

红曲霉中 PKS 基因的结构分析

丘振宇^{1,2}, 曾 军^{1,2}, 林 勇¹, 杨 宇¹, 王亚琴²

(1.贵州省仁怀市茅台镇老伙记酒业有限公司, 贵州 仁怀 564501; 2.华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510640)

摘 要: 对实验室保藏的一株高产 Monacolin K 红曲霉菌株及其野生株进行了初步的 PKS 基因结构分析。扩增得到红曲霉野生株 W 菌及其诱变株 M 菌的目的基因序列, 并将测序产物和 cDNA 序列进行比对, 确定该段基因序列不含内含子, 且诱变株 M 菌的突变位置不在此段基因上。分别用 ProfileScan、SWISS-MODEL 预测了该段蛋白的结构域以及三维结构。

关键词: 微生物; 红曲霉; PKS 基因; 结构研究

中图分类号: TS261.1; TQ925.7; Q93-3

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2010)04-0017-04

Analysis of PKS Gene Structure of *Monascus*

QIU Zhen-yu^{1,2}, ZENG Jun^{1,2}, LIN Yong¹, YANG Yu¹ and WANG Ya-qin²

(1.Laohuoji Liquor Industry Co.Ltd., Renhuai, Guizhou 564501; 2.School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510641, China)

Abstract: The PKS Gene structure of a lab-preserved *Monascus* strain with high yield of Monacolin K and its wild strain was analyzed. Then the gene sequence of *Monascus* wild strain W and its mutant strain M were amplified by polymerase chain reaction (PCR). And the sequencing products were compared with cDNA sequence. The results confirmed that such gene segment had no intron and the mutation position of mutant strain M did not locate on such gene segment. Finally, the domain and 3D structure of the protein in such segment was predicted by ProfileScan and SWISS-MODEL respectively.

Key words: microbe; *Monascus*; PKS Gene; structure analysis

自 20 世纪 70 年代有重大药用价值的 Monacolin K 被发现以后, 人们加大了对红曲霉及 Monacolin 类物质的研究。近年来的研究表明, 包含 Monacolin K 在内的 Monacolin 类物质都属于聚酮体化合物, 由聚酮体合成酶(PKSs)合成, 是 PKSs 基因家族的产物^[1]。聚酮体物质种类繁多, 很多与药物有关, 通常由 1 个乙酰基单位与 3 个或多个丙二酰缩合而成, 在合成过程中, 聚酮体合成酶起着非常关键的作用^[1]。

国外在一些真菌的 PKSs 领域进行了卓有成效的基础理论研究。有文献报道, 已有学者发现了土曲霉中与降血脂成分洛伐它汀(Lovastatin)合成有关的 PKS 基因簇, 并申报了专利(P99025US)^[2]。但对红曲霉中的 PKSs 基因的报道还很少。

对 Monacolin K 合成酶基因在其合成中的功能进行分析, 有助于掌握调控红曲霉代谢产物的生产关键, 为利用生物工程方法构建高产量的 Monacolin K 工程菌株奠定了基础。此外, 通过对 PKSs 基因功能的研究, 还有可能从红曲代谢产物中发掘新型的具有药用价值的聚酮体

物质。

在此课题的前期研究中, 已由他人运用 RACE 方法获得了此株红曲霉中 PKS 基因的 cDNA 序列, 并对相关菌株做了多方面的生理生化育种研究^[3-5]。本文将根据此 cDNA 序列用 PCR 方法扩增出整段基因的 DNA 序列, 并进行简单的结构功能分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

红曲霉 W(实验室编号), 野生株(标准编号): Palosus IFO 4520; 红曲霉 M(实验室编号), 由野生株 W 诱变而得的 Monacolin K 高产株。

1.1.2 主要试剂

Taq、LA Taq DNA 聚合酶, 6×Loading Buffer, 十二烷基苯甲酸钠(SDS), 溴化乙锭(EB), 均为大连 TaKaRa 公司产品; dNTP Mixture, 1 kbp DNA Ladder Marker, 琼脂糖, 均为 Geneview 分装; Tris 饱和酚, 北京鼎国生物技术

基金项目: 863 国家基金资助项目(024-D90661) 广东省自然科学基金资助项目(07006553)。

收稿日期: 2010-01-27

作者简介: 丘振宇(1981-), 男, 硕士研究生, 从事发酵工程、生物化工方面的研究, 发表论文 10 余篇。

有限公司产品;乙二胺四乙酸,上海生工生物工程有限公司产品;三氯甲烷(分析纯)、异戊醇(分析纯),湖北大学化工厂;无水乙醇(分析纯),天津市大茂化学试剂厂。

1.2 主要仪器、设备

C25KC M1246-0011 恒温摇床(New Brunswick Scientific Co. INC)、高速冷冻离心机(Hereus)、梯度 PCR 仪(Eppendorf)、核酸电泳仪(BIO-RAD)、VFH-202B 紫外透射分析仪(Agilent)、Gel Doc EQ 紫外凝胶成像仪(BIO-RAD)、高精度电子天平(上海精科实业有限公司)、SPX-250B-Z 型生化培养箱(上海博迅实业有限公司)等。

1.3 方法

1.3.1 制取红曲霉菌 DNA 的方法

①菌体的制备:在无菌操作台上将在摇瓶中生长 5 d 的红曲霉菌丝球用滤布(120 目)滤出,用玻棒小心将菌体刮入铺有一层滤纸的培养皿中。盖上盖子后在-20℃冰箱预冷 30 min。

②用冷冻干燥机将菌体冻干,处理后的菌丝体在添加液氮后研磨成菌体粉末,分装于 2 mL 离心管中密封保存。

③称取 20~60 mg 红曲霉菌体粉末,装入 1.5 mL 离心管中。添加 400 μ L 溶菌缓冲液,混匀直至出现匀浆;若液体粘稠,可再加入少量溶菌缓冲液,以不超过 700 μ L 为宜。

④65℃水浴 1 h;12000 r/min 离心 10 min,达到上层水相变清。

⑤加入等体积的酚·氯仿溶液,经充分混匀后,于 12000 r/min 离心 10 min,吸取上清液至另一干净的 1.5 mL 离心管。

⑥加入 10 μ L 3 mol/L 的 NaAc、0.54 倍体积的异丙醇,轻轻翻转几次后冰浴 2 min。

⑦12000 r/min 离心 10 min,弃上清液。用 70%乙醇小心洗涤 2 次。

⑧将离心管倒扣在纸巾上,在室温干燥 20 min,挥发除去乙醇。

⑨用 100~500 μ L 超纯水溶解。-20℃保存待用。

1.3.2 引物设计

引物设计遵循以下 6 点原则:

①长度:18~25 个碱基;

②GC 含量:40%~60%,碱基 G 和 C 在整个引物中应均匀分布;

③ $T_m = 4(C+G) + 2(A+T)$;

④引物和模板的非特异性配对位点的配对率小于 70%;

⑤两引物间配对碱基数小于 5 对;

⑥引物自身配对形成茎环结构,茎的碱基数不大于 3。

2 结果与讨论

2.1 以总DNA为模板进行PCR扩增PKSs基因片段

本研究开始之前,已由其他学者运用 RACE 方法获得了红曲霉 PKSs 基因的全长 cDNA 序列(因版面限制,未贴序列编码)。本实验室根据此 cDNA 序列设计的两条引物如下,并将设计好的引物交由英骏生物技术有限公司进行合成。

ex-F:5'-GCAACCTCACGGTAAGTGC-3'

ex-B:5'-TCCGTACAGTTCCTTCTGGAC-3'

本实验在引物的设计过程使用了 Primer Premier 5.0 程序,两条引物的各项参数见表 1。

表 1 设计引物的各项参数

项目	评分	长度	T _m (℃)	GC (%)	ΔG (kcal/mol)	活性	多义性
ex-F	73	19	56.1	57.9	-36.9	32.3	1
ex-B	72	21	56.6	52.4	-38.0	34.0	1
产品	61	1129	92.6	57.4	-	-	-

真核菌株的基因组中含有内含子的现象非常普遍,其内含子长度的变化范围也很大,有时甚至可以达到相应 cDNA 序列的 10 倍。所以,在对真核菌的总 DNA 组进行 PCR 扩增时,需要考虑 DNA 聚合酶所适用的长度范围和延伸时间。此外,由于片段长度、浓度差异、PCR 反应仪以及实验所用试剂等因素的影响,计算所得的退火温度不一定适用,所以需要进行梯度 PCR 来确定最佳的退火温度。

本实验针对这些情况,在初次的 PCR 条件摸索中选用 TaKaRa 的长链 PCR 扩增用聚合酶 LA Taq,循环中 72℃的延伸时间定为 2.5 min;并以引物设计时的退火温度为基础,设定了 52.4℃、54.1℃和 55.5℃3 组退火温度进行梯度 PCR 扩增实验。PCR 仪所使用的具体程序如下:

95℃	5 min	} 30 个循环
94℃	1 min	
梯度退火温度	40 s	
72℃	2.5 min	
72℃	7 min	
4℃	保存	

最后将实验所得的 PCR 产物进行 1%的琼脂糖电泳检测,选用 1 Kbp DNA ladder 作为 Marker。具体的电泳结果见图 1。

由图 1 可以得出,在设定的 3 个温度下,红曲霉 W



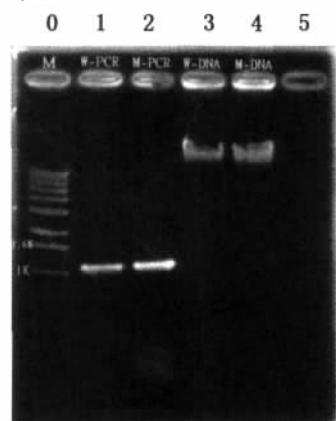
Lane 1、2、3 分别为红曲霉 W 退火温度在 52.4 °C、54.1 °C、55.5 °C 下的 PCR 产物

Lane 4、5、6 分别为红曲霉 M 退火温度在 52.4 °C、54.1 °C、55.5 °C 下的 PCR 产物

图 1 红曲霉 W 和 M 的梯度 PCR 产物

都可以被顺利地扩增出基因片段,且大小一致。而红曲霉 M 仅在 54.1 °C 的温度下能得到扩增片段,大小与 W 菌所得的产物相近,但亮度不足,可见在不同的体系下退火温度存在区别。与 Marker 对比后,初步确定所得到的两份 PCR 产物长度在 1100~1200 bp 之间。

通过以上实验,可以判定目的片段没有或含有极少的内含子,该扩增实验使用普通的 rTaq 聚合酶即可;退火温度定为 54 °C;循环中的 72 °C 延伸时间可缩短为 1 min。依此条件进行 PCR,1 % 琼脂糖电泳结果见图 2。



Lane 1: 红曲霉 W 菌 PCR 产物;
Lane 2: 红曲霉 M 菌 PCR 产物;
Lane 3: 红曲霉 W 菌总 DNA 组;
Lane 4: 红曲霉 M 菌总 DNA 组;
Lane 5: 阴性对照

图 2 红曲霉 W 和 M 的 PCR 产物

以上 PCR 扩增实验所用条件比较合适,所得片段结果较为理想,无论是红曲霉 W 菌还是 M 菌所扩增出来的条带都非常清晰明亮,两带长度基本一致;且 PCR 的阴性对照没有任何条带。

2.2 PKSs 基因片段测序和比对

将红曲霉 W 菌和 M 菌的 PCR 产物交由英骏公司

进行双向测序,并利用 Blast 2 sequences 工具对测序结果进行比对,结果见图 3。

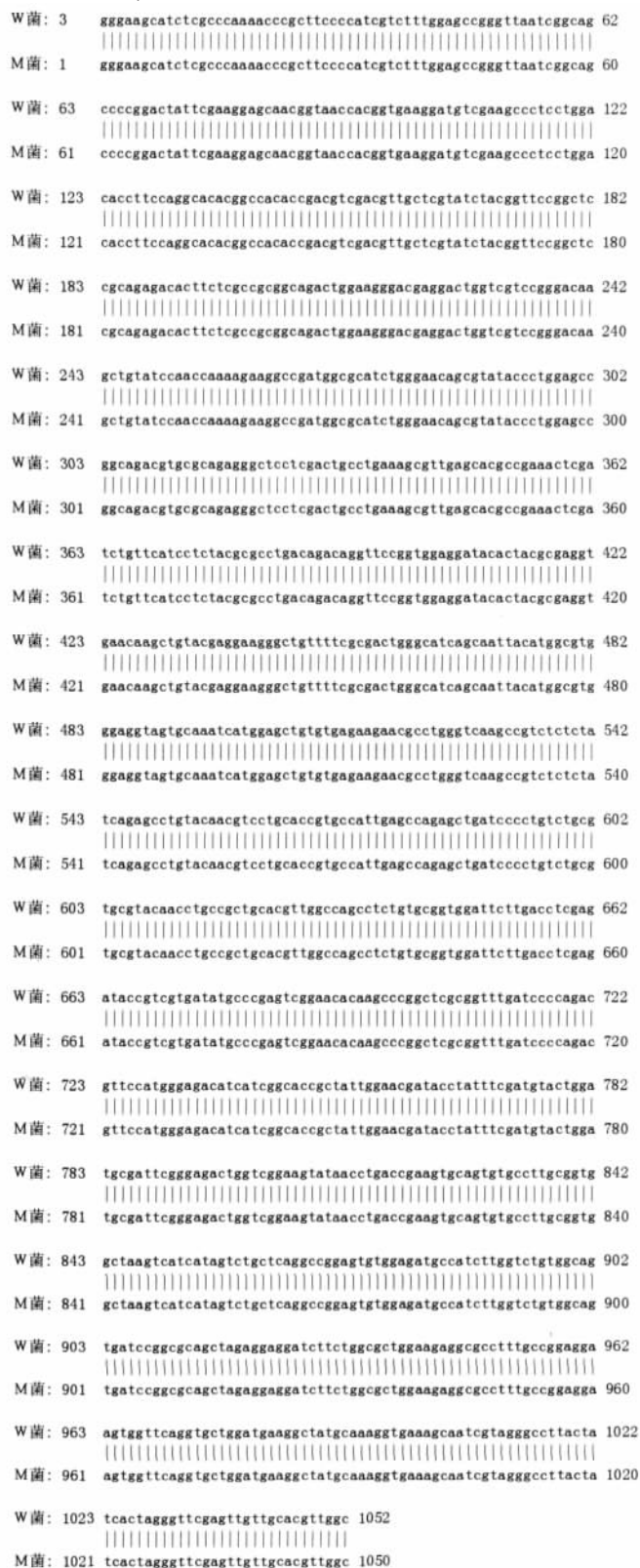


图 3 红曲霉 W 菌与 M 菌 PCR 产物的比对

通过查看以上比对的结果,红曲霉 W 菌和 M 菌的 PCR 产物完全一致,与 cDNA 的序列也一一吻合。由此可知,红曲霉 W 菌在该段基因序列上没有内含子,而其

诱变株红曲霉 M 亦没有在此段基因的碱基上发生突变。

2.3 PKSs 基因片段分析

尽管高产 Monacolin K 的突变株在此段基因上无突变发生,但国际上关于 PKSs 基因的分析研究报道还不多,本实验室将此序列在 NCBI 的网页上进行序列比对,得到的结果是:此序列与黄曲霉毒素醛还原酶有很高的同源性。

用 ProfileScan 预测此段 PKS 基因所表达蛋白的结构域,结果见图 4。

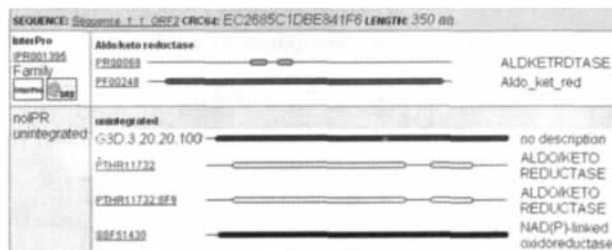


图 4 ProfileScan 预测的结果

该蛋白中可能存在一个醇醛酮还原酶(Aldo/keto reductase)结构。此还原酶家族含有许多具有氧化还原酶活性的 K+β 系通道调整域;此外,还具有许多单节显性的由 NADPH-氧化还原酶。推测第 293 位氨基酸残基位于活性中心以外。

用 SWISS-MODEL 预测蛋白的三维结构,其预测的三维结构见图 5。

3 展望

如前所述,PKSs 基因家族和很多重要药物的合成有关,有很高的研究价值,而国内乃至国际上在此方面的研究还不是很多。本文仅对该段 PKS 基因作了粗浅的结构

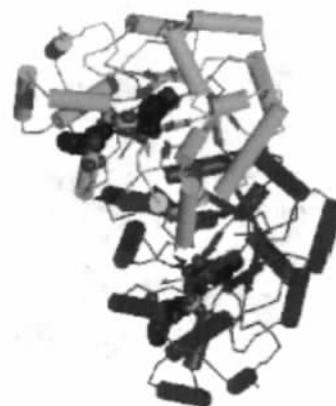


图 5 SWISS-MODEL 预测的蛋白三维结构

研究,后续还将对其进行质粒载体构建、原核表达以及真核表达等工作。

参考文献:

- [1] Hu Z., Desai R.P., Volchegursky Y., et al. Approaches to stabilization of inter-domain recombination in polyketide synthase genes expression plasmids [J]. Ind Microbiol Biotechnol, 2003, 30(3): 161-167.
- [2] Jonathan K., Karine A., Steven G., et al. Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during Lovastatin biosynthesis[J]. Science, 1999, 284(21):1368-1372.
- [3] 丘振宇,王亚琴,潘力,许喜林.一株高产 Monacolin K 红曲霉菌株的生理特性研究[J].中国调味品,2007,33(2):25-29.
- [4] 丘振宇,王亚琴,许喜林.一株高产 Monacolin K 红曲霉菌株的色素研究[J].食品工业科技,2007,195(7):81-83.
- [5] 丘振宇,王亚琴,许喜林.红曲霉的特点及应用研究[J].食品工业科技,2006,188(12):186-188.

全国酿酒行业秘书长会议在北京召开

本刊讯 2010 年全国酿酒行业秘书长会议于 2010 年 3 月 11 日至 3 月 13 日在北京召开。来自全国 25 个省、自治区、直辖市酿酒(工业)协会秘书长共 43 名代表参加了会议。会议由中国酿酒工业协会秘书长王琦主持,王延才理事长总结了协会 2009 年工作情况,回顾了协会第三届理事会 5 年来的成长历程。他指出,从第三届理事会以来,协会明确了自身建设的指导思想,即为行业、企业服务的定位,5 年来紧紧围绕着该宗旨,做了大量工作并取得了一定成效,协会逐步完成了从酒业产品的制造向产业的延伸,成立了市场委员会和啤酒原料委员会,丰富和完善了协会的体系、职能。同时,也向代表们介绍了协会 2010 年工作要点,提出了要在“十一五”的基础上,实现创新型酿酒工业的目标,即科技创新、观念创新、经营创新、文化创新,探索工、商共赢的新型合作关系。

王琦秘书长就 2010 年协会换届的工作情况向大家做了介绍并征求意见。肖德润副理事长总结了 2009 年酿酒行业职业技能培训和鉴定工作的有关情况。白酒分会副秘书长宋书玉介绍了将于 2010 年 11 月举行的白酒品酒职业技能竞赛工作,秘书长赵建华就白酒分会换届情况向大家征求意见并回答了职业技能竞赛的相关问题。

代表们对协会 2009 年工作和 2010 年计划表示肯定,对协会换届前期筹备工作情况表示认同。(小雨)

