

## 外源基因 *pheA*、*aroG* 和 *tyrB* 在苯丙氨酸合成途径中的共表达

曾小冰<sup>1</sup> 范长胜<sup>\*1</sup> 江培翊<sup>2</sup> 陈永青<sup>1</sup> 黄伟达<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> 复旦大学微生物学和微生物工程系, <sup>2</sup> 复旦大学生物化学系 上海 200433)

**摘 要** 利用基因工程技术提高了短杆菌的苯丙氨酸合成途径中关键酶活性,大幅度地增加了生物合成苯丙氨酸的产量。首先采用聚合酶链反应(PCR)从大肠杆菌的氟代苯丙氨酸抗性变异菌株基因组中扩增到与苯丙氨酸合成相关的 *aroG*、*pheA* 和 *tyrB* 3 个基因。其中 *aroG* 编码 3-脱氧-2-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸合成酶(DS),*pheA* 编码双功能酶蛋白-分枝酸变位酶(CM)和预苯酸脱水酶(PD),*tyrB* 编码转氨酶(AT)。设计不同的酶切位点,利用质粒 pUC118 的多克隆位点,将 3 个基因按不同的顺序组合串联,然后插入穿梭质粒 pCZ-10,导入短杆菌中表达。结果表明 3 个大肠杆菌基因在短杆菌中能够表达。其中以 *aroG-pheA-tyrB* 顺序串联而构建的黄色短杆菌工程菌株 1311-GAB 中的 DS 酶活力提高 4.5 倍,CM 提高 4.2 倍,PD 提高 2.7 倍,AT 提高 3.2 倍,它的苯丙氨酸合成量提高 2.35 倍。

**关键词** *aroG-pheA-tyrB* 三基因串联表达,苯丙氨酸生物合成,氨基酸途径工程

**中图分类号** Q789 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2000)06-0671-04

苯丙氨酸是一种必需氨基酸,在医药、食品、保健方面的应用前景广阔。近十几年来,由于高甜度低热量的阿斯巴甜(Aspartame)的应用推广,作为它的生产原料的苯丙氨酸市场需求量猛增。苯丙氨酸属于芳香族氨基酸,人体和动物不能合成,而微生物能够合成。它们以葡萄糖为原料,通过糖酵解途径(EMP)和己糖单磷酸途径(HMP)最终合成 L-苯丙氨酸。图 1 是短杆菌的苯丙氨酸生物合成途径及其调控方式。图中的 DAHP 合成酶(DS)、分枝酸变位酶(CM)和预苯酸脱水酶(PD)是受调控的关键酶;转氨酶(AT)则是合成途径中最后一步催化苯丙酮酸生成苯丙氨酸的关键酶。Ozaki A 等人<sup>[1]</sup>首先从棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum* k38)克隆到编码 CM 和 PD 的两个基因导入同一菌株表达,使相应的酶活力提高约 10 倍,苯丙氨酸合成产量提高 50%。Ikeda M 等人<sup>[2]</sup>从 *C. glutamicum* 菌株中克隆到 DS 和 CM 两个关键酶基因导入同种菌的不同菌株,使原来产色氨酸转变为产酪氨酸,将 DS、CM 和 PD 三个关键酶基因导入同种菌的不同菌株,使原来产色氨酸转变为产苯丙氨酸(28g/L)。史燕东等人<sup>[3]</sup>克隆大肠杆菌 *tyrB* 基因,使苯丙酮酸氨化

生成苯丙氨酸。我们报道过诱变选育苯丙氨酸产生菌株<sup>[4]</sup>和基因工程菌株构建的研究工作<sup>[5-9]</sup>。

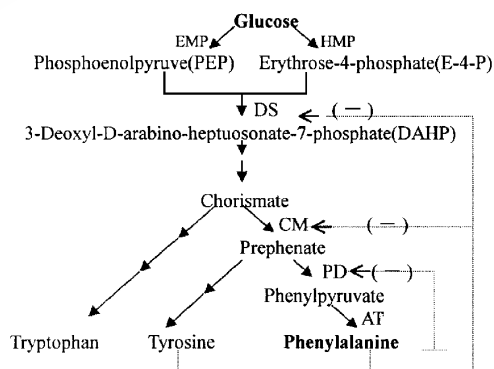


图 1 黄色短杆菌中的苯丙氨酸合成途径及调控方式

Fig. 1 Biosynthesis pathway and regulation of phenylalanine in *Brevibacterium flavum*

(-) Feedback inhibition, DS, 3-Deoxyl-D-arabino-heptuosonate-7-phosphate synthetase, CM, Chorismate mutase, PD, Prephenate dehydratase, AT, Transaminase.

本文报道用 PCR 技术从大肠杆菌中克隆 3 个已消除反馈抑制作用的苯丙氨酸关键酶基因: *pheA*、*aroG* 和 *tyrB* 其中 *pheA* 编码双功能酶蛋白-CM 和 PD, *aroG* 编码 3-脱氧-2-阿拉伯庚酮糖-7-磷

酸合成酶(DS),*tyrB* 编码 AT,以不同顺序串联组合导入短杆菌中共表达。检测了各个基因编码的相应酶活力,研究了它们对苯丙氨酸生物合成的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

1.1.1 菌株 (1)大肠杆菌(*Escherichia coli*) K12 作基因克隆供体菌。(2)*E. coli* XL1-blue,作基因鉴定用的转化受体菌。均由本实验室保存。(3)*E. coli* ZX1039,质粒接合转移的供体菌,郑兆鑫教授惠赠。(4)黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*) 1311,本实验室选育的苯丙氨酸产生菌,萘啶酮酸(Nalidixic acid)抗性,氟代苯丙氨酸(Fluorophenylalanine)抗性,卡那霉素(Km)敏感。

1.1.2 质粒 (1)大肠杆菌质粒 pUC118,氨苄青霉素(Amp)抗性,基因克隆载体 (2)穿梭质粒 pCZ-10,卡那霉素抗性,萘啶酮酸敏感,能在大肠杆菌和短杆菌之间进行穿梭转移的表达载体。均由本实验室保存。

### 1.2 培养基

1.2.1 大肠杆菌培养和质粒增殖培养基:参考文献[10],用 LB,必要时添加相应的抗生素。

1.2.2 短杆菌种子和发酵用培养基:参考文献[4]。

### 1.3 主要生化试剂及酶类

限制酶、RNase、连接酶和 Taq 酶购自 Biolabs 公司,测酶活力的试剂购自 Sigma 公司。

### 1.4 方法

1.4.1 PCR 扩增基因及 DNA 提取:参考文献[10]。

1.4.2 DNA 酶切及连接:按商品说明书操作。

1.4.3 大肠杆菌质粒转化:参考文献[10]氯化钙法。

1.4.4 短杆菌质粒抽提和穿梭质粒的接合转移:参照文献[5]。

1.4.5 基因编码的酶活检测:酶的提纯参照文献[6,7],菌体用超声波处理,8000 r/min 离心 20 min,取上清液,加入硫酸铵 25 g/100 mL(W/V)盐析沉淀,收集沉淀物,用 pH7.4 磷酸缓冲液(0.03 mol/L)透析后即用于酶活测定。DS 测定参照文献[6],CM、PD 测定参照文献[7],AT 测定参考文献[8]。

1.4.6 菌体蛋白质浓度测量:福林-酚试剂法,参照文献[8]。

1.4.7 短杆菌的苯丙氨酸发酵:参照文献[4]。

1.4.8 苯丙氨酸发酵产量检测:纸层析后,茚三酮显色,570 nm 比色测定,参照文献[9]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 多基因克隆及多基因重组菌株的构建

工程菌株构建的操作过程和三基因工程菌株构建结果如图 2 所示。

2.1.1 基因扩增:按文献报道的 *aroG*<sup>[11]</sup>,*pheA*<sup>[12]</sup> 和 *tyrB*<sup>[13]</sup> DNA 序列,设计聚合酶链反应(PCR)引物,用化学法合成引物,根据各基因引物特性,使用不同的 PCR 扩增条件,从大肠杆菌 K12 的氟代苯丙氨酸抗性菌株中获得了分别含有 *aroG*,*pheA* 和 *tyrB* 基因片段。

2.1.2 基因克隆:首先将 3 个基因分别克隆到 pCU118 中,对基因进行检测鉴定;然后使用不同的酶连接位点,进行不同顺序的串联组合,获得了 pUC 系列克隆质粒 pUC-g, pUC-a, pUC-b, pUC-ga, pUC-gb, pUCab 和 pUC-gab。为了研究各个基因在短杆菌苯丙氨酸合成途径中的功能,将目的基因从 pUC 系列质粒转移到穿梭质粒 pCZ-10 中。得到以下 6 种相应的重组质粒: pCZ-g, pCZ-a, pCZ-ga, pCZ-gb, pCZ-ab 和 pCZ-gab, 列于表 1。

2.1.3 工程菌株构建:通过接合转移方式将携带外源基因的 pCZ 系列质粒导入黄色短杆菌 *B. flavum* 1311-GA, 1311-GB, 1311-AB 和 1311-GAB, 列于表 2。3 基因串联的工程菌株构建过程及结果详见图 2。

### 2.2 基因编码的酶活性检测

携带目的基因的黄色短杆菌工程菌株接种于苯丙氨酸发酵培养基中,培养至稳定期,收集菌体,参照文献[6,7,8]的方法,超声波破壁,高速冷冻离心,去菌体,取上清液,通过盐析和透析获得粗酶提取液,分别测它们的蛋白浓度和相应酶的比活力。然后以没有携带目的基因的菌株(含 pCZ10 质粒)为对照,其相应的酶活力设定为 1.0,其余工程菌与之进行比较,获得各工程菌的相应酶活力的大小,即得到各工程菌中相应酶的相对比活力(增加倍数)。结果列于表 1。

表中列举了携带 3 个基因 6 种不同组合的工程菌酶活力数据,从中可以看出:与对照菌(含 pCZ10 质粒)相比,携带 *pheA* 基因的工程菌中相应酶(CM 和 PD)活力均有提高,其中 CM 的酶活提高了 4.2~8.4 倍,PD 的酶活提高了 2.7~4.1 倍;*aroG* 基因工程菌中 DS 酶活力分别提高了 4.3~6.8 倍;*tyrB* 单个基因在与 pCZ 质粒重组时表现很不稳定,原因有待进一步研究,但当它串联在其它基因之后,相应酶活力也提高了 3.2~4.8 倍。酶活力测定的

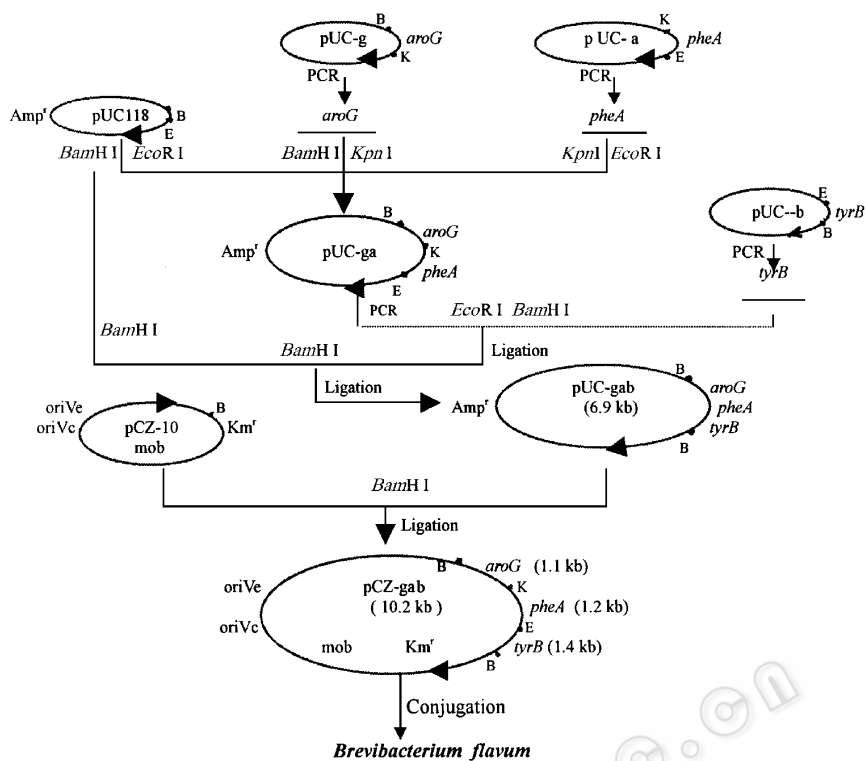


图 2 *aroG*、*pheA* 和 *tyrB* 三基因串联的工程菌株的构建

Fig. 2 Construction of strain containing three genes *aroG*, *pheA* and *tyrB* linked tandem

表 1 从大肠杆菌克隆的 *aroG*、*pheA* 和 *tyrB* 基因导入黄色短杆菌中的功能表达

Table 1 Functional expression of the *E. coli* genes *aroG*, *pheA* and *tyrB* in the *Brevibacterium flavum*

Plasmids	Cloning genes	Relative specific activities of enzymes (increased folds)			
		CM	PD	DS	AT
pCZ10	( Control )	1.0	1.0	1.0	1.0
pCZ-g	<i>aroG</i>	1.3	1.2	5.9	1.0
pCZ-a	<i>pheA</i>	8.4	4.0	1.2	1.1
pCZ-gb	<i>aroG</i> <i>tyrB</i>	1.0	1.1	4.3	3.3
pCZ-ga	<i>aroG</i> <i>pheA</i>	6.5	3.0	6.8	1.1
pCZ-ab	<i>pheA</i> <i>tyrB</i>	7.8	4.1	1.1	4.8
pCZ-gab	<i>aroG</i> <i>pheA</i> <i>tyrB</i>	4.2	2.7	4.5	3.2

*aroG* encodes DS, *pheA* encodes CM and PD, *tyrB* encodes AT.

结果表明来自大肠杆菌的 3 个基因 4 种串联组合都能在短杆菌中表达。

2.3 多基因串联表达对苯丙氨酸发酵产量的影响

短杆菌工程菌在液体种子培养基中活化培养 20 h 后,接种于装有发酵培养基的锥形瓶中进行发酵。在摇床上振荡培养 30℃ 恒温 3 d 后,离心取上

清液,按照文献 [9] 测定发酵液中的苯丙氨酸产量。以没有携带外源基因的亲株(即 *B. flavum* 1311-10 菌株)为对照,它的苯丙氨酸发酵产量设定为 1.00,其余基因工程菌的苯丙氨酸摇瓶发酵产量与之进行比较,获得各基因工程菌株的苯丙氨酸相对产量,即工程菌产量与对照菌产量之比。其结果列于表 2。

表 2 工程菌株的苯丙氨酸发酵产量比较

Table 2 Phenylalanine production of engineered strains compare with that of the host strain

Engineered strains	Heterologous genes	Yields in flask culture( mg/mL )	Relative yields of phe( Times )
<i>B. flavum</i> 1311-10 ( Control )	pCZ-10 plasmid	11.8	1.00
<i>B. flavum</i> 1311-G	<i>aroG</i>	15.3	1.30
<i>B. flavum</i> 1311-A	<i>pheA</i>	23.2	1.97
<i>B. flavum</i> 1311-GA	<i>aroG</i> <i>pheA</i>	26.1	2.21
<i>B. flavum</i> 1311-GB	<i>aroG</i> <i>tyrB</i>	13.5	1.14
<i>B. flavum</i> 1311-AB	<i>pheA</i> <i>tyrB</i>	15.6	1.32
<i>B. flavum</i> 1311-GAB	<i>aroG</i> <i>pheA</i> <i>tyrB</i>	27.7	2.35

从表 2 中可以看出:携带 *aroG*、*pheA*、*tyrB* 三基因串联的菌株苯丙氨酸合成产量最高,是对照菌株的 2.35 倍;携带 *aroG-pheA* 二基因串联的菌株次之,为 2.21 倍;带有单个基因 *pheA* 或 *aroG* 的菌株产量均有很大提高,其中携带 *pheA* 菌株的产量为 1.97 倍;而 *tyrB* 基因对菌株合成产量的影响则与基因串联的顺序有关:*tyrB* 串联在 *aroG* 或 *pheA* 单个基因之后对菌株合成苯丙氨酸的产量不但没有促进作用,反而会降低产量,测定的结果说明携带 *aroG tyrB* 菌株的产量不如携带 *aroG* 菌株的产量,

携带 *pheA tyrB* 菌株的产量不如携带 *pheA* 菌株的产量,只有 *tyrB* 串联在二基因之后(即三基因串联)才能小幅度提高苯丙氨酸合成量。这种现象有待深入研究。综合分析工程菌的酶活力和苯丙氨酸合成产量的结果表明:*pheA* 基因对提高苯丙氨酸合成的作用最大,*aroG* 基因次之,*tyrB* 基因较差;基因本身的功能对苯丙氨酸合成的影响比基因串联方式更重要,但是适当顺序的多基因串联表达也能够提高苯丙氨酸的生物合成产量。

## 参 考 文 献

- [1] Ozaki A, Katsumata R, Oka T *et al.* *Agri Biol Chem*, 1985, **49**: 2925~2930
- [2] Ikeda M, Katsumata R, *Appl and Envirom Microbiol*, 1992, **58**(3): 781~785
- [3] 史燕东. 药物生物技术, 1994, **1**(1): 8~13
- [4] 范长胜, 杨仁根. 工业微生物, 1995, **25**(4): 1~6
- [5] 雷呈祥, 范长胜, 黄伟达等. 生物工程学报, 1996, **12**(增刊): 179~184
- [6] 江培翊, 刘爱民, 葛海鹏等. 生物化学与生物物理学报, 1998, **30**(6): 593~596
- [7] 范长胜, 曾小冰, 柴运嵘等. 微生物学报, 1999, **39**(5): 430~435
- [8] 彭永济, 黄伟达, 沈水源等. 复旦学报(自然科学版), 1996, **35**(6): 643~648
- [9] Lei C X, Fan C S, Duan F H *et al.* *Progress in Natural Science*, 1996, **6**(2): 244~247
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* 2<sup>nd</sup> ed, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- [11] Davis W D, Davidson B E, *Nucleic Acids Reseach*, 1982, **10**(13): 4045~4058
- [12] Graham S H, Barrie E D, *J Moil Biol*, 1984, **180**: 1023~1051
- [13] Fotheringham I G, Dacey S A, Taylor P P *et al.* *Biochem J*, 1986, **234**: 593~604

## Co-expression of Heterologous Genes *pheA*, *aroG* and *tyrB* for Biosynthesis Pathway of L-phenylalanine

ZENG Xiao-Bing<sup>1</sup> FAN Chang-Sheng<sup>1</sup> JIANG Pei-Hong<sup>2</sup> CHEN Yong-Qing<sup>1</sup> HUANG Wei-Da<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Microbiology and Microbial Biotechnology, <sup>2</sup>Department of Biochemistry, Fudan University, Shanghai 200433)

**Abstract** Three genes related to the biosynthesis of phenylalanine, *pheA*, *aroG*, and *tyrB*, encode key enzymes: a bi-functional protein-chorismate mutase (CM), prephenate dehydratase (PD), 3-deoxy-D-arabino-heptulonate-7-phosphate synthetase (DS), and aminotransferase (AT), respectively. In this work, these genes were amplified from *Escherichia coli* mutants resistant to fluoro-L-phenylalanine (FP) by polymerase chain reaction (PCR). The genes were expressed either separately or linked tandem as operons in the plasmids pUC118 and pCZ10. To study the effect of each gene, the recombinant plasmids of pUC and pCZ involving different linkage order of the genes were constructed. When three genes linking tandem by *aroG-pheA-tyrB* order on the plasmid pCZ-gab transferred into *Brevibacterium flavum*, the specific activities of DS, CM, PD and AT were increased by 4.5, 4.2, 2.7 and 3.2 folds, respectively. As the result, the amount of phenylalanine biosynthesis was increased by 2.35 folds compared with that of host strain.

**Key words** Co-expression of genes *aroG*, *pheA*, and *tyrB*, phenylalanine biosynthesis, Pathway engineering for amino acid biosynthesis