

浅谈遗传工程在微生物酶中的应用

孙晋武 郭兴华

(中国科学院微生物研究所,北京)

新的工业革命重要内容之一的遗传工程,经过了十年时间的准备和探索过程,如今正像雨后春笋一般破土而出。目前,遗传工程作为一种最新和有效的手段,用来改善和提高一些激素、酶类、疫苗和其它一些代谢产物的质量与产量,以符合及满足人类的需要,现已取得一些可喜的成绩。胰岛素、人生长激素、乙型肝炎表面抗原、干扰素及凝乳酶等的基因都已克隆成功并得到有效的表达,已经或将要投入生产,使人们看到了这项新技术具有无比广阔的前景。

本文不准备涉及遗传工程的各个方面,只从微生物酶的角度来谈谈该项技术在这一领域中的应用情况及前途。

酶作为一种生物催化剂,在生命活动中起着重要的作用,另外它又可以作为化学反应的催化剂,应用于食品、发酵、轻工、制药等各个方面。表 1 列出了 1980 年世界各国在一些主要的酶制剂工业方面的产量与产值。目前,随着酶应用范围的扩大及新的具有工业价值的酶的开发,酶制剂的生产,每年正以 8% 的速率递增。如以此速度发展,到 80 年代中期,全世界工业酶的市场销售额将达到 60 亿美元。

表 1 1980 年世界各主要酶制剂的产量及产值

酶 制 剂	年产量(吨/年)	销 售 额 (百万美元/年)
细菌蛋白酶	530	66
葡萄糖淀粉酶	350	36
α -淀粉酶	320	12
葡萄糖异构酶	70	56
凝乳酶	26	64

人类现已认识的酶类有 2000 种左右,其中大部分在微生物中都存在。但是,目前在生产中应用的只有几十种,加上作为试剂而应用的酶,也只有数百种,只占酶的巨大资源的极小一部分。之所以如此,是有很多原因的,诸如酶的不稳定性、对作用条件有一定的要求、酶活力的大小及酶体系的复杂性等等。即使对现已采用的酶,在实际应用中,也还有一些问题需要解决。这些既向酶工程学家,同时也向遗传工程学家们

提出了研究的课题。例如,是否可将来源比较困难的动植物产生的酶,经过基因克隆,转到便于大量繁殖的微生物中去;能否使在细胞内产生的酶转变为胞外酶;能否提高产酶基因的拷贝数及表达能力,以提高酶的产量;能否获得在极端条件下(如高温、酸碱性溶液中)仍具活力的新酶等等。

下面就以几个酶的基因克隆成功的实例,较为详细地说明一下。看看在这方面工作中所体现的设计思想,一般的实验方法以及这些工作的意义。

一、青霉素酰化酶 [EC3. 5. 1. 11]

青霉素酰化酶能将青霉素水解生成 6-氨基青霉烷酸(6-APA),后者是生产各种半合成青霉素的母核,因而在医药工业上,该酶具有特殊的重要作用。产青霉素酰化酶的微生物很多,在细菌、放线菌和真菌中都有报导。1980 年西德的 H. Mayer 及 J. Collins 等^[1]首先报导了将大肠杆菌的青霉素 G 酰化酶基因,通过多拷贝质粒而克隆到另一株大肠杆菌受体菌中,成功地得以表达,具体过程是:

采用青霉素酰化酶生产菌 *E. coli* ATCC 11105,抽提其总染色体 DNA,用限制性内切酶 Hind III 切割,与经同一内切酶切割的运载体 Cosmid pJC 720 在 T4 连接酶作用下进行连接,然后进行体外装配,再转化到受体菌 *E. coli* HB101 中去,涂于含利福平的培养基上,从而构成供体菌的基因文库。

采用培养过夜的指示菌粘质赛氏杆菌 ATCC 27117,,对于印影在含有 3g/l 青霉素 G 的培养基上的上述大肠杆菌基因文库进行筛选,挑出指示菌生长受到抑制的相应克隆,反复纯化,并加以扩增培养。经鉴定,该克隆的插入物约为 15.5Kb。

抽提上述克隆的 DNA,进一步用 Eco RI 和 Pst I 进行切割,与经同样酶切的质粒 pBR 322 连结,然后转化受体菌 *E. coli* 5K,在含有四环素的平板上进行筛选,便可得到带有青霉素酰化酶基因片段的克隆了。

将此克隆进行紫外线诱变,便可得到高产菌株 *E. coli* 5K (pHM12),其青霉素酰化酶产量比不经诱变的原始生产菌 ATCC 11105 高 45 倍,比经诱变的原始菌

株也高 7.5 倍。带有该酶基因的质粒在寄主细胞中是稳定的。目前已对青霉素酰化酶及其基因进行了部分序列分析,而且已经应用于工业生产。

在此例中,有几点值得借鉴:1.他们首先将整个基因组插入到能接受大片段的 Cosmid 中,构成其基因文库,这样既便于目的基因产物的筛选,又不会破坏该基因的表达。2.第二步再将带有该基因的大片段切小,第二次克隆到 pBR322 中,利用该松弛型质粒的多拷贝性质,以提高酶的产量。3.在第二次克隆过程中,采用 Eco RI-Pst I 酶切片段插入到 pBR 322 中,以破坏该质粒中 β -内酰胺酶基因的表达,后者的存在会破坏生成的 6-APA,从而影响青霉素酰化酶生产菌的质量。4.利用粘质赛氏杆菌 ATCC 27117 必需要有青霉素 G 才能生长这一特性,巧妙地指示出带有青霉素酰化酶基因克隆的菌落。

二、 α -淀粉酶 [EC3. 2. 1. 1]

α -淀粉酶广泛地应用于食品、酿造、轻纺、造纸等工业,是生产及销售最大的酶制剂之一(见表 1)。正因为如此,人们已对产生菌进行了广泛、深入的遗传学研究。国外从 60 年代开始,便对它进行了转化与转导,并把枯草芽孢杆菌 168 菌株淀粉酶的结构基因及一些调控基因在染色体上定了位。在调控基因中,根据功能特点,又可分为专一性及普遍性调控两种。

α -淀粉酶产生菌大多是革兰氏阳性芽孢杆菌,因为这类菌无外膜,又加上不少基因产物具有分泌性的信号肽,所以使发酵后处理变得简单方便,可直接从发酵液中得到产物,从而降低成本,提高产量。芽孢菌所具有的信号肽,又是研究基因表达的好材料。产生菌具有生产上的优越性和理论研究上的重要性,促使科学家用不同的方法对基因进行了克隆。

现已报导用于克隆的供体菌有:解淀粉芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜热芽孢杆菌和凝结芽孢杆菌等。受体菌有枯草芽孢杆菌及大肠杆菌。运载体则采用良性噬菌体 ϕ 3T 和 ρ 11,还有质粒 pUB110, pBR322 和 Charon 4 噬菌体等。

就克隆的方法来讲,可分为:1.噬菌体法。把良性噬菌体 DNA 和染色体 DNA 在体外用限制性内切酶切割,然后用 T4 DNA 连接酶连接,并转化到被该噬菌体溶原化的菌中,在体内经过交换,把目的基因交换到原噬菌体上,通过选择,获得所需的转化体。这个方法的优点是容易克隆到目的基因,外源基因在转化体内稳定,不会在普通传代过程中丢失,缺点是不易得到良性噬菌体 DNA,外源基因是单拷贝的。2.质粒法。方法基本同上,所不同的是转化到细菌体内后,目的基因不整合到染色体上,而是存在于染色体外的质粒上。这种方法的优缺点与上法正好相反,即质粒 DNA 容易得到,外源基因的拷贝数较多。缺点是不稳

定,易丢失。为了保证质粒不丢掉,往往要在发酵时加入抗菌素,发酵后再从产物中去除残存的抗菌素,这样就使得成本变得昂贵。

芬兰 L. Palva^[1]报导以解淀粉芽孢杆菌为供体,采用鸟枪法,以 pUB110 为运载体,克隆到枯草芽孢杆菌中去,得到的带有 α -淀粉酶基因的克隆,其活力要比供体菌高 5 倍,并且具有供体菌 α -淀粉酶的全部性质。目前他们已对 α -淀粉酶及其氨基末端的信号肽区域及该基因的启动子进行了核苷酸序列分析,对阐明该酶的分泌机制提供了有益的信息。

爱尔兰的 S. A. Ortleep 等^[2,4]则采用供体菌地衣状芽孢杆菌中的高温 α -淀粉酶基因,克隆到质粒 pBD64 中,然后将重组体转化到不产该酶的枯草芽孢杆菌中,按照在含有淀粉的培养基中用碘染色的方法分离出产 α -淀粉酶的菌落。1983 年,他们已经克隆成功,但其产酶量与供体菌一样低。最近又有报导^[4],他们将此基因转化到别的枯草芽孢杆菌生产菌中,获得了高效表达。酶产量提高 7—10 倍,而且该酶在 93℃ 时仍很稳定,这样可使工业生产中,降解淀粉原来需要分二步(开始是 50—80℃,然后慢慢升到 100℃),采用该高温酶后,只需一步就可以了,因而具有极大的工业应用价值。

三、凝乳酶 [EC3. 4. 23. 4]

这是一种专一地裂解乳品中 K-酪蛋白分子而使乳蛋白凝聚的一类酸性蛋白酶。在生产奶酪(chese)中很有用,通常是从小牛的第四胃中得到,在一些真菌中也存在,但其质量远不如小牛的。由于小牛胃来源有限,因此人们试图用遗传工程的手段,将小牛来源的该酶基因,植入到微生物中,通过发酵,生产该酶,现已获得成功,并已进入中试阶段,不久便可投放市场。

这是一种动物来源的酶,尽管超出了本文的“微生物酶”的命题,但一来该酶在微生物中也存在,二来这一工作作为真核细胞酶的基因在原核生物中克隆并得到表达的实例,与原核生物基因克隆有些差别,具有一定的代表意义,故在此介绍一下。

凝乳酶在体内是以没有活性的前凝乳酶原的形式存在,在通过细胞膜时,去掉 16 个氨基酸组成的信号肽,成为凝乳酶原,然后在体内再将氨基末端的 42 个氨基酸切去后便成为具有活力的凝乳酶。

美国 D. Moir 等^[3]报导了对牛凝乳酶基因克隆的情况。他们的方法是:从小牛第四胃粘膜组织中分离到总 RNA,经 Oligo(dT)-cellulose 柱得到 Poly(A)⁺ RNA,经逆转录酶合成 cDNA,用 S1 核酸酶切去单链部分,形成平头末端,装上 Hind III 接头,将用 Hind III 切割后的 cDNA 与经 Hind III 切割又经硷性磷酸酯酶处理的噬菌体 CGF4 (是由噬菌体 f1 改造而来的)进行连接。之所以选择 Hind III 来切割,是因为通过凝乳酶的氨基酸序列分析知道,在对该酶编码的 DNA 序列

表 2 现已克隆成功的微生物酶*

编号	被克隆的酶的基因	供体菌	受体菌	编号	被克隆的酶的基因	供体菌	受体菌
1	咪唑-磷酸甘油脱氢酶 ^[7]	Yeast	<i>E. coli</i>	24	固氮酶 ^[40,41]	<i>Rhizobium japonicum</i>	<i>E. coli</i>
2	精氨酸琥珀酸裂解酶 ^[8]	Yeast	<i>E. coli</i>	25	碱性磷酸酯酶 ^[42,43]	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
3	酪氨酸氨酶 ^[9]	<i>Neurospora crassa</i>	<i>E. coli</i>	26	青霉素酶 ^[44]	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. stearothermophilus</i>
4	β -半乳糖苷酶 ^[10,11]	Yeast <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>E. coli</i> <i>E. coli</i>	27	苏氨酸-tRNA合成酶 ^[45]	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
5	半乳糖激酶 ^[12]	Yeast	<i>E. coli</i>	28	苯丙氨酸-tRNA合成酶 ^[46]	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
6	3-磷酸甘油醛脱氢酶 ^[13,14]	Yeast <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> <i>E. coli</i>	29	精氨酸酶 ^[47,48]	Yeast	<i>E. coli</i>
7	α -淀粉酶 ^[2,3,4,15]	<i>B. subtilis</i> <i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. subtilis</i>	30	γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 ^[49]	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
8	β -异丙基苹果酸脱氢酶 ^[16]	<i>Thermus thermophilus</i>	<i>E. coli</i>	31	天门冬氨酸- β -半醛脱氢酶 ^[49]	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
9	乙醇脱氢酶 ^[17]	Yeast	Yeast	32	β -D-磷酸半乳糖苷半乳糖水解酶 ^[50]	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>E. coli</i>
10	细胞色素氧化酶 ^[18]	Yeast	Yeast	33	磷酸果糖激酶 ^[51]	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
11	青霉素G酰化酶 ^[1,19]	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	34	磷酸甘油醛异构酶 ^[51]	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
12	丙酮酸脱氢酶复合物 ^[20]	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	35	磷脂酶 ^[52,53]	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
13	3-异丙基苹果酸脱氢酶 ^[21]	<i>Thermus thermophilus</i>	<i>E. coli</i>	36	尿嘧啶透性酶 ^[54]	Yeast	Yeast <i>E. coli</i>
14	甲硫氨酸-tRNA合成酶 ^[22,23]	Yeast <i>E. coli</i>	Yeast <i>E. coli</i>	37	转化酶(蔗糖酶) ^[55]	Yeast	Yeast
15	胸苷激酶 ^[24,25,26]	Marmoset herpesvirus	<i>E. coli</i>	38	链激酶 ^[56,57]	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>E. coli</i>
16	外切核酸酶V ^[27]	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	39	酪氨酸-tRNA合成酶 ^[58]	<i>B. stearothermophilus</i> <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> <i>E. coli</i>
17	鸟氨酸氨基甲酰基转移酶 ^[28,29]	Yeast <i>Aspergillus nidulans</i>	<i>E. coli</i> Yeast	40	D-乳酸脱氢酶 ^[59]	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
18	二氢叶酸还原酶 ^[30,31]	T4 phage <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> <i>E. coli</i>	41	唾液酸苷酶 ^[60,61]	<i>influenza virus</i>	<i>E. coli</i>
19	色氨酸合成酶A ^[32]	<i>Salmonella thymurium</i>	<i>E. coli</i>	42	β -胱硫醚酶 ^[62]	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
20	RNA多聚酶 ^[33]	T5 phage	<i>E. coli</i>	43	麦芽糖酶 ^[63,64]	Yeast	Yeast
21	糖基转移酶 ^[34,35]	<i>E. coli</i> <i>Streptococcus</i>	<i>E. coli</i> <i>E. coli</i>	44	中性蛋白酶 ^[65]	<i>B. stearothermophilus</i>	<i>B. subtilis</i> <i>B. stearothermophilus</i>
22	谷氨酸脱氢酶 ^[36,37]	<i>Neurospora crassa</i> <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> <i>E. coli</i>	45	多核苷酸磷酸化酶 ^[66]	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
23	甲基化酶 ^[38,39]	<i>B. centrosporus</i> <i>B. subtilis</i>	<i>F. coli</i> <i>E. coli</i>	46	已糖激酶 ^[67]	Yeast	<i>E. coli</i>

编号	被克隆的酶的基因	供体菌	受体菌	编号	被克隆的酶的基因	供体菌	受体菌
47	葡萄糖激酶 ^[67,68]	<i>Yeast</i>	<i>E. coli</i>	60	氯霉素乙酰转移酶 ^[63]	<i>B. pumilus</i>	<i>B. subtilis</i>
48	新霉素磷酸转移酶 ^[69]	<i>Streptomyces fradiae</i>	<i>E. coli</i>	61	乙酰鸟氨酸 δ -转氨酶 ^[64]	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
49	甲基转移酶 ^[70,71]	phage SPR	<i>E. coli</i> <i>E. subtilis</i>	62	苯丙氨酸脱氢酶 ^[65]	<i>Proleus morgani</i>	<i>E. coli</i> <i>P. morgani</i>
50	蔗糖-6-果糖基转移酶 ^[72]	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	63	谷氨酰胺-tRNA合成酶 ^[66]	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
51	核糖核酸酶 II ^[73]	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	64	乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶 ^[67]	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
52	虫萤光素酶 ^[74]	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>E. coli</i>	65	对氨基苯甲酸合成酶 ^[68]	<i>Streptomyces griseus</i>	<i>Streptomyces lividans</i>
53	反丁烯二酸酶 ^[75]	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	66	核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶 ^[69]	<i>Rhodospseudomonas sphaeroides</i>	<i>E. coli</i>
54	葡萄糖淀粉酶 ^[76]	<i>Yeast</i>	<i>Yeast</i>	67	木聚糖酶 ^[70, 91]	<i>B. subtilis</i> <i>B. pumilus</i>	<i>E. coli</i>
55	蛋白酶 ^[77]	Poliovirus	<i>E. coli</i>	68	3', 5'-氨基糖苷磷酸转移酶 III 型 ^[72]	<i>Streptococcus faecalis</i>	<i>E. coli</i>
56	羧肽酶 G2 ^[78]	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>E. coli</i>	69	β -木糖苷酶 ^[91]	<i>B. pumilus</i>	<i>E. coli</i>
57	纤维素酶 ^[79, 80]	<i>Thermomonospora</i>	<i>E. coli</i>	70	头孢菌素酶 ^[93]	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>E. coli</i>
58	谷氨酰胺合成酶 ^[81]	<i>Rhizobium meliloti</i>	<i>E. coli</i>	71	邻甲基转移酶 ^[94]	<i>Streptomyces</i>	<i>E. coli</i>
59	β -葡聚糖酶 ^[82]	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	72	乳清酸核苷-5'-磷酸羧化酶 ^[95]	<i>Neurospora crassa</i>	<i>E. coli</i>

* 本表基本上按被克隆的酶的时间排列,其中:

编号	报导时间	编号	报导时间
1	1977	13—19	1981
2—4	1978	20—43	1982
5—7	1979	44—72	1983
8—12	1980		

中没有 Hind III 切点。将连接后的 DNA 转染 *E. coli* BNN45, 得到噬菌斑。

通过免疫沉淀法证明上述得到的 poly (A)⁺ RNA 主要成分是编码凝乳酶的 mRNA, 因此筛选时, 用标记极弱的 poly (A)⁺ RNA 探针来筛选约 2000 个 cDNA 克隆组成的基因文库, 挑出给出强烈杂交的噬菌斑, 经凝胶电泳检查, 显示它带有 1Kb 的插入物, 能与凝乳酶的 mRNA 杂交, 并能得到分子量为 43,000 的翻译产物, 因而带有凝乳酶的基因。

英国 T. J. R. Harris 等人^[67]报导的方法与此相似。他们制备的 cDNA 与质粒 pAT153 相连, 转化 *E. coli* HB101。筛选分成二步, 第一步是用 ³²P 标记的小牛胃和小牛肝的 mRNA 分别制成探针, 与重组体进行菌落杂交, 从 200 个重组体中得到 35 个可专一性地与牛胃而不能与牛肝 mRNA 探针杂交的克隆。

第二步是再对这些重组体, 用 ³²P 标记的、用化学合成的寡核苷酸为引物, 通过逆转录酶从牛胃粘膜 mRNA 制得的 cDNA 为探针, 进行筛选。而此引物的核

苷酸顺序是根据已知的凝乳酶第 183—186 位氨基酸推算出来的。通过筛选,从上述 35 个克隆只得到一个能与此探针强烈杂交的克隆,凝胶电泳分析,插入物也在 1Kb 左右。

当然,这里介绍的只是公开的报导,与目前实际投入生产的,在所用菌种和方法上都会有所不同。另外在克隆成功后到实际应用于生产,也还有不少问题需要解决,而这些往往是保密的。

从上面所举的三个例子,我们从不同的角度来反映遗传工程在酶生产中的一些情况,其实,遗传工程作为一种新技术,已广泛地应用于这一领域。下面列出我们所收集的,很不完全的,仅就微生物来源的酶,已经克隆成功的公开报导,以飨读者。实际上很多用于生产的工程菌,例如用于限制性内切酶的工程菌,出于

保密的原因,并无报导。但从这一表中,我们也能略见一斑了。

参 考 文 献

- [1] Mayer, H., J. Collins and F. Wagner: *Enzyme Engineering*, Vol. 5, 61—69, ed. by H. H. Weetall, 1980.
- [2] Palva, I.: *Gene*, 19: 81—87, 1982.
- [3] Ortlepp, S. S. et al.: *Gene*, 23: 267—276, 1983.
- [4] Ortlepp, S. S. et al.: *Bio/Technology*, Feb.: 112, 1984.
- [5] Moir, D. et al.: *Gene*, 19: 127—138, 1982.
- [6] Harris, T. J. R. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 10(7): 2177—2187, 1982.
(文献 7—95 略)