

乙酰乳酸合成酶基因的克隆与高效表达

金美娟 吴坚平* 徐刚 杨立荣

(浙江大学 化学工程与生物工程学系 浙江 杭州 310027)

摘要: 【目的】乙酰乳酸合成酶(ALS)是异丁醇生物合成中的关键酶,实现 ALS 的高效表达对调控异丁醇代谢途径有重要意义。【方法】根据 GenBank 中 ALS 的基因序列(alsS)设计引物,以枯草芽孢杆菌 168 基因组 DNA 为模板通过 PCR 扩增技术得到目标酶基因,目的片段全长为 1 713 bp。将 alsS 连接到 pET-30a(+)上,得到重组质粒 pET-30a(+)-alsS,并在 *Escherichia coli* BL21(DE3)中实现表达。【结果】对表达条件进行了优化,获得最佳表达条件为:诱导温度 30 °C,诱导起始菌体 OD_{600} 为 0.6–0.8,诱导剂 IPTG 浓度为 1 mmol/L,诱导时间为 6 h。表达的乙酰乳酸合成酶大部分以可溶性形式存在于菌体内,优化后酶活可达到 24.4 U/mL,比优化前提高了 7.13 倍。经 HisTrapTMFF 亲和层析后获得电泳纯的 ALS,比活为 95.2 U/mg。【结论】ALS 的有效表达为在大肠杆菌体内构建异丁醇代谢途径打下了基础。

关键词: 枯草芽孢杆菌,乙酰乳酸合成酶,异丁醇

Cloning and effective expression of acetolactate synthase

JIN Mei-Juan WU Jian-Ping* XU Gang YANG Li-Rong

(Department of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University,
Hangzhou, Zhejiang 310027, China)

Abstract: [Objective] Acetolactate synthase (ALS) is the key enzyme in isobutanol biosynthetic pathway. Efficient expression of ALS is of great significance for the regulation of isobutanol metabolic pathway. [Methods] The acetolactate synthase gene (alsS) from *Bacillus*

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2011CB710800)

*通讯作者: Tel: 86-571-87952363; 信箱: wjp@zju.edu.cn

收稿日期: 2012-02-20; 接受日期: 2012-04-17

subtilis was amplified by PCR with primers designed according to the sequence of *alsS* in GeneBank, which is 1 713 bp. Then the *alsS* was cloned into the expression vector of pET-30a(+). The resulted recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) for the overexpression of *alsS*. [Results] The heterologous expression condition was optimized to be induced at an OD_{600} of 0.6–0.8, 30 °C with 1 mmol/L IPTG for 6 h. ALS was mostly expressed in the supernatant with the activity of 24.4 U/mL, which was improved for 7.13 times. Electrophoretically pure ALS was obtained after HisTrapTMFF affinity chromatography with the specific activity of 95.2 U/mg. [Conclusion] These results contributed to the construction of isobutanol biosynthetic pathway in *E. coli*.

Keywords: *Bacillus subtilis*, ALS, Isobutanol

乙酰乳酸合成酶(ALS, EC 4.1.3.18)主要用于催化丙酮酸与丙酮酸或 2-酮丁酸生成乙酰乳酸或 2-乙酰基-2-羟基丁酸^[1]。近来的研究发现,它可用于合成苯乙酰甲醇(Pac), Pac 是医药工业中合成 α/β -肾上腺素和其他手性羟酮化合物的重要前体^[2-3],其中大肠杆菌 ALS I 已被成功用于工业化生产 Pac^[4],并且 ALS 广泛的底物谱有望用于合成其他手性医药前体。研究还发现它是缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丁二酮、双乙酰、异丁醇等生物合成中的关键酶^[5-7]。目前人们在 ALS 对乳酸菌风味物质以及支链氨基酸代谢调控、ALS 氧化还原活性依赖辅因子 FAD 及 ThDP 等方面进行了大量研究并取得了很多成果^[8-10]。

近年来随着异丁醇高辛烷值、高能量密度、低吸湿性等燃料特性的发现,利用合成生物学思想生产异丁醇成为世界各国研究热点,而 ALS 作为异丁醇代谢途径中的关键酶也引起了大家的重视^[11-13]。现有研究表明,异丁醇生物合成中需要乙酰乳酸合成酶(ALS)、乙酰乳酸异构还原酶(AHAIR)、二羧基酸脱水酶(DHAD)、支链酮酸脱羧酶(KDC)、醛脱氢酶(ADH),其中 ALS 既能催化丙酮酸合成乙酰乳酸,也能起到脱羧酶的作用,催化异戊酮酸脱羧生成异丁醛。闻建平等的研究结果表明,过量表达 ALS 可使异丁醇产量提

高 2.2 倍,而过量表达 AHAIR 和 DHAD 异丁醇产量只提高了 1.1 倍^[14]。因此实现乙酰乳酸合成酶的高效表达对于支链氨基酸、异丁醇等代谢调控至关重要。已有的研究表明不同菌种来源表达的乙酰乳酸合成酶性质差异较大^[15-18],James 等在异丁醇生物合成过程中,采用来自枯草芽孢杆菌的 ALS,同样条件下异丁醇的产量要比采用来自大肠杆菌的 ALS 提高了 1.7 倍^[19]。但是目前关于枯草芽孢杆菌 ALS 高效表达的研究鲜见报道。

本文根据 ALS 的基因序列设计引物,以枯草芽孢杆菌 168 基因组 DNA 为模板通过 PCR 扩增技术得到了目标酶的基因,构建 T7 强启动子表达载体和重组工程菌株,对乙酰乳酸合成酶的高效表达进行了研究,希望以后能够通过高效表达乙酰乳酸合成酶来调控和优化异丁醇代谢途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: *Escherichia coli* BL21(DE3)、*Escherichia coli* DH5 α 、pET-30a(+)为本实验室保存,枯草芽孢杆菌 168 购自杭州艾康生物技术有限公司,pET-30a(+)-*alsS* 为本实验室构建。

1.1.2 培养基和培养条件: LB 培养基(g/L): 胰蛋白胍 10, 酵母膏 5, 氯化钠 10。固体培养基添加

1.5%琼脂, 固体和液体培养基在需要时添加卡那霉素至 50 mg/L。

1.1.3 仪器与试剂: 各种限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司; *Taq* DNA 聚合酶、*Pfu* DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司; 基因组提取试剂盒、质粒快速提取试剂盒、DNA 切胶回收试剂盒购自 Axygen 公司; PCR 引物为上海生工生物技术有限公司产品; 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)、卡那霉素(Kan)购自 Sigma 公司, 其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增: 根据 NCBI 数据库注册的乙酰乳酸合成酶基因(NC_000964)序列设计上、下游引物, 分别为 alsS1: 5'-CGCGGATCCTTGACAA AAGCAACAAAAGAAC-3', alsS2: 5'-CCGCTCG AGCTAGAGAGCTTTCGTTTTCATG-3' (下划线分别为 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切识别位点)。以枯草芽孢杆菌 168 基因组 DNA 为模板扩增乙酰乳酸合成酶基因。扩增条件为 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 重组表达质粒的构建和筛选: 扩增片段用切胶回收试剂盒回收约 1 700 bp 的片段, 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 作双酶切。质粒 pET-30a (+) 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 回收约 5 400 bp 的片段。酶切回收后的质粒和 PCR 产物用 T4 DNA 连接酶在 20 °C 连接 4 h, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 随机挑选转化子进行菌落 PCR 筛选阳性重组子。碱裂解法提取重组质粒进行酶切鉴定。DNA 测序委托上海生工生物技术有限公司进行。测序正确的重组质粒转化 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 得到重组表达菌。

1.2.3 目的蛋白的表达与表达条件优化: 将工程菌接种于 5 mL 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基

中, 37 °C、200 r/min 振荡培养过夜, 按 2% 的接种量接至 20 mL 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中, 继续培养。以转化了不含目的基因空质粒的工程菌作为对照。当 OD_{600} 达到 0.6–0.8 时, 加入 1 mmol/L IPTG, 18 °C、200 r/min 培养过夜, 4 °C、8 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 重悬于 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.0)洗涤 3 遍, 置于冰浴中超声波破碎后, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 收集细胞上清作为粗酶液, 进行不连续 SDS-PAGE 分析目标产物表达情况。

优化表达条件时分别选择不同起始诱导菌浓、不同温度、不同诱导时间及向培养物中加入不同终浓度的 IPTG, 进行诱导培养, 每个实验重复两次。通过 SDS-PAGE 和酶活测定结果考察培养条件对目的蛋白表达的影响。

1.2.4 酶活测定: 酶活测定根据乙酰乳酸在一定温度条件下会脱羧形成乙偶姻, 而乙偶姻在碱性条件下可以与肌酸和 α -萘酚的混合物反应生成红色物质, 可在 525 nm 下检测^[20]。反应体系为 1 mL 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.0), 其中含 40 mmol/L 的丙酮酸钠, 1 mmol/L 的氯化镁, 1 mmol/L 的 TPP, 10 μ mol/L 的 FAD, 37 °C 加入 20 μ L 酶液启动反应, 10 min 后加 50 μ L 3 mol/L 硫酸终止反应, 37 °C 脱羧 25 min, 2 000 r/min 离心 1 min 后, 上清稀释 20 倍后取 500 μ L 加入 0.25 mL 0.17% 肌酸和 0.25 mL 1.7% 的 α -萘酚, 37 °C 显色 30 min, 于 525 nm 处测定吸光度。乙偶姻的标准曲线方程为: $y=0.0139x$, 其中 x 为乙偶姻浓度(μ mol/L), y 为 OD_{525} 值。酶活单位(IU)定义为在该反应条件下, 1 min 内催化生成 1 μ mol/L 乙偶姻所需的酶量。

1.2.5 乙酰乳酸合成酶的纯化: 重组酶表达时末端带有组氨酸标记, 而组氨酸与镍离子有较强的相互作用, 通过镍柱亲和层析, 采用低浓度 20 mmol/L 咪唑上样, 穿透液中基本没有重组酶,

使用含 250 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液将大部分的重组酶洗脱下来, 经脱盐柱 Hitrap desalting 层析脱去咪唑和高盐分, 收集目的蛋白。蛋白质浓度采用 Bradford 法测定^[21]。

2 结果与分析

2.1 乙酰乳酸合成酶基因的克隆

以抽提的枯草芽孢杆菌基因组为模板, 以 alsS1、alsS2 为引物进行 PCR, 扩增获得 1 700 bp 左右的 DNA 产物(图 1), 与目的基因 1 731 bp 相吻合, 切胶回收 PCR 产物, 其酶切位点为 *Bam*H I 和 *Xho* I。

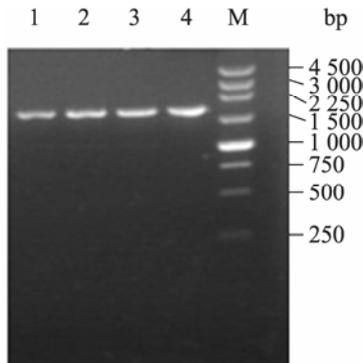


图 1 alsS 基因 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of alsS

注: M: DNA 分子量标准; 1-4: alsS 基因 PCR 扩增。

Note: M: DNA marker; 1-4: alsS PCR products.

2.2 表达载体 pET-30a(+)-alsS 的构建及验证

获得乙酰乳酸合成酶基因并纯化后, 将其连接到 pET-30a(+) (*Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切)得到 pET-30a(+)-alsS 重组质粒并转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 挑选菌落 PCR 验证有条带的阳性重组子继续培养, 并提取重组质粒分别进行单酶切和双酶切验证, 单酶切得到大小约为 7 100 bp 的条带, 双酶切后得到大小分别为 1 700 bp 和 5 400 bp 的条带, 基因片段大小符合预期。重组质粒经测序比对与 GenBank 上公布的基因序列一致, 证明乙酰乳酸合成酶基因已成功插入到 pET-30a(+)载

体中(图 2), 成功构建了 pET-30a(+)-alsS 表达载体。将构建成功的 pET-30a(+)-alsS 转入到 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中, 得到重组菌。

2.3 重组菌的诱导表达

重组菌诱导表达经 SDS-PAGE 验证(图 3), 得到分子量大小约为 62 kD 的重组酶, 与目的蛋白

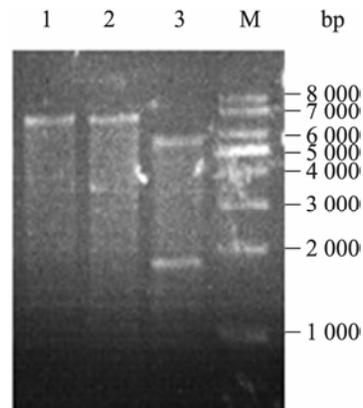


图 2 表达质粒酶切验证电泳图

Fig. 2 Identified by enzyme digestion

注: 1: *Bam*H I 酶切; 2: *Xho* I 酶切; 3: *Bam*H I -*Xho* I 酶切; M: DNA 分子量标准。

Note: 1: Digestion by *Bam*H I ; 2: Digestion by *Xho* I ; 3: Digestion by *Bam*H I -*Xho* I ; M: DNA marker.

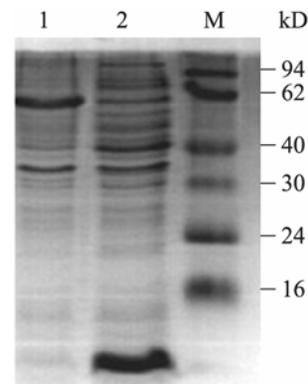


图 3 重组蛋白诱导表达图

Fig. 3 SDS-PAGE for the overexpression of alsS

注: 1: *E. coli* BL21(DE3)/pET-30a(+)-alsS IPTG 诱导 4 h 破胞后上清; 2: *E. coli* BL21(DE3)-pET-30a(+) IPTG 诱导 4 h 破胞后上清; M: 蛋白分子量标准。

Note: 1: Supernatant of *E. coli* BL21(DE3)/pET-30a(+)-alsS after sonication induced by IPTG for 4 h; 2: Supernatant of *E. coli* BL21(DE3)/pET-30a(+) after sonication induced by IPTG for 4 h; M: Protein marker.

理论计算值 62.8 kD 相符, 并测得粗酶液酶活为 3.42 U/mL, 表明乙酰乳酸合成酶得到了有效表达。

2.4 乙酰乳酸合成酶的优化表达

2.4.1 温度对乙酰乳酸合成酶可溶性表达的影响

据文献报道, 温度对目的蛋白的可溶性表达有很大的影响^[22-23], 选定的条件为: 在 18 °C、25 °C、30 °C、37 °C, 200 r/min 培养 OD_{600} 至 0.8 时, 加入 1 mmol/L IPTG, 诱导 4 h。由 SDS-PAGE 和表 1 可得乙酰乳酸合成酶在 30 °C 培养后上清中可溶蛋白的含量最多, 而沉淀中目的蛋白含量最少, 酶活最高。可见 30 °C 时虽然菌体比生长速率较低, 菌体最终密度不如 37 °C, 但菌体失活以及质粒稳定性降低现象都有很大程度缓解, 有活性的菌和带外源基因的菌更多, 从而表达的目的蛋白更多, 且大部分以可溶形式存在, 活性更高。而继续降温, 酶活下降, 这也表明大肠杆菌在较高的温度下生长快, 适当降低温度有利于目的蛋白的表达, 但也不能太低。

2.4.2 IPTG 对乙酰乳酸合成酶可溶性表达的影响

在一定范围内, IPTG 浓度对重组蛋白诱导表达有一定影响^[24]。因此, 本实验选取了 5 个 IPTG 浓度, 分别为 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L。在 30 °C、200 r/min 培养 OD_{600} 为 0.6 时, 加入上述不同浓度的 IPTG, 30 °C 诱导 4 h, 考察 IPTG 浓度对乙酰乳酸合成酶可溶性表达的影响。表达载体 pET30a(+)-alsS 含有 T7/Lac 启动子, 受 IPTG 诱导启动表达蛋白。当 IPTG 浓度过低时, 外来基因不能被完全表达, 同样的, 高浓度的 IPTG 将对细胞的生长产生毒害。从表 2 中可知, IPTG 浓度大于 0.6 mmol/L 时, 总蛋白量略微降低, 而酶活则随着 IPTG 浓度增加而增加, 当 IPTG 诱导浓度为 1 mmol/L 时, 酶活达到了最高值, 这是由于 IPTG 浓度提高, 会在一定程度上抑制菌体生长, 导致总蛋白量降低, 但高浓度的 IPTG 会诱导更多的目的蛋白合成, 从而增加了活性蛋白以

可溶性形式存在的比例, 酶活就高。因此选择 1 mmol/L 作为诱导剂 IPTG 的最适浓度。

表 1 不同温度对蛋白表达量和酶活的影响
Table 1 Effect of induction temperature on protein expression and ALS activity

诱导温度 Induction temperature (°C)	总蛋白 Total protein (g/L)	酶活 Enzyme activity (U/mL)
18	0.41	3.42
25	0.34	10.07
30	0.52	25.94
37	0.39	7.51

表 2 诱导剂浓度对蛋白表达量和酶活的影响
Table 2 Effects of IPTG concentration on protein expression and ALS activity

IPTG 浓度 IPTG concentration (mmol/L)	总蛋白 Total protein (g/L)	酶活 Enzyme activity (U/mL)
0.4	0.41	19.60
0.6	0.46	20.23
0.8	0.44	21.54
1.0	0.40	22.98
1.2	0.37	20.23

2.4.3 不同诱导起始菌浓和诱导时间对乙酰乳酸合成酶可溶性表达的影响

研究表明, 诱导起始菌浓不同, 菌体的生长速率会不同, 外源蛋白表达水平会受影响, 而且目的蛋白的表达量与表达时间并非完全成正比例关系^[25]。选定的条件为: (1) 诱导起始 OD_{600} 分别为 0.6、0.8、1.0、1.2, 加入 1 mmol/L IPTG, 200 r/min、30 °C 诱导 4 h。(2) 诱导起始 OD_{600} 为 0.8 时, 加入 1 mmol/L IPTG, 200 r/min, 30 °C 分别诱导 4、6、8、10 h。从表 3、表 4 可以看出, 诱导起始菌浓和诱导时间对重组蛋白表达量和酶活影响不是很显著, 起始菌浓高或诱导时间长, 菌体密度高, 但质粒丢失或菌体失活的可能性也提高, 因此选择菌体生长至对数生长期时(OD_{600} 为 0.6-0.8 左右)诱导培养 6 h 为宜。

表3 不同诱导起始菌浓对蛋白表达量和酶活的影响
Table 3 Effects of induction OD_{600} on protein expression and ALS activity

起始菌浓 OD_{600}	总蛋白 Total protein (g/L)	酶活 Enzyme activity (U/mL)
0.6	0.39	20.69
0.8	0.42	23.98
1.0	0.45	23.06
1.2	0.5	24.37

表4 诱导时间对蛋白表达量和酶活的影响
Table 4 Effects of induction time on protein expression and ALS activity

诱导时间 Induction time (h)	总蛋白 Total protein (g/L)	酶活 Enzyme activity (U/mL)
4	0.41	22.7
6	0.43	24.4
8	0.47	24.0
10	0.5	23.2

2.5 酶的纯化

重组酶经纯化后,用 SDS-PAGE 分析目的蛋白纯化情况,由图 4 可知酶纯度达到电泳纯。纯化结果见表 5。由表 5 可知,经过纯化后,重组酶比活达到 95.2 U/mg。同类研究报道中,以谷氨酸棒状杆菌为原始菌, pZA31 为表达载体构建的重组酶的比活为 6.7 U/mg^[15],以枯草芽孢杆菌为原始菌, pDRALSINT 为表达载体构建的重组酶的比活为 23.4 U/mg^[16],以拟南芥为原始菌, pT7-7 为表达载体构建的重组酶的比活为 7.88 U/mg^[17],以嗜热脂肪芽孢杆菌为原始菌, pT7-6 为表达载体构建的重组酶的比活为 9.2 U/mg^[18],以枯草芽孢杆菌为原始菌, pZA31 为表达载体构建的重组酶的比活为 150 U/mg^[26],酶活的数据几乎没有。可见不同菌种来源的重组酶比活相差大,即使是来源于同一芽孢杆菌属的重组酶比活相差也很大。进一步分析发现,来源于枯草芽孢杆菌的乙

酰乳酸合成酶是单体酶,而来源于嗜热脂肪芽孢杆菌的乙酰乳酸合成酶由催化亚基、调控亚基组成^[18],结构的不同导致了重组酶性质的差异。来源于枯草芽孢杆菌的乙酰乳酸合成酶最适温度为 37 °C,对丙酮酸高度专一,高浓度(100 mmol/L 左右)时底物抑制作用不明显。来源于嗜热脂肪芽孢杆菌的乙酰乳酸合成酶是第一个表征的嗜热乙酰乳酸合成酶,最适温度为 55 °C,底物专一性不高,对丁酮酸具有高亲和性,丙酮酸浓度高于 20 mmol/L 就有抑制作用。调控亚基不具备活性,但能激活催化亚基,单独的催化亚基活性只占全酶的 1/3,但加入纯化的调控亚基后几乎达到全酶活性。与上述研究报道相比,本实验克隆得到的重组酶纯化后比活较高,仅次于以 pZA31 为表达载体获得的重组酶。说明目的蛋白在 T7 强启动子的启动下获得了正确折叠,大部分以可溶形式存在,且结构正确,以后可以通过调控目的蛋白的表达水平来调控异丁醇以及支链氨基酸的代谢途径。

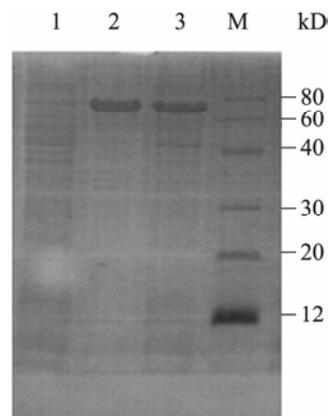


图4 重组蛋白纯化的电泳图

Fig. 4 SDS-PAGE for purification of ALS

注: 1: *E. coli* BL21(DE3)/pET-30a(+)破胞上清; 2: *E. coli* BL21(DE3)/pET-30a(+)-alsS 纯化后; 3: *E. coli* BL21(DE3)/pET-30a(+)-alsS 破胞上清; 4: 蛋白分子量标准。

Note: 1: Supernatant of *E. coli* BL21(DE3)/pET-30a(+) after sonication; 2: *E. coli* BL21(DE3)/pET-30a(+)-alsS after purification; 3: Supernatant of *E. coli* BL21(DE3)/pET-30a(+)-alsS; 4: Protein marker.

表5 重组蛋白的纯化
Table 5 Purification of recombinant ALS

纯化步骤 Purification step	总活力 Total activity (U)	总蛋白 Total protein (mg)	比活 Specific activity (U/mg)	纯化倍数 Purification fold
Crude extraction	2 472	47.4	53.0	1.0
Histrap™ FF	971	10.2	95.2	1.8

3 结论

本论文选择枯草芽孢杆菌 168 为原始菌克隆得到了乙酰乳酸合成酶基因, 采用 T7 启动子高表达体系, 并通过对诱导温度、诱导时间、诱导剂的浓度和诱导 OD 值的优化, 实现了乙酰乳酸合成酶的有效表达, 优化后蛋白最高酶活可达 24.4 U/mL, 提高了 7.13 倍, 纯化后比活达到 95.2 U/mg, 提高了 1.8 倍。这为合成手性医药前体、调控异丁醇以及氨基酸代谢途径打下了基础。

参考文献

- [1] McCourt JA, Duggleby RG. Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids[J]. *Amino Acids*, 2006, 31(2): 173–210.
- [2] Engel S, Vyazmensky M, Berkovich D, et al. Substrate range of acetohydroxy acid synthase I from *Escherichia coli* in the stereoselective synthesis of alpha-hydroxy ketones[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 88(7): 825–831.
- [3] Engel S, Vyazmensky M, Berkovich D, et al. Column flow reactor using acetohydroxyacid synthase I from *Escherichia coli* as catalyst in continuous synthesis of R-phenylacetyl carbinol[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 89(6): 733–740.
- [4] Engel S, Vyazmensky M, Geresh S, et al. Acetohydroxyacid synthase: a new enzyme for chiral synthesis of R-phenylacetylcarbinol[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 83(7): 833–840.
- [5] 韩希妍, 孙大庆, 相丽, 等. 乳酸菌风味代谢物质的基因调控[J]. *微生物学报*, 2007, 47(6): 1105–1109.
- [6] 赵宏峰, 边英男, 黄伟达. 利用重组大肠杆菌生产双乙酰[J]. *生物技术通报*, 2011(1): 165–169.
- [7] 林丽华, 郭媛, 庞浩, 等. 产异丁醇大肠杆菌工程菌的构建[J]. *生物技术通报*, 2011(8): 208–212.
- [8] 杨贞耐, 张雪. 乳酸菌代谢途径的基因工程调控[J]. *中国乳品工业*, 2007, 35(11): 44–49.
- [9] Blombach B, Hans S, Bathe B, et al. Acetohydroxyacid synthase, a novel target for improvement of L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 27(11): 419–427.
- [10] Choi KJ, Pham CN, Jung H, et al. Expression of acetohydroxyacid synthase from *Bacillus anthracis* and its potent inhibitors[J]. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2007, 28(7): 1109–1113.
- [11] Karabektas M, Hosoz M. Performance and emission characteristics of a diesel engine using isobutanol-diesel fuel blends[J]. *Renewable Energy*, 2009, 34(6): 1554–1559.
- [12] Zhanga KC, Sawaya MR, Eisenberg DS, et al. Expanding metabolism for biosynthesis of nonnatural alcohols[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 105(52): 20653–20658.
- [13] Atsumi S, Hanai T, Liao JC. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels[J]. *Nature*, 2008, 451(7174): 86–89.
- [14] Li SS, Wen JP, Jia XP. Engineering *Bacillus subtilis* for isobutanol production by heterologous Ehrlich pathway construction and the biosynthetic 2-ketoisovalerate precursor pathway overexpression[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91(3): 577–589.
- [15] Smith KM, Cho KM, Liao JC. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for isobutanol production[J]. *Applied Microbiology and*

- Biotechnology, 2010, 87(3): 1045-1055.
- [16] Yang YT, Peredelchuk M, Bennett GN, et al. Effect of variation of *Klebsiella pneumoniae* acetolactate synthase expression on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2000, 69(2): 150-159.
- [17] Chang AK, Duggleby RG. Expression, purification and characterization of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase[J]. The Biochemical Journal, 1997, 327(1): 161-169.
- [18] Porat I, Vinogradov M, Vyazmensky M, et al. Cloning and characterization of acetohydroxyacid synthase from *Bacillus stearothermophilus*[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(2): 570-574.
- [19] Atsumi S, Li Z, Liao JC. Acetolactate synthase from *Bacillus subtilis* serves as a 2-ketoisovalerate decarboxylase for isobutanol biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(19): 6306-6311.
- [20] 张奇, 邹昆, 徐旭, 等. 替考拉宁发酵液中乙酰乳酸合成酶活性的测定方法[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(6): 447-450.
- [21] Coligan JE, Dunn BM, Speicher DW, et al. 精编蛋
- 白质科学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 291-334.
- [22] Sorensen HP, Mortensen KK. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2005, 4(1): 1-8.
- [23] Williams RE, Bruce NC. 'New uses for an old enzyme'-the old yellow enzyme family of flavoenzymes[J]. Annals of Microbiology, 2002, 148(6): 1607-1614.
- [24] Feng ZG, Liu HJ, Lu J, et al. Optimized expression of a novel glycine-rich antibacterial peptide from drosophila in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology, 2008, 18(4): 18-20.
- [25] Peng L, Xu ZN, Fang XM, et al. High-level expression of soluble human β -defensin-2 in *Escherichia coli*[J]. Process Biochemistry, 2004, 39(12): 2199-2205.
- [26] Bacz A, Cho KM, Liao JC. High-flux isobutanol production using engineered *Escherichia coli*: a bioreactor study with in situ product removal[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90(5): 1681-1690.

稿件书写规范

论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N (当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 *OD* (斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如: *t* (h) (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 跟数字之间加一空格(%除外), 例如: 20 cm×0.3 cm, 不能写成 20×0.3 cm; 3 °C-5 °C 不可写成 3-5 °C; 3%-6%不可写成 3-6%等。