

醇醛脱氢酶的分离纯化及其基因文库的构建和筛选

Purification of L-sorbose/L-sorbose Dehydrogenase from *Ketogulonigenium vulgare* and Construction and Selection of Genomic Library

谢 莉¹ 张 铎¹ 窦燕峰² 张丽萍³ 赵宝华^{1*}

XIE Li¹ ZHANG Duo¹ DOU Yan-Feng² ZHANG Li-Ping³ and ZHAO Bao-Hua^{1*}

1 河北师范大学生命科学院, 石家庄 050016

2 石家庄制药集团, 石家庄 050051

3 河北省生物研究所, 石家庄 050081

1 College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China

2 Shijiazhuang Pharmaceutical Co. Ltd., Shijiazhuang 050051, China

3 Hebei Institute of Biology, Shijiazhuang 050081, China

摘 要 在维生素 C 的发酵生产过程中, 普通生酮基古龙酸菌 *S₂* (*Ketogulonigenium vulgare*) 能产生醇醛脱氢酶, 将 L-山梨糖转化为 VC 的前体 2-酮基-L-古龙酸 (2-KLG)。通过超声波破碎菌体、硫酸铵分级沉淀、DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析, Q Sepharose High Performance 柱层析等过程, 从普通生酮基古龙酸菌 *S₂* 发酵液中分离纯化了醇醛脱氢酶, 并用该纯化酶免疫新西兰兔制备出了合格抗血清。同时, 普通生酮基古龙酸菌 *S₂* 基因组 DNA 经 *Sau3A I* 部分酶切后, 与黏粒载体 pKC505 连接, 用包装蛋白进行包装, 转染大肠杆菌 DH5 α , 构建了基因组文库。最后应用免疫酶斑点技术 (Dot-ELISA) 从 12 000 个克隆子中筛选得到一个阳性克隆 K719[#]。通过检测该基因工程菌的活性, 表明 K719[#] 具有使 L-山梨糖转化为 2-KLG 的功能, 从而使醇醛脱氢酶在大肠杆菌中获得了高效表达, 这为简化 VC 的生产工艺奠定了基础。

关键词 普通生酮基古龙酸菌, 醇醛脱氢酶, 分离纯化, 免疫酶斑点技术, 文库筛选

中图分类号 Q939 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)05-0891-05

Abstract L-sorbose/L-sorbose dehydrogenase from *Ketogulonigenium vulgare* *S₂* can transform L-sorbose to 2-KLG, which is widely used in production of Vitamin C. In order to obtain the engineering strain producing L-sorbose/L-sorbose dehydrogenase and simplify the fermentation technology, firstly, this enzyme was purified by the methods of ammonium sulfate precipitation, DEAE Sepharose Fast Flow and Q Sepharose High Performance. Then, the purified L-sorbose/L-sorbose dehydrogenase was injected to rabbit to obtain antibody. Next, the genomic library of *Ketogulonigenium vulgare* *S₂* was constructed by inserting the restriction fragments of chromosomal DNA digested with *Sau3A I* into cosmid pKC505 vector digested by *Hpa I* and *Pst I*, which were packed with λ phage package protein and transferred into *E. coli* DH5 α *in vitro*. Finally, the positive strain K719[#] was selected from more than 12 000 clones via Dot-ELISA. Through the test of SDS-PAGE and thin layer chromatography, the results showed that the engineering strain K719[#] had the same biological activity as *Ketogulonigenium vulgare* *S₂* after adding

Received: January 23, 2007; Accepted: April 30, 2007.

This work was supported by a grant from the Natural Science Fund of Hebei Education Office (No. 2005131).

* Corresponding author. Tel: +86-311-86268434; Fax: +86-311-86268313; E-mail: zhaobaohua86178@sohu.com

河北省教育厅自然科学基金项目 (No. 2005131)

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

coenzyme PQQ.

Key words *Ketogulonigenium vulgare*, L-sorbose/L-sorbose dehydrogenase, purification, Dot-ELISA, gene library and selection

维生素 C (L-抗坏血酸) 既是人体营养所必需的水溶性维生素, 也是一种抗氧化剂, 广泛应用于医药、食品、饲料、化妆品等诸多领域, 社会需求量很大。2-酮基-L-古龙酸(2-Keto-L-Gulonic-acid, 以下简称 2-KLG) 是维生素 C 合成的重要前体, 工业上目前大多采用“二步发酵法”^[1], 这是一个包含 3 种细菌参与的二步发酵的过程。首先由一步菌转化 D-山梨醇生成 L-山梨糖, 然后在小菌及其作为伴生菌的大菌的参与下将 L-山梨糖转化 2-KLG。长期以来, 关于“二步发酵”的研究主要集中在生产条件和工艺方面, 关于代谢途径及关键酶的研究进行的很少, 小菌一度被鉴定为氧化葡萄糖杆菌, 并认为它体内有两种酶在转化中起作用。然而, 1999 年, Asakura 和 Hoshid^[2] 从源于我国的 VC 产酸菌株中分离到一种可将 L-山梨糖直接转化为 2-KLG 的 L-山梨糖/L-山梨酮脱氢酶, 也称作醇醛脱氢酶, 认为此酶是小菌中的关键酶, 它以吡咯喹啉醌(PQQ) 为辅酶。最近 Urbance 等经系统分类学研究重新确定了小菌的分类地位, 将它定名为普通生酮基古龙酸菌 (*Ketogulonigenium vulgare*)^[3]。

本实验室从普通生酮基古龙酸菌 S₂ 中分离纯化出了醇醛脱氢酶, 并用此酶免疫新西兰兔制备出了醇醛脱氢酶抗血清。同时以黏粒 pKC505 为载体构建了小菌基因组文库, 并应用免疫法从文库中筛选得到一株可将 L-山梨糖转化为 2-KLG 的阳性克隆 K719[#], 从而实现了醇醛脱氢酶在大肠杆菌中的高效表达。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:普通生酮基古龙酸菌 S₂ (*Ketogulonigenium vulgare*) 俗称小菌, 购自中科院微生物研究所; 大肠杆菌 DH5 α , 黏粒载体 pKC505 购自华美生物工程公司。

1.1.2 工具酶、主要试剂及仪器: *Sau*3A I、*Bam*H I、*Hpa* I、*Pst* I、核酸 Marker、碱性磷酸酶 CIAP、T4DNA 连接酶、噬菌体包装蛋白、辣根过氧化物酶酶标二抗购自 Promega 公司; 2, 6-Dichlorophenolindophenol (DCIP), 吩嗪硫酸甲脂(PMS), 红四氮唑(NBT) 购于

北京欣经科生物技术有限公司; 凝胶回收纯化试剂盒、质粒提取试剂盒购自上海生工公司; DEAE Sepharose Fast Flow, Q Sepharose High Performance、纯化仪 ÄKTA prime、分离柱 1.6cm \times 14cm 购自安玛西亚生物技术有限公司; 超声破菌仪 Soniprep150 购自 SANYO 公司。

1.1.3 主要溶液:活性染色液: NBT 3mg, PMS 0.2mg, 1mol/L Tris \cdot HCl (pH 8.0) 0.6mL, 山梨糖 10mg 加无菌水定容至 10mL; DCIP 检测试剂: DCIP 2.5mg, PMS 5mg, 山梨糖 0.2g, 无菌水 5mL, 混匀至溶解。

1.1.4 混合菌培养基:山梨糖 1.5%, 玉米浆 0.3%, 蛋白胨 1.5%, 尿素 0.6%, MgSO₄ \cdot 7H₂O 0.03%, CaCO₃ 0.4%, KH₂PO₄ 0.5% pH6.8。

1.2 蛋白含量的测定

采用 Lowry 法^[4], 以牛血清蛋白为标准蛋白。

1.3 酶活性的测定

在酶标板中放 100 μ L DCIP 检测试剂, 将 20 μ L 待测液加入后, 立即混匀, 30 $^{\circ}$ C 避光放置, 混合液在 10min 内褪色为醇醛脱氢酶阳性。

1.4 醇醛脱氢酶的提取和纯化

1.4.1 无细胞抽提液的制备:混合菌发酵液 3L 经 3000r/min 离心 5min 以去除大菌和杂质, 再 8000 r/min 离心 10min 收集小菌菌体, 无菌水洗涤 2 次, 加 5 倍体积的 25mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 重悬, 超声波破碎菌体, 然后 12 000r/min 离心 10min, 收集上清即得无细胞抽提液。

1.4.2 硫酸铵沉淀及透析(冰浴中进行):往无细胞抽提液中慢慢加入硫酸铵使饱和度达到 30% 4 $^{\circ}$ C 放置过夜, 然后 12 000r/min 离心 20min, 上清液中继续慢慢加入硫酸铵使饱和度达到 70%, 再次离心, 收集沉淀并溶于少量水中, 用截留分子量为 10 000 的透析袋透析除盐。

1.4.3 DEAE Sepharose Fast Flow 柱层析:柱子装好后先用 0.5mol/L NaOH 处理 10min, 再用 ddH₂O 洗, 将透析后的样品上柱, 用含 0.5mol/L NaCl 的 25mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)洗脱, 紫外 280nm 波长检测, 收集含有对 DCIP 具有脱色作用的组分。

1.4.4 Q Sepharose High Performance 柱纯化:将上步

收集的酶液合并,透析后上柱,用含 0~1mol/L NaCl 的 25mmol/L Tris-HCl pH8.0 缓冲液进行梯度洗脱,同上述方法收集酶活性组分。

1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析^[5]

将收集到的酶活性组分透析后进行 SDS-PAGE 电泳,采用 5% 浓缩胶,10% 分离胶,考马斯亮蓝染色,以低分子量标准蛋白(9.4~14.4kD)作对照。

1.6 免疫血清的制备

将上述纯化的醇醛脱氢酶液过滤除菌,加入等体积的弗氏佐剂,完全乳化后直接皮下注射新西兰兔,共进行 4 次免疫,每次间隔 2 周。最后一次免疫 7d 后从兔耳静脉少量采血,间接 ELISA 方法测定抗体效价,达到较高滴度后从心脏一次性采血,制备抗血清,-20℃保存。

1.7 基因文库的构建^[6-8]

1.7.1 基因组 DNA 酶切片段的制备:提取小菌的基因组 DNA,*Sau*3A I 进行部分酶切,碱性磷酸酶去磷酸化,凝胶电泳检测并切胶回收 20~30kb 的 DNA 片段。

1.7.2 载体的处理:载体 pKC505 先用 *Hpa*I 进行单酶切,经 CIAP 去磷酸化后,再用 *Bam*H I 酶切,将得到长短不同的两条片段作为载体的两臂。

1.7.3 连接与包装:将 DNA 酶切回收片段与 pKC505 两条载体臂以 2:1 的摩尔比混合,用 T4 DNA 连接酶进行连接,然后按产品说明书将 2 μ L 连接产物(约 1 μ gDNA)用 λ 噬菌体包装蛋白进行包装,感染大肠杆菌 DH5 α ,最后涂布含 50 μ g/mL 安普霉素的 LB 平板。

1.8 基因文库的筛选

采用 Dot-ELISA 方法。将文库中的单个克隆接种于含 50 μ g/mL 安普霉素的 LB 中,37℃ 扩增培养,离心收集菌体并进行超声波破菌,取上清用 0.01mol/L 碳酸盐缓冲液(PBS)稀释 10 倍。然后吸 1 μ L 稀释液点到硝酸纤维素膜上,20% 脱脂奶粉进行封闭,0.01mol/L PBS 洗膜,滴加 1:100 稀释的兔抗醇醛脱氢酶抗血清,37℃ 共同温育 1h;洗膜,滴加 1:1000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体 IgG,37℃ 温育 1h;再次洗膜后滴加 DAB 进行显色,出现棕褐色圆形斑点者为阳性。

1.9 阳性克隆的酶切鉴定

将筛选出的阳性克隆接种于 5mL 含 50 μ g/mL 安普霉素的 LB 培养液中,37℃ 振荡培养,试剂盒提取质粒,连同载体 pKC505 用 *Pst*I 酶切,0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。载体上有两个 *Pst*I 的酶切位点,

经 *Pst*I 酶切后,产生 5.0kb 和 13.7kb 的 DNA 片段,用于检测阳性克隆是否连接正确。

1.10 醇醛脱氢酶在大肠杆菌中的表达

取阳性克隆和 DH5 α /pKC505 细胞破菌液上清各 10 μ L,进行 SDS-PAGE 电泳分析,以稀释 10 倍的纯化醇醛脱氢酶和小菌破菌液为阳性对照。电泳结束后将胶放入预先配好的活性染色液中,30℃ 避光染色 20min。醇醛脱氢酶将染色液中的山梨糖还原成为 2-KLG,在凝胶上显出清晰深蓝色的条带。

1.11 阳性克隆酶活性的检测

利用薄层层析法(TLC)进行酶活性的定性测定。取阳性克隆和 DH5 α /pKC505 的细胞破菌液上清,分别加入等体积的 0.4% 山梨糖溶液,室温反应 10min,然后依次吸取 5 μ L 在硅胶 G 薄层板上点样,展开剂为正丙醇:水:磷酸 = 10:4:1,0.3% 茚三酮显色,阳性转化子可将山梨糖转化为 2-KLG,以标准品(0.2% 山梨糖和 0.2% 2-KLG 的混合液)和稀释 10 倍的纯化醇醛脱氢酶为对照,在相对应的位置可出现紫红色斑点。

2 结果

2.1 醇醛脱氢酶的分离纯化

2.1.1 DEAE Sepharose Fast Flow 交换层析:将小菌发酵液经过破碎菌体、硫酸铵沉淀及透析后上柱,用含 0.5mol/L NaCl 的 25mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)进行洗脱,DCIP 法检测醇醛脱氢酶酶活性(结果见图 1)。将具有较高酶活力的洗脱液合并,用 25mmol/L Tris-HCl 缓冲液透析后用于下一步的纯化。

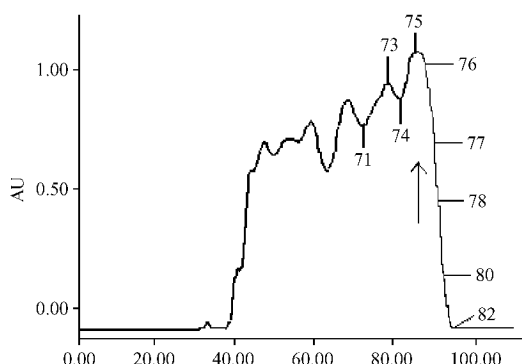


图 1 DEAE Sepharose Fast Flow 柱层析洗脱曲线
Fig. 1 Elution curve of DEAE Sepharose Fast Flow Column chromatography

2.1.2 Q Sepharose High Performance 柱再次纯化:将上步的透析液上柱,用含 0~1mol/L NaCl 的 25 mmol/L Tris-HCl(pH8.0)缓冲液洗脱。洗脱顺序:
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

0mol/L NaCl 10min, 0 ~ 1mol/L NaCl 160min, 1mol/L NaCl 10min。本次共收集洗脱液 50 管,经紫外 UV₂₈₀ 检测,DCIP 法检测醇醛脱氢酶活性(结果如图 2)倒数第二、三峰(31 ~ 34 管)的洗脱液表现出较强的酶活力,其中第 32 管酶活力最强。

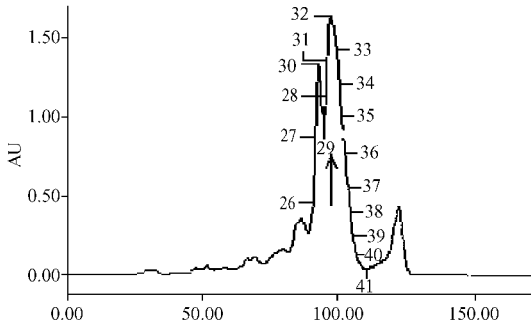


图 2 Q Sepharose High Performance 柱层析洗脱曲线
Fig.2 Elution curve of Q Sepharose High Performance column chromatography

2.1.3 SDS-PAGE 电泳分析:发酵液经超声波破菌,盐析和柱层析逐步分离纯化得到电泳纯的醇醛脱氢酶,电泳图谱见图 3,根据低分子量标准蛋白可知该酶的分子量为 66kD,与文献中报道的一致。

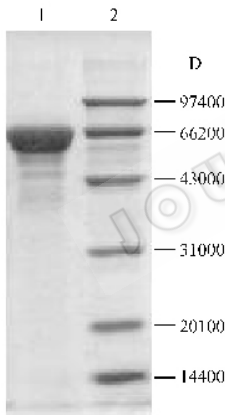


图 3 醇醛脱氢酶逐级分离纯化后 SDS-PAGE 电泳图
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified enzyme
1: purified L-sorbose/L-sorbose dehydrogenase 2: protein marker.

2.2 小菌基因组文库的构建和筛选

提取小菌的基因组 DNA,构建含有 12 000 多个克隆的基因文库。从文库中随机挑取单个克隆,用 Dot-ELESA 方法进行检测,筛选到第 719 号克隆时,出现了阳性反应斑点(图 4),由图可以看出阳性克隆 K719# 和对照醇醛脱氢酶具有明显的圆形斑点,而其他两克隆和 DH5α/pKC505 则只出现极弱的斑点。

2.3 阳性克隆的酶切鉴定

将 K719# 液体培养后提取质粒,连同载体 pKC505 一起用 Pst I 酶切,然后进行凝胶电泳检测

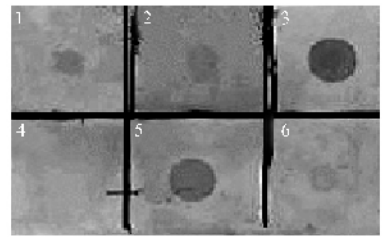


图 4 阳性克隆的筛选

Fig. 4 Screening of positive clones with Dot-ELESA

1: a random clone 2: a random clone 3: K719# 4: H₂O 5: purified L-sorbose/L-sorbose dehydrogenase 6: DH5α/pKC505.

(图 5)结果表明 K719# 的质粒明显大于对照载体质粒 pKC505,而在酶切后得到了与对照一致的 13.7kb 的载体片段,此外还有数条被酶切的外源 DNA 片段,证明 K719# 质粒构建正确。

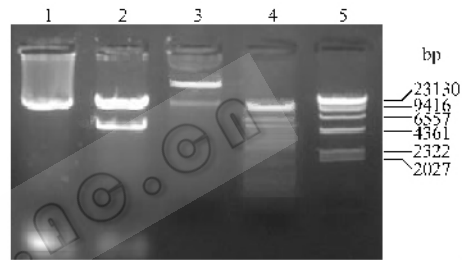


图 5 阳性克隆 K719# Pst I 酶切鉴定

Fig. 5 The identification of positive clone K719# digested with Pst I

1: pKC505 2: pKC505/Pst I 3: K719# 4: K719#/Pst I 5: λ-Hind III Marker.

2.4 阳性克隆表达产物的 SDS-PAGE 分析

阳性克隆 K719# 和 DH5α/pKC505 细胞破菌液进行 SDS-PAGE 电泳,染色结果(图 6)可以看出 K719# 出现了与对照醇醛脱氢酶和小菌相同的深蓝色表达条带,而 DH5α/pKC505 破菌液则无此条带,说明 K719# 具有醇醛脱氢酶活性。

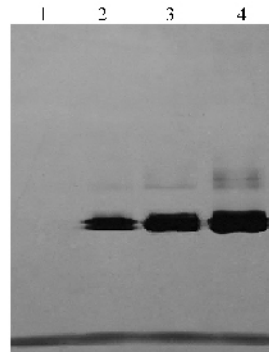


图 6 K719# 表达产物的 SDS-PAGE 活性分析

Fig. 6 Analysis of K719# expressed production with SDS-PAGE
1: DH5α/pKC505; 2: K719#; 3: purified L-sorbose/L-sorbose dehydrogenase 4: Ketogulonigenium vulgare S₂.

2.5 表达产物的生物学活性检测

取各细菌超声波破菌液与山梨糖反应,然后薄

层层析法检测,结果(图7)DH5 α /pKC505 只出现了底物中的糖点,而 K719 $^{\#}$ 和小菌除了出现糖点外,又出现了产物酸点,表明 K719 $^{\#}$ 能够产生醇醛脱氢酶,把底物山梨糖转化为 2-KLG,显示出生物活性。

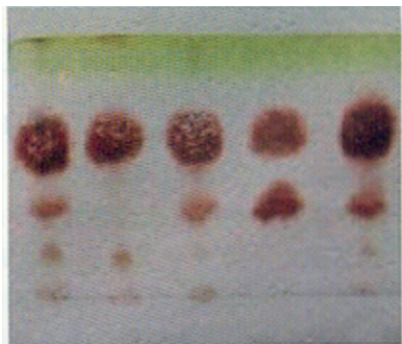


图7 K719 $^{\#}$ 转化产物的 TLC 检测

Fig. 7 TLC detection of bio-conversion products

1: K719 $^{\#}$; 2: DH5 α /pKC505; 3: purified L-sorbose/L-sorbosone dehydrogenase; 4 0.2% L-sorbose + 0.2% 2-KLG 5: *Ketogulonigenium vulgare* S₂.

3 讨论

由于目前维生素 C 工业生产的“二步发酵法”涉及 3 种细菌参与,工艺流程长,操作繁琐,易被污染,如能对 VC 生产菌株进行改造,构建出基因工程菌,将来实现从 D-山梨醇到 2-KLG 一步发酵生产法,既可省去高压加氢的不便和节约能源,又可减少因 3 株细菌两步发酵混合培养带来的不利因素,具有很强的社会竞争力,这也成为近年来的新研究课题。日本的 Shinjoh 等^[10]从液化醋杆菌 *Acetobacter liquefaciens* IFO 12258 中克隆并表达了产酸酶基因,但所构建的工程菌发酵产生 2-KLG 较少; Saito 等^[11]将氧化葡萄糖杆菌 T-100 的产酸酶基因重组入穿梭载体 pSOH155,克隆至氧化葡萄糖杆菌 G624 中,获得的基因工程菌具有一定的糖酸转化率。在国内,郭新友和尹光琳等^[12]通过 PCR 技术克隆到了产酸酶基因,并在 *E. coli* 中成功获得了表达,但该基因与收集到的少数产酸酶基因同源性很低。刘娟和尹光琳^[13]曾构建了产酸菌基因文库,目前没有分离出有关基因。然而,在醇醛脱氢酶被和小菌被重新定位后,还未见相关文献的报道。

从上述实验结果可见,本研究已经从“二步发酵法”中的产酸小菌中分离纯化出了糖酸转化的关键酶——醇醛脱氢酶,并且成功实现了醇醛脱氢酶基因的克隆和表达。基因工程菌 K719 $^{\#}$ 将原来串联发酵两株菌的相关特性结合到一株菌中,只需要一

步发酵便可以将 L-山梨糖转化生成 2-KLG,且具有较高的转化效率,避免了两种菌混合培养的繁琐,大大简化了发酵过程。今后本研究将继续进行亚克隆,得到醇醛脱氢酶基因序列,为最终构建成为直接利用 D-山梨醇发酵产生 2-KLG 的基因工程菌和实现 VC 生产工艺的改造奠定坚实的基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Tengerdy RP. Redox potential changes in the 2-keto-L-Gulonic acid fermentation II. Relationship between redox potential and product formation. *Biochem Microbiol Technol Eng*, 1961, **3**: 255 - 260.
- [2] Asakura A, Hoshino T. Isolation and characterization of a new quinoprotein dehydrogenase, L-sorbose/L-sorbosone dehydrogenase. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, **63**(1): 46 - 53.
- [3] Urbance JW, Bratina BJ, Stoddard SF, et al. Taxonomic characterization of *Ketogulonigenium vulgare* gen. nov, sp. nov. and *Ketogulonigenium robustum* sp. nov, which oxidize L-sorbose to 2-keto-L-gulonic acid. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, **51**(3): 1059 - 1070.
- [4] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193**(1): 265 - 276.
- [5] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**: 680 - 685.
- [6] Ausubel FM, Bernt R, Kingston RE, et al. Short Protocols in Molecular Biology. 3rd ed, New York: John Wiley & Sons, 1995.
- [7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] Hao SF(郝淑凤), Zhang WC(张惟材), Yuan HJ(袁红杰), et al. Construction of gene library of arthrobacter BT801 and isolation & expression of hydantoinase gene. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) 2003, **19**(3): 281 - 285.
- [9] Hurst HC. Immunological screening of phage cDNA expression libraries. *Methods Mol Biol*, 1997, **69**: 155 - 159.
- [10] Shinjoh M, Tomiyama N, Asakura A, et al. Cloning and nucleotide sequencing of the membrane-bound L-sorbosone dehydrogenase gene of *Acetobacter liquefaciens* OFO12258 and its expression in *Gluconobacter oxydans*. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 413 - 420.
- [11] Saito Y, Ishii Y, Hayashi H, et al. Cloning of genes coding for L-sorbose and L-sorbosone dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* and microbial production of 2-keto-L-gulonate, a precursor of L-ascorbic acid, in a recombinant *G. oxydans* strain. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 454 - 461.
- [12] Guo XY(郭新友), Yin GL(尹光琳). Cloning and expression of L-sorbosone dehydrogenase gene in *Escherichia coli*. *Micobiology* (微生物学通报), 1998, **2**(3): 139 - 143.
- [13] Liu J(刘娟), Yin GL(尹光琳). Construction of genomic library of *Gluconobacter oxydans* SCB329 in the L-sorbose utilizing mixed fermentation. *Micobiology* (微生物学通报), 1999, **26**(5): 314 -