

欧文氏菌 2-酮基醛糖还原酶基因敲除的研究*

陈 芳 陈策实 李 越 尹光琳

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

摘 要 根据已知基因序列,利用 PCR 技术,从克隆质粒和欧文氏菌(*Erwinia* sp.) SCB125 染色体中重新扩增得到含有 2-酮基醛糖还原酶 A 和 B(2-KRA 和 B)基因的片段,分别用于基因表达和敲除。用于表达的片段定向连接到表达载体 pBL 并转化大肠杆菌 DH5 α 后,获得高酶活表达。在证实发生了突变的基因表达产物仍具有酶活的基础上,对其进行基因敲除的研究。在体外将链霉素抗性基因插入到 *tkrA* 内部使其突变失活并作为阳性筛选标记,再将此突变基因构建到分配不稳定型质粒 pBR322 上,导入宿主菌后与染色体上正常基因进行同源重组交换,筛选质粒丢失的阳性菌落进行进一步鉴定。这项工作将为阻断旁路代谢,实现从葡萄糖一步发酵产生维生素 C 前体 2-酮基古龙酸(2-KLG)打下基础。

关键词 维生素 C, 2-酮基醛糖还原酶, 表达, 基因敲除, 欧文氏菌

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2000)05-0475-81

基因敲除作为近几十年新兴的一种重要的重组 DNA 技术,在微生物代谢工程研究中,与基因克隆技术同等重要,广泛应用于构建具有特定突变的工程菌,改变生物代谢途径,阻断副反应的进行,防止副产物或有毒产物形成,促进目的产物积累等方面。随着重组 DNA 技术的发展,研究者多采用将克隆的目的基因进行定点体外突变,然后导入宿主细胞,利用某些机制筛选得到目的基因敲除突变株。目前国内关于基因敲除在微生物代谢工程研究方面的工作未见报道。

维生素 C 是人体必需的一种维生素和抗氧化剂,其重要前体 2-酮基-L-古龙酸(2-KLG)的生物合成近几十年来一直受到广泛重视。我们实验室在“八五”攻关期间开展了采用欧文氏菌(*Erwinia* sp.)和棒状杆菌(*Corynebacterium* sp.)进行串联发酵产生 2-KLG 的一系列研究^[1]。为进一步简化工艺,开始构建从葡萄糖一步发酵产生 2-KLG 的基因工程菌,现已在宿主菌欧文氏菌 SCB125 中成功表达了有活力的 2,5-DKG 还原酶,同时在测酶活过程中发现存在高背景 2-酮基醛糖还原酶(2-KR)活力,并通过活性凝胶染色初步验证^[2]。随后根据国外草生欧文氏菌 ATCC21998 的两个 2-KR(2-KRA 和 B)基因序列^[3],采用 PCR 技术克隆得到两个 2-KR 基因(*tkrA* 和 *tkrB*)。酶切和测序证明:*tkrA* 发生多处突变,而 *tkrB* 基本保守。由于 2-KR 能够利用 NADPH 或 NADH 辅酶将工程菌代谢中重要的中间产物 2,5-DKG 及终产物 2-KLG 转化为副产物 5-酮基-D-葡萄糖酸(5-KDG)和 L-艾杜糖酸(L-IA),通过代谢工程研究减少或解除旁路代谢的关键酶能

* 国家自然科学基金资助项目(39770021)

作者简介:陈 芳(1974-),女,四川成都人,南京大学生物化学系毕业,现为中国科学院上海生物工程研究中心 97 级硕士研究生,主要从事分子生物学研究

收稿日期:1999-08-27,修回日期:1999-11-30

够提高 2-KLG 的产量^[3,4],我们着手对其进行基因敲除。

本文报道了两个 2-KR 基因在大肠杆菌中成功表达,证实发生了突变的基因表达产物仍具有酶活。在此基础上,我们构建了基因敲除质粒,利用同源重组的方法用体外突变失活的 2-KR 基因替换基因组上正常的 2-KR 基因,进行了基因敲除的初步研究。此项研究体现了基因敲除技术在微生物代谢工程方面的应用,使我们可以从宿主菌基因水平上彻底阻断旁路代谢,为实现工程菌从葡萄糖到 2-KLG 的高效转化打下基础。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒(表 1)

表 1 菌株与质粒
Table 1 Strains and plasmids

Strain and plasmid	Genotype	Source
<i>E. coli</i> DH5 α	[5]	Our lab.
<i>Erwinia</i> sp. SCB125	<i>Amp^r</i>	[6]
pGEM-T	<i>Amp^r</i>	Promega Corporation
pTA3	<i>Amp^r, tkrA</i>	Our lab.
pB3	<i>Amp^r, tkrB</i>	Our lab.
pBL	<i>Amp^r</i>	Our lab.
pBLII	<i>Amp^r, 2,5-DKG</i> Reductase II gene	Our lab.
pBLA	<i>Amp^r, tkrA</i>	This paper
pBLB	<i>Amp^r, tkrB</i>	This paper
pGEM-TA	<i>Amp^r, tkrA</i>	This paper
pDR121	<i>Str^r</i>	Our lab.
pBR322	<i>Tc^rAmp^r</i>	Sino-American Biotechnology Company
pUC4K	<i>Kan^r</i>	Parmacia Corporation
pCF	<i>tkrAm Tc^rKan^rStr^r</i>	This paper

1.2 培养基和试剂

1.2.1 培养基:LB 培养基按常规配制^[5],使用前根据需要加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Str、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tc 等。

1.2.2 酶与试剂:PCR 及回收 Kit 购于 Promega 公司,限制性内切酶、T4DNA 连接酶购于 Promega 公司和 TaKaRa 公司,质粒抽提 Kit 购于 QIAGEN 公司,NADPH 购自 CALBIOCHEM 公司,SDS-PAGE 低分子标准蛋白购于上海丽珠东风生物技术有限公司,2-KDG、5-KDG、萎蔫酸(Fusaric acid)和金霉素(Chlortetracycline hydrochloride)为 Sigma 产品,2-KLG 从山梨糖采用混合菌发酵制备,2,5-DKG 从葡萄糖经发酵制备。

1.3 方法

1.3.1 DNA 操作技术和表达产物的 SDS-PAGE 分析:按常规方法^[5]及操作说明书进行。转化欧文氏菌用改进的 CaCl_2 法进行^[7]。

1.3.2 欧文氏菌基因组 DNA 的提取方法:参考文献[8,9]。

1.3.3 引物合成与 PCR 扩增:根据文献报道的 2-KR 基因及其两端序列,用 PC/GENE 软件中 PCR 引物设计程序,设计了 PCR 反应的引物,合成时在 5' 端加上酶切位点和保护

碱基可以方便地进行克隆。

基因表达采用引物：

tkrA

5'端引物 5'AGAATTCATGAAGCCTGAAGTGCTGTTAT 3'

EcoRI

3'端引物 5'AAGCTTGCATTTAACGCAGCACC 3'

HindIII

tkrB

5'端引物 5'GAATTCATGACGCAACAAGCCC 3'

EcoRI

3'端引物 5'AAGCTTGC GGATTAAACAGCG 3'

HindIII

基因敲除采用引物

tkrA

5'端引物 5'ACTGCAGCCCTTCTTCGCCATTATTCC 3'

Pst I

3'端引物 5'TCCCGGGCTGCCGCTGTTGACCTTATG 3'

Sma I

反应采用 Promega 公司 PCR Kit,以已克隆 *tkrA* 和 *tkrB* 的质粒 pTA3、pTB3 或欧文氏菌基因组 DNA 为模板,在 50 μ L PCR 反应混合液中含 10 \times 缓冲液 5 μ L, 4dNTP(2.5 mmol/L) 4 μ L, 20 pmol/ μ L 引物各 2 μ L, 模板 2 μ L, MgCl₂(25 mmol/L) 2 μ L, Taq DNA Polymerase 1 μ L, 用无菌水调整至 50 μ L。97 $^{\circ}$ C, 10 min, 72 $^{\circ}$ C, 2 min, 加入 Taq 酶。循环参数: 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min; 45 $^{\circ}$ C 复性 1 min; 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min; 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min 使产物延伸完全。混合物取 5 μ L 用琼脂糖凝胶电泳检测。

扩增产物通过 PCR 回收试剂盒纯化。

1.3.4 2-KR 酶比活测定方法 参照文献 [10, 11] 并略加改进。离心收集表达的菌体,用 Buffer A (0.1 mol/L Tris-Cl(pH 7.0)) 洗涤,按 15 OD : 1 mL 的比例重悬浮于一定体积的 Buffer A 中,再超声破菌,离心取上清作为测定用的酶液。在 30 $^{\circ}$ C, 100 μ L 细胞裂解液上清加到 3 mL 含有 200 mmol/L 2-KLG 或 3.33 mmol/L 2,5-DKG 和 0.2 mmol/L NADPH 的 Buffer A 中,测定 OD₃₄₀ 的变化,酶活力以第 1 min 内 OD₃₄₀ 下降值来计算。根据标准曲线换算成 NADPH 浓度变化,计算酶活力。酶活力单位(U)定义为:每分钟氧化 1 μ mol NADPH 所需的酶量。蛋白浓度采用 Bradford 法 [12] 以牛血清白蛋白为标准测定 [13], 计算酶的比活力。

1.3.5 重组欧文氏菌的低磷培养 参照文献 [14, 15] 将 Kan 换为 Str。

1.3.6 基因敲除菌株的初筛方法 将低磷培养后的菌液适度稀释,参照文献 [16] 阳性筛选四环素敏感菌落,再用灭菌牙签分别点到含 Tc、Str 及 Kan 的 LB 平板上加以验证。

Str^rKan^sTc^s 的菌株即为初筛所需目的菌株。

2 结果和讨论

2.1 2-KR 基因的重新克隆

为了实现基因敲除,首先要克隆得到基因,经酶切和测序证明 *tkrA* 发生五处突变,其中第 117 位和第 192 位的碱基插入引进 27 个氨基酸移码突变, *tkrB* 基因基本保守。为了验证 *tkrA* 和 *tkrB* 是否具有活性,先对它们进行了体外表达。由于已克隆 *tkrA* 和 *tkrB* 并经测序验证的质粒 pTA3、pTB3 酶切位点与起始密码子 ATG 之间距离太长,若依次插入到表达载体 pBL 上,会造成 pBL 上的 SD 序列与起始密码子 ATG 之间距离太长(18bp),大大影响翻译效率,因此重新设计引物从质粒上扩增,经酶切验证后直接通过 *EcoRI*、*HindIII* 酶切位点构建表达载体。而通过同源重组机制进行基因敲除构建时,由于同源重组是一个低频事件,一般效率为 10^{-4} 到 10^{-5} ,目的基因两端的同源片段的长度对重组效率有很大的影响,为了保证同源重组的高效发生,需要一定长度的同源序列^[17],于是我们根据目的基因两端的序列重新设计了引物,从欧文氏菌基因组 DNA 重新克隆 *tkrA*,得到长约 2kb 的片段,使得同源序列增加了一倍。经过酶切鉴定后,也将其克隆到了 pGEM-T 载体上,定名为 pGEM-TA。

2.2 表达载体的构建和在大肠杆菌中的表达分析

利用表达载体 pBL 上的 P1 启动子、SD 序列等调控基因表达元件,构建出大肠杆菌高效报道载体 pBLA 和 pBLB,其 SD 序列与 ATG 起始密码子之间间距为 8bp,接近文献报道的最佳距离^[18](图 1)。

将含有重组表达载体 pBLA 和 pBLB 的大肠杆菌 DH5 α 过夜培养,转接后 30 $^{\circ}$ C 培养 3.5h,再 42 $^{\circ}$ C 热诱导 4h,产生了对照(含有质粒 pBL 和 pBLII)所没有的表达产物,在 SDS-PAGE 凝胶上可见明显的表达产物条带,测得分子量约为 33kD 和 34kD(图 2),其结果与理论值一致。

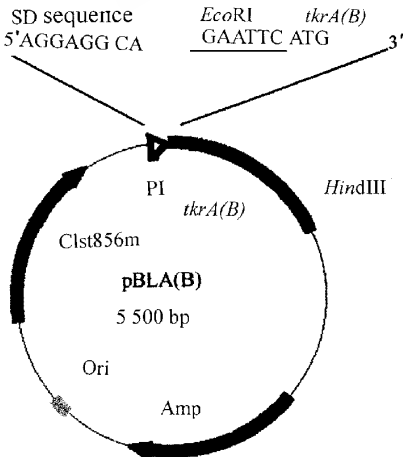


图 1 pBLA(B)物理图

Fig.1 Physical map of pBLA(B)

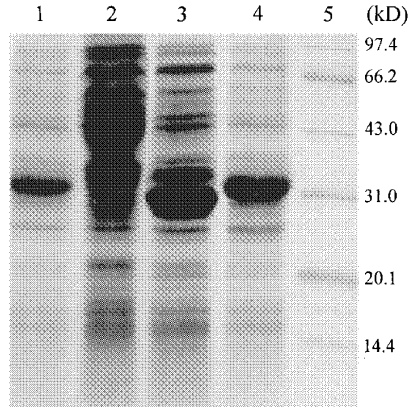


图 2 2-KRA(B)基因编码的蛋白在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE of the *tkrA* and *tkrB* genes coded protein expression in *E. coli*

1. DH5 α (pBLA); 2. DH5 α (pBL); 3. DHT α (pBLII);

按酶活力测定方法测定表达在大肠杆菌中的 2-KR 活力,结果表明表达的 2-KRA 和 B 都具有很高的生物学活性,对底物 2-KLG, 2-KRA 达到了 5356U/mg, 2-KRB 达到了 3889U/mg, 对底物 2,5-DKG, 2-KRB 也达到 6428U/mg, 与对照(含有 pBLII)表达的 2,5-DKG 还原酶 II 的活力相当。通过不同的温度诱导,从结果可见 42℃ 诱导能够得到高得多的蛋白表达量,但上清中酶的比活力和 30℃ 诱导保持基本相同的水平。这说明 42℃ 诱导的大量表达产物形成了包涵体,胞质中的可溶性蛋白可能已经达到饱和,同时说明突变的 CIts857 蛋白抑制 P1 启动子转录不是十分严谨,而欧文氏菌 SCB125 正常发酵温度接近于 30℃,因而这是比较合适的载体。

2.3 敲除质粒的构建及基因敲除菌株的初步筛选

在证实两个 2-KR 都具有酶活的基础上,对它们的基因敲除进行了初步探索。先从 *tkrA* 入手,构建敲除载体,利用同源重组的方法用体外突变失活的 2-KR 基因替换基因组上正常的 2-KR 基因。pBR322 质粒分配不稳定,在细胞分裂过程中易于出现质粒丢失的细胞。在无抗性压力或低磷条件下培养 10~50 代就会出现很多质粒丢失的细胞^[5,14,19]。因此将突变基因构建在此类质粒上,再让发生重组后的质粒丢失即可。构建时将从质粒 pDR121 上用 *Sma*I 切下的链霉素抗性基因片段插入 pGEM-TA 中 *tkrA* 内部(776bp)的 *Stu*I 位点,在 Amp^rStr^r LB 平板上筛选得到重组克隆,酶切鉴定后用 *Pst*I 切下此突变基因连接到质粒 pBR322 中,在 Str^rTc^rLB 平板上筛选得到的重组克隆,酶切鉴定后再插入从质粒 pUC4K 上用 *Eco*RI 切下的卡那霉素抗性基因片段,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ,在 Str^rTc^rKan^rLB 平板上筛选得到最终重组克隆,酶切鉴定后定名为 pCF(图 3)。

质粒 pCF 转化到欧文氏菌经低磷培养后,采用对四环素敏感的正向筛选方法先初筛四环素敏感的菌株,再分别在 Tc、Str、KanLB 平板上进行抗性验证。Str^rKan^rTc^s 的菌株即为初筛所需目的菌株。目前这一工作正在继续研究中,需要通过 PCR 技术, Southern 杂交等方法进一步验证。直接的酶活检测则还需要阻断另一个同工酶基因 *tkrB* 后进行。

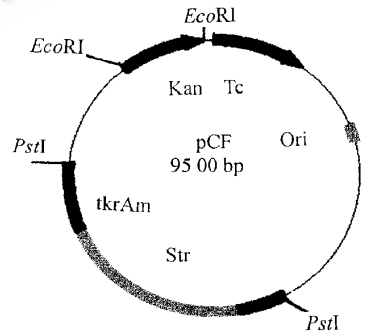


图 3 pCF 的物理图谱
Fig. 3 Physical map of pCF

4 讨论

基因敲除作为八十年代兴起的一种重要的重组 DNA 技术,日益广泛地应用于微生物代谢工程研究中,我们对旁路代谢的关键酶 2-KR 的基因敲除即是对此技术的又一应用,它可使宿主菌中的 2-KR 基因永久性失活,从而通过基因水平实现对旁路代谢的彻底阻断,为工程菌提供一个理想宿主。

为实现基因敲除,我们首先克隆得到了目的基因,并尽可能保证了同源片段的长度。在敲除载体的选择方面, Roeder D L 等人在敲除欧文氏菌 *Erwinia chrysanthemi* 中果胶酶基因 *pelC* 时,采用低磷诱导 pBR322 衍生质粒的丢失,结果非常理想^[14],我们在先后采用了线形转化,自杀型载体等方法后,最终也确定用分配不稳定型载体 pBR322 衍生质粒

进行敲除构建。此外,敲除成功还必须有好的筛选方法富集基因敲除重组子,由于还存在同工酶 2-KRB,直接的表型筛选不能采用,采用抗性标记进行初筛,用四环素抗性及卡那霉素抗性作为鉴定敲除质粒存在与否的阴性筛选标记,将插入基因内部的链霉素抗性作为鉴定突变基因存在与否的阳性筛选标记,并利用四环素抗性菌体对萘萹酸等脂类整合剂高度敏感进行四环素抗性丢失的正向筛选提高了筛选效率。目前突变菌株的筛选及进一步鉴定工作仍在继续进行中。

经验证后的目的菌株,将进行从葡萄糖发酵及酶促产物分析,观察 *tkrA* 敲除后对菌株催化 2,5-DKG、2-KLG 以及产 2-KLG 影响。对于 *tkrB*,考虑到它有可能是必需基因,为了防止其突变致死,可将突变基因构建在可调控的表达系统中,同源重组后,调控从染色体上替换下来的正常基因的表达^[3]。此外,还可考虑用反义核酸技术抑制其表达,通过表型初步筛选目的菌株,经最终发酵鉴定后即可作为无 2-KR 或低 2-KR 活性的工程菌宿主。

参 考 文 献

- [1] 尹光琳,马志方,董文玲,等. 微生物学报,1991,3(3):198~205.
- [2] 陈策实,尹光琳. 生物工程学报,1999,15(2):196~201.
- [3] Anderson S, Lazarus R A, Miller I, et al. U. S. Patent, 5032514, 1991.
- [4] Lazarus R A, Seymour J L, Stafford R K, et al. Biocatalysis. New York: Van Nostrand Reinhold, 1990. 135~155.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [6] 何建明,萨维琪,尹光琳,等. 工业微生物,1994,2(2):10.
- [7] Estell D A, Lazarus R A, Light D R, et al. European Patent 0132308A1, 1985. 29~30.
- [8] Perry K L, Simonitch T A, Liu S T, et al. J Bacteriol, 1986, 168(2):607~612.
- [9] Keen N T, Dahlbeck D, Staskawica B, et al. J Bacteriol, 1982, 159(3):825~831.
- [10] Seymour J L, Lazarus R A. Analytical Biochemistry, 1989, 178:243~247.
- [11] Miller J V, Estell D A, Lazarus R A. J Biol Chem, 1987, 262(19):9016~9020.
- [12] Braford M M. Anal Biochem, 1976, 72:248~254.
- [13] 李建武,陈丽蓉,陈雅惠,等. 生物化学实验原理和方法. 北京:北京大学出版社,1994. 174~176.
- [14] Roeder D L, Collmer A. J Bacteriol, 1985, 164(1):51.
- [15] Annamaria T. Biochem Biophys Acta, 1960, 38:460~479.
- [16] Stanley R M, William D N. J Bacteriol, 1981, 145(2):1110~1112.
- [17] Hamilton C M, Aldea A, Washburn B K, et al. J Bacteriol, 1989, 171(9):4617.
- [18] David V L. Methods in Enzymology, 1990, 185:3~195.
- [19] Kiel J A, Vossen J P, Venema G. Mol Gen Genet, 1987, 207(2~3):294~301.

STUDIES ON GENE KNOCKING OUT OF 2-KETO ALDOSE REDUCTASES FROM *ERWINIA* SP. SCB125

Chen Fang Chen Ceshi Li Yue Yin Guanglin

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

Abstract : Based on the reported gene sequences, the segments containing 2-keto aldose reductase (2-KRA and B) genes were amplified by PCR from the plasmids and *Erwinia* sp. SCB125 each for gene expression and gene knocking out. Then cloning them into expression vector pBL and successfully expressing them with high enzyme activity in *E. coli* DH5 α . After their enzyme activities were proved, the work on gene knock out followed. Introducing the knock-out vector which distribute unstably during the cell division to the host strains *Erwinia* sp. SCB125. Screening firstly by the positive marker, one resistance which resulted from the expression of the resistance gene inserting inside the reductase genes and the negative marker, another resistance which outside the reductase genes in the vector. The strains selected out will be tested by further study. This work was the bases of blocking the pathway metabolism and constructing a recombinant strain that can produce 2-KLG directly from D-glucose by one-step fermentation.

Key words : Vitamin C, 2-keto aldose reductase, Expression, Knock out, *Erwinia* sp.

《微生物学报》承接广告业务

《微生物学报》创刊于 1953 年,双月刊,双月 4 日出版,由中国微生物学会和中科院微生物研究所主办。他是我国微生物学领域唯一的综合性学报级刊物。主要报道我国普通微生物学、工业、农业、医学、兽医微生物学、病毒学、免疫学和生物工程等方面的研究论文、研究简报和短篇综述等。

本刊历史悠久,发行量大,内容涵盖面广,深受国内外科研工作者、高等院校师生和企业事业科研管理人员的欢迎。他是我国自然科学核心期刊,被国内外一些重要的文摘刊物和数据库收录。曾多次被评为优秀科技期刊。

凡与微生物学及其各分支学科有关的试剂、药品、仪器、设备,以及生物工程产品等均欢迎在本刊刊登广告。本刊服务热情,信守协议,保证质量,价格合理,竭诚为广大用户服务。

联系电话 (010) 62630422 邮编 100080

通讯地址 北京市海淀区中关村中科院微生物研究所内《微生物学报》编辑部