

细菌血红蛋白基因在产 D-阿拉伯糖醇酵母菌中的克隆与表达

贺 鵬 卢大军 王钦宏 沈 安 江 宁*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要:构建了含透明颤菌血红蛋白基因 *vgb* 和甲醛抗性基因 *SFA1* 的重组质粒 pVgb-EX2, 转化到产 D-阿拉伯糖醇的酵母 *Saccharomyces sp.* X-62 中。转化子细胞中 VHb 的含量比对照菌细胞有显著提高, 表明基因 *vgb* 在酵母细胞中得到表达。转化子发酵的 D-阿拉伯糖醇产量与转化率均有提高。在重复实验中 D-阿拉伯糖醇的产量最多提高了 27.3%。在实验条件下, 似乎 D-阿拉伯糖醇的产量与细胞 VHb 含量有相关性。

关键词: 细菌血红蛋白, D-阿拉伯糖醇, 酵母菌, 基因克隆

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2001) 03-0315-05

D-阿拉伯糖醇是天然五碳多元醇, 分子量为 152.15, 可用作合成神经药物的中间体。但由于多种结构的同分异构体和光学异构体的存在, 使 D-阿拉伯糖醇的化学合成较难。通过对耐高渗酵母葡萄糖代谢的研究, 发现在高渗条件下, 酵母菌可产生多元醇, 而五碳多元醇则以 D-阿拉伯糖醇为主^[1,2]。用¹³C NMR 技术分析发现, 有两条合成 D-阿拉伯糖醇的路线, 其中一条是经过氧化脱羧过程进入磷酸戊糖途径形成核酮糖-5-磷酸, 进一步脱磷、还原产生 D-阿拉伯糖醇^[3]。因此氧气的供应可影响该代谢反应的进行。曾有文献报道, 发酵中增加通气量可提高 D-阿拉伯糖醇的产量^[4,5]。本实验室在进行葡萄糖转化生产 D-阿拉伯糖醇的研究中也发现了类似的现象。当提高转化反应的溶氧时, 反应转化率也相应提高; 反之则葡萄糖的消耗增加。因此, 加强菌体的氧代谢水平会对 D-阿拉伯糖醇生成具有促进作用。

细菌血红蛋白是透明颤菌 (*Vitreoscilla*) 在贫氧环境下诱导产生的原核细胞中的血红蛋白, 结构基因长 438bp, 编码 146 个氨基酸, 分子量 15.8kD, 可与氧气结合形成调节菌体代谢的生物活性物质。国内外均有文献报道在贫氧环境中它对菌体生长、蛋白质及酶合成、抗生素的合成和代谢产物的形成等有促进作用。它可提高菌体氧代谢水平, 以消除低溶氧对菌体的抑制^[6,7]。

本文试图将透明颤菌血红蛋白 VHb 的结构基因 *vgb* 转入产 D-阿拉伯糖醇酿酒酵母 (*Saccharomyces sp.*) X-62 中, 使其在受体菌中表达, 并考察其对增强菌体氧代谢水平、提高 D-阿拉伯糖醇产量的影响。

* 通讯联系人

作者简介: 贺 鵬 (1969-), 男, 湖南邵东人, 中国科学院微生物研究所助理研究员, 主要从事微生物代谢调控与发酵工程研究。

收稿日期: 2000-09-08, **修回日期:** 2000-12-18

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒:见表 1。

表 1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmid

Strains and plasmid	Size/kb	Marker	Source
pBR322-vgb	5.14	amp ^r	From Prof. Yang Shengli
pBluescript IISK(-)	2.96	Amp ^r	From MBI Fermentas
pHPC4	5.79	amp ^r , SFA1	From this lab.
pHPC5	5.81	amp ^r , URA3	From this lab.
<i>E. coli</i> XL1-Blue		SupE44 hsdR17 recA1 gyrA46 thi relA1 lac ⁻ F'[proAB ⁺ lac I ^q lacZΔM15 Tn10(tet ^r)]	From this lab.
<i>Saccharomyces</i> sp. X-62		Formaldehyde sensitive	From this lab.

1.1.2 工具酶:购自 Promega 公司,华美生物工程公司,上海生工生物技术有限公司。

1.1.3 PCR 扩增引物:根据文献[8]报道的细菌血红蛋白结构基因 vgb 的核苷酸序列设计引物,由上海生工生物技术有限公司合成。5'端引物为:AAAGGATCCGAC-CCTCATGTTAGACCAG,3'端引物为:AAACTCGAGAAAAGACCACCTTATGGTGC。分别在 5'端和 3'端引物中加入了 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点。

1.1.4 培养基:LB 培养基, YEPD 培养基和发酵培养基(每升含:glucose 300g, yeast extract 3g, peptone 5g, pH 调至 5.1~5.4)。

1.2 实验方法

1.2.1 VHb 基因在大肠杆菌中的克隆:按 *Pfu* DNA 聚合酶反应条件操作,以质粒 pBR322-vgb 为模板进行反应。反应参数:94℃, 2min; 94℃, 30s, 55℃, 30s, 70℃, 1min, 30cycles; 70℃, 10min。PCR 产物及质粒 pBluescript IISK(-)经 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切后,分别回收所需片段,连接后转化 XL1-Blue,经蓝白斑筛选阳性克隆,酶切鉴定转化子质粒,获得重组子 pSK-Vgb,分别以 T3 和 T7 引物对插入片段测序。质粒构建过程如图 1 所示。

1.2.2 VHb 基因在酵母菌中的克隆与表达:经测序证实的质粒 pSK-Vgb 及质粒 pHPC5 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切后,分别回收所需片段,连接后转化 XL1-Blue,酶切鉴定转化子质粒,得重组子 pVgb-EX1。质粒 pVgb-EX1 及质粒 pHPC4 经 *Sac* I 和 *Kpn* I 酶切后,分别回收所需片段,连接后转化 XL1-Blue,经蓝白斑筛选阳性克隆,酶切鉴定转化子质粒,得甲醛抗性(SFA1)标记重组子 pVgb-EX2。

依据文献[9]的方法将重组质粒 pVgb-EX2 转入受体菌 *Saccharomyces* sp. X-62 中,用含甲醛的 YEPD 平皿筛选转化子。少量提取转化子 DNA 作为 PCR 模板,用 vgb 扩增引物进行 PCR,电泳检测反应产物是否与 vgb 扩增片段相符。

1.2.3 测定方法:细菌血红蛋白含量的测定参照文献[10]的方法进行。残糖的测定参照文献[11]的方法进行。甘油和 D-阿拉伯糖醇含量用 HPLC 测定(色谱柱:Bio-Rad Aminex HPX-87H;柱温 45℃;流动相:8mmol/L 硫酸;流速:0.5mL/min;检测器:RI @ 8X)测定。

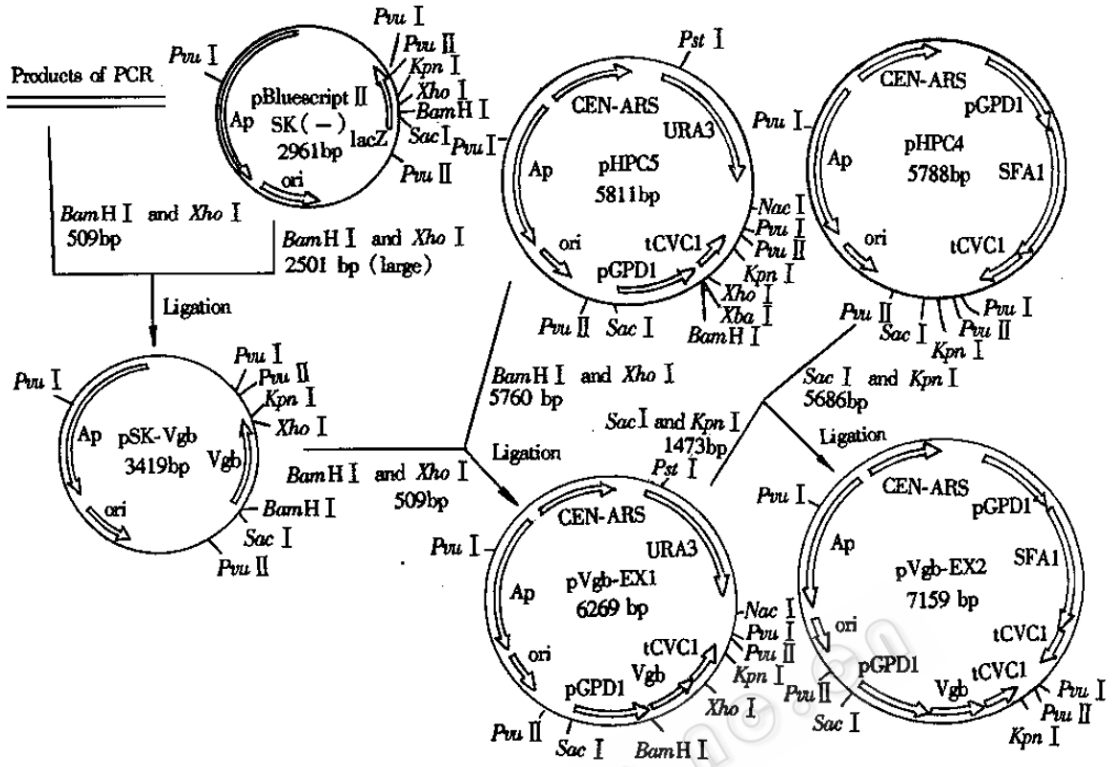


图 1 质粒的构建过程
Fig.1 Construction of plasmids

2 结果和讨论

2.1 PCR 产物与质粒 pSK-Vgb 的鉴定

将 PCR 产物进行电泳,显示在 0.5kb 附近存在特异的单一 DNA 带,结果如图 2 所示。用 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切大肠杆菌重组质粒 pSK-Vgb,也可得到 0.5kb 的插入片段。对插入片段进行序列测定,结果见图 3。

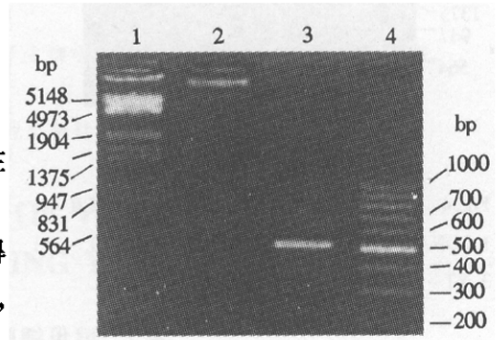


图 2 PCR 产物的鉴定

Fig.2 Identification of PCR products
1. λ DNA/*Eco*R I + *Hind*III marker; 2. pBR322-vgb; 3. PCR products of vgh; 4. 100bp ladder marker.

2.2 重组质粒 pVgb-EX1 和 pVgb-EX2 的鉴定

将重组质粒 pVgb-EX1 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切后,可得到 0.5kb 的插入片段 (*vgb* 结构基因)。用 *Sac* I 和 *Kpn* I 酶切重组质粒 pVgb-EX2 后,可获得 1.47kb 的插入片段,该片段含 *vgb* 结构基因及其它表达元件。

2.3 酵母转化子的 PCR 验证

如图 4 所示,以转化子 YT-1, YT-2, YT-3, YT-4 的 DNA 为模板进行 PCR 反应可得到单一的 0.5kb 片段,证实转化子中带有表达重组质粒 pVgb-EX2。

2.4 Vhb 表达产物的检测

在 YEPD 培养基中培养转化子和对照菌,培养条件为 30℃、220r/min 摇床。收集细胞

```

1 GGATCCGACC CTCATGTTAG ATCAGCAAAC CATTAAACATC ATCAAAGCCA CTGTTCTGT ATTGAAGGAG CATGGCGTTA
1 GGATCCGACC CTCATGTTAG ACAGCAAAC CATTAAACATC ATCAAAGCCA CTGTTCTGT ATTGAAGGAG CATGGCGTTA

81 CCATTACCAC GACTTTTTAT AAAAAGTTGT TTGCCAAACA CCTGAAGTA CGTCTTTGT TTGATATGG TCGCCAAGAA
81 CCATTACCAC GACTTTTTAT AAAAAGTTGT TTGCCAAACA CCTGAAGTA CGTCTTTGT TTGATATGG TCGCCAAGAA

161 TCTTTGGAGC AGCCTAAGGC TTTGGCGATG ACGGTATTTG CGGCAGCGCA AACATTGAA AATTTGCCAG CTATTTTGCC
161 TCTTTGGAGC AGCCTAAGGC CCTGAAGTA CGTCTTTGT TTGATATGG TCGCCAAGAA TCTTTGGAGC AGCCTAAGGC

241 TGGGTCAAAA AAAATTGCAG TCAAACATTG TCAAGCAGGC GTGGCAGCAG CGCATTATCC GATTGTCGGT CAAGAATTGT
241 TGGGTCAAAA AAAATTGCAG TCAAACATTG TCAAGCAGGC GTGGCAGCAG CGCATTATCC GATTGTCGGT CAAGAATTGT

321 TGGGTGCGAT TAAAGAAGTA TTGGGCGATG CCGCAACCGA TGACATTTTG GACGCGTGGG GCAAGGCTTA TGGCGTGATT
321 TGGGTGCGAT TAAAGAAGTA TTGGGCGATG CCGCAACCGA TGACATTTTG GACGCGTGGG GCAAGGCTTA TGGCGTGATT

401 GCAGATGTGT TTATTCAAGT GGAAGCAGAT TTGTACGCTC AAGCGGTGTA ATAAAGTTTC AGGCCGCTTT CAGGACATAA
401 GCAGATGTGT TTATTCAAGT GGAAGCAGAT TTGTACGCTC AAGCGGTGTA ATAAAGTTTC AGGCCGCTTT CAGGACATAA

481 AAAACGCACC ATAAGGTGGT CTTTTCTCGA G — PCR products
481 AAAACGCACC ATAAGGTGGT CTTTTCTCGA G — template

```

图3 PCR产物与模板DNA序列对照

Fig.3 Nucleotide sequence of PCR products and template DNA

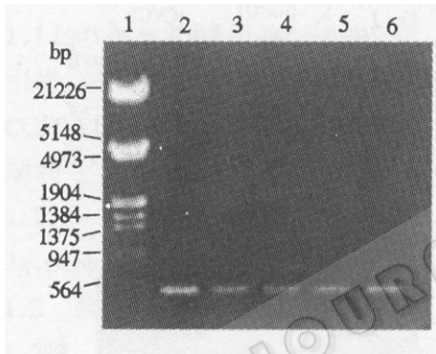


图4 转化子的PCR验证

Fig.4 Identification of transformants with PCR

1. λ DNA/*Eco*R I + *Hind* III marker; 2. YT - 1; 3. YT - 2; 4. YT - 3; 5. YT - 4; 6. pVgb-EX2.

后测定 Vhb 的含量,结果如表 2 所示。实验结果表明,转化子细胞中 Vhb 的含量比对照菌细胞有显著提高,这表明 Vhb 在酿酒酵母 X-62 中已得到表达,表达量不高可能的原因是:(1)表达 *vgb* 的载体是酵母 YCp 类的质粒,该质粒在细胞中的拷贝数很低,致使外源基因表达水平不高;(2)细胞培养的条件可能无法最大限度的发挥启动子启动转录的能力,导致外源基因无法高效表达;(3)*vgb* 结构基因中所用密码子与酵母菌细胞中密码子的使用频率可能存在差异,如果使用了低频率的密码子,将导致翻译水平下降,使蛋白产量降低。

表2 酵母细胞中细菌血红蛋白含量的测定

Table 2 Amount of heme in yeast cells

Strains	X-62	X-62/pHPC4	YT-1	YT-2	YT-3	YT-4
Amt of heme/(nmol/g)	3.60	4.04	14.38	14.38	17.08	10.79

2.5 Vhb 对转化子发酵葡萄糖产 D-阿拉伯糖醇的影响

以发酵培养基培养转化子和对照菌,培养条件为 30℃、220r/min 摇床。用 HPLC 测定发酵液上清中各组分的含量。测定结果如表 3 所示。对照菌发酵液中 D-阿拉伯糖醇含量分别为 54.1g/L 和 54.8g/L,而转化子的 D-阿拉伯糖醇产量均高于对照菌,最高可达到 62.4g/L,比对照菌提高了 13.9%。转化子的 D-阿拉伯糖醇转化率最高可达 22.51%,比对照菌提高了 14.5%,发酵液中甘油的产量略有增加。重复实验中,转化子的 D-阿拉伯糖醇产量均高于对照菌,其中 YT-3 的提高幅度最大,在第三批实验中最多提高了 27.3%。

表 3 发酵液中残糖、D-阿拉伯糖醇、甘油的含量及 D-阿拉伯糖醇的转化率

Table 3 Concentration of residue sugar, D-arabitol, glycerol in liquor and conversion of D-arabitol

Strains	Residue sugar	D-arabitol	Glycerol	Yield
	I/(g/L)	I/(g/L)	I/(g/L)	%
X-62	17.4	54.1	14.5	19.14
X-62/pHPC4	21.2	54.8	14.7	19.66
YT-1	23.5	60.4	17.6	21.84
YT-2	23.1	60.1	17.9	21.70
YT-3	22.8	62.4	18.2	22.51
YT-4	30.9	57.0	17.0	21.18

同一株菌的多次实验结果平均后,发现转化子比对照菌 D-阿拉伯糖醇产量的提高比率与 VHb 的表达量之间存在一定的联系。VHb 的表达达到一定量后, D-阿拉伯糖醇的产量与 VHb 的表达量具有相关性,随 VHb 含量的提高, D-阿拉伯糖醇的产量也成比例提高。从以上结果来看, VHb 的表达对菌体产生 D-阿拉伯糖醇的代谢存在影响,有利于 D-阿拉伯糖醇的合成。

参 考 文 献

- [1] Brown A D. *Advances in Microbial Physiology*, 1978, **17**:181 ~ 242.
- [2] Brown A D, Simpson J R. *J Gen Microbiol*, 1972, **72**:589 ~ 591.
- [3] Jovall P-A, Tunblad-Johansson I, Adler L. *Arch Microbiol*, 1990, **154**:209 ~ 214.
- [4] Peterson W H, Hendersho W F, Halay C J. *Appl Microbiol*, 1958, **6**:349 ~ 357.
- [5] Spencer J F T. Production of polyhydric alcohols by yeasts. In: Hockenull. *Progress in industrial microbiology*, 7, London; Churchill Ltd, 1968. 1 ~ 42.
- [6] 郭宏秋, 杨胜利. 微生物学通报, 1996, **23**:227 ~ 230.
- [7] Enayati N, Tari C, Parulekar S J, et al. *Biotechnol Prog*, 1999, **15**:640 ~ 645.
- [8] Khosla C, Bailey J E. *Mol Gen Genet*, 1988, **214**:158 ~ 161.
- [9] F. 奥斯伯, R. 布伦特, R. E. 金斯顿, 等(颜子颖等译). 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999.
- [10] Lamba P, Webster D A. *J Bacteriol*, 1980, **142**:169 ~ 173.
- [11] B. 施特尔特马赫著(钱嘉渊译). 酶的测定方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1992.

CLONING AND EXPRESSION OF VHb GENE IN D-ARABITOL PRODUCING YEAST

He Peng Lu Dajun Wang QinHong Shen An Jiang Ning

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: Recombinant plasmid pVgb-EX2 containing *Vitreoscilla* hemoglobin gene vgb and formaldehyde resistant gene SFA1 was constructed and transformed into D-arabitol producing yeast strain *Saccharomyces* sp. X-62. The fact that the amount of VHb in transformant cells was considerably higher than that in control cells indicated that gene vgb was expressed in transformant cells. D-arabitol productivity and yield of fermentation by transformants were improved. The most improvement of D-arabitol productivity in repeat experiments reached 27.3%. It appeared that the fermentation productivity of D-arabitol was relative to the amount of VHb in cells under experimental conditions.

Key words: Bacterial hemoglobin, D-arabitol, Yeast, Molecular cloning