

唾液酸醛缩酶基因工程菌的构建和表达*

董伟林 钱世钧**

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

关键词 唾液酸醛缩酶, 工程菌, 表达

分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(1999)03-0393-96

唾液酸(NANA)是一族神经氨酸类衍生物,它处于许多糖蛋白的寡糖链的非还原末端,具有重要的生理功能和药用价值。由于唾液酸的常规化学合成分离方法复杂,难以大量制备,因此价格很贵。而用酶法合成唾液酸,即在唾液酸醛缩酶(ALD)作用下,以丙酮酸钠和 N-乙酰甘露糖胺为底物合成唾液酸,则原料便宜,步骤简单,产率高,且适合工业化生产。但唾液酸醛缩酶是一个诱导酶,只能在以唾液酸为唯一碳源的培养基下才能生成,这就大大影响了它的应用。因此,我们构建了产该酶的工程菌,为唾液酸作为药物和原料药的大量应用打下了基础。

1 材料和方法

1.1 菌种与质粒

E. coli TGI[*SupE hsdΔ5 thiΔ(Lac-proAB)F'(tra D36 pro AB⁺ LacI^qLacZΔM15)*]由本实验室保存,pBV220 质粒由中国预防医科院病毒所张智清教授惠赠^[1],所试 ALD 基因供体菌均来自本所菌种保藏室。限制酶购自华美生物工程公司,DNA 分子量标准品购自中国协和医科大学医学科学技术开发公司,蛋白质分子量标准品购自北京鼎国生物技术发展中心。

1.2 产唾液酸醛缩酶菌种的培养基(%)及培养方法

唾液酸 0.5, (NH₄)₂HPO₄ 0.2, NaCl 0.3, KH₂PO₄ 0.1, MgSO₄·7H₂O 0.01, FeSO₄·7H₂O 0.002, 酵母粉 0.05。

接种不同来源的大肠杆菌,在 30℃ 三角瓶培养 48 h,然后离心,用超声破碎细胞测定酶活力。

1.3 染色体 DNA 的提取

参见《分子克隆》^[2]。

1.4 唾液酸醛缩酶活力测定

唾液酸醛缩酶活力测定原理是:唾液酸醛缩酶可催化唾液酸分解为丙酮酸和 N-乙酰甘露糖胺,后者与对二甲氨基苯甲醛(PDABA)反应,产物于 585 nm 处有强吸收。

分析反应总体积 200μL:50μL NANA(20μmol/L),50μL 200mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH7.2)100μL 合适的酶液。37℃ 水浴反应 10 min 后,100℃ 水浴 2 min 终止反应,加水 200 μL,离心取上清液 200μL,加入 300μL 水,100μL 四硼酸钾(0.8mol/L, pH9.1),100℃ 反应 3 min,迅速冷却,加入 3 mL 稀释 10 倍的对二甲氨基苯甲醛(PDABA 原液:5gPDABA 溶于 50mL 含 12.5% 盐酸的冰乙酸中),溶液于 37℃ 水浴放置

* 九·五国家科技攻关项目,微生物资源前期开发重点实验室资助项目。

** 联系作者。

收稿日期:1998-02-23,修回日期:1999-02-24。

20 min, 585 nm 处比色。

酶活力定义:在 37℃ 下,每分钟水解唾液酸产生 1 $\mu\text{mol/L}$ N-乙酰甘露糖胺所需要的酶量为一个酶单位^[3]。

1.5 PCR 反应

在 100 μL 反应体系中,含 5'端引物 100pmol,3'端引物 150 pmol/L,模板 DNA1.1 μg ,8 μL 2.5mmol/L dNTP,5u Taq DNA 聚合酶,PCR 反应循环参数设置为 94℃ 45s,72℃ 90s,50℃ 60s,扩增 36 个循环。

1.6 SDS-PAGE

具体方法参见《分子克隆》^[2],在 Shimadzu CS-9000 采用双波长(1:590nm,2:500 nm)进行凝胶薄层扫描测定。

2 结果与讨论

2.1 产唾液酸醛缩酶菌种筛选及染色体 DNA 的提取

我们用含唾液酸为唯一碳源的培养基,通过直接测定唾液酸醛缩酶方法从 9 株大肠杆菌中成功地筛选出一株含唾液酸醛缩酶基因的菌株。并按常规方法提取该菌的染色体 DNA。

2.2 重组质粒的构建

2.2.1 PCR 反应:根据唾液酸醛缩酶基因序列^[4]及 pBV220 上多克隆位点,我们设计了一对引物:

5'端引物 AGGAATTCATGGCAACGAATTTAC(加上一个 *EcoRI* 位点)

3'端引物 TCCTGCAGGCACCCGCGCTCTT(加上一个 *PstI* 位点)

按材料与方法所述,PCR 扩增出大小为 900bp 左右的片段,与报道的唾液酸醛缩酶大小一致^[5]。

2.2.2 重组质粒的构建,参见图 1。

2.3 重组质粒 pBV220-ALD 的鉴定

经过 *EcoRI-PstI* 双酶酶切重组质粒 pBV220-ALD,得到大小两个片段,其中小片段约 900bp 左右,与报道的基因片段大小一致,参见图 2。

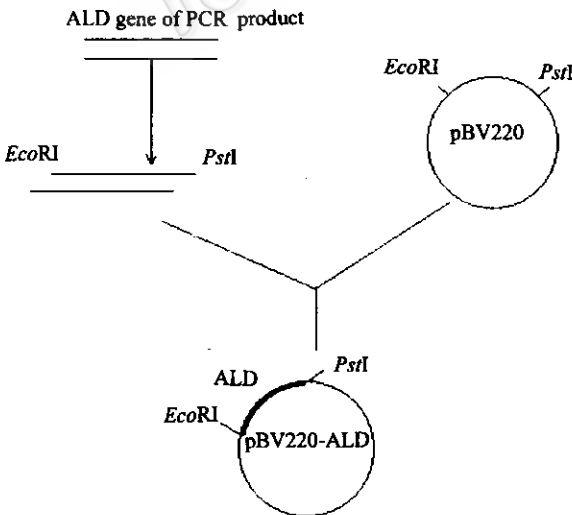


图 1 pBV220-ALD 重组质粒构建示意图

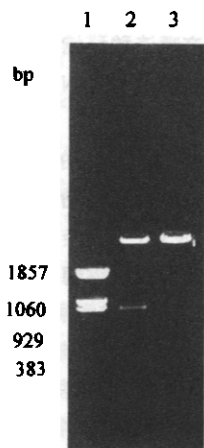


图 2 限制酶酶切分析重组质粒 pBV220-ALD

1: pBR322-*BstNI* marker
2: pBV220-ALD *EcoRI* + *PstI*
3: pBV220 *EcoRI* + *PstI*

2.4 SDS-PAGE 电泳

按 1.5 所述,做 SDS-PAGE 电泳,结果见图 3。据文献[4]报道,唾液酸醛缩酶的分子量是 98kD(三聚体),单体为 33kD,我们的结果与此相符。对凝胶进行薄层扫描,结果显示,唾液酸醛缩酶表达量占全菌可溶性蛋白的 62%。

2.5 工程菌培养条件的研究

由于 pBV220 带有 CI 调控基因,含 P_{RPL} 温控启动子,所以含 pBV-220-ALD 的工程菌在培养基中,发酵液须达到对数期后,于 42℃ 下诱导,酶才能高效表达。我们对工程菌的培养条件作了一些试验,如发酵时间,培养基组分等。在 LB 培养基里,工程菌在 30℃ 培养 4 h,待发酵液 A_{600} 达到 0.5 左右再转入 42℃ 进行诱导。由图 5 可见,最佳诱导时间是 4 h。而在另一种丰富培养基(RM)中,工程菌在 30℃ 培养,发酵液 A_{600} 则要达到 3.0 左右再转入 42℃ 诱导,它的最佳诱导时间是 6 h(图 4),其产酶活力是 LB 培养基时的 5 倍,最高活力能达到 1700 u/L。

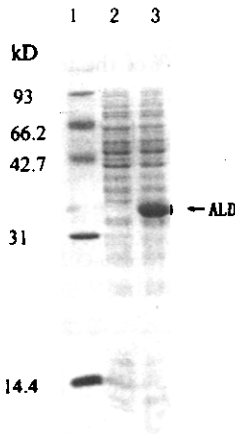


图 3 蛋白质 SDS 聚丙烯酰胺电泳
1. Marker; 2. *E. coli*-TGI-pBV220;
3. *E. coli*-TGI-pBV220-ALD

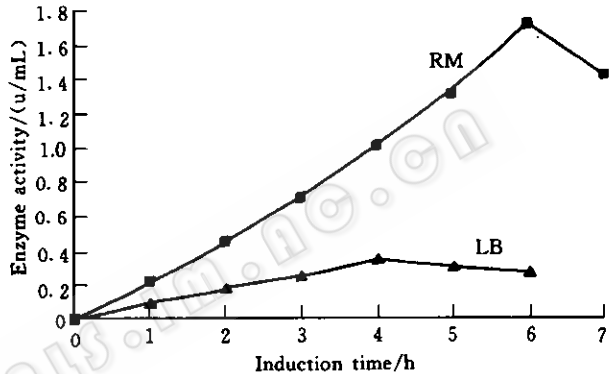


图 4 诱导时间对酶活的影响(LB 和 RM 培养基)

3 讨论

由于唾液酸醛缩酶在野生菌株中是诱导酶,在通常的生理状态中不形成或酶量很低,只有在以唾液酸为唯一碳源的情况下才可有较高的表达。本实验中,用 0.5% 唾液酸含量的培养基筛选产酶菌株,其酶活为 20u/L,而用基因工程的方法,得到的工程菌的产酶量为 1700 u/L 是普通菌种的 80 倍以上,并且在工程菌的发酵培养基中毋需添加唾液酸作为碳源。对照工程菌在两种不同培养基的发酵情况可看出,在丰富培养基条件下,所得到的单位体积酶活力是 LB 培养基的 5 倍。这种差别主要是与菌体量有关。在丰富培养基里,由于菌体量的增加,从而使总的酶活力大幅度提高。

参 考 文 献

[1] 张智清,姚立红,侯云德. 病毒学报,1990, 6:111~116.
 [2] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. Molecular Cloning, A Lab Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Lab New York, 1989.
 [3] J. E. G. Barnett, D. L. Corina, G. Rasool. J. Biochem, 1971, 125:275~285.

- [4] Y. Ohta, K. Watanabe, A. Kimura. *Nucleic Acids Research*, 1985, 13(24) : 8843~8852.
- [5] Y. Uchida, Y. Tsukada, T. Sugimori. *J. Biochem.*, 1984, 96: 507~522.

Construction and High Expression of N-acetylneuraminate Lyase Engineering Bacteria*

Dong Weilin Qian Shijun

(*Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080*)

Abstract The recombinant plasmid pBV220-ALD with the vector pBV220 and the N-acetylneuraminate lyase(NeuAc lyase) gene amplified by PCR was constructed and transformed into *E. coli* TGI. The fermentation conditions of engineered strain were studied. In rich medium, the maximum enzyme activity of the NeuAc lyase was about 1700u/L, and NeuAc lyase was 62% of the total soluble protein.

Key words N-acetylneuraminate lyase(NeuAc lyase), engineered strain, expression

* Supported by Project of Chinese National Programs for Science and Technology Development (No. 96-C02-03-08)