

构建无抗性标记双拷贝透明质酸合成酶基因工程菌

蓝小玲, 张波, 李学如*, 李尧, 郭泰林, 孟涛, 任瑶瑶, 江南屏

西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031

摘要:【目的】探讨一种构建无抗生素选择标记链球菌透明质酸合成酶基因工程菌的方法。【方法】PCR 扩增链球菌透明质酸合成酶操纵子 *hasABC* 基因, 用温度敏感载体 pJR700 构建携带 *hasABC* 基因重组质粒 pXL32; 电转化 pXL32 质粒到马链球菌兽疫亚种感受态细胞, 卡那霉素 (Kanamycin, kan) 平板 37℃ 培养筛选重组子, 在不含 kan 液体培养基中 30℃ 传代, 37℃ 平板分离挑取抗生素敏感菌落, RT-PCR 检测工程菌染色体 *hasABC* 基因表达, Bitter-Muir 法测定菌体透明质酸含量。【结果】在无抗生素选择压力条件下, 获得透明质酸产率提高 34% 的马链球菌兽疫亚种透明质酸合成酶基因工程菌。【结论】用 pJR700 温度敏感载体系统, 构建能提高透明质酸产量的无抗生素选择标记的基因工程菌是可行的。

关键词: 透明质酸合成酶操纵子, 温度敏感质粒, 菌透明质酸基因工程菌, 马链球菌兽疫亚种

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 03-0396-06

马链球菌兽疫亚种 (*Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*, GCS) 是工业生产透明质酸 (Hyaluronic acid, HA) 的主要菌种, 由于该菌有一定的致病性^[1-2], 因此, 利用该菌发酵生产透明质酸的安全性是人们一直担心的问题。自 DeAngelis 等^[3] 1993 年成功克隆和表达化脓性链球菌透明质酸合成酶 (Hyaluronic acid synthase, Has) 基因以来, 构建安全、高效生产透明质酸的工程菌, 受到研究者关注。目前所报道的文献主要集中在将链球菌透明质酸合成酶操纵子相关基因通过表达载体转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*)^[4]、枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)^[5]、乳酸链球菌 (*Lactococcus lactis*)^[6] 和土壤农杆菌 (*Agrobacterium* sp.)^[7] 等安全宿主, 但这些工程菌透明质酸产率与目前生产上使用的马链球菌兽疫亚种相比, 还不能达到工业化的要求, 因此通过基因工程的方法, 改造现有透明质酸生产菌, 被认为

是目前获得安全高产透明质酸生产菌的有效途径之一。

前期我们用温度敏感自杀性载体系统, 成功构建无抗生素标记的马链球菌兽疫亚种毒力基因缺失突变株^[8], 为今后进一步构建多个毒力基因缺失无毒突变株打下了基础。这里我们报道用温度敏感自杀性载体系统构建无抗生素选择压力的透明质酸合成酶基因工程菌, 研究结果不仅获得一种提高菌株透明质酸产率的方法, 同时也为通过基因工程的方法提高的微生物代谢产物提供了多一种选择。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株: 质粒 pJR700 由美国 Georgia 州立大学 Dr. Eichenbaum 实验室惠赠, Kan 抗性, 温

基金项目: 国家自然科学基金 (31070117); 中央高校基本科研业务专项资金 (SWJTU11ZT25)

* 通信作者。Tel: +86-28-87600990; E-mail: xueruli@sina.com

作者简介: 蓝小玲 (1986-), 女, 江西省赣州人, 硕士研究生, 生物化学与分子生物学专业。

收稿日期: 2011-09-27; 修回日期: 2012-01-09

度敏感;质粒 pXL32 本实验所构建,由质粒 pJR700 衍生而来,携带透明质酸合成酶 *hasABC* 基因,kan 抗性,温度敏感;马链球菌兽疫亚种野生菌株由本实验室前期构建^[8];大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 为本实验室保存。

1.1.2 培养基和菌株培养:链球菌 THY 液体培养基:3% Tod-Hewitt, 0.2% Yeast extract; THY 固体培养基:THY 液体培养基加 1.8% 琼脂;透明质酸发酵培养基:4% 葡萄糖, 1.5% 酵母浸膏, 0.2% KH₂PO₄, 0.06% MgSO₄, 0.02% NaCl, pH7.0;大肠杆菌 DH5 α 培养基:LB (Luria-Bertani) 培养基。培养条件及方法:链球菌基因工程菌构建 37 $^{\circ}$ C 或 30 $^{\circ}$ C 静置培养;链球菌产透明质酸发酵 220 r/min 摇瓶 37 $^{\circ}$ C 培养;

大肠杆菌 37 $^{\circ}$ C 摇瓶培养。根据细菌培养需要,固体或液体培养基中加入终浓度 70 μ g/mL 卡那霉素。

1.1.3 主要试剂:链球菌 Tod-Hewitt 培养基 (Bacto 公司);内切酶 *Cla* I, T4 连接酶,PCR 产物纯化试剂盒,胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒 (宝生物工程 (大连) 有限公司);高保真 DNA 聚合酶,透明质酸水解酶和 D-葡萄糖醛酸 (Sigma 公司);革兰阳性菌 DNA 提取试剂盒 (Epicentre 公司);细菌 RNA 纯化试剂盒 (Ambion 公司);Superscript III 反转录酶 (Invitrogen 公司)。

1.2 引物设计

用 Vector NTI AdvanceTM 11 软件 (Invitrogen 公司) 完成实验所用引物设计 (表 1)。

表 1 本研究使用的引物
Table 1 Primers used in this study

Primers	Location	Sequence(5' \rightarrow 3')	Restriction site
XLS2	<i>hasABC</i>	GGGGGATCGATGAGCTCCTTATAGAATTGCTTTG	<i>Cla</i> I
XLR2	<i>hasABC</i>	GGGGGATCGATGTGAGATACCAATCCTCTAG	<i>Cla</i> I
XLS3	<i>hasA</i>	GAGCTCCTTATAGAATTGCTTTG	
XLR3	<i>hasA</i>	GATACCTTAGTACAGTTAGCTAC	
XLS4	<i>recA</i>	AAAATTTGGTGATGAACGTC	
XLR4	<i>recA</i>	CCTTTTATTGTGTTGTTCC	

1.3 马链球菌兽疫亚种 *hasABC* 双拷贝基因工程菌的构建

1.3.1 马链球菌兽疫亚种基因组 DNA 提取:马链球菌兽疫亚种基因组 DNA 的提取方法按 Epicentre 公司 MasterPurTM 革兰阳性 DNA 纯化试剂盒指导进行。

1.3.2 马链球菌兽疫亚种感受态细胞的制作:参照文献 [8] 方法进行,马链球菌兽疫亚种接种在加含甘氨酸 0.6% 的 THY 培养基 37 $^{\circ}$ C 培养过夜,按 1:30 的比例将过夜培养物接种到新鲜培养基中 (含 0.6% 的甘氨酸和 100 μ g/mL 的透明质酸水解酶), 37 $^{\circ}$ C 培养到光密度值 (*OD*₆₀₀) 0.20 - 0.3, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 等体积的冷无菌双蒸水洗一次, 15% 冷甘油溶液洗两次后, 将细胞悬于 15% 甘油溶液中, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.3 工程菌的构建:参照文献^[8] 稍作修改,用温度敏感 pJR700 载体系统,构建染色体双拷贝 *hasABC* 目的基因链球菌工程菌原理图 1 所示,根据 GenBank 数据库马链球菌兽疫亚种全基因组序列,用 Vector NTI 软件设计含 *Cla*I 酶切位点的一对引物

XLS2 和 XLR2,以基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 *hasABC* 基因,*Cla*I 酶切 PCR 产物和 pJR700, T4 连接酶连接,得到质粒 pXL32,电转化到马链球菌兽疫亚种感受态细胞,涂布于 kan 平板,37 $^{\circ}$ C 过夜培养,挑取单菌落,接种到含 kan 的液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养到对数生长末期,按 1:100 接种于新鲜的含 kan 的液体培养基中,重复 3 - 5 次,按 1:100 接种到不含 kan 液体培养基中,30 $^{\circ}$ C 培养到对数生长末期,按 1:100 接种到不含 kan 液体培养基中,重复 3 - 5 次,取适量稀释菌液涂布于不含 kan 平板,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,挑取数个单菌落分别点接到含 kan 和不含 kan 平板,37 $^{\circ}$ C 过夜培养,选取在含 kan 平板上不生长的 kan 敏感菌株,接种于新鲜液体培养基,进行进一步实验。

1.4 RT-PCR 确定工程菌 *hasABC* 基因表达

参照文献^[9] 介绍的方法,离心收集对数生长期菌体,加入 1 mL Qiagen 公司 RNA 保护剂悬浮细胞,然后按 Ambion 公司 RiboPure 细菌 RNA 纯化试剂盒的方法提取马链球菌兽疫亚种 RNA。RT-PCR 检测 *hasA* 和 *recA* 基因表达,按 Invitrogen 公司的

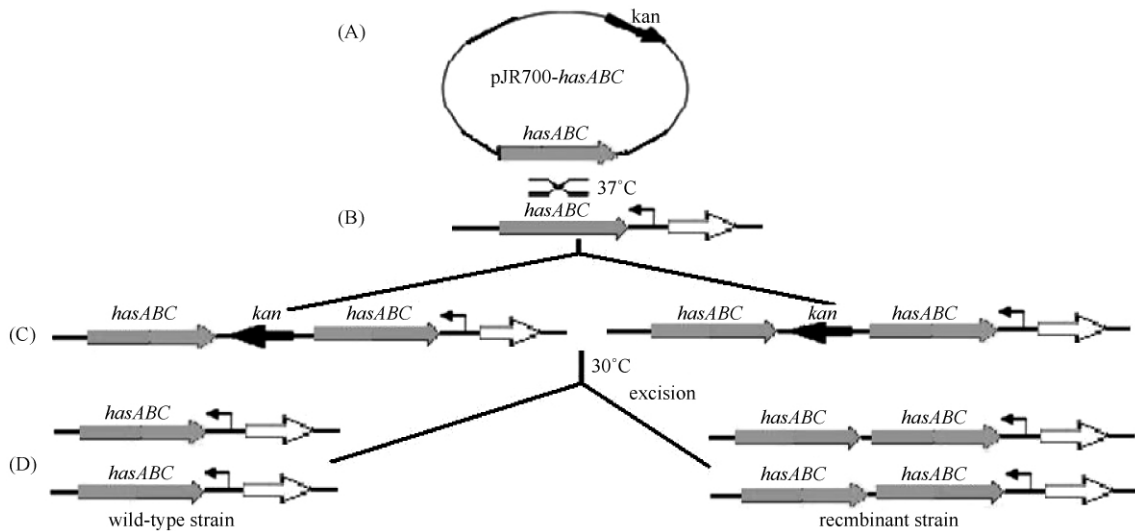


图1 构建双拷贝透明质酸合成酶基因工程菌原理

Fig.1 The strategy of constructing the *hasABC* recombinant strain. The plasmid (depicted as a circle, A) bearing streptococcal *hasABC* gene was constructed as described in Materials and Methods. The DNA fragment of *hasABC* was subcloned into the pJR700 plasmid at *Cla*I sites. This plasmid contains a pBR322 origin of replication that is active in *Escherichia coli* at 37°C, a temperature-sensitive, gram-positive origin of replication active at 30°C but not at 37°C, and a kanamycin resistance gene for selection. The recombinant plasmid pJR700/*hasABC* was transformed into *S. zooepidemicus* strain with electroporation. The homologous recombination (B) was induced by growing the bacteria at 37°C, and transformants were selected according to kanamycin resistance. A second homologous recombination event was triggered by growing bacteria at 30°C without antibiotics (C), resulting in excision of the indicated fragment, leaving the organism kanamycin sensitive in streptococcal duplication *hasABC* gene or wild type in streptococcal (D).

Superscript III 反转录酶试剂盒说明书进行, 2.5 μg 总 RNA 为模板与目的基因 PCR 引物 XLS3、XLR3、XLS4 和 XLR4 以及 dNTP 和 Superscript III 反转录酶混合, 55°C 反应 60 min, 70°C 处理 20 min 灭活酶。以 1.5 μL 上述反应产物为模板, 循环 20 次, PCR 扩增目的基因 *hasA* 和 *recA*。

1.5 重组菌与野生菌发酵液透明质酸含量的测定

用 Bitter-Muir 法^[10]制作 D-葡萄糖醛酸含量标准曲线; 发酵液中 HA 测定, 按文献^[4]介绍的方法进行, 用接种环挑取斜面培养基上培养 24 h 的 *hasABC* 工程菌和野生菌株, 接种到 50 mL 的种子培养基中, 37°C, 220 r/min 振荡培养 12 h, 作为种子, 再以 10% 接种量接入新鲜发酵培养基中, 进行发酵培养, 培养 18 h 后取出培养液, 加入相同体积的 0.1% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 溶液, 室温静置 10 min; 加入 2 倍体积无水乙醇, 混匀后在 4°C 静置 1 h; 室温下 3000 r/min 离心 20 min; 取沉淀, 加入 1 体积的 0.1 mol/L 的氯化钠溶液重悬浮, 室温下静置 10 min; 取 1 mL 样品用 Bitter-Muir 法测定 HA 含量。

2 结果

2.1 携带透明质酸合成酶 *hasABC* 基因温度敏感重组载体 pXL32 构建

用 Vector NTI Advance™ 11 软件分析马链球菌兽疫亚种基因组中透明质酸合成酶操纵子, 结果图 2-A 表明, 该操纵子与透明质酸合成相关的 3 个关键基因分别是 *hasA*、*hasB* 和 *hasC*。以 XLS2 和 XLR2 为引物, 通过 PCR 扩增, 可获得含 *hasA*、*hasB* 和 *hasC* 3 个基因, 碱基数为 4147 bp 的 DNA 片段, 该片段的 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析 (图 2-B) 和纯化后送测序公司测序证实, 与野生型马链球菌兽疫亚种透明质酸合成酶 *hasABC* 基因序列一致 (测序结果未列出)。将携带 *hasABC* 基因的重组质粒 pXL32 和温度敏感载体 pJR700 进行琼脂糖凝胶电泳分析, 结果图 2-C 表明质粒 pXL32 大约 10000 碱基, 比 pJR700 增加了 4100 左右的碱基, 表明重组质粒 pXL32 构建成功。

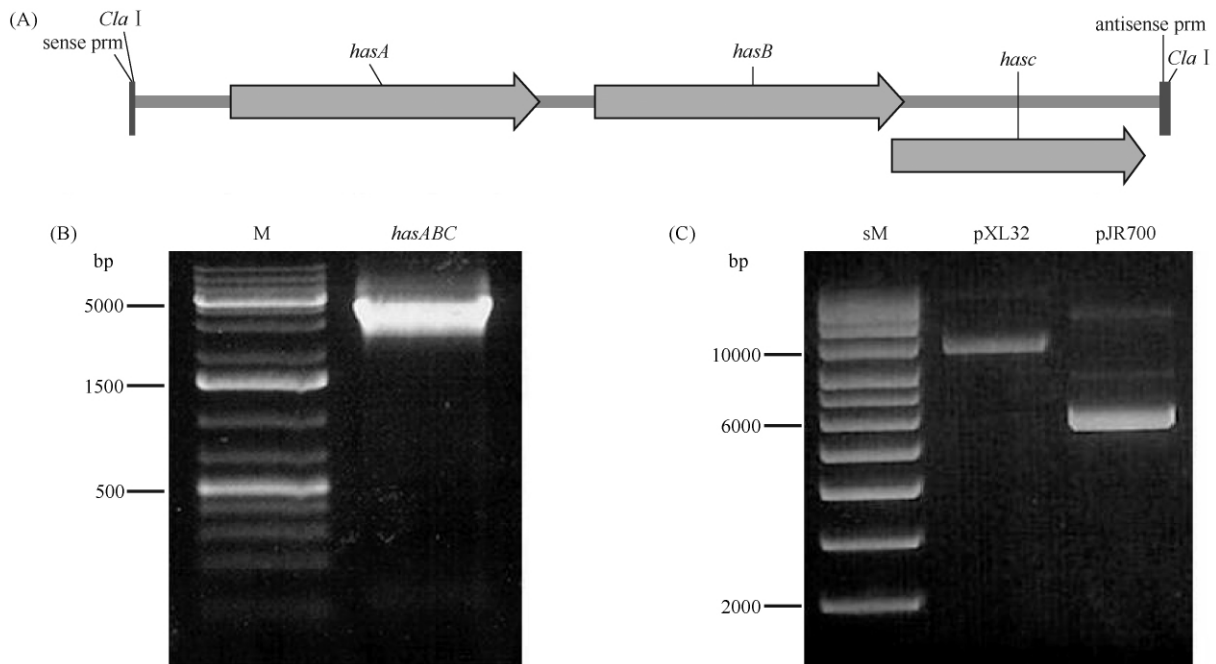


图2 Vector NTI 软件和琼脂糖凝胶电泳分析链球菌透明质酸合成酶操纵子 *hasABC*

Fig.2 The analysis of streptococcal *hasABC* by Vector NTI (A) and agarose gel electrophoresis (B and C). *hasABC*: PCR product of *hasABC*; pXL32: recombinant plasmid; pJR700: thermosensitive delivery vector; M: DNA marker. sM: superhelical DNA marker.

2.2 马链球菌兽疫亚种 *hasABC* 基因工程菌的确认

2.2.1 RT-PCR 分析工程菌 *hasABC* 基因的表达：以本实验构建的基因工程菌株和野生菌株的总 RNA 为模板，用 *hasA* 基因 PCR 引物 XLS3 和 XLR3，链球菌 *recA* 看家基因 PCR 引物 XLS4 和 XLR4，进行 RT-PCR 检测工程菌和野生菌株相关基因表达，实验结果图 3 显示，实验所用野生菌株和重组菌株

的总 RNA 和链球菌 *recA* 看家基因 PCR 产物没有差异，但是基因工程菌 *hasA* 基因的表达比野生型菌株有所增强，结果说明本研究构建的 *hasABC* 基因工程菌在基因表达水平上是成功的。

2.2.2 链球菌 *hasABC* 工程菌稳定性和发酵生产透明质酸结果分析：为了检测所构建的基因工程菌发酵生产透明质酸情况以及工程菌遗传的稳定性，我们挑取 20 个重组菌落，用 Bitter-Muir 法检测野生菌株和不同传代代数的 *hasABC* 工程菌发酵生产透明质酸产率。实验结果图 4 显示，工程菌传代 1、5 和 10 代后，透明质酸产量均能稳定在 1.28 g/L 以上，比出发野生菌株 (0.96 g/L) 提高 34%，表明工程菌株传代后生产透明质酸遗传性能稳定，用温度敏感质粒 pJR700 构建 *hasABC* 基因工程菌获得成功。

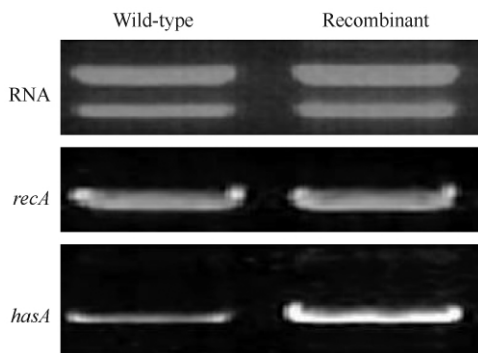


图3 RT-PCR 分析野生菌和重组菌 *hasA* 基因表达

Fig.3 Analysis of *hasA* genes expression in wild-type strain and *hasABC* recombinant by RT-PCR. Total RNA was loaded (1 μg/well) on an agarose gel. RT-PCR products obtained with *recA*-specific primers (used to control for equal amounts of RNA template) or with *hasA*-specific primers were analyzed by agarose gel electrophoresis. Wild-type: wild-type strain; Recombinant: *hasABC* recombinant strain.

3 讨论

透明质酸是一种普遍存在脊椎动物中的线性多糖，也是一些致病细菌，主要是 A 和 C 组链球菌荚膜的主要成分，透明质酸合成酶 (Has) 是合成透明质酸的关键酶，透明质酸产量与透明质酸合成酶操纵子相关基因拷贝数相关，增加马链球菌兽疫亚种

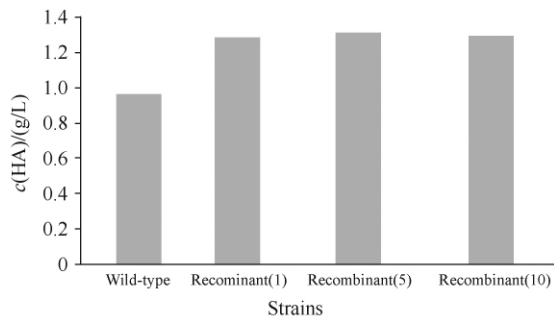


图4 基因工程菌发酵生产透明质酸和遗传的稳定性分析

Fig.4 Accumulation of HA in shake flask culture broth of wild-type strain and *hasABC* recombinant strain. Recombinant (1), recombinant (5) and recombinant(10) were 1 passages, 5 passages and 10 passages of recombinant strain respectively. HA production by stains and HA mensuration were to see Materials and Methods. 5 mL of seed culture medium was transferred into 50 mL HA Fermentation medium and inoculated on a rotary shaker at 220 r/min and 37°C for 18 h. The HA concentration was measured by the carbazole method based on uronic acid determination.

透明质酸合成酶基因数量能提高透明质酸产量^[11]。郝宁等^[12]将马链球菌兽疫亚种的透明质酸合成酶操纵子 *hasABC* 插入到革兰阳性菌表达质粒 pEU308 将构建的质粒电转化到马链球菌兽疫亚种菌株,透明质酸产量与野生菌株相比能提高 30% 左右,但该方法获得的 *hasABC* 为表达载体所携带,需要抗生素选择压力。我们将马链球菌兽疫亚种透明质酸合成酶 *hasABC* 插入到 pJR700 温度敏感载体,构建携带 *hasABC* 基因的温度敏感性重组质粒 pXL32 将该质粒载体转到马链球菌兽疫亚种突变株,获得无抗生素选择标记的 *hasABC* 基因工程菌,工程菌的透明质酸产量比出发菌株提高了 34%。我们将构建的 *hasABC* 工程菌和野生菌株取 1.5 个单位培养液的细胞,裂解后进行 SDS-PAGE 电泳分析显示(本报道未列出) *hasABC* 基因工程菌在分子量近 48、45 和 33 kDa 处蛋白表达有所的增加,同时重组菌一些蛋白表达较野生菌有所降低,表明链球菌染色体上引入 *hasABC* 基因后,可能对其他蛋白表达有抑制作用,这不难理解,透明质酸的合成与菌株代谢有关,链球菌染色体上携带 *hasABC* 基因拷贝数的增加,必定对菌株代谢产生影响,进而影响菌株一些蛋白的表达^[13],至于 *hasABC* 基因工程菌与野生菌蛋白表达的差异我们将进一步通过双向凝胶电泳和质谱分析予以确认。

与目前已报道的提高基因拷贝数不同的是,本研究运用链球菌特异性温度敏感自杀性质粒 pJR700,获得的透明质酸合成酶 *hasABC* 基因工程菌,克服了利用一般表达载体构建工程菌必须添加抗生素作为选择压力所带来的生产成本的提高和添加抗生素造成的环境污染。本研究使用链球菌特异性温度敏感载体系统,近年来被广泛用于链球菌单个或多个基因缺失突变株的构建^[8-9],本实验用这一温度敏感基因载体系统,成功构建透明质酸合成酶 *hasABC* 基因工程菌,为通过基因工程的方法提高的微生物代谢产物提供了多一种选择。

致谢 pJR700 温度敏感载体由美国 Georgia 州立大学生物系 Dr. Eichenbaum 惠赠。

参考文献

- [1] Chong BF, Blank LM, McLaughlin R, Nielsen LK. Microbial hyaluronic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 64: 341-351.
- [2] 范红结,陆承平. 链球菌兽疫亚种毒力因子. 国人兽共患病学报 (*Chinese Journal of Zoonoses*), 2006, 22 (3): 927-932.
- [3] DeAngelis PL, Papaconstantinou J, Weigel PH. Molecular cloning, identification, and sequence of the hyaluronan synthase gene from Group A *Streptococcus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268: 19181-19184.
- [4] Yu H, Stephanopoulos G. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. *Metabolic Engineering*, 2008, 10(1): 24-32.
- [5] Widner B, Behr R, Von Dollen S, Tang M, Heu T, Sloma A, Sternberg D, Deangelis PL, Weigel PH, Brown S. Hyaluronic Acid Production in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(7): 3747-3752.
- [6] Chien LJ, Lee CK. Hyaluronic acid production by recombinant *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 77(2): 339-346.
- [7] Mao Z, Chen RR. Recombinant synthesis of hyaluronan by *Agrobacterium* sp.. *Biotechnology Progress*, 2007, 23 (5): 1038-1042.
- [8] 李尧,蓝小玲,李学如,郭泰林,姚宁,江南屏,任瑶瑶. 一种构建马链球菌兽疫亚种血红素受体基因缺失突变株的方法. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2010, 50(6): 822-827.

- [9] Fisher M, Huang YS, Li X, McIver KS, Toukoki C, Eichenbaum Z. Shr is a broad-spectrum surface receptor that contributes to adherence and virulence in Group A *Streptococcus*. *Infection and Immunity*, 2008, 76(11): 5006-5015.
- [10] Bitter T, Muri HM. A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical Biochemistry*, 1962, 4(6): 330-334.
- [11] Blank LM, Hugenholtz P, Nielsen LK. Evolution of the hyaluronic acid synthesis (*has*) operon in *Streptococcus zooepidemicus* and other pathogenic streptococci. *Journal of Molecular Evolution*, 2008, 67(1): 13-22.
- [12] 郝宁, 张晋宇, 陈国强. 兽疫链球菌中表达 *vgb* 基因和透明质酸合成基因提高透明质酸产量. 中国生物工程杂志 (*Chinese Journal of Biotechnology*), 2005, 25(6): 56-60.
- [13] Wu TF, Huang WC, Chen YC, Tsay YG, Chang CS. Proteomic investigation of the impact of oxygen on the protein profiles of hyaluronic acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. *Proteomics*, 2009, 9: 4507-4518.

Constructing duplication *hasABC* of chromosome recombinant in *streptococcus equi* subsp. *zooepidemicu*

Xiaoling Lan, Bo Zhang, Xueru Li*, Yao Li, Tailin Guo, Tao Meng, Yaoyao Ren, Nanping Jiang

School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China

Abstract: [Objective] To investigate the possibility of increasing the yield of hyaluronic acid by constructing duplication *hasABC* of chromosome recombinant in *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus* with a thermosensitive delivery vector system pJR700. [Methods] We amplified a 4147 bp DNA fragment of hyaluronic acid synthase operon *hasABC* genes from chromosome of *S. zooepidemicus* using PCR. This DNA fragment was subcloned into the pJR700 at *ClaI* sites to result in recombinant plasmid pXL32. The recombinant plasmid was transformed into *S. Zooepidemicus* by electroporation. The homologous recombination was induced by growing the bacteria at 37°C, and transformants were selected according to kanamycin resistance for 3 rounds. Then the culture was shifted to grow at 30°C without antibiotics for 4 rounds to induce excision of the pJR700 indicated fragment. Colonies with kanamycin sensitivity were selected by plating on THY agar at 37°C. The *hasABC* recombinant of *S. Zooepidemicus* was identified through RT-PCR with primers homologous to the flanking regions. HA titers were measured by the modified carbazole assay. [Results] We constructed successfully the duplication *hasABC* of chromosome recombinant of *S. Zooepidemicus* and the HA titer production by recombinants harboring duplication *hasABC* was 34% higher than that of the wild type at 24 h in shake flask culture. [Conclusion] The thermosensitive delivery vector of pJR700 could be used to construct the streptococcal *hasABC* recombinant strain for increasing the yield of HA in *S. Zooepidemicus*.

Keywords: Hyaluronic acid synthase operon, thermosensitive plasmid, *hasABC* recombinant strain, *streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31070117) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (SWJTU11ZT25)

* Corresponding author. Tel: +86-28-87600990; E-mail: xueruli@sina.com

Received: 27 September 2011/Revised: 9 January 2012