

# 葡萄糖异构酶突变体酶 GIG138P 和 GIG138P-G247D 在变铅青链霉菌中的高效表达及检测

朱国萍 张颖\*\* 徐昞 唐建国 徐冲\*

(中国科学技术大学生命科学学院分子生物学与细胞生物学系, 合肥 230026)

**摘 要** 将含有 G138P 单点突变和 G138P-G247D 双点突变的 GI 结构基因, 分别克隆入 *E. coli*-链霉菌穿梭载体 pHZ-1272, 成功构建了穿梭表达载体 pHZGI1 和 pHZGI2。通过原生质体的转化, 将穿梭表达载体导入变铅青链霉菌 TK54 菌株。30℃ 振荡培养 24h, 加入 2 μg/mL 硫链丝菌素诱导表达 12h。SDS-PAGE 电泳表明, 两个穿梭载体在 TK54 菌株内表达出 42.5 kD 特异性条带。薄层扫描显示, 突变体酶 GIG138P 和 GIG138P-G247D 分别约占可溶性蛋白的 19% 和 22%。Western 杂交进一步证实 GIG138P 和 GIG138P-G247D 在变铅青链霉菌 TK54 中获得了表达。

**关键词** 葡萄糖异构酶, 突变体酶, 穿梭载体, 变铅青链霉菌, 高效表达

中图分类号 Q532, Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)03-0304-04

7 号淀粉酶链霉菌 M1033 菌株 (*Streptomyces dia-staticus* No. 7 strain M1033, 简称 SM33) 所产葡萄糖异构酶 (Glucose isomerase, 简称 GI) 在体外能催化 D-葡萄糖至 D-果糖的异构化反应, 是工业上大规模以淀粉制备高果糖浆 (HFCS) 的关键酶。在 SM33GI 基因全序列<sup>[1]</sup> 和 0.185nm 分辨率的晶体结构基础上<sup>[2]</sup>, 根据分子结构模拟, 通过定点突变获得了一系列 GI 突变体酶<sup>[3,4]</sup>。其中 GIG138P 和 GIG138P-G247D 是热稳定性获得较大改善 (分别提高 1 倍和 2.5 倍) 的有意义突变体酶, 并已在 *E. coli* 中获得了高效表达<sup>[5]</sup>。GIG138P 通过链霉菌质粒 pIJ4083 已实现了其在变铅青链霉菌 TK54 中的表达<sup>[6]</sup>。

以 *E. coli* 作为宿主菌用于食品生产, 伴随产生的类毒素是一个不容忽视的问题。而链霉菌作为重要的工业生产菌株比较安全, 已在食品和医药生产中广泛应用。变铅青链霉菌由于具有较为清楚的遗传背景, 能够识别多种不同的启动子, 对外源 DNA 不存在限制修饰作用以及良好的蛋白分泌机制等优点, 目前已成为链霉菌遗传操作中最常用的宿主菌。本文报道了通过穿梭载体 pHZ-1272 实现了突变体酶 GIG138P 和 GIG138P-G247D 在变铅青链霉菌 TK54 中的高效表达及检测, 为突变体酶在链霉菌染

色体中的整合及稳定高效表达研究奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** *E. coli* DH5α 购自上海生物工程公司。重组质粒 pBZ-GI1 (GIG138P) 和 pBZ-GI2 (GIG138P-G247D) 为本实验室构建。穿梭载体 pHZ-1272 为上海交大生命科技学院邓子新教授惠赠。变铅青链霉菌 TK54 (*his-2, leu-2, spc-1, SLP2, SLP3*) 为中科院微生物所谭华荣博士惠赠。

**1.1.2 培养基及抗生素:** 大肠杆菌培养用 LB 培养基。变铅青链霉菌液体生长培养基 (YEME) 及原生质体再生培养基 (R2YE) 的配制参考文献 [7]。氨苄青霉素 (Amp) 的使用浓度为 50 μg/mL, 卡那霉素 (Kan) 使用浓度为 5 μg/mL, 硫链丝菌素 (Th) 的使用浓度为 2 μg/mL (溶于二甲亚砜)。

**1.1.3 酶及试剂:** 限制酶 *Nde* I、*Bam*H I、*Not* I、*Bgl* I 以及 T4 DNA 连接酶均为华美生物工程公司产品。Sephaglas Band Prep Kit 为 Pharmacia 公司产品。硫链丝菌素为 Squibb 公司产品。低分子量标准蛋白为上海丽珠东风生物技术有限公司产品。其余均为进口或国产分析纯化学试剂。

## 1.2 方法

**1.2.1 重组穿梭表达载体的构建**:DNA 酶切、回收、连接和转化参照文献 [8] 进行。

**1.2.2 基因的诱导表达**:分别将 TK54 和重组菌株的链霉菌孢子接种于 50 mL 含有卡那霉素 (5 μg/mL) 的 YEME 培养基中,于 30°C 摇床振荡培养(转速 200 r/min) 24 h 后,加入 2 μg/mL 的 Th,继续 30°C 培养 36 h(诱导表达 12 h)。

**1.2.3 GI 粗酶液的制备**:将 50 mL 培养物离心收集菌体,用 10 mL 破碎缓冲液(pH7.5){50 mmol/L Tris-HCl,10 mmol/L EDTA (pH8.0),100 mmol/L MgCl<sub>2</sub>}洗涤菌体 3 次,称取湿重 1 g 的菌体,悬浮于冰预冷的 2~3 mL 破碎缓冲液中,冰浴超声破碎 15~20 min,12 000 r/min 离心收集上清,此即胞内粗酶液。

**1.2.4 酶活力测定**:以 D-葡萄糖或 D-木糖为底物采用改进的乙醇-吡唑法<sup>[9]</sup>。

**1.2.5 酶蛋白含量的测定**:采用 Lowry 法,以牛血清白蛋白为标准<sup>[3]</sup>。

**1.2.6 GI 抗血清的制备**:将纯 GI 与 PBS、完全福氏佐剂用搅拌机打匀成乳化剂,对 3 只 2 个月大小的白色健康家兔进行腹部皮下注射,一次 1 只兔子注射 6~8 处,1 个月后加强免疫 1 次,以后每周加强免疫 1 次,同时抽血进行免疫沉淀反应,检测抗体的产生和效价,加强免疫 3~4 次后,抗体已达较高水平,收兔血,静置数小时后离心,吸取上清液,此即为 GI 抗血清,-70°C 冻存。

**1.2.7 Western 杂交**:将粗酶液进行 15% SDS-PAGE 凝胶(5% 浓缩胶,15% 分离胶)电泳,然后通过 Amersham Pharmacia Biotech 公司的半干式电转移槽(SemiPhor™ Semi-dry transfer units)将蛋白转移至硝酸纤维素膜上。将膜放入含 5% 脱脂奶粉的封闭液 [PBS, pH 7.4<sup>[8]</sup>] 中,37°C 温育 1 h,用 PBS 洗膜。将膜放入含 GI 抗血清的封闭液 I 中,室温轻摇 2 h,用 PBS 洗膜。将膜放入含羊抗兔 IgG 抗体的封闭液 II {150 mmol/L NaCl,50 mmol/L Tris-HCl(pH7.5)} 中,室温温育 2 h,漂洗膜。通过膜上免疫偶联的辣根过氧化物酶与其敏感底物 3,3'-二氨基联苯胺的显色反应,膜上含有 GI 蛋白带的部位形成棕色条带。用重蒸水洗膜,终止显色反应,自然干燥。

## 2 结果

**2.1 穿梭载体 pHZ-G11 和 pHZ-G12 的构建及酶切鉴定**

将重组质粒 pBZ-G11 和 pBZ-G12 用 *Nde* I 和

*Bam* H I 酶切,分别获得含有 G138P 单点突变和 G138P-G247D 双点突变的 1.2 kb 的 *GI* 结构基因,与经 *Nde* I 和 *Bam* H I 酶切的 *E. coli*-链霉菌穿梭载体 pHZ1272 约 10.2 kb 的大片段连接,转化 *E. coli* DH5α 构建了表达载体 pHZ-G11 和 pHZ-G12,如图 1。用 *Nde* I 和 *Bam* H I 酶切鉴定,穿梭表达载体 pHZ-G11 和 pHZ-G12 已构建成功。再用 *Not* I 或(和) *Bgl* I 酶切鉴定定点突变<sup>[4]</sup>,证实 pHZ-G11 和 pHZ-G12 确实含有所需的突变位点(图略)。

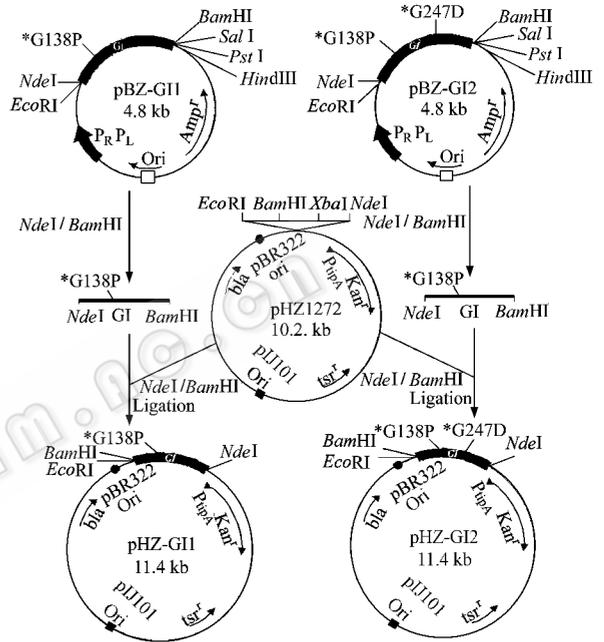


图 1 重组穿梭质粒 pHZ-G11 和 pHZ-G12 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant shuttle plasmid pHZ-G11 and pHZ-G12

## 2.2 pHZ-G11 和 pHZ-G12 在 TK54 中的诱导表达

将穿梭表达质粒 pHZ-G11 和 pHZ-G12 转化变铅青链霉菌 TK54 的原生质体,筛选具有 Kan<sup>r</sup> 的阳性菌落,得到重组菌株 pHZ-G11/TK54 和 pHZ-G12/TK54。将重组菌株接种 YEME 液体培养基,加入 Th 诱导表达,离心收集菌体,超声破碎制备 GI 胞内粗酶液。15% SDS-PAGE 电泳表明,在约 42.5 kD 处有明显的特异性表达条带,如图 2。

## 2.3 突变体酶蛋白含量的测定

以变铅青链霉菌 TK54 为对照,590nm 光密度薄层扫描分析表明,去除 TK54 约 3% 的背景,重组菌株 pHZ-G11/TK54 和 pHZ-G12/TK54 表达的突变体酶分别约占可溶性蛋白的 19% 和 22%,如图 3。

## 2.4 突变体酶表达产物的 Western 检测

将粗酶液进行 15% SDS-PAGE 凝胶电泳,再通



仅受温度、氮源、尤其是碳源等培养条件的影响,而且还受到质粒结构、克隆于质粒上的外源基因和宿主等因素制约<sup>[1]</sup>,因此本实验构建的 pHZG11/TK54 和 pHZG12/TK54 应用于工业化生产存在突变酶表达不稳定的问题。然而通过穿梭载体实现了单点突变体酶 GIG138P 和双点突变体酶 GIG138P-G247D 在变铅青链霉菌 TK54 中的表达,为进一步实现双突变体酶 GIG138P-G247D 在链霉菌中以染色体整合形式的稳定高效表达,以及固相化酶柱的研究奠定了基础。同时从链霉菌表达系统 pHZG11/TK54 和 pHZG12/TK54 获得的突变体酶的 N-端氨基酸为 Ser,与野生型酶一致,这为突变体晶体样品的制备提供了与野生型同一的结晶条件。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] WANG Y (王玉珍), HUANG Z (黄震), DAI X H (戴新华) *et al.*. The sequence of xylose isomerase gene from *Streptomyces diastaticus* No. 7 M1033. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1994, **10**(2): 97 ~ 103
- [ 2 ] ZHU X Y, TENG M K, NIU L W *et al.*. Structure of xylose isomerase from *Streptomyces diastaticus* No. 7 strain M1033 at 1.85Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2000, **56**: 129 ~ 136
- [ 3 ] ZHU G P (朱国萍), TENG M K (滕脉坤), WU C J (伍传金) *et al.*. Mutation of G138P enhanced the thermostability of glucose isomerase. *Acta Biochim Biophys Sin* (生物化学与生物物理学报), 1998, **30**(6): 607 ~ 610
- [ 4 ] ZHU G P (朱国萍), LUO D (罗丹), CAI Y F (蔡云飞) *et al.*. Mutations of Q20L and G247D improved the specific-activity and optimum pH of glucose isomerase. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2000, **16**(4): 469 ~ 473
- [ 5 ] Zhu G P, Xu C, Teng M K, *et al.*. Increasing the thermostability of D-glucose isomerase by introduction of a proline into the turn of a random coil. *Protein Eng*, 1999, **12**(8): 635 ~ 638
- [ 6 ] YANG Y H (杨永辉), XU C (徐冲), LIAO J (廖军) *et al.*. Overexpression of the single-mutation glucose isomerase (GIG138P) gene in *Streptomyces lividans* TK54 and its genetic stability. *Chinese Journal of Biochemistry & Molecular Biol* (中国生物化学与分子生物学报), 2000, **16**(1): 77 ~ 81
- [ 7 ] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F *et al.*. Genetic Manipulation of *Streptomyces*, A Laboratory Manual, Norwich, England: The John Innes Foundation, 1985
- [ 8 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [ 9 ] HUANG W Z (黄婉治), WANG C (王淳), LIU J (刘兢) *et al.*. Purification and characterization of glucose isomerase of *Streptomyces* M1033. *J China Univ Sci Technol* (中国科学技术大学学报), 1992, **22**(3): 283 ~ 288
- [ 10 ] YINAG R Y (杨闰英), HU Z H (胡志浩), DENG Z X (邓子新) *et al.*. Construction of *Escherichia coli-Streptomyces* shuttle vectors for gene expression in *Streptomyces*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1998, **14**(1): 6 ~ 12
- [ 11 ] Yang Y H, Xu C, Ge F *et al.*. Heterologous expression of the single-mutation glucose isomerase (GIG138P) gene in *Streptomyces lividans* and its genetic instability. *Curr Microbiol* 2001, **42**(4): 241 ~ 247

## Overexpression and Detection of the Mutated Glucose Isomerase GIG138P and GIG138P-G247D in *Streptomyces lividans*

ZHU Guo-Ping ZHANG Ying XU Yang TANG Jian-Guo XU Chong\*

(Department of Molecular and Cell Biology, School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

**Abstract** The shuttle expression vectors pHZG11 and pHZG12 were successfully constructed by inserting structural genes of GI containing single mutated site G138P and double mutated site G138P-G247D into *E. coli-Streptomyces* shuttle vector pHZ-1272, respectively. Then they were transformed into *S. lividans* TK54 strain by protoplast transformation. SDS-PAGE indicated that two shuttle vectors in TK54 strain expressed obviously specific bands at 42.5 kD after induced by 2μg/mL thiostrepton. Optical densitometric scan showed that the content of the mutant enzymes GIG138P and GIG138P-G247D were about 19% and 22% of dissoluble proteins, respectively. Western blotting farther proved that GIG138P and GIG138P-G247D were expressed in *S. lividans* TK54.

**Key words** glucose isomerase, mutant enzyme, shuttle vector, *Streptomyces lividans*, overexpression

Received: 12-10-2001

This work was supported by Grant from the State 863 High Technology R&D Project of China (No. 130-13-02-04).

\* Corresponding author. Tel: 86-551-3601442; Fax: 86-551-3631760; E-mail: xcg@ustc.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>