

# 钝齿棒杆菌 CD945 丙酮酸羧化酶基因的克隆、 序列分析及表达<sup>\*</sup>

王 绛 刘阳剑 王 宇 张英姿 余志华 丁久元<sup>\*\*</sup>

(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** :以钝齿棒杆菌(*Corynebacterium crenatum*)突变株 CD945 的基因组为模板,运用 PCR 方法,扩增出丙酮酸羧化酶的基因片段。核苷酸序列分析结果表明,该片段全长 3657bp,以 GTG 为起始密码子,编码一个 ORF。该 ORF 的核酸序列与 *Corynebacterium glutamicum*, *Mycobacterium smegmatis* 以及 *Saccharomyces cerevisiae* 的丙酮酸羧化酶结构基因相比,相似性分别为 98.22%、62.41% 和 49.61%。由 ORF 推导出的氨基酸序列与上述属种的丙酮酸羧化酶相比,同源性分别是 99.30%、64.65% 和 44.04%。经证实对于酶的催化活性至关重要的一些保守区域,如 ATP 和生物素的结合位点等,在该氨基酸序列中都存在。将该基因片段转化钝齿棒杆菌(*C. crenatum*)CD945,利用 CTAB 处理细胞和苹果酸脱氢酶偶联测定相结合的方法,进行酶活力的分析,结果表明,重组子与供体菌相比,丙酮酸羧化酶的活力提高 5 倍。

**关键词** :棒杆菌,丙酮酸羧化酶,氨基酸

中图分类号 :Q786 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6179(2003)02-0214-06

丙酮酸羧化酶(Pyruvate carboxylase, PYC)是一种重要的生物素酶,广泛分布于哺乳动物、真菌、植物组织和许多细菌中。在细菌中,它和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PPC)一样,对三羧酸循环中间产物草酰乙酸(OAA)的补充有重要作用。在荚膜红细菌(*Rhodobacter capsulatus*)<sup>[1]</sup>中, PYC 是唯一参与回补反应的酶;而在大肠杆菌(*Escherichia coli*)<sup>[2]</sup>等细菌中,只有 PPC 参与 OAA 的补充;仅有少数细菌,如谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)中同时有这两种酶存在,且 PYC 对 OAA 生成的贡献高达 90% 以上<sup>[3]</sup>。

钝齿棒杆菌(*Corynebacterium 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<sup>[4]</sup>,其突变株在国内氨基酸生产中广泛应用,但对其生理学和生物化学的研究几乎还是空白,尤其是在回补网络研究方面,还没有报道。本工作证实了 *C. crenatum* 中丙酮酸羧化酶的存在,首次报道其基因序列,并在 *C. crenatum* 中进行了表达。

## 1 材料和方法

### 1.1 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;BIO-RAD MicroPulser<sup>TM</sup>电击仪;721 分光光度计及 BekmanDU-7 紫

<sup>\*</sup> 本课题得到中国科学院重点项目的资助

<sup>\*\*</sup> 通讯作者。Tel :010-62554588 ; E-mail :dingjy@sun.im.ac.cn

作者简介:王 绛(1976-),女,中国科学院微生物研究所 99 级硕士研究生。

收稿日期:2002-04-27,修回日期:2002-08-14

外分光光度计。

1.2 菌株和质粒

所用的菌株和质粒见表 1。质粒 pJC1 由德国生物工程一所 Lothar Eggeling 教授惠赠。

1.3 培养基和培

养条件

表 1 菌株和质粒

LB 培养基 <sup>[6]</sup>	Table 1 The strains and plasmids used in this work		
用于细菌培养 ;用于电击转化棒杆菌的培养基是在 LB 培养基中加入 4% 甘氨酸 <sup>[7]</sup> ;大肠杆菌在 37℃ 培养 ,钝齿棒杆菌在 30℃ 培养。抗生素使用浓度分别为氨苄青霉素 100μg/mL ,卡那霉素 50μg/mL。	Strain/Plasmid	Characteristics	Source
	<i>E. coli</i>		
	DH5α	φ80lacZΔM15	Stored in this lab
	<i>Corynebacteria</i>		
	<i>Corynebacterium crenatum</i> CD945	AEC <sup>r</sup> , hom <sup>-</sup>	Stored in this lab
	Plasmid		
	Plasmid pMD18-T	T-vector , 2.7kb , Amp <sup>r</sup> , lacZ	Takara Co.
	Plasmid pJC1	<i>C. glutamicum</i> - <i>E. coli</i> shuttle vector , Kn <sup>r</sup>	Cremer , et al <sup>[5]</sup>
	Plasmid pJK105	3.67 kb PCR fragment containing PYC gene in pJC1	This work

1.4 DNA 操作

大肠杆菌 DNA 操作参照文献 [6] ,棒杆菌 DNA 操作参照文献 [7,8]。

1.5 基因扩增

1.5.1 PCR 引物 根据序列同源性 ,参考已报道的 *C. glutamicum* 丙酮酸羧化酶基因序列 (Accession No.AC Y09548 和 AF038548 ) ,设计出以下特异引物 :

上游引物为 5'AAAAACGTTAAGTCGTGCAGGTCAGGG 3'

*Psp* 1406 I

下游引物为 5'AAAACGCGTAAATCCAACTCACCCATC 3'

*Mlu* I

1.5.2 扩增条件(用 TaKaRa Pyrobest DNA 聚合酶) 94℃ 40s ,60℃ 1min ,72℃ 5min ,30 个循环。

1.6 序列测定

DNA 序列测定由 TaKaRa 公司完成。引物设计用 Primer Premier 5.0 ;DNA 及蛋白序列分析采用 Dnaman 4.0。

1.7 转化方法

大肠杆菌采用 CaCl<sub>2</sub> 法 ,棒杆菌采用电击转化。

1.8 酶活测定

1.8.1 细胞处理 将 *C. crenatum* 于 30℃ 摇床培养 7~9h ,离心收集细胞 ,用 50mmol/L Tris-HCl (pH6.3 ,含 50mmol/L NaCl)洗涤两次 ,适量 HEPEs (100mmol/L ,含 20% 甘油 ,pH7.5)悬浮 ,置于 -20℃ 保存。测活前 ,将之取出冰融 ,加入 3% CTAB ,使终浓度为 0.3% ,迅速混匀后室温作用 1min ,取适量立即用于测定反应。

**1.8.2 苹果酸脱氢酶偶联测定法** :测试组成为( 2.0mL 反应体系 ) :20mmol/L 丙酮酸钠 , 10mmol/L NaHCO<sub>3</sub> , 20mmol/L MgCl<sub>2</sub> ,100mmol/L Tris-HCl ( pH8.0 ) ,8mmol/L ATP 二钠盐 , 0.05 mmol/L NADH ,1U 苹果酸脱氢酶 ,适量细胞 CTAB 悬液。

NADH 的氧化由 340nm 光吸收测得 ,NADH 的摩尔消光系数  $\epsilon = 6220 \text{ L mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

活力单位定义 :一个活力单位( U )为在上述细胞处理和反应条件下 ,每分钟转化 1nmol NADH 为 NAD 所需的细胞量。

2 结果和讨论

2.1 丙酮酸羧化酶基因的克隆

提取 *C. crenatum* CD945 的染色体 DNA ,以此为模板 ,PCR 扩增出一条约 3.7 kb 大小的 DNA 片段( 图 1 )。在该 PCR 产物两端加 A 后与 pMD18-T 相连 ,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。挑取转化子到含 IPTG 和 X-gal 平板上 ,挑取白色菌落 ,碱法提取质粒。用 *Psp*1406I 和 *Mlu*I 进行双酶切 ,电泳结果如图 2 所示 ,酶切片段与预期相符。重组质粒命名为 pT-pyc。

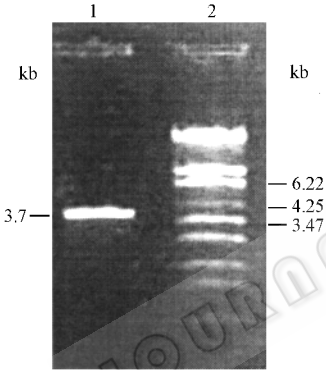


图 1 PYC 基因的 PCR 扩增  
Fig.1 Amplification of *pyc* by PCR  
1. PCR fragment ; 2. DNA marker.

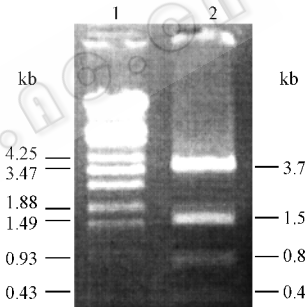


图 2 酶切分析质粒 pT-pyc  
Fig.2 Analysis of pT-pyc by  
*Psp*1406I & *Mlu*I digestion  
1. DNA marker ;  
2. digestion fragments.

2.2 丙酮酸羧化酶基因序列的分析

随机挑取两个阳性克隆 ,对 pT-pyc 上的插入片段进行测序 ,结果一致。该片段长 3657bp ,序列分析显示 ,仅含有一个 ORF( 3423bp ) ,起始密码子为 GTG ,终止密码子为 TAA。推测此 ORF 编码一条 1140 个氨基酸的多肽 ,分子量为 122.9kD。核酸序列与 *C. glutamicum*、耻垢分支杆菌( *Mycobacterium smegmatis* )以及酿酒酵母( *Saccharomyces cerevisiae* )的 PYC 核酸序列的相似性分别为 98.22%、62.41%和 49.61%。推测氨基酸序列的同源性分别为 99.30%、64.65%和 44.04%。该结果与文献报道的同属 PYC 的核苷酸和氨基酸序列具有高度同源性 ,而且 ,推测的氨基酸序列 N-端的 150 个氨基酸残基与文献报道<sup>[9]</sup>完全一致 ,说明插入片段是 *C. crenatum* CD945 的 PYC 基因。该序列已提交 GenBank 登记 ,序列号为 AF503915。对核苷酸序列进行分析 ,发现在起始密码子上游有一个较为典型的核糖体结合位点 :GAAAGGAA ,该区域的中心( AGGA )到翻译起始位点的距离为 14bp ,而在 *E. coli*

和枯草杆菌( *Bacillus subtilis* )中 ,已证实这一距离最适为 7 ~ 9bp<sup>[10]</sup>。这种差异可能与棒杆菌表达系统本身的特殊性或与 *C. crenatum* 中 PYC 的翻译效率有关。在 PYC 结构基因( *pyc* )的下游 ,即序列的 3584 ~ 3625bp 的位置 ,有一个可能的不依赖于  $\rho$  因子的终止子结构 ,与 *C. glutamicum* 的 *pyc* 相同。

PYC 属于一类以生物素为辅酶的酶家族 ,研究表明 ,不同种属来源的 PYC 酶蛋白中 ,存在着高度保守的区域。在序列的 N 端 ,有一段共同的序列 :GGGGRG ,这在所有的生物素酶类中都存在( R 可为 K )被认为是 ATP 的结合位点<sup>[11,12]</sup>。在序列的中部 ,有另一个关键的区域 :FLFEDPWDR ,Kumer 等人认为<sup>[13]</sup> ,这中间的色氨酸残基( W )参与了转羧基反应中的丙酮酸结合过程。在序列的 C 端 ,有一个非常保守的部位 :AMKM ,被认为是生物素的结合位点 ,已经证实其中的赖氨酸残基( K )与生物素特异共价结合<sup>[14]</sup> ;C 端另外三个特定位置的甘氨酸残基<sup>[15]</sup>也参与了生物素的结合。将 *C. crenatum* 的 PYC 氨基酸序列与上述三种来源的 PYC 比较发现 ,尽管它们之间的同源性存在差异 ,但是上述几个对酶活性极为重要的保守区域在 4 种来源的酶蛋白中都相当一致( 图 3 )。该结果表明 ,不同种属的 PYC 蛋白很有可能源自于相同的祖先 ,虽然在漫长的进化历程中被不同的宿主修饰或改变 ,但是决定其共有活性的局部区域还是保持了高度的保守性。

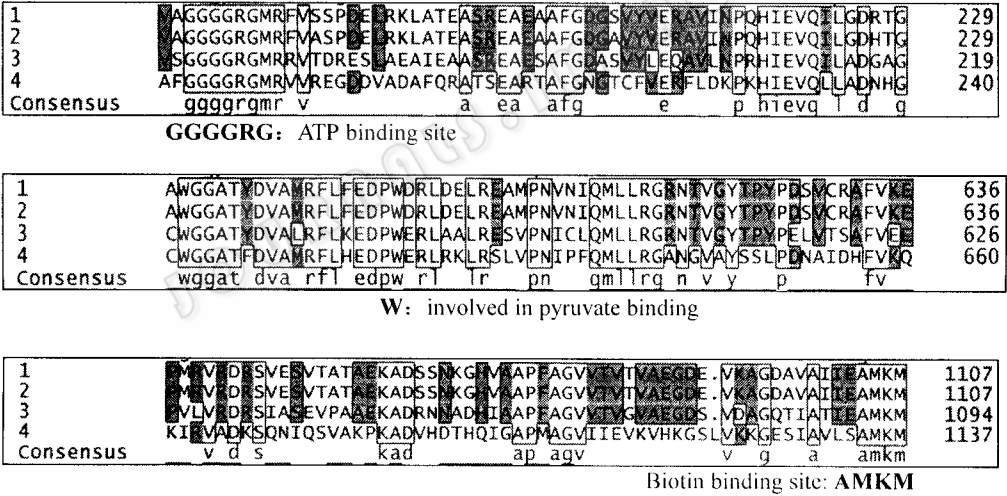


图 3 *C. crenatum* CD945 和其它种属来源的 PYC 部分氨基酸序列的比较

Fig.3 Comparison of several parts of amino acids sequences of PYC among *C. crenatum* CD945 and other organisms

1. *C. crenatum* CD945 ; 2. *C. glutamicum* ; 3. *M. smegmatis* ; 4. *S. cerevisiae* .

2.3 带有 PYC 基因的重组质粒的构建

回收 pT-pyc 中 3.7kb 的插入片段 ,与 pJC1 的 *Psp* 1406I-*Bss* HII 大片段相连( 图 4 ) ,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。 分别用 *Psp* 1406I 和 *Sma*I 酶切鉴定重组子。提取 *E. coli* DH5 $\alpha$  重组子的质粒 ,转化 *C. crenatum* CD945。对 *C. crenatum* 转化子中的重组质粒进行酶切图谱分析( 图 5 ) ,结果与预期一致。将携有 *pyc* 的重组质粒命名为 pJK105。

2.4 丙酮酸羧化酶基因在 *C. crenatum* CD945 中的表达

将 *C. crenatum* 在 LB 培养基中培养至对数中期 ,收获细胞 ,经 CTAR 处理后 ,检测 PYC

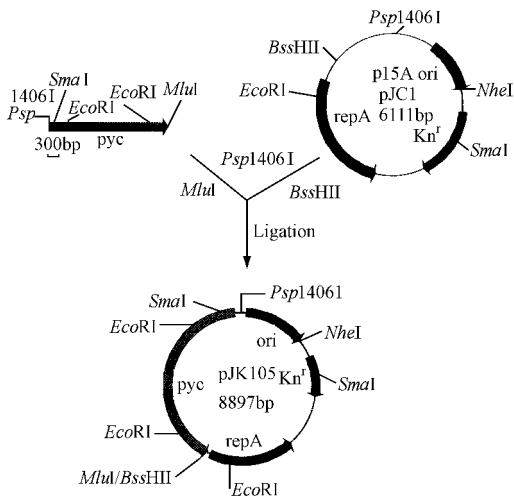


图 4 重组质粒 pJK105 的构建

Fig. 4 Construction of pJK105

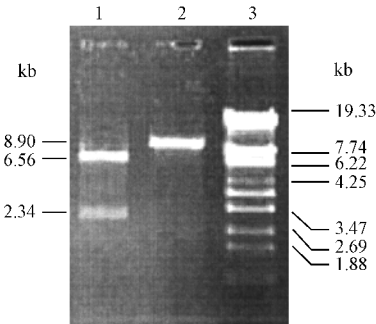


图 5 酶切分析重组质粒 pJK105

Fig. 5 Analysis of pJK105 by *Sma*I & *Psp*1406I digestion

1. *Sma*I digestion ; 2. *Psp*1406I digestion ; 3. Marker.

的活力 结果见表 2。经超声处理细胞后在粗提物中检测 PYC 活力的方法对于 *C. glutamicum* 来说不适用,对 *C. crenatum* 而言也存在这种情况。本工作曾试图在 *C. crenatum* 超声细胞破碎粗提物中进行分析,但未检测到 PYC 的活力。推测原因,可能是因为破碎棒杆菌的过程较为剧烈,或是常规的破碎条件不够适宜, PYC 酶蛋白中某些与酶活相关的因子或结构(如前所述的一些保守区域)被破坏,导致在粗提物中测不到酶活。这可能就是以前人们一直认为 *C. glutamicum* 中只有 PPC 而没有 PYC 的主要原因。Peters-Wendisch 等人建立了一种方法<sup>[9]</sup>,先将细胞用一定浓度的 CTAB 处理后,再用谷草转氨酶偶联法分析,检测到了 *C. glutamicum* 中 PYC 的活力。本工作在 CTAB 处理细胞后,结合苹果酸脱氢酶偶联测定法,首次证实 *C. crenatum* 中有丙酮酸羧化酶存在,重组子与供体菌相比酶活力提高 5 倍。有关丙酮酸羧化酶在 *C. crenatum* 的回补网络中对碳流的调节作用的研究正在进行中。

表 2 各菌株的丙酮酸羧化酶活性比较

Table 2 The activity of PYC in different strains

Strains ( plasmid )	CD945	CD945 ( pJC1 )	CD945 ( pJK105 )
Specific activity	6.0	5.3	34.0
U / ( mg dry cell wt )			

参 考 文 献

[ 1 ] Modak H V , Kelly D J . Acetyl-CoA-dependent pyruvate carboxylase from the photosynthetic bacterium Rhodobacter capsulatus : rapid and efficient purification using dye-ligand affinity chromatography , *Microbiology* ,1995 ,**10** 2619 ~ 2628 .  
[ 2 ] Gottschalk G , Bacterial metabolism , 2nd edn . Springer : New York Berlin Heidelberg , 1985 .  
[ 3 ] Petra G P W , Bettina S , Volker F W , et al . Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

- by *Corynebacterium glutamicum*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2001, **3** (2): 295 ~ 300.
- [ 4 ] 陈 琦,李玲阁.产 L-谷氨酸细菌 AS1.542 菌株的研究 I. 菌株的鉴定,微生物学报,1975, **15** (2): 119 ~ 124.
- [ 5 ] Cremer J, Eggeling L, Sahn H. Cloning the dapA dapB cluster of the lysine secreting bacterium *Corynebacterium glutamicum*, *Mol Gen Genet*, 1990, **220**: 478 ~ 480.
- [ 6 ] J. 萨姆布鲁克等编(金冬雁等译).分子克隆实验指南.第二版.北京:科学出版社,1992.
- [ 7 ] 沈天翔,那淑敏,肖文中,等.棒状类细菌电击转化中多种条件对转化效率的影响.生物工程学报,1995, **11** (3): 245 ~ 249.
- [ 8 ] Liebl W, Bayerl A, Schein B, et al. High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiol Lett*, 1989, **65**: 299 ~ 304.
- [ 9 ] Petra G P W, Caroline K, Kalinowski J, et al. Pyruvate carboxylase from *Corynebacterium glutamicum*: characterization, expression and inactivation of the *pyc* gene, *Microbiol*, 1998, **144**: 915 ~ 927.
- [ 10 ] Vellanoweth R L, Rabinowitz J C. The influence of ribosome-binding-site elements on translational efficiency in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* in vivo, *Mol Microbiol*, 1992, **6**: 1105 ~ 1114.
- [ 11 ] Lim F, Morris C P, Occhiodoro F, et al. Sequence and domain structure of yeast pyruvate carboxylase, *J Biol Chem*, 1988, **263**: 11493 ~ 11497.
- [ 12 ] Wexler I D, Du Y, Lisgaris M V, et al. Primary amino acid sequence and structure of human pyruvate carboxylase. *Biochim Biophys Acta*, 1994, **1227**: 46 ~ 52.
- [ 13 ] Kumar G K, Haase F C, Phillips N F B, et al. Involvement and identification of a tryptophanyl residue at the pyruvate binding site of transcarboxylase. *Biochemistry*, 1988, **27**: 5978 ~ 5983.
- [ 14 ] Rylatt D B, Keech D B, Wallace J C. Pyruvate carboxylase: isolation of the biotin-containing tryptic peptide and the determination of its primary sequence. *Arch Biochem Biophys*, 1977, **183**: 113 ~ 122.
- [ 15 ] Leon-del-Rio A, Gravels R A. Sequence requirements for the biotinylation of carboxyl-terminal fragments of human propionyl-CoA carboxylase  $\alpha$  subunit expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 22964 ~ 22968.

## Cloning, Sequence Analysis and Expression of Pyruvate Carboxylase Gene in *Corynebacterium crenatum* CD945 \*

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

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

**Abstract**: Pyruvate carboxylase gene (*pyc*) from a mutant *Corynebacterium crenatum* CD945 was cloned and expressed in its parent strain. Analysis of the *pyc* sequence shows that only one ORF exists, which codes 1140 amino acids using GTG as the initiation codon and TAA as the termination codon. The similarities among this ORF and those from *Corynebacterium glutamicum*, *Mycobacterium smegmatis* and *Saccharomyces cerevisiae* are 98.22%, 62.41% and 52.93%, respectively. The amino acid sequence deduced from the ORF shows homologies of 99.30%, 64.65% and 46% to those from the organisms above, respectively. Several motifs believed essential to the enzyme activity are found in this sequence, such as ATP and biotin binding sites. The gene was transformed into *C. crenatum* CD945. In CTAB-permeabilized cells, the enzyme activity was detected using the malate dehydrogenase coupling assay. Pyruvate carboxylase activity in the recombinant is about five-fold higher than that of the parent strain.

**Key words**: *Corynebacteria*, Pyruvate carboxylase, Amino acids

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

\*\* Corresponding author. Tel: 010-62554588; E-mail: dingjy@sun.im.ac.cn