

# 2,5-DKG 还原酶 II 基因的克隆和在大肠杆菌中的表达\*

李 越 陈策实 尹光琳

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

**摘要** 参照文献上的 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸(简称 2,5-DKG)还原酶 II 基因序列,合成两个引物序列并在两端加上 EcoR I 和 BamH I 两个酶切位点,抽提棒状杆菌 SCB3058 菌株的染色体为模板进行 PCR 反应,克隆得到 2,5-DKG 还原酶 II 基因,酶切验证与预期的结果相符合。将此片段克隆到 pGEM-T 载体上保存。将 2,5-DKG 还原酶 II 基因用 EcoR I 和 BamH I 内切酶切下,连接到 pBV220 载体上,构建成表达载体。42℃ 诱导不能得到稳定的蛋白表达条带和酶活力,测序发现基因 3' 末端的原 PCR 引物外少合了一个碱基,终止密码子发生移码突变而消失。此外在 5' 端的起始密码子 ATG 前有三个碱基与 pBV220 载体上的 SD 序列发生配对。据此,重新设计和合成了 PCR 引物,并用 pBV220 和 pBL4 载体构建了两个表达载体。42℃ 诱导表达均得到了稳定的表达条带和较高的酶活力。

**关键词** 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸还原酶 II 基因,PCR,克隆,表达载体,SD 序列

**分类号** Q933 **文献识别码** A **文章编号** 0253-2654(1999)-04-0260-06

\* 国家自然科学基金资助项目(NO. 39770021)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (NO. 39770021)

1998-06-06 收稿,1998-12-15 修回

## CLONING AND EXPRESSION OF 2,5-DIKETO-D-GLUCONATE (2,5-DKG) REDUCTASE GENE IN *ESCHERICHIA COLI*.

Li Yue Chen Ceshi Yin Guanglin

(Shanghai Research Center of Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233)

**Abstract** PCR method was used to amplify the gene of 2,5-diketo-D-gluconate reductase II with the template of chromosomal DNA from *Corynebacterium* sp. Strain SCB3058. Restriction enzyme sequence *Eco*R I and *Bam*H I was added to the end of 2,5-DKG reductase gene respectively by PCR techniques. The gene was cloned with a cloning vector pGEM-1 and expressed with an expression vector pBV220. After induced at 42°C, no exact protein was observed. Sequence determination found that one base was lost in PCR primer which led to the loss of end code, also three bases before ATG combine to other three bases in SD sequences which affected the expression. After correcting the two mistake by PCR method, we got the right 2,5-DKG reductase gene and expressed it in vector pBV220 pBL4 successfully.

**Key words** 2,5-diketo-D-gluconate reductase II gene, PCR, Clone, Expression vector, SD sequence

目前,维生素C的工业化生产主要仍采用“莱氏法”和我国发明的“两步发酵法”,两种方法都以D-山梨醇为原料,需要先将葡萄糖高压加氢制备,原料和能源都浪费很大,还要考虑高压条件下安全生产的问题,使工业化生产极大的增加了成本。所以近年来国内外开展了从葡萄糖直接制备维生素C的研究。

日本盐野义公司圆山高康等人于1974~1988年用欧文氏菌(*Erwinia* sp.)和棒状杆菌(*Corynebacterium* sp.)进行了从葡萄糖通过2,5-DKG发酵生产2-酮基-L-古龙酸(简称2-KLG,是维生素C生产的重要前体)的研究。其中,葡萄糖在欧文氏菌中经过一系列酶的催化生成2,5-DKG,随后2,5-DKG被棒状杆菌中所有的2,5-DKG还原酶在5位碳原子上专一性还原为2-KLG。

在此基础上,国外率先上进行了从棒状杆菌中克隆2,5-DKG还原酶基因,转入欧文氏菌构建基因工程菌的研究,以实现通过欧文氏菌一步发酵生产2-KLG的目的,并先后发现了两个2,5-DKG还原酶基因<sup>[1]</sup>。中科院上海生物工

程研究中心尹光琳课题组在利用本室所选育的欧文氏菌SCB125和棒状杆菌SCB3058成功实现维生素C串联发酵的基础上<sup>[2]</sup>,根据文献所报道的序列,利用PCR方法先后从SCB3058中克隆了2,5-DKG还原酶I基因和2,5-DKG还原酶II基因。测序结果表明与文献报道的基本一致<sup>[3~5]</sup>。根据文献报道,2,5-DKG还原酶I和还原酶II对2,5-DKG的 $K_m$ 值为13.5mmol/L和1.8mmol/L,这意味着由于2,5-DKG还原酶II的值比还原酶I的值小7倍,所以2,5-DKG还原酶II对2,5-DKG的亲合活性比还原酶I大7倍,因此很有可能2,5-DKG还原酶II对从2,5-DKG到2-KLG的催化活性也比还原酶I大,即2,5-DKG还原酶II可能更适合于构建基因工程菌。将克隆得到的2,5-DKG还原酶II基因连接到原核表达载体pBV220载体和pBL4载体,构建成功原核表达质粒,实现了在大肠杆菌中的高效表达,并显示了较高的酶活性,为将此2,5-DKG还原酶II基因转入欧文氏菌SCB125实现葡萄糖一步发酵产生2-KLG的基因工程菌的构建打下坚实的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种和质粒:**棒状杆菌 SCB3058;大肠杆菌 *E. coli* DH5a;质粒 pBV220、pBL4 均由本室保存。质粒 pGEM-T 为美国 Promega 公司产品。

**1.1.2 酶和寡核苷酸:**限制性内切酶、T4DNA 连接酶、Taq 酶等为美国 Promega 公司产品;RNase A、溶菌酶为华美生物工程公司产品;PCR 引物为公司化学合成。

**1.1.3 培养基:**LB 培养基,氨苄青霉素(Amp)的使用浓度为 70 $\mu$ g/mL。

**1.1.4 试剂:**胶回收试剂盒为上海华顺生物试剂公司产品;123bp Ladder Marker 为 Life Technologies 公司产品;NADPH 购自 Boehringer 公司;2,5-二酮基-D-葡萄糖酸(2,5-DKG)为本实验室合成,其余试剂见参考文献 [6]。

### 1.2 方法

**1.2.1 染色体 DNA 的提取:**将棒状杆菌 SCB3058 单菌落接入 100mL LB 培养基,30 $^{\circ}$ C 旋转培养 40h,5000r/min 20min 离心,去上清后沉淀加入 20mL 8mg/mL NaCl、0.2mg/mL KCl、3mg/mL Tris 缓冲液 (PH9.0) 悬浮,5000r/min 20min 离心,去上清,沉淀用 20mL 10mmol/L Tris-HCl (PH8.0)、0.1mol/L EDTA (PH8.0)、0.5% SDS 提取缓冲液悬浮,加入 100 $\mu$ L RNA 酶、20 $\mu$ L 溶菌酶,37 $^{\circ}$ C 处理 1h,加入 50 $\mu$ L 蛋白酶 K,50 $^{\circ}$ C 处理 3h,加入等体积水饱和酚混匀,10000r/min 10min 离心,取上清重复以上两个步骤,取上清,加入等体积氯仿、异戊醇混匀 10000r/min 10min 离心,取上清加入 0.1 体积 10mol/L 醋酸铵、两倍体积无水乙醇,10000r/min 20min 离心,去上清沉淀用 70% 乙醇洗涤,倒置晾干溶于低离子强度磷酸缓冲液中。

**1.2.2 PCR 反应:**10 $\mu$ L 10 倍缓冲液,4 $\times$ 4 $\mu$ L 5mmol/L dNTP,6 $\mu$ L 25mmol/L MgCl<sub>2</sub>,20pmol/L 引物 I 和引物 II 各 4 $\mu$ L,模板 1 $\mu$ L,双

蒸水 60 $\mu$ L。PCR 条件:97 $^{\circ}$ C 10min,72 $^{\circ}$ C 2min,加入 Taq 酶,93 $^{\circ}$ C 变性 1min,50 $^{\circ}$ C 复性 1min,72 $^{\circ}$ C 延伸 3min,35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 保温 5min。PCR 产物用胶回收试剂盒回收<sup>[7]</sup>。

**1.2.3 SDS-PAGE 鉴定表达产物的分子量:**参考文献 [6] 的方法进行鉴定,积层胶浓度为 5%,分离胶浓度为 12%。用灰度扫描的方法测定表达产物的含量。

**1.2.4 2,5-DKG 还原酶活性的测定:**将过夜培养的菌体以 1% 接种到 50mL 含 70 $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基,30 $^{\circ}$ C 约 3~4h 培养到对数生长期,42 $^{\circ}$ C 诱导培养 5h,4 $^{\circ}$ C 离心获得菌体,用 0.1mol/L Tris-HCl PH7.0 的缓冲液 Buf A 洗涤两次,每次 4 $^{\circ}$ C 离心,菌体最后悬浮于 Buf A,20 KHZ 超声波破碎细胞 6min,期间每隔 1min 用冰冷却 1min,离心沉淀细胞碎片后取上清液作为待测酶液。30 $^{\circ}$ C 100 $\mu$ L 酶液加入到 2.7mL Buf A 中,再加 100 $\mu$ L 浓度为 3~5mmol/L 的 NADPH 溶液及 100 $\mu$ L 过量底物 2,5-DKG 钙盐,测定 OD<sub>340</sub> 的变化,根据标准曲线。换算成 NADPH 的浓度变化,计算酶活力。酶活力单位 (U) 的定义为:每分钟氧化 1 $\mu$ mol NADPH 所需要的酶量。蛋白浓度采用双缩脲法以牛血清白蛋白为标准测定<sup>[8]</sup>,计算酶的比活力。

## 2 结果与讨论

### 2.1 PCR 扩增结果 (图 1)

根据已知的基因序列合成两个引物。

5' 端引物: ATGGAATTCATGCCGAACATCC  
EcoR I

3' 端引物: TCTGGATCCTACATCTCTTCGT-  
GCGTGTCCG  
BamH I

5' 端引物和 3' 端引物的一端分别加有 EcoR I 和 BamH I 的酶切位点,35 个循环后电泳检测 PCR 产物,在 850 碱基左右有一明显的条带,片段长度与预期相符。

### 2.2 2,5-DKG 还原酶 II 基因的克隆 (图 2)

采用 Promega 公司的 pGEM-T 克隆载体对

PCR反应产物进行克隆,通过蓝白斑筛选后得到阳性转化子。抽提质粒DNA,采用限制性内切酶

酶切,结果与预期相符。DNA序列测定结果与已知序列相符,由此证明克隆所得为2,5-DKG还原



图1 PCR产物电泳结果

1. PCR扩增产物, 2. 123bp Marker



图2 pGEM-T7酶切图谱

1. 123bp Marker, 2. Pst I, 3. Sal I和BamH I, 4. Nco I和Xho I, 5. BamH I和EcoR I

酶II基因。将此克隆命名为pGEM-T7。

### 2.3 表达载体pBV220 II和pBL II的构建

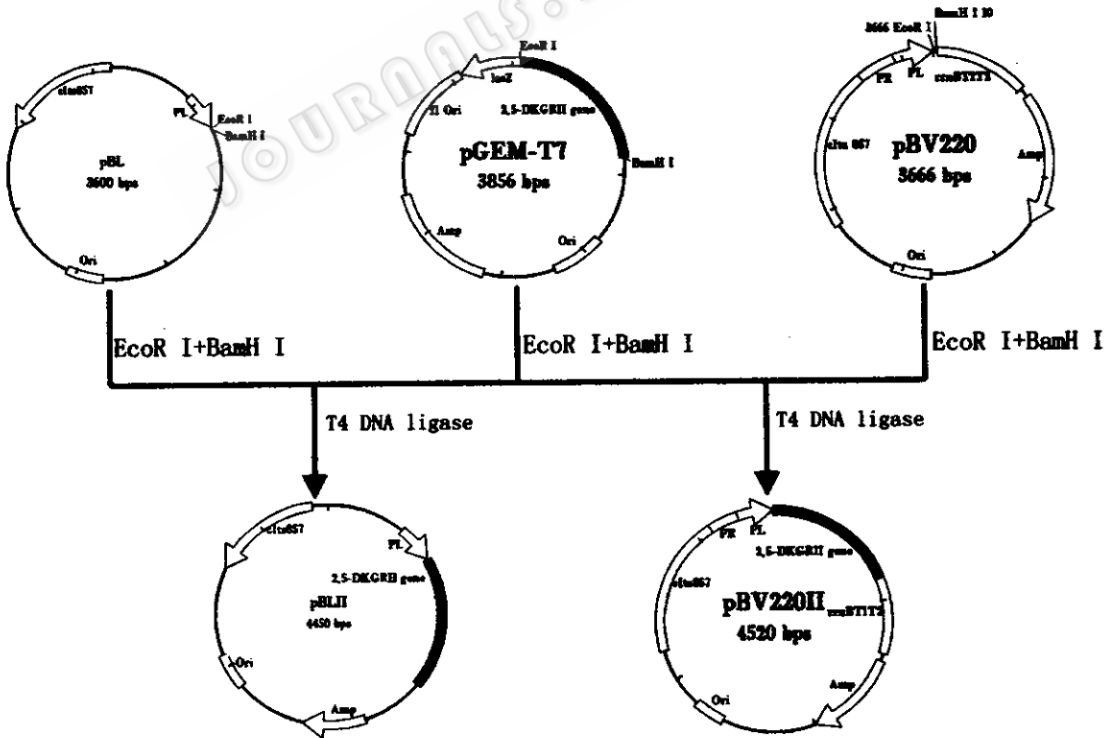


图3 表达载体pBLII和pBV220II的构建

## (图3)

pBV220 载体具有 pLpR 启动子, pBL 载体具有 pL 启动子。分别抽提其质粒, 用 EcoR I 和 BamH I 酶切后回收得到大片段, 与用相同内切酶酶切 pGEM-T7 所得的 2, 5-DKG 还原酶 II 基因相连, 转化至 *E. coli* DH5  $\alpha$ 。

## 2.4 2, 5-DKG 还原酶 II 基因在大肠杆菌中的表达

选取阳性转化子, 抽提其质粒 DNA, 电泳表明分别比 pBL 和 pBV220 增大, 酶切验证与预期的相符, 分别命名为 pBL II 和 pBV220 II。将其过夜培养物 (8~10h) 以 2% 接种到 40mL 氨苄青霉素 LB 的液体培养基中, 37℃ 培养 4.5h 达到对数生长期中期, 42℃ 诱导 5h 收集菌体。

## 2.5 SDS-PAGE 电泳结果 (图4)

转化子 pBV220 II 和 pBL II 经诱导以后在 29KD 处可以看到明显的表达条带, 灰度扫描的结果表明 pBV220 II 和 pBL II 的蛋白表达量分别占 22.6% 和 23.9%。

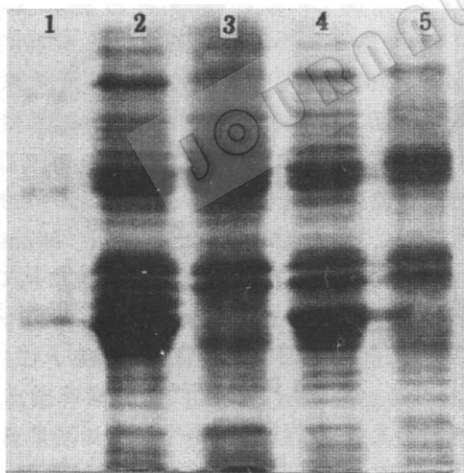


图4 表达产物 SDS-PAGE 电泳结果

1. 蛋白低分子量 Marker, 2, 3. 诱导 5h 的 *E. coli* pBLII 及对照 *E. coli* pBL, 4, 5. 诱导 5h 的 *E. coli* pBV220 II 及对照 *E. coli* pBV220

## 2.6 酶活测定结果

酶活测定结果表明 pBL II 的吸光度下降非常明显, 对照 pBL 基本上没有吸光度的下降,

pBV220 II 和对照 pBV220 均有吸光度下降现象, 但有差距。二者均证明得到的是有活性的酶。作为对照的 pBV220 出现的吸光度下降可能是因为含有 pBV220 质粒的大肠杆菌菌株背景引起的。根据 NADPH 在 340nm 处的光吸收标准曲线和测得蛋白浓度, 计算出 pBL II 和 pBV220 II 的比活力分别为 716u/mg 和 167u/mg。

## 2.7 讨论

在基因克隆和表达的过程中, 曾经合成过一对引物采用 PCR 方法从棒状杆菌 SCB3058 中克隆出 2, 5-DKG 还原酶 II 基因, 但采用 pBV220 表达载体无法得到蛋白表达, 也不能稳定的测到酶活性。经分析, 发现在引物的合成过程中 3' 端引物少合成一个碱基, 引起终止密码子发生移码突变而失去; 同时起始密码子 ATG 前三位碱基和 pBV220 本身所有的 SD 序列发生配对, 影响了核糖体的结合。据此从新设计和合成了 PCR 引物, 克隆得到基因并表达成功。

由本实验结果证明我们已经克隆到正确的 2, 5-DKG 还原酶 II 基因, 在大肠杆菌中得到有效的表达, 表达产物也具有较高的酶活力。但是要把所得的基因转入欧文氏菌 SCB125 构建基因工程菌仍有许多工作有待完成。由于 SCB125 本身有氨苄青霉素抗性, 所以新构建的表达载体必须有新的抗性筛选基因; 此外已有实验证实由于 SCB125 本身的培养温度为 30℃, 如果使用 pL 启动子的温度诱导, 42℃ 培养欧文氏菌的产 2, 5-DKG 的能力会大幅度下降, 而 IPTG 也不能渗透进欧文氏菌的细胞膜中, 因此有必要构建能在正常条件下表达的组成型载体; 在欧文氏菌中存在着 *tkrA* 和 *tkrB* 两个还原酶基因能将 2-酮基-L-古龙酸 (2-KLG) 转化为 L-艾杜糖酸 (简称 IA)<sup>[9]</sup>, 我们实验室研究人员已经将其克隆出来并在进行阻断的工作。当这些工作完成以后, 我们将构建出能够高效利用葡萄糖一步发酵产生 2-KLG 的基因工程菌株。

## 参 考 文 献

- [1] Sonoyama T, Kobayashi K. *Ferment Technol.* 1987, 65(3):311~317.
- [2] 尹光琳. *微生物学报*. 1991, 31(3):198~205.
- [3] Anderson S, Mark C B, Lazarus R *et al.* *Science*, 1985, 230: 144~149.
- [4] Grindley J F, Hardy K G. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54: 1770~1775.
- [5] 陈策实, 尹光琳. 第三届中国新医药博士论坛文集(摘要). 1997, 10:185.
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989.
- [7] 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.
- [8] 李建武, 陈丽蓉, 陈雅蕙等. 生物化学实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社, 1994, 174~176.
- [9] Anderson S. *Metabolic Pathway Engineering to Increase Production of Ascorbic Acid Intermediates*, US Patent, 1991, 5032514.