

棒状杆菌 2, 5-DKG 还原酶基因在欧文氏菌中的表达*

陈策实 尹光琳

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

摘要 将能够在大肠杆菌内高效表达棒状杆菌 2, 5-DKG 还原酶 I 基因的质粒 pBL4 改造成为具有链霉素抗性的质粒 pBLS, 采用改进的感受态转化法将 pBLS 导入能够利用葡萄糖高产 2, 5-DKG 的欧文氏菌 SCB125 中, 通过提高温度诱导, 经 SDS-PAGE 分析 2, 5-DKG 还原酶 I 获得了高效表达, 占菌体总蛋白的 22%, 不形成包涵体。体外酶活测定结果表明表达的酶具有较高的活力。同时, 通过凝胶活力染色发现了宿主欧文氏菌 SCB125 中存在一个活力较强的 2-酮基醛糖还原酶。

关键词 2, 5-DKG 还原酶, 欧文氏菌, 表达, 2-酮基醛糖还原酶

分类号 Q753 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999) 02-0196-01

维生素 C 作为我国医药工业一种重要的产品, 近几年由于大量投资, 造成供求失衡, 使得国际市场的竞争非常激烈。如何改进工艺, 提高总收率和降低生产成本, 已成为越来越受到重视的课题^[1]。2, 5-DKG 还原酶是在葡萄糖串联发酵基础上^[2]构建直接利用葡萄糖产生维生素 C 前体 2-KLG 的基因工程菌关键酶。我们在完成了棒状杆菌 2, 5-DKG 还原酶 I 基因克隆之后^[3], 又将它插入到含 Amp^rTet^r 表达载体 pKK388-1(Ptac 启动子) 和 Amp^r 表达载体 pBL(P_L 启动子), 分别得到 pTrc11 和 pBL4, 在大肠杆菌内都获得了高效表达。但 pTrc11 直接转化到葡萄糖串联发酵第一步菌欧文氏菌 (*Erwinia. sp*) SCB125 中后, 却不能有效表达。由于欧文氏菌 SCB125 对氨苄不敏感, 进一步改造 pBL4 成为链霉素抗性的质粒 pBLS 并导入, 结果获得高效表达, 具有良好的应用前景。但对于存在背景还原酶活力干扰的问题, 还有待于进一步研究解决。

1 材料与方 法

1.1 菌株与质粒

Strain and plasmid	Genotype	Source and reference
Strains		
<i>Erwinia. sp.</i> (SCB 125)	Amp ^r	Our laboratory stock
<i>E. coli</i> DH5a	[4]	Our laboratory stock
Plasmids		
PDR121	Amp ^r , Str ^r	Gift from prof Zhao Guoping
PBL4	Amp ^r , 2, 5-DKG reductase I ⁺	Our laboratory stock
PBLS	Amp ^r , Str ^r , 2, 5-DKG reductase I ⁺	This paper

Amp^r(Ampicillin resistant gene), Str^r(Streptomycin resistant gene)

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39770021)。
收稿日期: 1998-03-30, 修回日期: 1999-01-07。

1.2 培养基和试剂

1.2.1 培养基: LB 培养基按文献[4]配制,使用前根据需要加入 100 μ g/mL Amp 或 50 μ g/mL Str。

1.2.2 酶与试剂: 限制酶, T4DNA 连接酶购于 Promega 公司,质粒抽提 Kit 购于 QIAGEN 公司, NADPH 购自 CALBIOCHEM 公司, 2-KDG, 5-KDG 为 Sigma 产品, 2-KLG 从山梨糖采用混合菌发酵制备, 2, 5-DKG 从葡萄糖发酵制备。

1.3 方法

1.3.1 DNA 操作技术: 质粒 DNA 的分离和纯化按说明书,限制酶消化, DNA 连接, 转化大肠杆菌, 琼脂糖凝胶电泳按常规方法进行^[4]。转化欧文氏菌用改进的 CaCl₂ 法进行^[5]。

1.3.2 转基因欧文氏菌的培养与诱导: 接种含 Str 的 3mL LB 式管, 在 30 $^{\circ}$ C 培养过夜, 过夜菌再以 2% 接种 50mL 含 Str 的 LB 摇瓶, 在 30 $^{\circ}$ C 培养 2~6h 后, 转移到 42 $^{\circ}$ C 诱导培养若干小时, 摇床转速均为 200r/min。

1.3.3 菌体密度测定: 培养液用蒸馏水稀释 10 倍后在波长 600nm 测 OD 值。

1.3.4 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析: 参考文献[3]方法进行, 分离胶浓度 15%。

1.3.5 2, 5-DKG 还原酶酶活测定: 参考文献[3]方法进行, 菌体离心收获后, 按 15OD: 1mL 的比例重新悬浮于 0.1mol/L Tris-Cl(pH7.0)后, 再冻融和超声破菌, 除 2, 5-DKG 外, 2-KLG, 2-KDG, 5-KDG 也被用为酶的底物, 酶活力以第 1 分钟内 A₃₄₀ 下降值来计算。

1.3.6 质粒稳定性研究: 将过夜培养在含 Str LB 的欧文氏菌 SCB125(pBLS), 按相同的比例同时接种到含有 Str 和不含有 Str 的 LB 中在 30 $^{\circ}$ C 培养, 间隔取样用无菌水稀释到 10⁻³~10⁻⁷, 取 100 μ L 涂布 LB 和 Str LB, 30 $^{\circ}$ C 培养过夜后计数。

1.3.7 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳活力染色和 2-酮基醛糖还原酶酶活测定: 参考文献[6]方法进行。

2 试验结果

2.1 pBLS 表达质粒的构建

由于欧文氏菌 SCB125 对氨苄青霉素不敏感, 对四环素和链霉素都敏感。因此含 Amp^r 的表达质粒 pBL4 不能直接用来转化欧文氏菌, 必须引进其它的抗性选择标记。pDR121 含 Str^r, 用 Hind III 将其切下, 同时 pBL4 也用 Hind III 切开, 都通过电泳从胶上回收, 再用 T4 连接酶将 Str^r 片段与线性化的 pBL4 连接, 形成质粒 pBLS (见图 1), 其中 Str^r 片段正好插入到 2, 5-DKG 还原酶 I 的下游。用连接液转化大肠杆菌 DH5 α , 在含有 Amp 和 Str 的双抗平板上筛选转化子, 扩增培养获得大量质粒 DNA, 通过 EcoRI 和 Hind III 消化质粒电泳检测正确后, 再用改进的 CaCl₂ 法将 pBLS 转化欧文氏菌 SCB125, 在含有 Str 的抗性平板上筛选转化子。

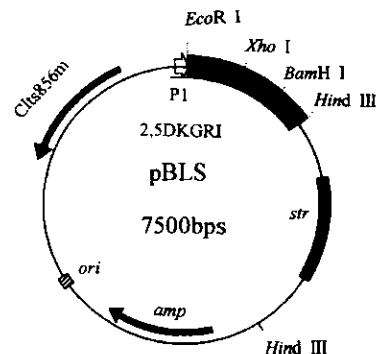


图 1 质粒 pBLS 的构建
Fig. 1 Construction of plasmid pBLS

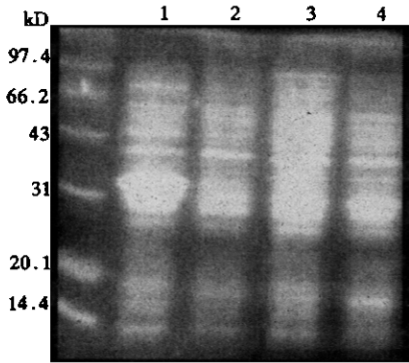


图2 在欧文氏菌 SCB125 表达的
2,5-DKG 还原酶 I SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE of the 2,5-DKG reductase I
expression in *Erwinia sp.* SCB125

1. Total protein of *Erwinia* containing pBLS after inducing at 42°C; 2. Total protein of *Erwinia* containing pBLS after inducing at 37°C; 3. Total protein of *Erwinia* containing pBLS after inducing at 30°C; 4. Total protein of *Erwinia* after inducing at 42°C.

物测量时,只有本底的活力水平(见图3)。37°C 诱导酶活力水平只与对照菌相当。

2.3 提高温度诱导对欧文氏菌生长的影响

因为欧文氏菌最佳生长温度为 30°C 左右,42°C 诱导培养对菌体生长不利,尤其是对数生长早期(2h, A_{600} 约 0.2)开始诱导,菌体浓度只能够达到正常生长的 15%,而且菌体易于老化。对数生长中期(4h, A_{600} 约 0.7)开始诱导对生长影响略微小一些,菌体浓度能够达到正常生长的 60%(见图4),但是酶的比活力只有早期诱导得到的 1/3。在显微镜下面观察,42°C 诱导培养的欧文氏菌菌体比正常生长的菌明显变长。

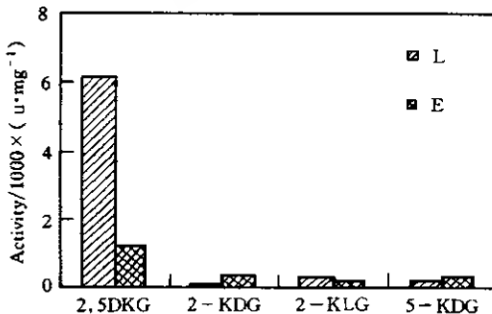


图3 在欧文氏菌 SCB125 表达的
2,5-DKG 还原酶 I 酶活分析

Fig.3 Enzyme specific activity of the
2,5 DKG reductase I expression in
Erwinia sp. SCB125
L. *Erwinia* (pBLS); E. *Erwinia*

2.2 2,5-DKG 还原酶 I 基因在欧文氏菌中的表达

由于 2,5-DKG 还原酶 I 基因处于 P_{I_1} 启动子下游,同时质粒 pBLS 能够表达一个温度敏感的 CI 蛋白,因此 2,5-DKG 还原酶 I 的表达要通过提高温度诱导来实现。SDS-PAGE 分析发现 42°C 诱导的欧文氏菌 SCB125 (pBLS) 与对照菌相比,在 34kD 位置上有明显的表达条带,约占菌体总蛋白的 22%,37°C 诱导培养则没有(见图2)。进一步用上清走电泳,发现表达的 2,5-DKG 还原酶 I 是以可溶形式存在。

通过酶活分析,结果经过 42°C 诱导的欧文氏菌 SCB125 (pBLS) 比活力可达到 6000u/mg 以上,约为对照菌的 5~6 倍,2,5-DKG 被作为酶的底物时,能够测到最高的酶活,而以 2-KLG,2-KDG,5-KDG 为底

物测量时,只有本底的活力水平(见图3)。37°C 诱导酶活力水平只与对照菌相当。

2.3 提高温度诱导对欧文氏菌生长的影响

因为欧文氏菌最佳生长温度为 30°C 左右,42°C 诱导培养对菌体生长不利,尤其是对数生长早期(2h, A_{600} 约 0.2)开始诱导,菌体浓度只能够达到正常生长的 15%,而且菌体易于老化。对数生长中期(4h, A_{600} 约 0.7)开始诱导对生长影响略微小一些,菌体浓度能够达到正常生长的 60%(见图4),但是酶的比活力只有早期诱导得到的 1/3。在显微镜下面观察,42°C 诱导培养的欧文氏菌菌体比正常生长的菌明显变长。

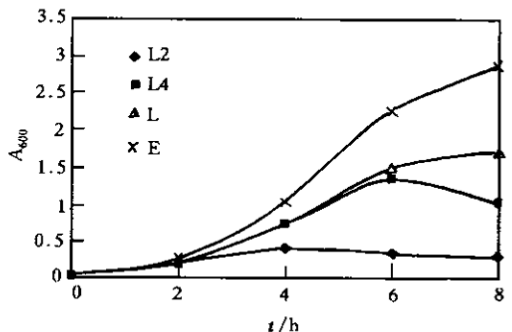


图4 对数生长期 42°C 诱导培养对欧文
氏菌生长影响

Fig.4 Influence of 42°C induction to growth
of *Erwinia sp.* in logarithmic period
L2. Induce after culturing for 2 hours; L4. Induce after
culturing for 4 hours; L. *Erwinia* (pBLS), no induc-
ing; E. *Erwinia*, no inducing.

鉴于以上菌体生长的特征,我们尝试在对数生长早期用 42℃ 短时间(0.5h)诱导后,到 37℃ 继续培养,最大程度减少对菌体生长的影响。结果虽然菌体浓度增加了,但表达效果不理想,说明 P_L 启动子的诱导需要维持较长的培养时间。

2.4 质粒在欧文氏菌中的稳定性

同时在加和没有加链霉素选择压力的情况下,对 pBLS 质粒在欧文氏菌的维持进行研究,结果 30℃ 培养 3h,再 42℃ 诱导了 6h 后,培养在 LB 中的欧文氏菌保持有 pBLS 质粒的仍然占 80% 左右,与加有抗生素选择压力基本相同,通过 SDS-PAGE 电泳和酶活分析,2,5-DKG 还原酶 I 表达水平基本相同,说明该质粒在欧文氏菌 SCB125 中是很稳定的(见图 5)。

2.5 2-酮基醛糖还原酶的发现

在酶活测量中,注意到了在不含质粒的对照菌细胞抽提液中也能够测到一定水平的 NADPH 下降,尽管其比活力不如表达有 2,5-DKG 还原酶 I 的工程菌高,但背景还原酶的存在还是在一定程度上干扰了对重组表达 2,5-DKG 还原酶 I 比活力的分析。在欧文氏菌能够同时还原 2,5-DKG 的酶最有可能的是 2-酮基醛糖还原酶,据文献报道,欧文氏菌内部有两个 2-酮基醛糖还原酶,它们对底物的专一性不高,可以同时催化还原 2,5-DKG、2-KLG、2-KDG 的第二位酮基^[5]。

将蛋白含量在 10mg/mL 左右的欧文氏菌 SCB125 细胞抽提液在 15% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳,在 4℃、30mA 恒流下进行 6h 电泳后,将胶在 1mmol/L NADPH 中浸泡 3min,然后分别放在浸有 0.1mol/L 2,5-DKG、2-KLG、2-KDG、5-KDG 的滤纸上约 6min,在紫外下观察,可以看到当胶放在浸 2,5-DKG、2-KLG、2-KDG 的滤纸上后,在同一位置均有一条明显的黑色条带,而放在浸 5-KDG 的滤纸上却没有(见图 6)。利用 2-KLG 作为底物,在文献[5]条件下测定欧文氏菌 SCB125(pBLS)和对照菌细胞抽提液 2-酮基醛糖还原酶比活,结果基本相同。因此可以推测背景还原酶的存在来源于其中一个 2-酮基醛糖还原酶。

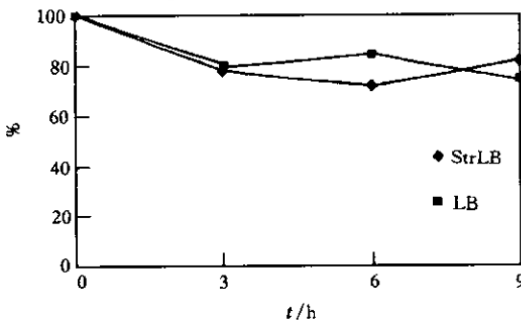


图 5 质粒 pBLS 在欧文氏菌 SCB125 中的稳定性

Fig. 5 The stability of plasmid pBLS in *Erwinia sp.* SCB125
StrLB. Culture in LB containing 50μg/mL str; LB. Culture in LB

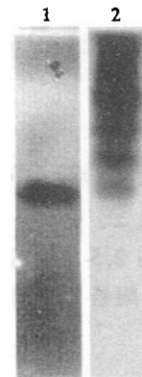


图 6 2-酮基醛糖还原酶在非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳活力染色

Fig. 6 2-keto reductase in native gel activity stain

1. Native gel activity stain of *Erwinia*, 2-KLG as substrate, 2. Coomassie brilliant blue stain of the same gel

3 讨 论

pBLS是在高拷贝表达质粒 pBL4 的基础上经过改造得到的,在 P_L 启动子控制下,2,5-DKG还原酶 I 在欧文氏菌 SCB125 以可溶形式获得了高效表达,并且具有较高的酶活力,同时质粒在没有抗生素的条件下也十分稳定。为进一步纯化重组蛋白做特征分析,优化基因工程菌从葡萄糖发酵产生 2-KLG 打下了良好的基础,具有潜在的应用价值。

通过实验发现提高温度诱导表达的方式对菌体生长有诸多不利影响,使菌浓降低,易于老化,而且菌体由于温度升高将产生热激反应扰乱菌体正常的代谢,这对将来在工业上应用带来一定困难。pBL4 在大肠杆菌中表达时,突变的 Clts857 蛋白抑制 P_L 启动子转录不是十分严谨,30℃ 生长也能达到相同酶活水平^[3]。但是改造后的 pBLS 在欧文氏菌内表达情况有所不同,2,5-DKG 还原酶 I 受到了严格的温度调控。因为代谢工程菌的基因表达和一般的基因工程菌要求不完全一样,如果单纯地追求高表达,可能对菌体形成一种负担和浪费。因此要求在尽量不影响生长的条件下,使 2,5-DKG 还原酶 I 在欧文氏菌中能稳定的表达,创造最有利于从葡萄糖发酵产生 2-KLG 的条件。用温和的诱导方式或者中等强度的组成型启动子来表达 2,5-DKG 还原酶 I 加上合适基因剂量有可能会更加实用。

发现背景还原酶的活力主要来源于一个 2-酮基醛糖还原酶,它的分子量和具体催化特征尚不十分清楚,由于它催化的三个还原反应都将不利于从葡萄糖发酵产生 2-KLG^[9],因此构建一个 2-酮基醛糖还原酶缺陷型菌株为 2,5-DKG 还原酶表达宿主,将大大提高基因工程菌的实际应用价值。最近韩国学者 Yum D. Y 等从 *Brevibacterium ketosoreductum* ATCC21914 中纯化得到一个 2-酮基醛糖还原酶,由两个相同的亚基构成^[10],在 *Acetobacter cerinus* 中采用染色法定性分析首先发现存在两个不同的 2-酮基醛糖还原酶,在 *Erwinia herbicola* 中的情况也是如此^[8]。目前我们正在试图纯化这个酶,同时已经克隆得到编码它的基因,正在利用基因敲除技术灭活这个酶,这方面结果我们将另文发表。

致谢 衷心感谢中科院上海植物生理研究所赵国屏研究员和张菁赠送 pDR121 质粒。

说 明: 2,5-DKG: 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸; 2-KLG: 2-酮基-L-古龙酸;
2-KDG: 2-酮基-D-葡萄糖酸; 5-酮基-D-葡萄糖酸

参 考 文 献

- [1] 石兰珍. 化学医药工业信息, 1997, 13(10): 1~3.
- [2] 尹光琳, 马志方, 董文玲等. 微生物学报, 1991, 31(3): 198~205.
- [3] 陈策实, 尹光琳. 微生物学报, 1998, 38(6): 435~440.
- [4] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [5] D. A. Estell, D. R. Light, R. A. Lazarus *et al.* . European Patent No: 0132308A1, 1985: 29~30.

- [6] L. S. Jana, R. A. Lazarus. *Analytical Biochemistry*, 1989, **178**:243~247.
- [7] R. A. Lazarus, J. L. Seymour, R. K. Stafford *et al.* Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms. Washington D. C.: American Society for Microbiology, 187~193.
- [8] Stephen Anderson, R. A, Lazarus, I. M. Havey *et al.* U. S. Patent No: 5032514, 1991.
- [9] R. A. Lazarus, L. Jana, R. Seymour, *et al.* Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms. Ed Hershberger C. L, American Society for Microbiology, Washington D. C. 187~193.
- [10] D. Y. Yum, P. Lee Y, J. G. Pan. *J. Bacter*, 1997, **179**(21):6566~6572.

Expression of 2, 5-DKG Reductase I Gene from *Corynebacterium* in *Erwinia* SCB125*

Chen Ceshi Yin Guanglin

(Shanghai Research Center of Biotechnology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233)

Abstract By an improved CaCl_2 method a derived plasmid, pBLS, containing 2, 5-DKG reductases I gene from *Corynebacterium sp.* SCB3058 was introduced into strain of *Erwinia sp.* SCB125 with efficiently producing 2, 5-DKG from glucose. With induction of temperature, the enzyme protein was expressed in high level. The expressed recombinant protein accounted for 22% of the total cell protein and had high specific enzyme activity. At the same time, we found a 2-keto aldose reductase with high activity by native gel activity stain. This work was the bases of constructing a recombinant *Erwinia* which can produce 2-KLG directly from D-glucose by one-step fermentation.

Key words 2, 5-DKG reductase I, *Erwinia sp.*, Expression, 2-keto aldose reductase

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(No. 39770021).