

钝齿棒杆菌天冬氨酸激酶基因的克隆和序列分析*

刘阳剑 张英姿 王 绛 王 宇 余志华 丁久元**

(中国科学院微生物研究所微生物生物技术中心 北京 100080)

摘 要 运用 PCR 方法,从野生型钝齿棒杆菌株(*Corynebacterium crenatum*)AS1.542 及具有 AEC 抗性的突变株 CD945 染色体上分别扩增出天冬氨酸激酶(AK)基因(*ask*),构建了重组质粒。核苷酸序列分析表明,*C. crenatum* AS1.542AK 基因与 *C. crenatum* CD945 相比,第 1199 位的碱基由 T 变为 C,引起酶蛋白 β 亚基第 80 位氨基酸从亮氨酸变成脯氨酸。该氨基酸的突变在蛋白结构上位于 ACT 结构域内,该区受赖氨酸调控。*C. crenatum* AS1.542 的 AK 基因的编码区核苷酸序列与 *C. glutamicum*、*C. flavum* 及 *B. lactofermentum* 相比,同源性分别为 97.23%、97.55% 和 97.62%。酶蛋白氨基酸序列的同源性分别为 99.76%、99.52% 和 99.76%。但在 AK 基因的启动子上游序列部分与其它棒杆菌相比有较大差异。

关键词 棒杆菌,天冬氨酸激酶,赖氨酸,AEC 抗性

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2002)04-0395-05

天冬氨酸激酶(Aspartokinase EC 2.7.2.4,简称 AK,又称 LysC),是天冬氨酸族氨基酸生物合成途径中的关键酶,由两个 α 亚基和两个 β 亚基组成($\alpha_2\beta_2$)^[1,2],其活性受该途径末端产物赖氨酸和苏氨酸的协同反馈抑制^[3]。赖氨酸的结构类似物 S-(α -氨基)-D,L-半胱氨酸(AEC)在反馈抑制作用中可以替代赖氨酸。因此,在赖氨酸产生菌的分子育种研究中,广泛采用的手段之一就是筛选抗 AEC 的突变株^[4,5],突变株的天冬氨酸激酶可以抗反馈调节,因而产物得以积累。棒杆菌是氨基酸生产上使用的最重要的菌种。国外对谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*),乳糖发酵短杆菌(*Brevibacterium lactofermentum*),黄色棒杆菌(*C. flavum*)等菌株的天冬氨酸激酶的研究已有报道^[1,6,7]。钝齿棒杆菌(*C. crenatum*)是我国研究者分离到的一种钝齿状、无芽孢的革兰氏阳性菌^[8],其突变株在国内氨基酸生产中广泛应用,但对其突变机制的研究还是空白。本文首次报道了钝齿棒杆菌天冬氨酸激酶的基因序列,并对 AEC 抗性菌株的突变机理进行了分析。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

所用的菌株和质粒见表 1。

1.2 培养基和培养条件

LB 培养基^[9]用于培养细菌,大肠杆菌在 37℃ 培养,钝齿棒杆菌在 30℃ 培养。

* 本课题得到中国科学院重点项目的资助

作者简介:刘阳剑(1976-)男,广西柳州人,中国科学院微生物研究所 98 级硕士研究生。

** 通讯作者 电话 010-62554588, E-mail: zlingjy@sun.im.ac.cn

收稿日期:2001-08-31,修回日期:2001-11-01

1.3 DNA 操作

大肠杆菌 DNA 操作参照文献 [9] 棒杆菌 DNA 操作参照文献 [7]。

1.4 基因扩增

1.4.1 PCR 引物 根据序列同源性,参考已报道的 *C. glutamicum* 天冬氨酸激酶基因序列 (Accession X57226),设计出以下特异引物

上游引物 5' ACCGGATCCACCTGTCACCTTTGTCTC3' ;

*Bam*H I

下游引物 5' CCTGGTCACCATTGTAAAACTACTCT3'。

*Bst*E II

表 1 菌株和质粒

Table 1 The bacteria and plasmids used in this work

Strain/Plasmid	Characteristics	Source
<i>E. coli</i>		
DH5 α	ϕ 80 <i>lacZ</i> ΔM15	Stored in this lab
<i>Corynebacteria</i>		
<i>Corynebacterium crenatum</i> 1.542	wild type	Stored in this lab
<i>Corynebacterium crenatum</i> CD945	AEC ^r ,hom ⁻	Stored in this lab
Plasmid		
Plasmid pMD18	T-vector 2.7kb ,Amp ^r ,lacZ	Purchased from Takara Co.
Plasmid pLY151	1.5kb PCR fragment containing AK gene in T-vector	This work
Plasmid pLY152	1.5kb PCR fragment containing AK ^{flr} gene in T-vector	This work

Note for feedback resistance AEC. S(α -Aminoethyl)-D ,L-cysteine

1.4.2 扩增条件(用 TaKaRa *LA Taq* DNA 聚合酶) :94℃ 40s ,55℃ 60s ,72℃ 90s ,30 个循环。

1.5 序列测定与分析

DNA 序列测定由中国科学院微生物研究所技术中心完成。引物设计用 Primer Premier 5.0 ;DNA 及蛋白序列分析采用 Dnaman4.0 ;蛋白功能结构域的定位在英国 Sanger 中心网站上进行。

1.6 试剂和仪器

所有分子生物学试剂均购自 Takara 公司 ;生化药品为进口或国产分析纯试剂 ;基因扩增仪为君意公司产品。

2 结果和讨论

2.1 *C. crenatum* AS1.542 AK 基因和 *C. crenatum* CD945 AK^{flr} 基因的 PCR 扩增以及重组质粒的鉴定

分别以 *C. crenatum* AS1.542 菌株和 *C. crenatum* CD945 菌株染色体 DNA 为模板 ,用上述引物 PCR 扩增出约 1.5kb 大小的 DNA 片段 (图 1)。回收的 PCR 产物与 pMD18-T Vector 相连 ,转化 *E. coli* DH5 α ,挑取转化子点到涂有 IPTG 和 X-gal 平板上 ,挑取白色菌落 ,碱法

提取其质粒。以 *Bam*H I 和 *Bst*E II 进行双酶切, 琼脂糖电泳得到 2.7kb 和 1.5kb 两条片段 (图 2), 分别对应于载体 (2.7kb) 和外源基因 (1.5kb), 这与预期相符。阳性克隆分别命名为 pLY151 和 pLY152。

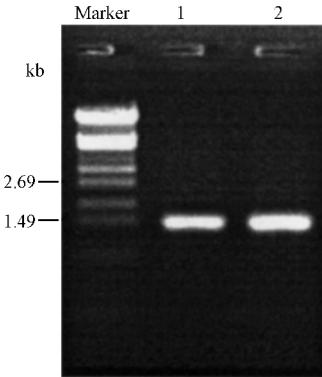


图 1 AK 基因的 PCR 扩增

Fig.1 Amplification of *ask* by PCR
M. λ DNA/*Eco*T141 I. 1. Ak. 2. AK^{tr}.

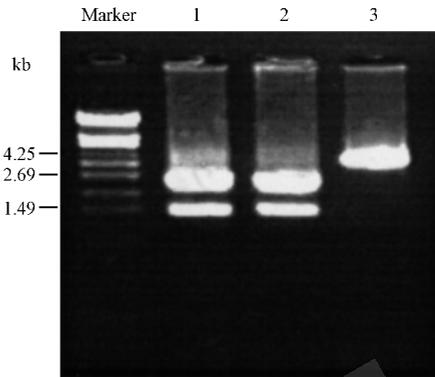


图 2 酶切分析质粒 pLY151 和 pLY152

Fig.2 Analysis of plasmids pLY151 and pLY152 by restriction enzyme digestion
M. λ DNA/*Eco*T141 I. 1. pLY151 digested by *Bam*H I and *Bst*E II. 2. pLY152 digested by *Bam*H I and *Bst*E II. 3. pLY151 digested by *Bst*E II.

2.2 AK 基因和 AK^{tr} 基因的核苷酸序列分析

将两种 PCR 产物纯化后直接进行毛细管测序, 分别得到一条长为 1513bp 的核苷酸序列, 它们都有两个 ORF, 分别编码长 421 个氨基酸的 α 亚基和长 172 个氨基酸的 β 亚基, 编码这两个亚基的基因位于同一个操纵子内, 都是以 GTG 为起始密码子, 而且 β 亚基与 α 亚基的 C 端氨基酸序列完全相同, 是在 α 亚基内起始翻译的一段长 172 个氨基酸的多肽。这与已报道的其它棒杆菌 AK 基因结构相同^[2, 6, 7, 10]。钝齿棒杆菌 AK 基因和 AK^{tr} 基因序列已提交 GenBank 登记, 注册号分别为 AF414084 (来自 *C. crenatum* CD945) 和 AF414085 (来自 *C. crenatum* AS1.542)。

2.3 AK 亚基结构分析

C. crenatum AS1.542 的 AK 基因与 *C. crenatum* CD945 的 AK^{tr} 基因相比有一个碱基的差异, 即第 1199 位碱基由 T 变成 C (图 3); 对推测出的蛋白质序列进行分析, 结果表明该位点的突变位于天冬氨酸激酶的 β 亚基上, 引起该亚基的第 80 个氨基酸 (全序列的第 329 个氨基酸) 由亮氨酸变成脯氨酸 (图 3)。

1. 542	MEEAVLTGVATDKSEAKVTVLGISDKPGEAAKVFALADAEINIDMVLQNVSSVEDGTTD	60
CD945	-----	60
1. 542	ITFTCPRSDGRRAMEILKKLQVQGNWNTNVLVYDDQVGKVS LVGAGMKSHPGVTAEFMEALR	120
CD945	-----P-----	120
1. 542	DVNVNIELISTSEIRISVLIREDDLAAARALHEQFQLGGEDEAVVYAGTGR	172
CD945	-----	172

图 3 *C. crenatum* AS1.542 和 *C. crenatum* CD945 天冬氨酸激酶 β 亚基氨基酸序列的比较

Fig.3 Comparison of the amino acid sequences of β subunit of aspartokinase between *C. crenatum* AS1.542 and *C. crenatum* CD945

在英国 Sanger 中心网站上 Pfam(Protein families database of alignments and HMMs)分析结果表明 ,该氨基酸的突变位于代谢酶类中受氨基酸浓度(对于 AK 是赖氨酸)调控的 ACT 结构域内^[11]。

现有报道的棒杆菌天冬氨酸激酶的 AEC 抗性都是由 β 亚基上的氨基酸突变引起的 ,但是不同的实验室对不同棒杆菌株的研究结果并不一致 :Kalinowski 等人^[10]的工作表明对于 *C. glutamicum* 是 β 亚基上第 62 个氨基酸由丝氨酸变成酪氨酸 ,而 Sugimoto 等人(GenBank Accession E06825)报道的则是第 29 个氨基酸从苏氨酸变成丙氨酸 ;Follettie 等人^[6]报道 *C. flavum* N13 AK β 亚基的第 96 个氨基酸由甘氨酸变成天冬氨酸 ,而对于 *B. lactofermentum* 21799 则是第 71 个氨基酸由精氨酸变成甘氨酸和第 96 个氨基酸由甘氨酸变成天冬氨酸^[7] ,我们的实验得出的结果表明 *C. crenatum* 的 AK^{br} β 亚基上第 80 个氨基酸由亮氨酸变成脯氨酸。从以上分析可以看出 ,尽管突变具有随机性 ,仅是一或两个氨基酸的变化 ,但位点大都集中在 ACT 结构域内 ,它们在空间结构上处于酶的别构部位或蛋白折叠的关键部位。

2.4 *C. crenatum* AS1.542AK 基因和其它棒杆菌来源的 AK 基因的序列比较

用 Dnaman4.0 软件进行序列比较 结果表明 ,来自 *C. crenatum* AS1.542 天冬氨酸激酶基因的编码区核苷酸序列与 GenBank 中的谷氨酸棒杆菌(*C. glutamicum*) Accession No. X57226) 黄色棒杆菌(*C. flavum* N13) Accession No. L16848)和乳糖发酵短杆菌(*B. lactofermentum*) Accession No. E14514)的同源性分别为 97.23%、97.55%和 97.62%(表 2) ;而氨基酸序列的同源性分别为 99.76%、99.52%和 99.76% ,这说明它们虽然属于不同的种 ,但在进化上却具有很近的亲源关系。值得注意的是 ,它们在启动子部分没有任何差别 ,但启动子上游部分却差别很大(图 4)。 *C. crenatum* AS1.542AK 基因在这一区域内富含 GC ,而其它三种棒杆菌则是富含 AT ,这可能与基因表达的调控作用有关 ,其功能有待于进一步探讨。

表 2 *C. crenatum* AS1.542 和其它棒杆菌天冬氨酸激酶的基因序列和酶蛋白氨基酸序列比较

Table 2 Comparison of gene sequences and amino acid sequences of aspartokinase among *C. crenatum* AS1.542 and other Corynebacteria

	<i>C. glutamicum</i>	<i>C. flavum</i> N13	<i>B. lactofermentum</i>
ORF Nucleotide sequence	97.23%	97.55%	97.62%
Amino acid sequence	99.76%	99.52%	99.76%

A	-185	AATACCAATIGCTTATCAGCATATGGGCTGTTTGCTTIGCCCGAGTCCCAGCAGCTGAG	-127
B	-185	AATATTAATCGAATATCAATATATGGTCTGTTTATTCGAAACGGTCCCAGTGGCTGAG	-127
C	-185	AATATTAATCGAATATCAATATACGGTCTGTTTATTCGAAACGGTCCCAGTGGCTGAG	-127
D	-185	AATATTAATCGAATATCAATATACGGTCTGTTTATTCGAAACGGTCCCAGTGGCTGAG	-127

图 4 *C. crenatum* AS1.542 和其它棒杆菌来源的 AK 基因启动子上游序列的比较

Fig.4 Comparison of upstream sequences of ask promoter among *C. crenatum* AS1.542 and other Corynebacteria

A. *C. crenatum* AS1.542 ;B. *C. glutamicum* ;C. *C. flavum* ;D. *B. lactofermentum* .

参 考 文 献

[1] Eikmanns J ,Eggeling L ,Sham H .*Antonie van Leeuwenhoek* 1993 ;64 :145-163 中国科学出版社微生物研究所联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [2] Kalinowski J , Bachmann B , Thierbach G , et al . *Mol Gen Genet* , 1990 **224** : 317 ~ 324 .
- [3] Shioo I , Miyajima R . *J Biochem* , 1969 **65** : 849 ~ 859 .
- [4] Tosaka O , Takinami K . *Agric Biol Chem* . 1978 **42** : 95 ~ 100 .
- [5] Tosaka O , Enei H , Hirose Y . *Trends Biotechnol* , 1983 **1** : 70 ~ 76 .
- [6] Follettie T , Peoples P , Afropoulou C , et al . *J Bacteriol* , 1993 **175** : 4096 ~ 4103 .
- [7] Jetten M , Follettie T , Sinskey J . *Appl Microbiol Biotechnol* , 1995 **43** : 76 ~ 82 .
- [8] 陈琦 , 李玲阁 . *微生物学报* , 1975 **15** (2) : 119 ~ 124 .
- [9] 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 , 1992 .
- [10] Kalinowski J , Cremer J , Bachmann B , et al . *Mol Microbiol* , 1991 **5** (5) : 1197 ~ 1204 .
- [11] Aravind L , Koonin V . *J Mol Biol* , 1999 **287** : 1023 ~ 1040 .

Cloning and Sequence Analysis of Aspartokinase Genes From *Corynebacterium crenatum* *

Liu Yangjian Zhang Yingzi Wang Jiang Wang Yu Yu Zhihua Ding Jiuyuan * *

(Center for Microbial Biotechnology , Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

Abstract : Aspartokinase genes (*ask*) from wild-type *Corynebacterium crenatum* AS1.542 and an AEC-resistant mutant *Corynebacterium crenatum* CD945 were cloned and sequenced. Analysis of *ask* sequence shows a exchange in a single base pair at position 1199 from T to C , leading to an amino acid change in the β subunit of Aspartokinase. Leu⁸⁰ in the wild-type is converted to Pro⁸⁰ in the feedback-resistant enzyme. The substitution is located in ACT domain , a region regulated by concentration of lysine. The ORF sequence of *ask* from *C. crenatum* AS 1.542 shows homologies of 97.23% , 97.55% and 97.62% to those from *C. glutamicum* , *C. flavum* and *B. lactofermentum* . And the amino acid sequence deduced from ORF displays homologies of 99.76% , 99.52% and 99.76% respectively. But there is much variation in the upstream sequence of *C. crenatum* AS 1.542 *ask* promoter compared to those from other *Corynebacteria* .

Key words : *Corynebacteria* , Aspartokinase , Lysine , AEC resistance

* This project was supported by Grant from Key Projects of Chinese Academy of Sciences

** Author for correspondence Tel 010-62554588 E-mail: dingjy@sun.im.ac.cn
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>