

## 大肠杆菌 *pheA* 基因在黄色短杆菌中的克隆与表达

雷呈祥<sup>1</sup> 范长胜<sup>2</sup> 黄伟达<sup>3</sup> 沈水源<sup>2</sup> 严维耀 郑兆鑫

(复旦大学遗传工程国家重点实验室 上海 200433)

**摘要** 在大肠杆菌中,影响苯丙氨酸生物合成的关键酶基因之一是 *pheA* 基因。利用大肠杆菌棒状杆菌穿梭表达载体 pLCX36 克隆了一个对反馈抑制不敏感的大肠杆菌基因 *pheA*, 组成成质粒 pLCX37。pLCX37 以接合转移方法转移到抗氟代苯丙氨酸的黄色短杆菌 3621 等菌株中, 获得若干基因工程菌株。经发酵测定, 编号为 3621.09 的黄色短杆菌的苯丙氨酸产量比出发菌 3621 高出 1 倍。最高达 26.26mg/ml。

**关键词** *pheA* 基因, 苯丙氨酸生产, 黄色短杆菌, 氨基酸基因工程

苯丙氨酸是食品、医药等的重要原材料。随着氨基酸用于大输液及低热量苯天糖 (Aspartame, 天门冬氨酸苯丙氨酸甲酯, 亦称阿斯帕甜) 的广泛应用<sup>[1]</sup>, 对苯丙氨酸的需要量很大, 应用前景日益看好。因此苯丙氨酸的生产具有很大的经济价值。

*pheA* 是苯丙氨酸生物合成途径中的关键酶基因之一。在大肠杆菌中, *pheA* 所编码的蛋白是一双功能酶, 它同时具有分枝酸变位酶 (Chorismate mutase, CM) 和预苯酸脱水酶 (Prephenate dehydratase, PD) 的活性。正常生理状态下, CM 和 PD 受生物合成的终端产物——苯丙氨酸的反馈调节。

首先, 为了解除反馈调节作用对 *pheA* 基因产物的影响, 用化学诱变方法筛选到抗苯丙氨酸类似物——氟代苯丙氨酸的大肠杆菌突变菌株 (其 *pheA* 基因对反馈抑制不敏感); 然后通过多聚酶链式反应 (PCR) 从该抗性菌株染色体上扩增到 *pheA* 基因, 构建成重组质粒 pPA1, 此质粒特性列于表 1。

大肠杆菌 *pheA* 基因可编码双功能的关键酶, 在苯丙氨酸生物合成中起重要作用。若是把解除反馈调节的 *pheA* 基因克隆到发酵工业中常用的棒状杆菌中去, 将大大提高苯丙氨酸的产量。日本的 Ozaki<sup>[2]</sup> 和 Ikeda<sup>[3]</sup> 等曾利用基因工程技术成功地构建了棒状杆菌基因工程菌, 其产量比出发菌有所提高, 分别达到 19mg/ml 和 23mg/ml。本实验室已构建一系列穿梭载体<sup>[4]</sup>。利用载体 pLCX36 克隆大肠杆菌的 *pheA* 基因, 构建成高表达的重组穿梭质粒 pLCX37。通过接合转移技术, 又将 pLCX37 导入能够积累苯丙氨酸的黄色短杆菌 (*Brevibac-terium flavum*) 中, 得到大量的基因重组子; 从中筛选到一批高

“八五”国家重点科技攻关项目。

1. 现在地址, 上海市海军医学研究所, 上海 200433。

2. 复旦大学微生物学系, 上海 200433。

3. 复旦大学生物化学系, 上海 200433。

本文于 1995 年 6 月 5 日收到。

产的苯丙氨酸菌株。其中编号为 3621.09 的菌株苯丙氨酸发酵产量最高达 26.26mg/ml, 比出发菌株的产酸量高出 1 倍。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 菌株和质粒: 实验中用到的菌株和质粒列于表 1。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains	Genotype	Sources
<i>E. coli</i>		
S17-1	recA thi pro hsdR <sup>+</sup> M <sup>+</sup> (RP4:2-Tc;Mu <sup>r</sup> ;Tn7)	This lab.
<i>B. flavum</i> :		
F36	Nx <sup>r</sup> PheA <sup>r</sup>	Fudan Univ.*
F75	Nx <sup>r</sup> PheA <sup>r</sup>	Fudan Univ.
1305	Nx <sup>r</sup> FP <sup>r</sup>	Fudan Univ.
3615	Nx <sup>r</sup> FP <sup>r</sup>	Fudan Univ.
3621	Nx <sup>r</sup> FP <sup>r</sup>	Fudan Univ.
5244	Nx <sup>r</sup> FP <sup>r</sup>	Fudan Univ.
9292	Nx <sup>r</sup> Fp <sup>r</sup>	Fudan Univ.
9542	Nx <sup>r</sup> Fp <sup>r</sup>	Fudan Univ.
Plasmids:		
pPA1	Ap <sup>r</sup> pheA <sup>+</sup>	Fudan Univ.
pLCX36	Km <sup>r</sup>	This lab.
pLCX37	Km <sup>r</sup> pheA <sup>+</sup>	This work

pheA, gene encoding CM and PD;FP, fluorophenylalanine;

Nx, nalidixic acid; Ap, ampicillin.; Km, kanamycin.

\* School of life, Fudan Univ.

1.1.2' LB 培养基: 多聚蛋白胨 1%、酵母粉 0.5%、氯化钠 1%, pH7.2, 以重蒸水配制。1.1kg/cm<sup>2</sup>, 湿热灭菌 20min。

1.1.3 基本培养基: 葡萄糖 1%、硫酸铵 0.5%、尿素 0.5%、磷酸二氢钾 0.1%、磷酸氢二钾 0.1%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.04%、硫酸素 8μg/ml、生物素 1μg/ml, pH7.2, 1.5% 的琼脂粉, 重蒸水配制。0.6kg/cm<sup>2</sup>, 湿热灭菌 30min。

1.1.4 发酵培养基: 葡萄糖 12%、糖蜜 4%、尿素 0.8%、硫酸铵 2%、玉米浆 3%、豆饼水解液 1%、磷酸二氢钾 0.1%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.14%, pH7.2。0.6kg/cm<sup>2</sup> 湿热灭菌 30min。临用前按 5% 量加入已灭菌的碳酸钙。

### 1.2 方 法

1.2.1 质粒的制备、重组和转化, 参照文献[5]。

1.2.2 接合转移: 参照文献[6, 7], 供体菌活化后按 1% 种子液转接至 LB 培养基, 37℃ 培养至 OD<sub>600</sub> = 1, 受体菌于 30℃ 培养至 OD<sub>600</sub> = 3.5 并 48.5℃ 水浴 9min。各取 2ml, 混匀, 4000r/min, 离心 5min, 弃上清, 沉淀悬浮在 100μl LB 中。将悬浮液体铺在硝酸纤维膜上 (该膜事先置于 LB 平板上并 37℃ 预热 2h)。30℃ 保温 36h。长出的菌落即为接合子。

接合频率 = 接合子数/供体菌数

1.2.3 质粒的稳定性检测: 带质粒的受体菌采用不含抗生素的 LB 培养基培养, 每隔 24h 以 1% 种子液转接于新鲜 LB 培养基中, 连续培养 96h。每 24h 取样稀释后涂布 LB 固体平板, 30℃ 36h, 生长菌落逐个转接在含 15μg/ml Km 的固体培养基上, 经培养检出生长菌落并作鉴定。

稳定率 = (生长菌落数/转接菌落数) × 100%

1.2.4 苯丙氨酸的定量检测: 活化后的种子液以 10% 量转接至 20ml 发酵培养基中 (装在 250ml 三角瓶中), 30℃ 振荡 (往复式摇床, 120 次/min) 培养 72h。发酵液离心后取上

清液 2μl 点样于滤纸上,置于层析液中单向上行展层 16h。烘干后以茚三酮显色。标准苯丙氨酸作对照。剪下层析后的着色斑点,置于 65% 的乙醇溶液中脱色 2h,用 721 分光光度计测波长 520nm 下的光密度。

氨基酸量 = (标准氨基酸溶液浓度/标准氨基酸溶液光密度) × 被测发酵液光密度

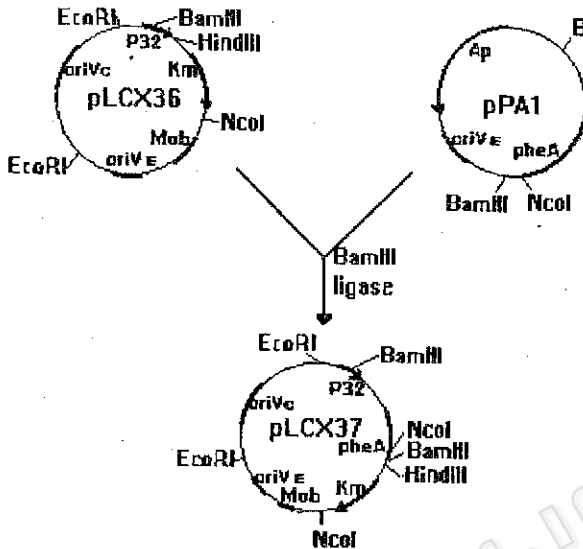


图 1 穿梭质粒 pLCX37 的构建

Fig 1 Construction of the shuttle plasmid pLCX37

oriV<sub>E</sub>, origin of vegetablerepicon in *E. coli*; oriV<sub>c</sub>, origin of vegetable replicon in coryneform bacteria;

Mob, mobilization fragment from RP4; kb, kilobases; P32, strong promoter from T4 phage.

1.2.5 发酵液体中的残糖测定,参照文献[8]。

1.2.6 菌体生长量测定,发酵液用 1mol/L HCl 稀释 60 倍,在 660nm 波长处测光密度。

1.2.7 酶活力测定,参照文献 [10]。

## 2 结果

### 2.1 携带 pheA 的穿梭质粒 pLCX37 的构建

pLCX36 是本实验室构建的高效表达载体。质粒上有来自大肠杆菌和棒状杆菌的复制起点,是穿梭质粒。因其有接合转移所需要的 Mob<sup>[6]</sup> 片段,可将外源基因从大肠杆菌转移到棒状杆菌。质粒上还有来自噬菌体 T4 的强启动子 P32<sup>[9]</sup>,能够克隆并表达外源基因。

pLCX37 穿梭质粒是由 pLCX36 和 pPA1 经 BamHI 酶切、

T4 连接酶连接而成。重组质粒 pLCX37 上有来自大肠杆菌和棒状杆菌的复制起点 (oriV<sub>E</sub>, oriV<sub>c</sub>), 有进行接合转移所必需的片段 (Mob), 有来自 T4 噬菌体的强启动子 (P32)。该质粒上的 pheA 基因来自大肠杆菌质粒 pPA1。pLCX37 的遗传选择标记基因是卡那霉素抗性基因 (Km), 它在大肠杆菌和棒状杆菌中都能表达。为便于进行质粒的接合转移, pLCX37 转化到大肠杆菌 S17-1 宿主中。pLCX37 的物理图谱和构建过程如图 1。

表 2 pLCX37 从大肠杆菌转移到棒状杆菌的接合频率

Table 2 Conjugal transferability of pLCX37 from *E. coli* to coryneform bacteria

Donors	Recipients							
	F75	F36	1305	3615	3621	5244	9292	9542
S17-1(pLCX37)	2.0 × 10 <sup>-3</sup>	1.2 × 10 <sup>-3</sup>	9.0 × 10 <sup>-5</sup>	1.5 × 10 <sup>-3</sup>	5.4 × 10 <sup>-3</sup>	9.6 × 10 <sup>-5</sup>	8.0 × 10 <sup>-3</sup>	2.0 × 10 <sup>-3</sup>
S17-1(pLCX36)	ND	ND	1.2 × 10 <sup>-4</sup>	2.0 × 10 <sup>-4</sup>	8.0 × 10 <sup>-3</sup>	1.1 × 10 <sup>-4</sup>	8.0 × 10 <sup>-6</sup>	2.5 × 10 <sup>-3</sup>

ND, not done.

表 3 质粒 pLCX37 于 pheA 菌株的互补实验

## 2.2 穿梭质粒从大肠杆菌转移

Table 3 Complementation of plasmid pLCX37 with pheA<sup>-</sup> strains.

## 到棒状杆菌的接合频率

Strains	Media			
	MM	MM + Phe	MM + Tyr	MM + Trp
F75(pLCX37)	+	+	+	+
F75	-	+	+	-
F75(pLCX36)	-	+	-	-
F36(pLCX37)	+	+	+	+
F36	-	+	-	-
F36(pLCX37)	-	+	-	-

以大肠杆菌 S17-1 (pLCX36)和 S17-1(pLCX37)为供体菌,以黄色短杆菌为受体菌,进行接合转移。然后在含 40 $\mu$ g/ml 萘啶酮酸和 15 $\mu$ g/ml 卡那霉素的 LB 固体平板上筛选双抗接合子。所得接合子通过显微镜观察和酶切进行鉴定。

MM, minimal medium; +, grown; -, not grown; Phe, phenylalanine; Tyr, tyrosine; Trp, tryptophan.

接合频率列于表 2。从表中可以看出, pLCX37 能以较高的接合频率从大肠杆菌转移到棒状杆菌。

## 2.3 pheA 基因与黄色短杆菌营养缺陷型(pheA)菌株的互补鉴定

为鉴定质粒 pLCX37 上的 pheA 基因能否在黄色短杆菌中正常表达,选用两株苯丙氨酸营养缺陷型菌株黄色短杆菌 F75 和 F36,作为接合转移的受体菌。经接合转移得到接合子,然后进行生长谱测定。将接合子用生理盐水洗涤,涂布于基本培养基(MM)平板上,30 $^{\circ}$ C 培养 48h。结果表明,接合子能在 MM 平板上生长,而缺陷型菌株不能生长(表 3)。这证实 pLCX37 质粒上的 pheA 基因能够在黄色短杆菌中表达。

表 4 重组菌株在 LB 培养基中的稳定率

Table 4 Stability of recombinant strains in LB-broth

Strains	LB-broth without Km / %					LB-broth with Km / %		
	0h	24h	48h	72h	96h	0h	48h	96h
3621.09	100	81	63	9.5	2.4	100	100	100
3621.19	100	75	61	12.3	4.7	100	100	100
5244.05	100	75	57	8.3	2.3	100	100	100
5244.06	100	69	46	5.9	1.8	100	100	100

## 2.4 重组菌株的遗传稳定性测定

质粒 pLCX37 对于黄色短杆菌来说是外源 DNA,导入黄色短杆菌菌体后能否稳定遗传? 本研究结果表明 pLCX37 在有选择压力(即培养基中含有 15 $\mu$ g/ml Km)条件下,该质粒不丢失,能稳定传代;在无选择压力(即培养基中无 Km)条件下,该质粒容易丢失,重组菌株不稳定。表 4 是重组菌株在不含 Km 的 LB 培养基中连续传代培养,定期取样测定稳定性的数据。

表 5 重组菌株 3621.09 中的 CM 和 PD 酶活测定

Table 5 Determination of specific activity of CM and PD in recombinant strain 3621.09

Strains	Specific activity of CM	Specific activity of PD
3621.09	0.0852(14.0)*	0.0167(5.4)
3621	0.0061(1.0)	0.0031(1.0)

## 2.5 重组菌株中 pheA 基因编码的双功能酶活力测定

重组菌株 3621.09 于 LB 培养基中(含 1% 葡萄糖),30 $^{\circ}$ C 振荡培养 30h,收集菌体、破壁,按照文献 [10]介绍的方法提取并测定 CM 和 PD 的活力,结果列于表 5。它说明

\* Relative activity.

重组菌株 3621.09 的酶活力显著高于出发菌株 3621。其中,CM 酶活提高了 14 倍,PD 酶活提高了 5.4 倍。

## 2.6 基因工程菌株的苯丙氨酸发酵产量测定

以接合转移的方法,将带有 pheA 的质粒 pLCX37 导入 6 株产苯丙氨酸黄色短杆菌(1305, 3615, 3621, 5244, 9292, 9542)中,组建基因工程菌。然后随机挑选一定数目的接合子进行摇瓶发酵,30℃ 振荡培养 72h 后测定苯丙氨酸产量。结果表明基因工程菌产苯丙氨酸量比出发菌高,其中以菌株 3621.09 的产量最高。该菌株最高产量达 26.26mg/ml,而其出发菌产酸量仅为 13.07mg/ml。数据列于表 6。

表 6 基因工程菌株的苯丙氨酸发酵产量

Table 6 Production of phenylalanine by genetic engineered strains

Strians*	1305	3615	3621	5244	9292	9542
Number of trans conjugants tested	20	20	20	20	20	20
Phe yield increased relative to parents/(%)	70	60	95	100	80	70
The highest yield of Phe /mg·ml <sup>-1</sup>	20.08	22.00	26.26	25.86	18.88	21.24
Phe yield of the parent /mg·ml <sup>-1</sup>	10.80	13.02	13.07	12.66	10.50	11.76

\* All strians used harbor the plasmid pLCX37.

从基因工程菌株黄色短杆菌 3621.09 平板中挑取单菌落进行种子培养,然后各以 10% 量转接至摇瓶中,30℃ 发酵 96h。每隔 12h 取样,分别测定发酵液中的 pH 值、苯丙氨酸产量、葡萄糖剩余量、菌体密度等指标的变化。结果如图 2。该图说明发酵 72h,菌株产量最高。

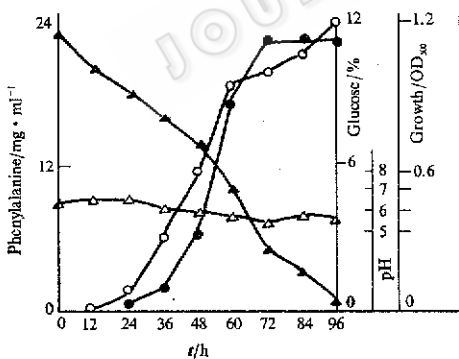


图 2 基因工程菌 3621.09 在发酵培养基中的进程曲线

Fig.2 Time course of genetic engineered strain 3621.09 in fermentation media

●Yield of phenylalanine; ○Growth;  
▲Glucose; △pH.

## 3 讨论

大肠杆菌基因在棒状杆菌中表达的关键是有一个合适的表达载体。pLCX36 在大肠杆菌和棒状杆菌中均有较强的表达外源基因的能力,并能以较高的接合频率从大肠杆菌转移到棒状杆菌中去。本研究利用 pLCX36 在棒状杆菌中表达大肠杆菌 pheA 基因取得了成功。

棒状杆菌中能否大量表达双功能酶,与菌株代谢过程中的反馈调节作用密切相关。首先必须从已解除反馈调节的抗氟代苯丙氨酸(FP)的菌种中分离基因。本研究从一株抗 FP 的大肠杆菌中经 PCR 扩增获得抗反馈调节作用的基因 pheA。为使微生物能过量积累代谢终产物苯丙氨酸,还必须解除受体菌株的自我调控作用,因为正常情况下,微生物不积累代谢终产物。最初我们使用谷氨

酸棒状杆菌 ATCC13032 作为基因工程出发菌,但未检测到苯丙氨酸的积累;后来改用抗 FP 的黄色短杆菌,检测到苯丙氨酸的大量积累。

本项研究中选育的苯丙氨酸基因工程菌株黄色短杆菌 3621.09 的产量最高可达 26.26mg/ml,比出发菌高出 1 倍,而且所消耗的原材料(玉米浆、糖蜜等)价格低廉,因此产出率也高。经进一步研究可望发展成为一株有生产价值的苯丙氨酸发酵菌株。

### 参 考 文 献

- [1]范长胜,余震,郑善良等,氨基酸杂志,1991,3:1.
- [2]Ozaki A, Katsumata R, Oka T *et al.* Agri Biol Chem, 1985, 49:2925.
- [3]Ikeda M, Ozaki A, Katsumata R, Appl Micro Biotech., 1993, 39:318.
- [4]郑兆鑫,ACHEMASIA 国际讨论基础研究报告集,1989, p. 95.
- [5]郑兆鑫,马楚平,严维耀等,生物工程学报,1987,3(3):183.
- [6]钱红,吴俊林,郑兆鑫等,生物工程学报,1994,10:39.
- [7]Schafer A, Kalinowski J, Simmon R *et al.* J Bacteriol, 1990, 172:1663.
- [8]宋大新,范长胜,徐德强等主编,微生物实验技术教程,上海:复旦大学出版社,1993, p. 81.
- [9]Belin D, Mudd E A, Prentki P *et al.* J Mol Biol, 1987, 194:231.
- [10]Richard G, Cotton H, Gibson F. Biochem Biophys Acta, 1965, 100:76.

## Cloning and Expressing of *Escherichia coli* Gene pheA in *Brevibacterium flavum*

Jie Chengxiang Fan Changsheng Huang Weida Shen Shuiyuan Yan Weiyao Zheng Zhaoxin  
(National Laboratory of Genetics Engineering, Fudan university, Shanghai 200433)

**Abstract** A pheA gene resistant to phenylalanine feedback was isolated from a chemically mutated *E. coli* strain and cloned into a shuttle plasmid pLCX36 from *E. coli* to coryneform bacteria, resulting a chimeric expression plasmid pLCX37. pLCX37 was transferred by conjugation into fluorophenylalanine-resistant strains of *B. flavum* 3621 and so on. One of the transconjugants, 3621.09 had shown the highest yield of phenylalanine, up to 26.26mg/ml, about two times increased, if compared with that of the parent strain.

**Key words** pheA gene, phenylalanine producing, *Brevibacteria flavum*, genetic engineering for amino acid