

## 整合型 *vgb* 基因载体的构建和研究

吴 奕 杨胜利

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

**摘 要** 运用染色体-质粒同源基因重组的方法将外源 *Vitreoscilla* 血红蛋白基因 (*vgb*) 整合在大肠杆菌 JM105 染色体的苏氨酸操纵子位置上, 构建单拷贝的 *vgb* 表达载体 VG1。VG1 保持了 *vgb* 基因的生理功能, 可在低氧条件下表达 *Vitreoscilla* 血红蛋白使细胞适应贫氧环境; 同时它克服了以质粒作为表达载体时 *vgb* 基因剂量和表达量过高带来的生理负担, 因此可作为一种适于高密度培养的基因工程宿主菌。实验结果还显示 *vgb* 基因的表达使 VG1 与普通大肠杆菌相比在低氧条件下仍能维持较高的呼吸强度, 说明 *vgb* 基因产物参与了细胞处于低氧水平时的代谢过程。

**关键词** 同源重组, *Vitreoscilla* 血红蛋白, 宿主, 呼吸代谢

在已报道的研究中, *Vitreoscilla* 血红蛋白基因 (*vgb*) 被插入各种抗性和复制型的质粒中进行表达, 并证明胞内表达的血红蛋白 (VHb) 可以在贫氧条件下提高发酵密度和目的产物蛋白的表达量<sup>(1)</sup>。但是宿主细胞含有表达目的基因和 *vgb* 基因的两个质粒以及由基因剂量造成 VHb 蛋白的过量表达, 都会给细胞带来严重的生理负担, 从而削弱 *vgb* 基因的功能。把 *vgb* 基因整合入宿主细胞染色体 DNA 中构建成整合型载体可望避免这样的负作用。

将外源基因整合入 *E. coli* 染色体 DNA 的方法通常是先把外源基因 DNA 片段插入转座基因或噬菌体 DNA 中, 再由转座子或噬菌体携带此外源基因随机整合到宿主染色体 DNA 中<sup>(2)</sup>。这种方法筛选工作量大, 整合位置不确定, 也可能造成某些基因的敲除而影响细胞正常的生理功能。这里我们参考染色体基因敲除诱变的方法<sup>(3)</sup>, 发展了同源基因交换的方法将 *vgb* 基因整合入大肠杆菌染色体的固定位置, 构建成单拷贝的 *vgb* 基因表达载体 VG1, 大大减少了筛选工作量, 而且整合位置确定, 可避免对细胞代谢功能的不利影响。

### 1 方法原理

同源基因交换法整合外源基因的原理和过程可由图 1 示意。首先构建一个质粒含细菌染色体基因 *a*, 抗性结构基因 *r1* 和抗性筛选标记 *R2*, 如图 1 质粒 I, 其中基因 *a* 和 *r1* 置于同一启动子 *Pr* 的下游获得表达, 含质粒 I 的细胞表型为  $A^+R1^+R2^+$ , 这时将转录终止子 *t* 插入质粒 I 的 *a* 基因中间, 把 *a* 基因分为 *a1* 和 *a2* 两部分, 构成质粒 II, 质粒 II 上 *a* 基因和 *r1* 基因的转录在过程中被终止, 含质粒 II 的细胞表型为  $A^+R1^sR2^+$ , 然后把需整合的 DNA 片段 *b* 入质粒 II 上 *a1* 和 *t* 之间, 构成质粒 III 的形式, 基因 *b* 由启动子 *Pr* 启动表达, 含质粒 III 的细胞表型为  $A^+R1^sR2^+$ , 质粒 III 与染色体 DNA 在 *a* 基因附近进行同源

交换, 如图 1-IV。其中一种结果是质粒 III 上的 DNA a1 和 a2 携带基因 b 和终止子 t 与染色体 a 基因发生交换, 染色体上 a 基因的转录被 t 终止, b 基因整合在 a 基因位置上, 同时染色体 a 基因交换到质粒上使其构成质粒 V 的形式, 抗性结构基因 r1 重新获得表达, 经过同源交换后细胞的表型为 A<sup>+</sup>R1'R2', 比较图 1-III 和图 1-V DNA 同源交换前后两种细胞的表型, 我们可以通过抗性 R1 的正筛选得如图 1-V 的交换结果。利用质粒的分配不稳定性可以得到丢失质粒 V 的宿主细胞, 它的基因型为 a-b+, 基因 b 已整合在其染色体基因 a 上了。虽然最后获得宿主细胞需要通过抗性 R1 和 R2 的负筛选, 但筛选量仍比运用转座基因的方法小得多, 而且成功率高。

## 2 材料与方 法

### 2.1 菌种与质粒

质粒构建和菌种筛选为常规重组 DNA 技术和微生物操作<sup>[4]</sup>。限制酶为 Boehringer

Mannheim 或 Promega 的产品, 氨基酸、维生素和生物素购自华美生物工程公司; 其它均为国产试剂。

表 1 菌种和质粒一览表

Table 1 Strains and plasmids

Strain/plasmid	Genotype	Source
JM105	endA1, hsdR, supE, sbcB15, Δlac	This lab.
C600	F-, thi1, thrB, leu, lacY1, supE44	This lab.
VG1	endA1, hsdR, supE, sbcB15, Δlac, thr, vgb+	This study.
pVH1	vgb+	This lab <sup>[3]</sup> .
pVH2	vgb+	This lab <sup>[3]</sup> .
pTH2	thrA+, thrB+	This lab <sup>[5]</sup> .
pYEJ001	cat-	Pharmacia
pTHAVH	thrA+, vgb+	This study.
pTHB	thrB+	This study.
pCAT-12	cat+	This study.
pRW001	thrB-	This study.
pRW002	thrB-	This study.
pRW003	thrB-	This study.
pRW004	thrB-, cat-	This study.
pRW015	thrA+, vgb+	This study.
pRW022	thrA+, thrB+, vgb-, cat+	This study.
pRW025	thrA+, thrB-, vgb+, cat-	This study.

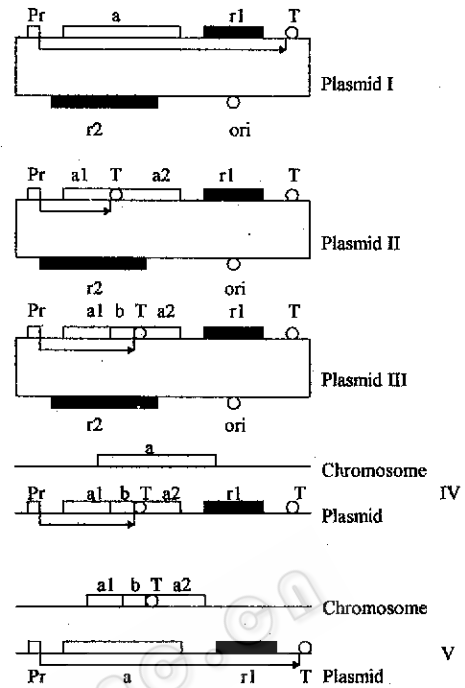


图 1 同源基因交换法整合外源基因的原理图  
Fig. 1 Principle of site-directed integrating by double recombination of homologous genes. a, a1, a2 Homologous gene; b. Heterologous gene, ori. Replication origin; Pr. Promotor; r1, r2. Resistance gene; T. Terminator; Arrow. Gene transcription direction.

为了避免在质粒构建过程中可能产生的质粒-染色体基因交换给构建工作带来的干扰, DNA 重组过程采用苏氨酸营养缺陷型菌株 C600 作为宿主。

基本培养基组成 (g/L):  $K_2HPO_4$  7.0;  $KH_2PO_4$  2.0;  $(NH_4)_2SO_4$  10; 柠檬酸钠 0.5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.0; 葡萄糖 2.0; 氨基酸 (Lys、Met、Asp、Leu、Ile、Pro、Glu) 20mg/L; 维生素  $B_1$  5.0mg/L; 生物素 0.5mg/L; 根据需要加或不加 Thr 20mg/L; 琼脂粉 1.5%。

## 2.2 摇瓶培养

LB 培养基, 装量为 100ml/250ml, 37℃, 100r/min, (NBS 往复式) 培养 16h。

## 2.3 发酵罐培养

采用 2.5L 发酵罐 (MBR BIOREACTOR LTD. SWITZLAND), LB 培养基, 分批培养, 搅拌转速 500r/min, 通气量为 0.7L/min, 培养温度 37℃; 停止通气, 溶氧水平下降, 记录溶氧值随时间的变化可测得细胞呼吸特性。

呼吸强度  $Q$  可由下式计算:

$$Q = (\Delta c_{O_2}) / (\Delta t \cdot X)$$

其中,  $Q$  为呼吸强度,  $mgO_2/gDCWmin$ ;

$\Delta c_{O_2}$  为氧浓度的变化,  $mgO_2/L$

$X$  为细胞密度,  $gDCW/L$ ;

DCW 为细胞干重。

## 2.4 流加培养

在分批培养 8~10h 后流加培养基, 培养基组成为 (g/L): 葡萄糖 40; Tryptone 30; Yeast extract 15;  $MgSO_4$  10, 流加速率为 50ml/h, 搅拌转速为 500r/min, 通气条件为 0.5L/min。

## 2.5 *Vitreoscilla* 血红蛋白含量测定

按文献 [1] 方法操作。

# 3 结 果

## 3.1 构建过程

从含苏氨酸操纵子基因 (thr) 的质粒 pTH2 出发, 经一系列 DNA 重组, 构建成为用于同源基因交换的质粒 pRW025, 期间的 DNA 重组过程由图 2 表示。

pTH2 由 Cla I 和 Pvu I 双酶解可获得含 thrA 的 3.1kb DNA 片段, 它携带苏氨酸启动子部分 ( $P_{thr}$ ), 该片段与 vgb 基因与 vgb 基因上游相连, 可获得含 thrA 和 vgb 的质粒 pRW015; 0.5kb 含 thr 基因的 DNA 片段由一系列亚克隆转移到质粒 pKK232-8 中强转录终止子 rrnBT1 下游, 构建为质粒 pRW002; 抗性基因则来自质粒 pYEJ001 在所携带的氯霉素酰基转移酶基因 (cat)。在此基础上将 thrA-vgb-nnrBT1-thrB-cat 五段基因拼接在一起, 构建成为质粒 pRW025。

## 3.2 同源交换与筛选

将构建好的质粒 pRW025 转入 *E. coli* JM105 中, 挑取一个转化单菌落接入 2ml LB (Ap 100 $\mu$ g/ml) 培养基中, 在 37℃ 摇床中培养 16h, 取 150 $\mu$ l 菌液涂布在双抗性平板上, 选择压力为 Ap100 $\mu$ g/ml、Cm250 $\mu$ g/ml, 筛选具有氨苄青霉素和氯霉素双重抗性的同源交换子。每块板可筛到 20~30 个菌落。

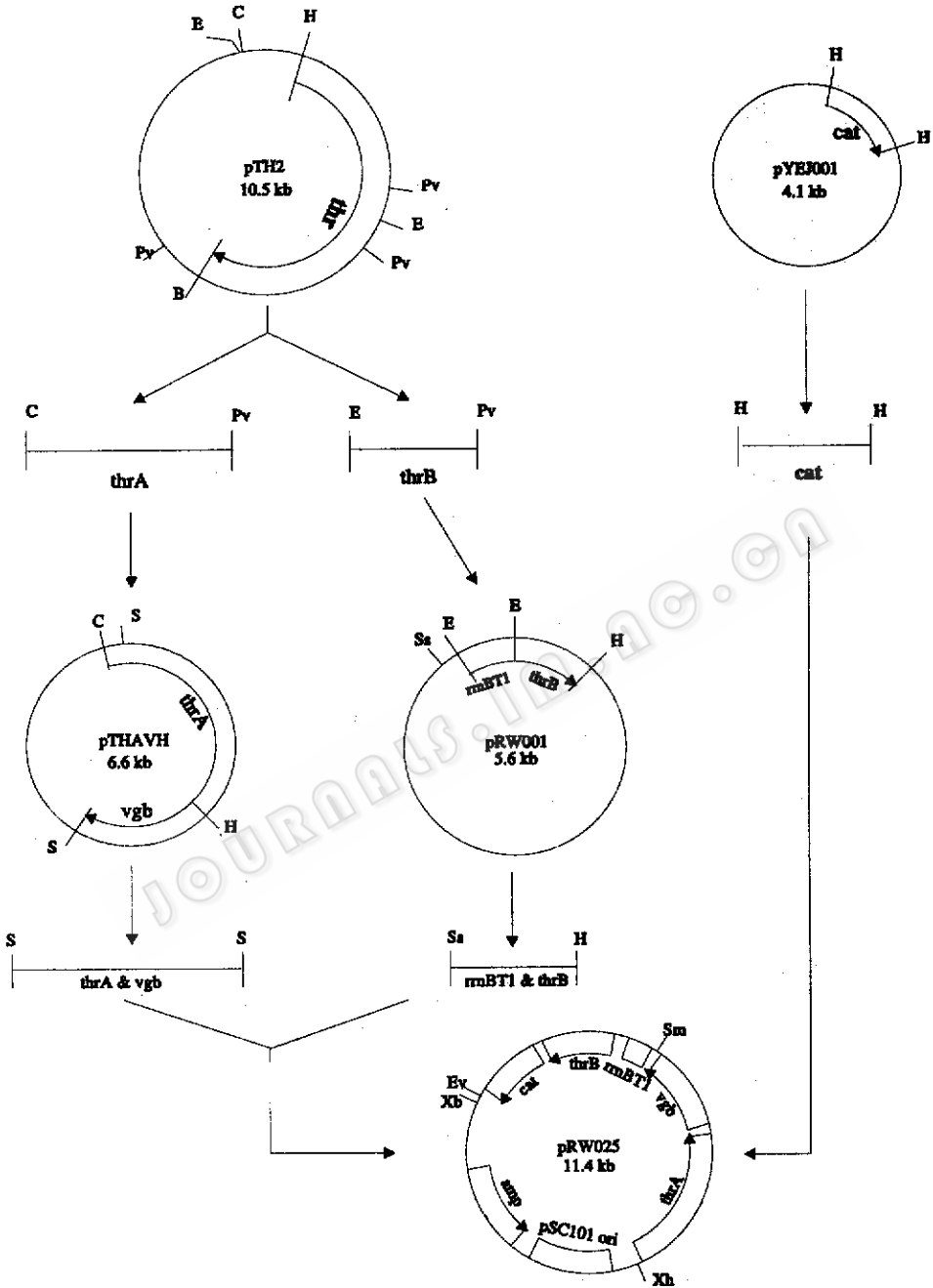


图 2 用于同源基因交换的质粒 pRW025 的构建过程

Fig. 2 Construction of plasmid pRW025

B-BamH I ; C-Cla I ; E-EcoR I ; Ev-EcoR V ; H-Hind II ; N-Not I ; Pv-Pvu I ; S-Sal I ; Sm-SmaI ; Se-SspI ; Xb-Xba ; Xh-Xho I .

挑取若干筛选到的菌落经小量培养后抽提质粒进行分析，发现这些菌体均携带同样

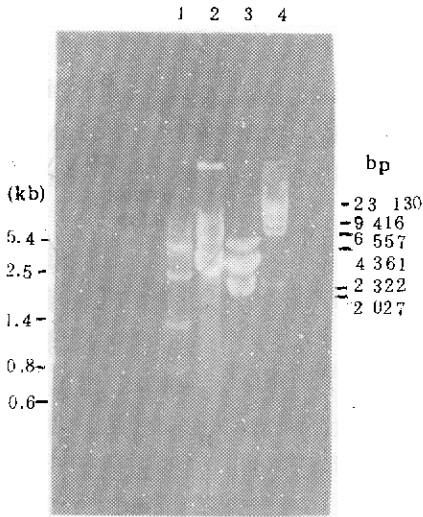


图 3 同源交换前后质粒图谱分析

Fig. 3 Analysis of plasmid before and after double recombination

- Lane 1. Before recombination, pRW025 digested by BamH I, Sal I and Hind III, ~5.4kb band is vector DNA, ~2.5kb band is thrA fragment, ~1.4kb band is vgb fragment, ~0.8kb band is cat fragment, ~0.6kb band is thrB fragment;
- Lane 2. After recombination, pRW022 digested by BamH I, Sal I and Hind III, ~0.4kb band is thr fragment;
- Lane 3. pTH2 digested by Hind III, BamH I and EcoR which the 4.0kb band coincide with the corresponding thr fragment in lane 2;
- Lane 4.  $\lambda$  DNA/Hind III marker.

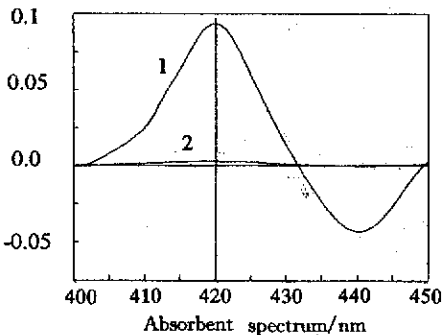


图 4 整合型 vgb 基因宿主的 CO 差光谱分析

Fig. 4 CO-spectrum analysis of the vgb-integrated cell

1. VG1, 2. JM105

的质粒(命名为 pRW022), 对质粒 pRW025 和 pRW022 作酶切分析, 二者的物理图谱存在明显的差异, 见图 3。这说明在培养过程中 pRW025 已与宿主细胞染色体 DNA 进行了同源基因交换。

为了更有效地将 pRW022 从双抗筛选子中缺失, 我们将与 pRW022 复制类型相同的载体 pWKS130 (pSC101 型, Kan<sup>r</sup>) 转入双抗筛选子中, 质粒的不相容性易造成它在分配过程中失落。转化后的细胞在 2ml LB 培养基中 37℃ 培养过夜, 培养液稀释 10<sup>6</sup> 倍后取 100 $\mu$ l 涂布于 LB 平板上, 长出的菌落在对应地点在 LB 和抗性平板上, 可筛到若干 Ap<sup>-</sup>、Cm<sup>-</sup> 和 Kan<sup>-</sup> 的宿主菌落, 负筛选效率约为 20%, 这样获得的宿主细胞命名为 VG1。

为了验证 VG1 即我们所需的 vgb 基因整合细胞, 对 VG1 进行了 CO 差光谱分析营养缺陷的考察。运用 CO 差光谱法发现 VG1 细胞与 CO 结合后的差光谱在 420nm 处出现峰值, 而出发菌株 *E. coli* JM105 没有这样的差光谱特性, 见图 4。这说明 vgb 基因已通过同源交换整合到原出发菌株的染色体 DNA 上。另外, 把 VG1 的培养液稀释 10<sup>6</sup> 倍后涂布在基础培养基的平板上, 在含苏氨酸的培养基上长出许多菌落, 但在不含苏氨酸的培养基上无菌落长出, 这说明由于 vgb 基因的整合原出发菌株成为苏氨酸营养缺陷型。

### 3.3 整合型 vgb 表达载体 VG1 的研究

vgb 基因整合型宿主 VG1 中 VHb 的表达也具有氧调控特性, 这说明 vgb 基因启动子没有在 VG1 构建过程中发生改变。由于整合型的 VHb 表达载体降低了 vgb 基因剂量, VHb 在 VG1 中的表达量大大低于以质粒为表达载体时的表达量。表 3 比较了摇瓶培养 16h 后 vgb 基因在质粒和染色体上表达量的差异。

表 2 vgb 基因在质粒和染色体 DNA 上的表达量

Table 2 The expression of vgb on the plasmid and chromosome

Expression vector	VHb/mg · (OD <sub>600</sub> ) <sup>-1</sup>
JM105 (pVH2)	$3.4 \times 10^{-2}$
JM105 (pVH1)	$1.8 \times 10^{-2}$
JM105 (pRW025)	$3.0 \times 10^{-3}$
Integrated VG1	$5.7 \times 10^{-3}$

VG1 中表达的 VHb 可促进菌体在贫氧条件下的生长。由于 VG1 消除了 vgb 表达质粒复制、转录和翻译给宿主细胞带来的生理负担, 又降低了 VHb 的过量表达, 所以与以质粒构建的 VHb 表达载体相比, VG1 对细胞的促进作用最为显著。图 5 比较了 VG1 和 JM105 流加培养时的细胞生长情况, 前者所获得的细胞密度比后者提高约 50%, 这说明 VHb 的表达使 VG1 比一般的大肠杆菌更适合高密度培养。

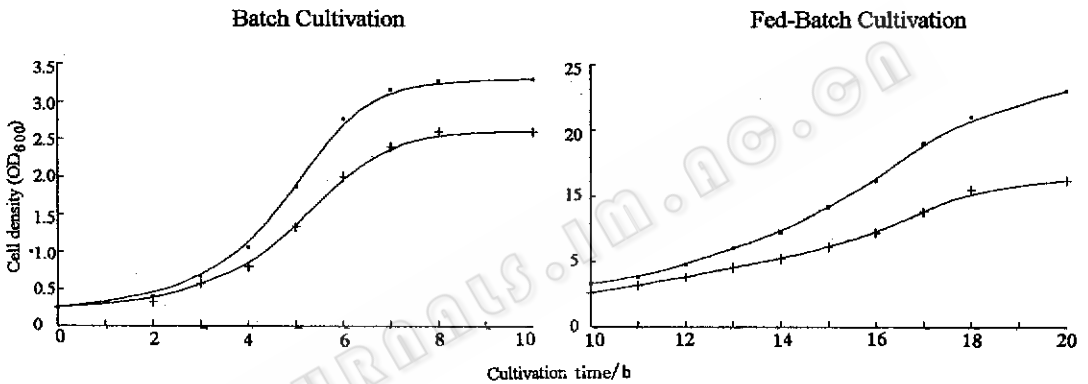


图 5 VG1 和 JM105 在批式和流动培养中的生长曲线

Fig. 5 Growth curve of VG1 and JM105 in batch and fed-batch cultivation

- · - VG1, —+— JM105

VHb 的表达对细胞的呼吸动力学也产生了明显的影响, 图 6 显示了这一差异。在发酵过程中切断供氧, 表达 VHb 的细胞培养液始终保持较快的溶氧下降速率, 而没有 VHb 表达的细胞溶氧下降速率逐渐减慢, 下降曲线变得平坦。两者的差别随溶氧水平下降而增大。这一结果表明 VHb 的表达使细胞在低溶氧条件下仍能维持原来的氧利用速率, 而没有 VHb 表达的细胞的溶氧水平降低时呼吸强度也随之减弱。根据前文公式对图 6 的数据进行粗略的计算, VG1 和 JM105 在溶氧低于 10% 饱和度时的呼吸强度分别为 132.1 和 84.6 mgO<sub>2</sub>/gDCW。前者大约为后者的 1.5 倍。

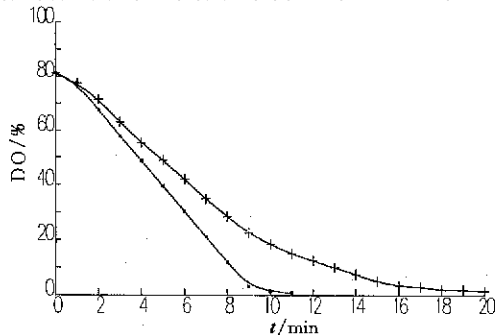


图 6 VHb 对细胞呼吸动力学的影响

Fig. 6 Effect of vgb expression on the oxygen consumption

- · - VG1, —+— JM105

## 4 讨 论

我们在实验表明质粒-染色体间同源基因交换作为一种行之有效的方法,不但可以应用于染色体基因的敲除 (Knock-Out), 还可把特定的 DNA 片段整合到染色体的确定位置上, 这一方法的正筛选特性大大简化了筛选工作。由于苏氨酸操纵子基因在细菌染色体上广泛存在, 这里构建的质粒 pRW025 也可用于把 *vgb* 基因整合到别的细胞染色体上。

根据我们的实验结果, 具有双抗表型的目标交换子发生频率在  $10^{-7}$  左右, 这一结果比 Lukacsovich 等<sup>[3]</sup>在运用此方法缺失染色体基因时报道的发生频率  $10^{-6}$  低。这可能是由于本实验中整合入染色体的 DNA 片段较大, 包括 *vgb* 和 *rrnBT1* 两个基因共约 1.9kb, 超过 Lukacsovich 报道中片段长度 (约 640bp)。另外在质粒构建中为了适应 *thr* 结构基因的酶切位点, 使 pRW025 中 *thrA*、*thrB* 两臂长度相差较大, 也可能造成单段 *thr* 基因交换频率较高, 减低了所需同源交换的发生频率。

同源基因交换后得到的双抗筛选子, 质粒携带了染色体上缺失的苏氨酸操纵子基因, 这一特点可能增强了培养过程中质粒的稳定性, 所以利用质粒的不相容性干扰质粒的复制和分配, 可大大提高最后一步负筛选的效率, 在我们的实验中至少可提高 10 倍以上。

在本实验中还有两个问题可能破坏正筛选特性。首先, 根据 Girons 等<sup>[6]</sup>研究, 大肠杆菌苏氨酸操纵子除在结构基因上游有一个主启动子外, 在其结构基因 *thrA* 和 *thrB* 之间还有一个内启动子 (Internal Promoter)。在缺失主启动子的情况下内启动子可启动表达 *thrB* 基因, 因此在构建 pRW025 上的 *thrB* 基因段时必须避免携带此内启动子部分而使 *cat* 基因始终获得表达; 另外, 在质粒 pRW025 上苏氨酸基因主启动子和 *vgb* 基因启动子都可导致基因转录, 我们发现 *vgb* 基因自身的终止信号不能完全终止这些转录, 这可能是启动子强度较大所引起, 所以必须插入较强的终止子 *rrnBT1* 终止转录以免对 *cat* 基因的通读 (Read through) 造成泄漏表达 (Leaking expression), 给筛选工作带来困难。

单拷贝的 *vgb* 基因整合型宿主 VG1 使细胞内血红蛋白的表达量大大降低, 约为用多拷贝质粒表达的  $1/4 \sim 1/10$ , 与 *Vireoscilla* 中 VHb 的表达量处于同一数量级<sup>[7~9]</sup>。这不但没有减弱 VHb 的生理功能, 而且因为消除了过量表达和额外表达载体给细胞带来的生理负担, VG1 在贫氧条件下表现出更显著的生长优势。由于 *vgb* 基因整合在苏氨酸操纵子位置, 只要培养条件满足细胞对苏氨酸的需求就不会影响细胞的正常生理活动, 因此 VG1 可作为一种适合高密度培养的基因工程宿主菌。

细胞在贫氧条件下呼吸动力学性质的差异再次证明 VHb 对细胞代谢具有明显的影响。在低溶氧水平没有表达 VHb 表达的细胞呼吸减慢, 整个能量代谢水平降低; 而 VHb 的表达使细胞在很低的溶氧水平下仍保持原有的呼吸强度, 这说明 VHb 可能介入了微氧条件下细胞呼吸链的某些步骤, 使细胞处于生物氧化效率较高的状态, 从而显示了生长优势。Kallio 和 Bailey<sup>[10]</sup>的研究也持有相同的观点, 他们测定了氧限条件下大肠杆菌中几种能量参数与 VHb 的关系, 发现表达 VHb 的细胞  $H^+/O$ 、跨膜  $\Delta pH$  和 ATP 浓度是原大肠杆菌的  $1.5 \sim 2$  倍, 这一结果与我们对呼吸强度的估算相当一致。进一步弄清 VHb 介入细胞代谢的具体方式和作用机理对研究 VHb 生理功能将会是十分有益的。

## 参 考 文 献

- [1] 吴 奕, 杨胜利. 生物工程学报. 1996, **12** (2): 177~182.
- [2] C Khosla JE, Bailey. J Bacteriol, 1989, **171**: 5995~6004.
- [3] Lukacovich, T Venetianer P. Mol Gen Genet, 1989, **218**: 364~366.
- [4] J. Sambrook EF, Fritsch, Maniatis T. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
- [5] 吴汝平, 杨胜利, 金科铭. 生物工程学报. 1987, **3** (3): 177~182.
- [6] Girons IS, Margarita D. J Bacteriol, 1985, **161**: 461~462.
- [7] Dikshit K L, Webster D A. Gene, 1988, **70**: 377~386.
- [8] Khosla C, Bailey J E. Mol Gen Genet, 1988, **214**: 158~161.
- [9] Khosla C, Bailey J E. Nature, 1988, **331**: 633~635.
- [10] Kallio P T, Bailey J E. Eur J Biochem, 1994, **219**: 201~208.

## Construction and Study of an Integrated Expression Vector of *Vitreoscilla* Hemoglobin Gene (vgb) by Double Homologous Recombination Between Plasmid and Chromosome

Wu Yi Yang Shengli

(Shanghai Research Center of Biotechnology, Academia Sinica, Shanghai 200233)

**Abstract** A method of double homologous recombination between plasmid and chromosome is introduced to construct an integrated expression vector of *Vitreoscilla* hemoglobin gene (vgb), which has advantages of positive selection and determinable integrated site. The vgb gene is inserted in the threonine operon of the chromosome DNA of *E. coli* JM105 and expressed under its native promoter. This vgb integrated cell, VG1, maintains the physiological functions of vgb, moreover it decreases expression amount of cellular hemoglobin by lowering the gene dose, which is overproduced using multicopy plasmid as an expression vector. Thus, the new developed strain VG1 can be used as a host cell suitable for high cell density fermentation. Comparison of the respiratory kinetics of VG1 and JM105 suggests that the hemoglobin participates in some steps of the cellular metabolism.

**Key words** Double recombination, *Vitreoscilla* hemoglobin, respiratory kinetics