

大肠杆菌腺苷脱氨酶基因的克隆、表达与缺失*

钱红亮 曾 洋 叶 江 张惠展

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 分子克隆实验室 上海 200237)

摘 要 利用途径工程的基本原理,拟在大肠杆菌核苷酸代谢途径中构建腺苷(AR)转化为腺苷三磷酸(ATP)的新途径,故需使细胞内的腺苷脱氨酶基因(*add*)缺失。通过构建大肠杆菌 MC4100 DNA 的基因文库,筛选得到含腺苷脱氨酶基因的 DNA 片段。构建表达质粒 pBD1 和 pBD2 并实现了表达。在此基础上构建了 *add* 基因缺失的带卡那霉素抗性基因的线性 5.2kb DNA 分子,同时转化 JM83、MC4100、BL21(DE3)。经遗传稳定性实验和 DNA 分子杂交鉴定,确认得到了来自 JM83 的两株 *add* 基因缺陷株 J1 和 J2。再对菌株 J1、pUC18/JM83、pBD1/JM83 的细胞粗提液做腺苷脱氨酶的酶活鉴定比较,结果表明则没有腺苷脱氨酶活性,pBD1/JM83 有比 pUC18/JM83 强的腺苷脱氨酶活性。

关键词 腺苷脱氨酶,ATP,基因缺失,途径工程

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2002)06-0686-07

在大肠杆菌核苷酸代谢途径中,腺苷脱氨酶(ADA,EC3.5.4.4)能催化腺苷水解脱氨生成肌苷和氨气。本研究试图通过对大肠杆菌腺苷脱氨酶基因及其它核苷酸相关基因的改造,在其体内构建高效转化腺苷为腺苷三磷酸的代谢途径,从而获得高产 ATP 的基因工程菌。

大部分生物体拥有合成核苷酸的“从头合成”途径和补救途径:即能以简单前体物质“从头合成”(de novo synthesis)核苷酸,也能由已有的碱基和核苷合成核苷酸,这是对核苷酸代谢的一种“补救”作用(salvage),以便更经济地利用已有的成分^[1]。但是“从头合成”途径在所有的生物体中几乎都是一样的,而由于不同生物体利用和转化外界供应的嘌呤衍生物的能力差异很大,因此它们的补救途径也各不相同。大肠杆菌的嘌呤核苷酸代谢途径如图 1。从代谢能量最经济角度分析,由于补救途径合成的核苷酸的底物仅需碱基或核苷,比“从头合成”途径耗能低,因此核苷酸合成优先利用周围环境中的碱基或核苷,即以补救途径为主,从头合成为辅。在有外源碱基、核苷存在下,细菌可能会优先利用现成资源,开启核苷酸生物合成的补救途径。

嘌呤碱基和核苷不是嘌呤核苷酸从头合成途径的中间物(图 1),但当在培养基中补充嘌呤碱基和核苷时,它们能通过细菌质膜,在胞质中被进一步代谢。其中核苷可以被核苷磷酸化酶降解为碱基与核糖,在磷酸核糖转移酶催化下将碱基转变为核苷酸,而腺苷也可以被脱氨生成肌苷,以肌苷为中间体合成其它各类核苷酸。在大肠杆菌中,生成的肌苷能进一步诱导脱氨酶的合成^[2]。这样,添加的腺苷就通过肌苷到肌苷一磷酸,成为合成嘌呤核苷酸的原料,从而降低了对“从头合成”途径的利用。如果阻断腺苷脱氨的途径,则细

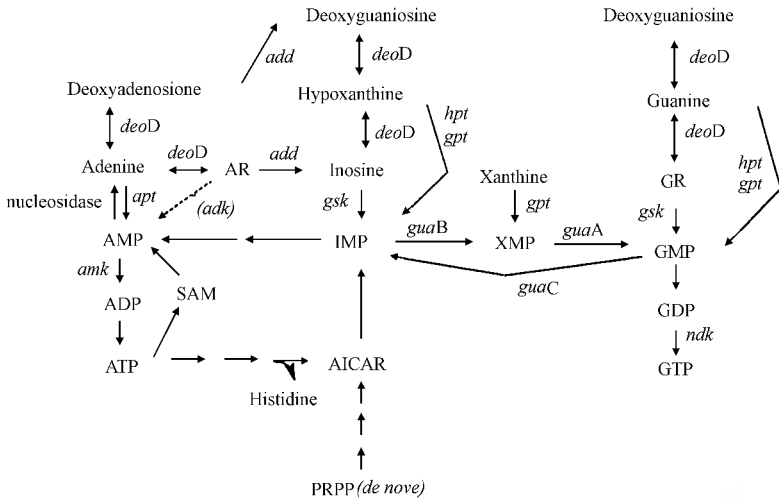


图 1 大肠杆菌中嘌呤类核苷酸的生物合成途径

Fig. 1 Purine interconversion pathways of *E. coli*

The individual enzymes of the pathways are identified by their gene italic symbols. The broken line indicates its pathway doesn't exist actually in *E. coli*.

菌不能用腺苷来合成鸟嘌呤核苷酸；“从头合成”途径仍会有效的利用起来。此外，在大肠杆菌中引入自身没有的腺苷激酶（如图 1 虚线所示），可以跨越核苷的降解而直接合成 ATP。

大肠杆菌腺苷脱氨酶有很高的生物催化能力^[3]，其催化活力由单一多肽链完成，并且不需辅因子。已有实验室通过与腺苷脱氨酶缺乏的细菌功能互补的方法克隆了大肠杆菌腺苷脱氨酶基因（*add*）^[4]。编码该酶的基因为 996bp，具有单独的启动子、核糖体结合位点和不依赖 ρ 因子的终止子。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、X-gal，由 TaKaRa（大连）生产；IPTG，由 Promega 生产；氨苄青霉素钠，由苏州益良药业有限公司生产；卡那霉素由江苏无锡第三制药厂提供。溶菌酶，由上海伯奥生物科技有限公司生产；核糖核酸酶，由华美生物工程公司提供；胰蛋白酶，由 Merck 公司生产；杂交专用尼龙膜，德国 Schleicher & Schuell GmbH Postfach 生产；杂交试剂盒来自德国 Boehringer Mannheim GmhH。

大肠杆菌 LB 培养基和实验中使用到的缓冲液的配制，以及基本实验操作按照参考文献 [5] 进行。

1.2 菌种（大肠杆菌 K12 株）和质粒

实验所用菌株和质粒见表 1。

1.3 实验方法

1.3.1 DNA 测序：由上海基康生物技术有限公司完成。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strain and plasmid	Characteristic	Source
<i>E. coli</i>		
JM83	F ⁻ , <i>ara</i> Δ(<i>lac-proAB</i>), <i>rpsL</i> (Str ^r), Δ80Δ <i>lacZ</i> ΔM15	This laboratory
MC4100	F ⁻ , <i>ara</i> D139, Δ(<i>argF-lac</i>)U169, <i>rpsL</i> 150, <i>recA</i> 1	ATCC(1996)
BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>dem</i> , <i>gal</i> Δ(DE3)	This laboratory
Plasmids		
pUC18	Amp ^r , <i>lac</i> promoter(<i>lacZ</i>)	This laboratory
pSP72	Amp ^r , T7 promoter	This laboratory
pNF3	Amp ^r , Km ^r	This laboratory

1.3.2 大肠杆菌的耐抗生素浓度梯度试验 在 LB 平板培养基中添加卡那霉素,使其终浓度从 0 到 50 μg/mL 分成几个梯度。将摇瓶培养过夜的大肠杆菌 JM83、MC4100、BL21(DE3) 涂布于上述平板培养基,培养 12h,确定最小抑菌浓度。卡那霉素对 JM83、MC4100、BL21(DE3) 分别为 30 μg/mL、30 μg/mL、20 μg/mL。

1.3.3 腺苷脱氨酶的酶活测定 粗酶液制备 将培养 5h 的大肠杆菌培养液 6 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,把菌体重新悬浮于磷酸盐缓冲液中(0.1 mol/L, pH 7.1)。超声破碎后的悬浊液 15 000 r/min 离心 30 min,取上清液作为粗酶液。

酶活测定 底物腺苷(10 mmol/L 的水溶液) 1.3 mL,磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.1) 1.2 mL,粗酶液 0.5 mL,使总体积为 3.0 mL,反应 15 min 后置于冰浴中待用。

底物和产物的分离 纸层析——新华 1 号滤纸,展层剂为:正丁醇:醋酸:水 = 4:1:1;薄层层析——硅胶 GF 预制板(5 cm × 20 cm),展层剂为:氯仿:乙醇:乙酸 = 4:1:1。

2 结果和分析

2.1 *add* 基因的克隆

根据 *E. coli* K12 基因组全序列,以质粒 pUC18 为载体, JM83 为受体菌,构建 *E. coli* MC4100 染色体 DNA *Pst* I 6.6 kb 片段的基因文库。在含 X-gal 和 Ampicillin 的转化平板上,共挑取得 318 个白色菌落,划线扩增并沸水浴快抽质粒 DNA。依次使用限制性内切酶 *Bam*H I、*Hin*d III、*Sal* I、*Pvu* II、*Eco*RV 酶切,电泳结果与期望重组子限制性内切酶图谱进行比较。发现 139[#] 和 140[#] 正好与两个期望重组子限制性内切酶图谱相同。

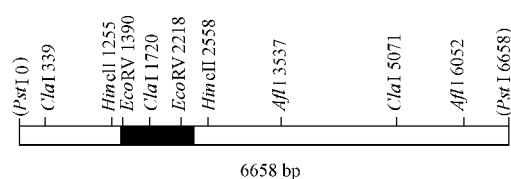


图 2 目标片段的限制性内切酶图谱

Fig. 2 The restricted map of the target DNA fragment

在 *E. coli* K12 中腺苷脱氨酶基因 *add* 的内部应有两个 *Eco*RV 酶切位点,间隔约为 0.83 kb(图 2)。 *Eco*RV 酶切 140[#],回收 0.83 kb 的片段,克隆于质粒 pUC18 上并测序。结果与已报道的 *add* 基因的 DNA 序列一致。

2.2 *add* 基因的表达

*Hin*C II 酶切 140[#] 回收约 1.3 kb 的片段,将

之克隆于载体 pUC18 和 pSP72, 构建得到表达质粒 pBD1 和 pBD2, 并分别转化宿主 JM83 和 BL21(DE3)。其中, *add* 基因自带的启动子与 pUC18 上的 *lacZ* 启动子方向相反, 而与 pSP72 的 T7 启动子方向相同。

摇瓶培养 pBD1/JM83 和 pBD2/BL21(DE3) 过夜, 接入二级摇瓶, 并定时取样。收集相同量的菌体, 处理后进行 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳(图 3 A)。

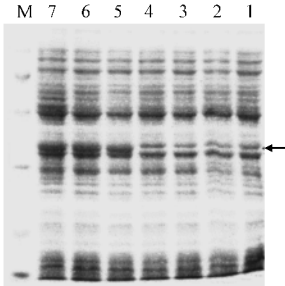


图 3 pUC18 载体 JM83 宿主菌的蛋白质表达图谱

Fig. 3 SDS-PAGE(12%) of proteins from JM83 with pUC18 vector

1. JM83 2h; 2. JM83 3.5h;
3. pUC18/JM83 2h; 4. pUC18/JM83 3.5h;
5. pBD1/JM83 2h; 6. pBD1/JM83 3.5h;
7. pBD1/JM83 5.5h;
M. Protein markers(bottom to top : 14.4 20.1 31.0 ,
43.0 66.2 97.4kD).

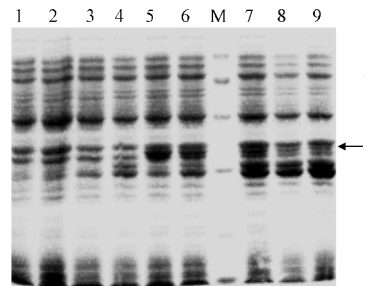


图 4 pSP72 载体 BL21(DE3) 宿主菌的蛋白质表达图谱

Fig. 4 SDS-PAGE(12%) of proteins from BL21(DE3) with pSP72 vector

1. BL21(DE3) 2h; 2. BL21(DE3) 2.5h;
3. pSP72/BL21(DE3) 2h; 4. pSP72/BL21(DE3) 2.5h;
5. pBD2/BL21(DE3) 2h; 6. pBD2/BL21(DE3) 2.5h;
7. pBD2/BL21(DE3) 3.5h; 8. pBD2/BL21(DE3) 4.5h;
9. pBD2/BL21(DE3) 5.5h;
M. Protein markers(bottom to top : 14.4 20.1 31.0 ,
43.0 66.2 97.4kD).

After cells cultivated 2h, IPTG was added to the cultures of BL21(DE3), pSP72/BL21(DE3), pBD2/BL21(DE3).

上图结果显示, 在 36kD 附近增加了一清晰条带。由于 pUC18 上的 *lacZ* 启动子对 *add* 基因的转录不起作用, 故表明 *add* 基因自身的启动子发挥了作用。此外, 在 BL21(DE3) 中的表达诱导前后均非常明显, 浓度也较一致, 推测 T7 启动子未起作用, 而由 *add* 基因自身的启动子起始转录。

2.3 大肠杆菌 *add* 基因的缺失

2.3.1 体外 *add* 缺失的线性 DNA 分子构建: 使用限制性内切酶 *Sma* I / *Hind* III 从质粒 pNF3 切下含 *Km^r* (卡那霉素抗性基因) 1.3kb 的 DNA 片段。将 *Hind* III 酶切的粘性末端用 Klenow fragment 补平, 然后替换质粒 140# 上 *add* 内部两 *Eco*RV 位点间的 0.83kb 部分。最后用 *Cla* I / *Xba* I 酶切回收 5.2kb 含 *Km^r* 的 DNA 线性分子(图 5)。

2.3.2 同源交换与抗性遗传稳定性鉴定: 用热脉冲法将 *add* 缺失的线性 DNA 分子分别导入用氯化钙制备的新鲜的大肠杆菌 JM83、MC4100、BL21(DE3) 感受态细胞^[5], 涂布于含卡那霉素为最小抑菌浓度的 LB 平板(材料和方法 1.3.2) 培养过夜。在以 JM83、MC4100 为受体菌的平板上各得到 2 个单菌落, 分别编号为 J₁、J₂ 和 M₁、M₂。

将 J₁、J₂ 及 M₁、M₂ 接种 LB 液体培养基, 培养过夜, 稀释 10⁵ 倍后涂布 LB 平板, 各挑

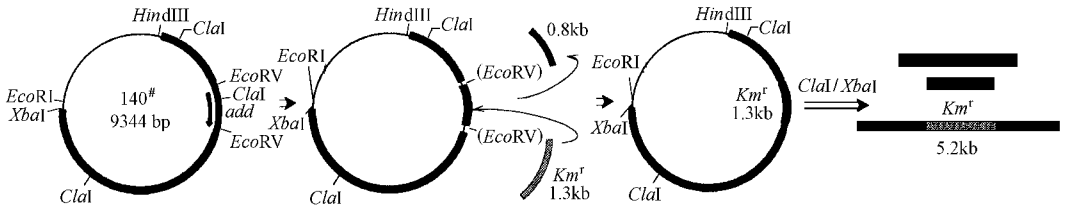


图5 *add* 缺失线性 DNA 分子的构建

Fig. 5 Construction of linear DNA fragment with fragmentary *add*

取 100 个单菌落分别复印于 LB 平板和 LB + Kan 平板。结果 J1、J2 在两种平板都生长良好 ;M1、M2 在 LB 平板上生长良好 ,在 LB + Kan 平板上没有生长。结果表明 J1、J2 的卡那霉素抗性能稳定遗传 ,而 M1、M2 则不能。初步认定 J1 J2 为 *add* 基因缺失的克隆。

2.3.3 Southern blotting 鉴定 :抽提 J1、J2 的染色体 DNA ,*Hinc* II 酶切并进行琼脂糖凝胶电泳 ,然后转移到尼龙膜。分别使用 140# 质粒上两个 *Eco*RV 位点间 0.83kb 的 DNA 片段和 1.3kb 的含 *Km^r* 基因的片段作探针杂交 ,结果如图 6。

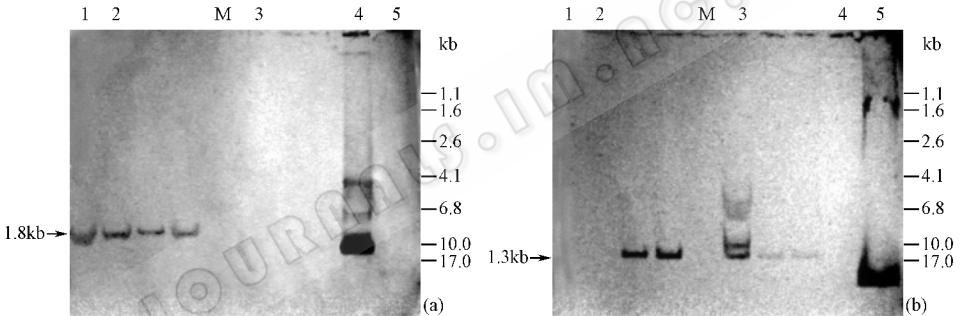


图 6 *Km^r* 探针杂交结果 (a) 和 *add* 探针杂交结果 (b)

Fig. 6 Results of hybridized nylon film by *Km^r* prob(a) and *add* prob(b) , respectively

- 1. J1 DNA/*Hinc* II ;
- 2. J2 DNA/*Hinc* II ;
- 3. JM83/*Hinc* II ;
- 4. pNF3 DNA/*Sma* I + *Hind* III ;
- 5. plasmid 140# DNA/*Eco*RV ;
- M. DNA markers.

Lines on the right side of maps indicated the actual positions of DNA markers.

J1、J2 菌株的 DNA 经酶切电泳后 ,*Km^r* 探针杂交在相应大小位置上呈现阳性 ;*add* 探针杂交为阴性。以上结果表明 J1、J2 染色体 DNA 上的 *add* 基因已被含 *Km^r* 基因的片段所替代 ,故得到了来源于 JM83 的两株腺苷脱氨酶缺陷菌株。

2.3.4 J1 的腺苷脱氨酶酶活缺失鉴定 :J1、pUC18/JM83 和 pBD1/JM83 的粗酶液反应结果 (图 7)与腺苷脱氨酶基因表达和基因缺失实验结果一致 :样品 5 中底物腺苷大部分转化为肌苷 ;样品 3 中没有肌苷产生。延长反应时间 ,样品 4 和 5 中腺苷全部转化以后 ,样品 3 中也没有肌苷出现(结果未列出)。

将斑迹处的样品回收 ,测肌苷的 *OD*₂₅₀ 值和腺苷的 *OD*₂₆₀ 值。结果表明从样品 3 到样品 5 ,腺苷的量依次减少 ,而肌苷的量依次增多(数据未列出)。

在样品 3 和 4 中,腺苷暗斑的前面出现了比较淡的斑点,推测是腺苷在嘌呤核苷磷酸化酶(EC. 2.4.2.1)的作用下降解生成了腺嘌呤^[6]。而样品 5 的相应位置上没有暗斑,则是因为 pBD1/JM83 的腺苷脱氨酶大量表达(图 3),其粗酶液含有的腺苷脱氨酶远比嘌呤核苷磷酸化酶多。腺苷脱氨酶在与嘌呤核苷磷酸化酶竞争性的催化腺苷反应中,使腺苷较多的被转化为肌苷,而产生的腺嘌呤不足以形成可见的暗斑。

3 讨论

采用鸟枪法克隆得到了含 *add* 基因的 6.6kb DNA 片段,为利用同源重组机理构建缺陷型菌株提供了足够长的 DNA 分子^[7,8]。线性 DNA 分子转化同源重组是一个探索性的实验,对于游离末端的线性 DNA 分子,在细胞内易被具有核酸外切酶活性的 *recBCD*、*ExoI* 等蛋白降解,因此线性 DNA 分子转入细胞后存在的时间很短,这样发生在线性 DNA 分子两端的同源重组几率将大大降低。但是对于 JM83、MC4100、BL21(DE3)非 *recA* 蛋白缺陷型受体而言,*recA* 蛋白能结合 DNA 游离末端,所以对这些宿主菌的线性 DNA 分子转化进行同源重组的方法是可行的。在基因缺失实验中,同时还使用了环状 DNA 分子(结果未列出)。相比线性 DNA 分子,环状 DNA 分子在胞内的稳定性要高,但在同源重组中,需由重组蛋白参与形成游离末端,这反而使得同源交换的概率更低。

在大肠杆菌中,对于由多种酶参与控制的核酸代谢网络,利用第三代基因工程——途径工程的基本原理^[9],使 *add* 基因缺失并引入异源腺苷激酶基因 *adk*,可望构建腺苷到腺苷三磷酸全新代谢途径,同时强化相关的能量代谢糖酵解过程,以期实现 AR 到 ATP 的活体转化。*add* 基因的克隆、表达和细胞内缺失,为该目标奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 沈 同,王镜岩.生物化学(第二版).北京:高等教育出版社,1991.302~315.
- [2] Agnete Munch-Petersen. Metabolism of Nucleotides Nucleosides and Nucleobases in Microorganisms. New York :A Cademic Press ,1983.
- [3] Frick L , Neela J P M , Wolfenden R. *Bioorg Chem* ,1987 ,**15** :100~108.
- [4] Chang Zengyi , Nygaard P , Chinault A C , et al . *Biochemistry* ,1991 ,**30** :2273~2280.
- [5] 萨姆布鲁克 J ,弗里奇 E F ,曼尼阿蒂斯 T.分子克隆实验指南.第二版.北京:科学出版社,1992.
- [6] Duskocil J , Holy A. *Collection Czechoslov Chem Commun* ,1977 ,**42** :370~383.
- [7] Singer B S , Gold L , Gauss P , et al . *Cell* ,1982 ,**31** :25~33.
- [8] Hippel P H. On the Molecular Bases of the Specificity of Interaction of Transcriptional Proteins with Genome DNA. In :Goldberger R F ed. Biological Regulation and Development. New York :Plenum Press ,1979.279~347.
- [9] 孙丽萍,吴海珍,张惠展.药物生物技术 2000 (2) :71~76.

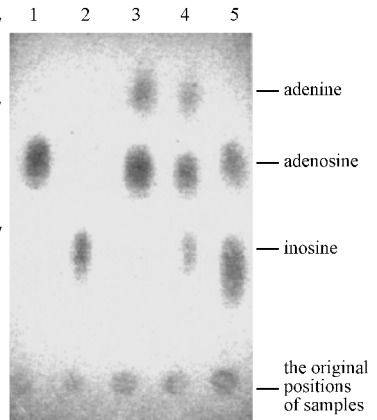


图 7 腺苷脱氨酶反应液薄层层析图

Fig.7 The thin layer chromatography map of the ADA reaction mixture

1. Adenosine ;
2. Inosine ;
3. Extract of J1 ;
4. Extract of pUC18/JM83 ;
5. Extract of pBD1/JM83.

Cloning , Expression and Deletion of Adenosine Deaminase Gene in *Escherichia coli*

Qian Hongliang Zeng Yang Ye Jiang Zhang Huizhan

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering ECUST , Shanghai 200237 ,China)

Abstract : Based on the principles of metabolic engineering , a new pathway of transforming adenosine to ATP is attempted to be built in the nucleotides metabolism of *E. coli* . Deletion of adenosine deaminase gene (*add*) is to be needed. The *add* gene from *E. coli* MC4100 was cloned by constructing gene library and expressed through constructing two plasmids pBD1 and pBD2. In order to get the *add*-defective strain , a 5.2kb DNA sequence including fragmental *add* gene and marker gene *Km^r* was made and transferred into JM83 , MC4100 and BL21(DE3). The genetic stability and DNA hybridization experiment proved that two *add*-defective strain J1 and J2 come from JM83 were found. The enzyme assays indicated that strain J1 lost the adenosine deaminase activity and pBD1/JM83 showed higher adenosine deaminase activity than pUC18/JM83.

Key words : Adenosine deaminase , ATP , Gene deletion , Pathway engineering

《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。2001 年《微生物学报》入选“中国科技期刊方阵”。

凡与微生物学及其各分支学科有关的试剂、药品、仪器、设备 , 以及与微生物有关的信息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

E - mail : gescg@sun. im. ac. cn actamicro@sun. im. ac. cn

通讯地址 北京市海淀区中关村北一条 13 号《微生物学报》编辑部