

透明颤菌血红蛋白基因在产 PHB 重组大肠杆菌中的引入*

于慧敏¹ 史悦¹ 张延平¹ 杨胜利² 沈忠耀¹

(¹ 清华大学化工系 生物化工研究所 北京 100084)

(² 中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

摘 要:将透明颤菌血红蛋白基因(*vgb*)采用插入染色体的方式引入产聚 β -羟基丁酸酯(PHB)重组大肠杆菌 VG1(pTU14)中,以从分子水平上提高克隆菌对氧的利用率,解决 PHB 发酵生产过程中的供氧矛盾,透明颤菌血红蛋白的一氧化碳差光谱分析表明,*vgb* 基因可以在 VG1(pTU14)中成功表达,且其表达量受溶氧水平的调控。*vgb* 基因的引入可以同时促进菌体生长和 PHB 产品的积累,且溶氧水平越低,PHB 表达量越高,这种促进作用就越明显。

关键词:透明颤菌血红蛋白基因(*vgb*),聚 β -羟基丁酸酯(PHB),溶氧调控

中图分类号:Q753 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 05-0548-05

透明颤菌血红蛋白(*Vitreoscilla Hemoglobin*, VHb)是由革兰氏阴性专性好氧菌——透明颤菌(*Vitreoscilla*)于微氧条件下合成的一种类似于血红蛋白的胞内可溶物质,它能够从分子水平上提高 VHb 的基因克隆菌对氧气的利用率,促进细胞生长和产物合成,从而提高发酵过程中的产物的产量和收率,且不需纯氧、不需氧载体、不需增大通气搅拌的设备费及附加的通入富氧或纯氧的投资^[1-3]。因此,利用 *vgb* 在其它菌种中进行外源表达这一基因策略来解决好氧生物发酵过程中的供氧问题具有很大的科研意义,并可能带来巨大的经济效益。

聚 β -羟基丁酸酯(Poly- β -hydroxybutyrate, PHB)是由微生物合成的一种可降解高分子材料,它具有可生物降解性、生物相容性等许多独特的优点,并可望为解决“白色污染”问题带来希望,但 PHB 的高成本却限制了它的大规模生产和广泛应用^[4]。

通过透明颤菌血红蛋白基因(*vgb*)、 λ 噬菌体裂解基因(*S⁻RRz*)^[5]和 PHB 合成基因(*phbCAB*)这三种外源基因在 *E. coli* JM105 中的同时引入,成功构建可以同时表达 *vgb* 和 *S⁻RRz* 的产 PHB 新菌株 VG1(pTU14)。为更好实现重组菌的高密度发酵和细胞的可控裂解,降低成本,本文进一步对 VG1(pTU14)中 *vgb* 基因的表达与氧调控特性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

透明颤菌血红蛋白基因(*vgb*)整合型宿主 VG1 利用同源基因交换法构建^[6](图 1);携带 λ 噬菌体裂解基因(*S⁻RRz*)及 PHB 合成基因(*phbCAB*)的质粒 pTU14(Ap⁺)由本所构

* 本课题为国家“九五”攻关项目(96-03-03-02);国家自然科学基金重点项目(29834103);国家自然科学基金面上资助项目(29876021)

作者简介:于慧敏(1973-),女,(满族),辽宁省人,清华大学博士研究生,主要从事生物化工研究。

收稿日期:2000-09-12,修回日期:2001-02-12

建^[7];按常规克隆操作,将 pTU14 转入苏氨酸营养缺陷型宿主 VG1 中,即得到三种外源基因同时表达的 PHB 高产多功能重组菌 VG1 (pTU14)。重组菌 JM105(pTU14)则是携带 S^-RRz 及 *phb* CAB,但不携带 *vgb* 的对照菌株。

1.2 培养基

LBG 培养基:酵母浸膏粉 5g/L;蛋白胨 10g/L;氯化钠 10g/L;葡萄糖 20g/L;pH7.0;发酵培养基:每升中含淀粉水解液还原糖 40g,硫酸铵 2.0g,酵母浸膏粉 6.0g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 3.0g, KH_2PO_4 0.8g, NaCl 3.0g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 5mg, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 150mg, Ap 50mg, pH7.0; 121℃, 20min 灭菌。接种前加入 $CaCl_2$ 溶液、 $MgSO_4$ 溶液、氨苄溶液和初始还原糖。

1.3 细胞的收获、诱导裂解与分析方法

培养到稳定期的细胞培养液,以 4000~6000r/min 的转速离心 10min,收集细胞。将收获的细胞重悬于 2mmol EDTA/50 mmol Tris(pH8.0)缓冲液中,220r/min,37℃振荡混合一定时间,即可实现菌体细胞的诱导裂解。

PHB 含量定量测定,采用硫酸降解法^[7];菌体浓度测定采用衡重法^[7];透明颤菌血红蛋白活性测定采用一氧化碳(CO)差光谱法^[8];

摇瓶培养液中溶氧水平的测定,采用如下方法:配制好摇瓶培养基后,以相同装液量分装多个摇瓶,灭菌后再以相同的接种量同时接种相同的种子(留下一个空白摇瓶作为溶氧标定的参照),37℃摇床上进行平行培养。打开发酵罐系统中的溶氧检测控制器,采用无氧水标定零点后,再以摇床上的空白培养基标定 100%;此后在不同的培养时间,即可在线检测得到摇床上不同摇瓶内的溶氧水平。每次检测结果,均为三个平行样的平均值。溶氧水平测定后,摇瓶内的菌液即用于菌体浓度和透明颤菌血红蛋白表达量的分析。

2 结果和讨论

2.1 *vgb*, S^-RRz 及 *phb* CAB 基因在 VG1 (pTU14) 中的同时表达

对重组菌 VG1(pTU14)和对照菌株 JM105(pTU14)在相同的培养条件下进行平行培养,20 h 后收获细胞,离心后分别分成两份,一份重悬于 EDTA/Tris(pH8.0)缓冲液进行诱导裂解处理,并对处理前后的细胞分别进行超薄切片电镜照相,考察 S^-RRz 和 *phb* CAB 基因的表达效果;另一份则进行冻融处理,并以过量的连二亚硫酸钠还原后进行透明颤菌血红蛋白的一氧化碳(CO)差光谱法分析(图 2)。电镜分析结果表明,缓冲液处理前的 VG1 (pTU14)和 JM105(pTU14)细胞内积累了大量的白色 PHB 颗粒,处理后的细胞则基本完全裂解,白色的 PHB 颗粒从胞内释放出来,说明由质粒 pTU14 携带的 S^-RRz 基因和 *phb* CAB 基因在 VG1 (pTU14)和 JM105(pTU14)中均可以成功表达^[7,9]。两株重组菌的一氧化碳(CO)差光谱法分析结果则表明,VG1 (pTU14)的菌悬液在 419nm 处呈现出明显的 VHb 特征吸收峰,而不含 *vgb* 基因的对照菌株 JM105(pTU14)则不具备这一光谱特征,说明 *vgb* 基因在 VG1 (pTU14)中也能够获得成功表达。

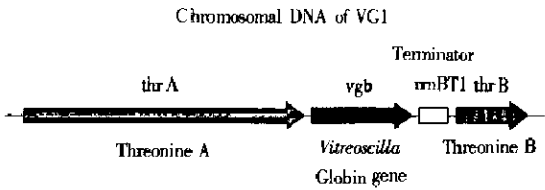


图 1 透明颤菌血红蛋白基因整合型宿主 VG1 染色体 DNA 的示意图

Fig.1 Schematic presentation of the chromosomoe DNA of *vgb*-integrated host VG1

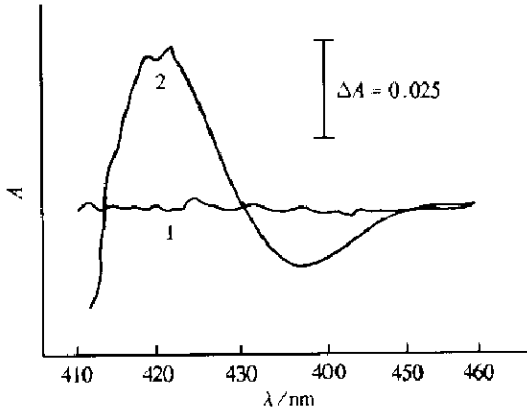


图2 两种不同菌株的CO差光谱

Fig.2 Comparison of the CO-difference spectrum of VG1 (pTU14) and JM105(pTU14)

1. JM105(pTU14); 2. VG1(pTU14).

2.2 不同培养条件下 *vgb* 基因的表达水平

对 VG1 (pTU14) 和 JM105 (pTU14) 进行摇瓶培养,并控制较高和较低两种不同的溶氧条件:高溶氧条件为在 250mL 摇瓶中加入 50mL 培养基,并于 250r/min,37℃ 摇床上培养;低溶氧条件则为在 250mL 摇瓶中加入 150mL 培养基,100r/min,37℃ 培养。分别收获这两种条件下过夜培养的细胞,进行 VHb 的 CO 差光谱分析。结果表明,在两种不同的溶氧条件下,VHb 在 VG1 (pTU14) 中均能成功表达,在 JM105(pTU14) 中则没有表达;在低溶氧条件下,VHb 在 VG1 (pTU14) 中的表达量约为 13.7nmol/g 湿菌,是高溶氧条件下的 1.8 倍。此外,相对于高溶氧条件,VG1 (pTU14) 和 JM105(pTU14) 在低氧条件下的生长均受到了

一定程度的抑制,其菌液的 OD_{600} 值分别从 48.0 和 39.2 下降到了 4.9 和 2.4。但由于 *vgb* 基因的成功表达使重组菌 VG1 (pTU14) 比 JM105 (pTU14) 具有更强的贫氧耐受能力,因此贫氧条件对 JM105 (pTU14) 的影响更显著,它在低氧条件下的 OD_{600} 值下降到高氧条件下的 1/16,而 VG1 (pTU14) 仅下降到 1/10。

前人的研究表明,透明颤菌血红蛋白基因的启动子为内启动子,其表达受溶氧水平 (DO) 调控。仅当 DO 低于 20% ~ 5% 时,透明颤菌血红蛋白 (VHb) 才开始大量表达,且单位湿菌重的 VHb 表达量是高氧条件下的 10 ~ 50 倍^[10]。对于新建重组菌 VG1 (pTU14),为了进一步研究 DO 水平对外源 *vgb* 基因表达的调控作用,在 37℃ 摇床上对其进行摇瓶培养,采用 1.3 节所述方法测定培养液中的溶氧水平,同时采用 CO 差光谱法测定 VHb 的表达量,考察 DO 水平与 VHb 表达间的对应关系,结果如图 3 和图 4 所示。

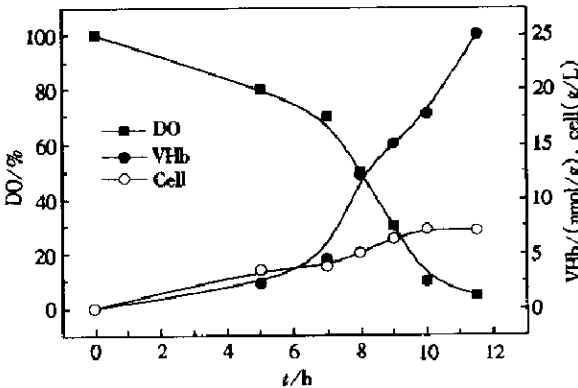


图3 不同溶氧水平 VHb 下的表达

Fig.3 Expression of VHb under different DO level

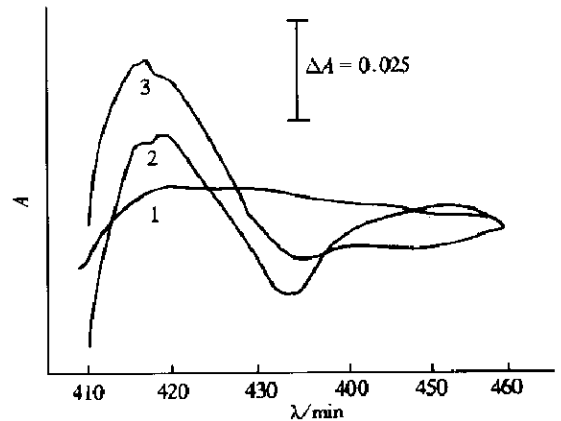


图4 不同溶氧水平下 VG1 (pTU14) 的 CO 差光谱

Fig.4 CO difference spectra of VG1 (pTU14) cells under different DO level (1,80% ;2,50% ;3,30%)

由图 3 可见,随着培养过程的进行,菌体浓度不断增大,培养液中的 DO 水平不断下降,但检测到的单位湿菌中的 VHb 表达量却不断增大;且 DO 越低,VHb 的表达量越高。当发酵液中溶解氧丰富,DO 高于 80% 时,VHb 的表达量很低,只有 2.3nmol/g 湿菌;但当 DO 低于约 50% 后,VHb 的表达量就迅速增大;当 DO 下降到 5% 以下时,VHb 的表达量高达 25.1nmol/g 湿菌,是 80% DO 下 VHb 表达量的 10.9 倍。上述结果与文献报导的结果具有一定的相似性,即 VHb 的表达量随 DO 水平的降低而增大;但同时也有一定的区别,主要表现在当 DO 较高时(如 50%),VG1(pTU14)细胞中的 VHb 就已经有较大量的表达。图 4 给出了 DO 水平分别为 80%、50% 和 30% 时收获的 VG1(pTU14)细胞的 CO 差光谱谱图。

2.3 *vgb* 基因的成功表达对 VG1(pTU14)菌体生长和 PHB 积累的影响

在相同的培养条件下,对 VG1(pTU14)和 JM105(pTU14)在 3.7L 发酵罐中进行分批对比培养,并控制溶氧在 50% 以上,检测发酵液中的菌体浓度和 PHB 浓度随时间的变化,结果如图 5 所示。由图可见,VG1(pTU14)的菌体浓度和 PHB 浓度均高于 JM105(pTU14),发酵结束时前者的菌干重是后者的 1.35 倍,而 PHB 产品浓度则是后者的 1.84 倍。

同样控制相同的培养条件,但溶氧保持在 50% 以下,5% 以上,VG1(pTU14)和 JM105(pTU14)的对比培养结果如图 6 所示:发酵结束时前者的菌干重达到了后者的 3.37 倍,而 PHB 产品浓度则达到了后者的 4.2 倍。上述结果说明,不论在何种溶氧水平下,*vgb* 基因的引入都对菌体生长和 PHB 积累具有较强的促进作用,但在较低的溶氧水平下,即 VHb 的表达量较高时,这种促进作用更为明显。

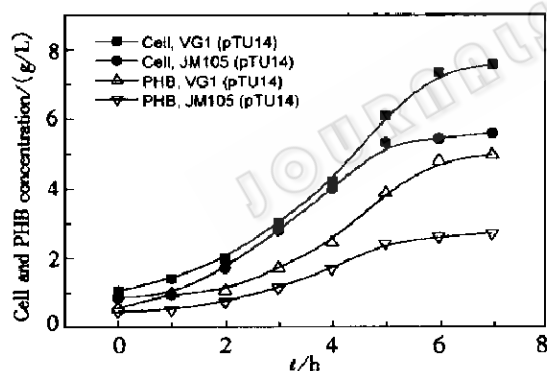


图 5 DO 高于 50% 时 *vgb* 基因引入对菌体生长和 PHB 积累的影响

Fig.5 Effects of *vgb* introduction to the cell growth and PHB accumulation when DO higher than 50%

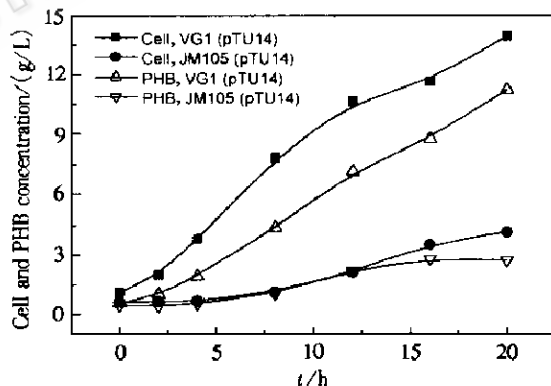


图 6 DO 低于 50% 时 *vgb* 基因引入对菌体生长和 PHB 积累的影响

Fig.6 Effects of *vgb* introduction to the cell growth and PHB accumulation when DO lower than 50%

此外,由图 5、图 6 的比较还可发现,当溶氧控制在 5% ~ 50% 之间,即 VHb 大量表达时,VG1(pTU14)的菌体浓度和 PHB 浓度分别达到了 13.92g/L 和 11.22g/L,而当溶氧一直控制在 50% 以上,即 VHb 表达较少时,菌体浓度和 PHB 浓度分别为 7.56g/L 和 4.96g/L,仅约为前者的 1/2;JM105(pTU14)的培养结果则恰好相反,当溶氧高于 50% 时,其菌体浓度和 PHB 浓度分别为 5.58g/L 和 2.69g/L,优于低溶氧(5% ~ 50%)条件下的结果(4.13g/L 和 2.68g/L)。这进一步证实,携带 *vgb* 的 VG1(pTU14)细胞具有较强的低溶氧耐受能力,它在

贫氧条件下仍能保持较高的细胞活性,合成较大量的 PHB 产品。

综上所述,透明颤菌血红蛋白基因可以在同时携带 *vgb*、 $S^{-}RRz$ 和 *phbCAB* 的重组大肠杆菌 VG1(pTU14)中成功表达,且其表达量受溶氧水平的影响。*vgb* 基因的引入可以同时促进的菌体生长和 PHB 产品的积累,且溶氧水平越低,VHb 表达量越大,这种促进作用就越明显。总之,在三基因重组大肠杆菌 VG1(pTU14)中,*vgb* 基因的成功表达将为解决 PHB 发酵过程中的氧气供求矛盾及实现高密度培养提供良好途径。

参 考 文 献

- [1] Khosla C, Bailey J E. *J Bacteriol*, 1989, **171**:5995 ~ 6004.
- [2] 于慧敏,沈忠耀.微生物学报,1999**39**(5):478 ~ 482.
- [3] 文 莹,李季伦.微生物学报,2000, **40**(1):50 ~ 56.
- [4] Lee S Y. *Biotechnol Bioeng*, 1995, **49**:1 ~ 14.
- [5] Garrett J, Fusselman R, Hise J, et al. *Mol Gen Genet*, 1981, **182**:326 ~ 331.
- [6] 吴 奕,杨胜利.生物工程学报,1996, **12**(3):276 ~ 283.
- [7] Yu H M, Yin J, Li H Q, et al. *J Biosci Bioeng*, 2000, **89**:307 ~ 311.
- [8] Webster D A, Liu C Y. *J Biol Chem*, 1974, **249**(13):4257 ~ 4260.
- [9] 于慧敏,尹 进,李红旗,等.微生物学报,2000, **40**(3):284 ~ 289.
- [10] Joshi M, Dikshit K L. *Biochem Biophys Comm*, 1994, **202**(1):535 ~ 542.

INTRODUCTION OF *VITREOSCILLA* HEMOGLOBIN GENE IN A RECOMBINANT *E. COLI* FOR PHB PRODUCTION

Yu Huimin¹ Shi Yue¹ Zhang Yanping¹ Yang Shengli² Shen Zhongyao¹

(¹ Department of Chemical Engineering, Institute of Biochemical Engineering Tsinghua University, Beijing 100084, China)

(² Shanghai Research Center of Biotechnology, Academic Sinica, Shanghai, 200233, China)

Abstract: *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*) was introduced into the recombinant *Escherichia coli* VG1(pTU14) for production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB), in order to enhance the oxygen uptake of strain from molecular level and to solve the problem of oxygen limitation in process of fermentation. The carbon monoxide difference spectra analysis of *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) showed that *vgb* could be successfully expressed in VG1 (pTU14), and this expression was under the regulation of dissolved oxygen (DO). The higher amounts of VHb could be got correspond to the lower level of DO. Because of the introduction of *vgb*, cell growth and PHB accumulation of VG1 (pTU14) were all strongly promoted during the process of batch culture.

Key words: *Vitreoscilla* hemoglobin gene, Poly- β -hydroxybutyrate, Dissolved oxygen regulation