

山梨糖脱氢酶基因在大肠杆菌染色体上整合及表达

高书颖^{1,2} 张惟材^{1*} 汪建华¹ 郭蔼光²

(¹ 军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

(² 西北农林科技大学生命科学院 杨凌 712100)

摘 要 :以质粒 pKF3 为模板,扩增出两翼与 *ptsG* 基因上下游序列同源,中间为氯霉素抗性基因的 DNA 片段,连至 pMD18-T 载体,构建得到 pMD18-PC。以质粒 pQE60-SDH 为模板,扩增山梨糖脱氢酶基因 *sdh*,与 pMD18-PC 连接,得到 pMD18-PC-SDH。将其用 *Pvu* II 酶切,回收含 *ptsG*₁-*cat-sdh-ptsG*₂ 的目的片段,电转化至 JM109/pKD46,在 Red 重组酶的作用下,外源 DNA 片段与染色体上对应区域发生同源重组,将基因 *ptsG* 敲除,替换为 *cat-sdh* 基因,获得整合 *sdh* 基因的 JM109s。经检测 JM109s 具有山梨糖脱氢酶活性。以 *ptsG* 基因上下游序列为引物, JM109s 基因组 DNA 为模板进行 PCR,扩增产物测序结果表明 *sdh* 基因染色体整合成功。

关键词 :山梨糖脱氢酶, Red 重组, 整合

中图分类号 :Q93 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2005)01-0139-03

在我国首创的维生素 C“两步发酵法”生产工艺中,首先由氧化葡萄糖杆菌(*Gluconobacter oxydans*, 俗称一步菌)将 D-山梨醇转化为 L-山梨糖,然后由普通生酮基古龙酸菌(*Ketogulonigenium vulgare*, 俗称小菌)及其伴生菌(大菌)组成的混合菌体系将 L-山梨糖转化为 Vc 前体 2-酮基-L-古龙酸(KGA)。我们从小菌中分离得到一种新的山梨糖脱氢酶及编码该酶的基因,并在大肠杆菌中对该基因进行了高效表达,表达产物在体外实验条件下能够将山梨糖转化为 KGA^[1]。本文采用 Red 重组技术将编码山梨糖脱氢酶的基因整合在大肠杆菌染色体上,实现了该酶的稳定表达。

Red 重组是新近发展起来的一种可以在染色体水平上进行分子克隆操作的新技术,在 λ 噬菌体 *gam*、*bet* 和 *exo* 3 个基因产物的作用下,染色体 DNA 能够与一段线性 DNA 片段通过两翼较短的同源序列高频重组,使外源片段整合在染色体上,同时染色体对应的序列被置换下来,这一技术可用于外源基因在宿主染色体上的整合、染色体上特定序列的敲除和回收^[2]。国内近来也有一些关于 Red 重组的报道^[3,4]。本文构建了两端含有与靶基因同源序列,中间为抗性基因和山梨糖脱氢酶的表达载体,将载体酶切为线性片段,通过电转化导入大肠杆菌,籍 Red 重组将染色体上 *ptsG* 基因置换下来,得到具有抗生素抗性和山梨糖脱氢酶的整合菌株。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 :大肠杆菌(*Escherichia coli*)JM109 由本室保存。pQE60-SDH 系含普通生酮基古龙酸菌 SCB329 *sdh* 基

因的质粒,由本室构建。pKD46 为携带 λ 噬菌体 *gam*、*bet* 和 *exo* 基因的温敏型复制质粒,上述 3 种基因受阿拉伯糖启动子调控,由美国 Purdue 大学 Wanner 教授惠赠。

1.1.2 主要试剂 :pKF3、pMD18-T、限制性内切酶及 *Ex* Taq 聚合酶购自 TaKaRa 公司,兔抗 SDH 抗体为本室制备,其他均为市售分析纯试剂。

1.1.3 引物设计和合成 :引物 P1 和 P2 系根据 *ptsG* 和 *cat* 基因序列设计,可供扩增氯霉素抗性完整基因,扩增片段两翼各包含一段长为 40bp 的 *ptsG* 基因两端的序列(用斜体表示),靠近 3'端的 17 个碱基与 *cat* 基因序列同源。引物 P3、P4 系根据 pQE60-SDH 序列设计,用于扩增 T5 启动子控制下的 *sdh* 基因。引物 P5 和 P6 系根据 *ptsG* 基因上下游序列设计,位于同源重组序列外侧,用于重组子检测。各引物序列如下 : P1 :5'-GATGCCCTGTACACGGCAGGCTCTCCCCCTTGCCACGCTCAGTGAACCTCCGTCG-3' ; P2 :5'-GCAGCCATCTGGCTGCCTTAGTCTCCCCAACGCTTACGGTGTAAAACGCTCGAAGGCC-3' ; P3 :5'-GGGGTACCGTTCGCGCACATTTCG-3' ; P4 :5'-AGCCCTGCAGGCC TGAAAATCTCGCCAAGC-3' ; P5 :5'-CGCTTCCCGCCTTCAATCC-3' ; P6 :5'-GACGCCGTATGGCACCTTCG-3'。引物合成由上海博亚生物技术公司完成。

1.2 DNA 操作和 *E. coli* 转化

DNA 的酶切、连接、转化参照文献 5 进行。

1.3 SDH 表达的检测

参照文献 5 用 Western 印迹法进行。

1.4 SDH 活性分析和检测

SDH 活性分析参照文献 6 的方法进行。根据该方法略

* 通讯作者。Tel :86-10-66948826 ; E-mail : zhangweicai@hotmail.com

作者简介 :高书颖(1970-),女,河南唐河人,西北农林科技大学博士研究生,研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail : shuyinggao@163.com

收稿日期 2004-06-21,修回日期 2004-09-28

加修改可进行 SDH 的定性检测。在酶标板中加入 250mmol/L Tris-马来酸缓冲液 (pH8.0) 50 μ L, 0.5mmol/L DCIP 50 μ L, 5mmol/L PMS 50 μ L, 0.625mol/L L-山梨糖 50 μ L, 细菌培养液 50 μ L, 立即混匀, 30 $^{\circ}$ C 避光放置。反应液在 10min 内褪色为 SDH 酶阳性。

1.5 细胞的超声破碎

5mL 细胞培养物离心收集菌体, 加入 1mL 50mmol/L Tris-HCl 超声破菌, 离心后取上清用于检测 SDH 表达。

1.6 电转化

采用 BioRad 公司 MicroPulser 电穿孔仪进行 0.2cm 电转化杯, 转化参数为 2.5kV, 5.1ms。电转化后 37 $^{\circ}$ C 培养 1h, 涂抗性平板筛选。

2 结果

2.1 重组质粒 pMD18-PC-SDH 的构建

以 P₁、P₂ 为引物, 质粒 pKF3 为模板, 扩增 *cat* 基因。PCR 反应体系 (50 μ L): 10 \times *Ex Taq* Buffer 5 μ L, dNTP Mixture (各 2.5mmol/L) 4 μ L, P₁ (10pmol/L) 1 μ L, P₂ (10pmol/L) 1 μ L, pKF3 (10ng/ μ L) 1 μ L, *Ex Taq* (5U/ μ L) 0.25 μ L, ddH₂O 37.75 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 54 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 60s, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5min。电泳回收 1100bp 片段。

将上述获得的扩增片段连至 pMD18-T 载体, 构建得到含 *cat* 基因的质粒 pMD18-PC, 在 *cat* 基因两端为 40bp 的 *ptsG* 基因同源序列。以 P₃、P₄ 为引物, 质粒 pQE60-SDH 为模板, 扩增 *sdh* 基因, 50 μ L PCR 反应体系同上。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 60 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 90s, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5min。回收扩增产物 2091bp 片段, 用 *Nhe*I 和 *Stu*I 酶切。将 pMD18-PC 用 *Nhe*I 和 *Stu*I 酶切, 回收 3765bp 片段。连接上述两片段, 得到含 *cat* 和 *sdh* 基因的质粒 pMD18-PC-SDH (图 1)。其中 *cat* 和 *sdh* 基因串联插入 pMD18-T 载体的多克隆位点, 40bp 的 *ptsG* 基因两翼同源序列位于串联基因的两端。以 pMD18-T2-SDH 质粒为模板, P3 和 P4 为引物, 通过 PCR 扩增得到大小为 2091bp 的产物。质粒经 *Nhe*I 和 *Stu*I 双酶切, 与预期产物大小相吻合, 表明载体构建正确 (图略)。

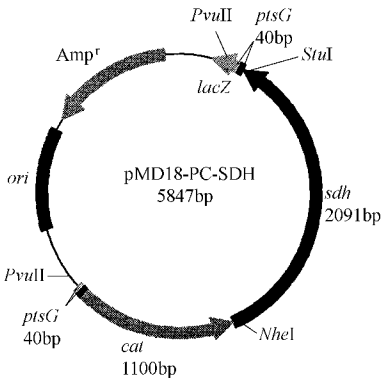


图 1 质粒 pMD18-PC-SDH 物理图谱

Fig.1 Physical map of pMD18-PC-SDH

2.2 JM109/pMD18-PC-SDH 的 SDH 表达和酶活性检测

收集 JM109/pMD18-PC-SDH 菌体, 超声破菌, 上清 Western

检测结果显示有 SDH 表达 (图 2), DCIP 检测有 SDH 酶活性 (图略)。Western 印迹检测阳性对照选择高表达 SDH 的菌株 JM109/pQE60-SDH。图 2 显示实验菌株和阳性对照菌株所表达的 SDH 均有 2 条带, 这是由于部分表达产物被酶解为更小的片段 (待发表)。JM109/pMD18-PC-SDH 中小片段看起来不明显, 可能是 SDH 表达较低, 降解也少。

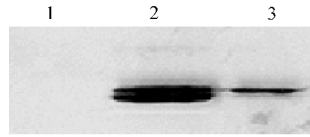


图 2 JM109/pMD18-PC-SDH 的 Western 印迹检测

Fig.2 Western blot of JM109/pMD18-PC-SDH

1. JM109 2. JM109/pQE60-SDH 3. JM109/pMD18-PC-SDH.

2.3 *sdh* 基因的整合

JM109/pKD46 电转化感受态细胞的制备参照文献 [7]。质粒 pMD18-PC-SDH 含有两个 *Pvu*II 酶切位点, 用 *Pvu*II 酶切后形成两片段, 电泳回收含 *ptsG*₁-*cat*-*sdh*-*ptsG*₂ 基因的 3483bp 片段, 电转化 JM109/pKD46, 在含有氨苄青霉素和氯霉素的 LB 平板上筛选整合子。

2.4 整合菌株的鉴定

以 *ptsG* 基因上下游序列 P5、P6 为引物, 整合菌株及对照菌株基因组 DNA 为模板, 对整合菌株进行 PCR 鉴定。反应体系 (50 μ L): 10 \times *Ex Taq* Buffer 5 μ L, dNTP Mixture (各 2.5mmol/L) 4 μ L, P₅ (10pmol/L) 1 μ L, P₆ (10pmol/L) 1 μ L, 基因组 DNA (50ng/ μ L) 1 μ L, *Ex Taq* (5U/ μ L) 0.25 μ L, ddH₂O 37.75 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 2min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。结果显示 *sdh* 整合菌株有 3610bp 条带, 为 *cat* 和 *sdh* 基因扩增产物, 对照菌株有 2017bp 条带, 为 *ptsG* 基因扩增产物, 初步说明 *sdh* 基因整合到 JM109 染色体上。Western 结果显示整合菌株有 SDH 表达 (图 3), 整合菌株 SDH 的表达量低于阳性对照菌株。DCIP 结果显示整合菌株有 SDH 酶活性 (图略)。将整合有 *sdh* 基因的 JM109/pKD46 命名为 JM109s/pKD46。

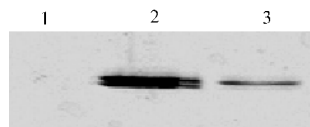


图 3 整合子的 Western 印迹检测

Fig.3 Western blot of integrant JM109s/pKD46

1. JM109 2. JM109/pQE60-SDH 3. JM109s/pKD46.

2.5 JM109s/pKD46 扩增产物的测序鉴定

将整合菌株 JM109s/pKD46 的扩增产物 3610bp 片段连入 pMD18-T 载体, 构建测序载体 pMD18-C-SDH。对测序载体的测序结果进行了序列分析。结果显示, JM109 染色体上的 *ptsG* 基因已为外源基因片段所替代, 并与预期结果吻合, 可以确定 *sdh* 基因已经整合到 JM109 染色体上, 置换了 *ptsG* 基因。而且酶活性检测结果也显示了 JM109/pMD18-C-SDH 有 SDH 酶活性 (图略)。

2.6 质粒 pKD46 的消除

将经过鉴定的整合子接种于 LB 培养液中, 42℃ 培养 2h, 再于 LB 平板上划线分离单菌落, 37℃ 培养, 将长出的单菌落分别接种在含氨苄青霉素和氯霉素的 LB 平板上, 选取氨苄青霉素敏感且具氯霉素抗性的菌株。得到消除质粒 pKD46 的整合 *sdh* 基因的 *ptsG* 缺陷菌株 JM109s。

2.7 整合菌株的遗传稳定性检测

挑取 1 株阳性克隆, 接种于不含抗生素的 LB 培养基中 37℃ 培养, 连续 5 代后稀释涂布在 LB 平板上, 挑取 100 个单菌落分别涂布于含氯霉素和氨苄青霉素的平板, 结果单菌落均在含氯霉素的平板上生长, 在含氨苄青霉素的平板上不生长。用 DCIP 检测传代后的菌株均有 SDH 酶活性, 说明 *sdh* 和氯霉素抗性基因在整合菌株中稳定存在。

3 讨论

ptsG 基因编码大肠杆菌磷酸转移酶系统(PTS)的酶 II BC^{Glc} , PTS 系统是大肠杆菌摄取葡萄糖的主要途径, 大肠杆菌葡萄糖磷酸转移酶系统由酶 I、HPr、酶 II A^{Glc} 和酶 II BC^{Glc} 组成, 酶 II BC^{Glc} 由基因 *ptsG* 编码, 对葡萄糖具有特异性。我们曾对该基因进行了敲除, 实验证明 *ptsG* 基因缺失, 对大肠杆菌的生长没有显著影响, 因此我们选择了该基因作为整合的靶位点^[7]。

在大肠杆菌中, 无论是染色体还是 BAC、YAC 等载体都可以利用 Red 重组技术进行基因敲除, 还可以把特定 DNA 片段整合到染色体的确定位置上。建立这一系统大大简化了基因敲除工作。在摄取葡萄糖的过程中, 大肠杆菌 PTS 系统的酶 II BC^{Glc} 、酶 II Man 、酶 II Fru 、酶 II Bgl 都可将葡萄糖转运入细胞内, 敲除基因 *ptsG* 后, 细胞可以通过其他途径吸收葡萄糖。

Wanner 等^[8]将 *gam*、*bet*、*exo* 基因置于受阿拉伯糖诱导的 P_{arab} 启动子的控制下, 构建了具有高效重组功能的低拷贝质粒 pKD46。这种重组系统的优点在于质粒 pKD46 具有温敏型复制子, 重组完成后可将 pKD46 从菌株中消除, 为进一步研究靶基因创造了条件。

本文将山梨糖脱氢酶基因整合到大肠杆菌染色体的确定位置上, 敲除 *ptsG* 基因, 实现了山梨糖脱氢酶基因在大肠杆菌中的稳定表达。为在大肠杆菌中研究维生素 C 发酵过程其它相关酶类及 PQ(山梨糖脱氢酶的辅酶)的生物合成奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 张惟材, 焦迎晖, 袁红杰, 等. 一种新的 L-山梨糖脱氢酶基因及其编码的蛋白质. 中国专利, 申请号 031020607.
- [2] 韩 聪, 张惟材, 游 松. Red 同源重组技术研究进展. 中国生物工程杂志, 2003, 23(12): 17-21.
- [3] 王恒梁, 冯玲玲, 史兆兴, 等. 用 Red 系统快速敲除痢疾杆菌 *asd* 基因. 军事医学科学院院刊, 2002, 26(3): 161-164.
- [4] 周建光, 洪 鑫, 黄翠芬. 重组工程及其应用. 遗传学报, 2003, 30(10): 983-988.
- [5] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [6] 薛震役, 尹光琳. L-山梨糖脱氢酶的纯化及性质的研究. 微生物学通报, 2000, 27(2): 89-92.
- [7] 韩 聪, 张惟材, 游 松, 等. 大肠杆菌 *ptsG* 基因敲除及其缺陷株生长特性研究. 生物工程学报, 2004, 20(1): 16-20.
- [8] Datsenko K A, Wanner B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. PNAS USA, 2000, 97(12): 6640-6645.

Integration and expression of *sdh* gene in *Escherichia coli*

GAO Shu-ying^{1,2} ZHANG Wei-cai^{1*} WANG Jian-hua¹ GUO Ai-guang²

(¹ Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China)

(² College of Life Science, Northwest Science and Technology of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract: The chloramphenicol-resistant cassette with short shared sequences of *ptsG* gene on both ends was PCR-generated from plasmid pKF3 and ligated to pMD18-T to construct pMD18-PC. The *sdh* gene for sorbose dehydrogenase was generated from plasmid pQE60-SDH and inserted into pMD18-PC, then pMD18-PC-SDH was constructed. It was digested with *Pvu* II and the target fragment *ptsG*₁-cat-*sdh*-*ptsG*₂ was recovered and electroporated into *Escherichia coli* JM109/pKD46. Homologous-recombination between linear DNA cassettes and *Escherichia coli* chromosomes took place by Red recombination. The detection result showed that the integron JM109s was of sorbose dehydrogenase activity. The PCR products assay using the upstream and downstream sequences of *ptsG* gene as primers and JM109s genomic DNA as template, indicated that *sdh* gene had been integrated at the *ptsG* gene site in *Escherichia coli*.

Key words Sorbose dehydrogenase, Homologous-recombination, *ptsG*

* Corresponding author. Tel: 86-10-66948826; E-mail: zhangweicai@hotmail.com

Received date: 06-21-2004