

透明颤菌血红蛋白在产聚 γ -谷氨酸 地衣芽胞杆菌 WX-02 中的表达

熊欢 魏雪团 冀志霞 孙明 陈守文*

(华中农业大学农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070)

摘要: 聚 γ -谷氨酸(γ -PGA)是一种应用前景良好的生物高分子材料。通过构建含有 α -淀粉酶(*amyE*)基因两端交换臂的整合载体 pDG1730-*vgb*, 将透明颤菌血红蛋白基因(*vgb*)整合到聚 γ -谷氨酸生产菌株地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*)WX-02 染色体中, 获得重组子 M2。一氧化碳差光谱结果验证 M2 中表达了有活性的血红蛋白, 3 L 发酵罐分批发酵结果显示 M2 的生物量比出发菌株 WX-02 提高了 25.5%, γ -PGA 产量提高了 20%。

关键词: 地衣芽胞杆菌, 聚 γ -谷氨酸, 透明颤菌血红蛋白

Expression of *Vitreoscilla* Hemoglobin in Poly γ -glutamic Acid-producing *Bacillus licheniformis* WX-02

XIONG Huan WEI Xue-Tuan JI Zhi-Xia SUN Ming CHEN Shou-Wen*

(National Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: Poly γ -glutamate is a biopolymer material that has a good application prospect. The *Vitreoscilla* hemoglobin(VHb) gene was integrated into the chromosome of *Bacillus licheniformis* WX-02 by integrative vector pDG1730-*vgb*. The expression of VHb was confirmed by CO-difference spectra analysis. It was shown by the results of batch cultures in a 3 L bioreactor that biomass and γ -PGA obtained in the recombinant M2 were 25.5 % and 20% higher than those of the control respectively.

Keywords: *Bacillus licheniformis*, Poly γ -glutamic acid, *Vitreoscilla* hemoglobin

聚 γ -谷氨酸(Poly γ -glutamic acid, γ -PGA)是由微生物合成的细胞外氨基酸聚合物, 由D型和L型-谷氨酸通过 γ -酰胺键连接而成。 γ -PGA具有保湿性和可生物降解等许多优良的理化和生物学特性, 可以作为药物载体、食品增稠剂、矿物营养促进吸收剂、保水剂以及絮凝剂等, 广泛地应用于医药、食品、轻化工、环保和农业等领域^[1]。 γ -PGA相对分子质量

一般在 100 kD~10000 kD, 发酵过程中 γ -PGA的产生使发酵液粘度增大, 影响发酵液中氧的传递, 导致溶氧受到限制^[2]。地衣芽胞杆菌ATCC9945A发酵生产 γ -PGA的过程中溶氧非常关键, 增加氧气的供应, 能使生物量加倍, 碳源利用率加快, γ -PGA的产量提高^[3]。解决供氧的方法有提高搅拌转速、优化搅拌配置、增加通气量等, 但这些措施会增加生产成

本^[4]。研究表明, VHb蛋白在宿主中的表达可降低重组细胞对溶氧的敏感程度, 使之适应较低的溶氧水平, 有利于重组细胞的生长和相应目的产物的合成^[5]。VHb基因已在多种异源宿主, 包括细菌、酵母和动植物细胞中成功表达, 它能明显改善异源宿主在限氧条件下的生长, 提高宿主生物量和促进次级代谢^[6,7]。

本研究将 VHb 基因构建到整合载体 pDG1730 上, 通过 *amyE* 整合位点, 将 VHb 基因整合到地衣芽胞杆菌染色体上, 以期提高地衣芽胞杆菌 WX-02 分批发酵的生物量及聚 γ -谷氨酸的产量。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒: 地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*)WX-02 为本实验室选育, 其保藏编号为 CCTCC No: M208065。大肠杆菌(*Escherichia coli*)TG1, 带卡那霉素抗性基因(Kan^r)的质粒 pDG780^[8], 带 *vgb* 的质粒 pEG491-*vgb*⁺ 为本实验室构建保存, 含 α -淀粉酶基因片段的整合载体 pDG1730^[9] 由华中农业大学农业微生物重点实验室芽胞杆菌分子生物学实验室提供。

1.1.2 工具酶及试剂: 限制性内切酶、T4 连接酶、rTaq 酶、DNA 分子量标准均为 TaKaRa 公司产品。其它常规试剂采用进口分装或国产分析纯。

1.1.3 培养基及抗生素: 大肠杆菌和地衣芽胞杆菌培养采用 LB 培养基: NaCl 1.0 g/L, 蛋白胨 1.0 g/L, 酵母粉 0.5 g/L。地衣芽胞杆菌感受态制备用培养基参见文献[8]。地衣芽胞杆菌发酵培养基: 葡萄糖 70 g/L, 谷氨酸钠 70 g/L, 柠檬酸钠 5 g/L, 硫酸铵 6 g/L, K₂HPO₄ 1.0 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L。整合转化子筛选平板中卡那霉素(Kan)浓度 10 μ g/mL。

1.1.4 主要仪器: Beckman coulter DU8000 紫外分光光度计。Agilent 1200 液相色谱仪, 美国安捷伦科技公司。3 L 发酵罐 NBS Bioflo 110 (New Brunswick Scientific Co., USA)。

1.2 方法

1.2.1 地衣芽胞杆菌染色体提取及转化: 方法同枯草芽胞杆菌染色体的提取及转化, 参见文献[9]。

1.2.2 大肠杆菌质粒的提取、酶切、连接和转化: 参见文献[10]。

1.2.3 血红蛋白整合表达的PCR验证: 引物扩增

VHb基因, 产物 1247 bp, 在 *vgbL* 和 *vgbR* 引物 5'端分别引入 *Hind* 位点和 *Bam*H 位点(下划线部分), *vgbL* : 5'-GTCAAGCTTTCTTGTGAATTATTACCAAAA-3', *vgbR* :5'-CGTGAATTCTTATTCAACCGCTTGAGCGTA-3', 引物由北京奥科公司合成。PCR反应条件: 95°C 5 min; 95°C 45 s, 55°C 50 s, 72°C 70 s, 30 个循环; 72°C延伸 10 min。

1.2.4 一氧化碳差光谱法: 检测透明颤菌血红蛋白的表达活性, 参见文献[8]。

1.2.5 摇瓶培养条件: 250 mL 摇瓶, 装液量 50 mL, 接种量 2%, 发酵温度 37°C, 转速 180 r/min, 发酵时间 36 h。

1.2.6 发酵罐培养条件: 3.0 L 发酵罐, 装液量 1.5 L, 接种量 2%, 发酵温度 37°C, 搅拌转速 600 r/min, 通气量 2 L/min, 发酵时间 36 h。

1.2.7 生物量测定: 摇瓶发酵生物量测定: 取 5 mL 发酵液, 离心去上清液, 沉淀用蒸馏水洗涤 3 次, 离心收集菌体, 于 80°C 烘干至恒重, 用分析天平测定其重量。

发酵罐发酵生物量测定: 取 1 mL 发酵液, 离心去上清液, 蒸馏水洗涤 3 次, 离心收集菌体, 稀释一定倍数后测定 600 nm 处的吸光值。

1.2.8 聚 γ -谷氨酸含量的测定: 一定体积去菌体的发酵上清液, 加等体积的浓盐酸, 真空条件下 110°C 水解 24 h, 水解完毕后用 NaOH 调 pH 至中性, 定容至一定体积, 高效液相色谱法测定水解液中谷氨酸浓度。依据水解前后发酵液中谷氨酸含量的差值计算 γ -PGA 含量。

高效液相法测定谷氨酸: 待检测的样品经 0.22 μ m 膜过滤后用 Agilent 1200 液相色谱仪检测(色谱柱为 Lichrospher C₁₈, 规格: 25 cm×4.6 mm), 检测波长 210 nm, 流动相为 100 mmol/L KH₂PO₄ 加 5.0% 甲醇(磷酸调 pH 值至 2.5), 流速 1.0 mL/min。

聚 γ -谷氨酸浓度=(样品水解后谷氨酸浓度-样品水解前谷氨酸浓度)×129/147

2 结果

2.1 整合载体 pDG1730-*vgb* 的构建

质粒 pEG491-*vgb*⁺ 经 *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切得到 1.2 kb 血红蛋白基因(*vgb*)片段, 该 *vgb* 片段带有芽胞杆菌编码乙酰高丝氨酸内酯(AHL)自身诱导物(AI)

合成酶 *luxS* 基因的启动子 P_{luxS} ^[8]。质粒 pDG780 经 *Hind* 酶切得到 1.4 kb 卡那霉素抗性基因 (Kan^r) 片段, 两片段插入质粒 pDG1730 的多克隆位点中, 得到重组整合载体 pDG1730-*vgb* (如图 1), 将构建的载体转化大肠杆菌 TG1, 在卡那霉素平板上挑取阳性克隆, 阳性克隆经培养后提取质粒, 用不同限制性内切酶对重组质粒进行了酶切鉴定。

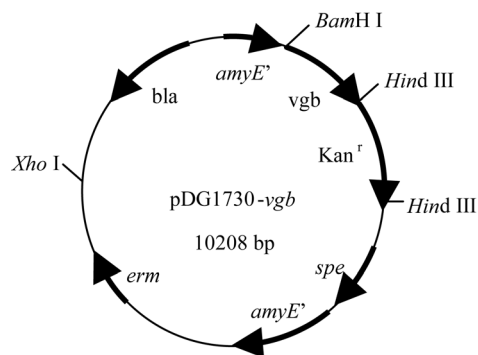


图 1 重组整合载体 pDG1730-*vgb* 图谱

Fig. 1 Map of recombinant plasmid pDG1730-*vgb*

2.2 重组菌的构建

线性化并末端去磷酸化的载体无法在体内成环, 不能在宿主中复制, 只能通过载体上的同源序列与宿主染色体 DNA 发生同源重组而整合在染色体上复制^[8]。载体 pDG1730-*vgb* 用 *Xho* 完全酶切成线状, 回收, 转化地衣芽胞杆菌 WX-02, 得到含卡那霉素抗性的转化子, 随机挑取 6 株转化子, 分别命名为 M1-M6, 提取其基因组 DNA 为模板, 利用引物 *vgbL* 和 *vgbR* 进行 PCR 鉴定, 成功扩增出大小约 1.2 kb 的血红蛋白基因 (*vgb*) 条带, 与对照 pDG1730-*vgb* 质粒的 PCR 产物条带一致, 以宿主 WX-02 基因组 DNA 为模板无对应条带 (如图 2), 说明重组子 M1-M6 的染色体上整合了血红蛋白基因。

2.3 重组菌的血红蛋白活性检测

还原态的血红蛋白是生理活性状态, 其 CO 络合物在 419 nm 处有明显的特征吸收峰^[4]。检测重组子

M1~M6 和出发菌 WX-02 的 CO 差光光谱, M1、M3~M6 吸收峰较弱 (图略), 仅 M2 在 419 nm 处有较明显的吸收峰, WX-02 没有相应吸收峰。M2 及 WX-02 的 CO 差光光谱如图 3, 说明菌株 M2 表达了有活性的血红蛋白。

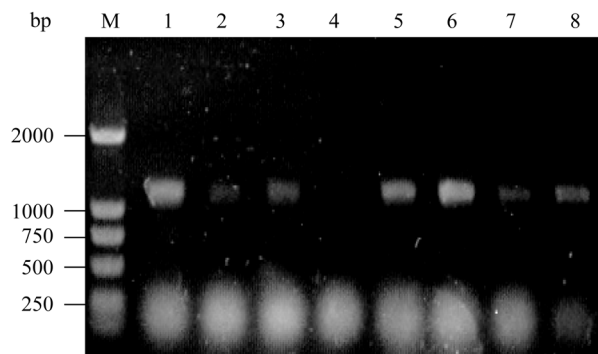


图 2 整合重组子的 PCR 验证

Fig. 2 PCR confirmation of the *vgb* from the chromosome of M1-M6 and WX-02

M: DL2000 Marker; 1: PCR products of pDG1730-*vgb*; 2,3,5,6,7,8: PCR products of the chromosome of M1-M6; 4: PCR products of the chromosome of WX-02

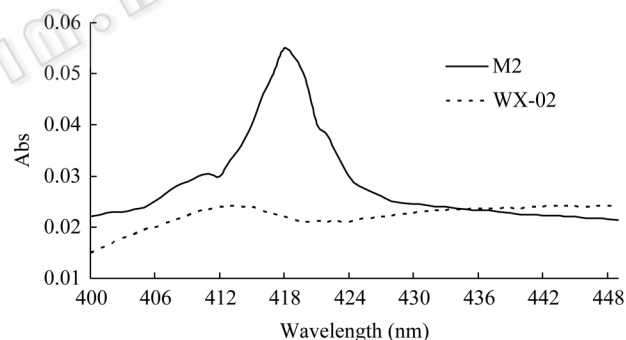


图 3 M2 及 WX-02 的 CO 差光光谱

Fig. 3 CO-difference spectra analysis of M2 and WX-02

2.4 重组菌 M2 的摇瓶发酵稳定性

为考察重组菌 M2 的发酵稳定性, 在无抗性选择压力情况下将 M2 与 WX-02 连续传代多次, 分别取第 5 代和第 10 代菌种按 1.2.5 条件发酵, 每次发酵各做 3 个重复, 测定结果取平均值, 见表 1, 重组

表 1 M2 与 WX-02 的摇瓶发酵
Table 1 Flask fermentation of M2 and WX-02

| | M2 | | WX-02 | |
|---------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | 第 5 代 The fifth generation | 第 10 代 The tenth generation | 第 5 代 The fifth generation | 第 10 代 The tenth generation |
| γ -PGA yield (g/L) | 23.94 | 24.23 | 21.44 | 21.35 |
| Dry cell weight (g/L) | 4.18 | 4.26 | 3.69 | 3.63 |

菌 M2 摇瓶发酵的生物量和聚 γ -谷氨酸产量有良好的稳定性, 且均高于出发菌株。

2.5 重组菌 M2 与出发菌 WX-02 的分批发酵

图 4 是 M2 与 WX-02 分批发酵过程中相对溶氧 (DO)、生物量 (OD_{600})、 γ -PGA 产量的变化过程图。从图中可以看出 M2 比 WX-02 有更长的延迟期; 随着菌体快速生长, γ -PGA 大量合成, 发酵液中溶氧降低, 20 h 以后 WX-02 发酵液中相对溶氧稳定在 8% 左

右, M2 发酵液中溶氧比 WX-02 低, 稳定在 2% 左右。出发菌株 WX-02 的生物量趋于稳定, 重组菌 M2 的生物量 (OD_{600}) 从 5 上升到 7 之后达到稳定, 重组菌 M2 最大生物量高于出发菌株 25.5%。28 h 时 WX-02 发酵液中 γ -PGA 含量达到最高点 28 g/L, 36 h 后下降至 22 g/L, M2 发酵液中 γ -PGA 含量呈缓慢上升趋势, 36 h 达到 33.5 g/L, 比 WX-02 最高产量高出 20%。

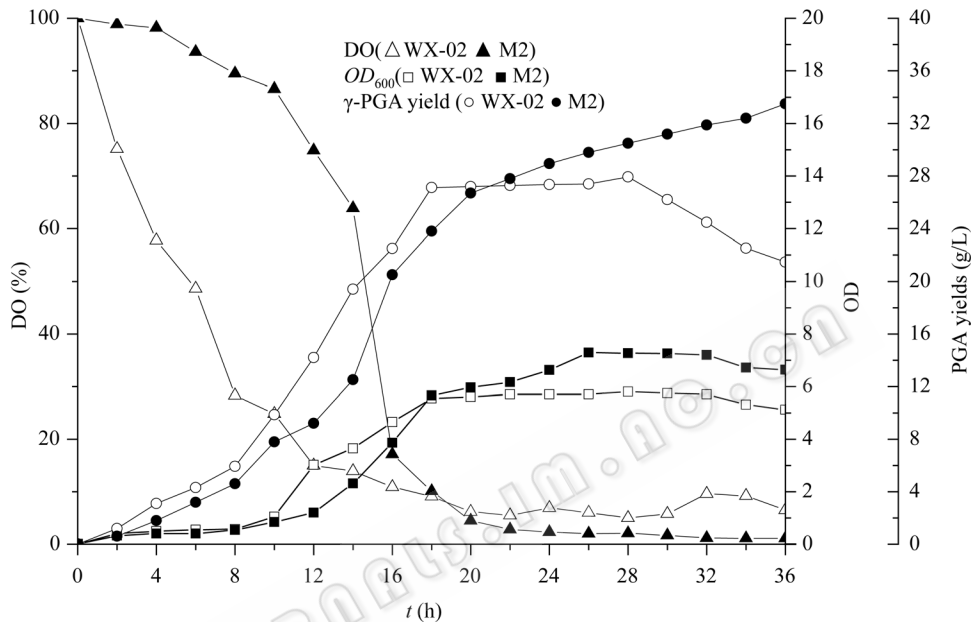


图 4 M2 及 WX-02 分批发酵过程中 DO, OD_{600} , γ -PGA 产量的变化曲线
Fig. 4 DO, OD_{600} , γ -PGA yield profiles of M2 and WX-02 in batch fermentation

3 讨论

本研究结果显示血红蛋白的表达提高了地衣芽胞杆菌 WX-02 的生物量及聚 γ -谷氨酸产量。在发酵 20 h 以后发酵液中相对溶氧很低的条件下, 重组菌 M2 仍呈缓慢生长状态, 菌体的生产时间延长, γ -PGA 总产量提高。再次证明 VHb 能在低溶氧条件下, 从分子水平提高细胞自身对发酵液中溶氧的利用能力, 使之适应较低的溶氧水平, 促进细胞生长和代谢产物的合成。这也是国内外首次将血红蛋白基因整合在产聚 γ -谷氨酸的芽胞杆菌染色体中表达。由于 VHb 基因是整合在宿主染色体上表达, 在无抗性选择压力下多次传代, 重组菌 M2 摇瓶发酵的生物量和聚 γ -谷氨酸产量有良好的稳定性。本研究对于解决地衣芽胞杆菌发酵生产聚 γ -谷氨酸过程

中的供氧不足有较大的意义。

参考文献

- [1] 杨 革, 刘 艳, 李桂芝. 溶氧及 pH 对地衣芽胞杆菌合成聚 γ -谷氨酸的影响. 应用与环境生物学报, 2006, 12(6): 850-853.
- [2] Sung HY, Jin HD, SANG YL, *et al.* Production of poly- γ -glutamic acid by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Letters*, 2000, 22: 585-588.
- [3] Anne MC, Gregory AB, Richard AG. Effects of pH and aeration on γ -poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* in controlled batch fermentor cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, 50: 222-227.
- [4] 张风豪, 王海燕, 何明雄, 等. 利用血红蛋白基因提高短小芽胞杆菌在低氧条件下的碱性蛋白酶产量. 高技术通讯, 2007, 17(7): 755-760.
- [5] 文 莹, 宋 渊, 李季伦. 透明颤菌血红蛋白在肉桂地

- 链霉菌中的表达及其对细胞生长及抗生素合成的影响. 生物工程学报, 2007, 17(1): 24–28.
- [6] 凌华云, 闵 勇, 熊 伟, 等. 斑贝链霉菌接合转移系统的构建及透明颤菌血红蛋白基因的表达对其次级代谢的影响. 微生物学通报, 2006, 33(5): 59–64.
- [7] Zhang L, Li YJ, Wang ZN, *et al.* Recent developments and future prospects of *Vitreoscilla hemoglobin* application in metabolic engineering. *Biotechnology Advances*, 2007, 25: 123–136.
- [8] Feng L, Chen SW, Sun M, *et al.* Expression of *Vitreoscilla hemoglobin* in *Bacillus thuringiensis* improve the cell density and insecticidal crystal proteins yield. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2007, 74(2): 390–397.
- [9] 王丽萍, 彭德奎, 陈守文, 等. 枯草芽孢杆菌重组木聚糖酶基因高效表达系统的构建. 农业生物技术学报, 2007, 15(1): 133–137.
- [10] Sambrook J 著. 分子克隆实验指南. 黄培堂等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002, pp.26–130.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及高新技术创新为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 微生物学、生物工程、病毒学、酶工程、发酵工程、细胞工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室(原技术与方法)、高等院校教学、名师讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿, 图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的文稿, 本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.1 篇幅

以 A4 纸 5 号字计算, 综述、教学和方法类文章最好在 3 页以内, 研究报告 4~6 页(以上均包括图表)。

3.2 图表

文中的图表须清晰简明, 文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm(占半栏), 大图的宽度应小于 17 cm(通栏)。

3.3 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“*et al.*”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名可以缩写, 但必须标准, 不加缩写点, 斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- 期刊: [1] 刘 杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达. 微生物学通报, 2007, 34(2): 1–3.
 [2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, *et al.* Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Biol Chem*, 2001, 276(39): 36514–36519.
- 图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程. 北京: 北京大学出版社, 2000, p. 4.
 [4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理. 见: 华 珞等. 核农学进展. 北京: 中国农业出版社, 1996, pp.115–120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金资助(No.)

*通讯作者 Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2008-00-00 ; 接受日期: 2008-00-00

(下转 p.1726)