTTTACCCGCTG
GCTCACAACCCGGGTCGCCAACCCCTTAGTCGAAGGAATCTCCTTGGGGA
TAGGATGTTGAGTGTTGAGGCCTTAACGCCATTACAGGATGATGTACTT
GCTGTTTCGACGAAGACCAGGGGCGGGCCAGCCGGGTTTCGTGGATGAGT
GAGGTGTTTTCCCTTTCCCGGGCGTTCTTCTTTCTCCAAAACGCGTT
GTACATTCAATACATAGTGATACAATTACTCCTAATCTACACTGTGTAG
TCATAAAAACGTCTAGTCACCACCCAAACCGCAATTGGTCTCGCGGAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

图 5 PCR 产物核苷酸序列

3 讨论

构建丝状真菌成为外源蛋白质的高效表达体系成为近来研究的热点. 基因转录调控作为调控外源蛋白质高效表达的第一步, 因此, 寻找、分析、获得丝状真菌内源的可调控的强启动子、信号肽序列、终止子序列是构建外源基因高效表达载体的关键^[10]. 草菇, 作为食用菌的一种, 目前的研究集中在对其完整的纤维

素、半纤维素酶系统和自身抗寒机制的研究本实验室根据草菇生长温度高,生物转化快,安全无毒等特点致力于构建草菇为医用蛋白质的高效表达体系,但国内外未见有关于草菇基因调控序列的研究报道.本文根据胞外高丰度存在的蛋白质去寻找强启动子的技术路线虽然具有一定的技术难度和风险性,但它却可以克服一般胞外酶启动子较弱和胞内酶不具有信号肽的缺点,大大增加了获得草菇高表达元件的机率.草菇外源基因高效表达体系的构建除了用于表达一些价格昂贵的医用蛋白外,而且可以表达与抗冷冻相关的蛋白质来提高草菇抗冷冻伤害能力^[11].本实验鉴定、纯化出两个高丰度表达的蛋白质 HEP1 和 HEP2 与草菇已知基因序列的胞外酶,如纤维素半纤维素酶,相对分子质量大小不同,说明我们所纯化的蛋白是草菇中没有研究过的新蛋白.并根据 HEP1 氨基酸序列设计简并引物克隆其 cDNA 序列做了初步研究.

[参考文献]

- [1] 刘谨,王汉忠. 丝状真菌外源基因表达系统的研究现状与展望[J]. 微生物学通报,2000,27(6):453—457.
- [2] 汪天虹,吴志红,刘世利,等. 丝状真菌外源基因表达系统的构建[J]. 中国生物化学与分子生物学学报, 2003,19(6): 736—742.
- [3] 郭丽琼,陈守才,林俊芳. 食用菌遗传转化研究进展[J]. 食用菌学报,2001,8(4):47—53.
- [4] Kaji wara S, Shishido K. Characterization of the promoter region of the basidiomycete *Lentinus edodes*, *ras* gene[J]. FEMS Microbiology Letters, 1992, 92(2): 147—150.
- [5] Bitter G A, Egan K M. Expression of heterologous genes in *Saccharomyces cerevisiae* from vectors utilizing the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter[J]. Gene, 1984, 32(2):263—274.
- [6] Dirk Carrez, Wouter Janssens. Heterologous gene expression by filamentous fungi: secretion of human interleukin-6 by *Aspergillus nidulans*[J]. Gene, 1990, 94(3): 147—154.
- [7] Moralejo F J, Cardoza R E, Gutierrez S, *et al.* Thaumatin production in *Aspergillus awamori* by use of expression cassettes with strong fungal promoters and high gene dosage[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(3): 1168—1174.
- [8] Moralejo F J, Cardoza R E, Gutierrez S, *et al.* Overexpression and lack of degradation of thaumatin in an aspergillopepsin A - defective mutant of *Aspergillus awamori* containing an insertion in the *pepa* gene [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2000, 54(6): 772—777.
- [9] 颜子颖,王海林,译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京:科学出版社,1999.
- [10] Mackenzie D A, Jeenes D J. Regulation of secreted protein production by filamentous fungi: recent developments and perspectives[J]. Journal of General Microbiology, 1993, 139(10): 2295—2307.
- [11] 郭丽琼,林俊芳. THP 基因的重新克隆及草菇表达载体的构建[J]. 微生物学报,2002,42(3):375—379.

[责任编辑:孙德泉]