

聂金梅,李阳源,刘金山,等.黑曲霉葡萄糖氧化酶基因改造及其在毕赤酵母中的表达[J].江苏农业科学,2018,46(20):17-21.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.20.004

黑曲霉葡萄糖氧化酶基因改造及其在毕赤酵母中的表达

聂金梅,李阳源,刘金山,王勇,唐业

(广东溢多利科技股份有限公司,广东珠海 519060)

摘要:为构建并筛选高效表达的葡萄糖氧化酶基因毕赤酵母工程菌株,采用 PCR 法从黑曲霉基因组中获得葡萄糖氧化酶全长基因(GOD),采用定点突变法和重叠 PCR 法获得 GOD^{mut} 基因,将其插入到 pPICZαA 中,获得重组质粒 pPIC-GOD^{mut},经 PmeI 线性化后,用电击法转化毕赤酵母菌株 X33,经大量筛选,获得 1 株高效分泌表达的工程菌株 X33-pPIC-GOD^{mut},在此基础上,去除 GOD 基因的信号肽,用同样的试验方法构建并筛选高效分泌表达的工程菌株 X33-pPIC-GOD^{new},结果表明:X33-pPIC-GOD^{mut} 的产酶水平为 460.3 U/mL,X33-pPIC-GOD^{new} 的产酶水平为 714.9 U/mL,是前者的 1.52 倍,该酶的最适作用温度和最适作用 pH 值分别为 40 ℃ 和 5.0,成功获得 1 株高效稳定表达的葡萄糖氧化酶基因毕赤酵母工程菌株。

关键词:葡萄糖氧化酶;黑曲霉;毕赤酵母表达系统;信号肽

中图分类号: Q789 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)20-0017-04

葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOD),能专一地氧化 β-D-葡萄糖成为葡萄糖酸和过氧化氢,反应产物葡萄糖酸可降低胃肠内 pH 值,为乳酸菌生长制造酸性环境。反应生成的过氧化氢具有灭菌作用,当过氧化氢积累到一定浓度时,直接抑制大肠杆菌、沙门氏菌、巴氏杆菌、葡萄球菌和弧菌的生长繁殖。因为具有天然无毒副作用的独特优点,葡萄糖氧化酶被广泛应用于食品加工、医药、葡萄糖定量分析及生物领域^[1-3]。许多研究者对该酶的性质做了大量的工作,尤其对葡萄糖氧化酶的辅基黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)作了深入的研究^[4],并给予详细的说明。Bentley 等应用同位素¹⁸O₂ 和 H₂¹⁸O 明确了在有过氧化氢酶存在下的一系列试验^[5];Keilin 等对黑曲霉的葡萄糖氧化酶的动力学及其作用形式也作了较详细的研究^[6]。

葡萄糖氧化酶不仅能够代替抗菌药物,而且还能代替抗球虫药物,是一种新型绿色饲料添加剂。它还能除去葡萄糖,以防蛋白成品在贮藏期间变色、变质。用于全脂奶粉、谷物、可可、咖啡、虾类、肉等食品,可防止由葡萄糖引起的褐变。用于柑橘类饮料及啤酒等的脱氧,以防色泽加深、降低风味和金属溶出。由于葡萄糖氧化酶催化底物所生成的 H₂O₂ 能使面筋中的-SH 基氧化成 S-S-基,有助于面筋蛋白之间形成较好的蛋白质网络结构,故近年来用于面包制造的效果良好,可用以代替可致癌的溴酸钾,受到愈来愈多的重视。此外,工业上还将葡萄糖氧化酶用于生产葡萄糖酸盐。

本研究克隆了来源于黑曲霉(*Aspergillus niger*)的葡萄糖氧化酶全长基因,综合运用了定点突变法、重叠 PCR 法获得了含突变基因的葡萄糖氧化酶基因,本研究首次去除葡萄糖

氧化酶基因的信号肽,构建并筛选葡萄糖氧化酶毕赤酵母工程菌株的产酶活性有显著提高,为实现葡萄糖氧化酶工业化生产提供一种切实可行的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 采用本实验室保存的黑曲霉。

1.1.2 仪器设备 基因扩增仪购于 HEMA,电泳仪购于北京君意,基因导入仪购于 Bio-rad, TG16-WS 台式高速离心机、核酸蛋白凝胶图像分析系统购于 HEMA,酶标仪购于 Molecular devices,紫外分光光度计 Caryo UV-vis 购于安捷伦公司。

1.1.3 主要试剂 限制性内切酶和连接酶购于 NEB 公司;酵母粉(oxford)、蛋白胨(oxford)、抗生素 Zeocin&Amp 购于 Invitrogen 公司;感受态细胞制备试剂盒购于上海生工生物工程有限公司;其他试剂均为国产分析纯产品。

1.1.4 培养基 大肠杆菌培养基为 LB, LBA 为 LB 培养基加 100 μg/mL 氨苄青霉素, LBZ 为 LB 培养基加 25 μg/mL Zeocin。酵母培养基为 YPD, 酵母筛选培养基为 YPDZ (YPD + 100 μg/mL Zeocin), BMGY 酵母诱导培养基和 BMMY (除了以 0.5% 甲醇代替甘油,其余成分与 BMGY 相同)。

1.1.5 酶活性定义 在 pH 值为 5.5、温度为 37 ℃ 的条件下,每分钟能把 1.0 μmol 的 β-D-葡萄糖氧化成 D-葡萄糖酸和 H₂O₂ 所需的酶量称为 1 个酶活性单位(U)。

1.2 测定葡萄糖氧化酶活性方法

邻联(二)茴香胺分光光度法:在有氧条件下,葡萄糖氧化酶催化葡萄糖脱氢产生葡萄糖酸和过氧化氢,在辣根过氧化物酶作用下,过氧化氢和邻联(二)茴香胺反应,生成水和红色的氧化型邻联茴香胺。加入 2 mol/L 硫酸终止反应,在 540 nm 下测定反应液吸光值,依据酶活力标准曲线,从而换算为葡萄糖氧化酶的活性。

收稿日期:2017-04-27

作者简介:聂金梅(1986—),女,江西上饶人,硕士,工程师,主要从事分子生物学方面的研究。E-mail:njm1030@163.com。

1.3 试验方法

1.3.1 表达载体的构建 首先根据葡萄糖氧化酶全基因序列,设计引物 GODF/GODR、GODF^(mut)/GODR^(mut)(表 1)。

表 1 本研究所用引物序列

引物	引物序列(5'→3')	大小 (bp)
GODF	GAATTCATGCAGACTCTCCTTGTCGAGGCTCGC	32
GODR	GCGGCCGCTCACTGCATGGAAGCATAATCCGCC	33
GODF ^(mut)	TGGCGTGGAGTTCCGGCACCCACAAGGGCAA	30
GODR ^(mut)	GGCTGCCGAAGTCCACGCCAACGGCACGAG	30
GODECONS	GGCCGGAATTCAGCAATGGCATCGAAGCCAGCC	33

1.3.2 提取黑曲霉基因组 本试验所用的黑曲霉保藏编号是:CGMCC NO. 4235,用察氏培养基培养,纱布过滤培养液,称取 100 mg 菌体,用液氮研细,加入到经 65 ℃ 预热的装有 700 μL PCB 溶液的 1.5 mL EP 管中,混匀,再加入 7 μL β-巯基乙醇。其余操作参照真菌基因组 DNA 抽提试剂盒。将黑曲霉基因组置于 -20 ℃ 保存。

1.3.3 克隆葡萄糖氧化酶基因 以黑曲霉基因组作为模板、引物 GODF/GODR,通过 PCR 方法克隆葡萄糖氧化酶基因,PCR 共 35 个循环,其中 98 ℃ 30 s,98 ℃ 10 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 90 s,72 ℃ 120 s;经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,切胶回收约 1.8 kb 的片段。

1.3.4 定点突变法和重叠 PCR 法 本研究将 GOD 基因序列中的 GAATTC 序列突变为 GAGTTC,针对该位点设计了 1 对突变引物 GODF^(mut)/GODR^(mut),采用重叠 PCR 方法扩增其编码区基因序列。重叠 PCR 分 PCR1 和 PCR2 两步进行,扩增条件如下:

PCR 共 30 个循环,其中 94 ℃ 5 min,94 ℃ 1 min,61 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,72 ℃ 5 min。将 PCR 产物用 1% 浓度的琼脂糖凝胶进行电泳分析,分别切胶回收大小约为 0.96 kb 和 0.88 kb 的基因片段并纯化,置于 -20 ℃ 保存,具体操作参照 PCR 纯化试剂盒。取 5 μL 纯化后的 PCR 产物进行琼脂糖电泳分析。以上述 PCR1 和 PCR2 产物片段为模板和引物,进行 PCR 扩增,PCR3 共 18 个循环,其中 94 ℃ 5 min,94 ℃ 1 min,61 ℃ 1 min,72 ℃ 4 min,72 ℃ 5 min。以 PCR3 产物为模板,以 GODF 及 GODR 为引物,进行 PCR 扩增,PCR4 共 40 个循环,其中 94 ℃ 5 min,94 ℃ 1 min,61 ℃ 1 min,72 ℃ 4 min,72 ℃ 5 min。将 PCR4 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳分析,并切胶回收大小约 1.8 kb 基因片段,置于 -20 ℃ 保存。取 5 μL 纯化后的 DNA 进行琼脂糖电泳分析。

取葡萄糖氧化酶突变基因 GOD^{mut} 以及 pPICZαA 各 20 μL,用 Not I 和 EcoR I 双酶切,37 ℃,3 h,T₄ 连接酶连接,4 ℃ 过夜,转化大肠杆菌 Top10。转化步骤如下:冰上放置 30 min,42 ℃ 孵育 90 s,冰上放置 20 min,加 1 mL LB 培养基后 37 ℃ 振荡培养 1 h,涂布 LBZ 平板,37 ℃ 培养过夜,挑取单菌落共 20 个,采用菌落 PCR 法鉴定阳性克隆子,菌落 PCR 条件如下:反应条件为 94 ℃ 4 min,94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 2 min,72 ℃ 10 min,30 个循环。取 10 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。对阳性克隆进行酶切鉴定以及测序序列,DNA 测序由华大基因完成。

1.3.5 去除葡萄糖氧化酶基因的信号肽 去除葡萄糖氧化

酶基因序列中的信号肽,设计上游引物 GODECONS,以葡萄糖氧化酶突变基因(GOD^{mut})为模板、引物 GODECONS/GODR 扩增 GOD^{new} 基因,经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,切胶回收约 1.75 ku 的片段。采用上述试验方法,酶切连接,转化及鉴定。

1.3.6 构建葡萄糖氧化酶毕赤酵母工程菌株 将重组质粒用限制性内切酶 PmeI 线性化,采用电击法将线性化的重组质粒转化至毕赤酵母 X33,涂布于 YPDZ 平板,30 ℃ 下静置培养 2~3 d,直至长出单菌落。

1.3.7 筛选高效分泌表达的葡萄糖氧化酶毕赤酵母工程菌株 挑取单菌落接种于装有 5 mL BMGY 的 50 mL 离心管中,于 28~30 ℃、200 r/min 培养,直到细胞密度达 10⁸ (D_{600 nm} 为 1.2~1.6)时,添加甲醇至终浓度为 0.6%,每隔 24 h 补加甲醇并留样,采用测定酶活性的方法初步筛选高产菌株,再以 1% 的量接种至装有 50 mL BMGY 的 500 mL 三角瓶中,用双层纱布封口,于 28~30 ℃、200 r/min 的摇床培养,复筛,分别得到高效分泌表达的葡萄糖氧化酶突变基因工程菌株和新葡萄糖氧化酶基因工程菌株各 1 株,将它们分别命名为 X33-PIC-GOD^{mut} 和 X33-PIC-GOD^{new}。

1.3.8 中试试验 50 L 液体发酵罐采用蒸汽灭菌,发酵原料 20 L,加水量为 16 L,121 ℃ 灭菌 24 min,然后冷却至室温;制备 YPD 液体种 1 L,分为 8 瓶装,125 mL/瓶,接种葡萄糖氧化酶毕赤酵母菌株,220 r/min、30 ℃ 培养 24 h;待发酵液冷却至室温后,接种菌液 1 L。将上述工程菌株进行高密度发酵培养。配置 20 L 基本盐培养基,在 50 L 自动控制发酵罐中灭菌后,冷却至常温备用。用氨水和磷酸调节发酵液的 pH 值至 6.0,通过调节转速和空气流量控制溶氧大于 30%,发酵温度为 30 ℃。整个发酵过程分 3 个阶段:第一阶段为菌体培养阶段,将重组菌 X33-PIC-GOD^{mut} 和 X33-PIC-GOD^{new} 按照 10% 的接种量接种至发酵罐中,流加已灭菌的 4 L 50% 葡萄糖,培养 24~30 h,以补充完葡萄糖为标志;第二阶段为饥饿阶段,当葡萄糖补完之后,不流加任何碳源,当溶氧上升至 80% 以上即表明该阶段结束,需 30~60 min;第三阶段为诱导表达阶段,在此阶段,流加诱导培养基,并且保持溶氧在 20% 以上,培养时间在 180~200 h 之间。发酵液可通过陶瓷膜或超滤膜处理后获得酶液。在发酵过程中的不同时间点取样测定酶活。同样发酵条件下,将本实验室保藏的改造信号肽之前的葡萄糖氧化酶毕赤酵母菌株进行高密度发酵培养,诱导培养 185 h 的发酵液的酶活性为原来的 460.3 U/mL 提高到了 714.9 U/mL。说明信号肽改造后的葡萄糖氧化酶毕赤酵母菌株能明显地提高了葡萄糖氧化酶的表达水平。

1.3.9 葡萄糖氧化酶活性分析 采用酶活力测定方法,在 pH 值为 5.5 的条件下,分别在 30、35、40、45、50、55、60、65、70、80 ℃ 测定酶的活力;在 37 ℃ 的条件下,分别在 pH 值为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 时测定酶的活力;在测定葡萄糖氧化酶活性的体系中,加入 20 mmol/L 金属离子磷酸盐缓冲液溶解(pH 值=5.0)至金属离子的终浓度为 2 mmol/L,测定葡萄糖氧化酶的活性。

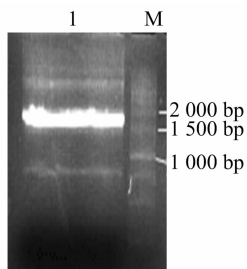
1.3.10 葡萄糖氧化酶 SDS-PAGE 蛋白电泳 制备浓度为 5% 的浓缩胶,凝固后,再加入 12% 的蛋白分离胶,收集工程菌株 X33-pPIC-GOD^{mut} 和 X33-pPIC-GOD^{new} 185 h 的发酵上清液,分别稀释 12 倍和 15 倍后,加入 5×loading buffer,

煮沸 5 min 使蛋白变性,电泳条件:电压 100 V、2 h,用染色液染色 2 h 后,再用脱色液脱色至条带显色清晰。

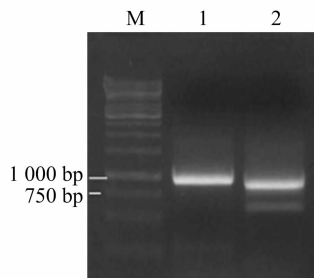
2 结果与分析

2.1 葡萄糖氧化酶突变基因诱导表达载体的构建及鉴定

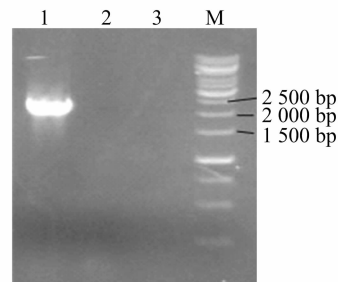
本试验克隆的葡萄糖氧化酶基因全长 1 818 bp(图 1),



1—扩增黑曲霉的葡萄糖氧化酶基因的PCR产物; M—DNA分子标准
图1 扩增黑曲霉的葡萄糖氧化酶基因的PCR产物琼脂糖凝胶电泳

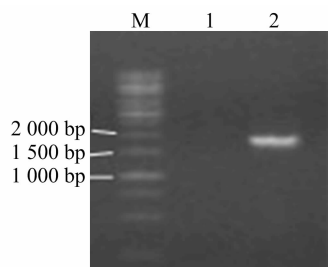


M—DNA分子标准; 1—PCR1产物;
2—PCR2产物
图2 重叠PCR产物琼脂糖凝胶电泳

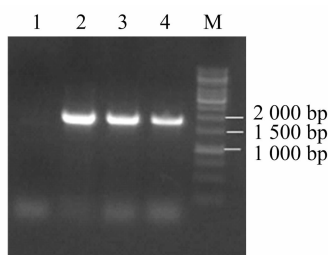


1—阳性转化子; 2、3—阴性转化子;
M—DNA分子标准
图3 重组质粒 pPIC-GOD^{mut} 的菌落 PCR 鉴定

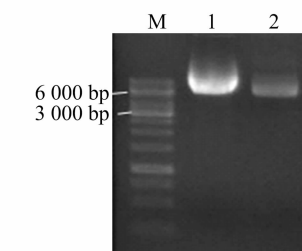
克隆新型葡萄糖氧化酶基因,大小为 1 752 bp(图 4)。利用特征引物 GODECONS 和 GODR 进行菌落 PCR 鉴定阳性转化子,结果如图 5 所示。



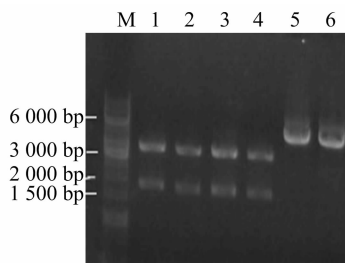
M—DNA分子标准; 1—阴性对照;
2—新型葡萄糖氧化酶基因(GOD^{new})的PCR产物
图4 扩增新型葡萄糖氧化酶基因的PCR产物(GOD^{new})琼脂糖凝胶电泳



1—阴性对照; 2、3、4—阳性转化子;
M—DNA分子标准
图5 新型葡萄糖氧化酶(GOD^{new})重组质粒 pPIC-GOD^{new} 的PCR鉴定



M—DNA分子标准; 1—环状重组质粒 pPIC-GOD^{mut}; 2—环状重组质粒 pPIC-GOD^{new}
图6 重组质粒 pPIC-GOD^{mut} 和 pPIC-GOD^{new} 琼脂糖凝胶电泳



M—DNA分子标准; 1、2—重组质粒 pPIC-GOD^{mut} 的 Not I / EcoR I 双酶切产物; 3、4—重组质粒 pPIC-GOD^{new} 的 Not I / EcoR I 双酶切产物; 5—重组质粒 pPIC-GOD^{mut}; 6—重组质粒 pPIC-GOD^{new}
图7 重组质粒 pPIC-GOD^{mut} 和 pPIC-GOD^{new} 的酶切分析

2.2 重组毕赤酵母表达菌株的诱导表达

将筛选得到的高效分泌表达的工程菌株 X33 - pPIC - GOD^{mut} 和 X33 - pPIC - GOD^{new}, 分别利用 50 L 液体发酵罐进行高密度培养, 每 24 h 取样 1 次, 测定葡萄糖氧化酶活性, 发酵至 185 h, X33 - pPIC - GOD^{mut} 的产酶水平为 460.3 U/mL, X33 - pPIC - GOD^{new} 的产酶水平为 714.9 U/mL(图 8、图 9)。

2.3 葡萄糖氧化酶酶学性质分析

2.3.1 最适催化温度 在 pH 值为 5.0 的条件下, 分别在

编码 605 个氨基酸, 测序结果表明, 它与登录号为 FJ979866.1 的基因完全一致, 利用重叠 PCR 法扩增出含突变位点的 2 段葡萄糖氧化酶基因 PCR1 和 PCR2, 大小分别为 960 bp 和 880 bp(图 2); 构建重组质粒 pPIC - GOD^{mut}, 转化至 Top10 感受态细胞, 利用通用引物 5' AOX 和 3' AOX 进行菌落 PCR 鉴定阳性转化子, 结果如图 3 所示。

提取重组质粒 pPIC - GOD^{mut} 和 pPIC - GOD^{new}, 用琼脂糖凝胶电泳鉴定(图 6)和 Not I 和 EcoR I 酶切鉴定(图 7), 测序结果都表明成功构建重组质粒。

30、35、40、45、50、55、60、65、70、80 ℃ 测定酶的活力, 40 ℃ 时酶活力最高。以 pH 值 5.0、40 ℃ 条件测定的酶活力为 100%, 80 ℃ 时酶活力急剧下降, 仅为最高酶活力的 20.9%(图 10)。

2.3.2 最适催化 pH 值 在 37 ℃ 的条件下, 分别在 pH 值为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 时测定酶的活力, 结果显示, 在 pH 值为 5.0 时酶活力最高。以 40 ℃、pH 值 5.0 时酶活力为 100%, pH 值为 3.0 ~ 6.0 时相对酶活在 50% 以上, 但在 pH 值为 7.5 时, 相对酶活性低于 20%(图 11)。

2.3.3 金属离子及乙二胺四乙酸(EDTA)对葡萄糖氧化酶催化活性的影响 采用酶活力测定方法, 在测定葡萄糖氧化酶活性的体系中, 加入 20 mmol/L 金属离子磷酸盐缓冲液溶解(pH 值=6.0), 至金属离子的终浓度为 2 mmol/L, 测定葡萄糖氧化酶的相对活力, 进行 3 组平行试验, 以未加入任何金属离子的葡萄糖氧化酶溶液作为对照组, 结果如图 12 所示。

2.4 葡萄糖氧化酶发酵上清液蛋白电泳分析

将发酵上清液煮沸使其失活后, 进行蛋白电泳分析, 上样量均为 30 μL, 葡萄糖氧化酶大小为 80 ku 左右, 结果如图 13 所示。

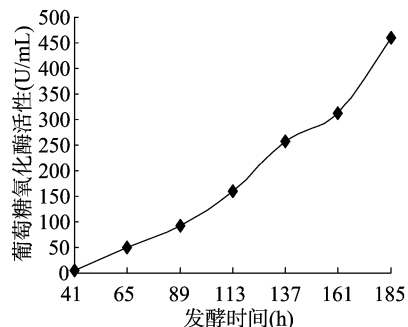
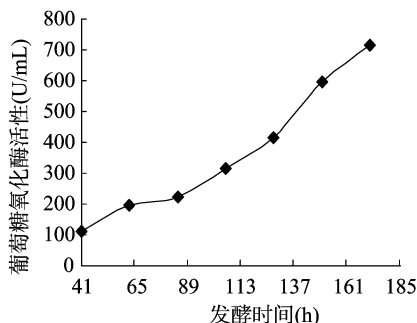
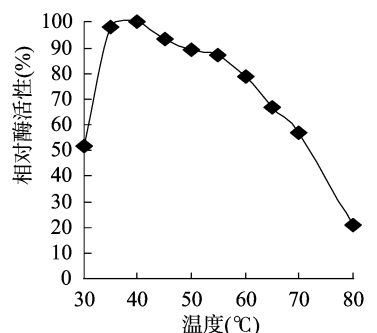
图8 工程菌株 X33-pPIC-GOD^{mut}的生产曲线图9 工程菌株 X33-pPIC-GOD^{new}的生产曲线

图10 葡萄糖氧化酶的最适催化温度

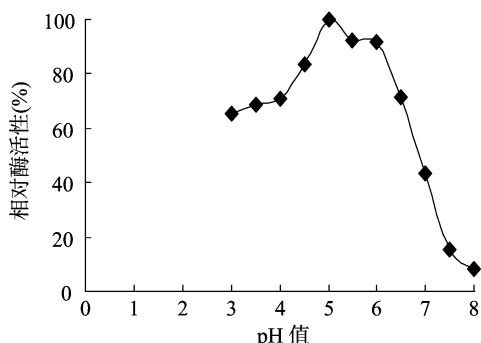


图11 葡萄糖氧化酶的最适催化 pH 值

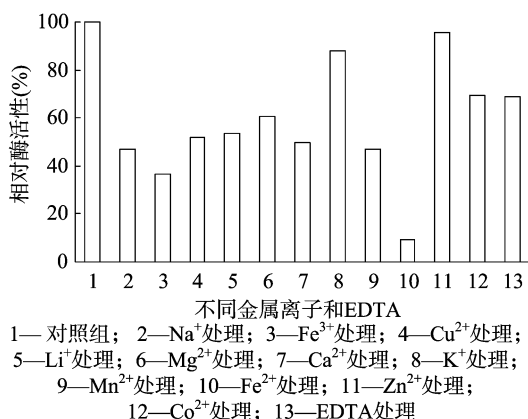
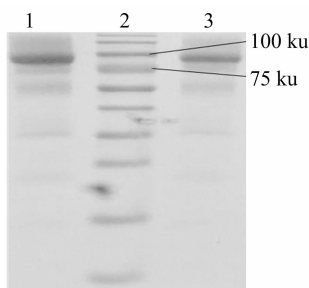


图12 金属离子及 EDTA 对葡萄糖氧化酶催化活性的影响



1—X33-pPICZaA-GOD^{new}发酵上清液；
2—蛋白分子标准；3—X33-pPICZaA-GOD^{mut}发酵上清液
图13 X33-pPICZaA-GOD^{new}发酵上清液蛋白 SDS-PAGE分析

3 讨论

从黑曲霉(*Aspergillus niger*)分离的葡萄糖氧化酶是二聚体,由2个相等的亚基单元组成,每个分子量为80 ku。每个

亚基单元含有1个黄素腺嘌呤的二核苷酸部分和1个铁。该酶是一种糖蛋白,含有16%的中性糖和2%的氨基糖。该酶也包含3个半胱氨酸残基和8个潜在的N-连接糖基化位点。葡萄糖氧化酶极具商业开发潜力,但其构象不稳定的特点大大限制了葡萄糖氧化酶的研究及应用。葡萄糖氧化酶的动力学特性以及其热稳定性,在很大程度上依赖它的氧化还原状态。蛋白的糖基化可影响活性位点的构象动力学并最终影响酶的活性^[7],但糖基化以何种途径影响葡萄糖氧化酶稳定性目前尚不十分清楚。此外,葡萄糖氧化酶表面经合成的聚乙烯·乙二醇长链修饰后,其熔点升高,并且体外添加多元醇,如山梨醇或丙三醇,也可显著升高葡萄糖氧化酶的熔点。报道指出,黑曲霉葡萄糖氧化酶比青霉菌葡萄糖氧化酶更加稳定,但是青霉菌葡萄糖氧化酶的底物亲和力是黑曲霉葡萄糖氧化酶的7倍,其催化速率也接近黑曲霉葡萄糖氧化酶的4倍^[8-10]。

本研究去除信号肽大小为69 bp,测定发酵上清液的酶活性结果表明,信号肽对葡萄糖氧化酶的活性产生很大的影响,究其原因是信号肽对分子构象的影响,所以,进一步研究其构象的变化有利于清晰掌握葡萄糖氧化酶的结构与酶学性质之间的关系,为深入研究和应用葡萄糖氧化酶提供理论基础。

4 结论

本研究通过改造黑曲霉葡萄糖氧化酶基因,提高了葡萄糖氧化酶在毕赤酵母表达系统的产酶水平,目前正在对黑曲霉葡萄糖氧化酶基因针对毕赤酵母密码子偏好性进行优化,构建优化后的黑曲霉葡萄糖氧化酶毕赤酵母基因工程菌株,以期获得产酶水平更高的工程菌株,并初步研究葡萄糖氧化酶分子结构对其活性的影响。

参考文献:

- [1] Kumar D, Dubey K K. Optimization of zinc oxide nanoparticles synthesis to fabricate glucose oxidase sensor [J]. Advances in Applied Science Research, 2012, 3(5): 3081-3088.
- [2] Yogananth N, Chanthru A, Sivanesan D. Optimization of various parameters for the production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* [J]. International Journal of Current Microbiology and Applied Science, 2012, 1(1): 23-28.
- [3] Bai L, Yuan R, Chai Y, et al. Direct electrochemistry and electrocatalysis of a glucose oxidase-functionalized bioconjugates as a trace label for ultrasensitive detection of thrombin [J]. Chemical Communications, 2012, 48(89): 10972-10974.

刘 爽. 2 个不同番茄品系 *fasciated* 基因克隆及表达载体构建[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(20): 21–24.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.20.005

2 个不同番茄品系 *fasciated* 基因克隆及表达载体构建

刘 爽

(福建农林大学园艺学院, 福建福州 350002)

摘要: 为了比较由笔者所在实验室通过多代自交筛选得到的性状稳定的 2 个番茄品系 FL1、MLK1 中 *fasciated* 基因的编码序列, 并验证该基因的功能, 通过特异性引物 PCR, 获得该基因在 2 个供试材料中的序列, 并通过 Gateway 技术分别构建了该基因的超量表达载体和 RNAi 载体。序列比对结果表明, 2 个心室差异明显的番茄材料中该基因的编码序列完全一致, 同时也构建了完整的质粒表达载体系统。供试番茄材料中心室数的不同并不是由 *fasciated* 编码序列的差异引起的。Gateway 技术是一种快速高效的植物表达载体构建方法。

关键词: 番茄; 心室; *fasciated*; 载体构建; Gateway

中图分类号: S641.201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)20-0021-04

20 世纪以来, 我国番茄生产中畸形果发生率高达 20% 以上, 特别是冬春季节温室番茄生产中畸形果发生率更高。在大果型番茄品种中, 每一花序最先开的花畸形果发生最多, 以第一花序畸形果发生率最高, 这严重影响番茄的食用品质, 且果实畸形, 外观品质欠佳, 亦影响销售, 在生产中造成严重的经济损失^[1]。因此, 许多科技工作者就如何减少番茄畸形果的发生进行了一系列的研究, 目前已经明确了番茄心室数是产生畸形果的主要原因, 即心室数越多, 果实越大, 越易产生畸形果; 而随着心室数的减少, 果实逐渐变小, 畸形果亦降低^[2-4]。番茄心室的形成既与其本身的遗传特性有关^[2], 又与植物生长调节物质、温度、光照、营养等条件有关, 各种外界环境均是通过影响番茄本身的遗传基因的表达而对番茄心室形成起作用的^[3-5]。

2008 年 Cong 等利用图位克隆的方法成功获得 *fasciated* 基因, 该基因通过碱基突变或转录水平的变化控制番茄心室的形成, 并经过转基因技术验证, 确认是主要的控制番茄心室形成的基因^[6]。本试验中的 2 个供试番茄品系是经过多代自交已完全纯合的材料, 分别命名为多心室 MLK1 和少心室

FL1 番茄, 心室数差异明显, 但 *fasciated* 的序列未知。为了明确该基因在 2 个供试材料中的序列差异, 明确供试番茄材料的心室数差异是否由 *fasciated* 序列差异或是转录水平差异引起, 同时为了进一步通过该基因的过表达和沉默植株研究其调控机理, 进行了本试验。

1 材料与方法

1.1 植物材料、菌种和质粒

1.1.1 植物材料 试验材料: 少心室番茄品系 FL1 (心室 2~3 个), 多心室番茄品系 MLK1 (心室 15 个左右), 由笔者所在实验室经多代自交获得, 二者心室数及果实大小差异明显。

1.1.2 入门克隆载体 pENTR/D-TOPO[®]、卡那霉素抗性、pCR[®]8/GW/TOPO[®]、壮观霉素抗性, 统一购自美国英杰 (Invitrogen) 生命技术有限公司。

1.1.3 植物表达载体 pMDC141 (超量表达载体) 和 pB7GWIWG2 (I) (RNAi 载体), 分别以抗潮霉素 *hyg* 基因和抗除草剂 *bar* 基因作为筛选标记, 2 个载体均由笔者所在实验室保存备用。

1.1.4 菌种 pGEM-T 载体及大肠杆菌 *Escherichia coli* 感受态细胞购自北京天根生化科技有限公司。

1.1.5 主要试剂 琼脂糖凝胶回收试剂盒及质粒小提试剂盒、Gateway LR Clonase Enzyme Mix II 购自 Invitrogen 公司。限制性内切酶、*rTaq* DNA 聚合酶、LA *Taq* DNA 聚合酶以及

Biochemistry, 2002, 269(13): 3113–3121.

[8] Seymour S L, Klinman J P. Comparison of rates and kinetic isotop effects using PEG-modified variants and glycoforms of glucose oxidase; the relationship of modification of the protein envelope to C—H activation and tunneling[J]. Biochemistry, 2002, 41(27): 8747–8758.

[9] Cioci F, Lavecchia R. Effects of polyols and sugars on heat-induced flavin dissociation in glucose oxidase[J]. Biochemistry & Molecular Biology International, 1994, 34(4): 705–712.

[10] Holland J T, Harper J C, Dolan P L, et al. Rational design of glucose oxidase for improved catalytic function and stability[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e37924.

收稿日期: 2018-01-10

基金项目: 福建省自然科学基金面上项目 (编号: 2015J01609)。

作者简介: 刘 爽 (1983—), 女, 辽宁桓仁人, 博士, 讲师, 从事设施蔬菜栽培生理与生物技术研究。E-mail: liushuangsyau@aliyun.com。

[4] Ferri S, Kojima K, Sode K. Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: a bird's eye view of glucose sensing enzymes[J]. Journal of Diabetes Science & Technology, 2011, 5(5): 1068–1076.

[5] Bentley R, Neuberger A. The mechanism of the action of notation [J]. Biochemical Journal, 1949, 45(5): 584–590.

[6] Keilin D, Hartree E F. The use of glucose oxidase for the determination of glucose in biological material and for the study of glucose-producing systems by manometric methods[J]. Biochemical Journal, 1948, 42(2): 230–238.

[7] Knapp M J, Klinman J P. Environmentally coupled hydrogen tunneling. Linking catalysis to dynamics [J]. European Journal