L-山梨酮脱氢酶基因在大肠杆菌中的克隆和表达

郭新友　尹光琳

(中国科学院上海生物工程研究中心　上海　200233)

摘要　参照已知的L-山梨酮脱氢酶基因序列，合成了两个引物序列，以 *Acetobacter liquefaciens* IF012258 的染色体 DNA 为模板进行 PCR 反应，克隆得到了 L-山梨酮脱氢酶基因，经酶切验证与预期结果相同，序列测定结果也与已知序列一致。采用 PCR 方法在此基因的两端加上了 E. coRI 和 HindIII 两个酶切位点，经 E. coRI 和 HindIII 酶切后去掉了两端的多余序列后，将此片段连接到 pKKH 上，经诱导无蛋白表达，采用 RcaI 酶切启动子端，对载体 pKKH 则采用 NcoI 酶切，使表达载体的 SD 序列与起始密码子 ATG 之间的距离减少了一个碱基，终止子端仍采用 HindIII 酶切，连接后进行转化，得到的阳性克隆经诱导后有明显的蛋白表达条带，酶活力也比对照明显增高。此工作为构建可直接利用 L-山梨糖发酵产生维生素 C 前体 2-酮基-L-古龙酸的基因工程菌打下了基础。

关键词　L-山梨酮脱氢酶基因，PCR，表达载体，SD 序列，克隆，表达

分类号　Q939.97

目前，维生素 C 在我国的生产大多采用“两步发酵法”，同“莱氏法”[1]相比，该法简化了生产工艺，降低了原料成本，减少了有毒有害及易燃易爆化学药品的消耗，有利于环境保护[2]。

七十年代中期，Makover 和 Periman 等人相继研究了生黑葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter melanogenus* IF03293 利用 L-山梨糖的代谢过程，并分别提出了产生维生素 C 前体 2-酮基-L-古龙酸(2-KLG)的“山梨酮途径”[3,4]。

其中，催化第一步正反应的酶是 L-山梨糖

1997-08-05收稿

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

脱氢酶，催化逆反应的酶是L-山梨酮还原酶，催化第二步反应的酶是L-山梨酮脱氢酶。尹光琳等证实了在氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans* SCB329(通称"小菌")和苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* SCB933(通称"大菌")混合发酵过程中，同样有L-山梨酮出现，当L-山梨酮积累至一定量时便不再增加，此时2-KLG开始大量产生，表明了在混合菌发酵过程中，2-KLG的产生也是通过同样途径产生的。根据混合菌代谢及发酵的特点，即 *G. oxydans* SCB329 单独培养时，除了可产生少量的2-KLG外，也能产生与在混合培养情况下基本等量的L-山梨酮，而 *B. thuringiensis* SCB933 单独培养时则既不产生L-山梨酮，也不产生2-KLG，由此推断，参与混合发酵的这两种微生物在此途径中起着不同的作用[2]。其中，"山梨酮途径"存在于 *G. oxydans* SCB329 中，但其产生2-KLG的第二步反应则极大地限制了整个反应的进行。而 *B. thuringiensis* SCB933 则促进了第二步反应的顺利进行，使得整个反应的速度大大加快。为了深入探索"山梨酮途径"的机理，以求进一步简化维生素C的生产工艺，采用了基因工程的技术对维生素C的生产菌株进行进一步的改造。为解除 *G. oxydans* SCB329 对第二步反应速度的限制，采用了在 *G. oxydans* SCB329 中导入一个高活性的L-山梨酮脱氢酶的方法。首先选择 *Acetobacter liqueficiens* IF012258 这个具有高活力的L-山梨酮脱氢酶的菌种[5]，以其染色体DNA为模板，以PCR方法扩增L-山梨酮脱氢酶基因，构建成功原核表达质粒以后，实现了在大肠杆菌中的高效表达，并显示了较高的酶活性，为下一步构建能产生高浓度2-KLG的基因工程菌的工作打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及质粒：*Acetobacter liqueficiens* IF012258 由日本IFO菌种保存中心得到；菌株 *E. coli* DH5α、*E. coli* RB791 及质粒 pKKH 均由本实验室保存；质粒 pGEM-3Zf(+)、pGEM-T为美国 Promaga 公司产品。

1.1.2 酶及寡核苷酸：限制性内切酶、T4DNA连接酶、Wizard 试剂盒等均为美国 Promaga 公司产品：RNase A、NAD^+ 和溶菌酶为华美生物工程公司产品：PCR引物合成及DNA序列测定均由中科院上海植物生理研究所 Beckman 生物技术示范实验室完成。

1.1.3 培养基：

804 培养基(%)：蛋白胨 0.5，酵母提取物 0.5，葡萄糖 0.5，pH6.6～7.0。

LB 培养基氨苄青霉素(Amp)使用浓度为 100μg/ml。

1.1.4 试剂：L-山梨酮为本实验室合成，其余试剂参考文献[8]。

1.2 方法

1.2.1 染色体DNA的提取：将 *A. liqueficiens* IF012258 新鲜斜面接种至 200ml 804 培养基，30℃ 摇瓶培养 48h，离心收集菌体，用 10ml 10mmol/L Tris-HCl，1mmol/L EDTA (pH8.0)提取缓冲液悬浮，离心收集菌体，加入 10ml 同样缓冲液悬浮，加入 100μl 150mg/ml 溶菌酶，100μl 10mg/ml RNase，37℃ 温育 1h，加入 50μl 120mg/ml 蛋白酶K，50℃ 温育 3h，加入等体积酚/氯仿，轻轻振荡，混匀，12000r/min，离心 10min，吸取上清液，再用酚/氯仿抽提一次，吸取上清液，用氯仿/异戊醇抽提一次，吸取上清液，加入 0.2 倍体积 10mol/L NH_4Ac，2 倍体积无水乙醇，0℃ 沉淀 10min，12000r/min，离心 15min，倒去上清，沉淀加入 1ml 70% 乙醇洗涤一次，12000r/min，离心 10min，弃上清，沉淀于 50℃ 烘干，加入 200μl TE 溶解后于 −20℃ 保存备用。

1.2.2 PCR体系：5μl 10倍缓冲液，2μl 15mmol/L dNTP，2μl 25mmol/L $MgCl_2$，20pmol/L 引物 I 及引物 II 各 2μl，模板 1μl，双蒸水 36μl，97℃ 10min，冷却后加入 0.5μl TaqDNA 聚合酶。PCR条件为：95℃ 变性 1min，55℃ 退火 1min，72℃ 延伸 3min，35 个循环后于 72℃ 保温 5min。PCR产物用 Wizard 试剂盒回

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

收。

1.2.3 SDS-PAGE鉴定表达产物的分子量：参考文献[8]的方法进行鉴定，其中积层胶浓度为5%，分离胶浓度为12%。

1.2.4 L-山梨酮脱氢酶活性的测定：将过夜培养的菌体以2%的接种量接种于40ml 50μg/ml氨苄青霉素LB液体培养基中，37℃，200r/min摇瓶培养4h后加入30μl 200mg/ml IPTG进行诱导，7～8h后收集菌体，洗涤后重新悬浮于2mlK_3PO_4(pH7.0)缓冲液中，用超声波仪破碎4min，其间每1min间隔用冰冷却1min，离心沉淀细胞碎片后取上清液作为待测酶液。在30℃，100μl酶液加到2.7ml K_3PO_4 (pH7.0)缓冲液中，再加100μl浓度为22mmol/L的NAD^+溶液及100μl过量底物L-山梨酮，测定OD_{340}的变化，根据标准曲线换算成NADH浓度变化，计算酶活力。酶活力单位(u)定义为：每分钟还原1μmol NAD^+所需的酶量。蛋白浓度采用双缩脲法以牛血清白蛋白为标准测定[10]，计算酶的比活力。

2 结果和讨论

2.1 PCR扩增结果(图1)

根据以知的基因序列合成两个引物。

引物1：5′——ACCCGGGAATTCATGACCC-GTTCCCAGATC——3′

EcoRI

引物2：5′——AGGATCCAAGCTTAGTCGG-TCTTCTGGTCC——3′

HindIII

引物1和引物2的一端分别加有EcoRI和HindIII酶切位点，35个循环后电泳鉴定PCR产物，在1300bp～1500bp之间可见一条十分明显的DNA扩增条带，片段长度与预期相符。

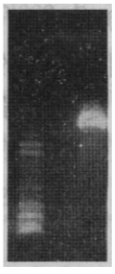

图1 PCR产物电泳结果
左为λ/HindIII分子量Marker，右为扩增产物

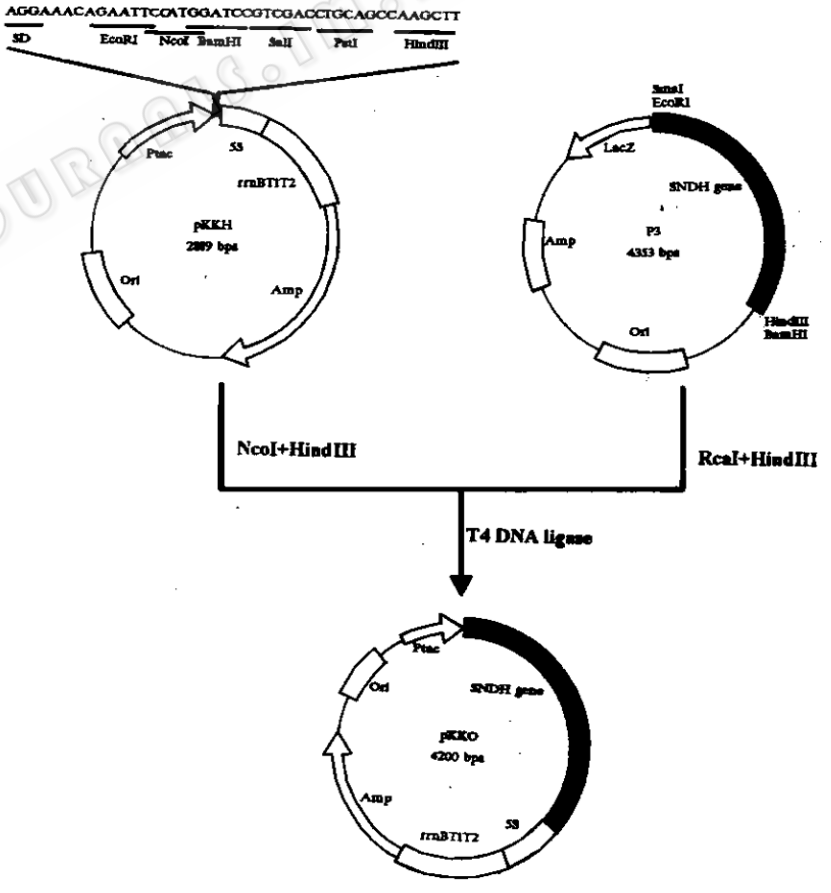

图2 表达载体pKKO的构建

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

2.2 L-山梨酮脱氢酶基因的克隆

采用 Promaga 公司 pGEM -T克隆载体对 PCR 反应产物进行克隆，得到阳性转化子后选取其中一个菌落抽提出其质粒 DNA，用 E. coRI 和 HindIII 双酶切后回收小片段，然后采用限制性内切酶酶切初步进行鉴定，结果与预期都相符。DNA 序列测定结果也与已知序列一致，充分证明克隆得到的的确就是 L-山梨酮脱氢酶基因。将此克隆命名为 *E. coli* P3。

2.3 表达载体 pKKO 的构建(图 2)

将带有强启动子 Ptac 启动子的质粒 pKKH 用 NcoI 和 HindIII 双酶切后回收得到的大片段与 RcaI 和 HindIII 酶切回收得到的 L-山梨酮脱氢酶基因进行连接，由于 NcoI 和 RcaI 切出的末端相同，因此连接效率与一般粘末端的连接效率基本相同，连接物用来转化 *E. coli* RB791。

2.4 L-山梨酮脱氢酶基因在大肠杆菌中的表达

选取一个 *E. coli* RB791 阳性转化子，抽提其质粒 DNA，电泳发现明显比 pKKH 增大，酶切验证也与预期相符，证明其的确为重组转化子，将其命名为 *E. coli* pKKO。将 *E. coli* pKKO 的过夜培养物(约 8～10h)以 2% 的接种量接种到 30ml 氨苄青霉素 LB 液体培养基中，37℃培养 6h 后加入 25μl 200mg / ml IPTG 进行诱导，4h 后收集菌体。

2.5 SDS-PAGE电泳结果(图 3)

E. coli pKKO 经诱导后在 50ku 处有一明显蛋白表达条带。

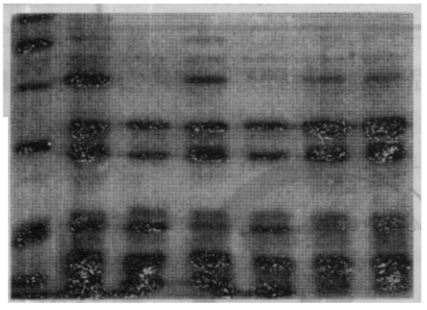

图3 表达产物SDS-PAGE电泳结果
从左至右依次为蛋白低分子量Marker，诱导4h的 *E. coli* pKKO及对照 *E. coli* pKKH，诱导2h的 *E. coli* pKKO及对照 *E. coli* pKKH，未诱导的 *E. coli* pKKO及对照 *E. coli* pKKH

2.6 340nm 处的吸光度曲线(图 4)

从图 4 中可看到 *E. coli* pKKO 的吸光度明显比对照 *E. coli* pKKH 高，证明得到表达的的确是有活性的酶。根据 NADH 在 340nm 处光吸收的标准曲线和蛋白标准曲线，可计算出前者的比活力为 88.2，而后者仅为 25.1。

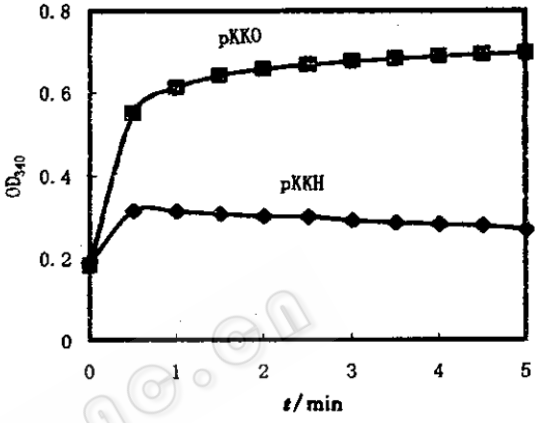

图4 *E. coli* pKKO表达产物活性的吸光度曲线

在基因表达的过程中，我们曾采用启动子前端的 EcoRI 酶切位点将基因克隆到载体 pKKH 上，后经反复诱导均未见有蛋白表达，也没有测到有 L-山梨酮脱氢酶的活性。后来，启动子端采用 NcoI 进行酶切，而载体 pKKH 则采用 RcaI 酶切，这样得到的表达载体的 SD 序列与启动子之间的距离比用 EcoRI 酶切得到少一个碱基，后来经诱导有蛋白表达，并测到了 L-山梨酮脱氢酶的活性，证明 SD 序列对基因的表达是至关重要的。另外，当基因的终止子端的多余序列未去掉时，虽有蛋白表达但却测不到酶活力，证明基因末端的多余序列有可能对基因的表达产物的活性产生影响。

从上述实验结果可见，我们已经克隆到了正确的 L-山梨酮脱氢酶基因，并且在大肠杆菌中得到了有效的表达，表达产物也具有较高的活性，至此，L-山梨酮脱氢酶基因的克隆和表达获得成功，为下一步将此基因导入 *Gluconobacter oxydans* SCB329 中以构建可利用 L-山梨糖产生高浓度 2-KLG的基因工程菌奠定了坚实的基础。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

参 考 文 献

[1] Reichstein T, Grussner A. Helv Chim Acta, 1934, 17: 311～328.

[2] 尹光琳,陶增鑫,严自正等. 微生物学报,1980,20(3):246～251.

[3] Kitamura I, Perlman D. Biotech Bioeng, 1975, 17: 349.

[4] Makover S, Ramsey G B, Witt C G *et al.* Abstract of the annual meeting of the American society for microbiology. Microbial physiology, 1974,Chicago, 64.

[5] Shinjoh M, Tomiyama N, Asakura A *et al.* Appl Environ Microbiol, 1995, 61:413～420.

[6] Hoshino T, Sugisawa T, Fujiwara A. Agric Biol Chem, 1991, 55(3),665～670.

[7] 尹光琳,何建明,任双喜等. 工业微生物,1997,27(1):1～7.

[8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[9] 林万明,杨瑞馥,黄尚志等. PCR技术操作和应用指南. 北京:人民军医出版社,1993,1～62.

[10] 李建武,陈丽蓉,陈雅惠等. 生物化学实验原理和方法. 北京:北京大学出版社,1994,174～176.

CLONING AND EXPRESSION OF L-SORBOSONE DEHYDROGENASE GENE IN *ESCHERICHIA COLI*

Guo Xinyou Yin Guanglin

(*Shanghai Research center of Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai*, 200233)

Abstract PCR method was used to amplify the gene of L-sorbosone dehydrogenase with the template of chromosomal DNA of *Acetobacter liquefaciens* IFO12258. The product of PCR was cloned with a cloning vector pGEM-T and the correct L-sorbosone dehydrogenase gene was got after sequences determination. Restriction enzyme site E. coRI and HindIII was added to the end of L-sorbosone dehydrogenase gene respectively by PCR techniques. Then it was cloned to an expression vector pKKH directly and after inducing with IPTG, it can't be expressed and no enzyme activity can be determined. Restriction enzyme RcaI was used to replace E. CoRI which resulted in a base number decreasing of the distance from SD sequence to the promoter. After inducing, an obvious protein stripe had been seen and a prominent enzyme activity had been determined.

Key words L-sorbosone dehydrogenase gene, PCR, Expression vector, SD sequence, Clone, Expression

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn