

7号淀粉酶链霉菌 M1033 菌株 葡萄糖异构酶在大肠杆菌中的高效表达

崔虹* 刘咸安 李澄清 伍传金** 王玉珍
王淳 牛立文 徐洵 崔涛

(中国科学技术大学生物系 合肥 230026)

摘要 从已克隆的含7号淀粉酶链霉菌 M1033 菌株产葡萄糖异构酶基因的质粒 pUB 中,用 DdeI 和 KpnI 酶解,分离出酶结构基因,以平端方式与大肠杆菌质粒 pT7-7 连接,构建了重组表达质粒 pTKD-GI。将 pTKD-GI 转化到特异大肠杆菌寄主 K38,经 42℃ 热诱导,所产葡萄糖异构酶占菌体可溶性蛋白 35%。通过 DEAE-A50 柱和 G-150 柱层析,发酵液可获电泳纯蛋白 34mg/L。

关键词 7号淀粉酶链霉菌 M1033 菌株,葡萄糖异构酶(木糖异构酶),高效表达

葡萄糖异构酶是世人使用的最大量的工业酶之一。该酶可用于果葡糖浆的生产,也可通过将该酶基因的转移,构建以 D-木糖为底物发酵获得乙醇的工业菌^[1]。

许多微生物都产葡萄糖异构酶。为了更方便地研究和利用葡萄糖异构酶,目前,国内外已有十几种不同来源的葡萄糖异构酶基因被克隆和测序,其中大部分酶基因在大肠杆菌中表达^[2]。王玉珍^[3]等已将我国自行筛选的7号淀粉酶链霉菌 M1033 菌株葡萄糖异构酶基因克隆并进行了全序列测定。本文在此基础上,对该基因进行亚克隆,构建了能在大肠杆菌中高效表达葡萄糖异构酶基因的质粒,并分离纯化到酶蛋白,其比活与链霉菌产的野生型酶一致。

1 材料与方 法

1.1 菌株与质粒

E. coli JM105, JA221 (F thi-1 leuB6 lacY1 tonA21 supE44 xy1)^[4]; K38 [HfrC(λ)/pGP1-2] 中含有 T7 RNA 聚合酶基因, pT7-7 (S. Tabor 博士惠赠) 质粒含噬菌体 T7 启动子^[5]。

1.2 酶及主要试剂

DdeI, KpnI, T4 聚合酶, T4 连接酶(华美公司或 Pharmacia 产品); Sephaglas Bandprep Kit (Pharmacia 产品); 利福平(Boehringer Mannheim 产品); DEAE A-50, G-150 (Pharma-

国家高技术项目资助。

* 现在病毒基因工程国家重点实验室。

** 本文联系人。

本文于 1995 年 4 月 20 日收到。

cia 产品)阿拉伯糖脱氢酶(本实验室制备)。

1.3 DNA 酶切、回收连接和细菌转化

参照 Sambrook 等人^[6]方法进行。

1.4 含目的基因的表达载体在大肠杆菌中的表达

pTKD-GI 质粒转化感受态大肠杆菌 K38, 阳性菌株在 30℃ 培养至 $A_{590} = 1.5$, 迅速升至 42℃, 25min 后加利福平(终浓度 100 μ g/ml)再 30℃ 培养 3h, 4000r/min \times 10min 收获菌体。

1.5 SDS-PAGE 电泳

参照常规方法^[6], 工程菌体经超声破碎后, 取 50 μ l 加入等量的 2 \times 样品缓冲液中, 100℃ 煮沸 3min; 取适量上样, 电泳结束后用 0.25% 考马思亮蓝 R-250 染色, 表达产物在菌体可溶性蛋白中所占比例用光密度薄层扫描确定。

1.6 酶活测定

用阿拉伯糖脱氢酶偶联法^[7]。1L 发酵液菌体, 悬浮于 15ml 50mmol/L Tris-HCl (pH7.5), 30mmol/L MgCl₂, 10mmol/L EDTA 缓冲液, 细胞经超声破碎离心处理后, 取 50 μ l 加入 2.5ml 的测活缓冲液(0.1mol/L Tris-HCl (pH8.0), 0.1mol/L D-木糖, 0.33mmol/L NADH, 30mmol/L MgCl₂)和 12 μ l 的阿拉伯糖脱氢酶混和液中, 每隔 10s 以 A_{340nm} 波长测其光密度下降值。

1.7 表达蛋白分离纯化

用超声破碎法裂解经温度诱导后的细菌。参照黄婉治等^[8]野生型葡萄糖异构酶分离纯化方法进行。

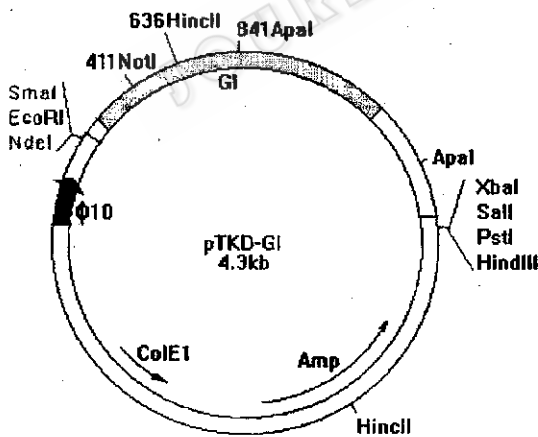


图 1 pTKD-GI 质粒图谱

Fig. 1 Structure of the recombinant plasmid pTKD-GI

This vector contains two kinds of genetic element:

- (1) The fragment of Glucose isomerase gene (black segment).
- (2) The plasmid pT7-7 (white segment).

2 结 果

2.1 pTKD-GI 的构建

从含葡萄糖异构酶基因的 pUB 质粒中^[3], 对酶结构基因上游-22 位以 DdeI 和下游 600 多位以 KpnI 双酶解, 切下 1.8kb 片段, 用 0.8% 琼脂糖电泳回收, 同时用 BamHI 酶解 pT7-7, 均用 T4 聚合酶补平连接, 构建成新质粒 pTKD-GI(图 1)转化感受态大肠杆菌 JM105, 经氨苄平板用快速提取质粒的方法筛选阳性克隆, 以 NotI, Apal, XhoI 限制酶分别作酶切图谱, 鉴定其酶切位点正确性, 用 HindIII, EcoRI 酶解鉴定其片段大小, 并确定其结构基因方向与转录方向一致。

2.2 pTKD-GI 质粒在 *E. coli* K38 菌株中的表达

由于 T7 启动子在 T7 RNA 聚合酶存在条件下才能启动结构基因转录,因此,此质粒必须转化入含有一带 T7 RNA 聚合酶基因的质粒 pGP1-2 的 K38 菌株中,该质粒为 P_L 启动子,当 42℃ 诱导时, P_L 转录 T7 RNA 聚合酶,从而专一高效转录 T7 启动子下游的靶基因,工程菌 K38' (pTKD-GI) 在摇瓶培养条件下,细胞粗提液经 SDS-PAGE 电泳,结果表明有明显特异性表达产物带产生(图 2),分子量 43kDa。530nm 光密度扫描结果表明葡萄糖异构酶占可溶性蛋白的 35%。

2.3 酶蛋白的分离纯化

1L 摇瓶发酵液经离心,菌体悬浮于 15ml Tris-HCl(pH7.5)和 $MgCl_2$ 的缓冲液中经超声破碎离心后,上清经透析直接加样至 DEAE A-50 柱,用 250~500 mmol/L NaCl 梯度洗脱,收集活性部分,浓缩,再加样于 G-150 柱凝胶过滤,用 50 mmol/L Tris-HCl(pH7.5), 150mmol/L NaCl, 10 mmol/L $MgCl_2$ 缓冲液洗脱,活性峰经 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色后为单一蛋白带,纯度 95% 以上(图 2)。脱盐浓缩获 34mg 酶蛋白,比活为 0.72u/mg,与从链霉菌株分离纯化出野生型酶一致。

3 讨论

由于以前克隆的含葡萄糖异构酶基因的质粒 pUB 中,带有链霉菌基因调控序列,因而不能在大肠杆菌中有效表达酶基因。而从结构基因上游-22 位和下游 600 多位切下 1.8kb 片段插入 pT7-7 的 $\phi 10$ 启动子下, $\phi 10$ 启动子被专一性 T7 RNA 聚合酶识别,它转录延伸速度是大肠杆菌 RNA 聚合酶的 5 倍^[9],所以葡萄糖异构酶基因转录是在强启动子的调控下完成,并利用自身的转录终止子使该表达系统高度稳定。同时,我们也将此 1.8kb 片段克隆在 lac、tac 启动子之下,构建了 pUKD-GI 和 ptacH-GI 质粒,对其表达量进行了比较结果证明在已比较的表达系统中,pT7-7/pGP1-2 系统为 7 号淀粉酶链霉菌 M1033 菌株葡萄糖异构酶的表达提供了一个有效的体系。为今后对葡萄糖异构酶的改造打下了良好基础。

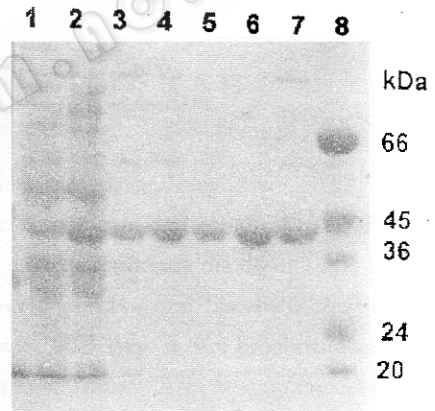


图 2 表达葡萄糖异构酶的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 2 Analysis of Glucose isomerase from *E. coli* K38' (pTKD-GI)

Lane 1, 2: Total cellular protein from K38(pTKD-GI).
3, 4: Pure of expressive protein though DEAE A-50
Column. 5, 6: Pure of expressive protein though DEAE A-50 column. and G-150 column. 7: Standard glucose isomerase. 8: Protein molecular weight marker.

参 考 文 献

- [1] 崔 涛, 陈 波, 刘 威安. 微生物学通报, 1991, 18(5): 315~316.
- [2] Lee C, Bhandagar L, Zhikus J G *et al.* Appl Environ Microbiol, 1990, 56: 2638~2643.
- [3] 王玉珍, 黄 震, 戴新华等. 生物工程学报, 1994, 10(2): 118~123.
- [4] Loving-anderton, P C Show, B S Hartley *et al.* J Biochem, 1991, 277: 263~271.
- [5] Stan Tabor, Richardson C C. PNAS USA. 1981, 82: 1074~1078.
- [6] Sambrook, Fritsch, Maniatis. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N. Y.
- [7] 李 宁, 王 淳, 崔 涛等. 工业微生物, 1992, 2: 11~15.
- [8] 黄婉怡, 王 淳, 王玉珍等. 中国科学技术大学学报, 1992, 22(3): 283~289.
- [9] Studier, Rosenberg, Dunn *et al.* Methods in Enzymology, 1990, 85: 60~89.

Overexpression of *Streptomyces diastaticus* No. 7 Strain M1033 Glucose Isomerase in *Escherichia coli*

Cui Hong Liu Xian'an Li Chenqing Wu Chuanjing Wang Yuzhen
Wang Chun Niu Liwen Xu Xun Cui Tao
(University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

Abstract The gene encoding thermostable glucose isomerase in *Streptomyces diastaticus* No. 7 strain M1033 was cloned into vector pUC resulting shuttle plasmid pUB. The pUB was digested by DdeI and KpnI to obtain structural glucose isomerase gene without its regulation sequence. Then the fragment was subcloned into expressed vector pT7-7 to construct expression plasmid pTKD-GI, which was introduced into *E. coli* K38 which containing T7 polymerase gene. The glucose isomerase gene was overexpressed in *E. coli*. The expressed protein accounted for about 35% of total soluble fraction. The solution was applied to a DEAE A-50 column, elution with a linear (0.25~0.5mol/L) NaCl gradient and G-150 column wash with 0.15mol/L NaCl in same buffer. We obtain 34mg pure glucose isomerase per liter culture, which was a band in SDS-PAGE (purity>95%). Its specific activity was identify of pure enzyme of strain M1033.

Key words *Streptomyces diastaticus* No. 7 strain M1033, glucose isomerase (xylose isomerase), gene overexpression