

多能硫杆菌 RubisCO 基因在大肠杆菌中表达产物分析

刘 振 盈

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

张 华

(山东中医药大学 济南 250014)

摘要 通过对多能硫杆菌 RubisCO 的基因表达分析表明该基因能够在 pBR322 的 P1 启动子、pUC19 的 lac 启动子以及 pKK223-3 的 tac 启动子的启动下,在大肠杆菌中表达, RubisCO 基因片段在 pUC19 和 pKK223-3 载体上的表达活性较高。进一步对 RubisCO 基因表达产物进行了非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,检测到了 RubisCO 蛋白质带。

关键词 多能硫杆菌, 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶

分类号 Q93-933

1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(简称 RubisCO)是卡尔文循环的关键酶,在植物的光合作用和呼吸作用中起着重要的作用^[1]。许多高等植物的 RubisCO 大、小亚基的 cDNA 序列已经制备并已在 大肠杆菌中表达,然而其大小亚基不能在体外装配成有活性的全酶,这一问题阻碍了进一步对高等植物 RubisCO 的研究^[2]。而在简单的自养微生物细胞中进行 RubisCO 的研究非常有利。多能硫杆菌 (*Thiobacillus versutus*) 是革兰氏阴性化能自养硫细菌,能够进行自养、混养及异养生长^[3],在生理学和分类学上具有重要的地位,在自养生长时通过卡尔文循环固定 CO₂,具有 RubisCO,我们曾报道克隆了多能硫杆菌 RubisCO 基因^[4],又在上述基础上进一步对该基因的表达进行研究。

1 材料与方 法

1.1 菌株和质粒见表 1

1.2 主要生化试剂

所用的限制性内切酶、连接酶、尼龙膜购自 Promega 公司,分子杂交试剂 ECMTM direct nucleic acid labelling and detection systems 购自

表1 细菌菌株及质粒

菌株或质粒	遗传性状或特征	参考文献 或来源
pKK223-3	Ap ^r , Tc ^r	[5]
JM109	recA supE44 endA hsdR17 gyrA96 relA thiΔ(lac-proAB)F[traD36 proAB lacI lacZΔM15	[6]
pSDLS-10	多能硫杆菌 3.4kb PstI RubisCO 基因片段克隆在 pUC9	[4]
pSDLS-191	Ap ^r , 3.3kb HindIII RubisCO 克隆在 pUC19	本工作
pSDLS-3221	Ap ^r , 3.3kb HindIII RubisCO 克隆在 pBR322	本工作
pSDLS-2231	Ap ^r , Tc ^r , 3.3kb HindIII RubisCO 克隆在 pKK223-3	本工作

英国的 Amersham 公司。

1.3 RubisCO 酶活性测定参见文献 [7]。

1.4 聚丙烯酰胺蛋白质凝胶电泳

将含 RubisCO 基因的重组质粒的大肠杆菌,用 LB 培养液培养至 OD₆₀₀ = 0.3,加 IPTG 诱导 6h,离心收集菌体,用超声波方法破碎细

1997-07-18 收稿

胞,超速离心收集上清液,取上清液 50μl 直接用于 5% 非变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳。

2 结果与讨论

2.1 RubisCO 在大肠杆菌中高效表达

基因工程的最终目的是在一个合适的系统中,使外源基因高效表达。为了使所克隆的 RubisCO 基因能够在大肠杆菌中高效表达,将多能硫杆菌 3.3kb RubisCO 基因片段以正方向分别克隆到 pUC19、pBR322 和 pKK223-3 的 HindIII 位点,分别对这些重组质粒在大肠杆菌 JM109 的表达情况进行了酶活性的测定(见表 2)。测定结果表明,多能硫杆菌基因 3.3kb RubisCO 基因片段在 pKK223-3,即 tac 启动子后,RubisCO 酶表达活性最高,而在 pUC19 的 lac 启动子的启动下表达活性次之,在 pBR322 启动子的启动下,表达活性最低,这些研究表明 lac 启动子和 tac 启动子具有较高的启动活性,在 tac 启动子系统里能够高效表达。另外发现该 3.3kb HindIII 片段重新插入到 pUC19 较原克隆 pSDLS-10 的 3.4kb PstI 表达活性高,说明表达质粒的 SD 接合位点与基因的起始密码子 AUG 之间的距离对表达有影响。

表2 各种大肠杆菌粗提物的RubisCO酶活性测定

菌株(质粒)	IPTG诱导 (2mmol/L)	RubisCO酶活性 (nnol/min/mg protein)
JM109(pUC19)	-or+	0
JM109(pSDLS-10)	-	1.2
JM109(pSDLS-10)	+	3.3
JM109(pSDLS-191)	-	1.5
JM109(pSDLS-191)	+	3.6
JM109(pSDLS-2231)	-	2.5
JM109(pSDLS-2231)	+	5.8
JM109(pSDLS-3221)	-	1.7
JM109(pSDLS-3221)	+	2.0

2.2 RubisCO 表达产物的蛋白质凝胶电泳

将含有重组质粒的大肠杆菌菌株, JM109(pSDLS-3221)、JM109(pSDLS-2231)、JM109(pSDLS-191)、JM109(pUC19) 和 JM109(pSDLS-10) 的蛋白质粗提液进行 5% 非

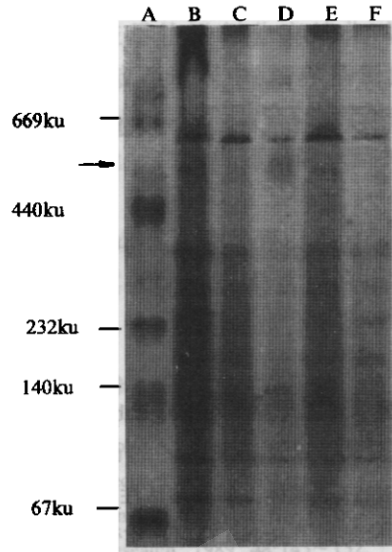


图1 含有不同重组质粒的大肠杆菌的聚丙烯酰胺凝胶电泳

- A. 标准蛋白; B. JM109(pSDLS-2231);
 - C. JM109(pSDLS-10); D. JM109(pSDLS-192);
 - E. JM109(pSDLS-3221); F. JM109(pUC19)
- 箭头所指方向为 RubisCO 带

变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳结果如图 1 所示, JM109(pSDLS-2231) (lane B), JM109(pSDLS-3221) (lane E), JM109(pSDLS-10) (lane C) 和 JM109(pSDLS-191) (lane D) 在 560ku 均有一条带,而相应的 JM109(pUC19) (lane F) 没有此带型,说明在 560ku 这条带是多能硫杆菌 rbcL-rbcS 基因的表达产物,这与高等植物以及大部分光合细菌的 RubisCO 分子量是一致的。我们不仅从酶活性检测到了在大肠杆菌中有 RubisCO 基因的表达产物,而且通过聚丙烯酰胺也观察到这一结果。

进一步提高酶产物的表达,可用 PCR 方法来调整表达质粒上的 SD 与基因上的 ATG 之间的距离而达到最佳表达效果,同时也有必要对含有重组质粒的大肠杆菌生长的最适产酶条件进行研究。

参 考 文 献

[1] 刘振盈,颜望明. 微生物学通报, 1993, 20(2): 110~114.

- [2] 李立人. 生物科学信息, 1989, 1(1): 12~15.
- [3] Smith A L, Kelly D P, Wood A P. J. Gen. Microbiol, 1980, 121: 127~138.
- [4] 刘振盈, 颜望明. 微生物学报. 1997, 37(4): 304~306.
- [5] Amann E, Brosius J, Ptashne M. Gene, 1983, 25: 167~178.
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al.* Molecular Cloning. A Laboratory Manual (2nd ed.) New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [7] Tabita F R, P Caruso, W Whitman. Analytical Biochemistry. 1978, 84: 462~472.

ANALYSIS OF EXPRESSING PRODUCTS OF RUBISCO FROM *THIOBACILLUS VERSUTUS* IN *ESCHERICHIA COLI*

Liu Zhenying

(State Key Laboratory of Microbial technology Shandong University, Jinan 250100)

Zhang Hua

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014)

Abstract The RubisCO gene of *T. versutus* has been successfully expressed in *E. coli* under the Pl(pBR322), lac(pUC19) and tac (pkk223-3) promoters. This fragment showed high level activities in pUC19 and pKK223-3. Nondenaturing PAGE was performed with each crude extract of *E. coli* JM109 containing RubisCO gene at various vectors. The product of the expression of *T. versutus* RubisCO gene have been observed on PAGE electrophoresis.

Key words *Thiobacillus versutus*, RubisCO