

大肠杆菌 *cai* DE 的基因克隆与表达

蒋建雄 段世伟 张惠展

(华东理工大学国家生物反应器重点实验室 上海 200237)

摘 要 从 *E. coli* MC4100 菌体的染色体 DNA 中利用鸟枪法克隆含编码肉碱消旋酶及相关因子的 *cai*DE 基因片段,并经序列分析验证。由重组质粒 pJX393 亚克隆得到 pDSW2 重组表达质粒,后者转入 *E. coli* BL21(DE3)菌株中,经异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导,在聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)上分子量为 30kD 和 24kD 附近可见明显的表达蛋白带。

关键词: *cai*DE, 基因表达, *E. coli* MC4100, *E. coli* BL21(DE3)

中图分类号: Q978 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2000)06-0586-90

肉碱(carnitine)又称为维生素 B^[1,2],分为 D 型和 L 型,后者具有促进脂肪酸代谢、解除氨的毒性、消除自由基、抗氧化等功能。D-肉碱完全无活性且还可能抑制 L-肉碱的利用,因此美国 FDA 在 1983 年就禁止出售 DL-混旋型肉碱。

DL-肉碱一般采用化学合成法来生产,但拆分其中具有生理活性功能的 L 型旋光体一直是限制 L-肉碱大规模生产的重要因素。自然界中只存在 L-肉碱,故通过对生物体内 L-肉碱分解合成途径的深入研究,人们了解到在一些肠道细菌如大肠杆菌、变形杆菌和沙门氏菌中,肉碱代谢与操纵子 *cai*TABCDE 密切相关^[3-5]。特别是 *cai*D 编码的肉碱消旋酶能简洁地将 D-肉碱转化为 L-肉碱,从而为 L-肉碱的生产提供了新思路。另外 *cai*E 编码一种未知因子,其高效表达能明显提高肉碱消旋酶活性。

本文采用鸟枪法首先构建 *E. coli* MC4100 限制性文库,筛选出含 L-肉碱消旋酶(rasemase)及未知因子的编码基因 *cai*DE 的重组克隆,经次级克隆在表达载体上后,转入 *E. coli*BL21(DE3)中表达,并对 DL-肉碱的充分利用进行了初步的探索。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

E. coli MC4100, BL21(DE3), JM83 菌株与 pUC18, pSP72 质粒为实验室收藏。pJX393, pDSW2 为本工作构建。

1.2 培养基、试剂与酶

LB 液体培养基成分: 胰蛋白胨 1%, 酵母抽提物 0.5%, NaCl 1%。LB 固体培养基成份再另加入 1.8% 的琼脂。

限制性内切酶、DNA 连接酶及其缓冲液为 TAKARA 产品,溶菌酶、RNA 酶、蛋白酶 K 购于上海实生生物技术公司。

1.3 一般操作方法

E. coli MC4100 全染色体及质粒 DNA 的相关操作参见文献 [6]

1.4 DNA 序列的测定 [6]

1.5 BL21(DE3) 感受态细胞的制备及 pDSW2 的转化

参见 Promega Corporation (1996), p45~47.

1.6 SDS-PAGE [6]

2 结果

2.1 *E. coli* MC4100 染色体限制性基因文库的构建及目的基因的筛选

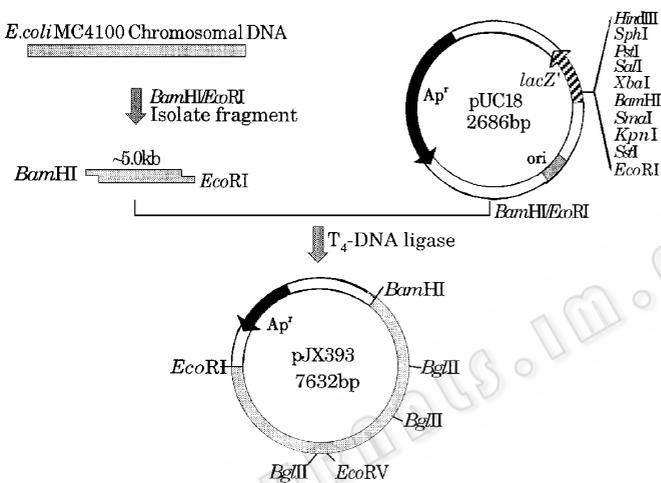


图 1 pJX393 的克隆

Fig. 1 Cloning of plasmid pJX393

以 *E. coli* MC4100 菌为出发菌株, 克隆其染色体上的 *caiD* 和 *caiE* 基因。在 *caiD* 及 *caiE* 基因的 5' 端上游有一个 *Bam*HI 位点, 3' 端下游有一个 *Eco*RI 位点, 这两个位点之间的 DNA 片段的大小为 4976bp (约 5.0kb), 该片段包含有完整的 *caiD* 及 *caiE* 基因。提取并纯化 *E. coli* MC4100 染色体 DNA, 用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切, 回收其中 5.0kb 左右片段, 与用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切过的质粒载体 pUC18 以 3:1 的摩尔比混合, 在 T4-DNA 连接酶的作用下于体外连接。然后转化 *E. coli* JM83, 再将转化产物全部涂布于含 Am^r (100 μg/mL) 及 X-gal (40 μg/mL) 的 LB 固体培养基上 (图 1)。

然后转化 *E. coli* JM83, 再将转化产物全部涂布于含 Am^r (100 μg/mL) 及 X-gal (40 μg/mL) 的 LB 固体培养基上 (图 1)。

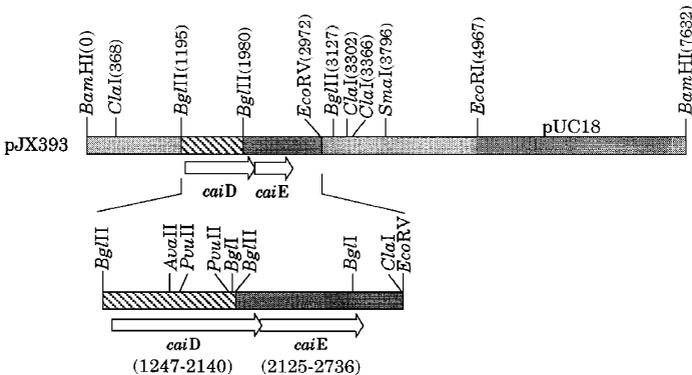


图 2 pJX393 的限制性酶切图谱

Fig. 2 Restriction enzyme map of plasmid pJX393

结果共得到 1380 个白色菌落,其中有 610 个重组子,重组率为 44.2%,经过几轮酶切鉴定后筛选出重组质粒 pJX393,其限制性酶切图谱和酶切电泳图谱如图 2、3 所示。

2.2 重组质粒 pJX393 外源 DNA 序列的部分测定

在 *caiD* 基因的 5' 端上游及内部各有一个 *Bgl*II 位点,两位点之间的片段大小为 785bp,选定这一片段进行测序。测序载体为质粒 pUC18,测序引物为 pUC/M13 通用测序引物:5' TG-TAAAACGACGGCCAGT3',进行单向测序。测序结果如图 4 所示,表明所得的 DNA 顺序与 *caiD* 基因一致。

2.3 表达质粒 pDSW2 的构建与鉴定

如图 5 所示构建 pDSW2。在筛选鉴定中间质粒 pDSW1 过程中,共快抽了 8 个克隆, *Eco*RI 酶切鉴定 3 个为重组子。在筛选鉴定 pDSW2-3

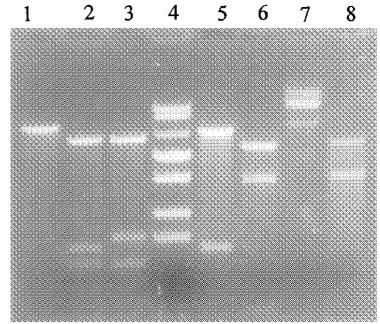


图 3 pJX393 的酶切电泳图谱

Fig. 3 The agarose gel electrophoresis of pJX393
1. *Eco*RI (7632bp); 2. *Bgl*II - *Eco*RV (155bp + 785bp + 992bp + 6600bp); 3. *Bgl*II (785bp + 1147bp + 6600bp); 4. Marker; 5. *Sma*I - *Eco*RI (971bp + 6661bp); 6. *Cla*I (64bp + 2934bp + 4634bp); 7. pJX393; 8. *Bam*HI - *Eco*RI (2665bp + 4967bp).

1	GAGTCTCTTT	CAGCGCCGCA	ATCGCCAGCG	<i>Bgl</i> II GGGCGCTGTT	<i>Pvu</i> II AACCAGCTGC
51	TGAGCCAGTT	CGCGGGCGTT	ATCCATCAGT	TCCGCCTGGC	TAACCACGCG
101	GTTGACTATC	CCCCAACGCA	GCGCCTCTTC	TGCGCCGATT	CGTCTGCCGG
151	TCATCACCAT	TTCATTGACG	ATGGCAGGCG	GCAGGATCTT	CGGCAGACGC
201	AGCACACCGC	CGCTGTCAGG	AACGATGCC	AGTTTGGCTT	CCGGCAGGGC
251	GAAGCTGGCG	TTATCGGCAC	AAACAATAAA	ATCTGCCGCC	AGCGCCAGTT
301	CAAAGCCGCC	GCCAAAGGCA	TAGCCGTTCA	<i>Pvu</i> II CAGCTGCGAT	AACCGGTTTG
351	TCGAGATTGA	AAATTTCCGT	TAATCCCGCA	<i>Ava</i> II AAACCACCCG	GACCAAAGTC
401	AGCATCCGGT	GCTTCGCCTT	CTGCTGCCGC	<i>Dra</i> I TTTTAAATCC	CAGCCC GCCG
451	AAAAGAACTT	CTCTCGCGCA	CCGGTAATAA	TGGCGACACG	TAATTGCGGA
501	TCGTACCGGA	AATTTAGAAA	TACTTCGCC	ATTTCAAAGC	TGGTTTTTGC
551	ATCAATAGCA	TTCGCTTTTG	GACGATCAAG	GGTAATTTCA	GAATTGATCC
601	ATTGCGGGTC	AGATGTAATG	ATTCAC TTAT	TCCTTTTCT	

图 4 pJX393 部分外源 DNA 片段的测序结果

Fig. 4 Partial sequence of object DNA fragment in pJX393

中,共快抽了 12 个克隆, *Bgl*I 酶切鉴定 4 个为重组子,电泳图谱如图 6 所示。

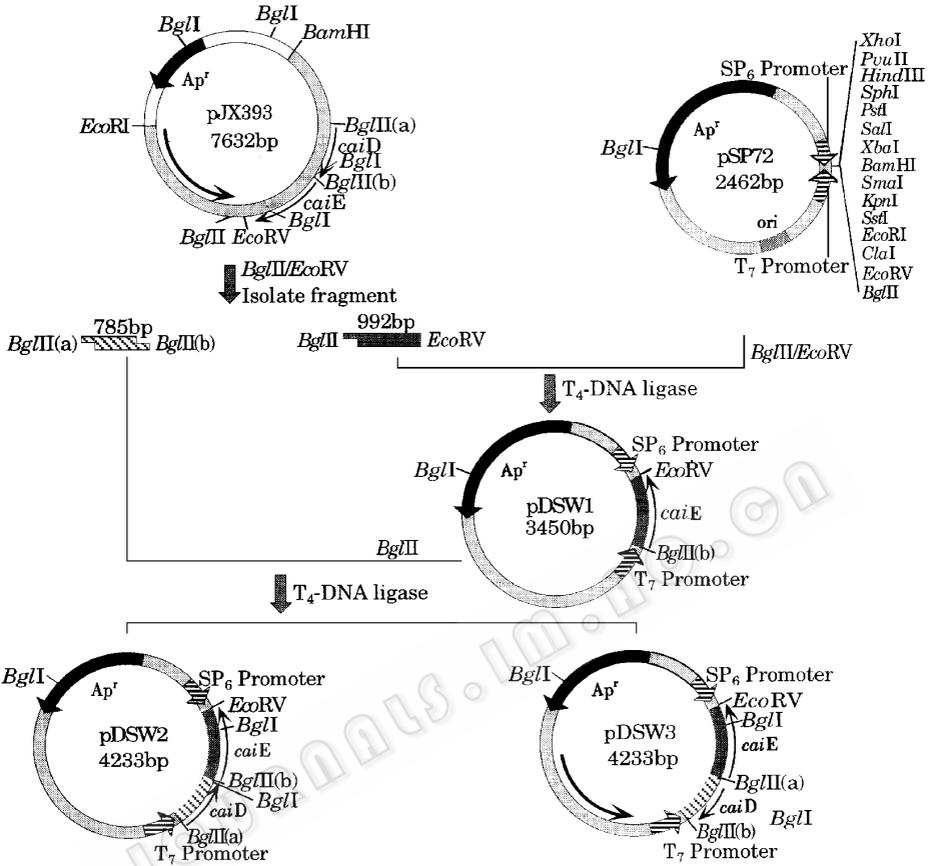


图 5 pDSW2 的构建路线

Fig. 5 Construction of pDSW2



图 6 质粒 pDSW2 的电泳图谱

Fig. 6 The agarose gel electrophoresis of plasmid pDSW2

- 1. pDSW2 ; 2. *Bgl*I - *EcoRV*(785bp + 992bp + 2465bp) ; 3. *Bgl*I (785bp + 3448bp) ;
- 4. Marker ; 5. *Bgl*I (715bp + 1519bp + 1999bp) ; 6. *EcoRI*(4233bp).

2.4 *cai*DE 在 BL21(DE3) 中的诱导表达

从平板上挑取含 pDSW2 的 BL21(DE3)菌体于 LB 液体培养基, 37°C 170rpm 培养 12h。再 1% 接二级种, 培养至 A_{600} 为 0.6 左右, 取样, 对剩余培养物进行诱导, 加

IPTG 至终浓度为 1mmol/L。分别在诱导后 0.5h、1h、2h 和 3h 取样。离心后将沉淀重悬于 $1 \times$ loading Buffer, 以含质粒 pSP72 的 BL21(DE3) 和不含质粒的 BL21(DE3) 悬液为对照, 进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。重组质粒 pDSW2 在 30kD 和 24kD 处有明显的蛋白表达, 而这与 *CaiD* 和 *CaiE* 的分子量(32kD 和 22kD) 基本吻合。其中 *CaiD*、*CaiE* 的表达量分别约为总蛋白的 50% 和 10%。

3 讨论

含 pDSW2 质粒的 *E. coli* BL21(DE3) 株的蛋白表达条带在 30kD 和 24kD 处各有一明显蛋白条带, 前者表达量约为后者的 4~5 倍, 这可能是由于 *caiE* 的翻译起始位点 GUG 不如 *caiD* 的 AUG 翻译起始效率高。另外 *caiD* 和 *caiE* 两者的 SD 序列不同, 也会导致两者蛋白的表达水平相差较大。

目前, 将基因工程技术应用于 L-肉碱生产的研究开发报道并不多见。通过基因重组技术获得高效表达 L-肉碱生产所需酶的微生物菌株, 极有可能成为未来几年内 L-肉碱开发生产研究的热点。而大肠杆菌中控制肉碱代谢的 *cai*TABCDE 操纵子就是一个很好的突破口, 构建基因工程菌使其中一些相关酶大量表达, 用来转化一些低成本的底物, 将会为 L-肉碱的工业化生产开创一条崭新的道路。本实验已克隆到了大肠杆菌中 *caiD* 及 *caiE* 基因, 对受体菌 BL21(DE3) 所表达的肉碱消旋酶活性的检测工作也正在进行之中。

参 考 文 献

- [1] 杨 能, 张惟杰. 生物物理与生物化学进展, 1992, 19(2): 81~85.
- [2] 孙志浩, 王 雷. 食品与发酵工业, 1996, 22(4): 64~68.
- [3] Kleber H P. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, 147(1): 1~9.
- [4] Eichler K, Bourgis E, Buchet A, et al. *Mol Microbiol*, 1994, 13(5): 775~786.
- [5] Eichler K, Schunck W H, Kleber H P, et al. *J Bacteriol*, 1994, 176(10): 2970~2975.
- [6] J. 萨姆布鲁克 E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著(金冬雁, 黎孟枫译), 分子克隆实验指南, 第二版. 北京: 科学出版社, 1993. 831.

CLONING AND EXPRESSION OF *caiDE* GENES IN *E. COLI* BL21(DE3)

Jiang Jianxiong Duan Shiwei Zhang Huizhan

(State Key laboratory of Bio-reactor and Engineering, ECUST, Shanghai 200237)

Abstract: The *caiDE* genes for carnitine racemase and its relative factor were cloned into pUC18 from the chromosomal DNA of *E. coli* MC4100 by shot-gun approach and have been verified by sequence analysis. The target plasmid was named as pJX393 and subcloned to form a transcription plasmid pDSW2. After its transformation into BL21(DE3) strain and induction by IPTG, the recombinant strain containing pDSW2 expressed two apparent protein bands on SDS-PAGE, whose molecular weight were 30kD and 24kD individually.

Key words: *caiDE*, Gene expression, *E. coli* MC4100, *E. coli* BL21(DE3)