

密级：

论文编号：

# 中国农业科学院 博士学位论文

来源于青霉 F63 的  $\alpha$ -半乳糖苷酶的纯化、基因  
克隆、表达与性质研究

**Purification, Characterization, Gene Cloning and Expression of an  
 $\alpha$ -Galactosidase from *Penicillium* sp. F63**

博 士 研 究 生：密士军

指 导 教 师：姚 斌 研究员

申 请 学 位 类 别：理学博士

专 业：生物化学与分子生物学

研 究 方 向：酶的分子生物学

培 养 单 位：研究生院

饲料研究所

提交日期 2006 年 6 月

Secrecy:

No.

# **Chinese Academy of Agricultural Sciences**

## **Purification, Characterization, Gene Cloning and Expression of an $\alpha$ -Galactosidase from *Penicillium* sp. F63**

Ph.D Candidate : Mi Shijun

Advisor : Yao Bin

Major : Biochemistry and Molecular Biology

Specialty : Molecular Biology of Enzyme

Chinese Academy of Agricultural Sciences

**June 2006**

# 中 国 农 业 科 学 院

## 博士学位论文评阅人、答辩委员会名单表

|                  |     |   |  |                  |        |         |
|------------------|-----|---|--|------------------|--------|---------|
| 论文题目             |     | 来源于青霉 F63 的 $\alpha$ -半乳糖苷酶的纯化、基因克隆、表达与性质研究 |  |                  |        |         |
| 论文作者             |     | 密士军   | 专 业  | 生化与分子生物学         | 研究方向   | 酶的分子生物学 |
| 指导教师             |     | 姚斌  |  | 培养单位(研究所、中心)     |        | 饲料所     |
| 姓名               |     | 职称  | 硕(博)   | 单 位              | 专 业    | 签 名     |
| 评<br>阅<br>人      | 王 璋 | 教授级高工                                       | 硕导 <input type="checkbox"/><br>博导 <input type="checkbox"/> | 中国食品发酵工业研究院      | 酶工程    |         |
|                  | 文华安 | 教授  | 硕导 <input type="checkbox"/><br>博导 <input type="checkbox"/> | 中国科学院微生物研究所      | 微生物学   |         |
|                  | 伍宁丰 | 研究员   | 硕导 <input type="checkbox"/><br>博导 <input type="checkbox"/> | 中国农科院生物技术研究所     | 微生物学   |         |
| 答<br>辩<br>主<br>席 | 范云六 | 研究员<br>院士                                   | 硕导 <input type="checkbox"/><br>博导 <input type="checkbox"/> | 中国农科院生物技术研究所     | 分子生物学  |         |
| 答<br>辩<br>委<br>员 | 吴乃虎 | 研究员   | 硕导 <input type="checkbox"/><br>博导 <input type="checkbox"/> | 中国科学院遗传与发育生物学研究所 | 分子生物学  |         |
|                  | 钱世钧 | 研究员   | 硕导 <input type="checkbox"/><br>博导 <input type="checkbox"/> | 中国科学院微生物研究所      | 酶分子生物学 |         |
|                  | 宋 未 | 教授  | 硕导 <input type="checkbox"/><br>博导 <input type="checkbox"/> | 首都师范大学生物学院       | 分子生物学  |         |
|                  | 莫湘筠 | 教授级高工                                       | 硕导 <input type="checkbox"/><br>博导 <input type="checkbox"/> | 中国食品发酵工业研究院      | 酶工程    |         |
|                  | 张志芳 | 研究员   | 硕导 <input type="checkbox"/><br>博导 <input type="checkbox"/> | 中国农科院生物技术研究所     | 分子生物学  |         |
|                  | 伍宁丰 | 研究员   | 硕导 <input type="checkbox"/><br>博导 <input type="checkbox"/> | 中国农科院生物技术研究所     | 微生物学   |         |
|                  |     |   | 硕导 <input type="checkbox"/><br>博导 <input type="checkbox"/> |                  |        |         |
| 会议记录(秘书)         |     | 袁铁铮   |  |                  |        |         |
| 论文答辩时间地点         |     | 2006.6.13 上午 9:00 农科院饲料所 301#               |  |                  |        |         |

# 独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间：      年    月    日

# 关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部内容。

（保密的学位论文在解密后应遵守此协议）

论文作者签名：

时间：      年    月    日

导师签名：

时间：      年    月    日

## 中文摘要

$\alpha$ -半乳糖苷酶 ( $\alpha$ -galactosidase, EC 3.2.1.22) 是催化  $\alpha$ -半乳糖苷键水解的酶类, 广泛的分布于植物、动物和微生物体内。它不但可以催化  $\alpha$ -半乳糖苷类的寡糖, 还可以催化含  $\alpha$ -半乳糖苷键的多聚糖。该酶在饲料、食品、造纸和医药工业等领域具有广泛的应用前景。然而目前  $\alpha$ -半乳糖苷酶主要是从天然菌株中分离得到, 产量较低, 成本较高, 从而限制了  $\alpha$ -半乳糖苷酶的生产应用。因此利用微生物学和分子生物学的原理和手段, 克隆  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因, 构建高效表达和分泌的基因工程菌株来提高  $\alpha$ -半乳糖苷酶产量, 降低生产成本是解决这一问题的重要途径。

本研究利用硫酸铵沉淀、阴离子交换层析、分子筛层析和电泳技术从青霉 F63 中分离纯化到一种  $\alpha$ -半乳糖苷酶 Agl1, 该酶的分子量为 330 kDa, 亚基分子量为 82 kDa, 该蛋白是由相同亚基组成的一种四聚体。经过 MALDI-TOF-MS 鉴定和 ESI-MS/MS 测序分析, 该蛋白为一种新的  $\alpha$ -半乳糖苷酶。利用所测的两段内肽的氨基酸序列, 设计简并引物, 以青霉基因组 DNA 为模板 PCR 扩增得到了  $\alpha$ -半乳糖苷酶的一段核苷酸序列。根据克隆到的  $\alpha$ -半乳糖苷酶的核苷酸序列设计引物, 通过反向 PCR 技术得到了该基因的 5'上游和 3'下游序列。根据该  $\alpha$ -半乳糖苷酶的基因组序列, 设计恰当的引物, 以青霉 F63 菌丝体总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 克隆到该  $\alpha$ -半乳糖苷酶 cDNA 的全长序列。通过测序证明该  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因内部是没有内含子的。该  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因的开放阅读框架 (ORF) 为 2205 bp, GTG 被推定为该基因的起始密码子, 编码一个含有 734 个氨基酸的酶蛋白, N 端 21 个氨基酸为该  $\alpha$ -半乳糖苷酶的信号肽序列。推测该酶的理论分子量为 78.5 kDa, 理论 pI 为 5.07。在成熟蛋白的氨基酸序列中, 有 7 个潜在的糖基化位点。与其它的  $\alpha$ -半乳糖苷酶的氨基酸序列进行比较发现该  $\alpha$ -半乳糖苷酶的氨基酸序列与黑曲霉的序列一致性最高, 达到 69.6%。该  $\alpha$ -半乳糖苷酶与已知的青霉的  $\alpha$ -半乳糖苷酶的氨基酸序列比较, 发现它们的序列一致性较低, 与紫青霉和单青霉的氨基酸序列一致性分别为 7.5%和 8.2%。这是首次从青霉属中克隆到糖基水解酶 36 家族的  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因。

将编码 $\alpha$ -半乳糖苷酶成熟蛋白的序列克隆到毕赤酵母表达载体pPIC9 中, 电击转化宿主菌 GS115, 利用 $\alpha$ -半乳糖苷酶底物 (pNPG) 平板筛选阳性转化子。从 100 个转化子中筛选到了 23 株表达 $\alpha$ -半乳糖苷酶的重组子, 其中 56<sup>#</sup>转化子在 3L发酵罐水平表达量约为 0.2 mg/mL发酵液,  $\alpha$ -半乳糖苷酶的酶活力达 111 U/mL, 约为国外最高酶活力的 2 倍, 是国内构建的 $\alpha$ -半乳糖苷酶基因工程菌株的 3 倍。

将重组 $\alpha$ -半乳糖苷酶和天然 $\alpha$ -半乳糖苷酶进行纯化并进行了酶学性质的研究。天然酶的最适温度为 45℃, 重组酶的最适pH为 40℃。天然酶与重组酶的最适pH都为 5.0。重组酶与天然酶对高温都较敏感。天然酶在pH 5.0-6.0 之间具有良好的pH稳定性, 而重组酶在pH 6.0-6.5 之间具有良好的pH稳定性, 它们在常温作用 12 h后, 剩余酶活力都大于 88%。天然酶的比活为 106.4 U/mg, 重组酶的比活为 925.1 U/mg。天然酶和重组酶都受Hg<sup>2+</sup>的强烈抑制, 原始酶受Ag<sup>+</sup>的抑制不显著而重组酶受到Ag<sup>+</sup>的完全抑制。它们其它的酶学性质是相似的。重组 $\alpha$ -半乳糖苷酶和天然 $\alpha$ -半乳糖苷酶都可以有效降解蜜二糖、棉子糖和水苏糖。重组 $\alpha$ -半乳糖苷酶的比活性较高, 最适温度与最适pH接近动物肠道的生理条件, 故重组的 $\alpha$ -半乳糖苷酶更有利于作为动物饲料添加剂。

关键词: 青霉,  $\alpha$ -半乳糖苷酶, 分离纯化, 性质鉴定, 基因克隆, 异源表达, 毕赤酵母

## Abstract

$\alpha$ -galactosidases ( $\alpha$ -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.22), which are distributed widely in microorganisms, plants and animals, catalyze the hydrolysis of  $\alpha$ -1,6 linked  $\alpha$ -galactoside residues from polymeric galacto(gluco)mannans and from oligosaccharides such as melibiose, raffinose and stachyose.  $\alpha$ -galactosidase is widely used in industrial fields, such as feed and food additive, pulp and paper processing, medicine and pharmaceutical industry. However,  $\alpha$ -galactosidases are mainly produced from naturally microbial strains and the expression level of  $\alpha$ -galactosidases is too low for commercial use. An effective approach to solving the problem is to clone an  $\alpha$ -galactosidase coding gene and to construct recombinant strains with high-level expression of  $\alpha$ -galactosidase to improve the production and to low the price of the  $\alpha$ -galactosidase.

An extracellular  $\alpha$ -galactosidase from *Penicillium* sp F63, designated as Agl1, was purified to homogeneity by ammonium sulfate precipitation, ion-exchange and gel filtration chromatography with a molecular mass of 82 kDa on SDS-PAGE while 330 kDa on native gradient PAGE, which indicated that Agl1 is a tetramer of identical subunits. Identification of MALDI-TOF-MS and sequencing of ESI-MS/MS suggested that the protein is a novel  $\alpha$ -galactosidase. Based on amino acid sequences of the internal peptides, degenerated primers were synthesized and used to amplify specific chromosomal DNA sequence encoding the partial fragment of the target  $\alpha$ -galactosidase. Subsequently, inverse PCR was performed to clone the flanking sequences of the fragment and to acquire the whole genomic sequence of the  $\alpha$ -galactosidase. A cDNA encoding the  $\alpha$ -galactosidase was isolated by RT-PCR. The ORF of *Agl1* consists of 2205 nucleotides encoding a protein of 734 amino acids including 21 residues as a putative signal peptide in its N-terminal. *Agl1* was intron-less, and a GUG codon was considered as the start codon of the gene. The theoretical molecular mass and pI of the protein were 78.5 kDa and 5.07, respectively. Seven potential N-glycosylation sites (N-X-S/T) could be identified in the amino acid sequence of the mature protein. Comparison of the deduced amino acid sequence of *Agl1* with those of other  $\alpha$ -galactosidase genes showed that Agl1 has the highest overall similarity to AglC of *A. niger* with a sequence identity of 69.6%. However,  $\alpha$ -galactosidases of family 27 such as those of *P. purpurogenum* (identity, 7.5%) and *P. simplicissimum* (identity, 8.2%) showed little homology to Agl1. To our knowledge, this is the first report of gene cloning for *Penicillium*  $\alpha$ -galactosidase belonging to family 36 of glycosyl hydrolases.

The gene encoding mature protein of Agl1 was cloned into expression vector pPIC9. The recombinant vector was then linearized and transformed into strain GS115 by electroporation.  $\alpha$ -galactosidase-expressing transformants were selected by their ability to degrade the substrate pNPG and the recombinant colonies were colored yellow. There were 23 recombinants in the 100 transformants, of which the recombinant 56# produced the highest activity reached 111U/mL in

high cell density fermentation carried out in a 3 L fermenter, which was known to be the highest expression level with determination of enzyme activity against pNPG as substrate.

The recombinant and native  $\alpha$ -galactosidase were purified to electrophoretic homogeneity by ammonium sulfate precipitation, anion-exchange and gel filtration chromatography and were characterized. The optimal temperature of native enzyme is 45°C while that of recombinant enzyme is 40°C. The optimal pH values of the native and the recombinant enzyme were both 5.0. Both of the enzymes are sensitive to high temperature. The native enzyme displays good pH stability after 12 hour in the range from 5.0 to 6.0 while the recombinant enzyme does after 12 hours from 6.0 to 6.5, which retain 88% of their activity. The specific activity of the native enzyme is 106.4 U/mg while that of the recombinant enzyme is 925.1 U/mg. The native and the recombinant enzymes are completely inhibited by  $\text{Hg}^{2+}$ . The native  $\alpha$ -galactosidase is partially inhibited by  $\text{Ag}^+$  and the recombinant  $\alpha$ -galactosidase is totally inhibited by  $\text{Ag}^+$ . While other metal ions and chemicals have no or little effect on the activity of the  $\alpha$ -galactosidases. The native and recombinant  $\alpha$ -galactosidases catalyze the release of galactose from natural oligosaccharides, such as melibiose, raffinose, and stachyose.

Because of the higher specific activity and the better optimal temperature and pH, which are nearly in accordance with the physicochemical conditions of the intestines of monogastric animals, the recombinant  $\alpha$ -galactosidase is more advantageous to be used in animal feed additive than the native one.

Keywords: *Penicillium* sp.,  $\alpha$ -galactosidase, purification, characterization, gene cloning, heterologous expression, *Pichia pastoris*

# 目 录

|  |    |
|--|----|
| 中文摘要-----  | I  |
| Abstract-----  | II |
| 第一章 引言-----  | 1  |
| 1 $\alpha$ -半乳糖苷酶及其分子生物学的研究进展-----                   | 1  |
| 1.1 $\alpha$ -半乳糖苷酶的来源-----                          | 1  |
| 1.2 $\alpha$ -半乳糖苷酶的生理功能-----                        | 1  |
| 1.3 $\alpha$ -半乳糖苷酶的分类-----                          | 2  |
| 1.4 $\alpha$ -半乳糖苷酶的生化性质-----                        | 4  |
| 1.5 $\alpha$ -半乳糖苷酶的基因工程-----                        | 5  |
| 1.6 $\alpha$ -半乳糖苷酶的表达与调控-----                       | 8  |
| 1.7 $\alpha$ -半乳糖苷酶的结构和功能研究-----                     | 9  |
| 2 $\alpha$ -半乳糖苷酶的应用领域与应用前景-----                     | 11 |
| 2.1 饲料工业-----  | 11 |
| 2.2 食品工业-----  | 13 |
| 2.3 造纸工业-----  | 13 |
| 2.4 医疗领域-----  | 14 |
| 3 真核生物的表达系统-----                                     | 14 |
| 3.1 啤酒酵母( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )表达系统----- | 15 |
| 3.2 甲醇营养型酵母表达系统-----                                 | 15 |
| 3.2.1 多形汉逊酵母表达系统-----                                | 15 |
| 3.2.2 巴斯德毕赤酵母表达系统-----                               | 16 |
| 3.3 巴斯德毕赤酵母表达系统在在饲料添加剂开发上的应用-----                    | 21 |
| 3.3.1 饲料用酶-----                                      | 21 |
| 3.3.2 激素-----  | 22 |
| 3.3.3 抗菌肽-----                                       | 22 |
| 研究的目的是和意义-----                                       | 23 |
| 第二章 一种来源于青霉的新的 $\alpha$ -半乳糖苷酶的分离纯化及其酶学性质            |    |
| -----  | 24 |
| 1 材料和方法-----   | 24 |
| 1.1 材料-----  | 24 |



|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1.1.1 | 菌株-----  | 24 |
| 1.1.2 | 试剂和仪器-----                                       | 24 |
| 1.1.3 | 培养基和培养条件-----                                    | 24 |
| 1.2   | 酶活性测定-----                                       | 24 |
| 1.3   | 蛋白质浓度和分子量的测定-----                                | 24 |
| 1.4   | 酶的分离纯化-----                                      | 25 |
| 1.4.1 | 离子交换层析-----                                      | 25 |
| 1.4.2 | 凝胶过滤层析-----                                      | 25 |
| 1.5   | 电泳-----  | 28 |
| 1.5.1 | SDS-PAGE-----                                    | 25 |
| 1.5.2 | 非变性 PAGE-----                                    | 26 |
| 1.5.3 | 活性染色-----  | 26 |
| 1.5.4 | 非变性梯度凝胶电泳-----                                   | 27 |
| 1.6   | $\alpha$ -半乳糖苷酶转 PVDF 膜-----                     | 27 |
| 1.7   | 纯化蛋白的质谱鉴定与内肽序列的测定-----                           | 27 |
| 1.8   | 酶学性质-----  | 27 |
| 1.8.1 | $\alpha$ -半乳糖苷酶的最适 pH 和 pH 稳定性的测定-----           | 27 |
| 1.8.2 | $\alpha$ -半乳糖苷酶的反应最适温度及热稳定性-----                 | 28 |
| 1.8.3 | 不同金属离子及相关化学试剂对 $\alpha$ -半乳糖苷酶的影响-----           | 28 |
| 1.8.4 | $\alpha$ -半乳糖苷酶反应初速度和 $K_m$ 及 $V_{max}$ 的测定----- | 28 |
| 1.8.5 | $\alpha$ -半乳糖苷酶比活性测定-----                        | 28 |
| 1.8.6 | 底物特异性的测定-----                                    | 29 |
| 2     | 结果与分析-----                                       | 29 |
| 2.1   | 青霉 F63 $\alpha$ -半乳糖苷酶的活性染色-----                 | 29 |
| 2.2   | 来源于青霉的 $\alpha$ -半乳糖苷酶 Agl1 的纯化-----             | 30 |
| 2.3   | $\alpha$ -半乳糖苷酶的 N 端测序-----                      | 31 |
| 2.4   | 纯化蛋白的内肽序列的测定-----                                | 31 |
| 2.5   | $\alpha$ -半乳糖苷酶的酶学性质-----                        | 33 |
| 2.5.1 | $\alpha$ -半乳糖苷酶活性的测定-----                        | 33 |
| 2.5.2 | $\alpha$ -半乳糖苷酶的酶学性质-----                        | 33 |
|       | 本章小结-----  | 39 |
|       | 第三章 $\alpha$ -半乳糖苷酶基因的克隆-----                    | 40 |
| 1     | 材料和方法-----                                       | 40 |
| 1.1   | 材料-----  | 40 |
| 1.1.1 | 菌株和质粒-----                                       | 40 |
| 1.1.2 | 引物合成-----  | 40 |
| 1.1.3 | 试剂盒、工具酶和生化试剂-----                                | 40 |

|   |    |
|---|----|
| 1.2 方法-----   | 40 |
| 1.2.1 青霉 F63 基因组 DNA 的提取-----                           | 40 |
| 1.2.2 $\alpha$ -半乳糖苷酶基因组 DNA 片段的扩增-----                 | 41 |
| 1.2.3 反向 PCR-----                                       | 41 |
| 1.2.4 $\alpha$ -半乳糖苷酶全长 cDNA 的获得-----                   | 42 |
| 1.2.5 双酶切-----  | 43 |
| 1.2.6 DNA 电泳回收-----                                     | 43 |
| 1.2.7 连接-----   | 44 |
| 1.2.8 感受态细胞的制备-----                                     | 44 |
| 1.2.9 电转化-----  | 44 |
| 1.2.10 筛选重组子-----                                       | 45 |
| 1.2.11 质粒 DNA 的大量提取-----                                | 45 |
| 1.2.12 $\alpha$ -半乳糖苷酶 DNA 及 cDNA 序列测定、序列一致性比较-----     | 46 |
| 2 结果-----   | 46 |
| 2.1 获得 $\alpha$ -半乳糖苷酶基因的部分序列-----                      | 46 |
| 2.2 反向 PCR-----   | 47 |
| 2.3 $\alpha$ -半乳糖苷酶基因 cDNA 的克隆及鉴定-----                  | 49 |
| 2.4 青霉 F63 $\alpha$ -半乳糖苷酶基因组 DNA、cDNA 及衍生的氨基酸序列分析----- | 51 |
| 2.5 青霉 $\alpha$ -半乳糖苷酶起始密码子的推断-----                     | 52 |
| 2.6 青霉 F63 $\alpha$ -半乳糖苷酶的序列一致性分析-----                 | 53 |
| 本章小结-----   | 56 |
| 第四章 $\alpha$ -半乳糖苷酶基因的异源表达-----                         | 57 |
| 1 材料和方法-----  | 57 |
| 1.1 材料-----   | 57 |
| 1.1.1 菌株与质粒-----  | 57 |
| 1.1.2 引物合成-----   | 57 |
| 1.1.3 培养基-----  | 57 |
| 1.1.4 试剂及仪器-----  | 57 |
| 1.2 方法-----   | 58 |
| 1.2.1 $\alpha$ -半乳糖苷酶的重组菌株的构建-----                      | 58 |
| 1.2.2 $\alpha$ -半乳糖苷酶基因信号肽编码序列的去除-----                  | 58 |
| 1.2.3 真核重组表达载体的构建-----                                  | 59 |
| 1.2.4 质粒 DNA 的处理-----                                   | 59 |
| 1.2.5 酵母感受态的制备-----                                     | 59 |
| 1.2.6 酵母细胞的转化-----                                      | 60 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1.2.7 | 转化子的筛选-----  | 60 |
| 1.2.8 | 目的基因在毕赤酵母中的表达检测-----                               | 60 |
| 1.2.9 | 发酵罐水平重组酵母的高细胞密度发酵-----                             | 61 |
| 2     | 结果-----  | 61 |
| 2.1   | 表达载体的构建和重组质粒的转化-----                               | 61 |
| 2.2   | 表达 $\alpha$ -半乳糖苷酶的阳性重组子的筛选-----                   | 62 |
| 2.3   | 摇瓶水平 $\alpha$ -半乳糖苷酶的表达-----                       | 63 |
| 2.4   | 重组子的 PCR 检测-----                                   | 63 |
| 2.5   | 发酵罐水平 $\alpha$ -半乳糖苷酶的表达-----                      | 64 |
|       | 本章小结-----  | 66 |
|       | 第五章 重组与天然 $\alpha$ -半乳糖酶的酶学性质比较-----               | 67 |
| 1     | 材料和方法-----   | 67 |
| 1.1   | 试验材料-----  | 67 |
| 1.2   | 实验仪器-----  | 67 |
| 1.3   | 重组 $\alpha$ -半乳糖酶的纯化-----                          | 67 |
| 1.3.1 | 粗酶液的制备-----  | 67 |
| 1.3.2 | HiTrap Q Sepharose XL 层析-----                      | 67 |
| 1.3.3 | Sephacryl S-200 分子筛层析-----                         | 67 |
| 1.4   | 蛋白含量的测定-----                                       | 68 |
| 1.5   | 电泳-----  | 68 |
| 1.6   | 表达产物的脱糖基化-----                                     | 68 |
| 1.7   | $\alpha$ -半乳糖酶的酶学性质的研究-----                        | 68 |
| 2     | 结果-----  | 68 |
| 2.1   | 重组 $\alpha$ -半乳糖苷酶的纯化-----                         | 68 |
| 2.2   | 天然和重组 $\alpha$ -半乳糖苷酶的酶学性质比较-----                  | 71 |
| 2.2.1 | $\alpha$ -半乳糖苷酶的最适作用 pH 和 pH 稳定性-----              | 71 |
| 2.2.2 | $\alpha$ -半乳糖苷酶的最适作用温度和热稳定性-----                   | 72 |
| 2.2.3 | 重组 $\alpha$ -半乳糖苷酶的 $K_m$ 值和最大反应速度 $V_{max}$ ----- | 73 |
| 2.2.4 | 不同化学试剂对天然和重组 $\alpha$ -半乳糖苷酶酶活的影响-----             | 74 |
| 2.2.5 | 天然和重组 $\alpha$ -半乳糖苷酶的底物特异性-----                   | 75 |
| 2.2.6 | 重组 $\alpha$ -半乳糖苷酶与天然 $\alpha$ -半乳糖苷酶的酶学性质的比较----- | 77 |
|       | 本章小结-----  | 78 |
|       | 第六章 讨论-----  | 79 |
|       | 第七章 结论-----  | 82 |

|           |    |
|-----------|----|
| 参考文献----- | 84 |
| 致谢-----   | 93 |
| 作者简介----- | 94 |

## 第一章 引言

### 1 $\alpha$ -半乳糖苷酶及其分子生物学的研究进展

$\alpha$ -半乳糖苷酶 ( $\alpha$ -galactosidase, EC3.2.1.22) 最初是从酵母底面发酵液中提取出来的, 加水可以分解蜜二糖, 故又称为蜜二糖酶。后来通过对各种碳水化合物为底物研究蜜二糖酶的特性, 结果发现该酶的主要作用底物是具有  $\alpha$ -D-半乳糖苷结构的碳水化合物, 因此又将该酶命名为  $\alpha$ -半乳糖苷酶 (李孝辉等, 2003)。 $\alpha$ -半乳糖苷酶属于外切糖苷酶类, 能够专一性催化糖链非还原末端  $\alpha$ -半乳糖苷键的水解, 它不仅能够水解含  $\alpha$ -半乳糖苷键的寡糖, 例如蜜二糖、棉子糖、水苏糖、毛蕊花糖等, 而且还能够催化含该键的多糖, 如  $\alpha$ -半乳甘露聚糖等。绝大多数的  $\alpha$ -半乳糖苷酶都是糖蛋白酶, 由甘露糖和 N-乙酰氨基葡萄糖组成的寡糖与蛋白组分上天冬酰胺结合而构成 (Wallis 等, 2001)。由于  $\alpha$ -半乳糖苷酶在农业、食品、造纸业、医学等方面的巨大应用前景, 自 20 世纪 60 年代以来, 对  $\alpha$ -半乳糖苷酶进行了广泛深入的研究, 并取得了很大的进展。

#### 1.1 $\alpha$ -半乳糖苷酶的来源

$\alpha$ -半乳糖苷酶广泛存在于微生物、植物、动物和人体内 (Dey 等, 1972)。在微生物中, 细菌、放线菌、丝状真菌和酵母等都能合成  $\alpha$ -半乳糖苷酶 (Aslanidis 等, 1989; Talbot 等, 1990; Elshafei 等, 2001; Adya 等, 1977; Richard 等, 1981)。目前, 已分离筛选出许多产  $\alpha$ -半乳糖苷酶的微生物, 如大肠杆菌、芽孢杆菌、链霉菌、青霉、红曲霉、米曲霉、黑曲霉、焦曲霉、泡盛曲霉、葡萄酒被孢霉、毛霉、根霉、黄曲霉、啤酒酵母等等 (张树政, 1984)。微生物  $\alpha$ -半乳糖苷酶有较高的产量, 特别是丝状真菌, 每升培养基可以分泌 30 g 蛋白质 (Den Herder 等, 1992), 它们产生的  $\alpha$ -半乳糖苷酶可以分泌到胞外、具有合适的酸碱度和良好的稳定性从而最有利于技术应用。因此产生  $\alpha$ -半乳糖苷酶的真菌受到越来越广泛的关注。

#### 1.2 $\alpha$ -半乳糖苷酶的生理功能

$\alpha$ -半乳糖苷酶对于植物种子的萌发至关重要, 它的缺乏可能抑制种子的萌发。种子萌发初期, 它首先在合适的 pH 下催化含有  $\alpha$ -半乳糖苷键的寡糖如棉子糖和水苏糖的降解, 其终产物 D-半乳糖通过糖酵解途径迅速转化和消耗, 为种子的萌发提供最初的能量来源。后期,  $\alpha$ -半乳糖苷酶主要参与细胞壁储存的多糖  $\alpha$ -半乳甘露聚糖等的水解 (吴劲松等, 2000; Brouns 等, 2006)。

细胞膜上糖脂和糖蛋白的复杂糖链与真核细胞的生长发育密切相关, 特别是在免疫系统的自

我识别过程中发挥重要的作用。能够修饰细胞膜表面的  $\alpha$ -半乳糖苷酶可以影响免疫反应。人类的 B 型红细胞膜上的抗原决定簇为末端含有  $\alpha$ -半乳糖苷键的复杂糖链，它具有较强的免疫原反应。如果水解去掉这个半乳糖残基，可以使之转变为具有较弱免疫原性的 O 型血细胞（Lenny 等, 1994）。

在患有 Fabry 疾病的人体中发现具有  $\alpha$ -D-galactosyl-1,4- $\beta$ -D-galactosyl-1,4-D-glucosyl 三糖结构的糖脂的积累。与正常人不同的是，这个  $\alpha$ -D-半乳糖残基是非 B 抗体专一性的。检测病人血细胞的  $\alpha$ -半乳糖苷酶活性时发现，男性病人缺乏  $\alpha$ -半乳糖苷酶活性，女性病人的  $\alpha$ -半乳糖苷酶活性仅为正常人群的 14-15%。因此人体中  $\alpha$ -半乳糖苷酶的缺乏可以引起 Fabry 疾病（Clarke and Iwanochko, 2005）。

### 1.3 $\alpha$ -半乳糖苷酶的分类

根据  $\alpha$ -半乳糖苷酶的最适 pH，可把它分成酸性  $\alpha$ -半乳糖苷酶和碱性  $\alpha$ -半乳糖苷酶。绝大多数真核微生物的  $\alpha$ -半乳糖苷酶都是酸性的；在一些植物及细菌中的  $\alpha$ -半乳糖苷酶则属于碱性  $\alpha$ -半乳糖苷酶（Carmi 等, 2003; Lee 等, 2004; Akiba and Horikoshi, 1976）。几乎所有的碱性  $\alpha$ -半乳糖苷酶都可以有效的降解水苏糖，而水解棉子糖的能力较低。

根据  $\alpha$ -半乳糖苷酶的氨基酸序列，又可以把  $\alpha$ -半乳糖苷酶分成糖基水解酶的第 27、36、4 和 57 家族（Henrissat, 1991 和 1995）（表 1-1）。其中，来源于植物、动物、酵母和大多数丝状真菌的  $\alpha$ -半乳糖苷酶属于糖基水解酶的第 27 家族，在 27 家族中也有个别的  $\alpha$ -半乳糖苷酶来源于细菌，如来自 *Clostridium josui* 多纤维素酶体的一个组分 Aga27A（Jindou 等, 2002）和来自 *Pseudomonas fluorescens* 的  $\alpha$ -半乳糖苷酶 Aga27A（Halstead 等, 2000）；来源于绝大多数细菌和少数的真菌的  $\alpha$ -半乳糖苷酶属于糖基水解酶的第 36 家族（Ademark 等, 2001; Margolles-Clark 等, 1996）。许多属于 36 家族的  $\alpha$ -半乳糖苷酶一般都是多聚体，分子量较大。36 和 27 这两个家族的  $\alpha$ -半乳糖苷酶之间的氨基酸序列一致性非常低，仅有个别位置的氨基酸具有一致性。在  $\alpha$ -半乳糖苷酶的第 36 家族中，具有一个保守序列 LFVL/MDDGWFG，在  $\alpha$ -半乳糖苷酶的第 27 家族中也有一个保守序列 DYLYKDNC。这两个保守区域可能是  $\alpha$ -半乳糖苷酶的催化活性位点或底物结合位点（Aslanidis 等, 1989; Fridjonsson 等, 1999; Hart 等, 2000）。来自大肠杆菌 K12 的  $\alpha$ -半乳糖苷酶（MelA）属于第 4 家族，该  $\alpha$ -半乳糖苷酶在结构上不同于第 27 和 36 家族的  $\alpha$ -半乳糖苷酶，在起催化作用时需要  $\text{NAD}^+$  和  $\text{Mg}^{2+}$  的辅助（Liljeström, 1987）。而来自于 *Pyrococcus furiosus* 和 *Thermococcus alcaliphilus*  $\alpha$ -半乳糖苷酶则属于糖基水解酶的第 57 家族（Betül, 2004）。绝大多数已报道的  $\alpha$ -半乳糖苷酶都属于糖基水解酶的第 36 和 27 家族。其中碱性的  $\alpha$ -半乳糖苷酶既不属于 36 家族也不属于 27 家族，具体属于哪个家族目前有待确定（Carmi, 2003; Lee, 2004）。

表 1-1 根据氨基酸序列部分  $\alpha$ -半乳糖苷酶的分类

Table 1-1 Classification of several  $\alpha$ -galactosidases based on amino acid sequences

| $\alpha$ -半乳糖苷酶             | 来源  | 家族 |
|-----------------------------|---|----|
| AglA                        | <i>A. niger</i>                             | 27 |
| Agl B                       | <i>A. niger</i>                             | 27 |
| AglC                        | <i>A. niger</i>                             | 36 |
| AGL I                       | <i>T. reesei</i>                            | 27 |
| AGL II                      | <i>T. reesei</i>                            | 36 |
| AGLIII                      | <i>T. reesei</i>                            | 27 |
| Aga                         | <i>T. brockianus</i> ITI360                 | 36 |
| $\alpha$ -galactosidase     | <i>B.adolescentis</i>                       | 36 |
| AGL I                       | <i>M. vinacea</i>                           | 27 |
| AGL II                      | <i>M. vinacea</i>                           | 27 |
| MEL1                        | <i>S. carlsbergiensis</i>                   | 27 |
| AGL I                       | <i>P. simplicissimum</i>                    | 27 |
| $\alpha$ -galactosidase     | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>             | 27 |
| $\alpha$ -galactosidase     | <i>Phanerochaete chrysosporium</i>          | 27 |
| $\alpha$ -galactosidase     | <i>Penicillium purporogenum</i>             | 27 |
| $\alpha$ -galactosidase     | <i>Absidia corymbifera</i>                  | 36 |
| $\alpha$ -galactosidase Aga | <i>Lactococcus raffinolactis</i> ATCC 43920 | 36 |
| $\alpha$ -galactosidase     | <i>Streptococcus mutans</i>                 | 36 |
| $\alpha$ -galactosidase     | <i>Sulfolobus solfataricus</i>              | 36 |
| MelA                        | <i>E. coli</i> K-12                         | 4  |
| $\alpha$ -galactosidase     | <i>Pyrococcus furiosus</i>                  | 57 |
| $\alpha$ -galactosidase     | <i>Thermococcus alcaliphilus</i>            | 57 |

Dey 等（1993）根据  $\alpha$ -半乳糖苷酶底物的特异性，把  $\alpha$ -半乳糖苷酶分成两类：一类是作用于低分子量底物 pNPG、蜜二糖、棉子糖等寡糖的  $\alpha$ -半乳糖苷酶，如青霉 *P. simplicissimum* 的 AGL II 和黑曲霉 *A. niger*  $\alpha$ -Gal I 等（Luonteri 等，1998；Ademark 等，2001）；第二类作用于半乳糖甘露聚糖等多聚底物和不同程度水解低分子量底物的  $\alpha$ -半乳糖苷酶，如 *P. simplicissimum* 的 AGL I 和黑曲霉 *A. niger*  $\alpha$ -Gal II、III 和 IV 等（Luonteri 等，1998；Ademark 等，2001）。随后又发现了第三类  $\alpha$ -半乳糖苷酶，它既可以水解寡糖又可以水解多聚糖，如葡萄酒色被包霉（*M. vinacea*）产生的  $\alpha$ -半

乳糖苷酶 (Shibuya 等, 1997)。

1.4  $\alpha$ -半乳糖苷酶的生化性质

植物来源的  $\alpha$ -半乳糖苷酶主要用于种子的萌发, 有的  $\alpha$ -半乳糖苷酶还涉及叶片的衰老 (Lee, 2004)。植物的  $\alpha$ -半乳糖苷酶可以分为酸性  $\alpha$ -半乳糖苷酶和碱性  $\alpha$ -半乳糖苷酶, 酸性的  $\alpha$ -半乳糖苷酶对于分解棉子糖具有偏爱性, 而碱性的  $\alpha$ -半乳糖苷酶对于水苏糖具有较高的亲合性。其中碱性的  $\alpha$ -半乳糖苷酶的分子量较高, 一般大于 80 kDa, 而酸性  $\alpha$ -半乳糖苷酶的  $\alpha$ -半乳糖苷酶的分子量较低一般在 50 kDa 左右。图 1-2 为部分植物  $\alpha$ -半乳糖苷酶的酶学性质。

图 1-2 植物  $\alpha$ -半乳糖苷酶的酶学性质

| Properties of some plant $\alpha$ -galactosidases |              |          |         |          |                |
|---|--------------|----------|---------|----------|----------------|
| 植物  | 酸碱性          | 分子量(kDa) | 最适 pH   | 最适温度(°C) | 参考文献           |
| 慈菇  | Acid form    | 60       | 5.8     | 60       | 肖念清 (1996)     |
| Cucumber leaves                                   | Acid form    | 50       | 5.2     |          | Smart EL, 1980 |
|   | Acid form    | 25       | 5.5     |          |                |
| Melon fruit                                       | Acid form    | 27       | 5.8     | 50       | Gao Z, 1999    |
|   | Alkline I    | 79       | 7.5     | 35       |                |
|   | Alkline II   | 92       | 7.5     | 40       |                |
| Rice leaf   | Alkline form | 87       | 8       |          | Lee R-H, 2004  |
| Melon fruit                                       | Alkline form | 84       | 7.5-8.5 | 30-37    | Carmi N, 2003  |
| sunflower seeds                                   | Acid form    | 40       | 5       | 50       | Kim W-D, 2003  |

绝大多数的真菌的  $\alpha$ -半乳糖苷酶是胞外酶, 细菌来源的  $\alpha$ -半乳糖苷酶一般都是胞内酶。在真核生物中,  $\alpha$ -半乳糖苷酶的分子量为 50 kDa 左右, 一般为单体酶。原核生物中分子量约为 80 kDa 左右, 一般为多体酶。来源于丝状真菌的  $\alpha$ -半乳糖苷酶氨基末端的氨基酸序列一致性一般在 40—60%, 有的高达 76% (Shibuya 等, 1995; Manzanares 等, 1998)。真核生物的  $\alpha$ -半乳糖苷酶的等电点在 4.1-5.2 之间, 绝大多数在 5.0 以下; 最适温度在 40—60°C, 以 55°C 居多, 一般在 55°C 以下具有良好的稳定性; 最适 pH 值大多为 4—5.5, pH 稳定性一般在 3.0-8.0 之间; 细菌的  $\alpha$ -半乳糖苷酶最适 pH 值相对较高, 一般为 5.5—8.1 左右, 最适温度一般为 37—45°C。这些差异是由于不同来源的  $\alpha$ -半乳糖苷酶在分子结构上的差异造成的。绝大多数的  $\alpha$ -半乳糖苷酶活性受到  $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$  的完全抑制, 受到  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  等的部分抑制。微生物  $\alpha$ -半乳糖苷酶的部分酶学性质见表 1-3

表 1-3 微生物  $\alpha$ -半乳糖苷酶的酶学性质

Table 1-3 Properties of microbial  $\alpha$ -galactosidases



| 来源  | 类型 | 分子量         | 亚基 |        | 最适 pH   | 文献                   |
|---|----|-------------|----|--------|---------|----------------------|
|   |    |             | 数  | 最适温度   |         |                      |
| <i>Aspergillus nidulans</i>                   | 胞内 | 370 kDa     | 4  | 50℃    | 4~5     | Rios 等, 1993         |
| <i>Aspergillus ficuum</i> NRRL3135            | 胞外 | 70.8 kDa    | 1  | 60℃    | 5.6~6.0 | Zapater 等, 1990      |
| <i>Aspergillus niger</i>                      | 胞外 | 45 kDa      | 1  | NR     | 4~4.5   | ]Adya and Adya, 1977 |
| <i>Aspergillus niger</i>                      | 胞外 | 147 kDa     | 2  | 50℃    | 5       | Somiari 等, 1995      |
| <i>Aspergillus tamaritii</i>                  | 胞内 | 265+/-5 kDa | 3  | 45-50℃ | 4.2~4.3 | Civas 等, 1984        |
| <i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30            | 胞外 | 50+/-3 kDa  | NR | 60℃    | 4       | Zeilinger 等, 1993    |
| <i>Aspergillus niger</i> N400                 | 胞外 | 54 kDa      | NR | 50-55℃ | 4.5     | Manzanares 等, 1998   |
| <i>Mortierella vinacea</i>                    | 胞内 | 240 kDa     | 4  | 60℃    | 3~4     | Shibuya 等, 1997      |
| <i>Mortierella vinacea</i>                    | 胞外 | 60 kDa      | 1  | 60℃    | 3~4     | Shibuya 等, 1997      |
| <i>Penicillium purpurogenum</i> No. 618       | 胞外 | 67 kDa      | NR | 55℃    | 4.5     | Shibuya 等, 1995      |
| <i>Penicillium simplicissimum</i> VTT-D-78090 | 胞外 | 55 kDa      | 1  | NR     | 3.5~4.5 | Luonteri 等, 1998     |
| <i>Penicillium simplicissimum</i> VTT-D-78090 | 胞外 | 400 kDa     | 4  | NR     | 4~5     | Luonteri 等, 1998     |
| <i>Penicillium simplicissimum</i> VTT-D-78090 | 胞外 | NR          | NR | NR     | 3.5~4.5 | Luonteri 等, 1998     |
| <i>Penicillium ochrochloron</i>               | 胞外 | 57.5 kDa    | 1  | 55℃    | 4.5     | Dey等, 1993           |
| <i>Monascus pilosus</i>                       | 胞内 | 150 kDa     | NR | 55℃    | 4.5~5   | Wong 等, 1986         |
| <i>Lactobacillus fermentum</i>                | 胞内 | 194.5 kDa   | 4  | 45℃    | 5.0~6.5 | Garro等, 1996         |
| <i>Streptococcus mutans</i>                   | 胞内 | 82 kDa      | 4  | NR     | 6.5     | Aduse-Opku 等, 1991   |
| <i>Micrococcus</i> sp No31-2                  | 胞内 | 367 kDa     | NR | 40℃    | 7.5~8.5 | Akiba 等, 1976        |
| <i>Bacillus</i> sp No7-5                      | 胞外 | 312 kDa     | NR | 40℃    | 6.0~8.5 | Akiba 等, 1976        |
| <i>Bacillus stearothermophilus</i>            | 胞外 | 247 kDa     | 3  | NR     | 7-7.5   | Talbot 等, 1990       |

## 1.5 $\alpha$ -半乳糖苷酶的基因工程

随着分子生物学的发展, 各种微生物来源的  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因从细菌、真菌中克隆并进行了功能表达分析, 研究了这些基因的表达调控, 并使其异源表达。Den Herder 等从黑曲霉中克隆到了一个  $\alpha$ -半乳糖苷酶的基因 (*aglA*), 该基因的 ORF 为 1635 bp, 成熟蛋白的长度为 514 个氨基酸, 含有 7 个潜在的糖基化位点 (Den Herder 等, 1992)。De Vries 等克隆了来源于黑曲霉的  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因 (*aglB*), 其开放阅读框架为 1750 bp, 含有 6 个内含子, 可编码 443 个氨基酸, 其中包括 16 氨基酸的信号肽和 7 个推断的糖基化位点 (De Vries 等, 1999)。Ademark 等从黑曲霉中克隆了  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因 (*aglC*), 该基因可编码 747 个氨基酸, 其氨基酸序列与 *T. reesei* 的 *agl2* 序列一致性可达 69% (Ademark 等, 2001)。Elina 等利用相似的实验方法 (cDNA 文库筛选) 从青霉 (*P. simplicissimum*) 中克隆到了  $\alpha$ -半乳糖苷酶的基因 (*aglI*), 该基因编码 435 个氨基酸, 其中包括 18 个氨基酸的信号肽序列, 在该序列中发现了 5 个潜在的糖基化位点 (Elina L 等,

1998)。同年,来源于另一种青霉(*P. purpurogenum*)的 $\alpha$ -半乳糖苷酶的cDNA克隆测序的结果表明其开放阅读框架为1371 bp,其编码的成熟蛋白有419个氨基酸组成,其分子量为46.3 kDa。在基因序列中有9个推定的糖基化位点(Shibuga等,1998)。Shibuga等利用寡核苷酸探针从cDNA文库中克隆到了来源于被孢霉的 $\alpha$ -半乳糖苷酶AGL I和AGL II的cDNA,其编码的氨基酸分别为397和376,这两种 $\alpha$ -半乳糖苷酶与其他来源的 $\alpha$ -半乳糖苷酶的氨基酸序列一致性分别为34—47%和31—49%(Shibuga等,1995和1997)。之后他们将这两种酶的cDNA转化到酵母中,并使其受到启动子GAL10的控制,分泌表达的重组 $\alpha$ -半乳糖苷酶的比活分别为68.7U/mg和28.3U/mg(Shibuya等,1999)。Suryani等利用基因文库克隆了来源于*Clostridium sterorarium* F-9的 $\alpha$ -半乳糖苷酶Aga36A的基因,该基因有2208bp组成,可编码736个氨基酸,预测分子量为84.8 kDa,该基因被转化到大肠杆菌中,纯化后的重组酶的最适温度为70℃,最适pH值是6.0,该重组酶可以水解棉子糖和瓜儿豆,比活分别为3.0U/mg和0.46U/mg(Suryani等,2003)。Naumova等从酵母中克隆到了 $\alpha$ -半乳糖苷酶基因MELp和MELj,这两个基因的开放阅读框架都为1413 bp,可编码471个氨基酸(Naumova等,1996)。Aduse-Opku等从*Streptococcus mutans*中克隆到的 $\alpha$ -半乳糖苷酶基因aga,其开放阅读框架为2163bp,可编码720个氨基酸,该基因中无信号肽序列,因此其编码的 $\alpha$ -半乳糖苷酶为胞内酶(Aduse-Opku, 1991)。Margolles-Clark等从木霉RutC-30的 $\alpha$ -半乳糖苷酶表达文库中分离到了的基因agl1、agl2、agl3,这三个基因分别可编码444、746、624个氨基酸,并将他们转化到酵母中,产生的 $\alpha$ -半乳糖苷酶有不同的底物特异性(Margolles-Clark等,1996)。Baik等克隆了犁头霉(*Abisidia Corymbifera* IFO8084) $\alpha$ -半乳糖苷酶的cDNA序列,该序列具有一个2190 bp的开放阅读框架,编码730个氨基酸。该 $\alpha$ -半乳糖苷酶被确定为四聚体,其氨基酸序列与其他的 $\alpha$ -半乳糖苷酶序列比对,结果表明该 $\alpha$ -半乳糖苷酶属于糖基水解酶的36家族。该 $\alpha$ -半乳糖苷酶的cDNA被克隆到一个融合表达载体pET32Trx中,构建了一个高效表达硫氧还原蛋白融合形式的 $\alpha$ -半乳糖苷酶的载体。在大肠杆菌中表达的 $\alpha$ -半乳糖苷酶融合蛋白表达量大约为原始菌株的40倍,并且该融合蛋白具有 $\alpha$ -半乳糖苷酶的活性,其酶学性质与原始菌株的 $\alpha$ -半乳糖苷酶的性质相似(Baik等,2000)。已经克隆的部分 $\alpha$ -半乳糖苷酶基因及主要特征见表1-4。

表 1-4 部分克隆的 $\alpha$ -半乳糖苷酶基因及其主要特征Table 1-4 Several cloned  $\alpha$ -galactosidases genes and their characteristics

| 来源                                       | 成熟蛋白    |        |        |      | 参考文献                    |
|--|---------|--------|--------|------|-------------------------|
|  | 糖基水解酶家族 | 氨基酸残基数 | 信号肽残基数 | 糖基化数 |                         |
| <i>Escherichia coli</i> K-12             | 4       | 450    |        |      | Liljestrom 等, 1987      |
| <i>Penicillium purpurogenum</i>          | 27      | 419    | 19     | 9    | Shibuya 等, 1998         |
| <i>Penicillium simplicissimum</i> (AGLI) | 27      | 417    | 18     | 5    | Luonteri 等, 1998        |
| <i>Aspergillus niger</i> (AglA)          | 27      | 522    | 23     | 7    | Den Herder 等, 1992      |
| <i>Aspergillus niger</i> (AglB)          | 27      | 427    | 16     | 7    | De Vries 等, 1999        |
| <i>Trichoderma reesei</i> (agl1)         | 27      | 417    | 27     | 5    | Margolles-Clark 等, 1996 |

|                                  |    |     |    |    |                         |
|----------------------------------|----|-----|----|----|-------------------------|
| <i>Trichoderma reesei</i> (agl3) | 27 | 602 | 22 | 7  | Margolles-Clark 等, 1996 |
| <i>Mortierella vinacea</i>       | 27 | 397 | 20 | 5  | Shibuya 等, 1995         |
| <i>Mortierella vinacea</i>       | 27 | 376 | 20 | 9  | Shibuya 等, 1997         |
| <i>Coffee bean</i>               | 27 | 363 | 15 | 1  | Zhu and Goldstein, 1994 |
| <i>Pseudomomas fluorescens</i>   | 27 | 382 | 23 |    | Halstead 等, 2000        |
| <i>Aspergillus niger</i> (AglC)  | 36 | 725 | 22 | 10 | Ademark 等, 2001         |
| <i>Trichoderma reesei</i> (agl2) | 36 | 720 | 26 | 9  | Margolles-Clark 等, 1996 |
| <i>Absidia corymbifera</i>       | 36 | 730 |    | 4  | Baik 等, 2000            |
| <i>Lactobacillus plantarum</i>   | 36 | 738 |    |    | Silvestroni 等, 2002     |
| <i>Escherichia coli</i>          | 36 | 708 |    |    | Aslanidis 等, 1989       |
| <i>Clostridium stercorearium</i> | 36 | 736 |    |    | Suryani 等, 2003         |
| <i>Streptomyces coelicolor</i>   | 36 | 499 |    |    | Kondoh 等, 2005          |

许多表达系统已经成功的用于  $\alpha$ -半乳糖苷酶的异源表达, 如大肠杆菌系统、毕赤酵母系统、啤酒酵母系统、丝状真菌表达系统、昆虫表达系统等 (Kondoh 等, 2005; Shibuya 等, 1999; Murphy 等, 2002; Fellingner 等, 1991; Chen 等, 2000a, 2000b)。  $\alpha$ -半乳糖苷酶异源表达的例子见表 1-5。目前在啤酒酵母中表达的单青霉的  $\alpha$ -半乳糖苷酶的酶活力最高, 达到 63 U/mL。  $\alpha$ -半乳糖苷酶主要是利用微生物发酵法生产的, 菌种主要来源于曲霉和犁头酶。据报道, 美国、丹麦和日本已有这方面的基因工程菌, 并且还发酵了少量产品。但由于价格较高, 目前只是由于实验研究 (陆文清, 2000)。利用工程菌株高效表达  $\alpha$ -半乳糖苷酶, 降低生产成本是生产饲料用  $\alpha$ -半乳糖苷酶的发展方向。

表 1-5  $\alpha$ -半乳糖苷酶的异源表达Table 1-5 Heterologous expression of  $\alpha$ -galactosidases

| 来源                        | 基因                               | 宿主菌                             | 重组质粒               | 表达量        | 底物   | 参考文献                  |
|---------------------------|----------------------------------|---------------------------------|--------------------|------------|------|-----------------------|
| <i>Penicillium</i>        |                                  |                                 |                    |            |      |                       |
| <i>purpurogenum</i>       | <i><math>\alpha</math>-gal</i>   | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Yep-PGA            | 63 U/mL    | PNPG | Shibuya H, 1998       |
| <i>Trichoderma reesei</i> | <i>agl1</i>                      | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | p1A2               | 25.8 U/mL  | PNPG | Margolles-Clark, 1996 |
| <i>Trichoderma reesei</i> | <i>agl2</i>                      | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | p7BL               | 1.04 U/mL  | PNPG | Margolles-Clark, 1996 |
| <i>Trichoderma reesei</i> | <i>agl3</i>                      | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | p9AL               | 0.066 U/mL | PNPG | Margolles-Clark, 1996 |
| Coffee bean               | <i><math>\alpha</math>-gal</i>   | <i>Pichia pastoris</i>          | p $\alpha$ F-BZ-22 | 12 U/mL    | PNPG | Zhu A, 1995           |
| Coffee bean               | <i><math>\alpha</math>-gal</i>   | Insect cell                     | pVL-BZ             | 300 U/mg   | PNPG | Zhu A, 1995           |
| <i>Saccharomyces</i>      |                                  |                                 |                    |            |      |                       |
| <i>cerevisiae</i>         | <i><math>\alpha</math>-gal</i>   | <i>Aspergillus awamori</i>      | pPLF-686B3         | 51 U/mg    | PNPG | Murphy R-A, 2002      |
| Human                     | <i><math>\alpha</math>-gal A</i> | <i>Pichia pastoris</i>          | pCC106             | 20256 U/mL | MUG  | Chen Y, 2000a         |

|                      |                   |  |            |                          |       |                 |
|----------------------|-------------------|--|------------|--------------------------|-------|-----------------|
| Human                | $\alpha$ -gal A   | Insect cell                            | pAcC6079   | 2.1×10 <sup>4</sup> U/mL | MUG   | Chen Y,2000b    |
| 咖啡豆                  | $\alpha$ -gal     | <i>Pichia pastoris</i>                 | pPIC9K-Gal | 36 U/mL                  | PN PG | 高新, 等, 2003     |
| 短双歧杆菌                | aga1              | <i>E coli</i> BL21(DE3)                | pBVaga1    | 13.85 U/mg               | PNPG  | 陆宇, 等, 2005     |
| <i>Mortierella</i>   |                   |  |            |                          |       |                 |
| <i>vinacea</i>       | $\alpha$ -gal e 1 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YEpMG1 |            | 0.16 U/mL                | PNPG  | Shibuya H, 1999 |
| <i>Mortierella</i>   |                   |  |            |                          |       |                 |
| <i>vinacea</i>       | $\alpha$ -gal 2   | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YEpMG2 |            | 0.64 U/mL                | PNPG  | Shibuya H, 1999 |
| <i>Streptomyces</i>  | $\alpha$ -gal     | <i>E coli</i>                          |            |                          |       |                 |
| <i>coelicolor</i>    |                   | BL21(DE3)                              | pET-28-gal | 2.58 U/mg                | PNPG  | Kondoh K, 2005  |
| <i>Cyamopsis</i>     |                   |  |            |                          |       |                 |
| <i>tetragonoloba</i> | $\alpha$ -gal     | <i>Hansenula polymorpha</i>            |            | 38 U/mg                  |       |                 |
| (guar)               |                   |  |            |                          |       |                 |

### 1.6 $\alpha$ -半乳糖苷酶的表达与调控

对于  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因调控的研究可以有助于理解其基因表达机制和表达规律, 不同来源的  $\alpha$ -半乳糖苷酶的表达与调控模式是不同的。大肠杆菌来源的  $\alpha$ -半乳糖苷酶有两种操纵子控制其基因的表达。一种是位于质粒上的棉子糖操纵子(Raf operon), 一种是位于染色体上的蜜二糖操纵子(Mel operon)。棉子糖操纵子由一个调节基因 *rafR* 和三个结构基因 *rafA*、*rafB* 和 *rafD* 构成。*rafA* 编码  $\alpha$ -半乳糖苷酶, *rafB* 编码棉子糖转运酶(Raf permease), *rafD* 编码蔗糖水解酶。 $\alpha$ -半乳糖苷酶被蜜二糖和棉子糖诱导, 也被 D-半乳糖微弱诱导, 但不受乳糖等结构类似糖的诱导。Raf 操纵子的基因结构组成与乳糖操纵子相似。以阻遏物介导的负调控在该操纵子调节中起主要作用, 以 cAMP-CAP 为介导的正调控也参与调节(Su 等, 1989)。蜜二糖操纵子(mel operon)位于大肠杆菌的染色体上, 由一个调节基因(*MelR*)和两个结构基因 *mela* 和 *melB* 构成。*mela* 编码  $\alpha$ -半乳糖苷酶, *melB* 编码硫甲基半乳糖转运酶(Bourgerie 等, 1997)。乳酸菌来源的有关  $\alpha$ -半乳糖苷酶的操纵子(aga-galK operon)也位于其染色体 DNA 上, 该操纵子有一个调节基因(*galR*)和三个结构基因 *aga*、*galK* 和 *galT* 组成, 分别编码  $\alpha$ -半乳糖苷酶、半乳糖激酶和 1-磷酸半乳糖尿苷酰转移酶组成。在该乳酸菌中, *galR* 表达的产物 GalR 是  $\alpha$ -半乳糖苷酶(aga)的抑制物, 可以降低  $\alpha$ -半乳糖苷酶的活性达 20 倍以上(Boucher 等, 2003)。真菌的  $\alpha$ -半乳糖苷酶的表达调控较复杂, 有更多的基因参与  $\alpha$ -半乳糖苷酶的表达。来源于酿酒酵母的  $\alpha$ -半乳糖苷酶调控模式是由一个调节环路构成, 有多个基因参与调控表达。这些基因位于几个不同的染色体上, 调控单元由结构基因 *GAL1*、*GAL2*、*GAL5*、*GAL7*、*GAL10* 和 *MEL1* 和调节基因 *GAL4*、*GAL80*、*GAL3* 构成。结构基因分别编码半乳糖激酶、半乳糖转运酶、1-磷酸半乳糖变位酶、1-磷酸半乳糖尿苷酰转移酶、差向异构酶和  $\alpha$ -半乳糖苷酶, 这些结构基因参与了半乳糖的代谢与利用。调节基因 *GAL4* 编码一个激活结构基因转录的蛋白(GAL4), *GAL80* 编码一个结合到 GAL4 上的蛋白质, 来阻止结构基因的转录。由 *GAL3* 表达的产物来催化小分子诱导物(Inducer)的产生, 诱导物可以阻止 *GAL80* 结合到 *GAL4*

上或者将 *GAL80* 从 *GAL4* 解离下来, 从而诱导结构基因的表达(Johnston, 1987)。

## 1.7 $\alpha$ -半乳糖苷酶的结构和功能研究

随着大量的  $\alpha$ -半乳糖苷酶的鉴定、纯化及克隆表达的研究, 该酶结构和功能的关系也受到越来越广泛的重视。通过对碱性的  $\alpha$ -半乳糖苷酶、27 家族的  $\alpha$ -半乳糖苷酶和 36 家族的  $\alpha$ -半乳糖苷酶分别进行氨基酸序列的一致性分析, 发现这三类  $\alpha$ -半乳糖苷酶有两个保守的基序 (Motif), 一个是 DD(G/C)W, 另一个为 K $\times$ D。第 27 家族的  $\alpha$ -半乳糖苷酶的活性中心被预测为含有两个羧基基团 (Mathew, 1987), 一个含羧基的氨基酸作为催化亲核子, 另一个则作为催化质子受体。其中 K $\times$ D 基序被认为是 27 家族最保守基序 YLKVDNC 的一部, 这个 D 已经被证明是催化亲核子 (Hart 等, 2000)。另一个保守序列 DD(G/C)W 被认为是  $\alpha$ -半乳糖苷酶的特征性标志, 其中的一个 D 很可能是作为酸碱催化剂而起作用, 这个基序非常可能是催化中心部分 (Carmi 等, 2003)。虽然这些家族的  $\alpha$ -半乳糖苷酶来源不同, 氨基酸序列差异较大, 但它们非常可能具有相似的活性中心, 这些不同的  $\alpha$ -半乳糖苷酶可能具有有相同的祖先 (Margolles-Clark 等, 1996)。

| Alkaline $\alpha$ -gals and RFO synthases |   |       | A             | B           |
|---|---|-------|---------------|-------------|
| <i>CmAGA2</i>                             | DWFGWCTWDAFYTDATAEGVVEGLKSLSEGG                 | ---   | APPKFLIIDDGWQ | CGIDGVKKVDV |
| <i>HvSIP</i>                              | DWFGWCTWDAFYTDVTADGVKQGLRSLAEGG                 | ---   | APPRFLIIDDGWQ | CGVDGVKKVDV |
| <i>CmAGA1</i>                             | NWFGWCTWDAFYTDVTS DG VKKGLESFENG                | ---   | IPPKFVIIDDGWQ | AGVDGVKKVDV |
| <i>CsRFS</i>                              | DKFGWCTWDAFYLT VHPQGVIEGVRHLVDGG                | ---   | CPPGLVLIDDGWQ | VGIDGVKKIDV |
| <i>PsStS</i>                              | DKFGWCTWDAFYLT VNP I V I W H G L D D F S K G G  | ---   | VEPRFVIIDDGWQ | SGITGVKKVDV |
| Family 27 - Glycosyl hydrolases           |   |       |               |             |
| <i>Ca</i>                                 | PPMGWNSWNHFRCLNDEKLIRETADAMVSKGLAALGYKYINLDDCWA |       |               | WGVDYLKYDN  |
| <i>Ct</i>                                 | PPMGWNSWNHFGCDINENVVRETADAMVSTGLAALGYQYINLDDCWA |       |               | WGVDYLKYDN  |
| <i>At</i>                                 | PQMGWNSWNFFACINETVIKETADALVSSGLADLGYIHVNIDDCWS  |       |               | WGVDYLKYDN  |
| <i>An</i>                                 | PPMGFNWAFMCDLNETLFTETADTMAANGLRDAGYNRINLDDCWM   |       |               | WGVDYLKYDN  |
| <i>Sc</i>                                 | PQMGWDMNTFACDVSEQLLLDTADRISDLGLKDMGYKIILDDCWS   |       |               | NRVDYLKYDN  |
| Family 36 - Glycosyl hydrolases           |   |       |               |             |
| <i>Ec</i>                                 | RPVHLNTWEGIYFNHNPDIYMQMAERAAALG                 | ----- | VERFIIDDGWF   | HPVDYVKWDM  |
| <i>Bs</i>                                 | RPILINWEATYFHFNEEKILRLAKTAAELG                  | ----- | IELFVLDDGWF   | APISYVKWDM  |
| <i>Pp</i>                                 | IPSVLNTWETLTFAVSESKVQHLIEHAHQLG                 | ----- | LQMLVLDDGWF   | NQLDYLKWDM  |
| <i>Bh</i>                                 | RPILLNSWEATYFDFTEDSLVEFAKEGKKLG                 | ----- | VELFVLDDGWF   | APISYIKWDM  |
| Conserved                                 | W   |       | G DD W        | K D         |

图 1-1 三种  $\alpha$ -半乳糖苷酶家族间的保守序列

Fig 1-1 Motifs conserved between the three  $\alpha$ -gal families.

The representative sequences are as follows: *CmAGA2* (*Cucumis melo*  $\alpha$ -galII AY114165), *HvSIP* (*Hordeum vulgare* S27762), *CmAGA1* (*Cucumis melo*  $\alpha$ -galI AY114164), *CsRFS* (*Cucumis sativus* E15707), *PsStS* (*Pisum sativus* CAC38094), *Ca* (*Coffea arabica* Q42656), *Ct* (*Cyamopsis tetragonoloba* P14794), *At* (*A. thaliana* CAB87430), *An* (*Aspergillus niger* CAB46229), *Sc* (*Saccharomyces cerevisiae* P04824), *Ec* (*E. coli* P06720), *Bs* (*Bacillus stearothermophilus* AAD23585), *Pp* (*Pediococcus pentosaceus* CAA 76720), *Bh* (*Bacillus halodurans* BAB 05947).

Maranvilille 等认为咖啡豆  $\alpha$ -半乳糖苷酶的 C 端部分序列对于  $\alpha$ -半乳糖苷酶的活性是非常重要的

的。当其C端有1个或2个氨基酸残基缺失时,截短的 $\alpha$ -半乳糖苷酶的活性大大降低;当其C端缺失3个或3个以上氨基酸残基时,截短的 $\alpha$ -半乳糖苷酶的活性完全丧失,因此 $\alpha$ -半乳糖苷酶的C端在维持 $\alpha$ -半乳糖苷酶的构象起关键的作用,其C端可能直接影响该酶活性中心适当构象的形成(Maranvilille, 2000a)。Maranvilille E等还认为咖啡豆 $\alpha$ -半乳糖苷酶的一个色氨酸Trp16对于该 $\alpha$ -半乳糖苷酶的活性也是非常重要的。采用定点突变的方法用不同的氨基酸来替代Trp16,结果表明芳香族氨基酸如苯丙氨酸和酪氨酸可以产生与野生型 $\alpha$ -半乳糖苷酶相似表达量的酶活,在该位置用精氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸和半胱氨酸替代的 $\alpha$ -半乳糖苷酶的活性与野生型的 $\alpha$ -半乳糖苷酶相比酶活显著降低,而没有检测到其他氨基酸替代的 $\alpha$ -半乳糖苷酶的酶活。该研究证实了色氨酸Trp16影响了 $\alpha$ -半乳糖苷酶活性中心羧基的pKa,它对于维持 $\alpha$ -半乳糖苷酶的催化反应是必需的(Maranvilille, 2000b)。Hart等鉴定克隆了来源于白腐菌*P.chrysosporium*的 $\alpha$ -半乳糖苷酶基因,并对其成熟蛋白的活性位点分析表明,Asp130在27家族的糖基水解酶中是高度保守的,是该酶的活性位点催化亲核子,该位置附近可能是 $\alpha$ -半乳糖苷酶的催化位点或酶的结合位点,对其活性影响较大(Hart等, 2000)。来自于木霉的 $\alpha$ -半乳糖苷酶用 $H_2O_2$ 处理后其活性提高了12倍,用其他的氧化剂如 $NaIO_4$ 、 $KmnO_4$ 和 $K_4S_4O_8$ 处理也获得了相似的结果。核磁共振的研究结果表明,对于 $\alpha$ -半乳糖苷酶活性的维持,一个甲硫氨酸的巯基的氧化是必需的。在此 $\alpha$ -半乳糖苷酶中含有5甲硫氨酸,其中的一个甲硫氨酸位于该酶的活性中心部位(Kachurin 等, 1995)。许多 $\alpha$ -半乳糖苷酶的晶体结构都已获得并初步进行了结构和功能的研究(Suzuki等, 1970; Fujimoto 等, 2003a,b; Golubev等, 2004;)。Golubeu A M等得到了来源于木霉*T. reesei*的晶体结构(Golubeu, 1993和2004),并对其催化机制进行了分析(图1-2)。该晶体模型包含两个结构域,一个是位于N末端的 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状拓扑结构,另一个是C末端的反向平行的 $\beta$ -折叠片,在催化结构域中包含4个糖基化位点。在所有的含有 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状拓扑结构的糖苷酶中, $(\beta/\alpha)_8$ 桶状拓扑结构是该酶的催化结构域,活性中心的氨基酸都位于C末端的反向平行的 $\beta$ -折叠片中(Naumoff, 2005)。在 $\alpha$ -半乳糖苷酶的晶体结构中,Asp54、Trp205和Trp19对于底物的结合非常关键,可能是其底物的结合位点。Asp225、Asp132、Asp226构成的空间结构可能是其催化位点。Asp132和Asp226介导了木霉 $\alpha$ -半乳糖苷酶的双置换催化机制。Asp132作为亲核子(nucleophile)靠近于半乳糖苷的C1,而Asp226则作为酸碱催化剂。在Asp266的周围有两个水分子,其中一个水分子在降解酶-底物中间物时参与二次亲核攻击(Golubev等, 2004)。水稻的 $\alpha$ -半乳糖苷酶的晶体结构也利用MIR技术进行了确定(Fujimoto等, 2003),该模型是由362个氨基酸的肽链组成,含有一个催化结构域(1-278)和一个C端结构域。催化域也包含一个 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状拓扑结构,它是许多糖基水解酶的共同基序(Motif)。活性位点穴(pocket)位于催化结构域的C端。两个二硫键位于活性催化穴的附近。C端结构域是由8个 $\beta$ 折叠片组成,包含一个Greek关键基序。Asp130和Asp185为其催化残基,Trp-164和Cys-162为其底物结合位点。从以上的研究可以看出, $\alpha$ -半乳糖苷酶保守的Asp、Trp、Cys和Met等氨基酸对于 $\alpha$ -半乳糖苷酶的活性是非常重要的。目前对于 $\alpha$ -半乳糖苷酶的具体催化机制研究的还不够清楚,随着 $\alpha$ -半乳糖苷酶结构的深入研究,其催化机制会得到更明确的阐明和认识。



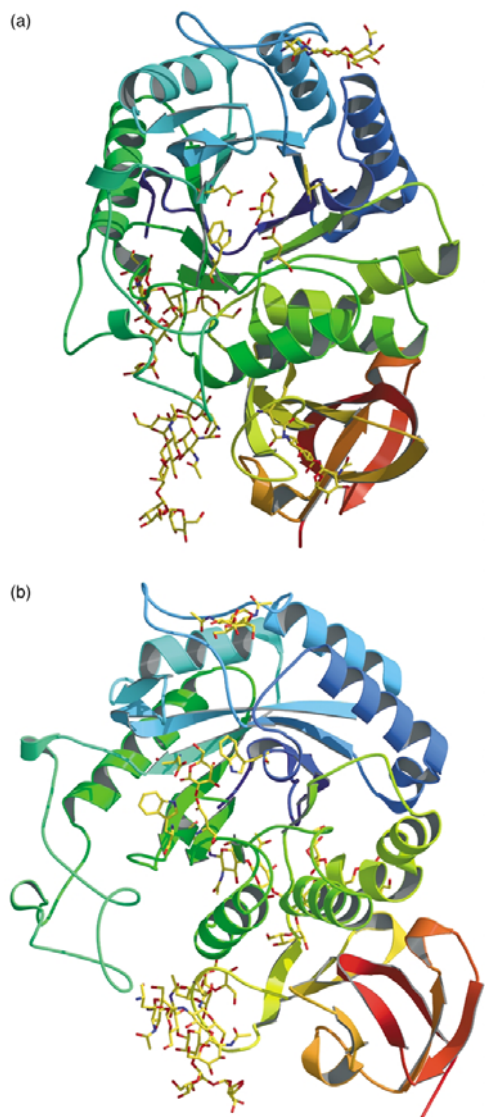


图 1-2 木霉 $\alpha$ -半乳糖苷酶的晶体结构

Figure 1—2. (a) The overall fold and the active site of  $\alpha$ -galactosidase from *T. reesei*.  $\beta$ -Strands and  $\alpha$ -helices are represented, respectively, as arrows and coils; Asp132 and Asp226 participating in catalysis, two Trp residues, involved in important hydrophobic interactions with the substrate, and four N-binding sugar chains are represented as “sticks”. The  $(\beta/\alpha)_8$ -barrel domain A and domain B, consisting of  $\beta$ -strands, are held together by a network of hydrogen bonds, mainly between  $\alpha$ -helices 7 and 8 of domain A and two  $\beta$ -turns of domain B. (b) The same model rotated 45° clockwise. Two long loops protruding from each domain interact by mutual hydrogen bonds between both, amino acid residues and mannose residues of the branched oligosaccharide linked to Asn157.

## 2 $\alpha$ -半乳糖苷酶的应用领域与应用前景

### 2.1 饲料工业

豆粕是饲料工业中应用最广的植物性蛋白质原料，一般在日粮中的用量为 25~30%。在豆类饼粕饲料中，含有 5-7% 的单胃动物不能消化的 $\alpha$ -半乳糖苷的低聚糖，占豆粕中碳水化合物总量的 40% 左右，它们是一种抗营养因子，主要包括水苏糖、棉子糖和毛蕊花糖（图 1-6），在单胃动物的肠道内缺乏 $\alpha$ -半乳糖苷酶，较高浓度的此类游离的水溶性低聚糖可能造成食糜黏度增高，对营养物的吸收和消化产生不利影响。同时这些低聚寡糖不能被家禽消化道的内源酶降解，只有经过消化道微生物发酵以后才能被利用。不仅消化能大大降低，而且在发酵过程中会产生 $\text{CO}_2$ 、 $\text{CH}_4$ 和 $\text{H}_2$ 等气体，使畜禽的采食量下降，还产生胀气等疾病。另外，这些低聚寡糖还能刺激肠道蠕动，提高饲料通过消化道的速度，从而降低营养物质的利用率。豆粕中还含有约 14% 的果胶，而果胶具

有高度的粘性。这些粘性的多糖不但抑制营养物质的消化和吸收，而且还能和肠道分泌的消化酶结合，降低消化酶活性，甚至还会引起肠粘膜形态和功能的变化。果胶中约 7%的 $\alpha$ -半乳糖苷具有良好的热稳定性，在普通的饲料调制加工过程也不会失活，同时亦不能被单胃动物的内源酶消化。如果所有这些半乳糖苷都被 $\alpha$ -半乳糖苷酶将水解掉，则豆粕的代谢能含量会增加 250 千卡，即如果每千克日粮的代谢能含量为 3000 千卡，则总能量含量的增加为 8.0%以上(Puchal, 1999)。

表 1-6 不同植物干种子中  $\alpha$ -半乳糖苷的含量 (%) (谢启宇, 2000; 张晋辉, 2001)

Table 1-6 The content of  $\alpha$ -galactosides in different plant seeds

| 植物种子 | 总含量  | 棉子糖  | 水苏糖  | 毛蕊花糖 |
|------|------|------|------|------|
| 羽扇豆  | 19.1 | 3.3  | 11.8 | 4    |
| 棉籽   | 9.27 | 6.91 | 2.36 | 痕量   |
| 鹰嘴豆  | 7.5  | 1    | 2.5  | 4    |
| 大豆   | 7.1  | 1.9  | 5.2  | 痕量   |
| 绿豆   | 7.1  | 0.8  | 2.5  | 3.8  |
| 豇豆   | 5.7  | 0.4  | 4.8  | 0.5  |
| 苜蓿草籽 | 5.3  | 1.35 | 3.95 | 痕量   |
| 兵豆   | 5    | 0.9  | 2.7  | 1.4  |
| 紫花豌豆 | 4.7  | 0.6  | 1.9  | 2.2  |
| 葵花籽  | 3.23 | 3.09 | 0.14 | 痕量   |
| 花生   | 1.32 | 0.33 | 0.99 | 痕量   |
| 大麦   | 0.71 | 0.71 | 痕量   | 痕量   |
| 黑麦   | 0.71 | 0.71 | 痕量   | 痕量   |
| 小麦   | 0.7  | 0.7  | 痕量   | 痕量   |
| 玉米   | 0.26 | 0.26 | 痕量   | 痕量   |

在豆粕和菜籽粕中的  $\alpha$ -半乳糖苷类的化合物目前主要是通过物理和化学的加工工艺来消除豆粕和菜籽粕中的低聚寡糖。但这种方法耗时耗力，大大增加了饲料的生产成本。因此，应用  $\alpha$ -半乳糖苷酶来水解  $\alpha$ -半乳糖苷，可以认为是物理加工工艺的补充或替代物理加工的一种方法。用  $\alpha$ -半乳糖苷酶来水解棉子糖类的低聚寡糖是减少其抗营养作用的有效方式。Graham 等认为相比较未经过处理的豆粕，用  $\alpha$ -半乳糖苷酶处理的豆粕饲喂鸡后，粪便中棉子糖和水苏糖分别减少了 69% 和 54%。净代谢能 (TME) 和生长性能 (GP) 都有明显增加 ( $P < 0.05$ ) (Graham 等, 2002)。Gaizi 等研究表明用蛋白酶 P3 (*Aspergillus niger*) 和  $\alpha$ -半乳糖苷酶 (*Aspergillus oryzae*) 混合处理豆粕来饲喂雏鸡，可以增加 TME 和 TND (True nitrogen digestibility) 值 ( $P < 0.05$ )，豆粕的营养值显著提高 (Gaizi 等, 2003)。Igbasan 等发现在豌豆日粮中单独添加果胶酶没有效果，但在加入  $\alpha$ -半乳糖苷酶后的肉鸡的生长速度和日粮的营养值有提高的趋势 (Igbasan 等, 1997)。Barcelona Autònoma 大学曾用肉仔鸡作为试验材料，研究  $\alpha$ -半乳糖苷酶对玉米—豆粕型日粮的能量、粗蛋白和其它营养物质的影响，结果表明在每公斤饲料中添加 100 U 的  $\alpha$ -半乳糖苷酶，代谢能提高 5—10%，氮的



存留率提高 10—15%，证实了添加  $\alpha$ -半乳糖苷酶而产生的水解作用，不仅有利于提高日粮的能量消化率，而且还有利于提高蛋白质的消化率（谢启宇，2000）。

但关于  $\alpha$ -半乳糖苷酶的饲喂效果仍然存在一些争议，对于消除豆粕中寡糖的抗营养作用还没有充分肯定。Angel 等认为添加  $\alpha$ -半乳糖苷酶并不能提高豆粕的营养价值（Angel 等，1988）。Slominski 等研究表明使用  $\alpha$ -半乳糖苷酶和蔗糖酶不影响双低菜籽粕和豆粕的非淀粉多糖的消化率（Slominski 等，1994）。而且 Irish 等在日粮中添加  $\alpha$ -半乳糖苷酶和蔗糖酶后反而使日粮的代谢能下降（Irish 等，1993）。

产生这些矛盾结果可能与试验所采用的方法和试验材料、相同或相似的试验没有统一的标准有关。像寡糖的处理和添加方法、日粮的类型和营养水平和酶制剂自身的稳定性都影响试验的结果，可能得出不同的结论。但目前公认的观点为在豆粕类饲料中添加  $\alpha$ -半乳糖苷酶可以提高豆粕的代谢能，消除肠道的胀气现象，增加动物的采食量。作者认为把  $\alpha$ -半乳糖苷酶作为复合酶制剂的一个成分添加到饲料中会起到明显的效果。

## 2. 2 食品工业

在制糖工业中，由于棉子糖的存在，造成糖蜜黏度增加而阻碍蔗糖结晶析出，以致产生大量的废糖蜜，致使糖产量降低。使用  $\alpha$ -半乳糖苷酶去除废糖蜜中的棉子糖，可以产生半乳糖和蔗糖，因而提高蔗糖的得率。使用  $\alpha$ -半乳糖苷酶法制糖可以减少在制糖过程中降温与再加热的费用，降低了生产成本（Ganter 等，1988）。

在大豆及其制品中，含有 1% 的棉子糖、4% 的水苏糖和微量的毛蕊花糖。这些寡糖阻碍人类对豆类的消化吸收，能够产生胀气等疾病，而人胃、肠不分泌  $\alpha$ -半乳糖苷酶，因此在豆制品中加入  $\alpha$ -半乳糖苷酶，可以分解这些寡糖，增加人类对豆类营养的吸收。微生物来源的  $\alpha$ -半乳糖苷酶制品早在上世纪七十年代已广泛的应用于豆奶加工和处理来消除豆奶中的引起胀气和消化不良的棉子糖和水苏糖（Sugimoto 等，1970；Thaananukul 等，1976，Cruz 等，1981）。米曲霉（*Apergillus oryzae*）来源的  $\alpha$ -半乳糖苷酶在 50℃ 作用豆奶 2 小时后，棉子糖和水苏糖的含量大大降低（Cruz 等，1982）。Prashanth 等利用藻酸钙固定化的  $\alpha$ -半乳糖苷酶和非固定化的  $\alpha$ -半乳糖苷酶处理豆奶制品 12 小时后，在豆奶中的棉子糖类的寡糖可分别减少 81% 和 93%，效果十分显著（Prashanth，2005）。

纠尔豆胶和角豆胶是两种食品胶，纠尔豆胶含有 38-40% 的  $\alpha$ -半乳糖，角豆胶则含有 22-24% 的  $\alpha$ -半乳糖。半乳糖是以残基形式连接于甘露糖为主链的甘露聚糖上。半乳糖侧链的存在对半乳甘露聚糖的特性影响很大。 $\alpha$ -D-半乳糖基侧链的多少及位置，决定其在水中的溶解度和胶凝能力。纠尔豆胶和角豆胶用  $\alpha$ -半乳糖苷酶进行修饰后，适量除去侧链的半乳糖残基而不使甘露聚糖主链断裂，可提高水溶性，也极大提高纠尔豆胶和角豆胶的胶凝能力，提高其商品性（Luonteri 等，1998）。

## 2. 3 造纸工业

在造纸工业中，使用  $\alpha$ -半乳糖苷酶也是一种令人感兴趣的选择。阿拉伯木聚糖和半乳葡聚甘露聚糖是软木中主要的半纤维素组分， $\alpha$ -半乳糖苷酶可以水解半纤维素类的半乳葡聚甘露聚糖，

使  $\alpha$ -半乳糖从其碳链骨架上分离下来。尽管单独使用  $\alpha$ -半乳糖苷酶处理造纸加工过程中的软木纸浆对纸张的漂白没有什么影响,但是软木纸浆被木聚糖酶、甘露聚糖酶和  $\alpha$ -半乳糖苷酶的处理后,可以提高纸张的漂白效果。Clarke 等利用来自 *Neocallimastix Patriciarum* 的木聚糖酶 XylA 和来自 *Pseudomonas fluorescens* 甘露聚糖酶 ManA 和  $\alpha$ -半乳糖苷酶 AgaA 处理软木纸浆可以显著提高纸张的漂白效果(Clarke 等, 2000)。

## 2. 4 医疗领域

目前,  $\alpha$ -半乳糖苷酶在医学界也引起广泛的兴趣。许多  $\alpha$ -半乳糖苷酶可以从 B 血细胞表面的糖蛋白水解  $\alpha$ -1,3-D 连接的末端半乳糖苷残基,从而造成 B 型血到 O 型血的转换。通过把 B 型血转换成的 O 型血可以增加通用血型(Lenny, 1994)。

Fabry 疾病(X 性连锁隐性遗传性溶酶体  $\alpha$ -半乳糖苷酶缺乏性疾病)是一种糖代谢缺陷遗传病,该疾病不但会导致疼痛,还影响肾脏、心包、中枢神经系统和皮肤,还会造成胃肠道症状。这种疾病是由人体的溶酶体  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 缺乏造成的,从而造成糖磷脂的逐渐增加。 $\alpha$ -半乳糖苷酶可以水解糖磷脂的末端  $\alpha$ -半乳糖残基,这种功能可以用于治疗 Fabry 疾病(Takenaka 等, 2000; Clarke 等, 2005)。

$\alpha$ -半乳糖苷酶作为一种新型的酶制剂,在许多领域都有广阔的应用前景。目前,  $\alpha$ -半乳糖苷酶主要是利用原菌株的发酵生产,产量较低,成本较高。 $\alpha$ -半乳糖苷酶的基因工程菌株目前报道也较少,主要还是在实验室研究阶段。因此,不断提高菌种产酶水平,研究  $\alpha$ -半乳糖苷酶合成的调控机制、酶基因的克隆和异源高效表达,进行产业化推广应用是今后发展的主要方向。

## 3. 真核生物的表达系统

大肠杆菌是用得最多、研究最成熟的基因工程表达系统,当前已商业化的基因工程产品大多是通过大肠杆菌表达的。大肠杆菌表达系统最突出的优点是工艺简单、产量高、周期短、生产成本低。然而,许多蛋白质在翻译后,需经过翻译后的修饰加工,如磷酸化、糖基化、酰胺化及蛋白酶水解等过程才能转化成活性形式。大肠杆菌缺少上述加工机制,不适合用于表达结构复杂的蛋白质。另外,蛋白质的活性还依赖于形成正确的二硫键并折叠成高级结构,在大肠杆菌中表达的蛋白质往往不能进行正确的折叠,往往以包含体状态存在。包含体的形成虽然简化了产物的纯化,但不利于产物的活性,为了得到有活性的蛋白,就需要进行变性溶解及复性等操作,这一过程比较繁琐,同时增加了成本。近年来,以酵母作为工程菌表达外源蛋白日益引起重视,原因是与大肠杆菌相比,酵母是低等真核生物,除了具有细胞生长快,易于培养,遗传操作简单等原核生物的特点外,又具有对表达的蛋白质进行正确加工,修饰,合理的空间折叠等功能,非常有利于真核基因的表达,能有效克服大肠杆菌系统缺乏蛋白质翻译后加工、修饰的不足。因此酵母表达系统受到越来越多的重视和利用(李晶, 1999)。

目前,在真核基因的表达系统中应用最普遍的是酵母表达系统、丝状真菌外源表达系统、昆虫细胞表达系统、植物基因表达系统、动物乳腺表达系统等。食品上应用的葡糖淀粉酶多来源于

曲霉，其中在黑曲霉中的表达量达到 20 g/L (Archer 等, 1997)，因此选用丝状真菌表达系统较为合适。

丝状真菌表达系统虽有外源蛋白分泌能力强、对合成的蛋白也能进行各种翻译后加工、重组子稳定、使用安全等特点，但它存在着一些现在无法解决的缺点：如受体菌本身遗传背景知识贫乏；存在着蛋白酶降解外源蛋白的现象；表达载体种类少，使用受局限；转化频率低；尤其是外源蛋白表达量低，菌体生长繁殖周期长，分离纯化困难等(Gouka 等, 1997; Minetoki 等, 1998; 刘谨, 2000)。目前在微生物基因工程当中最普遍利用的表达系统为：啤酒酵母表达系统和甲醇营养型酵母表达系统。

### 3.1 啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)表达系统

啤酒酵母表达系统的优点(Cereghino 等, 1999; 刘文等, 2001):

- (1)在小量培养基和大规模生物反应器中都能快速生长。
  - (2)目前已分离鉴定出了几个很强的酵母基因启动子。
  - (3)2 $\mu$ m 质粒可作为内源表达载体。
  - (4)可对蛋白质进行多种翻译后修饰。
  - (5)基因组很小，是目前已知的真核生物基因组最小的一个，酵母细胞既可作为单倍体存在，又可作为二倍体存在，这就克服在其它真核细胞中隐性基因控制的性状难以检测的缺陷。
- 但啤酒酵母表达系统也有其不足之处(马孟根等, 2001):
- (1)表达重组蛋白的表达量普遍偏低。
  - (2)大量表达时，即使使用诱导型的启动子也常常发生质粒丢失的现象。
  - (3)重组蛋白常发生超糖基化，每个 N-寡糖链上都含有 100 个以上的甘露糖，而正常的甘露寡糖链仅含 8-13 个甘露糖。过多的甘露糖可能会影响蛋白的生物活性及免疫原性。
  - (4)在有些实验中，分泌的蛋白都会留在壁膜间隙中，使得分离纯化十分困难。

### 3.2 甲醇营养型酵母表达系统

甲醇营养型酵母是近十年逐渐发展起来的一类可用于表达外源基因特别是真核生物基因的理想系统(Faber 等, 1995)。主要由多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)和巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)组成。

#### 3.2.1 多形汉逊酵母表达系统

多形汉逊酵母(*H. polymorpha*)是一种耐热酵母，最适生长温度为 37-43℃，最高生长温度达 49℃。它体内含有一特殊的甲醇代谢途径。此途径的第一步是在甲醇氧化酶(MOX)的催化下将甲醇氧化成甲醛和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，产生的甲醛可在甲醛脱氢酶(FMD)和甲酸脱氢酶的作用下进一步氧化成CO<sub>2</sub>，也可在二氢丙酮合成酶(Dihydroxy-acetone synatase, DHAS)等的作用下通过木酮糖单磷酸

途径生成碳水化合物,成为细胞物质。另一产物 $H_2O_2$ 则在过氧化物酶的作用下形成 $H_2O$ 和 $O_2$ 。甲醇代谢途径的关键酶MOX、FMD和DHAS的表达受阻遏/解阻遏机制的调控。乙醇及高浓度的葡萄糖和甘油阻遏基因表达,甲醇及低浓度甘油(0.3%)和葡萄糖(0.1%)能解阻遏,使相关酶得到一定程度的表达(Sierkstra等,1991; Gellissen等,1992)。在汉逊酵母中外源基因的整合多为非同源重组整合(约占50-80%),且往往是以串联的形式形成多个拷贝。该系统表达的外源蛋白可分泌到细胞外,也可在细胞质或过氧化物体内积累。现已发表的胞外表达的最高产量是黑曲霉葡萄糖氧化酶,为2.25 g/L(Mayer等,1999)。尽管该系统是一个很有发展前景的表达系统,但目前还未进入成熟应用阶段,还存在着一些缺陷和不足,如外源基因的整合多以非同源重组,这就存在着基因的稳定性问题(Dijk等,2000)。

### 3.2.2 巴斯德毕赤酵母表达系统

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)是近几年发展起来的较为完善的、被广泛用来表达外源蛋白的甲醇营养型酵母表达系统(Sreekrishna等,1997)。

人们对于巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)发生兴趣始于七十年代,由于它能利用甲醇作为唯一碳源大量合成蛋白质,曾一度用于工业规模的单细胞蛋白的生产,因此也对它作了大量研究,总结起来主要有以下几个特性:(1)能以甲醇作为唯一碳源快速生长,在无机盐培养基中细胞量可达100 g/L,其中代谢甲醇的关键酶乙醇脱氢酶含量可达细胞可溶性蛋白的30%;(2)生活史与酿酒酵母十分相似,在营养生长期以单细胞为主,但子细胞可以进行同宗交配,营养不良时可诱导相对交配型细胞交配产生二倍体,该二倍体能在以后的生长中得以保持,营养不良时也可诱导产生孢子,形成含有四个孢子的子囊,这些子囊孢子可用作四分子分析或随机分析;(3)细胞学研究表明巴斯德毕赤酵母存在着一种称为微体(microbody)的细胞器,由于该细胞器中大量合成过氧化物酶,所以微体也称过氧化物酶体( Peroxisome),它是一种由外膜包围着的结构简单的细胞器,其蛋白由核基因编码,但本身不含DNA,经诱导产生并随细胞生长而分裂,微体是一种合成储存蛋白质的地方,该特点对外源蛋白基因的表达十分有利,可使它们免受蛋白酶的降解且不对细胞产生毒害。

巴斯德毕赤酵母作为表达系统的优点为(彭毅等,2000;于平,2005):

(1) 高表达:由于醇氧化酶基因启动子很强,细胞生长速度很快,所以该表达系统表达的外源蛋白产量很高;

(2) 高稳定:由于该系统的表达载体不是以自主复制的质粒形式存在,而是整合在染色体上,所以构建的菌株十分稳定;

(3) 高分泌:酿酒酵母中一些分泌信号和先导序列(如 $\alpha$ 因子)的分子生物学特性已经研究的十分清楚,可用于巴斯德毕赤酵母表达系统,加之它自身的生物学特性,其分泌表达可达10g/L,这在已知的分泌表达系统中十分少见;

(4) 易放大:巴斯德毕赤酵母容易适应重组蛋白的大规模发酵生产,重组蛋白在巴斯德毕赤酵母中的表达已在1000 L 发酵罐中实现工业化生产;

(5) 具有生物活性:作为真核表达系统,可对表达的蛋白进行翻译后的加工与修饰,从而使表达出的蛋白具有生物活性;

(6) 便于纯化: 在 *P. pastoris* 中表达的蛋白既可存在于细胞内, 又可分泌到胞外, 自身分泌的蛋白非常少, 十分有利于纯化;

(7) 糖基化程度低, 与 *S. cerevisiae* 相比, *P. pastoris* 不产生过度的糖基化。*P. pastoris* 表达的糖蛋白的糖链长度为 8-14 个甘露糖, 而 *S. cerevisiae* 糖链中甘露糖多达 50-150 个; *S. cerevisiae* 分泌的糖蛋白的核心寡聚糖具有终端  $\alpha$ -1,3 糖苷连接, 使分泌的糖蛋白的抗原性明显增强, 而 *P. pastoris* 的糖基化位点与哺乳类细胞的相同, 其所分泌的糖蛋白的免疫原性较低, 更利于临床应用(Montesino 等, 1998; Gemmill 等, 1999)。

(8) 成本较低: 重组蛋白在巴斯德毕赤酵母中的表达比在昆虫和哺乳动物中表达成本要低, 生产和表达基质不需要象牛血清白蛋白那样昂贵的添加物, 也不需要 CO<sub>2</sub> 培养箱和组织培养箱等昂贵的设备。

### 3.2.2.1 毕赤酵母表达宿主菌

毕赤酵母的一个重要特性是能利用甲醇作为唯一的碳源和能量来源。毕赤酵母中存在一种称为微体的细胞器, 其中大量合成过氧化物酶, 因此称为过氧化物酶体。合成的蛋白质贮存于微体中, 可免受蛋白酶的降解, 且不对细胞产生毒害。因为甲醇能诱导其表达甲醇代谢所需的酶, 如 AOX, DHAS 和过氧化氢酶(Catalase), 表达的 AOX 和 DHAS 的含量甚至可达到总细胞蛋白的 60-80%。而以葡萄糖、甘油、或乙醇为碳源时, AOX 几乎不表达。AOX 的合成是在转录水平调控的, 其基因启动子为诱导型(Cregg 等, 1989; 李晶等, 1999)。

毕赤酵母表达宿主菌于 80 年代初开发获得, 大多应用宿主菌是通过野生型石油酵母 Y11430 进行突变改造而来。在组氨酸脱氢酶基因(*HIS4*)处有一突变, 用于转化后筛选重组菌株。其他的一些营养缺陷宿主菌或生物合成基因也可作为筛选标记。目前主要有 3 种表达宿主菌, 它们之间的区别在于 *AOX* 一个或二个基因的缺失而造成对甲醇利用能力高低的变化。最常用的宿主菌为 GS115(*his4*), 它含 *AOX1* 和 *AOX2* 基因, 在含甲醇的培养基上以野生型速率生长。KM71(*his4 arg4 aox1::ARG4*)宿主菌的 *AOX1* 已被 *S. cerevisiae* 的 *ARG4* 所代替, 因此, 此宿主菌只有依赖 *AOX2* 基因合成 AOX, 在甲醇中低速度生长。第 3 种宿主菌 MC100-3(*his4 arg4 aox1::SARG4AOX2::Phis4*)的两个 *AOX* 基因都被去除, 不能在含甲醇的培养基上生长。上述宿主菌的进一步改造, 还可得到其它衍生的宿主菌, 目前已有十几种不同基因型。SMD1163(*his4pep4prb1*), SMD1165(*his4prb1*)和 SMD1168 (*his4pep4*)是最近开发的一类蛋白酶缺失的宿主菌, 可减少表达外源蛋白的降解, 有广泛的应用价值(Cregg 等, 1985; 章如安等, 2000)。

### 3.2.2.2 毕赤酵母表达载体

毕赤酵母表达载体包括自我复制型的游离载体和整合型载体, 但以整合型载体为主。常见的整合型载体又分为表达胞内蛋白和分泌表达两类, 表达胞内蛋白的载体有: pPIC3、pPIC3K、pHIL-D2、pPICZA(B, C)等; 分泌表达的载体有: pPIC9、pPIC9K、pHIL-S1、pACO815、pPICZ

$\alpha$  A(B, C)等(马孟根等, 2001) (表 1-8)。通用的整合载体多含有 *AOXI* 启动子, 具有多种共同特性。一般都有一个外源基因表达框和 *AOXI* 启动子、多克隆位点(MCS)和一个从 *AOXI* 基因上拷贝下来的终止序列(TT); 同时, 作为筛选标记的 *HIS4* 基因和在细菌中进行复制起始点和选择标记(如 *ColEI* 复制起始点和抗氨苄基因); 同时也含有 *AOXI* 3' 的非编码区序列, 使外源基因能以同源重组的方式整合到染色体的 *AOXI* 部位(表 1-7)。

*P. pastoris* 表达载体中最常用的启动子为 *AOXI* 启动子, 它的甲醇诱导性很强, 由它控制的外源基因通常能得到高效表达。Shen 等报道从毕赤酵母中克隆到的甲醛脱氢酶(FLDI)基因的诱导型启动子具有 *AOXI* 启动子相同的强度或更高强度, 能在甲醇为唯一碳源或以甲胺代替甲醇为唯一氮源(葡萄糖、甘油等为碳源)情况下表达。用甲胺代替甲醇为诱导剂, 扩大了毕氏酵母的应用范围。甲胺不易挥发, 更适合于摇瓶研究, 毕赤酵母中 *FLDI* 启动子将有很好的应用前景 (Shen 等, 1998)。除诱导型启动子外, 近来发展的载体如 pGAPz 等则含有 3' -磷酸甘油醛脱氢酶(GAP)的启动子或 *YPT1* 启动子, *GAP* 启动子具有很强组成型表达能力, *YPT1* 则相对为中等的组成型表达(Frank 等, 1998; 欧阳菁等, 2001)。根据实际需要可构建各种质粒, 它们具备不同功能。例如, 为了分泌表达外源蛋白, 在载体启动子后面可加入一个编码信号肽的序列, 既可用外源蛋白自身的信号肽也可选用甲醇酵母的信号肽。这些信号肽主要有酸性磷酸酶基因 *PHO1* 的信号肽、蔗糖酶基因 *SUC2* 的信号肽、间质金属蛋白酶 *MMP* 的信号肽及转化酶的信号肽等, 常用的为 *S. cerevisiae* 的  $\alpha$  -MF 信号序列。另外如果外源基因产物不能分泌到体外, 还可将产物连上一个定向肽, 使其定向运输到过氧化物酶体中, 以免产物积累对宿主细胞造成毒害, 同时产物稳定性还大大增强(Waterham 等, 1997)。

表 1-7 巴斯德毕赤酵母表达载体的结构与功能

Table 1-5 Function and Structure of Expression Vector of *Pichia Pastoris*

| 特征             | 结 构                               | 功 能                      |
|----------------|-----------------------------------|--------------------------|
| 5' <i>AOXI</i> | 含 <i>AOXI</i> 启动子的 1kb 左右的 DNA 片段 | 介导质粒与基因组整合和<br>甲醇诱导下高效表达 |
| Sig            | 编码 N-末端分泌信号                       | 介导外源蛋白分泌                 |
| MCS            | 多克隆位点                             | 外源基因的整合                  |
| TT             | 转录终止和 PolyA 形成基因                  | 转录有效终止,<br>促进 PolyA 形成   |
| <i>HIS4</i>    | 编码组氨酸脱氢酶基因                        | 遗传标记                     |
| 3' <i>AOXI</i> | 醇氧化酶基因片段                          | 介导整合                     |
| <i>Amp</i>     | 抗氨苄青霉素基因                          | 筛选标记                     |
| <i>ColEI</i>   | 大肠杆菌复制起点                          | 复制                       |

表 1-8 巴斯德毕赤酵母一般表达载体

| Table 1-8 Expression vectors of Pichia pastoris |   |                                       |   |
|---|---|---------------------------------------|---|
| 载体名   | 单一克隆位点  | 选择标记                                  | 特点  |
| 胞内生产  |   |                                       |   |
| pPIC3   | <i>Bam</i> H I, <i>Sna</i> B I, <i>Eco</i> R I, <i>Avr</i> II, <i>Not</i> I                           | <i>HIS</i> 4                          | 多聚接头载体  |
| pPIC3K  | <i>Bam</i> H I, <i>Sna</i> B I, <i>Eco</i> R I, <i>Avr</i> II, <i>Not</i> I                           | <i>HIS</i> 4, <i>kan</i> <sup>r</sup> | 多聚接头载体，用 G418 选择多拷贝克隆   |
| PHIL-D1   | <i>Eco</i> R I  | <i>HIS</i> 4                          | 最初的基本载体之一   |
| PAO815  | <i>Eco</i> R I  | <i>HIS</i> 4                          | 包含 fl 复制点和 <i>Bam</i> H I 位点以在体外产物多拷贝表达单位                     |
| 分泌  |   |                                       |   |
| pPIC9   | <i>Xho</i> I, <i>Sna</i> B I, <i>Eco</i> R I, <i>Avr</i> II, <i>Not</i> I                             | <i>HIS</i> 4                          | 含啤酒酵母 $\alpha$ -因子的引导肽  |
| pPIC9K  | <i>Sna</i> B I, <i>Eco</i> R I, <i>Avr</i> II, <i>Not</i> I   | <i>HIS</i> 4, <i>kan</i> <sup>r</sup> | 含啤酒酵母 $\alpha$ -因子的引导肽，用 G418 选择多拷贝克隆                         |
| pYAM7SP6  | <i>Bam</i> H I, <i>Bgl</i> II, <i>Eco</i> R I, <i>Not</i> I, <i>Stu</i> I, <i>Xho</i> I, <i>Spe</i> I | <i>HIS</i> 4                          | 包含杂合的 <i>Pichia</i> 的 <i>Pho</i> 1 信号肽，具内肽酶 <i>Kex</i> 2 切割位点 |

3.2.2.3 外源蛋白在毕赤酵母中的表达

通常为了获得高稳定的外源蛋白表达菌株，巴斯德毕赤酵母表达载体连同外源基因通过同源重组整合至宿主染色体基因组座位上。

外源蛋白在毕赤酵母中的表达影响因素很多，它不仅受基因剂量、整合位点、 mRNA5' 和 3' 非翻译区(UTR)(Masayu 等，1994)、cDNA 的 AT 含量(Carol 等，1993)、翻译起始区和信号肽等上游的影响，也受宿主菌、Mut 表型、蛋白酶、蛋白加工、酶切和糖基化及培养基的影响(Macauley-Patrick 等，2005)。

表 1-9 在巴斯德毕赤酵母中表达的外源蛋白

Table 1-9 Expression of Foreign Protein in Pichia Pastoris

| 蛋 白      | 蛋白表达部位 | 含量(%) | 产量(g/L) | 参考文献                |
|----------|--------|-------|---------|---------------------|
| 乙肝病毒表面抗原 | 胞内     | 3     | 0.30    | Cregg 等, 1993       |
| 破伤风毒素蛋白  | 胞内     | 27    | 12      | Clare 等, 1991       |
| 人的肿瘤坏死因子 | 胞内     | 25    | 10.0    | Sreekrishna 等, 1989 |
| 超氧化物歧化酶  | 胞内     | 2     | 0.75    | 李晶等,                |

|                                  |    |    |                     |                     |
|----------------------------------|----|----|---------------------|---------------------|
| 人免疫缺陷病毒 1 型膜外糖蛋白                 | 胞内 |    | 1.3                 | Scorer 等, 1993      |
| Pertactin(P69)                   | 胞内 | 10 | 3.0                 | Romanos 等, 1991     |
| 牛溶菌酶                             | 分泌 | 60 | 0.3                 |                     |
| 鼠表皮生长因子                          | 分泌 | 80 | 0.45                | Clare 等, 1991       |
| 人血清白蛋白                           | 分泌 | 80 | 10.0                | 崔蕴霞等, 2001          |
| 瞬时抗凝蛋白(TAP)                      | 分泌 |    | 1.7                 | Laroche 等, 1994     |
| D-丙氨酸羧肽酶                         | 分泌 |    | 0.1                 | Despreaux 等, 1993   |
| $\alpha$ -淀粉酶                    | 分泌 |    | 2.5                 | Paifer 等, 1994      |
| <i>Escherichia coli</i> AppA 植酸酶 |    |    | 117 $\pm$ 1<br>U/mL | Stahl 等, 2003       |
| <i>Escherichia coli</i> phytase  |    |    | 6.4 g/L             | Chen 等, 2004        |
| 丹宁酸酶                             |    |    | 72 mg/L             | Zhong 等, 2004       |
| 脂肪酶                              |    |    | 19 U/mL             | Resina 等, 2004      |
| $\beta$ -甘露聚糖酶                   | 分泌 |    | 900mg/L             | Xu 等, 2002          |
| 漆酶                               | 分泌 |    | 23.9 U/mL           | O'Callaghan 等, 2002 |
| 乙酰木糖酯酶                           | 分泌 |    | 190mg/L             | Koseki 等, 2006      |

目前, 利用毕赤酵母表达系统已成功地表达了许多外源蛋白。外源蛋白在毕赤酵母中的表达分胞内表达和分泌到胞外两种方式(表 1-9)。胞内表达如破伤风毒素蛋白的产量达 12 g/L。胞外蛋白的表达如人血清白蛋白, 利用诱导型高效启动子 *AOXI*, 分泌的外源蛋白占有分泌蛋白的 80%以上, 分泌表达量为 10 g/L。姚斌等将来源于 *A. niger* 963 的植酸酶基因 *phyA* 的内含子和信号肽编码序列去掉, 在不改变所编码氨基酸的情况下定点突变优化了此基因在酵母中高效表达起关键作用的 Arg 密码子。改造后的植酸酶基因与来源于酿酒酵母的  $\alpha$ -因子信号肽编码序列 3' 端以正确的阅读框架融合, 采用诱导型高效 *AOXI* 启动子, 电击转化后将植酸酶基因融合到毕赤酵母基因组中, 重组酵母中表达的植酸酶能分泌到培养基中, 与天然植酸酶在酶学性质上没有差异, 具有正常的生物学活性, Arg 密码子经优化改造后, 其植酸酶表达量比未经优化的高约 37 倍。重组酵母经高密度发酵后, 植酸酶的表达量达到  $5 \times 10^5$  U/mL 以上, 比原植酸酶产生菌 *A. niger* 963 的表达量高约 3000 倍(姚斌等, 2000)。许多成功表达的事例证明, 单拷贝的表达盒就可得到较理想的表达产量, 增加拷贝数对提高产量没有明显作用(Wegner等, 1983; Siegel等, 1990)。但在另一些例子中, 提高拷贝数可大大增加表达水平, 如鼠表皮生长因子、人肿瘤坏死因子在毕赤酵母中的高效表达则是通过表达载体的高拷贝整合而实现的(Sreekrishna等, 1997)。也有极少情况下, 增加拷贝数反而降低了表达水平, 因此基因拷贝数对表达量的影响是无法预测的。高表达菌株的筛选应以表达蛋白量为重要指标, McGrew等就建立了一种双筛选膜筛选方法, 可快速的从大量重组子中筛选出高表达克隆(McGrew等, 1997)。

### 3.2.2.4 毕赤酵母表达系统的局限性及解决策略



尽管毕赤酵母表达系统也有其局限性。例如, 信号肽加工不完全、聚合体的存在、内部降解等造成的产物不均一现象。但通过相应的方法均可克服这些局限性。通过加还原剂、SDS、盐酸胍、去污剂和加热的方法可使聚合体解聚(刘文等, 2001); Singh 等通过定向缺失诱变  $\alpha$ -MF 和干扰素基因连接处的寡核苷酸, 导致了含天然 N 端的成熟干扰素的正确释放(Singh 等, 1984)。美国康奈尔大学吴瑞教授实验室构建了一种质粒载体 pYA-4, 它适合于酵母表达中任何从下游与  $\alpha$  因子前导肽编码顺序连接的其他基因。这个质粒包含酵母  $\alpha$  因子启动子和前导肽的编码顺序直到第 85 个密码子(Arg)。已知酵母细胞中  $\alpha$  因子蛋白前体的成熟加工就发生在这个位置, 在加工过程中,  $\alpha$  因子前导肽被切除, 但释放的  $\alpha$  因子的氨基末端仍带有 4 个多余的氨基酸残基, 它们随即被一种二氨基肽酶除去从而形成成熟的  $\alpha$  因子。经验证明, 当细胞内有大量外源蛋白合成时, 酵母二氨基肽酶的活力不足以除去它们氨基末端的 4 个附加的氨基酸残基, 酵母自身平衡调节机制受到破坏, 出现信号肽切除不完全现象。因此, 在构建 pYA-4 载体时, 已预先切除了前导肽编码顺序第 85 密码子下游的 4 个密码子共 12 个碱基对, 并在第 85 密码子处重建了一个 *HindIII* 位点, 使它能直接与外源基因的编码相连接。使用这种质粒载体表达克隆基因可以绕过对大量二氨基肽酶的要求, 并使分泌到培养基中的成熟蛋白不含多余的氨基酸残基(李育阳, 1987)。防止目的蛋白降解可通过使用蛋白酶缺陷的受体菌株, 改变培养基的 pH(Barr 等, 1992), 在培养基中补加一些富含氨基酸的组分和酪蛋白水解物、胃蛋白水解物(Siegel 等, 1990), 降低甲醇诱导表达时的温度等方法来实现(Mei 等, 2000)。

由此可见, 毕赤酵母表达系统是用于表达各种外源蛋白的具有良好的商业应用前景的真核表达系统。

### 3.3 巴斯德毕赤酵母表达系统在饲料添加剂开发上的应用

巴斯德毕赤酵母表达系统现在已经广泛得被应用到饲料添加剂领域, 主要用于饲料用酶、激素和抗菌肽等产品的开发, 降低饲料添加剂的生产成本, 增加经济效益和社会效益(许英蕾等, 2005)。

#### 3.3.1 饲料用酶

在巴斯德毕赤酵母中实现高效表达的促消化的酶类包括  $\alpha$ -淀粉酶(Nathalie J 等 1996)、脂肪酶、蛋白酶等。一些能促进饲料利用率的酶如植酸酶、木聚糖酶等也已经在毕赤酵母中高效表达。目前, 这些酶的基因改造正在进行广泛开展, 经基因改造的酶不仅具有良好的热稳定性, 在饲料高温制粒中的酶活损失少, 而且在动物消化道中具有抗蛋白酶的作用, 不易被降解, 结合毕赤酵母营养要求低, 生长快, 培养基廉价, 能高密度发酵产酶等优点为廉价高效的生产优质饲料酶制剂提供了新的思路。

### 3.3.2 激素

一种猪的重组生长激素 (rGH) 基因已经在巴斯德毕赤酵母中获得表达, 其表达量大于酵母总蛋白的 20%。用按梯度 (0.05%、0.1%、0.2%、0.4%) 添加该酵母培养物的基础日粮饲喂鸡时发现, 饲喂含 0.4% 的酵母培养物日粮的鸡在育雏阶段的体重增长明显 ( $P < 0.05$ ) (Chen 等, 2000)。李英华等用毕赤酵母胞内表达鲤鱼生长激素 (rcGH), 并将构建的工程菌作为饲料添加剂饲喂罗非鱼, 发现具有强烈的促生长作用 (李英华等, 2001)。

### 3.3.3 抗菌肽

抗菌肽是生物体内产生的一种具有抗菌活性的多肽, 它具有分子量小, 抗菌谱广且效率高, 作用机制独特, 不易产生抗性等特点。在抗生素对畜产品的品质和人类健康的影响日益严重的情况下, 抗菌肽极有可能替代抗生素成为新的抗菌药物饲料添加剂来源。由于抗菌肽具有很强的杀伤作用, 一般采用融合表达或在酵母中表达。在巴斯德毕赤酵母中获得表达的抗菌肽有: 虎纹捕鸟蛛毒素-I (聂东宋等, 2002), 抗菌肽 AD (黄亚东等, 2002)、抗菌肽蜚素 (张春义等, 1998) 等。随着抗菌肽在巴斯德毕赤酵母中的表达研究的开展, 抗菌肽的生产成本大大降低, 为其在饲料中的应用展示了广阔的前景。

经过十多年的发展, 巴斯德毕赤酵母表达系统已经成为比较完善的外源蛋白表达系统, 同时巴斯德毕赤酵母的发酵工艺也日趋成熟。目前大约已经有 400 多种蛋白在该系统中得以成功表达, 有些已经产业化, 产生了巨大的经济效益和社会效益, 如医药行业已经用毕赤酵母生产疫苗、干扰素和激素等产品。在饲料和食品行业用毕赤酵母大量生产植酸酶、木聚糖酶和乳糖酶。这些成果显示毕赤酵母在饲料和食品添加剂的开发上具有非常广阔的应用前景。

## 研究的目的是和意义

豆粕是非常优秀的植物性蛋白质饲料原料，一般在日粮中的用量为 25~30%。但在豆粕中含有 5~6% 的单胃动物不能消化的  $\alpha$ -半乳糖苷类的低聚寡糖，如棉子糖、水苏糖等，这些寡糖一方面会引起动物的肠胃胀气疾病，另一方面会增加食糜的粘度，从而降低了动物对营养物质的消化与吸收。而在豆科饲料中添加  $\alpha$ -半乳糖苷酶能够增加饲料中低聚寡糖的消化，减少此类低聚寡糖的抗营养作用，减轻或消除单胃动物的消化紊乱，从而提高饲料中营养物质的利用率和代谢能。

利用微生物原菌株很难分离获得大量的  $\alpha$ -半乳糖苷酶来用作饲料添加剂。本研究的目的是利用微生物学和分子生物学的原理和手段，克隆  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因，构建高效表达和分泌的基因工程菌株来提高  $\alpha$ -半乳糖苷酶产量，降低生产成本，从而形成商品化的  $\alpha$ -半乳糖苷酶制剂，来解决豆粕寡糖的抗营养问题。

## 第二章 一种来源于青霉的新的 $\alpha$ -半乳糖苷酶的分离纯化及其酶学性质

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 菌株

青霉 F63 (*Penicillium* sp. F63)。

##### 1.1.2 试剂和仪器

酵母粉 (Yeast extract) 为英国 Oxoid 公司产品; pNPG (p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside)、蜜二糖、棉子糖、水苏糖、角豆胶和牛血清白蛋白为美国 Sigma 公司产品; 其余试剂为国产分析纯。立式冷冻离心机购自 Sorvall 公司; 蛋白电泳仪、 $\ddot{\text{A}}$ KTA FPLC 蛋白纯化系统均购自 Aamersham pharmacia biotech 公司; 超滤膜包购自 Sartorius 公司。

##### 1.1.3 培养基和培养条件

马铃薯汁培养基: 20%马铃薯汁, 1%葡萄糖, 2%琼脂, pH6.8。产酶培养基: .4%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.28%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.12%  $\text{CaCl}_2$ , 0.12% Urea, 0.12%  $\text{MgSO}_4$ , 0.02% Mannanose, 0.02% Yeast extract, 3%的豆粕作为碳源和诱导物。挑取 1 环丝状真菌接种于产酶培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、250 rpm 振荡培养 7 天。

#### 1.2 酶活性测定

酶活性测定方法采用pNPG法(Den Herder I F, 1992), 略有修改。将pNPG溶于pH 5.0、0.1 M McIlvaine缓冲液中,使其终浓度为 20 mM。将 20  $\mu\text{L}$ 酶液, 1.88 mL的McIlvaine缓冲液和 100  $\mu\text{L}$  20 mM的pNPG混合, 摇匀。37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 5 min后, 反应液中加入 2 mL 1 M的 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液终止反应。在 405 nm处测定光吸收值, 以对硝基酚的生成量表示酶活力。一个酶活单位 (U) 定义为每分钟分解pNPG释放 1  $\mu\text{mol}$  p-硝基酚所需的酶量。

#### 1.3 蛋白质浓度和分子量的测定

采用Lowry 法 (Lowry等, 1951), 以牛血清白蛋白为标准测定蛋白质浓度。采用LaemmLi法 (LaemmLi, 1970) 进行SDS-PAGE电泳测定蛋白质分子量。

## 1.4 酶的分离纯化

### 1.4.1 离子交换层析

培养物离心取上清, 用 20-95%饱和度的硫酸铵沉淀过夜。然后 5000 rpm 离心 10 min, 用适量的 20 mM, pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液(buffer A)溶解, 透析过夜。将透析后的粗酶液用 30 kDa 的膜包浓缩并更换成缓冲液 A。取 2.0 mL 浓缩液上预先用缓冲液 A 平衡的 HiTrap Q Sepharose XL 阴离子柱(预装柱), 然后用相同缓冲液配置的 1 mol/L NaCl 溶液和缓冲液 A 进行梯度洗脱, 流速为 2.0 mL/min, 分部收集, 每管 1 mL。对收集管中的溶液进行酶活和蛋白浓度测定。

### 1.4.2 凝胶过滤层析

经离子交换层析后得到的样品浓缩后进行 Sephacryl S-200 分子筛层析(1.0 cm $\times$ 120 cm), 用缓冲液 A 洗脱, 流速为 0.5 mL/min, 分部收集, 每管 0.5 mL。对收集管中的溶液进行酶活和蛋白浓度测定。

## 1.5 电泳

### 1.5.1 SDS-PAGE

SDS-PAGE 储备液的制备:

- 1) 30%丙烯酰胺-甲叉丙烯酰胺: 称取 29.2 g 丙烯酰胺和 0.8 g 甲叉丙烯酰胺, 用水溶解并定容至 100 mL, 过滤, 在 4 $^{\circ}$ C 避光保存。
- 2) 分离胶缓冲液(1.5 M Tris-HCl, pH 8.8): 称取 18.15 g Tris, 用 60 mL 蒸馏水溶解, 再用 1 M 盐酸调节至 pH 8.8, 然后定容至 100 mL, 4 $^{\circ}$ C 保存。
- 3) 浓缩胶缓冲液(0.5 M Tris-HCl, pH 6.8): 称取 6 g Tris, 用 60 mL 蒸馏水溶解, 再用 1 M 的盐酸调节至 pH 6.8, 然后定容至 100 mL, 4 $^{\circ}$ C 保存。
- 4) 10%SDS (w/v): 将 10 g SDS 溶于 80 mL 蒸馏水中并轻轻搅拌, 定容至 100mL, 室温放置。
- 5) 2 $\times$ 上样缓冲液: 分别取蒸馏水 2.5 mL, 浓缩胶缓冲液 2.0 mL, 甘油 2.0 mL, 20% SDS 2.0 mL, 巯基乙醇 1.0 mL, 0.1% (w/v) 溴酚蓝 0.5 mL。加样前, 样品与此上样缓冲液以 1:1 混合在沸水浴中加热 3-5 min。
- 6) 5 $\times$ 电极缓冲液: 称取 15 g Tris, 72 g 甘氨酸, 5 g SDS, 用水溶解至 1000 mL, pH 8.3, 用时稀释 5 倍。
- 7) 染色液: 0.1%考马斯亮蓝 R250, 40%甲醇, 10%冰醋酸。
- 8) 脱色液: 10%甲醇和 10%冰醋酸。

12% 分离胶配方

|                   |         |
|-------------------|---------|
| 水                 | 3.44 mL |
| 40% 聚丙烯酰胺         | 2.4 mL  |
| Tris-HCl (pH 8.8) | 2 mL    |
| 10%SDS            | 0.08 mL |

|         |          |
|---------|----------|
| 10% APS | 0.08 mL  |
| TEMED   | 0.004 mL |
|         | 8 mL     |

#### 5%浓缩胶配方

|                   |          |
|-------------------|----------|
| 水                 | 2.2 mL   |
| 40% 聚丙烯酰胺         | 0.394 mL |
| Tris-HCl (pH 6.8) | 0.375 mL |
| 10% SDS           | 0.03 mL  |
| 10% APS           | 0.03 mL  |
| TEMED             | 0.003 mL |
|                   | 3 mL     |

#### 样品处理

取一定量体积的样品，加入等体积的 2×上样缓冲液，煮沸 5 min。

#### 电泳

待浓缩胶完全聚合后，小心拔出梳子，用蒸馏水洗涤加样孔以除去未聚合的丙烯酰胺。取样品 20–30  $\mu$ l 上样，恒压 90 V 电泳直至染料前沿到达浓缩胶与分离胶的界面，调电压至 120 V，电泳至染料前沿到凝胶底部，关闭电源。电泳完毕后，将凝胶置于染色液中，摇床染色 30–60 min 后，将其转移至脱色液中脱色至背景无色。

### 1.5.2 非变性 PAGE

#### PAGE 储备液的制备

- 1) 分离胶缓冲溶液：同上。
  - 2) 浓缩胶缓冲溶液：同上。
  - 3) 30% 丙烯酰胺–甲叉丙烯酰胺：同上。
  - 4) 上样缓冲液：分别取蒸馏水 3 mL，浓缩胶缓冲液 1.0 mL，20% 蔗糖溶液 4.0 mL，0.1%(w/v) 溴酚蓝 0.5 mL。
  - 5) 5×电极缓冲液：称取 15 g Tris，72 g 甘氨酸，用水溶解至 1000 mL，pH 8.3，用时稀释 5 倍。
- 12% 分离胶配方：去处 SDS 成分，其余与 SDS-PAGE 电泳相同。
- 5% 浓缩胶配方：去处 SDS 成分，其余与 SDS-PAGE 电泳相同。

### 1.5.3 活性染色（亓珊，1995）

#### 试剂：

- A) 反应液：将 5 mg 6-溴-2-萘- $\alpha$ -D-半乳糖苷 (Sigma) 溶于 1.0 mL 95% 的乙醇中，加 0.1 M pH7.5 的磷酸缓冲液 9.0 mL。
- B) 染色液：将 2 mg 坚固蓝 B 盐溶于 1 mL 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 冷缓冲液中 (pH 7.8)，使用

前临时配制。

#### 活性染色程序

电泳后将凝胶立即放入反应液中，37℃保温 5 min，然后用蒸馏水洗涤，再放入新配制的冷染色液内，4℃染色 5 min，取出用蒸馏水洗涤 2-3 次，放置水中保存。

#### 1.5.4 非变性梯度凝胶电泳 (Native gradient PAGE)

分离胶溶液、30% 丙烯酰胺-甲叉丙烯酰胺、上样缓冲液、5×电极缓冲液同非变性 PAGE。

4-15%非变性梯度凝胶的制备利用 Bio-Rad 公司 gradient delivery system 完成。

待非变性梯度凝胶完全聚合后，小心拔出梳子，用蒸馏水洗涤加样孔以除去未聚合的丙烯酰胺。取样品 20-30  $\mu$ L 上样，恒压电流 30 mA，保持温度不超过 30℃，电泳至染料前沿到凝胶底部，关闭电源。电泳完毕后，将凝胶置于染色液中，摇床染色 30-60 min 后，将其转移至脱色液中脱色至背景无色。

#### 1.6 $\alpha$ -半乳糖苷酶转 PVDF 膜

(1) 对纯化的  $\alpha$ -半乳糖苷酶 Agl1 样品进行 SDS-PAGE 蛋白电泳，得到待转移的凝胶，预冷转移缓冲液，裁剪好大小的 PVDF 膜先在甲醇溶液中浸泡 5 min，然后浸泡于转移缓冲液里，滤纸及海绵也都浸泡于转移缓冲液中；

(2) 平放塑料支架在含转移缓冲液的托盘中，然后在塑料支架上放一块海绵，海绵上面对齐放一张转移滤纸，然后依次将 PVDF 膜、凝胶、及另一张滤纸和海绵放上；

(3) 用塑料支架夹紧上述各层，放入已有转移缓冲液的电转移槽内，PVDF 膜一侧向正极，凝胶一面向负极，接通电源电压，恒流 390 mA，转移 1.5-3 h；

(4) 转移结束后，取出塑料支架，依次取掉各层，取出 PVDF 膜，立即放入染色液中，染色 5 min，然后取出膜，放入脱色液中脱色，直至底色褪去；

(5) 将转入到 PVDF 膜上的  $\alpha$ -半乳糖苷酶 Agl1 条带剪下，放入干净管中，晾干，进行蛋白测序。

#### 1.7 纯化蛋白的质谱鉴定与内肽序列的测定

将含有纯化蛋白的 SDS-PAGE 电泳胶送中国军事医学科学院国家生物医学分析中心进行胰蛋白酶酶解后的 MALDI-TOF-MS 分析与内肽 N 端序列的 ESI-MS/MS 测定。

#### 1.8 酶学性质

##### 1.8.1 $\alpha$ -半乳糖苷酶的最适 pH 和 pH 稳定性的测定

纯化的  $\alpha$ -半乳糖苷酶在不同的 pH (3.0~9.0) 下进行酶促反应以测定其最适 pH，所用的缓冲液为 pH 3.0~7.5 的 0.1 mol/L 的 McIlvaine 缓冲液和 pH 8.0~9.0 的 0.1 mol/L 的 Tris/HCl 缓冲液。

在 37℃ 下测定酶活。并绘制最适 pH 曲线。

将酶液在不同 pH 的缓冲液中于室温下处理 12 h, 在 37℃、pH 5.0 的 0.1 M McIlvaine 缓冲液条件下测定其酶活并研究该酶的 pH 稳定性。同时以未保温的相应 pH 的稀释液作对照。

### 1.8.2 $\alpha$ -半乳糖苷酶的反应最适温度及热稳定性的测定

最适温度的测定在 pH 5.0 的 0.1 mol/L 的 McIlvaine 缓冲液体系及不同的温度 (10~60℃) 下进行酶促反应, 绘制最适温度曲线。

测定  $\alpha$ -半乳糖苷酶在不同的温度 (40, 45, 50℃) 下分别保温 2、5、10、15、20、30、45、60 min 时的相对酶活力, 绘制酶的热稳定性曲线。

### 1.8.3 不同金属离子及相关化学试剂对 $\alpha$ -半乳糖苷酶的影响

在酶促反应体系中加入不同的金属离子及化学试剂 ( $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Li^+$ 、 $Co^{+}$ 、 $Cr^{3+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Ag^+$ 、 $Hg^{2+}$ 、EDTA 和 SDS), 使这些物质的终浓度为 1 mmol/L。在 37℃、pH 5.0 的条件下测定酶活力, 以未加金属离子和化学试剂的稀释酶液为对照。

### 1.8.4 $\alpha$ -半乳糖苷酶反应初速度和 $K_m$ 及 $V_{max}$ 的测定

取 8 支试管, 每管中依次加入底物、缓冲液和稀释的酶液。依次在酶促反应的 1 min、3 min、5 min、7 min、10 min、15 min、20 min、30 min 时取出试管马上置于冰上, 待全部反应后, 测定酶活性, 然后算出酶活性与反应时间的比值, 在一定时间内比值保持稳定, 则在此时间内的酶促反应为该一级反应, 此时间即可确定为测  $K_m$  和  $V_{max}$  的反应时间。

根据以上所测的反应初速度确定的反应时间, 用不同浓度 (1~20 mM) 的 pNPG 为底物, 在 pH 5.0、0.1 mol/L 的 McIlvaine 缓冲体系中, 于最适温度下测定酶活性, 计算相应的反应速度, 利用米氏方程双倒数法确定  $K_m$  及  $V_{max}$ 。按双倒数作图法 (Lineweaver-Burk 法) 将米氏方程改写为:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

实验时选取不同的  $[S]$  测定相应的  $v$ , 求出二者的倒数, 以  $1/v$  对  $1/[S]$  作图, 绘出直线, 横轴截距为  $1/K_m$ ,  $K_m = -1/x$

### 1.8.5 $\alpha$ -半乳糖苷酶比活性测定

#### 1.8.5.1 考马斯亮蓝试剂及标准蛋白质溶液的配制

考马斯亮蓝试剂: 考马斯亮蓝 G-250 500 mg 溶于 25 mL 95% 乙醇中, 加入 50 mL 85% 磷酸, 用蒸馏水稀释至 1000 mL, 滤纸过滤。最终试剂中含 0.05% (W/V) 考马斯亮蓝 G-250, 2.39% (W/V) 乙醇, 4.25% (W/V) 磷酸。

标准蛋白质溶液: 结晶牛血清白蛋白, 预先经微量凯氏定氮法测定蛋白氮含量, 根据其纯度用 0.15 M NaCl 配制成 1 mg/mL 蛋白溶液。



### 1.8.5.2 标准曲线的绘制

取一系列不同体积的 1 mg/mL 标准蛋白溶液，与 0.15 M NaCl 按总体积 0.1 mL 混合，加入 5 mL 考马斯亮蓝试剂，摇匀，37℃ 反应 15 min 后，在 595 nm 处测定光吸收值。以光吸收值为纵坐标，标准蛋白含量为横坐标，绘制标准曲线。

### 1.8.5.3 比活性测定

取合适体积的酶液，与 0.15 mol/L NaCl 按总体积 0.1 mL 混合，使其测定值在标准曲线的直线范围内。根据所测定的  $A_{595\text{nm}}$  值，在标准曲线上查出其相当于标准蛋白的量，从而计算出酶蛋白的浓度 (mg/mL)。再结合该酶蛋白的酶活力测定该酶的比活力。

### 1.8.6 底物特异性的测定

将蜜二糖、棉子糖、水苏糖和角豆胶溶解于 0.1 mol/L, pH 5.0 的 McIlvaine 缓冲液中，蜜二糖、棉子糖、水苏糖浓度各 1 mg/mL，角豆胶为 3 mg/mL。纯化的 2 U 的  $\alpha$ -半乳糖苷酶分别与这些底物在 40℃ 下作用 24 h。半乳糖的释放用离子交换色谱仪 CARBOPAC PA10 (Dionex Corporation, USA) 进行测定。

## 2. 结果与分析

### 2.1 青霉 F63 $\alpha$ -半乳糖苷酶的活性染色

将用豆粕诱导 7 天的青霉 F63 的上清液进行非变性凝胶电泳，将电泳后凝胶分别进行活性染色和考马斯亮蓝染色，结果见图 2-1，该青霉的上清液中有两种  $\alpha$ -半乳糖苷酶，分别被命名为 Agl1 和 Agl2。我们对表达量相对较高的一个  $\alpha$ -半乳糖苷酶 Agl1 进行了分离纯化。

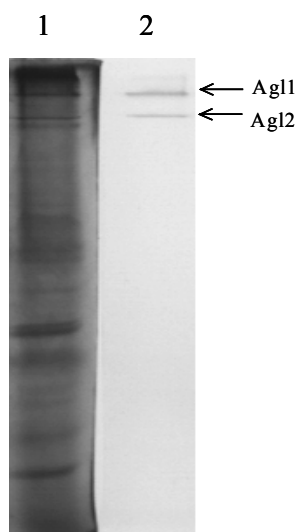


图 2-1 青霉 F63  $\alpha$ -半乳糖苷酶的非变性凝胶电泳

Fig 2-1 Native PAGE of  $\alpha$ -galactosidases from *Penicillium* sp F63

Lane 1 Coomassie brilliant blue R-250 staining of  $\alpha$ -galactosidases from *Penicillium* sp F63.  
Lane 2 Activity staining of  $\alpha$ -galactosidases from *Penicillium* sp F63

表 2-1  $\alpha$ -半乳糖苷酶的纯化

Table 2-1 Purification of the  $\alpha$ -galactosidase from *Penicillium* sp F63

| Purification step   | Vol (mL) | Total activity (U) | Total protein (mg) | Specific activity (U/mg) | Yield (%) | Purification (fold) |
|---|----------|--------------------|--------------------|--------------------------|-----------|---------------------|
| Crude filtrate  | 1200     | 2208               | 230                | 9.6                      | 100.00    | 1.00                |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitation | 80       | 1342               | 104.8              | 12.8                     | 60.7      | 1.3                 |
| HiTrap Q Sepharose XL   | 7.5      | 784                | 11                 | 71                       | 35.5      | 7.4                 |
| Sephacryl S-200 HR  | 2        | 223                | 2.1                | 106.4                    | 10.1      | 11                  |

2.2 来源于青霉的  $\alpha$ -半乳糖苷酶 Agl1 的纯化

$\alpha$ -半乳糖苷酶的纯化结果见表 2-1， $\alpha$ -半乳糖苷酶的纯化倍数为 11，活性回收率为 10.1%，所得的酶比活为 106.4 U/mg。粗酶液经过硫酸铵沉淀、阴离子交换层析和分子筛层析后（图 2-2），经非变性梯度凝胶电泳，该  $\alpha$ -半乳糖苷酶的分子量约为 330 kDa（图 2-3）。经变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测为单一条带，亚基分子量约为 82 kDa（图 2-4）。说明分离纯化的  $\alpha$ -半乳糖苷酶是由四个相同亚基组成的四聚体。

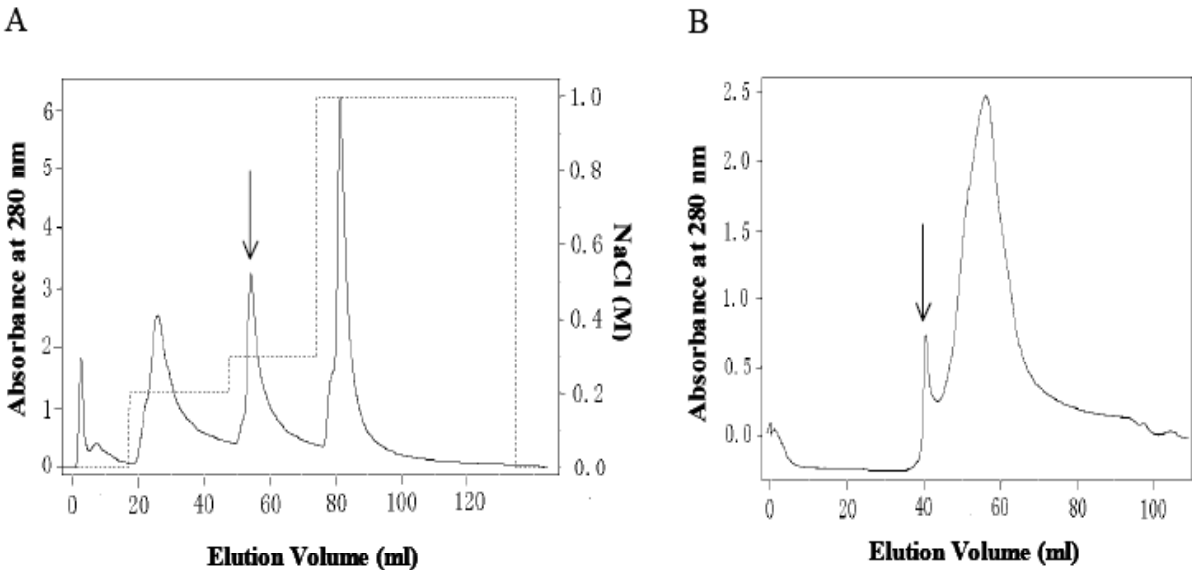


图 2-2 青霉  $\alpha$ -半乳糖苷酶的纯化

A 阴离子交换层析 (HiTrap Q Sepharose XL 预装柱) B 分子筛层析 (介质为 Sephacryl S-200 HR)。箭头所指的峰为含  $\alpha$ -半乳糖苷酶组分的峰。

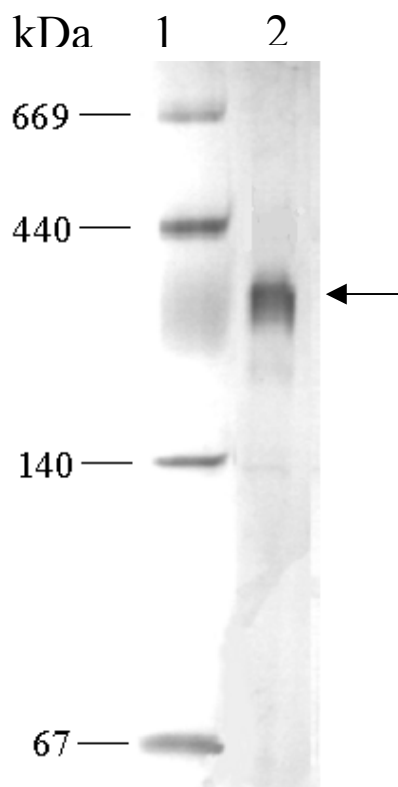
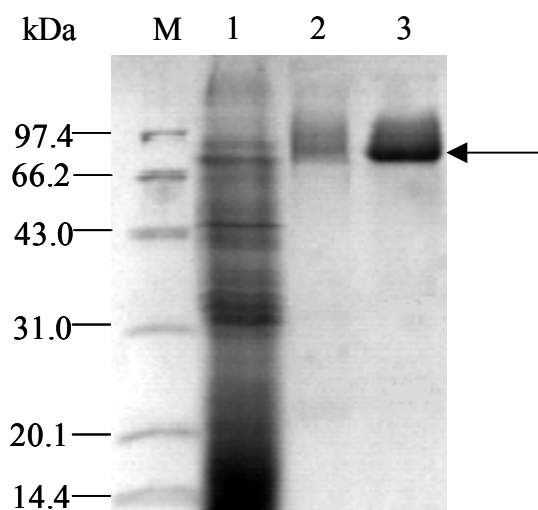
图 2-3  $\alpha$ -半乳糖苷酶的非变性梯度凝胶电泳Fig2-3 Native gradient PAGE of the  $\alpha$ -galactosidase

图 2-4  $\alpha$ -半乳糖苷酶的 SDS-PAGEFig. 2-4 SDS-PAGE analysis of the  $\alpha$ -galactosidase

M. Standard protein molecular weight; 1. Culture supernatant; 2.  $\alpha$ -galactosidase after anion exchange chromatography; 3.  $\alpha$ -galactosidase after size chromatography.

## 2.3 $\alpha$ -半乳糖苷酶的 N 端测序

转膜后的  $\alpha$ -半乳糖苷酶送往上海基康生物技术有限公司进行 N 端的 Edman 降解反应, 测定其 N 端序列, 非常遗憾的是, 该  $\alpha$ -半乳糖苷酶的 N 端是封闭的。

## 2.4 纯化蛋白的内肽序列的测定

中国军事医学科学院国家生物医学分析中心对该蛋白进行了胰蛋白酶的酶解反应, 通过 MALDI-TOF-MS 分析, 得到的肽指纹图谱利用 Mascot 软件查询 NCBI 数据库, 该蛋白没有匹配上任何已知的  $\alpha$ -半乳糖苷酶, 与一个未命名的蛋白具有较高的匹配值。利用 ESI-MS/MS 技术测得了 6 段内肽的 N 端氨基酸序列, 序列分别为: LFVLDDGWFK, DNAGLGDWLPNPE, QSEGYTVSEFQYK, VNPLVLTGDMWR, LEGLDENALYK, PEVQDFLLK。测定肽段与其它真菌相应  $\alpha$ -半乳糖苷酶的序列一致性见表 2-2, 其中 4 个肽段与已知的  $\alpha$ -半乳糖苷酶有较高的序列一致性, 而另 2 个肽段与已知的  $\alpha$ -半乳糖苷酶无任何序列一致性。6 个肽段与已知青霉的  $\alpha$ -半乳糖苷酶序列没有序列一致性。这些结果说明分离到的  $\alpha$ -半乳糖苷酶是一新酶。

表 2-2 测定肽段与其他真菌  $\alpha$ -半乳糖苷酶序列的序列一致性Table 2-2. The sequence homology between the sequenced inner peptides and the peptides of other fungal  $\alpha$ -galactosidases

| 测定肽段          | 黑曲霉  | 构巢曲霉 | 木霉   | 犁头霉 |
|---------------|------|------|------|-----|
| LFVLDDGWFK    | 100% | 88%  | 100% | 88% |
| DNAGLGDWLPNPE | 91%  | 84%  | 83%  | 76% |
| QSEGYTVSEFQYK | 66%  | 66%  | 76%  | 0   |
| VNPLVLTGDMWR  | 58%  | 75%  | 75%  | 0   |
| LEGLDENALYK   | 0    | 0    | 0    |     |
| PEVQDFLLK     | 0    | 0    | 0    |     |

注: 黑曲霉、构巢曲霉、木霉、犁头霉的  $\alpha$ -半乳糖苷酶氨基酸序列注册号分别为: CAB63901、EAA58775、CAA93245、ABB43117。

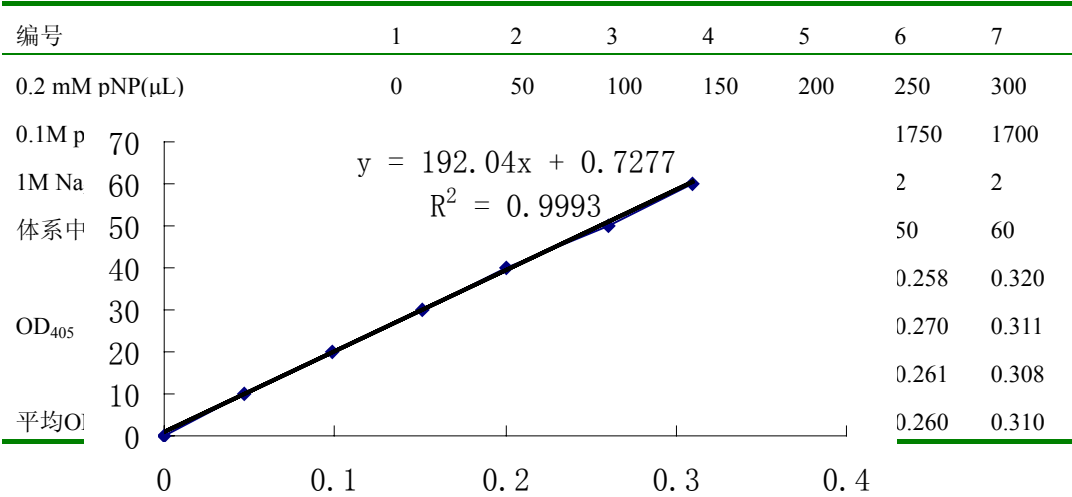
2.5 α-半乳糖苷酶的酶学性质

2.5.1 α-半乳糖苷酶活性的测定

2.5.1.1 标准曲线的绘制

α-半乳糖苷酶可将对硝基酚-α-D-半乳糖苷等摩尔地分解为黄色的对硝基酚(pNP)，通过测定 pNP 的量即可测定 α-半乳糖苷酶的活性。

称取 0.278 g pNP,先溶于 1 mL 甲醇中，再用 0.1 mol/L pH 4.5 McIlvaine 缓冲液定容至 100 mL, 配成 2 mmol/L 的 pNP 母液，再将该母液稀释 10 倍，配成最终浓度为 0.2 mmol/L 的 pNP 溶液。按下表加入不同量的 pNP 和 0.1 mol/L pH 4.5 的 McIlvaine 缓冲液，最后加入 2 mL 1mol/L 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液，总体积 4 mL，测定 OD<sub>405</sub> 的光吸收。绘制标准曲线。



酶活单位 (U/mL) 定义：在 pH 4.5、37℃ 下每分钟分解 pNPG 释放 1 μmol p-硝基酚所需的酶量被定义为一个酶活单位。

根据 α-半乳糖苷酶标准曲线的结果，得出其酶活单位计算公式：

酶活=(0.19204X+0.0007277) × 50 × N/5

X: 405 nm 处的光吸收。

N: 酶液稀释倍数。

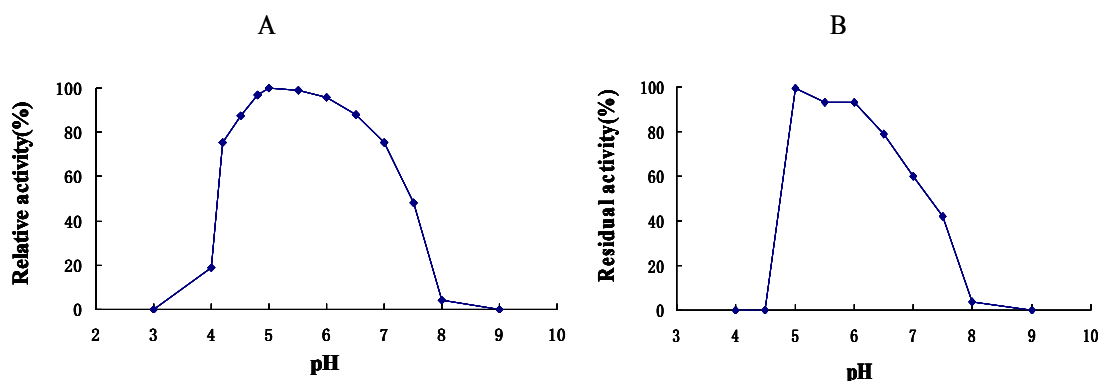
50: 将 20 μL 酶液中的酶活折算为 1 mL 的酶活性。

5: 反应 5 min。

2.5.2 α-半乳糖苷酶的酶学性质

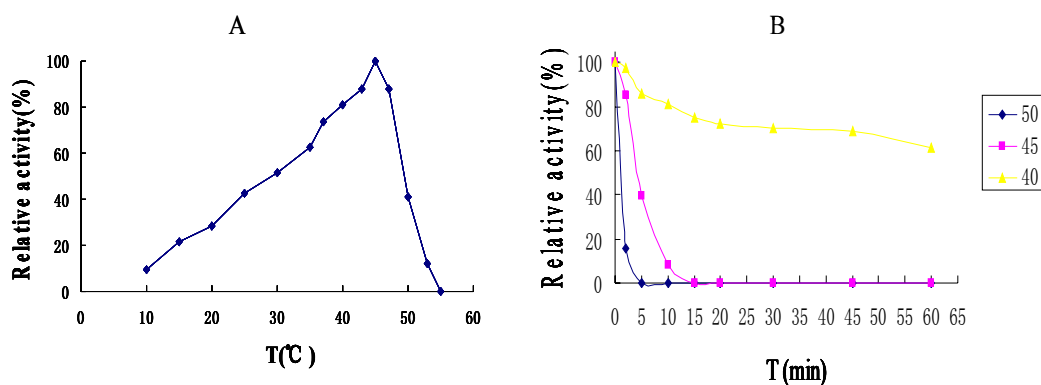
2.5.2.1 α-半乳糖苷酶的最适作用 pH 及 pH 稳定性

α-半乳糖苷酶的最适作用 pH 及 pH 稳定性的实验结果见图 2-5。其最适作用 pH 为 5.0，在 pH 4.5~6.5 保持 85% 以上的相对酶活性。该酶最稳定的 pH 范围为 5.0~6.0，室温下作用 12 h，酶活力保持在 90% 以上。

图 2-5  $\alpha$ -半乳糖苷酶的最适作用 pH 和 pH 稳定性Fig. 2-5 (A) Optimum pH of the  $\alpha$ -galactosidase and (B) pH stability of the  $\alpha$ -galactosidase

### 2.5.2.2 $\alpha$ -半乳糖苷酶的最适作用温度及热稳定性

$\alpha$ -半乳糖苷酶的最适作用温度及热稳定性的实验结果见图 2-6。 $\alpha$ -半乳糖苷酶的最适作用温度为 45℃。该酶在 40℃ 下作用 1 h 后可以保持 60% 以上的活性，该酶在 50℃ 下作用 5 min，酶活性即完全丧失。因此该酶在 40℃ 以下是稳定的，对高温较敏感。

图 2-6  $\alpha$ -半乳糖苷酶的最适作用温度及热稳定性Fig. 2-6 (A) Optimum temperature of the  $\alpha$ -galactosidase and (B) temperature stability of the  $\alpha$ -galactosidase

### 2.5.2.3 $\alpha$ -半乳糖苷酶的反应动力学

根据  $\alpha$ -半乳糖苷酶和底物 (pNPG) 在不同时间的酶促反应，该酶的活性与反应时间的比值在 5 min 内保持恒定，因此在反应时间 5 min 内的酶促反应确定为其一级反应。利用双倒数作图法 (图 2-7)，以  $S^{-1}$  为横坐标，以  $V^{-1}$  为纵坐标，测得  $K_m = 1.4 \text{ mmol/L}$ ,  $V_{max} = 1.556 \text{ mmol/L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

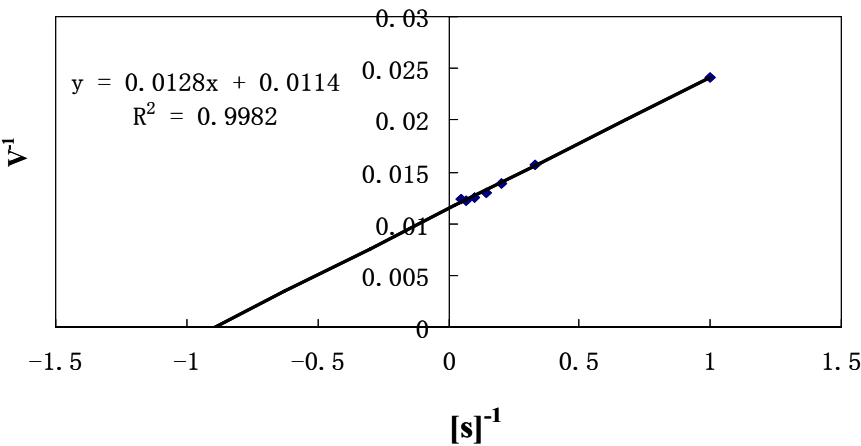


图 2-7  $\alpha$ -半乳糖苷酶的 Lineweaver-Burk 图

Fig. 2-7 Lineweaver-Burk plot of the  $\alpha$ -galactosidase

2.5.2.4 金属离子及其它化学试剂对  $\alpha$ -半乳糖苷酶活性的影响

金属离子及其它化学试剂对该酶的影响见表 2-3。大多数的金属离子对 $\alpha$ -半乳糖苷酶的活性影响较小， $\text{Cu}^{2+}$ 和SDS对该酶活性抑制较严重，相对酶活分别为 19%和 26.5%， $\text{Hg}^{2+}$ 完全抑制 $\alpha$ -半乳糖苷酶的活性，可以推断带有巯基的氨基酸(如半胱氨酸)可能在其活性中心部位。值得注意的是，与已报道的 $\alpha$ -半乳糖苷酶的活性都受到 $\text{Ag}^{+}$  的强烈抑制不同的是 (Fridjonsson等, 1999; Zapater等, 1990)，该 $\alpha$ -半乳糖苷酶受 $\text{Ag}^{+}$ 的抑制作用不显著（保持 88.7%的相对酶活力），说明该酶中具有羧基的氨基酸和组氨酸可能不在此酶的活性中心部位(Zapater等, 1990)。该酶活性中心部位的氨基酸构成与其它 $\alpha$ -半乳糖苷酶是不同的。

表 2-3 各种金属离子和化学试剂对  $\alpha$ -半乳糖苷酶活性的影响

Table 3 Effect of various metal ions and chemicals on the  $\alpha$ -galactosidase activity

| Metal ions and other chemical reagents | Relative activity(%) |
|--|----------------------|
| CK                                     | 100                  |
| $\text{K}^{+}$                         | 103.5                |
| $\text{Na}^{+}$                        | 94.9                 |
| $\text{Ca}^{2+}$                       | 93.1                 |
| $\text{Li}^{+}$                        | 98.4                 |
| $\text{Co}^{+}$                        | 94.4                 |
| $\text{Cr}^{3+}$                       | 86.2                 |
| $\text{Ni}^{2+}$                       | 97.9                 |
| $\text{Cu}^{2+}$                       | 19                   |
| $\text{Mg}^{2+}$                       | 97.1                 |

|                  |      |
|------------------|------|
| $\text{Fe}^{2+}$ | 66.1 |
| $\text{Mn}^{2+}$ | 61.3 |
| $\text{Zn}^{2+}$ | 92.6 |
| $\text{Ag}^+$    | 88.7 |
| $\text{Hg}^{2+}$ | 0    |
| EDTA             | 104  |
| SDS              | 26.5 |

### 2.5.2.5 $\alpha$ -半乳糖苷酶的底物特异性

该  $\alpha$ -半乳糖苷酶可以降解蜜二糖、棉子糖和水苏糖，而不能降解多糖类的角豆胶（图 2-8,图 2-9，图 2-10）。降解  $\alpha$ -半乳糖苷类的寡糖的顺序为：蜜二糖> 棉子糖> 水苏糖（表 3）。

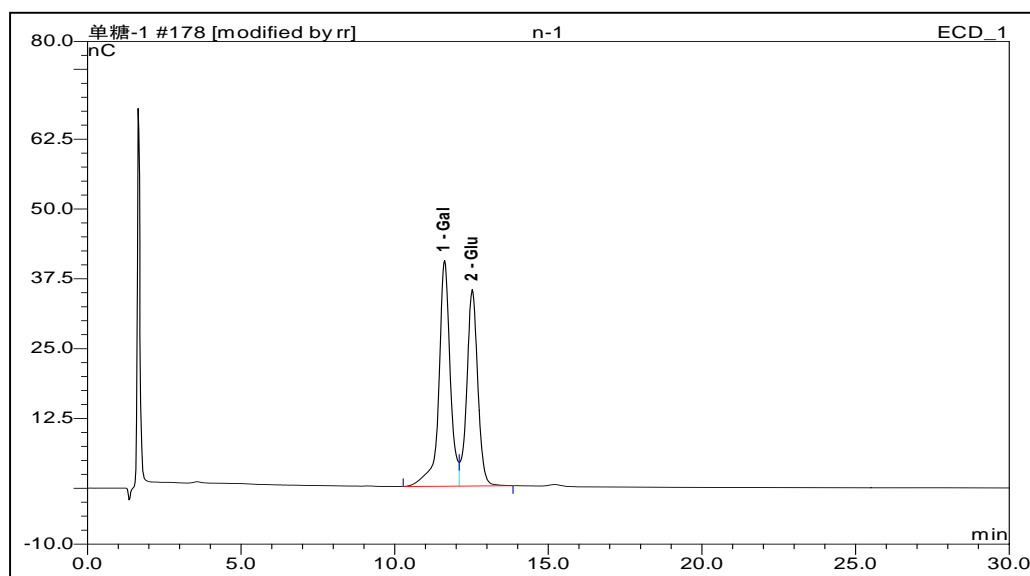


图 2-8 Agl1 水解蜜二糖的 HPAEC 分析图

Fig 2-8 HPAEC of the degradation of melibiose by Agl1



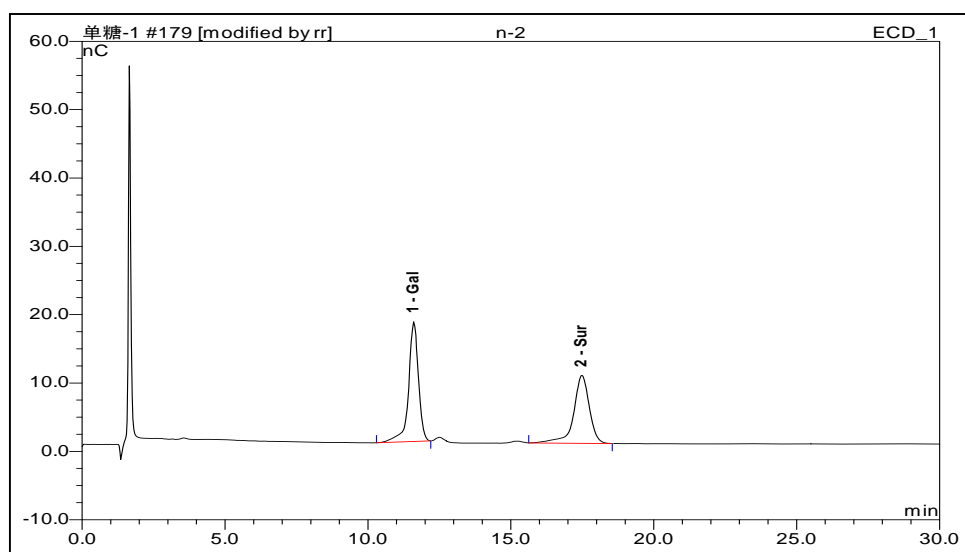


图 2-9 AgI1 水解棉子糖的 HPAEC 分析图

Fig 2-9 HPAEC of the degradation of raffinose by AgI1

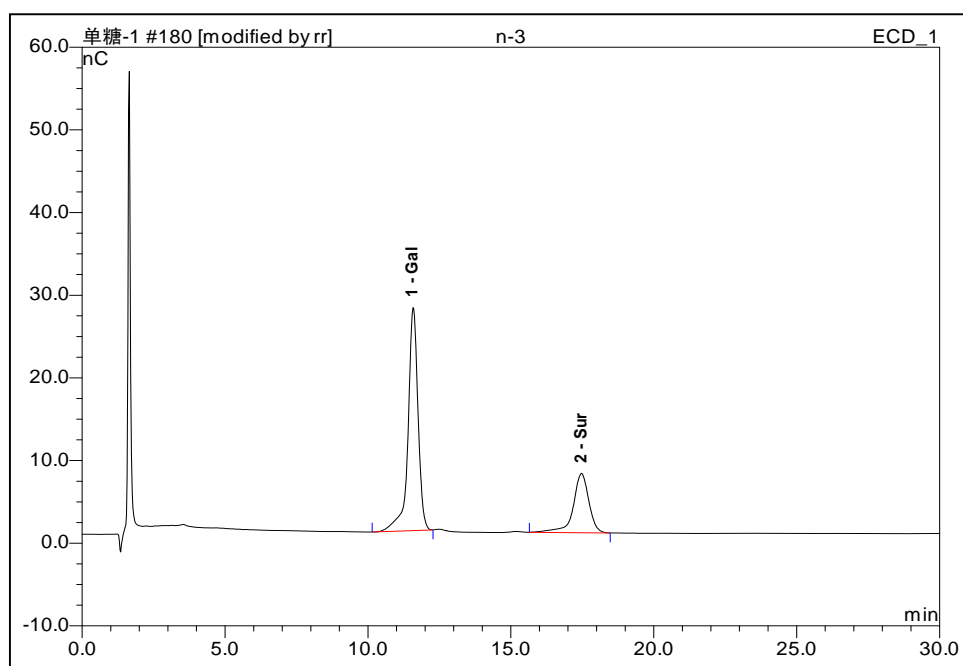


图 2-10 AgI1 水解水苏糖的 HPAEC 分析图

Fig 2-10 HPAEC of the degradation of stachyose by AgI1

表 3  $\alpha$ -半乳糖苷酶水解寡糖后半乳糖的释放量Table 3 The release of galactose from galactose-containing oligosaccharides by the  $\alpha$ -galactosidase

| Substrate | The amount of the<br>substrates | The amount of galactose released | D-Galactose     |
|-----------|---------------------------------|----------------------------------|-----------------|
|           | (mg)                            |                                  | released<br>(%) |
| Melibiose | 1                               | 0.425                            | 80.7            |
| Raffinose | 1                               | 0.204                            | 67.5            |
| Stachyose | 1                               | 0.420                            | 64.8            |
| Guar gum  | 3                               | 0                                | 0               |

## 本章小结

利用豆粕诱导青霉 $\alpha$ -半乳糖苷酶的产生, 通过对其培养基上清液的活性染色分析, 该青霉可以产生两种 $\alpha$ -半乳糖苷酶。采用硫酸铵沉淀、阴离子交换层析和分子筛层析等方法分离纯化了该菌株的一种 $\alpha$ -半乳糖苷酶。经过非变性梯度凝胶电泳, 该 $\alpha$ -半乳糖苷酶的分子量为 330 kDa, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳, 此酶蛋白的亚基分子量约为 82 kDa, 说明该 $\alpha$ -半乳糖苷酶为四聚体。该 $\alpha$ -半乳糖苷酶反应的最适pH为 5.0, 最适温度为 45℃。此 $\alpha$ -半乳糖苷酶的热稳定性在 40℃以下, pH稳定性为pH5.0-6.0。与已报道的 $\alpha$ -半乳糖苷酶的活性都受到 $\text{Ag}^+$ 的强烈抑制不同的是, 该 $\alpha$ -半乳糖苷酶受 $\text{Ag}^+$ 的抑制作用不显著。以pNPG为底物的 $K_m$ 值为 1.4 mmol/L和 $V_{\max}$ =1.556 mmol/L·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>。该酶可以有效降解蜜二糖、棉子糖和水苏糖, 但不能降解末端含 $\alpha$ -半乳糖苷键的多糖。通过利用质谱技术对纯化的 $\alpha$ -半乳糖苷酶进行鉴定以及内肽的N端测序, 将分离纯化的蛋白进行MALDI-TOF-MS分析, 得到的肽指纹图谱利用Mascot软件查询NCBI数据库, 该蛋白没有匹配上任何已知的 $\alpha$ -半乳糖苷酶, 与一个未命名的蛋白具有较高的匹配值。利用ESI-MS/MS技术测得了 6 段内肽的N端氨基酸序列, 其中 4 个肽段与已知的 $\alpha$ -半乳糖苷酶有序列一致性, 而另 2 个肽段与已知的 $\alpha$ -半乳糖苷酶无任何序列一致性。6 个肽段与已知青霉的 $\alpha$ -半乳糖苷酶序列没有序列一致性。以上结果证明该蛋白为一种新的 $\alpha$ -半乳糖苷酶。

## 第三章 $\alpha$ -半乳糖苷酶基因的克隆

### 1. 材料和方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 菌株和质粒

青霉 (*Penicillium* sp. F63) 为本实验室分离、保存, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109, 质粒 pUC19 均为本实验室保存; pGEM-T 载体购自 Promega 公司。

##### 1.1.2 引物合成

引物由上海英俊生物技术有限责任公司合成

##### 1.1.3 试剂盒、工具酶和生化试剂

DNA回收试剂盒为TakaRa公司产品; 实验所用的各种限制性内切酶购自TakaRa公司; T<sub>4</sub> DNA连接酶购自Invitrogen公司; Taq酶为TakaRa公司的TakaRa LA Taq<sup>TM</sup>(with GC Buffer), Pyrobest DNA polymerase产品; 其他常规试剂均为国产分析纯试剂。

溶液 I: 50 mmol/L 葡萄糖, 25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 10 mmol/L EDTA

溶液 II: 0.2 mol/L NaOH, 1% SDS (现配现用)

溶液 III: 3 mol/L 醋酸钾, 5 mol/L 醋酸 (pH4.8)

TAE (50×): 242 g Tris 碱, 57.1 mL 冰乙酸, 100 mL 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0), 用无菌水定容至 1000 mL。

蛋白上样缓冲液 (2×): 100 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8)、200 mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT)、4% SDS、0.2% 溴酚蓝、10% 甘油。

30% 丙烯酰胺溶液: 29 g 丙烯酰胺, 1 g N, N' -亚甲叉丙烯酰胺, 溶于 100 mL 水, 过滤。

考马斯亮蓝染液: 0.24 g 考马斯亮蓝 R250 溶于 90 mL 甲醇:水 (1:1, v/v) 和 10 mL 冰乙酸中。

脱色液: 10% 冰乙酸。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 青霉 F63 基因组 DNA 的提取

取 30℃ 培养 7 天后的青霉 F63 菌液 6000 rpm 离心 10 min。取 100 mg 菌丝体加 500  $\mu$ L 无菌水清洗, 离心取沉淀。沉淀重悬于 500  $\mu$ L 提取液混合液, 于 37℃ 温育 60 min, 10000 rpm 离心

10 min 去沉淀。上清液用等体积酚、酚：氯仿、氯仿依次抽提。取上层溶液加 0.6-1 倍体积的异丙醇常温沉淀 10 min。12000 rpm 离心 15 min。沉淀用 70% 乙醇清洗，稍离心，将沉淀烘干后用 30  $\mu$ L 无菌水溶解，备用。

### 1.2.2 $\alpha$ -半乳糖苷酶基因组 DNA 片段的扩增

根据内肽的测序结果，以 gal2 和 gal3 的氨基酸序列设计简并引物 Pf1 和 Pf2，以青霉基因组 DNA 为模板，Pf 和 Pr 为引物，PCR 扩增  $\alpha$ -半乳糖苷酶的基因组 DNA。

**Pf: 5'-(T/C)T(A/G/C/T)GA(T/C)GA(T/C)GGCTGGTTT-3'**

**Pr: 5'-C(G/T)CCACAT(A/G)TC(A/G/C/T)CC(A/G/C/T)GT-3'**

反应体系:

|                        |              |
|------------------------|--------------|
| 2 $\times$ GC buffer I | 25 $\mu$ L   |
| dNTP mix(2.5mmol/L)    | 4 $\mu$ L    |
| LA Taq (5U/ $\mu$ L)   | 0.3 $\mu$ L  |
| Pf(100 $\mu$ mol/L)    | 2 $\mu$ L    |
| Pr(100 $\mu$ mol/L)    | 2 $\mu$ L    |
| 模板 DNA                 | 3 $\mu$ L    |
| ddH <sub>2</sub> O     | 13.7 $\mu$ L |
| 总体积                    | 50 $\mu$ L   |

PCR 反应参数：94℃变性 3 min 后冷却至 4℃；然后 94℃变性 1 min，60℃退火 1 min，72℃延伸 1 min, 30 个循环后 72℃保温 10 min。PCR 产物回收后连接到 pGEM-T 载体上，送博亚生物技术有限公司进行序列测定。

### 1.2.3 反向 PCR

综合参照蹇文婴等的方法略加改进进行反向PCR扩增（蹇文婴等，2002；Rabudonirina等，1999；蔡文琴等，1994）。根据得到的 $\alpha$ -半乳糖苷酶的部分基因序列，设计反向PCR引物。分别以选定的各种限制性内切酶酶切青霉F63 总DNA，然后用T<sub>4</sub>DNA连接酶使酶切片段自身环化，以此自身环化的DNA片段作为PCR反应的模板进行反向PCR扩增。扩增所得产物回收后送博亚生物技术有限公司测序。引物序列如下：

Gi-f1 : 5' CACTTCGCTCGCCTACCCGC 3',

Gi-f2 : 5' GTCGCGATGATGGGCGGCTC 3',

Gi-f3 : 5' GCCGGGGCTCATTGCTCTCGC 3',

Gi-r1 5' CGGTGCGAGGGTAGGGTCC 3',

Gi-r2: 5' GGGCCCAGTCCGGGTGCTCG 3',

Gi-r3: 5' CGTCTGGGAACCGCTCAGGG 3'。

### 1.2.4 $\alpha$ -半乳糖苷酶全长 cDNA 的获得

利用 Qiagen 公司的 RNeasy Plant Mini kit 提取青霉 F63 总 RNA。

1 将在 3%豆粕产酶培养基中培养 3—4 天的菌体离心，称取 100 mg 湿菌体，用 DEPC 水洗三次。

2 在液氮中研磨成粉末，将菌体粉末和液氮倒入一个经液氮预冷的 2 mL 的 eppendorf 管中，使液氮挥发干净。

3 将含有 4.5 mL  $\beta$ -巯基乙醇的 450  $\mu$ L 缓冲液 RLC 加入 eppendorf 管中，剧烈振荡。

4 将裂解液直接移入淡紫色的柱子中，然后把此柱子放在 1.5 mL 的 eppendorf 管中，14000 rpm 离心 2 min，转移上清于另一管中。

5 加入 0.5 倍的乙醇到上清中，用枪混匀，不要离心。

6 将此上清移到另一个粉色的柱子中，盖上盖子，> 8000 g 离心 15 s，弃上清。

7 向柱子中加入 700  $\mu$ L RW1 缓冲液，> 8000 g 离心 15 s，弃上清。

8 将柱子放到另一个 eppendorf 管中，加 500  $\mu$ L 的 RPE 缓冲液。> 8000 g 离心 15 s，弃废液。

9 再加 500  $\mu$ L RPE 到柱子上，> 8000 g 离心 2 min。

10 重复步骤 9

11 将柱子转移到一个新的 eppendorf 管中，加入 30~50  $\mu$ L 的 Rnase-free 的水到柱子中的膜上，> 8000 g 离心 1 min

12 重复步骤 11，获得总 RNA。

紫外测定 RNA 的含量及纯度，取 5  $\mu$ g 的总 RNA 做反转录获得 cDNA 的一链。

反应体系：

|                               |                        |
|-------------------------------|------------------------|
| Prgal2 (10 $\mu$ mol/L)       | 1.5 $\mu$ L            |
| 样品总 RNA                       | 10 $\mu$ L (5 $\mu$ g) |
| DEPC ddH <sub>2</sub> O       | 4 $\mu$ L              |
| 70℃保温 10 min，冰上放置 1 min，短暂离心  |                        |
| 10×PCR buffer                 | 2.5 $\mu$ L            |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/L) | 2.5 $\mu$ L            |
| dNTP mix (2.5 mmol/L)         | 2 $\mu$ L              |
| DTT (0.1 mol/L)               | 2.5 $\mu$ L            |
| 总体积                           | 25 $\mu$ L             |

轻轻混合，短暂离心，42℃水浴 1 min，加入 1  $\mu$ L (200 U) SuperScript™ II RT，轻轻混合，42℃保温 50 min。70℃水浴 15 min，终止该反应，离心 10-20 s，将其放置在 37℃下，加入 1  $\mu$ L RNAase mix，轻轻混匀，37℃反应 30 min，反应结束后，将样品短暂离心，放在冰上。待 cDNA 的第一链合成后，采取 PCR 的方法获得 cDNA 的第二链，引物 Prgal1 和 Prgal2 如下：

Prgal1: 5'-AAAGGTATGTATTTCCCGG-3'

Prgal2: 5'-CTATTGCTTTTCCAACATCA-3'

反应体系：

|                               |        |
|-------------------------------|--------|
| 10×PCR buffer                 | 2.5μL  |
| dNTP mix(2.5mmol/L)           | 3μL    |
| MgSO <sub>4</sub> (50mmol/L)  | 0.5μL  |
| Pyrobest DNA polymerase(2.5U) | 0.5μL  |
| Prgal1 (10μmol/L)             | 1μL    |
| Prgal2 (10μmol/L)             | 1μL    |
| cDNA 一链                       | 2μL    |
| ddH <sub>2</sub> O            | 14.5μL |
| 总体积                           | 25μL   |

扩增条件为：94℃ 4 min, 94℃ 1 min, 48℃ 1 min, 72℃ 3 min, 共 35 个循环, 72℃延伸 10 min。

将扩增所得到的 PCR 片断连接到 pGEM T-Easy 上进行测序。

PCR 扩增产物的纯化, 依据 DNA 纯化试剂盒(北京鼎国生物技术公司)。

### 1.2.5 双酶切

|        |           |       |
|--------|-----------|-------|
| 第一次酶切: | 无菌水       | 适量    |
|        | DNA       | 适量    |
|        | 10×buffer | 4 μL  |
|        | 酶         | 10 U  |
|        | 总体积       | 40 μL |

37℃保温 1.5 h 后, 加 4 μL 3 M 乙酸钠(pH5.2)及 132 μL 无水乙醇, -70℃沉淀 20 min。13000 rpm 离心 15 min, 用 70%乙醇洗 1-2 次, 13000 rpm 离心 5 min。真空干燥 15 min 后, 用 17 μL 无菌水溶解进行第二次酶切。

|        |           |       |
|--------|-----------|-------|
| 第二次酶切: | DNA       | 17 μL |
|        | 10×buffer | 2 μL  |
|        | 另一种酶      | 10U   |
|        | 总体积       | 20 μL |

37℃保温 1.5 h。电泳回收目的条带及质粒载体。

### 1.2.6 DNA 电泳回收

#### 1.2.6.1 电泳

电泳: 电泳缓冲液 1×TAE, 电压 1-5 V/cm, 时间约 30 min。

#### 1.2.6.2 回收

(1) 把切胶用的刀片用电泳缓冲液洗净, 切取的胶块应尽量小, 切下的胶块放入备用的新的 Eppendorf 管中, 用 Tip 吸头捣碎, 动作轻柔;

- (2) 加入 3 倍体积的溶胶液, 室温下放置 5 min, 其间轻摇 Eppendorf 管几次, 使胶完全溶化;
- (3) 加入 10  $\mu$ L 玻璃奶 (玻璃奶使用前要充分混匀), 颠倒混匀, 冰浴下放置 10 min。并且间隔 2-3 min 混匀一次, 12000 rpm 离心 30 s, 吸弃上清;
- (4) 加 250  $\mu$ L 漂洗液 (浓缩漂洗液使用前, 按浓缩漂洗液: 无水乙醇=3:7 配成工作浓度), 用加样器吸漂洗液轻柔地将玻璃奶冲散混匀, 12000 rpm 离心 30 s, 吸弃上清;
- (5) 重复上一步。吸取完漂洗液后再离心 10 s, 用 Tip 头将最后一点漂洗液吸干净。然后真空干燥 10 min;
- (6) 加适量无菌蒸馏水或 TE (10-30  $\mu$ L, 常规加入 30  $\mu$ L), 混匀。60℃水浴 5 min, 12000 rpm 离心 1 min, 回收上清备用。重复这一步, 会提高回收率。

### 1.2.7 连接

体系为 10  $\mu$ L:

|                            |             |
|----------------------------|-------------|
| 无菌水                        | 适量          |
| 质粒:                        | 0.1 $\mu$ g |
| 目的基因:                      | 0.5 $\mu$ g |
| 10 $\times$ T4 DNA 连接酶缓冲液: | 1 $\mu$ L   |
| T4 DNA 连接酶:                | 3 U         |

总体积

10  $\mu$ L

14℃保温 12-16 h。

### 1.2.8 感受态细胞的制备

- (1) 取 1/100 体积的新鲜的 *E. coli* 大肠杆菌过夜培养液, 接种于 500 mL LB 培养液中, 37℃振荡培养过夜, 使其 OD<sub>600</sub> 约为 0.5-0.7;
- (2) 将培养液冰浴 20 min, 以后的步骤尽可能保持在 0℃, 所有的容器在加细胞之前都预冷。4000 g 4℃离心 15 min;
- (3) 用 500 mL 预冷的 10% 甘油重悬细胞, 动作要轻。4000 g 4℃离心 15 min, 弃上清
- (4) 用 250 mL 预冷的 10% 甘油重悬细胞, 4000 g 4℃离心 15 min, 弃上清;
- (5) 用 20 mL 预冷的 10% 甘油重悬细胞, 转移到 30 mL 无菌离心管中, 4000 g、4℃离心 15 min, 弃上清;
- (6) 用 1-2 mL 预冷的 10% 甘油重悬细胞, 细胞的浓度应为  $1-3 \times 10^{10}$  细胞/mL;
- (7) 将细胞按每管 40  $\mu$ L 分装, -70℃保存, 备用。

### 1.2.9 电转化

#### 1.2.9.1 重组 DNA 的纯化



取连接后的 10  $\mu\text{L}$  溶液, 加 1  $\mu\text{L}$  乙酸钠 (1/10 体积) 和 33  $\mu\text{L}$  无水乙醇 (3 倍体积),  $-20^{\circ}\text{C}$  沉淀 20 min, 14000 rpm 离心 15 min。再用 70%乙醇洗, 14000 rpm 离心 5 min。沉淀真空干燥 10 min 后用 5  $\mu\text{L}$  无菌水溶解。

### 1.2.9.2 转化

- (1) 于冰上冻融 $-70^{\circ}\text{C}$ 保存的感受态细胞, 把 Eppendorf 管和电转化杯预冷备用;
- (2) 将纯化后的 5  $\mu\text{L}$  DNA 加入到 40  $\mu\text{L}$  的感受态细胞中混匀, 冰浴 1 min;
- (3) 将细胞和 DNA 混和液转到电转化杯中, 并将液体敲至杯底。把小杯放入小盒中, 电击;
- (4) 迅速取出小杯, 加入 1 mL LB 培养基, 重悬细胞。把细胞转至一灭菌的离心管中,  $37^{\circ}\text{C}$  轻柔振荡 1 h;
- (5) 取电击转化培养液, 5000 rpm 离心 3 min, 弃去约 750  $\mu\text{L}$  上清后, 如可用蓝白斑筛选, 往离心管中加入 16  $\mu\text{L}$  50 mg/mL X-gal 和 4  $\mu\text{L}$  1mol/L IPTG, 将菌打散, 混匀, 涂平板,  $37^{\circ}\text{C}$  倒置培养过夜。

### 1.2.10 筛选重组子

- (1) 从平板上挑取白斑, 用装有 5 mL 含 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素 LB 培养液的玻璃管 250 rpm、 $37^{\circ}\text{C}$  培养过夜, 挑一个蓝斑作为阴性对照。
- (2) 小量提取质粒
  - ① 取 1.5 mL 摇床过夜培养液 5000 rpm 离心 3 min;
  - ② 弃上清, 沉淀中加入 100  $\mu\text{L}$  溶液 I, 振荡器混匀, 再加入 200  $\mu\text{L}$  溶液 II, 颠倒混匀, 放置 1-2 min, 再加入 150  $\mu\text{L}$  溶液 III, 放置 5 min;
  - ③ 13000 rpm, 离心 10 min, 取上清, 加 0.6-1 倍体积异丙醇, 室温放置 10 min;
  - ④ 13000 rpm, 离心 10 min, 沉淀用 70%乙醇清洗;
  - ⑤ 真空干燥, 最后用 30  $\mu\text{L}$  无菌水溶解。
- (3) 先进行琼脂糖凝胶电泳, 根据大小, 进行初步检测, 然后对有可能是阳性克隆质粒进行酶切检测, 最后大量提取质粒 DNA 作进一步酶切检测, 确定阳性克隆子。

### 1.2.11 质粒 DNA 的大量提取

- (1) 取一管 $-70^{\circ}\text{C}$ 保存的大肠杆菌 (含质粒), 接种于含 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素的 50 mL LB 培养基中,  $37^{\circ}\text{C}$  振荡过夜培养;
- (2) 取过夜培养液, 5000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$  离心 3 min。
- (3) 弃上清, 倒置离心管于吸水纸上, 吸去多余的液体;
- (4) 将沉淀重悬于 3 mL 溶液 I 中, 剧烈振荡, 充分悬浮;
- (5) 加入 6 mL 新鲜配置的溶液 II, 颠倒混匀, 冰上放置 1 min;
- (6) 加入 4.5 mL 溶液 III, 颠倒混匀, 冰上放置 5 min;
- (7) 13000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$  离心 10 min。移出上清, 用擦镜纸过滤;
- (8) 上清中加入 0.6-1 倍体积的异丙醇, 室温放置 10 min。13000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$  离心 10 min;

- (9) 弃上清, 70%乙醇洗沉淀, 稍离心后倾去乙醇, 将沉淀真空干燥 10 min;
- (10) 在干燥后的离心管中, 每管加入 500  $\mu$ L TE, 用枪把沉淀打散, 移入 Eppendorf 管中, 加入 10  $\mu$ L RNase, 37°C 保温 15 min;
- (11) 每管加入 500  $\mu$ L Tris 饱和酚, 混匀, 14000 rpm 离心 3 min;
- (12) 吸取上层水相于新 Eppendorf 管中, 加入 500  $\mu$ L 酚: 氯仿液, 混匀, 14000 rpm 离心 2 min;
- (13) 小心吸取上层水相于新 Eppendorf 管中, 加入 500  $\mu$ L 氯仿;
- (14) 取上清, 加入等体积 13.3% PEG8000, 冰上放置 15 min, 14000 rpm 离心 15 min;
- (15) 弃上清, 沉淀加 500  $\mu$ L 70%乙醇洗, 尽量不使沉淀漂起来, 离心 3 min。弃去乙醇, 沉淀于真空干燥器中干燥 10 min; 于离心管中加入 50  $\mu$ L 无菌水或 TE 液, -20°C 保存备用。

### 1.2.12 $\alpha$ -半乳糖苷酶 DNA 及 cDNA 序列测定、序列一致性比较

将经鉴定无误的连有青霉  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因组 DNA、cDNA 片段的重组质粒进行测序(上海博亚公司), 并将该基因的 cDNA 序列、衍生的氨基酸序列在 NCBI 的 Genbank 中搜索比较序列一致性。

## 2 结果

### 2.1 获得 $\alpha$ -半乳糖苷酶基因的部分序列

根据 gal2 和 gal5 的氨基酸序列, 设计了一对简并引物 Pfl 和 Pr1, 以青霉 F63 基因组 DNA 为模板扩增得到一个 800 bp 的片断, 然后将 PCR 产物克隆进 pGEM T-Easy 质粒中, 通过电击转化, 蓝白斑筛选, 酶切检测, 挑出阳性克隆子进行测序, 测序后鉴定该片断为  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因的部分序列。PCR 扩增产物电泳分析结果见图 3-1。测序结果见如下。

5'-ATACCCACGTCTCTCTGACAATGCCGGGCTGGGCGACTGGATCCCAAACCCTGAGCGGTTCCCAGACGCGC  
CTGGAGCCGCTTGTGAAAAAGATCACGGACCTCAAAGCCGCTAACACGTCAACAAACATGCGCTTTGGTAT  
CTGGTTCGAGCCGAAATGGTCAATCCGAACTCGACTCTGTATAACGAGCACCCGGACTGGGCCCTACATGC  
AGGACCCTACCCTCGCACCGAAAGACGCAGCCAGCTCGTATTGAACCTCGCTCTTCCTGAAGTCCAAGACTT  
CATCATCAAGTCCGTCTCAGATATTCTCAAGAGTGCAGATATTAGTTACGTCAAGTGGGATAACAACAGGGGC  
ATTCACGAGACGCCTTCGCCAGCCACAAGCCACGCCTACATGCTCGGTCTGTACCGCGTTTTTCGAGGAACTG  
ACAACCCAATTCCCCGATGTCTCTGGGAGGGTTGCGCGTCGGGTGGAGGCCGTTTCGACCCAGGTGTTCTC  
CAGTATTTCCCGCAGATCTGGACATCGGACAACACAGACGCAATCGATCGCATCACCATCCAGCTTGGCACT  
TCGCTCGCCTACCCGCCTAGCGCGATGGGTGCTCACCTGTCCCAAGTGCCGAACCACCAGACTGGCCGTACA  
GTCCCCGTGGCTGTCCGCGGACATGTCGCGATGATGGGCGGCTCGTTTTGGCTTGGAACCTCGATCCCGCTGCA  
ATGGACGCTGATGACAAGGCAGCTATGCCGGGGCTCAATTGCTCTCGCTGAGAAGGTAAATCCCATTGTTCTTA  
CTGGTGATATGTGGCGA-3'

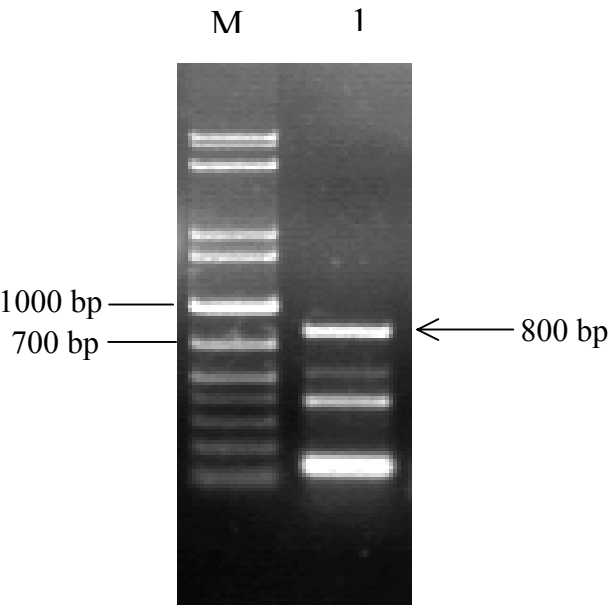


图 3-1 简并引物 PCR 产物

Fig. 3-1 The products of degenerated primer-PCR

M: DNA Marker; 1: degenerated primer PCR products

2.2 反向 PCR

根据以上扩增的 800 bp 片段，设计了 3 对反向 PCR 嵌套引物，以青霉菌基因组 DNA 为模板，分别扩增而得到 3200 bp、3300 bp 和 3400 bp 的片段（图 3-2），测序证明在扩增的片段中含有  $\alpha$ -半乳糖苷酶的开放阅读框架（ORF）。

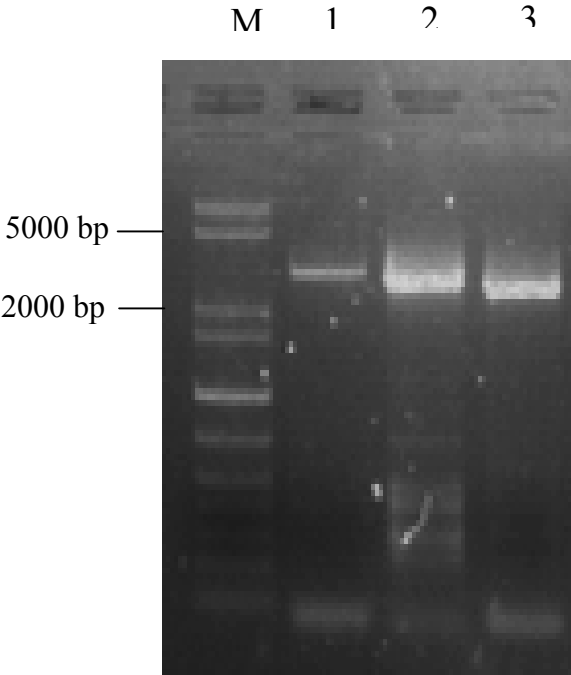


图 3-2 反向 PCR 产物

Fig 3-2 The products of inverse PCR

M: DNA Marker; 1: The products amplified by primers Gi-f1 and Gi-r1; 2: The products amplified by primers Gi-f2 and Gi-r2; 3: The products amplified by primers Gi-f3 and Gi-r3

```

-628 GTCGACGCTACTAACATATGAGTTCGGGATCTGTTGGGCCGGGTATGACTGGCTTACCGACATGTCGCACAGGCCTTTGCTGGTCTCAT
-538 TATTCCCAAAGAGAAAAGGACCACTTGTTAAAGCATTGGCAAATTGGAGGAGTTAAGCAGACTGTGTCGGGATTGAAAGAAGCAAAAGCC
-448 AATGAGCGAAGTTCAAACCCGCCGCGACACGGAGTATCCCCGGAGTTTCTCCGCATTTTCGACTCCACAGTTATAAACCCCAACATAT
-358 GTAGTAGTATATACTTCCAAGTATCGCCGAAGTTGGTTTTTGGATCCGCATTTCAAGAGCCATAGTTCAGCAGACTCGTAGAAGTCTGTT
-268 CTTGGCAATTGAGACCATTTCTACGTGATTGAGACTACATAGTCGAGCCAACCTTGAATACCTGCATGTAATCTCCCCACAAGTCG
-178 AAAAGACGTCGGGTAAAAGATATAAAAAGGTATGTATTCCCGGGTTGGGATTGGAATCTATCAAAAACACGGCAAAAATGGTT
-88 TACTTATCAAGGGTGTGTCAGTGGCTACATGCCTAGGGCTACTTGCACATTCTCCGCTATTATGGCTAAGGAATTAACCTAAGC
1 GTGAGTCCTTTGCTTCTGTCTTTTATAGTTTCAAATCTAACCATATATCCTATAGCAATCGCGCGGATGGTACTCTCTTTGCTCTCAAT
   m s p l l l s f i v s n l t i y p i a i a A D G T L F A L N
91 GGAGAAAATGTTTCGTACCGCATCCATGTGGACAACCACTGGTGATCTCCTAGGAGACCATTTCGGCGGCTCCGTCGGAGCTAATATC
   G E N V S Y R I H V D N T T G D L L G D H F G G S V G A N I
181 CCTCTGGAGACTGTAGCGAGGTCAATGGCTGGAGTAGTCATATAGGACGTGTGCGCCGAGTTCAGACCAAGGCCAGGGGATTTC
   P L E T V G E V N G W S S H I G R V R R E F P D Q G R G D F
271 CGGACCCCTGCGATTTCGATTCGTCAGTCAGAAGGTATACCGTATCTGAATTCAGTACAAATCGCACAAGATCATCGCCGGCAAGCCC
   R T P A I R I R Q S E G Y T V S E F Q Y K S H K I I A G K P
361 GCTCTGCCTGGGTGCCAGCCACGACAGGCACAGAAGAGGATGTTAGCACTTTGATCATCAGTCTGTATGACAAGTACAGCGATGTGGCT
   A L P G L P A T T G T E E D V S T L I I S L Y D K Y S D V A
451 GCAGACCTCTCTACTCAATTTCCCTAAGCACGATGCCATTGTGCGCAGCGTGAATGTTACGAATCACGGAGAGGCAACATCACAATC
   A D L S Y S I F P K H D A I V R S V N V T N H G E A N I T I
541 GAGTCTCTGGCCAGTCTGAGCGTGGATTGCGGTTTGAAGTTCGAATGGGTAAGTCTCTCACCTCCACAATCCTTTCTGGCGTTGGCA
   E S L A S L S V D L P F E E L D M I S L R G D W A R E A H R
631 GAGAGGAAAAGGTCACGTACGTACCCAAGGCTTTGGAAGTTCGAATGGGTAAGTCTCTCACCTCCACAATCCTTTCTGGCGTTGGCA
   E R K R V T Y G T Q G F G S S N G Y S S H L H N P F L A L A
721 GATCCCTCTGCCACCGAGTCCCAAGGAGAGGTATGGGATTCTCGCTTGTGTACACAGGTTCAATTCCTGGAGGTCGAGAAGGGTTCA
   D P S A T E S Q G E V W G F S L V Y T G S F S V E V E K G S
811 CAGGGTTTCACGCGTGCCCTTCTGGGTTTCAACCCTGGTCAGCTTTCGTGGACTTTGCCGCCAGGTGAGACTCTTACTCCCCGAATGT
   Q G F T R A L L G F N P G Q L S W T L P P G E T L T S P E C
901 GTCTCGGTATACTCCCGGGATGGCATCGCGGAATGTCACGCTCGTGCATCGCTTGTACCGCAACCATCTCATCAAGCAAGTTTGCT
   V S V Y S R D G I G G M S R S L H R L Y R N H L I K S K F A
991 ACCAGTGATCGTCTACGTTGCTGAACAGTTGGGAAGGACTGTATTTCGATTACAACCAGAGCAGTATCTACGAGCTGGCAAAGGGAGCC
   T S D R P T L L N S W E G L Y F D Y N Q S S I Y E L A K G A
1081 GCCGAAGTAGGCGCTAAGCTCTCGTTCTGGATGACGGCTGGTTCGGCAAGGAATACCCACGTCTCTGACAATGCCGGGTGGGCGAC
   A E V G A K L F V L D D G W F G K E Y P R L S D N A G L G D

```

```

1171 TGGATCCCAAACCTGAGCGGTTCCAGACGGCCTGGAGCCGCTTGTGAAAAAGATCACGGACCTCAAAGCCGCTAACACGTCAACAAAC
      W I P N P E R F P D G L E P L V K K I T D L K A A N T S T N
1261 ATGCGCTTTGGTATCTGGTTCGAGCCGAAATGGTCAATCCGAACCTCGACTCTGTATAACGAGCACCCGGACTGGGCCCTACATGCAGGA
      M R F G I W F E P E M V N P N S T L Y N E H P D W A L H A G
1351 CCCTACCTCGCACCGAAAGACGCAGCCAGCTCGTATTGAACCTCGCTCTTCTGAAGTCCAAGACTTCATCATCAAGTCCGTCTCAGAT
      P Y P R T E R R S Q L V L N L A L P E V Q D F I I K S V S D
1441 ATTCTCAAGAGTGCAGATATTAGTTACGTCAAGTGGGATAACAACAGGGGATTACAGAGACGCCTTCGCCAGCCACAAGCCACGCCTAC
      I L K S A D I S Y V K W D N N R G I H E T P S P A T S H A Y
1531 ATGCTCGGTCTGTACCGCGTTTTTCGAGGAACTGACAACCAATTCCCCGATGTCTCTGGGAGGGTTGCGCGTCGGGTGGAGGCCGTTTC
      M L G L Y R V F E E L T T Q F P D V L W E G C A S G G G R F
1621 GACCCAGGTGTTCTCCAGTATTTCCCGCAGATCTGGACATCGGACAACACAGACGCAATCGATCGCATCACCATCCAGCTTGGCACTTCG
      D P G V L Q Y F P Q I W T S D N T D A I D R I T I Q L G T S
1711 CTCGCCTACCCGCTAGCGCGATGGGTGCTCACCTGTCCCAAGTGCCGAACCACCAGACTGGCCGTACAGTCCCGTGGCTGTCCGCGGA
      L A Y P P S A M G A H L S Q V P N H Q T G R T V P V A V R G
1801 CATGTCGCGATGATGGGCGGCTCGTTTGGCTTGGAACTCGATCCCGCTGCAATGGACGCTGATGACAAGGCAGCTATGCCGGGGCTCATT
      H V A M M G G S F G L E L D P A A M D A D D K A A M P G L I
1891 GCTCTCGTGAGAAGGTAAATCCCATTGTTCTTACTGGTGATATGTGGCGATTGAACCTTCCGGAGGACTCGAATTGGCCTGCTGTTTTG
      A L A E K V N P I V L T G D M W R L N L P E D S N W P A V L
1981 TTCATCGCCGAGGATGGTCAGAAGGCTGTGTTGTTTGTCTCCAGCTCGCTCCAAATGTCGATCATTATGCCCCGCGTTAGGTTGGAG
      F I A E D G Q K A V L F V F Q L A P N V D H S W P R V R L E
2071 GGATTGGATGAGAATGCTTTATATAAGATTGATGATGGTGTGGTTTACTCTGGTGGAACCTTGATGAATATCGGTCTGCAATTCCCCTTT
      G L D E N A L Y K I D D G V V Y S G G T L M N I G L Q F P F
2161 AAGGGTGACTATGGCAGTCAAGTTGTGATGTTGGAAGCAATAGAGAGGACTTGCAATATCGGCTCAATAGTTATATTGAGCGGCAAC
      K G D Y G S Q V V M L E K Q *
2251 GGTGTGAGCAGTCATGCTATTTTCATAGGATTCGACAAGTTAAGAACCAATATCAACATTCCAAGATTGCTGAATAATGAGATAATATA
2341 TTTGAAGAGGGATATCCAATTCAAGACTGTTGTAAACTCATGTTGGCCTTCCAAGGTTGATGATCTTGATATTATTCTGCCGACGAA
2431 AAAAACCCGCTTATCGATAAGCTCGCCTTCTTAATCCCCTCCGACTCTGACTCCTTCCAGCCTCTAATTTATTCTTAACGAACTATTCA
2521 ACATGCGAGATGCAGACGAGGACGCTATTCGCGCCCTGAAAAATGCCTCTGCACAGCCCGAGGTCGAC

```

图 3-3 *AGLI* 的核苷酸序列与推导的氨基酸序列FIG 3-3. Nucleotide and deduced amino acid sequence of *AGLI*. The putative uORFs are shaded

## 2.3 $\alpha$ -半乳糖苷酶基因 cDNA 的克隆及鉴定

利用总RNA提取试剂盒从*Penicillium* sp F63 中提取总RNA, 经紫外分光光度计测定其  $OD_{260}/OD_{280}=1.8$ , 纯度达到要求。在琼脂糖凝胶上可见明显的 28S、18S条带(图 3-4), 提取的总RNA可用于进行反转录和RT-PCR。以 5  $\mu$ g总RNA为模板合成cDNA的一链, 利用引物Prgal1 和 Prgal2 PCR扩增获得 $\alpha$ -半乳糖苷酶cDNA的全长片段(图 3-5)。片段长度为 2.3 kb, 将该片段克隆到pGEM-T Easy载体上, 测序后证明该 $\alpha$ -半乳糖苷酶cDNA的序列与其基因组DNA的序列完全相

同, 该基因的ORF为 2205 bp, 编码一个 735 个氨基酸的多肽链。在推倒的氨基酸序列中含有 7 个潜在的糖基化位点。根据网上数据库分析结果, Agl1 信号肽长度为 21 个氨基酸(图 3-6), 该信号肽的可能性达到 95.8%。

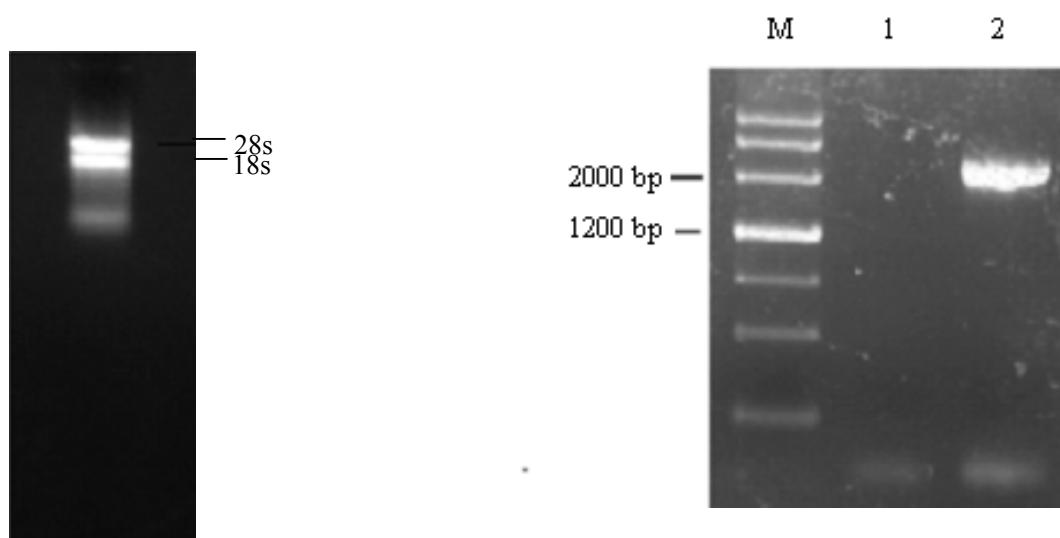


图 3-5 RT-PCR 扩增  $\alpha$ -半乳糖苷酶的 cDNA

Fig. 3-5 The cDNA of  $\alpha$ -galactosidase by RT-PCR

Fig3-4 Extract of RNA from mycelia of *Penicillium* sp. F63

M: DNA Marker; 1: Control; 2: full length cDNA of  $\alpha$ -galactosidase

图 3-4 青霉菌丝体 RNA 的提取

MSPLLLSFIVSNLTIYPIAIAADGTLFALNGENVSYRIHVDNTTGDLLGDHFGGSVGANIPLE  
TVGEVNGWSSHIGRVRREFPDQGRGDFRTPAIRIROROSEGYTVSEFOYKSHKIIAGKPALGPLPATT  
GTEEDVSTLIISLYDKYSDVAADLSYSIFPKHDAIVRSVNVTNHGEANITIESLASLSVDLPFEEL  
DMISLRGDWAREAHRERKRVTYGTQGFSSNGYSSHLHNPFLALADPSATESQGEVWGFSLVY  
TGSFSVEVEKGSQGFTRALLGFNPGQLSWTLPPGETLTSPECVSVYSRDGIGGMSRSLHRLYRN  
HLIKSKFATSDRPTLLNSWEGLYFDYNQSSIYELAKGAAEVGAKLFVLDDGWFGKEYPRLSDN  
AGLGDWIPNPERFPDGLEPLVKKITDLKAANTSTNMRFGIWFEPEMVNPNSTLYNEHPDWALH  
AGPYPRTERRSQVLNLALPEVODFIKSVSDILKSADISYVKWDNNRGIHETPSPATSHAYMLGL  
YRVFEELTTQFPDVLWEGCASGGGRFDPGVLQYFPQIWTSNDNTDAIDRITIQLGTSLAYPPSAMG  
AHL SQVPNHQTGRTPVAVRGHVAMMGSGFLELDPAMDADDKAAMPGLIALAEKVNPIVL  
TGDMWRLNLPEDSNWPVLFIAEDGQKAVLFVFLAPNVDHWPVRVRLEGLDENALYKIDDG  
VVYSGGTLMNIGLQFPFKGDYGSQVVMLEKQ

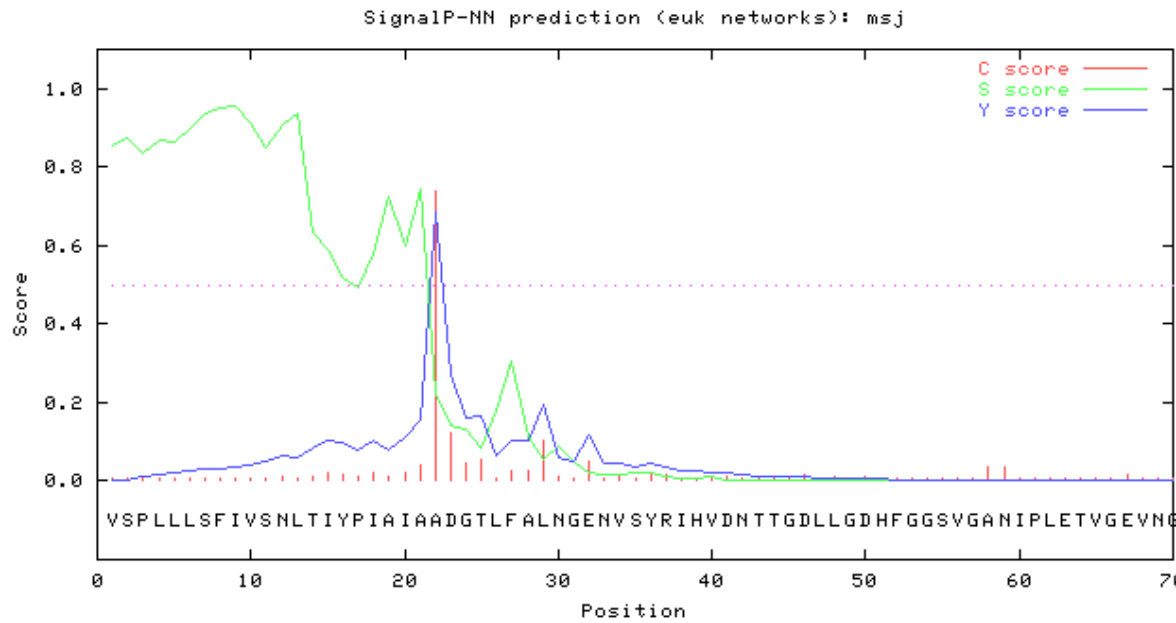
图 3-6  $\alpha$ -半乳糖苷酶推导的氨基酸序列

Fig. 3-6 The deduced amino acid sequence of  $\alpha$ -galactosidase

2.4 青霉 F63  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因组 DNA、cDNA 及衍生的氨基酸序列分析

将经鉴定无误的连有 *Penicillium* sp F63  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因组 DNA、cDNA 片段的重组质粒进行测序，序列测定结果表明，DNA 和 cDNA 序列完全一致。该基因内部没有内含子。序列分析结果表明，该基因的开放阅读框架（ORF）为 2205 bp，该  $\alpha$ -半乳糖苷酶的起始密码子被认为 为 GTG，终止密码子为 TAG，GC 含量为 53.7%。由此 cDNA 序列推导衍生出的氨基酸序列(图 3-3) 共有 734 个氨基酸，信号肽的核苷酸长度为 63 bp,编码 21 个氨基酸：MSPLLLSFIVSNLTIYPIAIA （图 3-7）。成熟蛋白的理论分子量的为 78.5 kDa，理论等电点为 5.07。根据 N-糖基化位点的定义 (Asn-X-Ser/Thr，X 代表除 Pro 外的任何氨基酸)，在  $\alpha$ -半乳糖苷酶成熟蛋白氨基酸序列中推测有 7 个潜在的 N-糖基化位点：12 NVS，21 NTT，148 NVT，156 NIT，328 NQS，395 NTS，424NST。分析该基因的非翻译区，一个预测的启动子位于-162，TATA box 位于-154，CAAT box 位于-258。在该基因终止密码子的下游+118，有一个多聚腺苷酸信号（AATAATGA）。测序的六段内 肽随机分布在推导的氨基酸序列内。

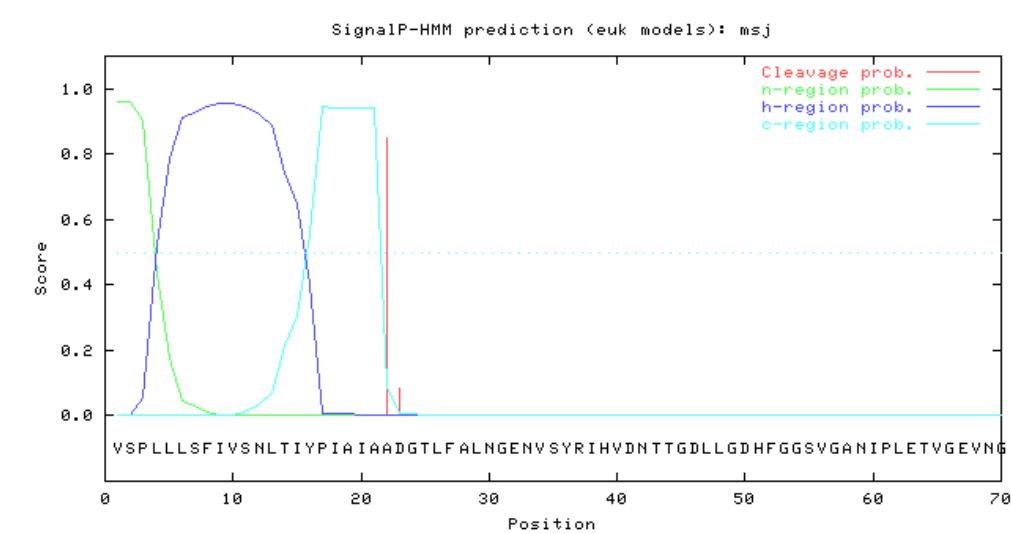
SignalP-NN result:



| # Measure | Position | Value | Cutoff | signal peptide? |
|-----------|----------|-------|--------|-----------------|
| max. C    | 22       | 0.738 | 0.32   | YES             |
| max. Y    | 22       | 0.686 | 0.33   | YES             |
| max. S    | 9        | 0.955 | 0.87   | YES             |
| mean S    | 1-21     | 0.787 | 0.48   | YES             |
| D         | 1-21     | 0.736 | 0.43   | YES             |

# Most likely cleavage site between pos. 21 and 22: AIA-AD

SignalP-HMM result:



>msj

Prediction: Signal peptide

Signal peptide probability: 0.958

Signal anchor probability: 0.001

Max cleavage site probability: 0.852 between pos. 21 and 22

图 3-7  $\alpha$ -半乳糖苷酶信号肽的预测

Fig. 3-7 Prediction of  $\alpha$ -galactosidase signal peptide

2.5 青霉  $\alpha$ -半乳糖苷酶起始密码子的推断

目前，非 AUG 起始的密码子包括 GTG、UUG、ACG、AGG 等，该  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因的起始密码子被认为是 GTG 的原因有以下几个方面。

(1) 通过分析该 GTG 密码子在  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因中的上下游序列发现，此密码子符合 Kozak 规则，在真核生物中，起始密码子的-3 位为腺嘌呤（A），在+4 位为嘧啶碱基。但-3 位的腺嘌呤碱基（A）在所用的生物中是最保守的。在这个青霉  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因中，一个腺嘌呤位于 GTG 密码子的-3 位。在别的可能是起始密码子的-3 位是没有腺嘌呤的。

(2) 在推测的 GTG 起始密码子的-12 处有一个与该基因相同阅读框的终止密码 TAA，这表明该青霉  $\alpha$ -半乳糖苷酶（Agl1）的 N 端序列不可能再向上游延伸。

(3) 该青霉  $\alpha$ -半乳糖苷酶分子量为 82 kDa，而推导的氨基酸的理论分子量为 78.5 kDa，成熟蛋白的分子量是与推导的氨基酸序列的分子量是基本一致的。

(4) 在 Agl1 的 5'-UTR 区，有三个短小的上游开放阅读框（uORF），位置分别为-59，-447 和-566，开放阅读框的大小分别为 13、27 和 30 个密码子。这些 uORF 能够指导下游主要的 ORF 的翻译起始（包括非 AUG 起始密码子）(Nicola 等, 1998; Kozak, 1989a)。

(5) 通过用 SignalP 软件分析推导氨基酸的信号肽表明其信号肽的可能性达到 95.8%，这种可



能性在所有可能的信号肽中是最高的。

## 2.6 青霉 F63 $\alpha$ -半乳糖苷酶的序列一致性分析

将不同来源的  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因序列及其推导的氨基酸序列与青霉 F63  $\alpha$ -半乳糖苷酶的基因及衍生的氨基酸序列进行了序列一致性比较。结果表明, (1) 该  $\alpha$ -半乳糖苷酶属于糖基水解酶的 36 家族。(2) 该基因与黑曲霉、构巢曲霉、木霉和烟曲霉的  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因具有较高的序列一致性, 但最高序列一致性仅有 66.7%, 氨基酸的序列一致性最高为 69.6%(图 3-8)。(3) 该基因与已发表的青霉的  $\alpha$ -半乳糖苷酶的序列一致性较低, 与紫青霉和单青霉  $\alpha$ -半乳糖苷酶的核苷酸序列一致性分别为 35.5%和 32.1%, 氨基酸序列一致性分别为 7.5%和 8.2%。(4) 该  $\alpha$ -半乳糖苷酶具有原核生物  $\alpha$ -半乳糖苷酶的保守序列 LFVLDDGWF, 该保守序列很可能位于  $\alpha$ -半乳糖苷酶的活性中心或底物结合部位。

该基因没有内含子, 推定的起始密码子为 GTG, 并且该  $\alpha$ -半乳糖苷酶属于糖基水解酶的 36 家族, 36 家族的  $\alpha$ -半乳糖苷酶一般是细菌来源的, 从以上特征可以看出该基因可能是由细菌的基因进化而来的。

|      |  |     |
|------|--|-----|
| A.ni | -----MFRSTATVAAATAMGLTATGHGSLAIAQGTGTSNAVVVDGTFNFAIANGASMSYVFHANSTTGDIVSDHFGATISG  | 75  |
| A.ng | -----MIGSSHAVVALGLFTLYGHSAAPAGASNSQITVNTGTSFALNGDNVSYRFHVNSSTGDLISDHFGGVVSG        | 72  |
| A.fu | -----MMMTAIVVEGKTFFALNGYNVSYRFHVDESTGDLRSDHFGGSVSG                                 | 44  |
| P.Fr | -----MSPILLS-----FIVSNLTITYPIAIAADGTLFALNGENVSYRTHVDNTTGDLLGDHFGGSVGA              | 58  |
| T.re | -----MLGAPSPRRLLADVLAVT-----AGLVASVRAASPISSVSKSFALNGDNVSYRFHVDDSKDLIGDHFGGPATE     | 68  |
| A.co | -----ALDVG-----IHKHPSFETWFMVTKKSTYVVGATADGYVINLHWGKRLTQLDLDLNATVPL                 | 55  |
| A.ni | A-IPAPKEPAVNGVWGMPPGRIRREFPDQGRGDFRIPAVRIQTAGYTVSDLYQGHVVDGKPALPGLPATFGEAGDVTT     | 154 |
| A.ng | T-IPSEVEPAVNGVWGMPPGRIRREFPDQGRGDFRIPAVRIRESAGYTVSDLYQVSHVIEGKYALPGLPATFGDAQDATT   | 151 |
| A.fu | P-IPDDSAPIMNGWTGMPDRVRREFPDQGRGDFRIPAIRIRQSQGHETVSFAFRYDSHTVLKGPALAGLPATFGTEEDVST  | 123 |
| P.Fr | N-IPLETVGEVNGWSSHIGRVREFPDQGRGDFRTPAIRIRQSEGYTVSEFQYKSHKIIAGKPALPGLPATTTGTEEDVST   | 137 |
| T.re | DGVFFPIIGPIQGVVDLIGRQRREFPDQGRGDFRPAVHIRQAAGYTVSDFOYKSHRVVEGKPALRGLSTFGDAGDVST     | 148 |
| A.co | S-----DQSQNPPISYAMEELPAFGGLRYRDNVLKVDLPDGTRELNLLYSGAKSKD-----DTLL                  | 110 |
| A.ni | LVVHLYDNYSSVAADLSYSVFPEFDAVVRVSVNVTNKKGKNITIEENLASLSVDLP-----LEDLDLVSLRGDWAREANRER | 229 |
| A.ng | LVVHLYDNYSSVAADLSYSIFPKYDAIVRSVNVTNOGPGNITIEALASTSIDFP-----YEDLDMVSLRGDWAREANVOR   | 226 |
| A.fu | LVVHLYDQHSEVAADLMYSIFPKHDAIVRSVRITNKGEGTISIEALSSMSVDLP-----CEDFDMIGLRGDWAREAHRER   | 198 |
| P.Fr | LITSLYDKYSVAADLSYSIFPKHDAIVRSVNVTNHGEANITIEENLASLSVDLP-----FEELDMISLRGDWAREAHRER   | 212 |
| T.re | LVVHMYDNYSSVAADLTYSIFPKYDAIVRSVNTNMKGKNITIEKLASLSVDLP-----YEDFDMLELRGDWAREGKRLR    | 223 |
| A.co | DIELSDGNRTDFKVTLLHYELDTENDMIRRSYTVENGLKGRVNLDLALSAAWHPTALDVEDKRELLTLAGENNEAQQVS    | 190 |
| A.ni | RRVEYGIQGFSGSTGYSSHLHNPFFALVHPSTTESQGEAWGFNLVYTGFSFSAQVEKGSQGLTRALTGFPNDQLSWNLG    | 307 |
| A.ng | SKVOYGVQGFSGSTGYSSHLHNPFLALVDPATTESQGEAWGFNLVYTGFSFSAQVEKGSQGFTRALTGFPNDQLSWNLG    | 304 |
| A.fu | RKVDYGIQGFSGSTGTFSSHLHNPFLALAHRSSTTESHG-EAWGFSLVYTGFSFAANTEKGSQGLTRVSMGFHPNQLSWPLA | 276 |
| P.Fr | KRVTYGTQGFSGSSNGYSSHLHNPFLALADESATESQGEVWGFSLVYTGFSFVEVEKGSQGFTRALTGFPNQLSWTLP     | 290 |
| T.re | RKVDYGSQGFSGSTTGYSHLHNPFFSLITPTTTTESQGEAWGFSLVYTGFSFVEVEKGSQGLTRALTGFPNQLSWPLG     | 301 |
| A.co | TELKFGIAHTIQTTPKGFTHVSYPFALRQVPSEVNPGETEVYFGTLAWGGSWEITAHTNTYGYTRITGCMHHLDFGWTE    | 270 |
| A.ni | PGETLTSPECVSVYSKDGIGGMSRKEHRLYRKHLIRSKFATSD-----RPVLLNSWEGVYFDENQSSITELAEQSAALGLR  | 383 |
| A.ng | PGETLTSPECVAVYSDKGLGSVRKEHRLYRNHLMKSKFATSD-----RPVLLNSWEGVYFDYNQSSITELAEESAALGVH   | 380 |
| A.fu | PGETLTSPECVSVYSKDGIGGMSRSLHRLYRNHLMKSKFAADN-----RPVLLNSWEGVYFDINEENMHRMAQESAALGVK  | 352 |
| P.Fr | PGETLTSPECVSVYSRDLGIGGMSRSLHRLYRNHLIKSKFATSD-----RPTLLNSWEGVYFDYNQSSITELAKGAAEVAK  | 366 |
| T.re | PGETLTSPEAVAVSTTGVGMSRKEHRLYRKHLIRSKFATQM-----HPVLLNSWEGVYFDYNQSSITELHLAQESADLGLK  | 377 |
| A.co | PGESFTTPVFIAGTFTDEGLPCARRRLRPHARKYQQSLQOTQKNDSLYHPVLYNSWEAVTFDVTDFKQVALAEKAAPLGE   | 350 |
| A.ni | LFVMDDGWFGDKYPRTSNAGLGDWTPNPDRFPNGLEPVVEEITNLTVDNTSAEKLRFGIWVEPEMVNPNSLYREHPDW     | 463 |
| A.ng | LFVMDDGWFGDKYPRVSDNAGLGDWMPNPARFPDGLTPVVDITNLTVDNGTESTKLRFGIWVEPEMVNPNSLYHEHPDW    | 460 |
| A.fu | LFVMDDGWFGDKYPRVSDSAGLGDWTPNPTRFPNGIAPLVKAITSLKVAK-SPENLRFGIWVEPEMVNPQSSLYHEHPDW   | 431 |
| P.Fr | LFVMDDGWFGKEYPRTSNAGLGDWTPNPERFPDGLPELVKKITDLKAAN-TSTNMRFGIWVEPEMVNPNSLYNEHPDW     | 445 |
| T.re | LFVMDDGWFGVYKPRVSDNAGLGDWEANPKRFQGLPDFISDVTKLKAN-SSDHLQFGLWFEPEMVNPNSLYMEHPDW      | 456 |
| A.co | LFVMDDGWFGDRN---NDSAGLGDWYFNKEKFPNGIKPLADHVHDL-----GMQFGVWFEPESVNPNSNLYREHPDW      | 419 |
| A.ni | ALHAGAYARTERRNQLVLNLALPEVQEFYIIDFMTDLNLSADISYIKWDNNR-----GIHEAPSPSTDHEYMLGLVYR-VF  | 536 |
| A.ng | ALHAGPYPRTERNQLVLNLALPAVQDFIIDFMTNLLQDTGISYVKWDNNR-----GIHETPSPSTDHGYMLGLYR-VF     | 533 |
| A.fu | VLHAGSYPRTEQRNQLVLNLALPEVQEFYIIDAITNINLSADISYVKWDNNR-----AINETPSPAATHAYMLGLMYR-VF  | 504 |
| P.Fr | ALHAGPYPRTERRSQVLNLALPEVQDFIISVSDILKSADISYVKWDNNR-----GIHETPSPATSHAYMLGLYR-VF      | 518 |
| T.re | ALHAGSYPRTLTRNQLVLNLALPEVQDFIIESLSNINLSASISYVKWDNNR-----GIHEAPYPGLDYAYMLGLYR-VF    | 529 |
| A.co | VLYYDGVPRYEARNQLLLNLGLPEVQDFIYDRVSSIENEDIDYIKWDMNRPYQGVTMHHYDRNPRAEWVLIARGYQNLL    | 499 |
| A.ni | DTLTARFPDVLWEGCASGGGRFDAGVLHYFPQIWTSDNTDGVDRVTIQFGTSLAYPPSAMGAHLSAVPNHOTGRTVPLEF   | 616 |
| A.ng | DTLTTRFPDVLWEGCASGGGRFDAGMLQYVPQIWTSDNTDAIDRITIQFGTSLAYPPSAMGAHLSAVPNHOTGRTVPFTF   | 613 |
| A.fu | DTLTSTRFPDILWEGCASGGGRFDPGLVQYFPQIWTSDNTDAVERIEIQMGTSLVYPASAMGAHLSAVPNHOTGRTVPLEF  | 584 |
| P.Fr | EELTTQFPDVLWEGCASGGGRFDPGLVQYFPQIWTSDNTDAIDRITIQFGTSLAYPPSAMGAHLSAVPNHOTGRTVPVAV   | 598 |
| T.re | DTLTSSKFPNVRWEGCASGGGRFDPGLVQYFPHIWTSDNTDAVERIAIQFGTSLVYPPSAMGAHLSAVPNGQTORTSTAF   | 609 |
| A.co | AKLKKRFPNLIWIESCASGGGRMDLSVLEHADQVWTSNTRPDARLKIQYGASLFLPRAMYGVWTESGD-DNNVHIPLSF    | 578 |
| A.ni | RAHVAMMGGSFGLLEDPATLQDDP--DVPELIQMAEKVNPLVLNGDLYRLRLPEES--QWPAALFVAEDGSQAVLFYFQI   | 692 |
| A.ng | RAHVAMMGGSFGLLEDPATVEGDE--IVPELLALAEKVNPIILNGDLYRLRLPQDS--QWPAALFVSQDGAQAVLFYFQV   | 689 |
| A.fu | RAHVAMMGGSFGLLEDPKMCPEEKAVVPELIALAEKVNPIVLKGMWRLSLPEES--NWPVAVLFVSEDGVKAILFLFQI    | 662 |
| P.Fr | RCHVAMMGGSFGLLEDPAAAMDADDKAAMPGLIALAEKVNPIVLKGMWRNLNLPES--NWPVAVLFIADGQKAVLFVQI    | 676 |
| T.re | RAHVAMMGGSFGEFELTPAEMPEDDKAQIPGIIALAEKVNPIVLKGMWRLSLPEES--NWPAAALFISQDGSQAVLFYFQI  | 687 |
| A.co | RFTTSFMGG-LGIGANLNKYSNDNMKESTAWIALYKKLRPVIQNGDLDWLVPPSKVGEMIAVSQTTSKDQOEAVILAEIRI  | 657 |
| A.ni | SPNVNHAAPFWRLQGLDPEASY-----TVDCDKTYTGATLMNLGLQYT--FDTEYGSKVVFLEEQ--                | 750 |
| A.ng | QPNVNHAAPFWRLQGLDPKADY-----TVDCDQTYSGATLMNLGLQYS--FDTEYGSKVVFLEEQ--                | 747 |
| A.fu | SPNVNHTIPRVRLOGLDRQAMY-----SVDEQGPYSGDMLMNLGLQYS--ESTDYASKVVFLEQVDM                | 723 |
| P.Fr | APNVDSWPRVRLGLDENALY-----KIDGCVVYSGGTLMTNLGLQEP--FKGDYGSQVVMLEKQ--                 | 734 |
| T.re | RANLNNAWPVRLQGLDASAKY-----KIDGNQTFSGATLMNLGLQYQ--FNGDYDSKVVFLEKQ--                 | 746 |
| A.co | SSPFSAPMNPVRPRFLKDDVVYRVQIWLQDPHKVAEYDMSGALLMHKGISLDGLNRAMFTSAVVYVKESED-           | 729 |

图 3-8 真菌 36 家族  $\alpha$ -半乳糖苷酶全长氨基酸序列的一致性比较

Fig 3-8 Sequence homology of  $\alpha$ -galactosidases belonging to family 36 from fungi. The amino acid sequences of *Penicillium* sp. F63 AGL1(P.Fr), *Aspergillus nidulans*  $\alpha$ Gal(A.ni), *Aspergillus niger* AGLC (A.ng), *Aspergillus fumigatus* $\alpha$ Gal (A.fu), *Trichoderma reesei* AGL II (T.re), and *Absidia corymbifera*  $\alpha$ Gal (A.co) were aligned by using the program Clustal X and boxshade. Hyphens indicated gaps and identical amino acid residues are shaded.

## 本章小结

根据测定的内肽序列并结合糖基水解酶 36 家族的真菌  $\alpha$ -半乳糖苷酶的核苷酸的序列, 设计简并引物, 扩增得到该青霉  $\alpha$ -半乳糖苷酶的部分核苷酸序列。利用扩增得到的核苷酸序列设计嵌套反向引物, 通过反向 PCR 技术获得了该  $\alpha$ -半乳糖苷酶的全长基因组序列。提取青霉 F63 的 RNA, 反转录获得其 cDNA 序列, 通过 PCR 获得了该  $\alpha$ -半乳糖苷酶的全长 cDNA 序列。分析其 DNA 序列、cDNA 序列表明,  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因的 ORF 为 2205 bp, 其起始密码子推定为 GTG, 基因内部没有内含子, 共编码 734 个氨基酸, N 端前 21 个氨基酸为信号肽序列, 氨基酸序列中有 7 个潜在的糖基化位点。通过与其他  $\alpha$ -半乳糖苷酶的基因进行比较发现, 该基因的核苷酸序列与烟曲霉  $\alpha$ -半乳糖苷酶的核苷酸序列的一致性最高, 达 66.7%, 与紫青霉和单青霉的  $\alpha$ -半乳糖苷酶的序列一致性分别为 35.5% 和 32.1%。分析该  $\alpha$ -半乳糖苷酶与其他的  $\alpha$ -半乳糖苷酶氨基酸序列的一致性表明, 该  $\alpha$ -半乳糖苷酶的氨基酸序列与黑曲霉 aglC 的氨基酸序列一致性最高, 达到 69.6%, 与紫青霉和单青霉  $\alpha$ -半乳糖苷酶氨基酸序列的一致性分别为 7.5% 和 8.2%。以上结果表明克隆到的  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因为一新基因, 也是首次从青霉中克隆出糖基水解酶 36 家族的  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因。

## 第四章 $\alpha$ -半乳糖苷酶基因的异源表达

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

##### 1.1.1 菌株与质粒

青霉 (*Penicillium* sp. F63), 大肠杆菌(*Escherichia coli*)JM109, 毕赤酵母(*Phichia pastoris*)表达系统均为本实验室保存; pGEM-T 载体购自 Promega 公司。

##### 1.1.2 引物合成

引物由上海英俊生物技术有限责任公司合成。

##### 1.1.3 培养基

LB 培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母膏 5 g/L, 氯化钠 10 g/L, pH 7.0 (固体培养基含 1.5%琼脂)

完全培养基 YPD: 酵母提取物 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 葡萄糖 20 g/L

转化培养基RDB: YNB 13.4 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 生物素  $4 \times 10^{-4}$  g/L, 琼脂粉 20 g/L, 山梨醇 186 g/L

选择培养基MD: YNB 13.4 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 生物素  $4 \times 10^{-4}$  g/L, 琼脂粉 20 g/L

选择培养基MM: YNB 13.4 g/L, 甲醇 5 mL/L, 生物素  $4 \times 10^{-4}$  g/L, 琼脂粉 20 g/L

诱导表达培养基BMGY: 酵母提取物 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 酵母氮源(YNB) 13.4 g/L, 生物素  $4 \times 10^{-4}$  g/L, 甘油 10 mL, pH6.0;

诱导表达培养基BMMY: 酵母提取物 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 酵母氮源(YNB) 13.4 g/L, 生物素  $4 \times 10^{-4}$  g/L, 甲醇 5 mL/L, pH6.0;

发酵培养基 10×Basal Salts: 磷酸 26.7 mL/L,  $\text{CaSO}_4$  0.93 g/L,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  18.2 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  14.9 g/L, KOH 4.13 g/L, 葡萄糖 40 g/L

发酵中所用的微量盐溶液 PTM1: 硫酸铜 6.0 g/L、碘化钠 0.08 g/L、硫酸锰 3.0 g/L、钼酸钠 0.2 g/L、硼酸 0.02 g 氯化钴 0.5 g/L、氯化锌 20 g/L、硫酸亚铁 65 g/L、Biotin 0.25 g/L、硫酸 5 mL/L (上述培养基中除酵母氮源 YNB、甲醇、生物素、氨基酸、PTM1 需过滤除菌, 葡萄糖需在 108 °C 灭菌 30 min 外, 其余均在 121 °C 灭菌 20 min。)

##### 1.1.4 试剂及仪器

蛋白电泳仪, 美国 Biorad 公司; 3 L 发酵罐, 德国 Barun 公司; 限制性内切酶、高保真 Taq DNA 聚合酶、连接酶等购自 TaKaRa 及 Invitrogen 公司; 对硝基苯酚- $\alpha$ -D 半乳糖苷(p-Nitrophenyl-

$\alpha$ -D-galactopyranoside, pNPG)购自 Sigma 公司; 对硝基酚(p-nitrophenol, pNP), 上海生化试剂厂; 低分子量标准蛋白 marker, Pharmacia 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

## 1.2 方法

### 1.2.1. $\alpha$ -半乳糖苷酶的重组菌株的构建

#### 1.2.1.1 PCR 扩增

操作步骤见第三章。

#### 1.2.1.2 双酶切

操作步骤见第三章。

#### 1.2.1.3 DNA 电泳回收

操作步骤见第三章

#### 1.2.1.4 连接

操作步骤见第三章。

#### 1.2.1.5 质粒 DNA 的大量提取

操作步骤见第三章。

### 1.2.2 $\alpha$ -半乳糖苷酶基因信号肽编码序列的去除

为了将  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因在毕赤酵母中表达, 首先去掉其自身的信号肽编码序列, 通过 PCR 方法设计引物将青霉的  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因中的信号肽编码序列(63 bp)去除。

Primer1: (5'-GGCCTACGTAGCGGATGGTACTCTCTTTG-3')作为5'端PCR引物,

*SnaBI*

3'端引物Primer2: (5'-AAGCGGCCGCCTATTGCTTTTCCAACAT-3'),

*NotI*

以cDNA为模板, 进行PCR扩增。

反应体系:

|                         |             |
|-------------------------|-------------|
| 10×PCR buffer           | 5 $\mu$ L   |
| dNTP mix(2.5 mmol/L)    | 4 $\mu$ L   |
| Taq Plus(3 U/ $\mu$ L)  | 0.3 $\mu$ L |
| Primer1(10 $\mu$ mol/L) | 2 $\mu$ L   |

|                                |                    |
|--------------------------------|--------------------|
| Primer2(10 $\mu\text{mol/L}$ ) | 2 $\mu\text{L}$    |
| 模板 DNA                         | 2 $\mu\text{L}$    |
| ddH <sub>2</sub> O             | 34.7 $\mu\text{L}$ |
| 总体积                            | 50 $\mu\text{L}$   |

扩增条件为：94℃ 4 min，94℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃ 2.5 min，共 35 个循环，72℃ 延伸 10 min。纯化 PCR 扩增产物，得到一约 2.2 kb 的无信号肽编码序列的  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因片段，

### 1.2.3 真核重组表达载体的构建

用 *Sna*BI、*Not*I 对毕赤酵母表达载体 pPIC9 进行双酶切处理，将已去除信号肽的 cDNA 片段连于毕赤酵母表达载体 pPIC9 上，构建重组表达质粒 pPIC9-*Agl*I。

### 1.2.4 质粒 DNA 的处理

(1) 因线性化的质粒更容易转化进酵母染色体中，先应对重组体质粒进行单酶切，使之线性化。为了确保转化质粒能被消化完全，先进行预酶切。因 *Agl*I 基因内部有 *Bgl*II 酶切点，故该重组质粒不能用 *Bgl*II 酶切使之线性化。取 3  $\mu\text{L}$  大提质粒 pPIC9-*Agl*I 用酶 *Dra*I 处理 1 h，切出了预期的条带，并且消化比较完全。再分别取 30  $\mu\text{L}$  大提质粒 pPIC9-*Agl*I 用 *Dra*I 酶切 2 h。

酶切体系为：

|       |                    |                   |
|-------|--------------------|-------------------|
| 预酶切：  | 无菌水                | 适量                |
|       | DNA                | 3 $\mu\text{L}$   |
|       | 10 $\times$ buffer | 2 $\mu\text{L}$   |
|       | <i>Dra</i> I       | 10 U              |
|       | 总体积                | 20 $\mu\text{L}$  |
| 大量酶切： | 无菌水                | 适量                |
|       | DNA                | 30 $\mu\text{L}$  |
|       | 10 $\times$ buffer | 40 $\mu\text{L}$  |
|       | <i>Dra</i> I       | 100 U             |
|       | 总体积                | 400 $\mu\text{L}$ |

(2) 将 400  $\mu\text{L}$  酶切产物依次用等体积的酚:氯仿(1:1)、氯仿抽提，再加入 1/10 体积的乙酸钠 (pH 5.2) 及 2-3 倍体积的无水乙醇沉淀，再用 70%乙醇洗一次，真空干燥后溶于 10  $\mu\text{L}$  水中，待用。

### 1.2.5 酵母感受态的制备

- A 将毕赤酵母 GS115 接种到含 5 mL YPD 液体培养基的 100 mL 三角瓶中，28~30℃ 摇床过夜培养。
- B 将过夜培养物按 1/1000~5/1000 的接种量转接到含 500 mL YPD 液体培养基的 1000 mL 三角瓶中培养至  $\text{OD}_{600}=1.3\sim1.5$ 。

- C 于 4℃、5000 rpm 离心 5 min, 收集菌体。
- D 用 500 mL 冰预冷的去离子水轻柔重悬沉淀, 4℃、5000 rpm 离心 5 min, 收集菌体。
- E 用 250 mL 冰预冷的去离子水轻柔重悬沉淀, 4℃、5000 rpm 离心 5 min, 收集菌体。
- F 用 20 mL 冰预冷的 1 mol/L 山梨醇轻柔重悬沉淀, 4℃、5000 rpm 离心 5 min, 收集菌体。
- G 用 1 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇轻柔重悬沉淀, 按每管 80  $\mu$ L 分装成备用的毕赤酵母感受态细胞, 保存于-70℃。

### 1.2.6 酵母细胞的转化

- (1) 将 80  $\mu$ L 已制备好的感受态细胞与 10  $\mu$ L 已制备好的线性化待转化质粒 DNA 混合, 并将其转至 0.2 cm 电转化杯中;
- (2) 将装有混合液的转化杯冰浴 5 min;
- (3) 调整好基因导入仪的参数 (置于毕赤酵母档), 电击一次, 电压 2000 V, 时间一般应约为 5 ms;
- (4) 立即往转化杯中加入 1 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇溶液, 混匀, 并将其转至灭过菌的离心管中;
- (5) 将混合液涂于 RDB 板上, 每个 RDB 板上约涂 200—600  $\mu$ L 的混合液;
- (6) 将 RDB 板置于 30℃培养箱中培养 2—3 d, 直到长出菌落为止。
- (7)

### 1.2.7 转化子的筛选

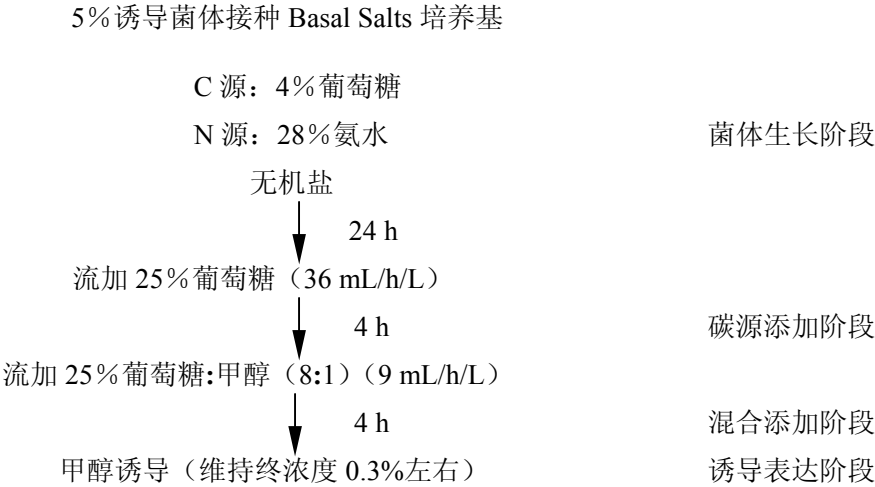
- (1) 用灭过菌的牙签从长有转化子的 RDB 板上挑取单菌落, 按照编号点到 MM 上, 再点到相应编号的 MD 平板上, 每个平板上一般点 100 个单菌落;
- (2) 将点有转化子的 MM、MD 平板置于 30℃培养箱中培养 1—2 天, 至菌落长出。阳性转化子应在 MM 平板上不生长或生长缓慢, 而在 MD 平板上能正常生长。

### 1.2.8 目的基因在毕赤酵母中的表达检测

- (1) 按编号挑取 MD 平板上的单克隆接种于装有 5 mL BMGY 培养基的 20 mL 离心管中, 30℃、250—280 rpm 摇床培养 2—3 天;
- (2) 将摇床培养 2—3 天的培养液 3000 g 离心 15 min, 取沉淀 (尽量将上清除尽), 再往沉淀中加入 4 mL 含有 0.5%甲醇的 BMMY 培养基, 重新在 30℃、250—280 rpm 诱导培养;
- (3) 诱导培养 48 h 后, 每管取出 200  $\mu$ L 菌液, 3000 g 离心 5 min, 取上清, 部分用于酶活性检测, 部分制样准备进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检测, 对上清进行初步酶活性检测, 对那些筛选出有酶活性的, 进行进一步的诱导表达;
- (4) 为补偿甲醇的挥发损失, 在筛选出有酶活性的菌液中加入 100  $\mu$ L 10×甲醇溶液, 使菌液中的甲醇浓度保持在 0.5%, 以后每隔 12 h 取样一次, 并补加甲醇, 直至 96 h, 筛选出几株表达量高的准备上发酵罐, 进行发酵工艺研究。



1.2.9 发酵罐水平重组酵母的高细胞密度发酵



重组酵母的高细胞密度发酵流程

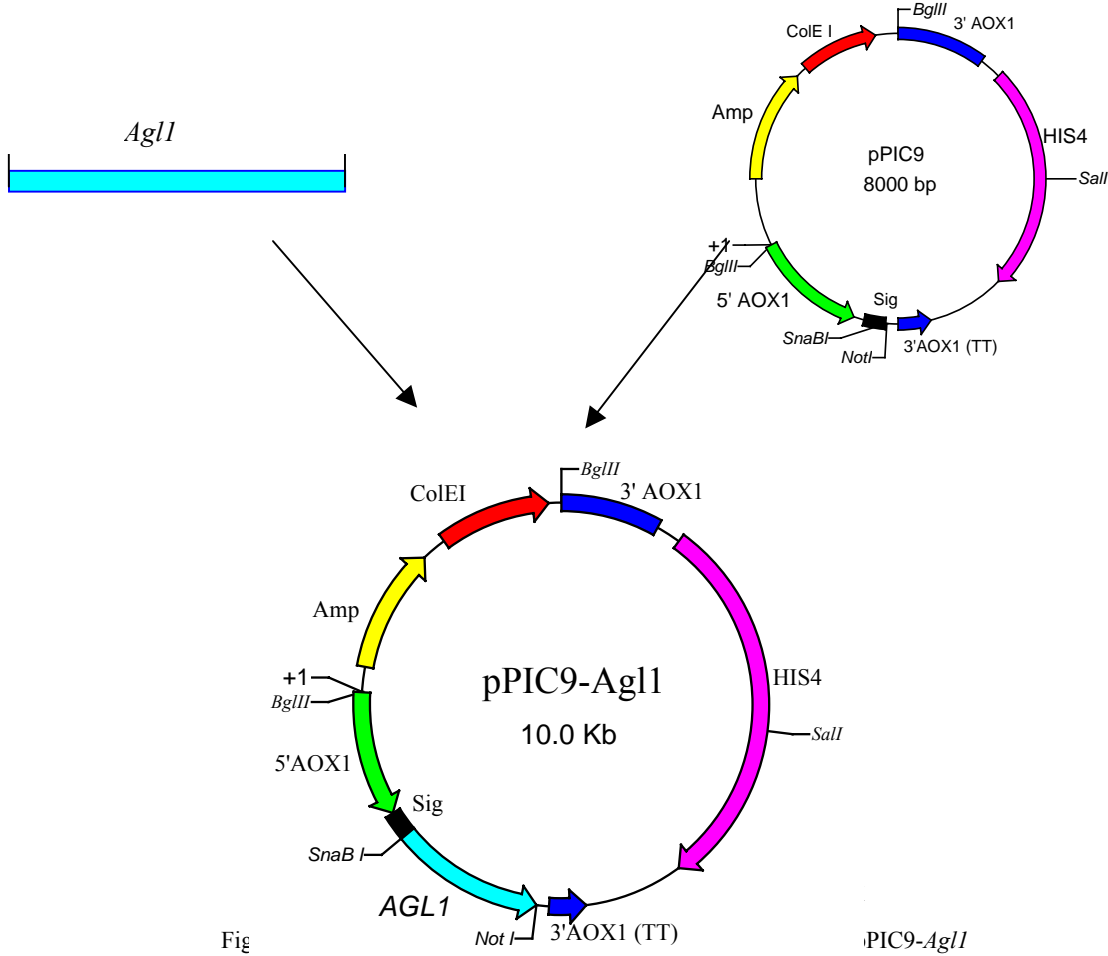
发酵过程分为四个阶段:

- (1) 菌株培养阶段。发酵培养基 10×Basal Salts 接种前首先加入 28%氨水使培养基的 pH 达到 5.0 (氨水同时也作为菌株生长的氮源), 再按每升培养基加 4.37 mL 的量加入 PTM1。5~10% 接种种子液, 通气搅拌培养 18~24 h, 在培养过程中随着菌株的生长, 培养基中的溶氧量由 100% 逐渐降低。当碳源消耗完后溶氧量会再度升高, 当溶氧升高至 80% 以上时, 开始碳源饲喂阶段。
- (2) 碳源添加阶段。流加 25%葡萄糖 (每升中含 12 mL PTM1), 流量为 36 mL/h/L, 培养 4 h。调整通气量使溶氧量始终大于 20%。
- (3) 碳源-甲醇混合添加阶段。流加 25%葡萄糖:甲醇 (8:1) 培养 4 h, 流量为 9 mL/h/L, 控制溶氧量始终大于 20%。
- (4) 诱导表达阶段。加入诱导剂甲醇 (每升中含 12 mL PTM1), 使甲醇终浓度维持在 0.3%, 溶氧量始终大于 20%。在诱导过程中每隔 12 h 取样一次测定表达的  $\alpha$ -半乳糖苷酶的活性, 并同时 进行 SDS-PAGE 监测表达量的累积。SDS-PAGE 电泳参照《分子克隆》。

2 结果

2.1 表达载体的构建和重组质粒的转化

PCR 扩增的  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因用 *Sna*BI 和 *Not*I 双酶切, 同时 pPIC9 也用 *Sna*BI 和 *Not*I 双酶切, 将双酶切的  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因插入到载体 PIC9 启动子的 *AOX1* 下面, 利用酿酒酵母  $\alpha$ -因子信号肽, 使该基因在毕赤酵母中实现胞外异源表达。构建的表达载体见图 4-1。



该重组质粒用 *Dra*I 线性化后利用电击转化法使其整合到毕赤酵母 GS115 的基因组中。

2.2 表达  $\alpha$ -半乳糖苷酶的阳性重组子的筛选

将 RDB 平板上的克隆分别点到 MM、MD 平板上，MM 培养基中加入预先滤灭的 pNPG 使其终浓度为 10 mM。培养 48 h 后，在 MM 平板上， $\alpha$ -半乳糖苷酶的基因被甲醇诱导表达，表达的  $\alpha$ -半乳糖苷酶由于降解培养基中的底物 pNPG 而在其菌落周围呈现黄色(图 4-2)。在 MM 平板上 100 个菌落中有 23 个菌落呈现黄色。重组子的转化率为 23%。

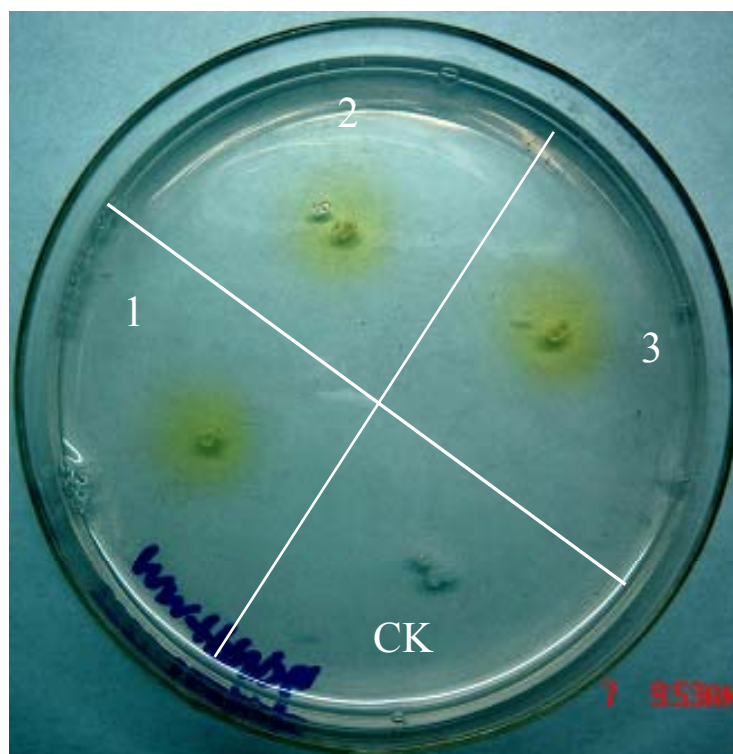


图 4-2 阳性转化子筛选平板

Fig. 4-2. Screening of the positive transformants

a) Recombinant 56#, 2 Recombinant 35#, 3 Recombinant 85#

### 2.3 摇瓶水平 $\alpha$ -半乳糖苷酶的表达

将在 MM 平板中筛选到的阳性菌株，分别接种到 BMGY 和 BMMY 培养基中，在 BMMY 培养基中诱导 24 h 后，分别测定其酶活力。其中，以菌株 GS115/pPIC9-AGL1-56 的酶活力最高，达到 6.03 U/mL。

### 2.4 重组子的 PCR 检测

提取重组子酵母的基因组，以毕赤酵母的基因组 DNA 为模板，以 Primer1 和 Primer2 为引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增的结果表明，重组子的基因组中有 *AgII* 基因的整合（图 4-3）。

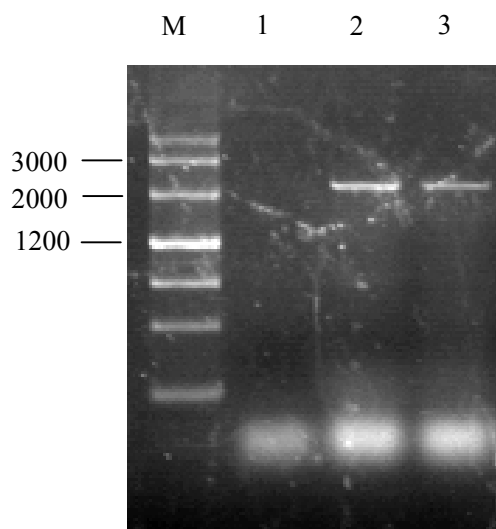


图 4-3  $\alpha$ -半乳糖苷酶阳性重组子的 PCR 筛选

Fig 4-3 PCR screening of the positive transformants of  $\alpha$ -galactosidase

1. DNA Marker 2 Recombinant 56# 3 Recombinant 35#

## 2.5 发酵罐水平 $\alpha$ -半乳糖苷酶的表达

选择 56<sup>#</sup>转化子研究其在 3 L 发酵罐水平  $\alpha$ -半乳糖苷酶的表达。在 3 L 发酵罐中，在甲醇未诱导之前，处于菌株培养和碳源饲喂阶段，在这两个阶段内，菌体大量增长，菌体湿重可达 180 g/L，在发酵液上清中检测不到  $\alpha$ -半乳糖苷酶活性，SDS-PAGE 也表明此时无  $\alpha$ -半乳糖苷酶蛋白的表达 (图 4-5, Lane2)。随着甲醇的诱导，发酵液中的  $\alpha$ -半乳糖苷酶活性逐渐增加，诱导 144 h 后发酵液中  $\alpha$ -半乳糖苷酶活性为 110 U/mL，约为 0.2 mg/mL 发酵液 (图 4-4)；SDS-PAGE 同时表明发酵液中  $\alpha$ -半乳糖苷酶蛋白表达量也在不断积累，诱导 156 h 后  $\alpha$ -半乳糖苷酶的表达量达到 111 U/mL (图 4-4)。

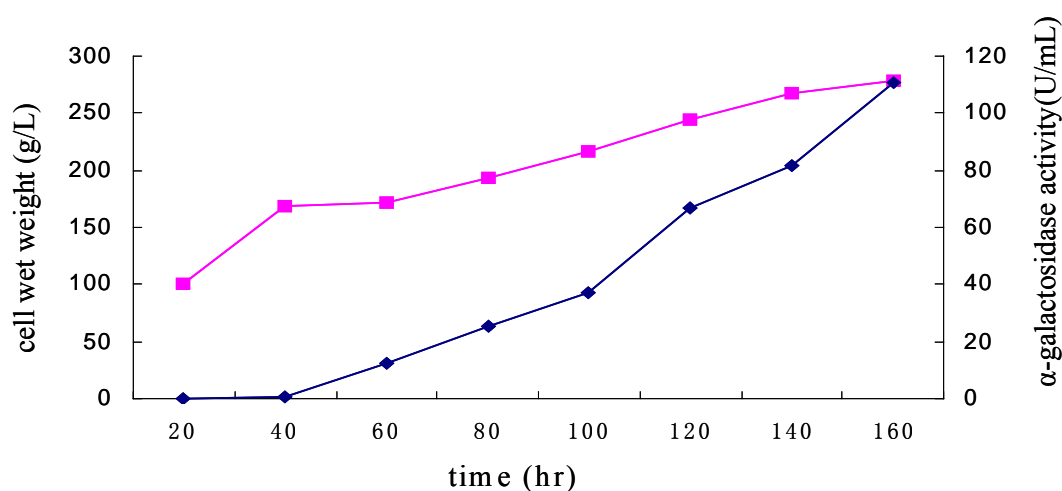


图 4-4 发酵罐水平毕赤酵母菌体湿重与  $\alpha$ -半乳糖苷酶活性随诱导时间的积累

Fig. 4-4 Accumulation of wet weight of *P. pastoris* strains and enzymatic activity as induction time increases in 3 L Fermenter

■—— cell wet weight    ◆——  $\alpha$ -galactosidase activity

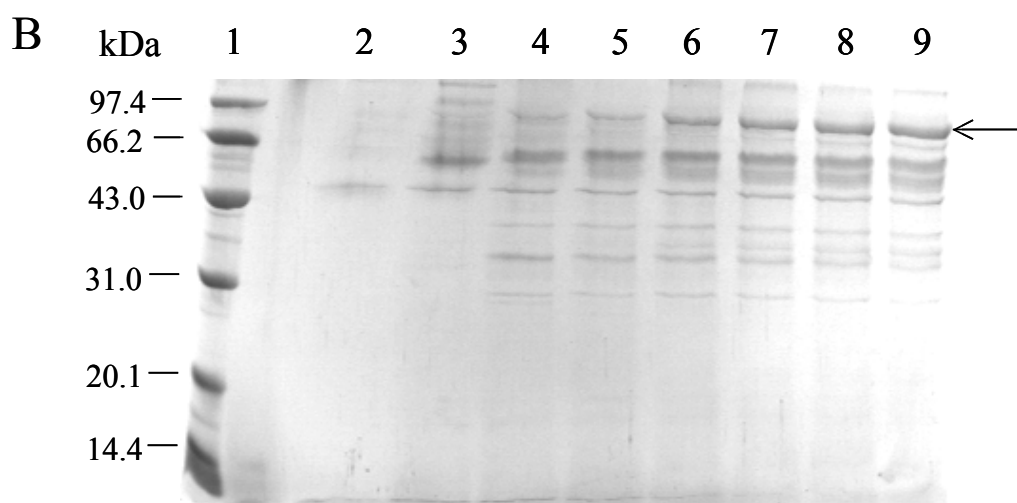


图 4-5 3 L 发酵罐中  $\alpha$ -半乳糖苷酶经甲醇诱导不同时间内的表达量

1. 分子量标准蛋白 marker; 2 甲醇诱导前的发酵液; 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9: 经甲醇诱导 12 h、36 h、60 h、84 h、108 h、132 h、156 h 的发酵液中的  $\alpha$ -半乳糖苷酶蛋白量

Fig. 4-5 SDS-PAGE of the recombinant  $\alpha$ -galactosidase in the 3L fermenter under different induction time

Lane 1, molecular size marker; The expression level of  $\alpha$ -galactosidases after induction by 0 h (lane 2), 12 h (lane 3), 36 h (lane 4), 60 h (lane 5), 84 h (lane 6), 108 h (lane 7), 132 h (lane 8), and 156 h (lane 9).

## 本章小结

将青霉 F63 的  $\alpha$ -半乳糖苷酶成熟蛋白的基因整合到毕赤酵母的基因组中，并成功实现了重组  $\alpha$ -半乳糖苷酶的表达，在 3 L 发酵罐中甲醇诱导表达 7 d 后， $\alpha$ -半乳糖苷酶的酶活力达到 111 U/mL，约为 0.2 mg/mL 发酵液，这比国外报道的最高表达量（63 U/mL）高近 1 倍，是国内报道的最高表达量（36 U/mL）的 3 倍。表达产物的分子量为 82 kDa，与天然酶的分子量相同。

本文虽然成功地构建了  $\alpha$ -半乳糖苷酶的生产工程菌，但其产酶活力与实现工业化生产仍有一定的差距，所以我们仍然需要进一步摸索和优化发酵条件或重新构建高效表达的工程菌株来提高  $\alpha$ -半乳糖苷酶的表达量。本研究为基因工程  $\alpha$ -半乳糖苷酶的大规模生产奠定了基础。

## 第五章 重组与天然 $\alpha$ -半乳糖苷酶的酶学性质比较

### 1 材料和方法

#### 1.1 试验材料

纯化的重组  $\alpha$ -半乳糖苷酶 r-Agl1 和天然  $\alpha$ -半乳糖苷酶 Agl1。

#### 1.2 实验仪器

立式高速冷冻离心机 (Sorvall 公司), 台式高速冷冻离心机 (Eppendorf 公司), 蛋白电泳仪 (Amersham pharmacia biotech 公司), 紫外分光光度计 (Bio-Rad 公司), ÄKTA FPLC 蛋白纯化系统 (Amersham pharmacia biotech 公司), 超滤膜包 (Sartorius 公司)、小型离心机、水浴锅、蠕动泵等均为国产仪器。

#### 1.3 重组 $\alpha$ -半乳糖苷酶的纯化

酶的纯化操作均在 4℃ 下操作。

##### 1.3.1 粗酶液的制备

工程菌在发酵罐中诱导培养 7 d, 6000 rpm 15 min 离心, 所得上清液缓慢加入研磨的固体硫酸铵至 95% 的饱和度, 4℃ 静置过夜。10000 rpm 离心 20 min, 弃上清, 沉淀重悬于 20 mM pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液, 4℃ 透析过夜。将透析液用膜包进行浓缩至 15 mL, 并用更换 20 mM pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液 4-5 次。

##### 1.3.2 HiTrap Q Sepharose XL 层析

取 2.0 mL 浓缩液上预先用缓冲液 A 平衡的 HiTrap Q Sepharose XL 阴离子柱 (预装柱), 然后用相同缓冲液配置的 1 mol/L NaCl 溶液和缓冲液 A 进行梯度洗脱, 流速为 2.0 mL/min, 分部收集, 每管 1 mL。对收集管中的溶液进行酶活和蛋白浓度测定。

##### 1.3.3 Sephacryl S-200 分子筛层析

经离子交换层析后得到的样品浓缩后进行 Sephacryl S-200 分子筛层析 (1.0 cm×120 cm), 用缓冲液 A 洗脱, 流速为 0.5 mL/min, 分部收集, 每管 0.5 mL。对收集管中的溶液进行酶活和蛋

白浓度测定。

## 1.4 蛋白含量的测定

用 Lowry 法测定，以牛血清白蛋白做标准。

考马斯亮蓝 G-250 溶液：称取考马斯亮蓝 G-250 250 mg 溶于 12.5 mL 95%乙醇中，加入 25 mL 磷酸，加水定容至 500 mL，滤纸过滤备用。

牛血清白蛋白(BSA)，Sigma 公司；其他化学试剂均为国产分析纯。

## 1.5 电泳

电泳方法见第二章。

## 1.6 表达产物的脱糖基化

取 9  $\mu$ L 纯化的重组  $\alpha$ -半乳糖苷酶进行脱糖基化处理，建立如下反应体系：9  $\mu$ L 重组  $\alpha$ -半乳糖苷酶加 1  $\mu$ L 10 $\times$ Glycoprotein 变性缓冲液，100 $^{\circ}$ C 反应 10 min 后加 1.2  $\mu$ L 10 $\times$ G5 缓冲液、1  $\mu$ L Endo H 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h。

## 1.7 $\alpha$ -半乳糖酶的酶学性质的研究

天然与重组  $\alpha$ -半乳糖苷酶的酶学性质的测定方法参照第二章。

# 2 结果

## 2.1 重组 $\alpha$ -半乳糖苷酶的纯化

对纯化过程中的离子交换层析、凝胶层析各步分别进行了酶活性测定及蛋白浓度测定，结果见表 5-1。纯化完成后，比活力从粗酶液的 13.26 U/mg 提高到纯酶的 925.1 U/mg，纯化倍数为 69.8 倍，得率 11.4%。SDS-PAGE 结果（图 5-1）表明，纯化后的  $\alpha$ -半乳糖苷酶蛋白仅有一条单一的条带，重组  $\alpha$ -半乳糖苷酶的分子量约为 82 kDa。



表 5-1 重组  $\alpha$ -半乳糖苷酶的纯化结果  
Purification of the recombinant  $\alpha$ -galactosidase

| Step  | Volume<br>(mL) | Total activity<br>(U) | Total protein<br>(mg) | Specific activity<br>(U/mg) | Yield<br>(%) | Purification<br>(fold) |
|---|----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|--------------|------------------------|
| Supernatant   | 200            | 22,210                | 1674                  | 13.26                       | 100          | 1                      |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitation | 20             | 16,684                | 496                   | 33.6                        | 75.1         | 2.5                    |
| HiTrap Q Sepharose XL   | 12             | 4,651                 | 5.242                 | 857.9                       | 20.9         | 64.7                   |
| Sephacryl S-200 HR  | 8              | 2,531                 | 2.736                 | 925.1                       | 11.4         | 69.8                   |

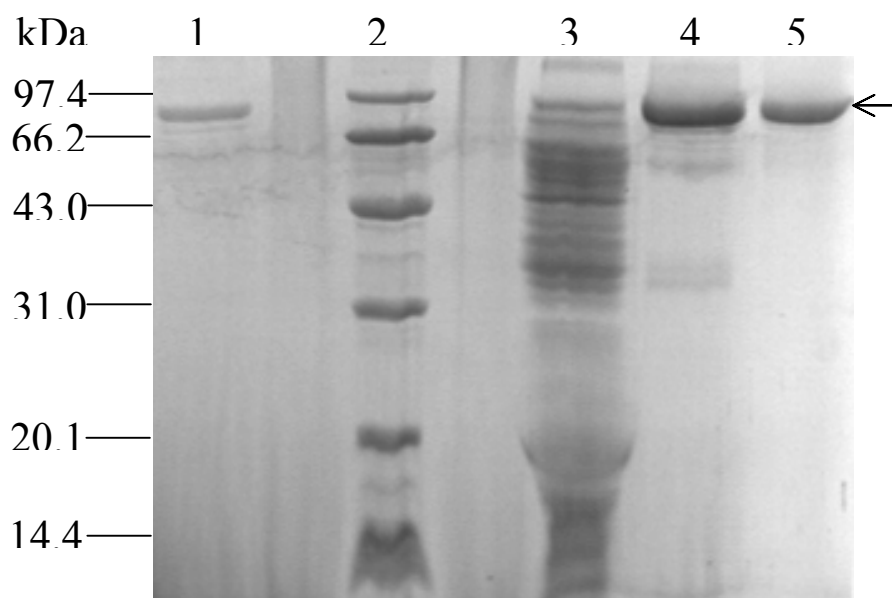
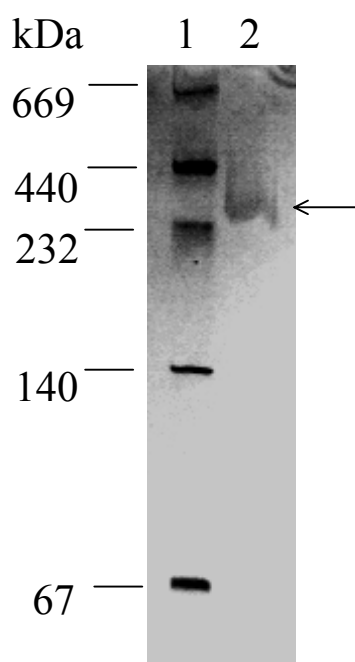


图 5-1 重组  $\alpha$ -半乳糖苷酶的 SDS-PAGE 分析

Fig 5-1 SDS-PAGE profiles of the recombinant  $\alpha$ -galactosidase.

Fig. 5-1. Lane 1, the purified native  $\alpha$ -galactosidase. Lane 2, molecular mass standard. Lane 3, the fermenter culture supernatant. Lane 4, the recombinant  $\alpha$ -galactosidase after the HiTrap Q Sepharose. Lane 5, the purified recombinant  $\alpha$ -galactosidase.

非变性梯度凝胶电泳的结果表明纯化的该重组酶为单一条带，分子量为 330 kDa（图 5-2），说明重组的  $\alpha$ -半乳糖苷酶是有四个相同的亚基组成的四聚体。

图 5-2 重组  $\alpha$ -半乳糖苷酶的非变性梯度凝胶电泳分析Fig 5-2. Native gradient PAGE analysis of the recombinant  $\alpha$ -galactosidase

Lane 1, Molecular mass standards. Lane 2, Purified recombinant enzyme.

该重组的  $\alpha$ -半乳糖苷酶用脱糖基化酶处理后，分子量明显小于未经脱糖基化的重组酶（82 kDa），其分子量为 78 kDa，说明该重组的  $\alpha$ -半乳糖苷酶的糖基化程度不高。

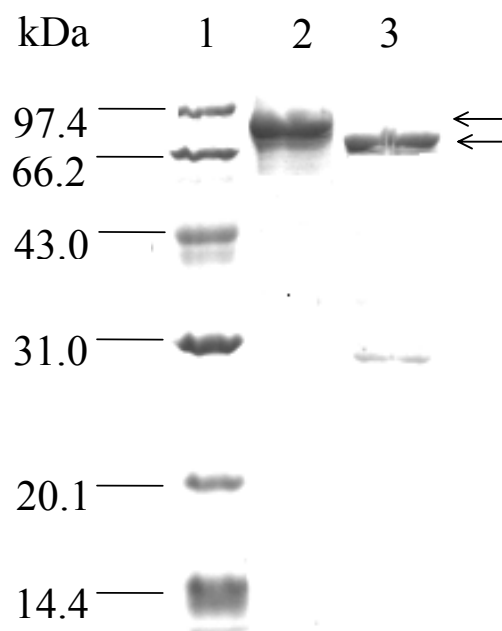
图 5-3 脱糖基化处理的  $\alpha$ -半乳糖苷酶的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5-3 SDS-PAGE of the recombinant  $\alpha$ -galactosidase treated by endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase H. Lane 1, molecular mass standard. Lane 2 the recombinant  $\alpha$ -galactosidase. Lane 3, the N-deglycosylated  $\alpha$ -galactosidase. The arrow indicates the position of the  $\alpha$ -galactosidase.

发酵液上清进行非变性 PAGE，然后进行活性染色，活性染色结果表明，在非变性凝胶上仅有一条单一的条带。因此发酵液上清中只有一种  $\alpha$ -半乳糖苷酶存在。

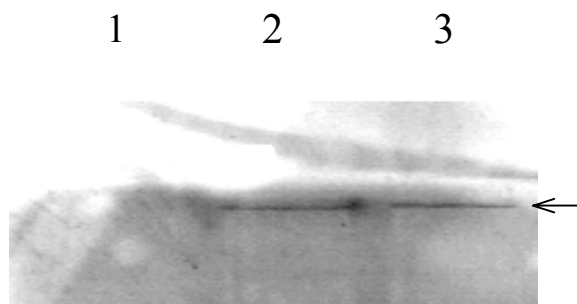


图 5-4 重组  $\alpha$ -半乳糖苷酶的活性染色

Fig. 5-4 Activity staining of recombinant  $\alpha$ -galactosidases

i. Control, 2. Recombinant 56#, 3. Recombinant 35#

## 2.2 天然和重组 $\alpha$ -半乳糖苷酶的酶学性质比较

### 2.2.1 $\alpha$ -半乳糖苷酶的最适作用 pH 和 pH 稳定性

Agl1 和 r-Agl1 在不同的 pH 缓冲体系中，Agl1 的最适 pH 为 5.0，在 pH 4.8-6.0 范围内保持 95% 以上的酶活力。而 r-Agl1 的最适作用 pH 也为 5.0，但在 pH 4.8-6.5 范围内可保持 96% 以上的酶活力，重组酶的最适作用 pH 相对较宽（图 5-5）。Agl1 在 pH 5.0-6.0 之间具有良好的 pH 稳定性，在常温下作用 12 h 仍剩余 90% 以上的酶活力。r-Agl1 在 pH 6.0-6.5 之间 pH 稳定性较高，常温作用 12 h 后，剩余酶活力大于 88%（图 5-6）。

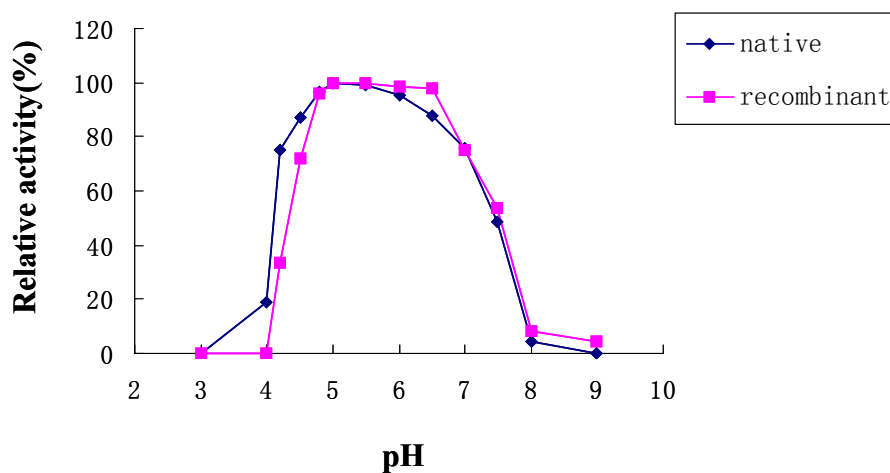


图 5-5 天然酶与重组酶的最适作用 pH

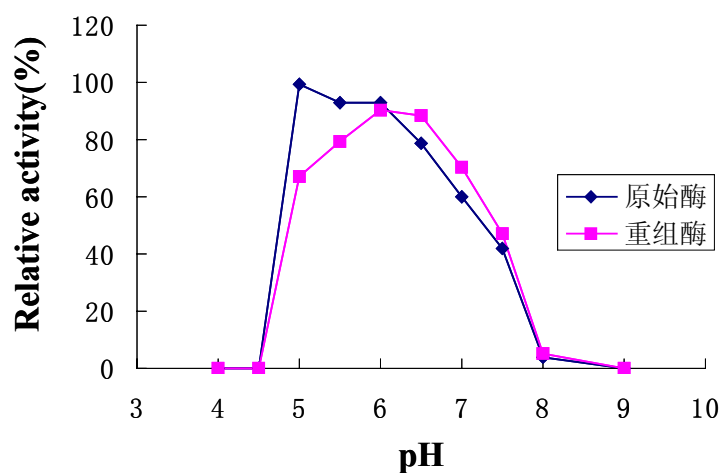
Fig.5-5 Optimum pH of native and recombinant  $\alpha$ -galactosidases

图 5-6 天然酶与重组酶的 pH 稳定性

Fig. 5-6 pH stability of native and recombinant  $\alpha$ -galactosidases

### 2.2.2 $\alpha$ -半乳糖苷酶的最适作用温度和热稳定性

r-Agl1 的最适作用温度为 40℃，低于天然的  $\alpha$ -半乳糖苷酶的最适作用温度 45℃(图 5-7)。重组酶的热稳定性类似于天然酶(图 5-8)，在 40℃作用 60 min，天然酶与重组酶都活有 60%以上的剩余酶活力(图 5-8)，因此这两种酶在 40℃以下时稳定的。天然酶和重组酶在 45℃作用 10 min，在 50℃下作用 5 min，酶活性即完全丧失。天然酶和重组酶对高温都较敏感。

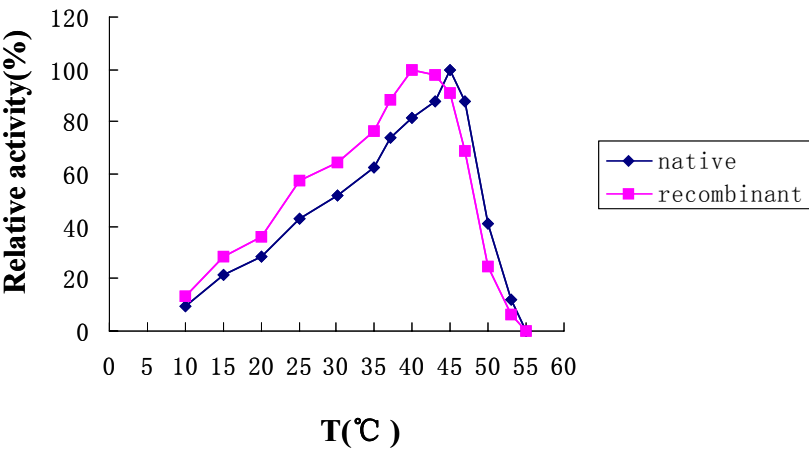


图 5-7 天然酶和重组酶的最适作用温度

Fig. 5-7. Optimal temperature of native and recombinant  $\alpha$ -galactosidases

图 5-8 天然酶与重组酶的热稳定性

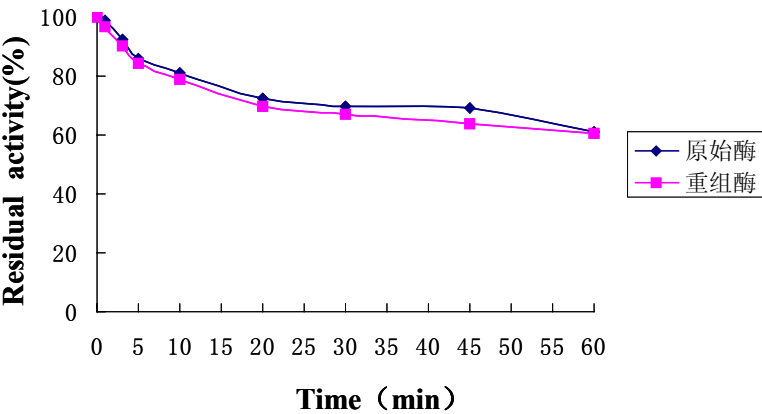


Fig.5-8 Thermostability of native and recombinant  $\alpha$ -galactosidases at 40°C

2. 2. 3 重组  $\alpha$ -半乳糖苷酶的  $K_m$  值和最大反应速度  $V_{max}$

在不同底物浓度的反应体系中 37℃ 反应 5 min，测定  $A_{405}$  以计算酶反应的初速度。以底物浓度的倒数为横坐标，以酶反应初速度的倒数为纵坐标，做 Lineweaver-Burk 双倒数曲线，计算出天然酶的  $K_m$  值为 1.1 mM，最大反应速度  $V_{max}$  为  $1566.1 \mu\text{M}/\text{min}.\text{mg}^{-1}$ 。重组  $\alpha$ -半乳糖苷酶的  $K_m$  值为 1.4 mM，最大反应速度  $V_{max}$  为  $1553.6 \mu\text{M}/\text{min}.\text{mg}^{-1}$ 。

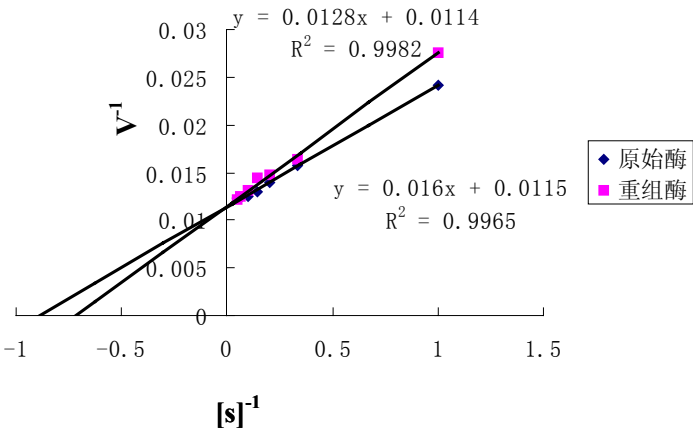


图 5-9 天然酶和重组酶的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线图

Fig.5-9. Lineweaver-Burk plots of the native and recombinant  $\alpha$ -galactosidases

2.2.4 不同化学试剂对天然和重组  $\alpha$ -半乳糖苷酶酶活的影响

在酶促反应体系中加入不同的化学试剂，然后分别测定酶活力。结果表明(表 5-2)，只有 SDS、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 对两种  $\alpha$ -半乳糖苷酶酶活有明显的抑制作用。 $\text{Ag}^{+}$ 和 $\text{Hg}^{2+}$ 完全抑制重组  $\alpha$ -半乳糖苷酶的酶活，而 $\text{Ag}^{+}$ 对天然酶的抑制效应不显著，这表明天然酶和重组酶在其空间结构是有轻微差异的，很可能在它们的活性中心部位结构有所差异。其余化学试剂对重组  $\alpha$ -半乳糖苷酶的酶促反应无显著影响。

表 5-2 各种化学试剂对  $\alpha$ -半乳糖苷酶活力的影响

Table 5-2 Effect of metal ions and some reagents on the recombinant  $\alpha$ -galactosidase

| Metal ions and other chemical reagents | Relative activity (%) |                    |
|--|-----------------------|--------------------|
|  | Native enzyme         | Recombinant enzyme |
| CK                                     | 100                   | 100                |
| $\text{Na}^{+}$                        | 94.9                  | 103.8              |
| $\text{K}^{+}$                         | 103.5                 | 100                |
| $\text{Ca}^{2+}$                       | 93.1                  | 101.8              |
| $\text{Li}^{+}$                        | 98.4                  | 102.2              |
| $\text{Co}^{+}$                        | 94.4                  | 103.5              |
| $\text{Cr}^{3+}$                       | 86.2                  | 94.8               |
| $\text{Ni}^{2+}$                       | 97.9                  | 95.2               |
| $\text{Cu}^{2+}$                       | 19                    | 25.2               |

|                  |      |       |
|------------------|------|-------|
| Mg <sup>2+</sup> | 97.1 | 101.8 |
| Fe <sup>2+</sup> | 66.1 | 92.3  |
| Mn <sup>2+</sup> | 61.3 | 58    |
| Zn <sup>2+</sup> | 92.6 | 96    |
| Ag <sup>+</sup>  | 88.7 | 0     |
| Hg <sup>2+</sup> | 0    | 0     |
| EDTA             | 104  | 93.4  |
| SDS              | 26.5 | 37.3  |

2.2.5 天然和重组 α-半乳糖苷酶的底物特异性

天然和重组 α-半乳糖苷酶的底物特异性见表 5-3。这两种 α-半乳糖苷酶的底物特异性是相似的，都可以降解含 α-半乳糖苷键的寡糖，如蜜二糖、棉子糖、水苏糖，但不能降解含 α-半乳糖苷键的多糖，如角豆胶。重组酶降解蜜二糖、棉子糖和水苏糖的情况见图 5-10、图 5-11 和图 5-12。

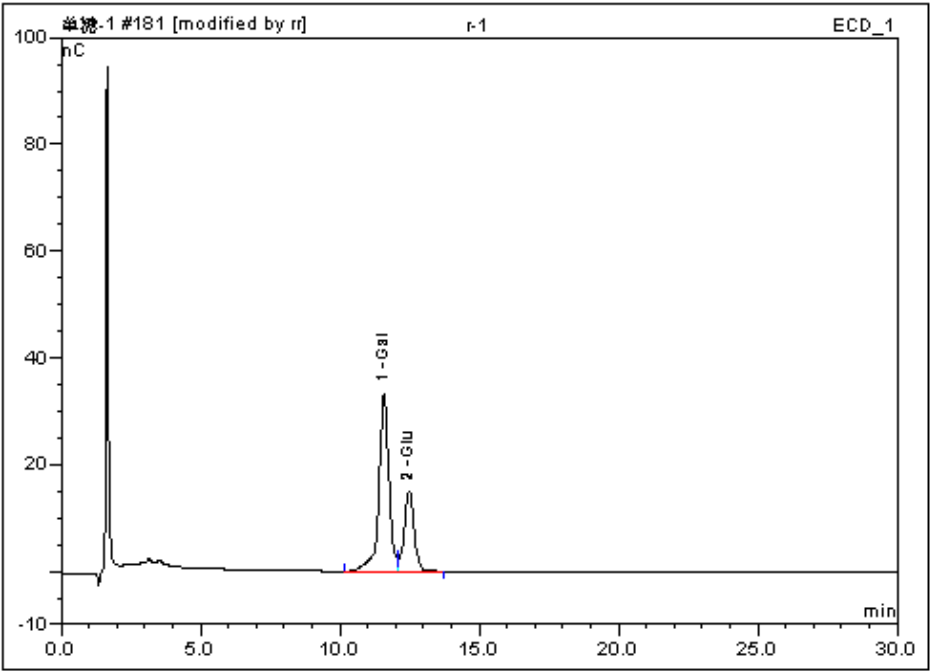


图 5-10 r-Agl1 水解蜜二糖的 HPAEC 分析图  
Fig5-10 HPAEC of the degradation of melibiose by r-Agl1

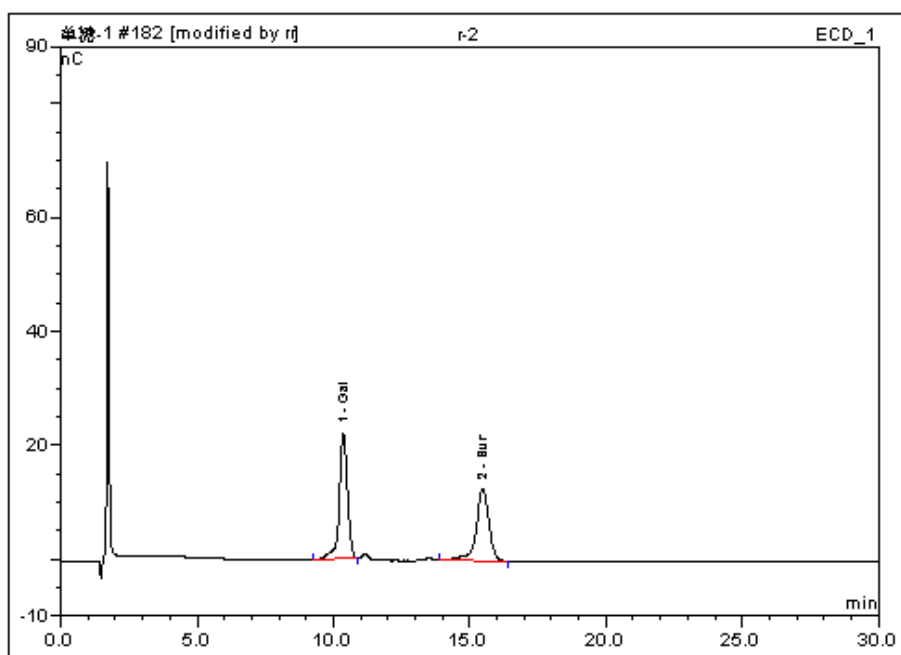


图 5-11 r-Agl1 水解棉子糖的 HPAEC 分析图

Fig5-11 HPAEC of the degradation of raffinose by r-Agl1

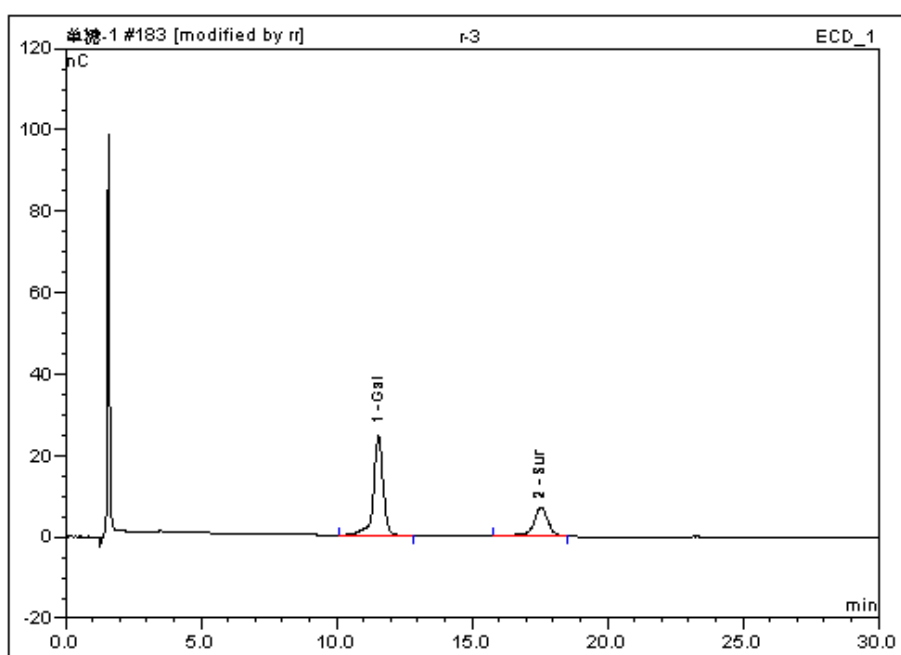


图 5-12 r-Agl1 水解水苏糖的 HPAEC 分析图

Fig5-12 HPAEC of the degradation of stachyose by r-Agl1



表 5-3 天然和重组  $\alpha$ -半乳糖苷酶水解底物后所产生的半乳糖

Table 5-3. The release of galactose from galactose-containing oligosaccharides by Agl1 and r-Agl1

| Substrates | Amount of substrates (mg) | Agl1                                   |                          | r-Agl1                                 |                          |
|------------|---------------------------|--|--------------------------|--|--------------------------|
|            |                           | D-galactose released ( $\mu\text{g}$ ) | D-galactose released (%) | D-galactose released ( $\mu\text{g}$ ) | D-galactose released (%) |
| Melibiose  | 1                         | 424.5                                  | 80.7                     | 427.6                                  | 81.3                     |
| Raffinose  | 1                         | 204.4                                  | 67.5                     | 188.9                                  | 62.4                     |
| Stachyose  | 1                         | 175.2                                  | 64.8                     | 153.6                                  | 56.8                     |
| Guar gum   | 3                         | 0                                      | 0                        | 0                                      | 0                        |

## 2.2.6 重组 $\alpha$ -半乳糖苷酶与天然 $\alpha$ -半乳糖苷酶的酶学性质的比较

下表列出了两种  $\alpha$ -半乳糖苷酶的性质。比较结果发现工程菌株所产的  $\alpha$ -半乳糖苷酶的最适反应温度比天然酶下降了  $5^{\circ}\text{C}$ ，而  $K_m$  略有增加，比活比天然酶提高了近 8 倍。

表 5-4 两种  $\alpha$ -半乳糖苷酶的性质比较Table 5-4 Comparison of some properties between recombinant and native  $\alpha$ -galactosidase

| $\alpha$ -galactosidase                                    | r-Agl1                | Agl1                  |
|--|-----------------------|-----------------------|
| Molecular mass (kDa)                                       | 82                    | 82                    |
| Optimum pH   | 5.0                   | 5.0                   |
| Optimum temperature( $^{\circ}\text{C}$ )                  | 40                    | 45                    |
| pH range for stability                                     | 5.0-6.0               | 6.0-6.5               |
| Temperature range for stability                            | $<40^{\circ}\text{C}$ | $<40^{\circ}\text{C}$ |
| $K_m$ (mM)   | 1.4                   | 1.1                   |
| $V_{\max}$ ( $\mu\text{M}/\text{min}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) | 1553.6                | 1566                  |
| Specific activity (U/mg)                                   | 925.1                 | 106.4                 |

## 本章小结

重组毕赤酵母发酵液上清经硫酸铵沉淀、阴离子柱交换层析和分子筛层析等方法分离纯化到电泳纯的重组的 $\alpha$ -半乳糖苷酶，比活为 925.1 U/mg，大大高于天然酶的比活（106 U/mg）。其分子量为 330 kDa，亚基分子量为 82 kDa，与天然的 $\alpha$ -半乳糖苷酶的分子量相同。比较了重组酶和天然酶的酶学性质，除了最适温度、pH稳定性、比活、 $\text{Ag}^+$ 对酶活性的影响外，其余的酶学性质是相似的。与天然的 $\alpha$ -半乳糖苷酶相比，重组的 $\alpha$ -半乳糖苷酶更有利于作为饲料添加剂。

## 第六章 讨论

据报道,在发酵过程中大豆化合物可以诱导一些丝状真菌  $\alpha$ -半乳糖苷酶的合成,豆类化合物中水苏糖是  $\alpha$ -半乳糖苷酶合成的最佳诱导物 (Cruz 等, 1981, 1982)。因此,在本实验中,采用大豆粕作为诱导物,诱导  $\alpha$ -半乳糖苷酶的合成。

根据  $\alpha$ -半乳糖苷酶的分子量,可以把它们分成两类。一类  $\alpha$ -半乳糖苷酶的分子量大于 80 kDa, 另一类  $\alpha$ -半乳糖苷酶的分子量在 53-67 kDa 之间 (Fridjonsson 等, 1999)。一般情况下,细菌来源的  $\alpha$ -半乳糖苷酶属于第一类,而真菌来源的  $\alpha$ -半乳糖苷酶则属于第二类。本实验中分离纯化的真菌的  $\alpha$ -半乳糖苷酶的分子量大于 80 kDa, 属于第一种细菌类型的  $\alpha$ -半乳糖苷酶。该  $\alpha$ -半乳糖苷酶的电泳谱带有“拖尾”现象,这种现象很可能是由蛋白的糖基化造成的,“拖尾”的长度与该蛋白结合不同大小的碳水化合物有关。

利用肽指纹图谱鉴定纯化的  $\alpha$ -半乳糖苷酶 Ag11, 该蛋白没有匹配上任何已知的  $\alpha$ -半乳糖苷酶,说明该蛋白可能是一个新的  $\alpha$ -半乳糖苷酶。我们又通过质谱测其内肽的 N 段序列,得到的 6 段内肽序列,其中 4 段内肽的序列与黑曲霉、构巢曲霉、木霉和犁头霉有 58-100% 的序列一致性,与已知青霉的  $\alpha$ -半乳糖苷酶序列没有序列一致性。并且没有找到与另外两段内肽序列一致的  $\alpha$ -半乳糖苷酶序列。在测序的六段内肽中恰好有一段序列 LFVLDDGWF 为糖基水解酶 36 家族  $\alpha$ -半乳糖苷酶的保守序列 (motif), 该  $\alpha$ -半乳糖苷酶属于糖基水解酶的 36 家族。目前,从青霉中分离的  $\alpha$ -半乳糖苷酶都属于糖基水解酶的 27 家族 (Luonteri 等, 1998; Shibuya 等, 1995), 这是首次报道从青霉中分离纯化到 36 家族的  $\alpha$ -半乳糖苷酶。以上这些结果表明,纯化的该蛋白是一个新的  $\alpha$ -半乳糖苷酶。

对  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因的克隆,没有采取传统的同源克隆的方法。原因是真核的  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因序列之间一致性较低,找不到较保守的核苷酸序列来设计简并引物。因此我们测定纯化蛋白质的氨基酸序列,利用氨基酸提供的信息克隆该  $\alpha$ -半乳糖苷酶的基因。遗憾的是该  $\alpha$ -半乳糖苷酶的 N 端序列是封闭的,因此我们利用所测内肽的氨基酸序列,设计了简并引物扩增出青霉  $\alpha$ -半乳糖苷酶的一段核苷酸序列,在此基础上,利用反向 PCR 技术,获得了该  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因的基因组序列。同时通过 RT-PCT 方法,利用恰当的引物,扩增出了该  $\alpha$ -半乳糖苷酶的全长 cDNA 序列。

通过分析该  $\alpha$ -半乳糖苷酶的基因组序列与 cDNA 序列,结果表明该  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因没有内含子,并且 GTG 被认为是该基因的起始密码子。在真核生物中,相似的例子在白地霉 (*Candida albicans*) 的核糖体结合蛋白 P2A 和果蝇 (*Drosophila*) 的乙酰转移酶的基因中都有过报道。该基因因为研究真核生物在非 AUG 起始位点起始翻译的机理提供了优良材料,需进一步研究该酶的翻译起始类型,详细阐明青霉  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因的特殊翻译机制。

通过比对不同来源的  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因,Ag11 与糖基水解酶 27 家族的  $\alpha$ -半乳糖苷酶的基因间序列一致性较低,与真菌 36 家族的  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因具有相对较高的序列一致性。Ag11 与烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) 的  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因的序列一致性最高,仅为 66.7%。Ag11 与黑曲霉  $\alpha$ -半乳糖苷酶的氨基酸序列一致性最高,达到 69.6%。与已报道的青霉的  $\alpha$ -半乳糖苷酶的核

苷酸序列与氨基酸的序列一致性都很低,说明克隆到的 $\alpha$ -半乳糖苷酶基因确实为一新基因。

到目前为止,已经有多种表达系统用来异源表达的 $\alpha$ -半乳糖苷酶,如*E. coli*、*S. cerevisiae*、*A. awamori*、*A. oryzae*、*Hansenula polymorpha*、*P. pastoris*及昆虫表达系统(Kondoh等, 2005; Shibuya等, 1999; Murphy等, 2002; Fellingner等, 1991; Chen等, 2000a, 2000b)。本文将青霉的 $\alpha$ -半乳糖苷酶基因克隆到毕赤酵母诱导型表达载体pPIC9中,电击转化毕赤酵母GS115,利用 $\alpha$ -半乳糖苷酶的作用底物pNPG筛选重组菌株。传统的利用摇瓶培养筛选培养基筛选重组子,相对比较耗时耗力,针对性不强。而利用平板原位产筛选 $\alpha$ -半乳糖苷酶的重组菌株是一种快速准确的方法。重组子在其周围产生黄色区域的大小及颜色的深浅可以初步判断 $\alpha$ -半乳糖苷酶表达量的多少。黄色的区域越大,颜色越深,其表达的 $\alpha$ -半乳糖苷酶的量就越高。该方法也可以用于筛选表达文库中 $\alpha$ -半乳糖苷酶重组菌株。

糖基化是毕赤酵母最普通的翻译后修饰。糖基化现象在维持重组蛋白的生物活性、稳定性、细胞识别等方面具有中重要的作用。我们尝试了利用表达载体pET22b+来表达该 $\alpha$ -半乳糖苷酶基因,结果在大肠杆菌的上清液与菌体中都没用检测到酶活,但是通过SDS-PAGE分析,与对照相比,在上清液和细胞内都检测到有82 kDa的条带。其原因可是在大肠杆菌中重组蛋白不能进行适当的糖基化修饰或蛋白质折叠的缘故。

在毕赤酵母中该基因实现了成功的表达,通过SDS-PAGE分析,该 $\alpha$ -半乳糖苷酶的分子量为82 kDa左右,与天然酶的分子量相同。Zhu等也在毕赤酵母中表达了咖啡豆的 $\alpha$ -半乳糖苷酶基因,表达量为12 U/mL。Shibuya等在啤酒酵母中表达了紫青霉的 $\alpha$ -半乳糖苷酶基因,在培养216 h后, $\alpha$ -半乳糖苷酶的表达量为63 U/mL,相当于0.21 g/mL(Shibuya等, 1998)。在该研究中,在3L发酵罐中,甲醇诱导6天后,其 $\alpha$ -半乳糖苷酶的产量为110 U/mL。重组酶的表达量是天然酶(1.84U/mL)的60倍,大约是咖啡豆 $\alpha$ -半乳糖苷酶重组菌株的10倍,是啤酒酵母表达紫青霉 $\alpha$ -半乳糖苷酶的2倍,是高新等构建地咖啡豆地 $\alpha$ -半乳糖苷酶工程菌3倍(高新等, 2003),这是目前表达量最高的重组 $\alpha$ -半乳糖苷酶。

本实验虽然成功的构建了 $\alpha$ -半乳糖苷酶的基因工程菌株,但其表达量与工业化生产的要求仍有一定的差距。我们需要进一步摸索与优化发酵条件和工艺或筛选更高表达水平的 $\alpha$ -半乳糖苷酶的基因工程菌株。选择更有利于 $\alpha$ -半乳糖苷酶表达的温度和pH值。培养温度对异源蛋白的表达量有很大影响(Macauley-Patrick等, 2005),有研究表明低温培养可以增加异源蛋白的表达量。Li等研究表明温度从30℃降低到23℃,鲑鱼防冻蛋白的表达量从5.3 mg/L增加到18.0 mg/L(Li等, 2001)。Hong等通过降低培养温度(从30℃降低到20℃)和减少甲醇的浓度(从1.0%降低到0.5%)而增加了漆酶表达量(Hong等, 2002)。pH也可以影响外源蛋白的表达量。pH6.0是表达老鼠的表皮因子或认的血清白蛋白是最适的,而pH3.0对于表达胰岛素类生长因子-I是最适的(Brierley等, 1994; Clare等, 1991; Kobayashi等, 2000)。因此,通过降低温度,选择合适的pH可能会增加 $\alpha$ -半乳糖苷酶的表达量。基因拷贝数被认为是毕赤酵母中表达外源蛋白质的限速步骤,增加基因的拷贝数对增加外源蛋白的表达量有积极的影响(Clare等, 1991; Romanos等, 1995)。因此增加*AgII*基因的拷贝数也是增加 $\alpha$ -半乳糖苷酶表达的重要措施之一。其他的措施如改变载体中的信号肽;使用其他的表达宿主,如SMD1168或K71;使用强启动子的表达载体等等。

重组的 $\alpha$ -半乳糖苷酶经过(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>沉淀、阴离子交换层析和分子筛层析,比活达到925.1 U/mg,比天然酶的比活提高了近8倍,*K<sub>m</sub>*略有增加说明毕赤酵母表达的重组 $\alpha$ -半乳糖苷酶与青霉表达的

天然 $\alpha$ -半乳糖苷酶在高级结构是不同的或存在不同的其他修饰。经过一步阴离子柱纯化, 重组 $\alpha$ -半乳糖苷酶已经占到总蛋白的 90% 以上, 说明这种纯化方法是高效的。

$\text{Ag}^+$ 抑制 $\alpha$ -半乳糖苷酶的活性是由于 $\text{Ag}^+$ 结合活性中心附近的组氨酸残基或带有羧基的氨基酸残基所造成的(Zapater等, 1990)。与已报道的 $\alpha$ -半乳糖苷酶的活性都受到 $\text{Ag}^+$ 的强烈抑制不同的是(Fridjonsson等, 1999; Zapater等, 1990), 天然的 $\alpha$ -半乳糖苷酶受 $\text{Ag}^+$ 的抑制作用不显著(保持 88.7% 的相对酶活力)。而重组 $\alpha$ -半乳糖苷酶的活性受到 $\text{Ag}^+$ 的完全抑制,  $\text{Ag}^+$ 对这些酶影响的研究结果表明其酶活性中心部位的氨基酸构成可能是不同的(Zapater等, 1990), 这也为进一步研究 $\alpha$ -半乳糖苷酶的结构与功能的关系提供优良的材料。

重组 $\alpha$ -半乳糖苷酶和天然 $\alpha$ -半乳糖苷酶都可以有效的降解棉子糖和水苏糖。重组的 $\alpha$ -半乳糖苷酶的最适反应温度为 40℃, 在 37-40℃ 之间, 其酶活力保持 88% 以上; 最适反应 pH 为酸性, 在 pH4.8-6.5 范围内, 保持 96% 以上的酶活力, 这些性质非常接近动物肠道的生理条件。而天然的 $\alpha$ -半乳糖苷酶最适温度为 45℃, 在 37-40℃ 仅保持 70% 左右的酶活力。因此重组酶的性质在饲料添加剂的应用上更优于天然酶。因此重组 $\alpha$ -半乳糖苷酶可以作为一种消除单胃动物体内 $\alpha$ -半乳糖苷类的寡糖的饲料添加剂。此外, 该 $\alpha$ -半乳糖苷的最适作用 pH 为 5.0, 与豆奶的天然 pH 相同, 所以重组 $\alpha$ -半乳糖苷酶也可以用于豆奶加工, 消除豆奶中的棉子糖类寡糖, 扩大豆奶的可食用人群。

近年来国外对 $\alpha$ -半乳糖苷酶在畜禽饲料中的应用开展了广泛的研究。据报道, 在含大豆粕的鸡、猪日粮中加入 100~150 U/Kg 饲料的 $\alpha$ -半乳糖苷酶, 与果胶酶、蛋白酶结合使用, 可比不加 $\alpha$ -半乳糖苷酶提高日增重 4~6%, 饲料利用率提高 5~7%。经消化试验, 加入 1%  $\alpha$ -半乳糖苷酶可使小肠中的 $\alpha$ -半乳糖苷类物质分解率从 80% 提高到 97%。由于一般畜禽日粮中豆粕的用量不会超过 40%, 因此, 日粮中添加 $\alpha$ -半乳糖苷酶可以提高畜禽的表观代谢能(Veldman等, 1993; 谢启宇等, 2000; Gaizi等, 2003; )。在国内, 浙江省农业科学院利用黑曲霉来源的 $\alpha$ -半乳糖苷酶对猪进行小区试验, 结果证明加酶组猪的日增重和饲料报酬比对照组分别提高 8.04%—9.18% 和 7.40%—8.16%。对于该重组 $\alpha$ -半乳糖苷酶作为动物饲料添加剂的有效性, 需要进行动物的饲喂试验来评价, 该 $\alpha$ -半乳糖苷酶作为饲料添加剂的可行性与使用方法和使用剂量还有待进一步确定。另外, 该重组酶在甜菜制糖业、血型转换等方面的潜在应用也需要进行评价。

许多 $\alpha$ -半乳糖苷酶都具有转糖基活性。在转糖基反应中, 底物的糖基部分被转移到含羟基的其他化合物上。当和高浓度的单糖反应时,  $\alpha$ -半乳糖苷酶也可以合成含 $\alpha$ -半乳糖苷类的寡糖(Dey等, 1972)。该重组和天然的 $\alpha$ -半乳糖苷酶是否具有转糖基活性, 仍需要实验来进一步证明。

该 $\alpha$ -半乳糖苷酶对高温较敏感, 热稳定性较差, 需要对该 $\alpha$ -半乳糖苷酶进行分子改造。通过进一步研究与分析该重组酶的高级结构, 与其他 36 家族热稳定性高或嗜高温的 $\alpha$ -半乳糖苷酶进行一级结构和高级结构的比对, 寻找对热稳定起决定作用的结构域或氨基酸, 利用酶分子定向进化的方法来提高其热稳定性。

## 第七章 结论

1. 利用豆粕作为  $\alpha$ -半乳糖苷酶表达的碳源和诱导物。豆粕在培养基中的含量为 3%， $\alpha$ -半乳糖苷酶在诱导 7 天时表达量最高，酶活达到 1.84U/mL。
2. 通过  $\alpha$ -半乳糖苷酶的同工酶电泳，从青霉 F63 的培养基上清中，发现有两种  $\alpha$ -半乳糖苷酶存在。
3. 利用硫酸铵沉淀、阴离子交换层析、分子筛层析和电泳技术分离纯化到一种  $\alpha$ -半乳糖苷酶 Agl1，该  $\alpha$ -半乳糖苷酶的分子量为 330kDa，亚基分子量为 82kDa，该  $\alpha$ -半乳糖苷酶是由相同亚基组成的四聚体。
4. 将 Agl1 进行 N 端测序，结果表明该  $\alpha$ -半乳糖苷酶 N 端封闭。利用 ESI-MS/MS 技术测定 Agl1 的内肽 N 端氨基酸序列，结果获得了 6 段肽段序列，分别为：LFVLDDGWFK，DNAGLGDWLPNPE，QSEGYTVSEFQYK，VNPLVLTGDMWR，LEGLDENALYK，PEVQDFLLK。其中 4 个肽段与已知的  $\alpha$ -半乳糖苷酶有序列一致性，而另 2 个肽段与已知的  $\alpha$ -半乳糖苷酶无任何序列一致性。6 个肽段与已知青霉的  $\alpha$ -半乳糖苷酶序列没有序列一致性。
5. 设计简并引物，获得了该  $\alpha$ -半乳糖苷酶的一段 800 bp 核苷酸序列，利用反向 PCR 技术和 RT-PCR 获得了该  $\alpha$ -半乳糖苷酶的全长基因组序列和 cDNA 序列，分别测序后证明该  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因是没有内含子的。该基因的 ORF 为 2205bp，该  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因的起始密码子被推定为 GTG，编码 735 个氨基酸，N 端前 21 个氨基酸为推定的信号肽序列。在成熟蛋白的氨基酸序列中，有 7 个潜在的糖基化位点，在该基因中的 G+C 含量为 53.7%。推测该  $\alpha$ -半乳糖苷酶的氨基酸序列，计算出该酶的理论 pI 为 5.07，理论分子量为 78.5。该基因在 GENE BANK 已被注册，登录号为：Accession No. **DQ344486**。
6. 通过与青霉  $\alpha$ -半乳糖苷酶的核苷酸序列和氨基酸序列比较，发现它们的序列一致性较低。该  $\alpha$ -半乳糖苷酶与紫青霉  $\alpha$ -半乳糖苷酶的核苷酸和氨基酸序列的一致性分别为 35.5% 和 7.5%，与单青霉  $\alpha$ -半乳糖苷酶核苷酸和氨基酸序列的一致性分别为 32.1% 和 8.2%。该  $\alpha$ -半乳糖苷酶的核苷酸序列与烟曲霉的序列一致性最高，达 66.7%，其次为黑曲霉，达 65.8%。该  $\alpha$ -半乳糖苷酶的氨基酸序列与黑曲霉的序列一致性最高，达到 69.6%，其次为烟曲霉，达到 69.2%。以上结果说明分离到的  $\alpha$ -半乳糖苷酶是一新酶。
7. 该  $\alpha$ -半乳糖苷酶属于糖基水解酶的第 36 家族，本研究首次从青霉属中克隆到 36 家族的该  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因。
8. 筛选出的表达量最高的重组菌株 56#，在摇瓶水平的表达量为 6.03U/mL；在 3 L 发酵罐水平，甲醇诱导表达 6 天后其表达量为 111U/mL，是目前重组  $\alpha$ -半乳糖苷酶的最高表达水平。
9. 天然酶的最适温度为 45℃，重组酶的最适 pH 为 4.0℃。天然酶与重组酶的最适 pH 都为 5.0。天然酶在 pH 5.0-6.0 之间具有良好的 pH 稳定性，而重组酶在 pH 6.0-6.5 之间具有良好的 pH 稳定性，它们在常温作用 12 h 后，剩余酶活力都大于 88%。重组酶与天然酶都高温都较敏感。天然酶的比活为 106.4 U/mg，重组酶的比活为 925.1 U/mg。原始酶受  $\text{Ag}^+$  的抑制不显著而重组酶受到  $\text{Ag}^+$  的完全抑制。它们其它的酶学性质是相似的。重组酶的最适 pH 和最适温度接近于

单胃动物的肠道生理条件,而且重组酶可以有效地降解蜜二糖、棉子糖和水苏糖,并且重组酶的比活是原始酶的 8 倍,因此该重组的 $\alpha$ -半乳糖苷酶与原始酶相比更有利于作为饲料添加剂。同时该重组酶的最适pH值与豆奶的天然pH值是相同的,故该重组的 $\alpha$ -半乳糖苷酶又可以作为食品添加剂用于豆奶加工。

## 参考文献

1. 蔡文琴,王伯云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术. 成都:四川科学技术出版社,1994:466.
2. 崔蕴霞,明文玉,银巍,任哲,汪健,顾军. 人重组白蛋白基因在巴斯德毕赤酵母中的高效表达. 微生物学报, 2001, 41(2), 244-247.
3. 黄亚东,郑青,姚汝华等. 抗菌肽AD基因的改造及在毕赤酵母中的表达. 华南理工大学学报(自然科学版). 2002, 30(2): 13-16.
4. 蹇文婴,东秀珠. 利用反向 PCR 方法扩增细菌热激蛋白 HSP60 基因. 微生物学报. 2002, 42(1): 56~61.
5. 李晶,赵晓祥,沙长青. 甲醇酵母基因表达系统的研究进展. 生物工程进展. 1999, 19(2): 17-20.
6. 李孝辉,竺莉红,吴吉安等. 青霉  $\alpha$ -半乳糖苷酶的纯化及酶学性质的研究. 浙江农业学报. 2003, 15(2): 99-102.
7. 李英华,白俊杰,李新辉等. 鲤鱼生长激素在毕赤酵母中的表达. 中国生物化学与分子生物学报. 2001, 17: 488-491.
8. 李育阳. 外源基因在酵母中表达产物的分泌. 生物工程学报. 1987, 3(2): 81-85.
9. 刘谨,王汉中. 丝状真菌外源基因表达系统研究的现状及展望. 微生物学通报. 2000, 27(6): 453-457.
10. 刘文,胡巍. 酵母表达基因工程产物特性分析. 生物工程进展. 2001, 21(2): 74-76.
11. 陆文清. 介绍一种新型饲料用酶制剂— $\alpha$ -半乳糖苷酶. 粮食与饲料工业. 2000, 9: 55.
12. 马孟根,王红宁. 巴斯德毕赤酵母表达外源蛋白研究进展. 四川农业大学学报. 2001, 19(3): 277-280.
13. 聂东宋,李敏,徐辉明等. 重组虎纹捕鸟蛛毒素-I 在巴氏毕赤酵母中的表达及纯化. 生物工程学报. 2002, 18(2): 172-177.
14. 欧阳菁,龙紫新,杨林,王珣章. 甲基营养型酵母表达载体系统研究进展. 应用与环境微生物. 2001, 7(5): 502-506.
15. 彭毅,步威,康良仪. 甲醇酵母表达系统. 生物技术通报. 2000, 1: 38-41.
16. 邵铁娟,孙谧,郑家声,王跃军,邱秀宝. Bohaisea-9145 海洋低温碱性脂肪酶研究. 微生物学报. 2004, 44(6): 789-793.
17. 吴劲松,冯万祥.  $\alpha$ -半乳糖苷酶. 生物的化学. 2000, 20(2): 84-86.
18. 肖念清,孙册. 慈菇 (*Sagittaria sagittifolia*)  $\alpha$ -半乳糖苷酶的纯化与性质. 生物化学杂志. 1996, 12(5): 547-552.
19. 谢启宇. 酶制剂对豆粕  $\alpha$ -半乳糖苷的作用. 国外畜牧科技. 2000, 27(3): 29-30.
20. 许英蕾,孙建义,刘明启. 巴斯德毕赤酵母表达系统及其在饲料添加剂开发上的应用前景. 生物技术. 2005, 26(2): 40-42.
21. 姚斌,范云六. 植酸酶的分子生物学与基因工程. 生物工程学报. 2000, 16(1): 1-5.
22. 于平. 巴斯德毕赤酵母表达系统研究进展. 工业微生物. 2005, 35(3): 50-54.
23. 张春义,赵军,武长剑. 利用毕赤酵母表达抗真菌萤素基因. 科学通报. 1998, 43(19): 2085-2089.
24. 张晋辉. 畜禽日粮中  $\alpha$ -半乳糖苷以及相应酶制剂的应用. 中国农业科技导报. 2001, 3(1): 49-54.



25. 张树政主编. 酶制剂工业下册, 科学出版社, 北京, 1984, p781-784.
26. 章如安, 杨晟, 邱荣德, 袁中一. 巴斯德毕赤酵母表达体系研究及进展. 微生物学报. 2000, 27(5): 371-373.
27. Ademark P, Larsson M, Tjerneld F, Stalbrand H. Multiple  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus niger*: Purification, characterization and substrate specificities. Enzyme and Microbial Technology. 2001, 29: 441-448.
28. Ademark P, Vries RP, Hagglund P, Stalbrand H, Visser J. Cloning and characterization of *Aspergillus niger* encoding an  $\alpha$ -galactosidase and a  $\beta$ -mannosidase involved in galactimannan degradation. Eur. J. biochem. 2001, 268: 2982-2990.
29. Aduse-Opku J, Tao L, Ferretti J J, Russell RRB. Biochemical and genetic analysis of *Streptococcus mutans*  $\alpha$ -Galactosidase. Journal of General microbiology. 1991, 137:757-764.
30. Adya S, Elbein AD. Glycoprotein enzymes secreted by *Aspergillus niger*: purification and properties of alpha-galactosidase. J. Bacteriol. 1977, 129(2): 850-856.
31. Akiba T and Horikoshi K. Properties of  $\alpha$ -galactosidases of alkalophilic bacteria. Agr. Biol. Chem. 1976, 40 (9): 1851-1855.
32. Angel CR, Sell JL, Zimmerman DR. Autolysis of  $\alpha$ -Galactosides of defatted soy flakes: Influence on nutritive value for chickens. J. Agric. Food Chem. 1988, 36: 542-546.
33. Archer DB and Peberdy JF. The molecular biology of secreted enzyme production by fungi. Crit. Rev. Biotechnol. 1997, 17: 273-306.
34. Aslanidis C, Schmid K, Schmitt R. Nucleotide sequences and operon structure of plasmid-borne genes mediating uptake and utilization of raffinose in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 1989, 171 (12): 6753-6763.
35. Baik S H, Saito K, Yokota A, Asano K, Tomita F. Molecular Cloning and High-Level Expression in *Escherichia coli* of Fungal  $\alpha$ -Galactosidase from *Abisidia Corymbifera* IFO8084. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2000, 90 (2): 168-173.
36. Barr KA, Hopkins SA, Sreekrishna K. Protocol for efficient secretion of HAS developed from *Pichia pastoris*, Pharm. Eng. 1992, 12: 48-51.
37. Betül SU. Cloning and characterization of industrially important alpha-galactosidase gene from the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. Master Thesis, 2004.
38. Boucher I, Vadeboncoeur C, Moineau S. Characterization of Genes Involved in the Metabolism of  $\alpha$ -Galactosides by *Lactococcus raffinolactis*. Applied and Environmental Microbiology. 2003, 69: 4049-4056.
39. Bourgerie SJ, Michán CM, Thomas MS, Busby SJW, Hyde EI. DNA binding and DNA bending by the MelR transcription activator protein from *Escherichia coli*. Nucleic Acids Research. 1997, 25(9): 1685-1693.
40. Brierley RA, Davis RG, Holtz CG. Production of insulin-like growth factor-I in methylotrophic yeast cells. US Patent. 1994, No.5, 324, 639.
41. Brouns SJJ, Smits N, Wu H, Snijders APL, Wright PC, de Vos WM, van der Oost J. Identification of a novel  $\alpha$ -galactosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. Journal of Bacteriology. 2006, 188(7): 2392-2399.
42. Carmi N, Zhang G, Petreikov M, Gao Z, Eyal Y, Granot D, Schaffer AA. Cloning and functional expression of alkline  $\alpha$ -galactosidase from melon fruit: similarity to plant SIP proteins uncovers a novel family of plant glycosyl hydrolases. The Plant Journal. 2003, 33: 97-106.

43. Cereghino GP, Cregg JM. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1999, 10(5), 422-427.
44. Chen C-C, Wu P-H, Huang C-T, Cheng K-J. A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of an *Escherichia coli* phytase. *Enz. Microb. Technol.* 2004, 35(4): 315-320.
45. Chen CM, Cheng WT, Chang YC, Chang TJ, Chen HL. Growth enhancement of fowlss by dietary administration of recombinant yeast cultures containing enriched growth hormone. *Life Sciences.* 2000, 67: 2103-2115.
46. Chen Y, Jin M, Egborge T, Coppola G, Andre J and Calhoun DH. Expression and characterization of glycosylated and catalytically active recombinant human  $\alpha$ -galactosidase A produced in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification.* 2000a, 20: 472-484.
47. Chen Y, Jin M, Goodrich L, Smith G, Coppola G, Calhoun DH. Purification and characterization of human alpha-galactosidase A expressed in insect cells using a baculovirus vector. *Protein Expr. Purif.* 2000b, 20 (2): 228-236.
48. Civas A, Eberhard R, Dizet PLE, Petek F. Glycosidases induced *Aspergillus tamarii*. Mycelial  $\alpha$ -D-Galactosidase. *Biochem. J.* 1984, 219: 849-855.
49. Clare JJ, Rayment FB, Ballantyne SP, Sreerkrishna K, Romanos MA. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *BioTechnology.* 1991, 9: 455-460.
50. Clare JJ, Romanos MA, Rayment FB, Rowedder JE, Smith MA, Payne MM, Sreekrishna K, Henwood CA. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene.* 1991, 105(2): 205-212.
51. Clarke JH, Davidson K, Rixon JE, Halstead JR, Fransen MP, Gilbert HJ, and hazlewood GP. A comparison of enzyme-aided bleaching of softwood paper pulp using xylanase, mannanase and  $\alpha$ -galactosidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000, 53: 661-667.
52. Clarke JT, Iwanochko RM. Enzyme replacement therapy of Fabry disease. *Mol. Neurobiol.* 2005, 32(1): 43-50.
53. Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, Thill GP, Stillman CA. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology.* 1989, 9(3): 1316-1323
54. Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N Y).* 1993, 11(8): 905-910.
55. Cregg JM., Barringer KJ, Hessler AY, Madden KR. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Molecular and Cellular Biology.* 1985, 5(12): 3376-3385.
56. Cruz R and Park YK. Production of fungal  $\alpha$ -Galactosidase and its application to the hydrolysis of galactooligosaccharides in soybean milk. *Journal of food science.* 1982, 47: 1973-1975.
57. Cruz R, Batistela JC, Wosiacki G. Microbial  $\alpha$ -Galactosidase for soybean processing. *Journal of Food Science.* 1981, 46: 1196-1200.
58. De Vries RP, Van Den Brock HC, Dekkers E, Manzanares P, De Graaff LH, Visser J. Differential Expression of The  $\alpha$  -Galactosidase Genes and a Single  $\beta$  -Galactosidase Gene from *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology.* 1999, 65(6): 2453-2460.
59. Den Herder I F, Rosell A M M, Van Zuilen C M, Punt P J & Van den Hondel C A. Cloning and expression of a

- member of *Aspergillus niger* gene family encoding  $\alpha$ -galactosidase. Mol.Gen.Genet. 1992, 233: 404-410.
60. Despreaux CW, Manning RF. The *dacA* gene of *Bacillus stearothermophilus* coding for D-alanine carboxypeptidase: cloning, structure and expression in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. Gene. 1993, 131(1): 35-41.
61. Dey PM, Patel S, Brownleader MD. Induction of  $\alpha$ -galactosidase in *Penicillium ochrochloron* by guar (Cyamopsis tetragonoloba) gum. Biotechnol. Appl. Biochem. 1993, 17: 361-371.
62. Dey, PM and Pridham, JB. Biochemistry of  $\alpha$ -galactosidases. Adv. Enzymol. 1972, 36: 91-130.
63. Dijk V, Faber KN, Kiel JA. The methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*: a versatile cell factory. Enzyme Microb. Technol. 2000, 26: 793-800
64. Elshafei AM, Foda MS, Abdel-Mobde E, Ali NH. Optimization of alpha-galactosidase production in *Streptomyces erythrus*. Acta Microbiol. Pol. 2001: 50(1): 53-63.
65. Faber KH, Harder WAG, Veenhuis M. Methylotrophic yeasts as factories for the production of foreign proteins. Yeast. 1995, 11(4): 1331-1344.
66. Fellingner AJ, Verbaker JMA, Veale RA, Sudbery PE, Bom IJ, Overbeke N, Verrips CT. Expression of the  $\alpha$ -Galactosidase from *Cyamopsis tetragonoloba* (guar) by *Hansenula polymorpha*. Yeast. 1991, 7: 463-474.
67. Frank D, Majak, Stephan T. Use of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter for production of functional mammalian membrane transport proteins in the yeast *Pichia pastoris*. Biochem. Bio-phys. Res. Commun. 1998, 250: 531-536.
68. Fridjonsson O, Watzlawick H, Gehweiler A, Rohrhirsch T, Mattes R. Cloning of the Gene Encoding a Novel Thermostable  $\alpha$ -Galactosidase from *Thermus brockianus* ITI360. Appl. Environ. Microbiol. 1999, 65: 3955-3963.
69. Fujimoto Z, Kaneko S, Momma M, Kobayashi H, Mizuno H. Crystal Structure of Rice  $\alpha$ -Galactosidase Complexed with D-Galactose. The Journal of Biological Chemistry. 2003, 278 (22): 20313-20318.
70. Fujimoto Z, Kim W-D, Kaneko S, Park G-G, Momma M, Kobayashi H, Mizuno H. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of  $\alpha$ -Galactosidase I from *Motierella vinacea*. Acta Cryst. 2003, 59: 2289-2291.
71. Ganter C, Böck A, Buckel P, Mattes R. Production of thermostable recombinant alpha-galactosidase suitable for raffinose elimination from sugar beet syrup. Journal of Biotechnology. 1988, 8(4): 301-310.
72. Gao Z and Schaffer AA. A novel alkline  $\alpha$  -galactosidase from melon fruit with a substrate preference for raffinose. Plant Physiology. 1999, 119: 979-987.
73. Garro M.S., de Valdez G.F., Oliver G, de Giori G.S. Purification of  $\alpha$ -galactosidase from *Lactobacillus fermentum* . Journal of biotechnology. 1996, 45(7): 103-109.
74. Gellissen G, Weydemann U, Strasser AW, Piontek M, Janowicz ZA, Hollenberg CP. Progress in developing methylotrophic yeasts as expression systems. Trends Biotechnol. 1992, 10(12): 413-417.
75. Gemmill TR, Trimble RB. Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. Biochem. Biophys. Acta. 1999, 1426 (2): 227-237.
76. Ghazi S, Rooke JA and Galbraith H. Improvement of the nutritive value of soybean meal by protease and  $\alpha$ -galactosidase treatment in broiler cockerels and broiler chicks. British Poultry Science. 2003, 44 (3): 410-418.
77. Golubev AM and Neustroev KN. Crystallization of  $\alpha$  -galactosidase from *Trichoderma reesei*. J. Mol. Biol. 1993, 231: 933-934.
78. Golubev AM, Nagem RAP, Brandao Neto JR, Neustroev KN, Enryskaya EV, Kulminskaya AA, Shablin KA,

- Savel'ev AN, Polikarpov I. May Crystal structure of alpha-galactosidase from *Trichoderma reesei* and its complex with galactose: implications for catalytic mechanism. *J. Mol. Biol.* 2004, 339(2): 413-422.
79. Gouka RJ, Punt PJ, van den Hondel CA. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1997, 47(1): 1-11.
80. Graham KK, Kerley MS, Firman JD, Allee GL. The effect of enzyme treatment of soybean meal on oligosaccharide disappearance and chick growth performance. *Poultry Science.* 2002, 81: 1014-1019.
81. Halstead JR, Fransen MP, Eberhart R Y, Park AJ, Gilbert HJ Hazlewood GP.  $\alpha$ -galactosidase A from *Pseudomonas fluorescens* subsp. Cellulosa: cloning, high-level expression and its role in galactomannan hydrolysis. *FEMS Microbiology Letters.* 2000, 192: 197-203.
82. Hart DO, He S, Chany CJ, Withers SG, Sims PFG, Sinnott ML, Brumer H. Identification of Asp-130 as the catalytic Nucleophile in the Main  $\alpha$ -Galactosidase from *Phanerochaete chrysosporium*, a Family 27 Glycosyl hydrolase. *Biochemistry.* 2000, 39: 9826-9836.
83. Henrissat B, and Romeu A. Families, superfamilies, and subfamilies of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 1995, 311: 351-352.
84. Henrissat, B. and Romeu A. Classification of glycosyl hydrolases based on amino acid based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 1991, 280: 309-316.
85. Hong F, Meinander NQ, Jonsson LJ. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.* 2002, 79(4): 438-449.
86. Igbanan FA, Guenter W, Slominski BA. The effect of pectinase and  $\alpha$ -Galactosidase supplementation on the nutritive value of peas for broiler chickens. *Can. J. Anim. Sci.* 1997, 77: 537-539.
87. Irish GG and Balnave D. Non-starch polysaccharides and broiler performance on diets containing soybean meal as the sole protein concentrate. *Aust. J. Agric. Res.* 1993, 44: 1483-1499.
88. Jindou S, Karita S, Fujino E, Fujino T, Hayashi H, Kimura T, Sakka K, Ohmiya K.  $\alpha$ -Galactosidase Aga27A, an Enzymatic Component of the *Clostridium josui* Cellulosome. *J. Bacteriol.* 2002, 184 (2): 600-604.
89. Johnston M. A Model Fungal Gene Regulatory Mechanism: the GAL Genes of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Microbiological Review.* 1987, 51(4): 458-476.
90. Juge N, Andersen JS, Tull D, Roepstorff P, Svensson B. Overexpression, purification, and characterization of recombinant  $\alpha$ -amylases 1 and 2 secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification.* 1996, 8: 204-214.
91. Kachurin AM, Golubev AM, Geisow MM, Veselkina OS, Isaeva-Ivanova LS, Neustroev KN. Role of methionine in the active site of  $\alpha$ -Galactosidase from *Trichoderma reesei*. *Biochem. J.* 1995, 308: 955-964.
92. Kim W-D, Kaneko S, Park G-G, Tanaka H, Kusakabe I & Kobayashi H. Purification and characterization of  $\alpha$ -galactosidase from sunflower seeds. *Biotechnology Letters.* 2003, 25: 353-358.
93. Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T, Ohda T, Ohyama M, Tomomitsu K. Addition of oleic acid increases expression of recombinant human serum albumin by the AOX2 promoter in *Pichia pastoris*. *J. Biosci. Bioeng.* 2000, 89 (5): 479-484.
94. Kondoh K, Morisaki K, Kim W-D, Park G-G, Kaneko S, Kobayashi H. Cloning and expression of the gene encoding *Streptomyces coelicolor* A3(2)  $\alpha$ -galactosidase belonging to family 36. *Biotechnology Letters.* 2005, 27:

- 641-647.
95. Koseki T, Miwa Y, Akao T, Akita O, Hashizume. An *Aspergillus oryzae* acetyl xylan esterase: Molecular cloning and characteristics of recombinant enzyme in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*. 2006, 121: 381-389.
  96. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 2004, 5:150-163.
  97. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970, 227: 680-685.
  98. Laroche Y, Storme V, De Meutter J, Messens J, Lauwereys M. High-level secretion and very efficient isotopic labeling of tick anticoagulant peptide (TAP) expressed in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N Y)*. 1994, 12(11): 1119-1124.
  99. Lee RH, Lin MC and Chen SCG. A novel alkaline  $\alpha$ -galactosidase gene is involved in rice leaf senescence. *Plant Molecular Biology*. 2004, 55: 281-295.
  100. Lenny LL, Hurst R, Goldstein J, Galbraith RA. Transfusions to group O subjects of 2 units of red cells enzymatically converted from group B to group O. *Transfusion*. 1994, 34: 209-214.
  101. Li Z, Xiong F, Lin Q, d'Anjou M, Daugulis AJ, Yang DS, Hew CL. Low temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. *Prot. Exp. Pur.* 2001, 21 (3): 438-445.
  102. Liljeström PL, Liljeström P. Nucleotide sequence of the melA gene, coding for  $\alpha$ -galactosidase in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15 (5): 2213-2220.
  103. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193: 265-275.
  104. Luonteri E, Alatalo E, Siika-aho M, Penttilä M & Tenkanen M.  $\alpha$ -Galactosidase of *Penicillium simplicissimum*: production, purification and characterization of the gene encoding AGL1. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1998, 28: 179-188.
  105. Luonteri E, Tenkanen M, Viikari L. Substrate specificities of *Penicillium simplicissimum*  $\alpha$ -galactosidase. *Enzyme Microb. Technol.* 1998, 22: 192-198.
  106. Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*. 2005, 22: 249-270.
  107. Manzanares P, de Graaff LH, Visser J. Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger*: purification of a novel  $\alpha$ -galactosidase activity. *Enzyme Microb. Technol.* 1998, 22 (5): 383-90.
  108. Maranville E and Zhu A. Assessment of amino-acid substitutions at tryptophan 16 in  $\alpha$ -Galactosidase. *Eur. J. Biochem.* 2000b, 267: 1495-1501.
  109. Maranville E and Zhu A. The carboxyl terminus of coffee bean  $\alpha$ -Galactosidase is critical for enzyme activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2000a, 373 (1): 225-230.
  110. Margolles-Clark E, Tenkanen M, Luonteri E, Penttilä M. Three  $\alpha$ -galactosidase genes of *Trichoderma reesei* cloned by expression in yeast. *Eur. J. biochem.* 1996, 240: 104-111.
  111. Mathew CD and Balasubramaniam K. Mechanism of action of  $\alpha$ -galactosidase. *Phytochemistry*. 1987, 26(5): 1299-1300.
  112. Mayer A F, Hellmuth K, Schlieker H. An expression system marutes: a highly efficient and cost-effective process

- for phytase production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha* process in developing methylotrophic yeasts as expression systems. *Biotechnol. Bioeng.* 1999, 63 (3): 373-381.
113. McGrew JT, Leiske D, Dell B, Klinke R, Krasts D, Wee SF, Abbott N, Armitage R, Harrington K. Expression of trimeric CD40 ligand in *Pichia pastoris*: use of a rapid method to detect high-level expressing transformants. *Gene.* 1997, 187(2): 193-200.
114. Mei M, Whittaker, James W, Expression of recombinant galactose oxidase by *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification.* 2000, 20: 105-111.
115. Minetoki T, Kumagai C, Gomi K, Kitamoto K, Takahashi K. Improvement of promoter activity by the introduction of multiple copies of the conserved region III sequence, involved in the efficient expression of *Aspergillus oryzae* amylase-encoding genes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1998, 50 (4): 459-467.
116. Montesino R, Garcia R, Quintero O, Cremata JA. Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *protein Exp. Purif.* 1998, 14 (2): 197-207.
117. Murphy RA and Power RFG. Expression of an  $\alpha$ -galactosidase from *Saccharomyces cerevisiae* in *Aspergillus awamori* and *Aspergillus oryzae*. *Journal of Industrial Microbiology & biotechnology.* 2002, 28: 97-102.
118. Naumoff DG. GH97 is a new family of glycoside hydrolases, which is related to the  $\alpha$ -galactosidase superfamily. *BMC Genomics.* 2005, 6:112-123.
119. Naumova ES, Turakainen H, Naumov GI, Korhola M. Superfamily of  $\alpha$ -Galactosidase MEL gene of the *Saccharomyces stricto* species complex. *Mol. Gen. Genet.* 1996, 253: 111-117.
120. O'Callaghan J, O'Brien MM, McClean K, Dobson ADW. Optimisation of the expression of a *Trametes versicolor* laccase gene in *Pichia pastoris*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2002, 29: 55-59.
121. Paifer E, Margolles E, Cremata J, Montesino R, Herrera L, Delgado JM. Efficient expression and secretion of recombinant alpha amylase in *Pichia pastoris* using two different signal sequences. *Yeast.* 1994, 10(11): 1415-1419.
122. Prashanth S J and Mulimani V H. Soymilk oligosaccharide hydrolysis by *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -galactosidase immobilized in calcium alginate. *Process Biochemistry.* 2005, 40: 1199-1205.
123. Puchal F. Role of feed enzyme in poultry nutrition examined. *Feedstuffs.* 1999, 11:12-14.
124. Rabodonirina M, Cotte L, Boibieux A, Kaiser K, Mayencon M, Raffenot D, Trepo C, Peyramond D, Picot S. Detection of pneumocystis carinii DNA in blood specimens from human immunodeficiency virus-infected patients by nested PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37(1):127~130.
125. Resina D, Serrano A, Valero F, Ferrer P. Expression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* under control of the nitrogen source-regulated formaldehyde dehydrogenase promoter. *J. Biotechnol.* 2004, 109: 103-113.
126. Richard G, Buckholz, Bruce G, Adams. Induction and Genetics of Two  $\alpha$ -Galactosidase Activities in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 1981, 182: 77-81.
127. Rios S, Pedregosa AM, Fernandez Monistrol I, Laborda F. Purification and molecular properties of an alpha-galactosidase synthesized and secreted by *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1993, 112(1): 35-41.
128. Romanos M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1995, 6: 527-533.
129. Romanos MA, Clare JJ, Beesley KM, Rayment FB, Ballantine SP, Makoff AJ, Dougan G, Fairweather NF, Charles IG. Recombinant Bordetella pertussis pertactin (P69) from the yeast *Pichia pastoris*: high-level production and

- immunological properties. *Vaccine*. 1991, 9 (12): 901-906.
130. Scorer CA, Buckholz RG, Clare JJ, Romanos MA. The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*. 1993, 136(1-2): 111-119.
131. Shen S, Sulter G, Jeffries TW, Cregg JM, A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia Pastoris*. *Gene*. 1998, 216: 93-102.
132. Shibuya H, Kobayashi H, Kasamo K, Kusakabe I. Nucleotide Sequence of  $\alpha$ -galactosidase cDNA from *Mortierella vinacea*. *Biosci. Biotech. Biochem*. 1995, 59 (7): 1345-1348.
133. Shibuya H, Kobayashi H, Park GG, Komatsu Y, Sato T, Kaneko R, Nagasaki H, Yoshida S, Kasamo K, Kusakabe I. Purification and Some Properties of  $\alpha$ -Galactosidase from *Penicillium purpurogenum*. *Biosci. Biotech. Biochem*. 1995, 59 (12): 2333-2335.
134. Shibuya H, Kobayashi H, Sato T, Kim W-S, Yoshida S, Kaneko S, Kasamo K, Kusakabe I. Purification, Characterization, and cDNA cloning of a novel  $\alpha$ -galactosidase from *Mortierella vinacea*. *Biosci. Biotech. Biochem*. 1997, 61(4): 592-598.
135. Shibuya H, Kobayashi H, Yoshida S, Kaneko S, Park GG, Kusakabe I. Purification and Characterization of Recombinant *Mortierella vinacea*  $\alpha$ -Galactosidase I and II Expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotech. Biochem*. 1999, 63(6): 1096-1099.
136. Shibuya H, Nagasaki H, Kaneko S, Yoshida S, Park GG, Kusakabe I, Kobayashi H. Cloning and High-Level Expression of  $\alpha$ -Galactosidase cDNA from *Penicillium purpurogenum*. *Appl. Environ. Microbiol*. 1998, 64(11): 4489-4494.
137. Siegel r S, Buckholz R G, Thill G P, Wondrack L M, Production of epidermal growth factor in methlotrophic yeasts. International Patent Application. 1990, WO 90/10697.
138. Sierkstra LN, Verbakel J MA, Verrips CT. Optimisation of a host/vector system for heterologous gene expression by *Hansenula polymorpha*. *Curr Genet*. 1991, 19(2): 81-87.
139. Singh A, Lugovoy JM, Kohr WJ, Perry LJ. Synthesis, secretion and processing of alpha-factor-interferon fusion proteins in yeast. *Nucleic Acids Res*. 1984, 12(23): 8927-8938.
140. Slominski BA, Campbell LD, Guenter W. Oligosaccharides in canola meal their effect on nonstarch polysaccharides digestibility and true metabolizable energy in poultry. *Poultry Science*. 1994, 73: 156-162.
141. Smart EL and Pharr DM. Characterization of  $\alpha$ -galactosidase from cucumber leaves. *Plant Physiology*. 1980, 66: 731-734.
142. Somiari RI, Balogh E. Properties of an extracellular glycosidase of *Aspergillus niger* suitable for removal of oligosaccharides from cowpea meal. *Enzyme Microb. Technol*. 1995, 17: 311-316.
143. Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE, Blankenship DT, Tsay JT, Smith PL, Wierschke JD, Subramaniam A, Birkenberger LA. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*. 1997, 190(1): 55-62.
144. Sreekrishna K, Nelles L, Potenz R, Cruze J, Mazzaferro P, Fish W, Fuke M, Holden K, Phelps D, Wood P, High-level expression, purification, and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry*. 1989, 28(9): 4117-4125.
145. Stahl CH, Wilson DB, Lei XG. Comparison of extracellular *Escherichia coli* AppA phytases expressed in

- Streptomyces lividans* and *Pichia pastoris*. Biotechnol. Lett. 2003, 25: 827–831.
146. Su TZ, Qi S, Yun WH, Xiu L. Regulation in the expression of alpha-galactosidase gene in raf operon in *Escherichia coli*. Wei Sheng Wu Xue Bao. 1989, 29(3): 180-186.
147. Sugimoto H and Van Buren JP. Removal of oligosaccharides from soy milk by an enzyme from *Aspergillus saitoi*. J. Food Sci. 1970, 35: 655-657.
148. Suryani, Kimura T, Sskka K, Ohmuya K. Cloning, Sequencing and Expression of the Gene Encoding the *Clostridium stercoreum*  $\alpha$ -Galactosidase Aga36A in *Escherichia coli*. Biosci. Biotech. Biochem. 2003, 67(10): 2160-2166.
149. Suzuki H, Li S-C, Li. Y-T.  $\alpha$ -Galactosidase from *Mortierella vinacea*. CRYSTALLIZATION AND PROPERTIES. J. Biol. Chem. 1970, 245: 781 – 786.
150. Takenaka T, Murray GJ, Qin G, Quirk JM, Ohshima T, Qasba P, Clark K, Kulkarni AB, Brady RO, Medin JA. Long-term enzyme correction and lipid reduction in multiple organs of primary and secondary transplanted Fabry mice receiving transduced bone marrow cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2000; 97(13): 7515-7520.
151. Talbot G, Sygusch J. Purification and characterization of thermostable beta-mannanase and alpha-galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 1990, 56(11): 3505-3510.
152. Thanunkul D, Tanaka M, Chichester CO, Lee TC. Degradation of raffinose and stachyose in soybean milk by  $\alpha$ -Galactosidase from *Mortierella vinacea*. Entrapment of  $\alpha$ -Galactosidase with polyacrylamide gel. J. Food Sci. 1976, 41: 173-175.
153. Veldman, A., W. A. G. Veen, D. Barug, and P. A. van Paridon. Effect of  $\alpha$ -galactosides and  $\alpha$ -galactosidase in feed on ileal piglet digestive physiology. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 1993, 69: 57–65.
154. Wallis, GLF, Easton RL, Jolly K, Hemming FW, Peberdy J F. Glactofuranoic-oligomannose N-linked glycans of  $\alpha$ -galactosidase A from *Aspergillus niger*. Eur. J. Biochem. 2001, 268: 4134 – 4143.
155. Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, Lair SV, Cregg JM. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. Gene. 1997, 186(1): 37-44.
156. Wegner G H, Biochemical conversions by yeast fermentation at high cell densities. USA Patent. 1983, No, 4414329.
157. Wong HC, Hu CA, Yeh HL, Su W, Lu HC, Lin CF. Production, Purification, and Characterization of  $\alpha$ -Galactosidase from *Monascus pilosus*. Appl. Environ. Microbiol. 1986, 52(5): 1147-1152.
158. Xu bingze, Sello D, Janson J-C. Cloning and expression in *Pichia pastoris* of a blue mussel (*Mytilus edulis*)  $\beta$ -mannanase gene. Eur. J. Biochem. 2002, 269: 1753-1760.
159. Zapater IG, Ullah AH, Wodzinski RJ. Extracellular alpha-galactosidase (E.C. 3.2.1.22) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 purification and characterization. Prep. Biochem. 1990, 20: 263-296.
160. Zeilinger S, Kristufek D, Arisan-Atac I, Hodits R & Kubicek CP. Conditions of formation, purification, and characterization of an alpha- galactosidase of *Trichoderma reesei* RUT C-30. Appl. Envir. Microbiol. 1993, 59: 1347 – 1353.
161. Zhong X, Peng L, Zheng S, Sun Z, Ren Y, Dong M, Xu A. Secretion, purification and characterisation of a recombinant *Aspergillus oryzae* tannase in *Pichia pastoris*. Prot. Exp. Pur. 2004, 36: 165–169.



## 致谢

本文是在导师姚斌研究员的悉心指导下完成的。从论文的选题、实验各个阶段进展直至论文的最后定稿，姚老师都给了我悉心的指导和无私的帮助。在此，我要向姚老师表示我最深的敬意和最衷心的感谢！姚老师严谨的态度，渊博的知识、敏捷的思维，一丝不苟的风格，宽以待人的处事风格，在过去的三年中给了我无声的教诲，将是我今后学习的楷模。感谢姚老师三年来在学习和生活中对我无微不至的关心和教导。

我所在的团队是一个团结互助、奋斗向上的集体，非常荣幸的成为了这个家庭的一员，又非常遗憾的即将离开这个集体。本实验室的所有老师和同学多给了我许多的无私帮助和支持。在本论文的完成整个过程中，得到本实验室的史秀云老师全力帮助，在此向她表示衷心的感谢。感谢本实验室的孟昆博士、王亚茹老师、袁铁铮师兄、柏映国硕士、罗会颖师姐、杨培龙博士和博士生杨浩萌、李雅楠、石鹏君、谷维娜、张宇宏、曹亚楠及硕士生黄火青、李宁、韩晓宇、邵娜、唐辉桂、付大伟、吴博在学习和工作中给我的支持和帮助，并和他们度过了这段美好的时光。感谢中国农业科学院生物技术研究所张志芳研究员、伍宁丰研究员、张伟博士给予的无私帮助和热情的指导。感谢从本实验室已经毕业的李江博士和张会图博士曾经给我的热心帮助和指导。

最后我要深深地感谢我的家人三年来对我的理解和支持，特别感谢我的爱人在生活和工作中的对我的关心、支持和鼓励。

同时，我还要感谢饲料研究所和研究生院的领导和老师以及所有关心和帮助我的同学、朋友们。

密士军

2006. 6. 3

## 作者简介

密士军，男，1975 年 9 月出生，山东省苍山县人。2000 年毕业于山东聊城师范学院生物系，获学士学位。2003 年毕业于东北农业大学生命科学学院，获理学硕士学位。同年考入中国农业科学院饲料研究所攻读博士学位，师从姚斌研究员。

研究生期间发表论文：

密士军，柏映国，孟昆，史秀云，王亚茹，姚斌. 一种来源于青霉的新的  $\alpha$ -半乳糖苷酶的分离纯化及其酶学性质. 微生物学报, 已接收。

Shijun Mi, Kun Meng, Yaru Wang, Yingguo Bai, Tiezheng Yuan, Huiying Luo, Bin Yao\*. **Molecular cloning and characterization of a novel  $\alpha$ -galactosidase gene from *Penicillium* sp. F63 and expression in *Pichia pastoris*. (submitted)**

密士军, 邱丽娟, 常汝镇, 郝再彬, 关荣霞. 利用 SSR 指纹图谱分析大豆花叶病毒 (SMV) 病抗源的遗传多样性. 植物病理学报. 2004, 34(3): 244-253

密士军, 郝再彬. 航天诱变育种研究的新进展. 黑龙江农业科学 2002, (4): 31-33