

SHMT 基因工程菌的构建及高效表达

蔡宇暘 吴梧桐 史燕东

(中国药科大学生物技术中心 南京 210009)

摘要 以质粒 pT7-7 和 pBR322 为载体, 构建 GlyA 基因的重组质粒, 继而得到 12 株基因工程菌(CWS 系列)。其中, 高表达菌株 CWS-7 的 SHMT 酶表达量占全菌可溶蛋白的 47%, 是其宿主菌的 56 倍; 改善培养条件后, CWS-7 中 SHMT 酶活力可达宿主菌的 106 倍。

关键词 GlyA, 丝氨酸羟甲基转移酶, CWS-7

目前, L-丝氨酸价格昂贵, 大部分只限于氨基酸输液和高级化妆品。如果能大幅度降低其生产成本, 并作为生产 L-色氨酸、L-多巴、L-半胱氨酸的前体, L-丝氨酸将会有极大的市场和效益^[1]。GlyA 基因编码的丝氨酸羟甲基转移酶(Serine Hydroxy-methyltransferase, SHMT)能利用廉价的甘氨酸和甲醛生产 L-丝氨酸, 很有应用价值。Hamilton 等已成功地运用鸟枪法克隆并构建了 SHMT 基因工程菌, 用于工业生产, L-丝氨酸产率高于 400g/L^[2]。

我们运用 PCR 技术, 成功地从大肠杆菌中扩增出 GlyA 目的基因^[3], 并拼接入质粒 pT7-7、pBR322, 转化 8 株大肠杆菌, 得到 12 株 SHMT 基因工程菌, 命名为 CWS 系列。其中 CWS-7 的 SHMT 酶活是其宿主菌的 56 倍, SHMT 表达量约占全菌蛋白的 47%, 可达 180 μ g/ml。同时, 我们摸索了 CWS-7 的最佳培养时间、合理的 pH 范围及较适合的培养基, 使 CWS-7 中 SHMT 的酶活提高到其宿主菌的 106 倍。

1 材料和方法

1.1 菌种、质粒、工具酶及培养基

宿主菌 *E. coli* 均购自中科院菌种保藏中心; pT7-7 来自 Harvard Medical School; pBR322 和限制性核酸酶均购自 Bio-Lab 公司; 低分子量标准蛋白质购自中国科学院生物化学研究所东风生化试剂厂。质粒的抽提、转化以及酶切、酶连反应参见文献[4]。基因工程菌的构建均采用 LB 培养基。

1.2 SHMT 酶活测定

SHMT 酶活测定的原理是: 它可催化 DL-苯基丝氨酸分解产生苯甲醛, 后者在 279nm 处有特征性的强烈吸收。按 1ml 湿菌/1ml 底物溶液 (50mmol/L DL-苯基丝氨酸, 50 μ mol/L 磷酸吡哆醛, 0.03% 十六烷基三甲基溴化铵^[5]) 制备反应液, 在 30 $^{\circ}$ C 振荡反应

1h, 以 5000r/min 转速离心反应液 10min, 取上清, 测定 A_{279} 值, 根据 A_{279} —苯甲醛浓度回归方程确定反应液中苯甲醛浓度。酶活定义: 在 30℃ 的 1L 底物溶液中, 1g 湿菌反应 1h 产生 1mol 苯甲醛为 1 个酶活单位(u)。

1.3 全菌蛋白电泳和基因表达率的测定

SDS-PAGE 方法参见文献[4]。按 2%~3% 的接菌量接菌于 LB 培养基, 37℃ 振荡过夜, 测 OD_{600} 值。取 1ml 菌液, 离心去上清, 按每 0.1 OD_{600} 菌量加 50 μ l 双蒸水和 50 μ l 2 \times 上样缓冲液的比例稀释, 从中取 20 μ l 或 30 μ l 上样, 分离胶浓度为 15%。薄层扫描采用双波长(1:590nm, 2:500nm)

2 结果与讨论

2.1 重组质粒的构建

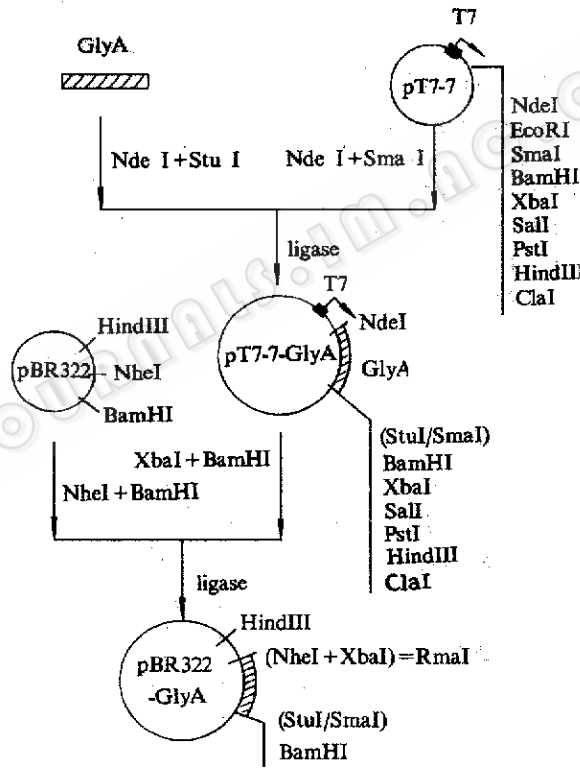


图 1 重组质粒的构建

Fig. 1 Flow diagram of plasmid recombination

2.2 工程菌及宿主菌的酶活比较

由图 2 可见: 所有含 pT7-7-GlyA 的工程菌的 SHMT 酶活都要比其宿主菌的酶活低, 而含 pBR322-GlyA 的工程菌的酶活都或多或少比宿主菌高; 其中 CWS-7 的 SHMT 酶活是其宿主菌的 56 倍, CWS-12 是其宿主菌的 23 倍。

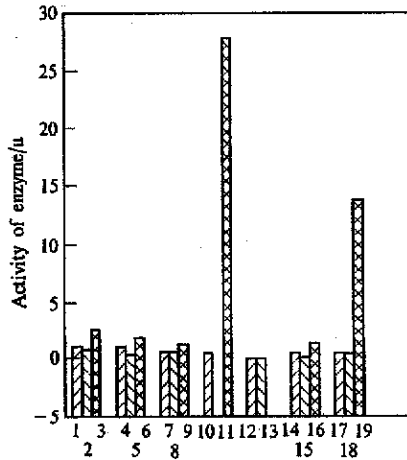


图 2 不同菌种 SHMT 酶活比较(10 克湿菌)

Fig.2 Comparison of Enzyme SHMT Activity of Different Bacteria (Activity of Enzyme of 10g Wet Bacteria)

- 1: AS. 1. 1187; 2: AS. 1. 1187 + pT7-7-GlyA, CWS-1; 3: AS. 1. 1187 + pBR322 - GlyA, CWS-2;
 4: AS. 1. 1189; 5: AS. 1. 1189 + pT7-7-GlyA, CWS-3; 6: AS. 1. 1189 + pBR322 - GlyA, CWS-4;
 7: AS. 1. 1192; 8: AS. 1. 1192 + pT7-7-GlyA, CWS-5; 9: AS. 1. 1192 + pBR322 - GlyA, CWS-6;
 10: AS. 1. 1193; 11: AS. 1. 1193 + pBR322 - GlyA, CWS-7;
 12: BL21; 13: BL21 + pT7-7-GlyA, CWS-8;
 14: JM105; 15: JM105 + pT7-7-GlyA, CWS-9; 16: JM105 + pBR322 - GlyA, CWS-10;
 17: AS. 1. 1199; 18: AS. 1. 1199 + pT7-7-GlyA, CWS-11;
 19: AS. 1. 1199 + pBR322 - GlyA, CWS-12.

我们通过 PCR 技术克隆的 GlyA 基因拥有自己的调控序列, 包括: a) -35 region; b) Pribnow box; c) SD 序列; d) Met R 结合位点(正调控位点); e) PruR 结合位点(负调控位点); f) *E. coli* RNA 聚合酶的结合位点; e) 在编码序列后有四对颈环结构^[6]。因此它可以不要额外的调控序列, 而完成自身的表达。这就是 GlyA 基因在插入非表达质粒 pBR322 后仍能得到高表达的原因。也正是因为 GlyA 基因的编码序列前有大约 300bp 的调控序列, pT7-7 中的 T7 强启动子无法发挥其正常的功能; 同时少量的 T7 RNA 聚合酶便有很强的竞争力, 能大大抑制由 *E. coli* 的 RNA 聚合酶所操纵转录, 而且 T7 RNA 聚合酶对其自身的启动子有高度的选择性, 即便是拼入 pT7-7-GlyA 中的 *E. coli* 启动序列也不能利用^[7]。我们认为这就是含 pT7-7-GlyA 基因工程菌的 SHMT 酶活比其宿主菌还要低的原因。

2.3 CWS-7 中 SHMT 酶的表达量^[8]

按 4.2 所述, 做 SDS-PAGE 电泳, 结果见图 3, 4。根据参考文献^[9], SHMT 的分子量应该是 46, 500, 与我们的结果相符^[9]。分别对图 3 的 c、e 和图 4 的 e 进行薄层扫描, 结果(图谱略)显示, CWS-7 中 SHMT 酶表达量占全菌可溶性蛋白的 47% (3c: 49%, 3e: 45%, 4e: 46%, 取算术平均值)。请专家估算, 图 4(b) 中 SHMT 约含 6 μ g, 以发酵液 OD₆₀₀ 值为 0.6 计算, SHMT 酶量可达 180 μ g/ml。

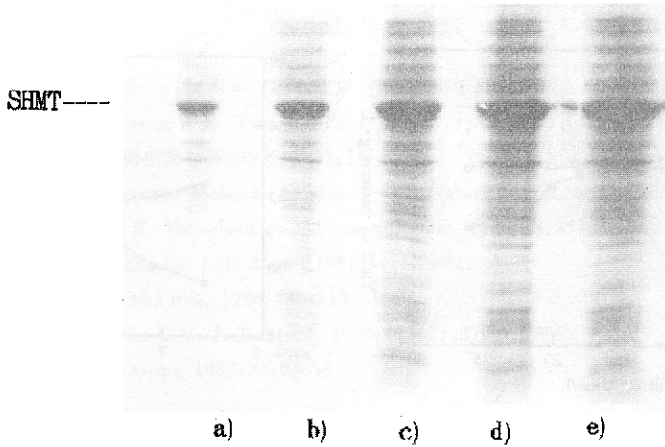


图3 CWS-7 不同浓度梯度的 SDS-PAGE 电泳图
Fig.3 SDS-PAGE: Different Concentration of CWS-7
a) $5\mu\text{l}$; b) $10\mu\text{l}$; c) $20\mu\text{l}$; d) $30\mu\text{l}$; e) $40\mu\text{l}$.



图4 SDS-PAGE 电泳图
Fig.4 SDS-PAGE.
a) *As. 1.1193* $20\mu\text{l}$; b) CWS-7, $20\mu\text{l}$; c) Marker;
d) *AS. 1.1193* $30\mu\text{l}$; e) CWS-7, $30\mu\text{l}$.

2.4 最佳培养条件初探

我们对 CWS-7 的培养条件作了一些改善,如:选择最佳的培养时间、最佳 pH 区间等。由图 5、6 和 7 可见:最佳的发酵培养时间是 14h,较理想的 pH 范围为 7.2~7.8、8.4~9.2,在所选用的 1~7 号培养基中,4 号最理想。我们选择 4 号培养基,在 pH7.4 条件下发酵 14h, CWS-7 的 SHMT 酶活可达到宿主菌的 106 倍,而且 4 号培养基价格较低,可用于发酵生产。

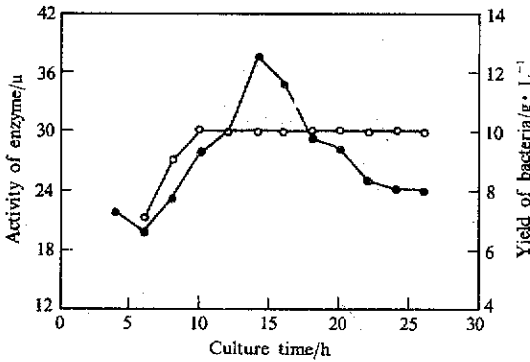


图 5 培养时间对酶活的影响

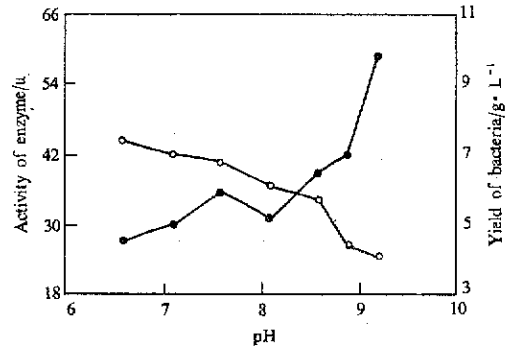


图 6 培养基 pH 值对酶活的影响

Fig.5 Different cultrue time (activity of enzyme of 10g wet bacteria)
 ●- Activity of SHMT enzyme
 ○- Yield of bacteria

Fig.6 Different pH of culture medium (activity of enzyme of 10g wet bacteria)
 ●- Activity of SHMT enzyme
 ○- Yield of bacteria

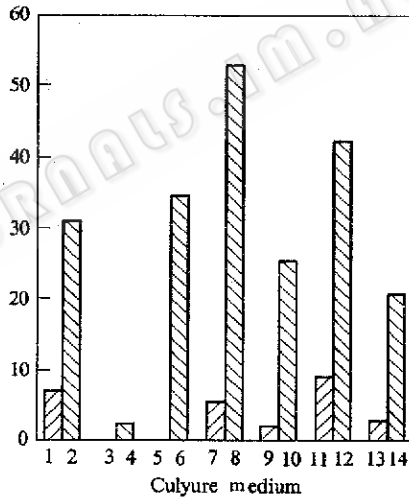


图 7 不同培养基对酶活的影响
 (以 10 克湿菌为比较对象)

Fig.7 Different cultrue medium (activity of enzyme of 10g wet bacteria)

1,2: Use medium No. 1 (LB medium); 3, 4: Use medium No. 2 (Inorganic Salts);
 5, 6: Use mediana No. 3 (inorganic salts) 7, 8: Use medium No. 4 (lactose etc.);
 9, 10: Use medium No. 5 (beef extract); 11, 12: Use medium No. 6 (lactose);
 13, 14: Use medium No. 7 (beef extract).

▨ Yield of bacteria (g/L), ▨ Activity of SHMT enzyme(u)

参 考 文 献

- [1]张炳荣编译. 氨基酸工业大全——技术与市场. 北京: 轻工业出版社, 1991.
- [2]Hamilton B K, Hsiao H Y, Swann W E. *Trends in Biotechnology*, 1985, 3(3):64~68.
- [3]蔡宇锡, 吴梧桐, 史燕东. *药物生物技术*, 1995, 2(1):1~4.
- [4]Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis. *Molecular Cloning——a laboratory manual*. second edition, 1989.
- [5]Hsiao H Y, Wei T, Campbell K. *Biotechnology and bioengineering*, 1986, 28:857~867.
- [6]Stauffer J V, Plamann M D, Stauffer L T. *Gene*, 1981, 14:63~72.
- [7]Studier F W, Moffatt B A. *J Mol Biol*, 1986, 189:113~130.
- [8]Steiert J G, Rolfes R J, Stauffer G V. *J. Bacteriol*, 1990, 172(7):3799~3808.
- [9]Plamann M D, Stauffer G V. *Gene*, 1983, 22:9~18.

Construction and High-rate Expression of SHMT Genetic Bacteria

Cai Yuyang Wu Wutong Shi Yandong

(Center of Biotechnology, China Pharmaceutical University,
Nanjing, 210009)

Abstract We used pT7-7 and pBR322 as vectors of GlyA gene amplified by PCR. With which we constructed 12 strains of genetic bacteria named CWS. Among the total dissoluble proteins of CWS-7, SHMT is 47%, which is 56 times as high as its host's. By improving culture conditions, the activity of SHMT in CWS-7 could reach to 106 times as high as its host's.

Key words GlyA gene; serine hydroxymethyltransferase, CWS-7