

肉毒碱乙酰转移酶基因敲除对长链二元酸生产代谢过程的影响

高 弘 张 剑 华玉涛 李 春 曹竹安*

(清华大学化学工程系生物化工研究所 北京 100084)

摘 要 在利用热带假丝酵母发酵生产长链二元酸的过程中,脂肪酸将进入 β -氧化途径,代谢产生能量,从而降低产物收率。首次以负责运输的肉毒碱乙酰转移酶为改造目标,在肉毒碱乙酰转移酶基因中插入潮霉素 B 抗性基因,构建 DNA 转化质粒,并进行一次同源重组,得到肉毒碱乙酰转移酶基因单拷贝敲除的基因工程菌。根据摇瓶实验结果,该基因工程菌与原始菌株相比,十三碳二元酸的产量与摩尔转化率分别提高了 13.0% 和 11.8%。

关键词 肉毒碱乙酰转移酶,十三碳二元酸,热带假丝酵母,同源重组,代谢调控

中图分类号:Q933 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)01-0102-04

长链二元酸(Long Chain Dicarboxylic Acid, DCA)是合成工程塑料、香料、耐寒增塑剂、涂料、液晶等物质的一种重要的化工原料^[1],目前主要利用热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)转化烷烃的生物法生产^[2]。

在热带假丝酵母转化烷烃生产长链二元酸的过程中^[3~4],烷烃被转运进入细胞后,首先由细胞色素 P450 酶氧化生成 α -一元醇,再进一步被氧化生成 α -一元酸,这被称为 α -氧化过程。接着, α -一元酸由同样的酶系催化,经过 ω -氧化途径被氧化生成 α , ω -二元酸。在 α , ω -氧化过程中生成的一元酸和二元酸都可以进入微体,经过 β -氧化被代谢消耗,降解为乙酰辅酶 A 或丙酰辅酶 A,产生细胞生命活动所需的能量。但这个过程存在能量的无益消耗,对于提高烷烃的转化率和二元酸的产量是极为不利的。

根据 Picataggio 等^[5]的报道,通过阻断 β -氧化中的脂酰辅酶 A 氧化酶可以提高长链二元酸的转化率。但是,这种方法需要把 4 个同工酶全部阻断才能达到理想的效果,因此具体操作过程比较繁琐。而且,后来 Hara 等^[6]无法重复这个实验的结果,所以,这种方法的可行性和有效性还有待商榷。重要的是,如果完全阻断 β -氧化可能会严重影响能量提供,从而抑制菌体的生长。

在一元酸和二元酸向 β -氧化途径转运的过程中,肉毒碱脂酰转移酶起到了重要的作用。肉毒碱乙酰转移酶(Carnitine acyltransferase, CAT)就是其中

之一。因为脂肪酸 β -氧化的产物乙酰辅酶 A 不能通过微体膜,而 CAT 能可逆地催化乙酰辅酶 A 生成乙酰肉毒碱,乙酰肉毒碱可以通过微体膜^[7],从而实现乙酰辅酶 A 在各微体间的转运。

通过代谢流分析得知,脂酰辅酶 A 的转运过程是 β -氧化的限速步骤。而且热带假丝酵母是二倍体,没有有性周期,为不完全阻断 β -氧化,保证细胞能量的供应,同时考察 β -氧化过程中脂肪酸无谓消耗的程度,本文首次将代谢途径中负责运输的酶作为改造对象,得到了 CAT 第一拷贝缺失的重组菌株,只缺失了热带假丝酵母中 CAT 两个等位基因中的一个基因,并系统考察了 CAT 基因缺失重组菌在生长特性、产酸和烷烃转化率等方面与原始菌的区别。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 :乙酰辅酶 A、L-Carnitine 和 5, 5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzoic acid) (DTNB) 购自 Sigma 公司。潮霉素 B 购自 Roche 公司,限制性内切酶、pUC18 质粒,均购自 TaKaRa 公司,质粒 pUCATPH 由中国农业大学植保学院赠送。质粒纯化试剂盒购自北京赛百盛基因技术有限公司。n-十三烷(n -C₁₃)由抚顺化工二厂提供,其中 n -C₁₃ 含量大于 98.5%,其它主要的成分为 n -C₁₂,约占 1%。玉米浆由华北制药厂提供。其它试剂均为分析纯。

基金项目 国家自然科学基金(29976022, 30000003, 20036010), 国家 973 项目(2003CB716007)

* 通讯作者。Tel: 86-10-62785514 Fax: 86-10-62780304 E-mail: cza-dce@mails.tsinghua.edu.cn

作者简介 高 弘(1978-)女,博士研究生,生物化工专业。E-mail: gaohong00@mails.tsinghua.edu.cn

收稿日期 2004-05-14, 修回日期 2004-07-05

1.1.2 菌种和培养基:热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)菌株 C.t.F10-1,由清华大学化学工程系生物化工研究所保藏。

YPD 培养基:每升含酵母粉 10g,蛋白胨 20g,葡萄糖 20g,pH7.0,培养重组菌时加入一定浓度的潮霉素 B。**种子培养基:**每升含蔗糖 30g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5g,玉米浆 1g,酵母膏 1g,NaCl 1g, KH_2PO_4 4g, Na_2HPO_4 2g,尿素 1.5g, MgSO_4 1.5g/L,pH6.5,尿素和硫酸镁分消。**SD 培养基:**每升含 YNB(Difco Yeast Nitrogen Base)6.7g,葡萄糖 20g。

1.2 CAT 酶活测定

参照 Bieber 等^[8]提出的测定肉毒碱棕榈酰转移酶(CPT)酶活的方法,用 DTNB 方法测定 CAT 酶活并计算比酶活结果(以 U/mg 细胞组织表示,细胞组织指线粒体与过氧化物酶体)。

1.3 CAT 酶基因的扩增

经实验确定,F10-1 中的 CAT 基因与 GenBank 公布的 *C. tropicalis* 中的 CAT 基因相同,因此根据该基因序列设计了引物。引物序列分别为 P1:5'-CACTGCTTGAGCTCCACAAA-3';P2:5'-GCTAAATCC TGCAGGCAA-3';P3:5'-AAGTACACCGGCAAGATCAG ACC-3';P4:5'-AGCTATTTACCCGCAGGACATATCC-3';其中 P1 和 P2 用来扩增 CAT 基因序列,分别加入 *Sac* I 和 *Sse*8387 I 酶切位点。P3 和 P4 扩增重组质粒中的 *hygB*-CAT 片段,用来验证质粒。

1.4 重组质粒 pUCSS5hyg15 和中间载体 pUCSS5 的构建

以 P1 和 P2 为引物,从热带假丝酵母 F10-1 基因组上扩增得到约 1600 个 bp 的 CAT 基因片段。用 *Sac* I 和 *Sse*8387 I 双酶切该片段和 pUC18 质粒,将两者连接起来得到质粒 pUCSS5。将带有能够在酵母中表达的启动子的潮霉素 B 抗性基因用 *Sal* I 酶从质粒 pUCATPH 上切下,插入到质粒 pUCSS5 上 CAT 基因中的 *Sal* I 酶切位点上,得到质粒 pUCSS5hyg15。质粒用质粒纯化试剂盒提取。

1.5 敲除法用于 CAT 单拷贝基因缺失株的构建

参照 Lisa 等^[9]的方法,用 *Sse*8387 I 和 *Sac* I 酶解 pUCSS5hyg15 质粒,得到的线性 DNA 用来转化热带假丝酵母菌株 F10-1,涂布于 SD 平板。筛选具有潮霉素 B 抗性的菌株。

2 结果和分析

2.1 热带假丝酵母 F10-1 的潮霉素抗性

潮霉素 B 是含有氨基和多醇的氨基糖苷类抗

生素,其作用机制是通过抑制在核糖体上多肽的转移,从而抑制原核和真核生物蛋白质的合成^[10],是在酵母中使用比较普遍的一种抗生素。在 YPD 培养基中分别加入不同浓度的潮霉素 B,培养 F10-1 菌株,20h 后到达指数生长期末期,测定菌液在 620nm 处的吸光度。

结果(图 1)说明,当 YPD 培养基中潮霉素 B 的浓度达到 200mg/L 以上时,热带假丝酵母菌株 F10-1 就无法生长。该结果为用潮霉素 B 抗性筛选重组菌提供了依据。

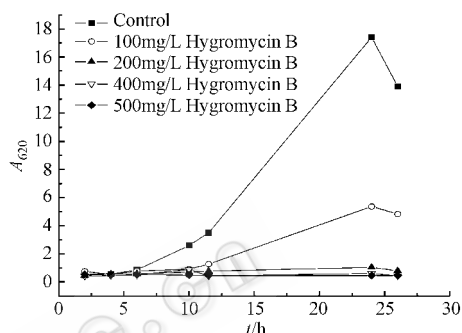


图 1 F10-1 对潮霉素 B 的耐受性研究

Fig.1 Hygromycin B resistance of F10-1

2.2 CAT 基因单拷贝缺失菌株的构建和验证

为了在不影响菌体生长的条件下提高二元酸的产量和烷烃的转化率,我们提出对脂肪酸 β -氧化转运过程进行部分阻断,因此构建了 CAT 基因单拷贝缺失的菌株。首先构建了用于敲除 CAT 基因的质粒 pUCSS5hyg15。在热带假丝酵母的 CAT 基因中只有一个 *Sal* I 位点,位于第 789 个 bp 处,质粒 pUCSS5hyg15 中两段被 *Sal* I 位点分开的 CAT 同源片段长度都在 400bp 以上,能够有效地实现同源重组。pUCSS5hyg15 用 *Sac* I 和 *Sse*8387 I 酶解得到线性化质粒,包含两段 CAT 基因和潮霉素 B 抗性基因的片段用来转化 F10-1 菌株。根据 F10-1 的潮霉素抗性实验结果,用含有 400mg/L 潮霉素 B 的 YPD 培养基来筛选具有潮霉素 B 抗性的菌株。选取具有潮霉素 B 抗性的转化子,在液体 YPD 培养基中培养后,以菌液为模板,按照所得 CAT 基因前面的序列和 *hygB* 与 CAT 交界处的序列设计引物 P3 和 P4,用 P3 和 P4 扩增。产物测序结果表明,重组质粒 pUCSS5hyg15 上插入潮霉素 B 抗性基因的 CAT 序列已经通过同源重组整合到热带假丝酵母的基因上,将重组菌命名为 CZ-15。

2.3 重组菌性质的初步研究

2.3.1 重组菌的生长与 CAT 酶活水平的研究:原始

菌株 F10-1 和重组菌 CZ-15 在种子培养基(不含潮霉素 B)中的生长曲线如图 2 所示。实验结果发现,重组菌与原始菌株的菌体生长没有明显区别,说明 CAT 基因的单拷贝敲除没有影响热带假丝酵母的生长和繁殖功能。

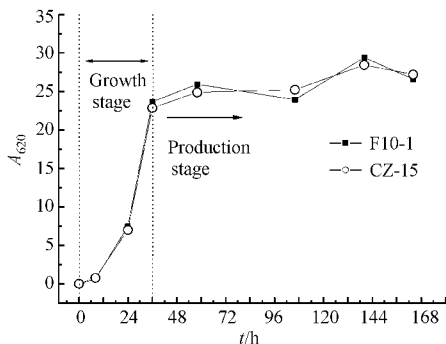


图 2 F10-1 和重组菌 CZ-15 的生长曲线

Fig.2 Cell growth curves of F10-1 and CZ-15

在实验中同时测定了原始菌与重组菌中 CAT 的比酶活。结果显示,与原始菌株 F10-1(0.447U/mg cell precipitate)相比,重组菌中 CAT 的比酶活(0.253U/mg cell precipitate)降低了大约 43.4%。在热带假丝酵母中有两个拷贝的 CAT 基因,单拷贝缺失株中 CAT 酶活应该是原始菌的 50%左右,与实验结果相符,从而证明热带假丝酵母中一个拷贝的 CAT 基因已经被敲除。

在摇瓶实验中分别测定了原始菌与重组菌的产酸情况(图 3)。结果表明,在重组菌中,CAT 酶活降低后,DCA13 的产量增加了 13.0%。同时烷烃的摩尔转化率也提高了 11.8%(从 39.0%到 43.6%)。

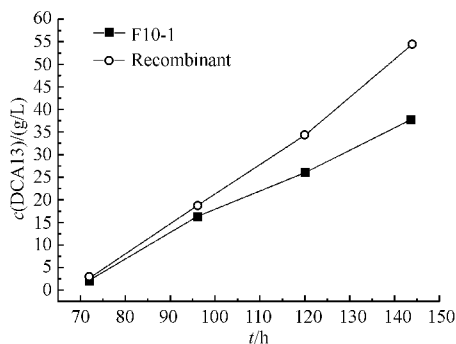


图 3 原始菌与重组菌的产酸情况

Fig. 3 DCA13 production of F10-1 and the recombinant

以上结果说明,在 β -氧化代谢脂肪酸为细胞生长提供能量的过程中,的确存在着一部分脂肪酸的无谓消耗,CAT 基因单拷贝缺失后的重组菌中减少了这部分无谓消耗,所以可以提高二元酸产量与烷烃转化率。同时也说明,通过对 β -氧化转运途径的改造来提高产酸与烷烃转化率的方法是可行的。

2.3.2 重组菌的稳定性研究:通过以上的研究可以看出,基因工程重组菌具有比原始菌更高的产酸能力和烷烃转化率。我们应该进一步了解的是,这种优良的性状是否能够稳定遗传。为了研究本文所获得的基因工程重组菌的遗传稳定性,我们同时将原始菌和重组菌每 5 天传代一次,分别在 3 个月和 12 个月之后测定了重组菌和原始菌中 CAT 酶活和产酸情况(表 1)。结果表明在经过 9 个月的传代之后,重组菌 CZ-15 中 CAT 的比酶活始终保持在原始菌 F10-1 的 50%左右。在培养了 18 代后,重组菌的十三碳二元酸产量比原始菌高 11.0%;73 代后,与原始菌相比,重组菌的十三碳二元酸产量提高了 13.8%,可见重组菌 CZ-15 的性状可以稳定遗传。这是因为热带假丝酵母属于假丝酵母属,没有有性生殖形式,因此我们获得的杂合子可以稳定遗传,并具有进一步应用于工业长链二元酸生产中的潜力。

表 1 不同世代原始菌 F10-1 与重组菌 CZ-15 的摇瓶产酸水平

Generation	Δ DCA13 (g/L)		
	F10-1	CZ-15	Increased/%
18	61.1 $\pm$ 1.2	68.3 $\pm$ 1.4	11.0
73	58.6 $\pm$ 1.6	66.7 $\pm$ 1.3	13.8

3 结论

肉毒碱乙酰基转移酶在热带假丝酵母代谢烷烃过程,尤其是脂肪酸向 β -氧化转运过程中起到关键作用。为了从基因水平调控 β -氧化过程,并且不影响菌体自身能量的供应,本文首次将负责脂肪酸运输的酶作为研究对象,用 PCR 方法扩增出热带假丝酵母中的 CAT 基因,插入潮霉素 B 抗性基因作为筛选标记,构建了重组质粒 pUCSShyg15,并整合到热带假丝酵母的基因组上,实现 CAT 基因的单拷贝敲除,得到正确而且稳定的转化子,经过初步检测,重组菌的 CAT 酶活降低 43%,产酸和烷烃摩尔转化率也得到了提高,证明思路可行,从而为今后对 CAT 与 β -氧化的关系的研究奠定了基础。

以往对热带假丝酵母的基因改造通常都是以营养缺陷型菌株为出发点,本文直接利用工业用菌株,获得 CAT 基因单拷贝敲除的基因工程重组菌,减少 β -氧化过程中脂肪酸的无谓消耗,提高了烷烃转化率与十三碳二元酸的产量,并且性状能够稳定遗传,使该基因工程菌具有工业上的应用价值。

参 考 文 献

- [1] 陈远童. 长链二元酸的用途. 微生物学通报, 2000, 27(5): 389 – 389.
- [2] 李元广, 曹竹安, 袁乃驹. 以纯烷烃为基质的石油发酵体系动力学分析. 清华大学学报, 1994, 34 : 62 – 66.
- [3] Casey J R, Dobb R, Mycock G. An effective technique for enrichment and isolation of *Candida cloacae* mutants defective in alkane catabolism. *J General Microbiology*, 1990, 136 : 1197 – 1202.
- [4] 刘树臣, 焦 鹏, 曹竹安. 热带假丝酵母代谢烷烃过程中的 β – 氧化和代谢调控. 微生物学报, 2002, 42(1): 125 – 128.
- [5] Picataggio S, Rohrer T, Deanda K, et al. Metabolic engineering of *Candida tropicalis* for the production of long – chain dicarboxylic acids. *Biotechnology*, 1992, 10 : 894 – 898.
- [6] Hara A. Repression of fatty-acyl-CoA oxidase-encoding expression is not necessarily a determinant of high-level production of dicarboxylic acids in industrial dicarboxylic-acid-producing *Candida tropicalis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 56 : 478 – 485.
- [7] Bieber L L. Carnitine. *Ann Rev Biochem*, 1988, 57 : 261 – 283.
- [8] Bieber L L, Abraham T, Helmuth T. A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase. *Anal Biochem*, 1972, 50 (2): 509 – 518.
- [9] Lisa H, James M C, Martin G. Development of an integrative DNA transformation system for the yeast *Candida tropicalis*. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(8): 4571 – 4577.
- [10] 王昌禄, 杜连祥, 顾晓波, 等. 抗酸酵母遗传特性的初步研究. 微生物学通报, 1998, 25(4): 213 – 217.

Effects of carnitine acetyltransferase gene knockout on long chain dicarboxylic acid production and metabolism of *Candida tropicalis*

GAO Hong ZHANG Jian HUA Yu-tao LI Chun CAO Zhu-an*

(Institute of Biochemical Engineering, Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract : *Candida tropicalis* can assimilate *n*-alkane as a sole carbon source and produce dicarboxylic acids (DCAs). The synthesis of DCAs is thought to be reduced by β -oxidation. Carnitine acetyltransferase (CAT) is the major enzyme to transfer DCAs into β -oxidative pathway, then DCAs would be catalyzed to generate ATP to supply cells with energy. A homologous recombination plasmid was constructed, in which CAT gene was disrupted by inserting hygromycin B resistance gene. This plasmid was used to transform *Candida tropicalis* wild type strain F10-1, and one single CAT gene knockout strain was obtained. Comparing with the wild type, the recombinant increased DCA13 yield and molar conversion of alkane by 13.0% and 11.8%, respectively, and decreased unnecessary consumption of DCAs in β -oxidation.

Key words : Carnitine acetyltransferase, DCA13, *Candida tropicalis*, Homologous recombination, Metabolic regulation

Foundation item : Chinese National Natural Science Foundation (29976022, 30000003 and 20036010); Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2003CB716007)

* Corresponding author. Tel : 86-10-62785514 ; Fax : 86-10-62780304 ; E-mail : cza-dce@mail.tsinghua.edu.cn

Received date : 05-14-2004

本 刊 重 要 声 明

为适应我国信息化建设需要,扩大作者学术交流渠道,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。如作者不同意将文章编入该数据库,请在投稿时声明,否则本刊将视为同意收录。

另外,从2002年开始,凡被本刊录用的文章均统一纳入“万方数据——数字化期刊群”,进入因特网提供信息服务。有不同意见者,请事先声明。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

读者可上网查询浏览本刊内容,并征订本刊。刊物网址: <http://wsxb.periodicals.com.cn>