

# 短芽孢杆菌 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶基因在大肠杆菌中的克隆和表达\*

陈 炜 何秉旺 张建华 周 健 陈乃用

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 用 PCR 方法扩增短芽孢杆菌 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶基因, 引入原核表达载体 pBV220 中, 得到重组质粒 pALD1。pALD1 中的 ALDC 基因在大肠杆菌中高效表达, 每毫升发酵液产酶 80 单位以上, 比原始菌株提高 200 余倍。SDS-PAGE 蛋白质分析表明, 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  (pALD1) 表达的 ALDC 占细胞总蛋白量的 40% 以上。研究了重组质粒稳定性, 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  (pALD1) 和 HB101 (pALD1) 分别在无选择压力下 30 $^{\circ}$ C 连续培养 50 代以上, 41 $^{\circ}$ C 诱导不同时间, DH5 $\alpha$  (pALD1) 在热诱导 5 h 后, 未发现质粒不稳定性, HB101 (pALD1) 在热诱导 3 h 后, 质粒基本稳定, 但热诱导 5 h 后, 丢失质粒的细胞约占 70%。

**关键词**  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶, 基因表达, 大肠杆菌

$\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶 ( $\alpha$ -acetolactate decarboxylase, EC.4.1.1.5, 简称 ALDC) 催化 $\alpha$ -乙酰乳酸 ( $\alpha$ -acetolactate) 的脱羧作用, 生成乙偶姻 (acetoin; 3-羟基-2-丁酮) 和二氧化碳。ALDC 在啤酒生产中用于加速啤酒熟化过程, 缩短发酵周期, 此外, 也有可能用于葡萄酒和无水乙醇生产中。前文已报道<sup>[1]</sup>, 我们从几种细菌中筛选到十几株 ALDC 产生菌, 提取的 ALDC 应用在小规模啤酒发酵试验中, 效果良好, 但自然筛选的菌株酶活都很低<sup>[1~3]</sup>, 即使通过诱变和发酵条件的研究, 距离生产的要求仍较远。Diderichsen 等<sup>[4]</sup>将短芽孢杆菌 ALDC 基因克隆到大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中表达, 酶活大大提高。国内尚未见有关 ALDC 基因克隆和表达的报道。随着啤酒工业的发展, 国内对该酶的需求日益明显。为此, 我们将 ALDC 基因引入含  $P_{R}P_L$  启动子的大肠杆菌高效表达载体 pBV220 中, 使 ALDC 高效表达, 为 ALDC 的工业生产奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

供体菌短芽孢杆菌 (*Bacillus brevis*) ATCC11031 来自美国模式菌种保藏中心。质粒 pBV220 为中国预防医学科学院张智清等<sup>[5]</sup>构建, 含  $P_{R}P_L$  启动子的原核高效表达载体, 可表达外源基因, 产生非融合蛋白。受体菌大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 HB101 为本实验室保存的常用菌株。

### 1.2 酶和试剂

T4DNA 连接酶等工具酶及核酸和蛋白质分子量标准等分别购自 Promega 公司,

\* 北京市自然科学基金资助项目。

本文于1996年3月7日收到。

Sigma 公司, 华美公司, 中国医学科学院友谊公司等。TaqDNA 聚合酶购自中国科学院遗传学研究所。测定酶活用的有关试剂同前文<sup>[1]</sup>。

### 1.3 培养基和培养条件

LB 培养基用于细菌培养, 固体培养基添加 1.5% 琼脂。固体和液体培养基在需要时加入氨苄青霉素至 50 $\mu$ g / ml。重组质粒的种子培养和菌株诱导前的培养温度为 30 $^{\circ}$ C, 诱导培养温度为 41 $^{\circ}$ C。

### 1.4 分子克隆技术和表达产物的 SDS-PAGE 分析

参照文献 [6] 进行。

### 1.5 PCR 引物合成和基因扩增

根据短芽孢杆菌 ALDC 基因的 DNA 序列<sup>[4]</sup>, 设计和合成了两个引物:

引物 1 5' TAGAATTCATGAAAAAAAAATATCATCAC3'

引物 2 5' CCGTCTGACTCGCATGAGGCTGATTTA3'

引物 1 的 5' 端含 EcoRI 酶切位点, 引物 2 的 5' 端含 SalI 酶切位点。

从短芽孢杆菌 ATCC 11031 提取的染色体 DNA 作为 PCR 扩增的模板。PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 42 $^{\circ}$ C 复性 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 扩增反应 30 个循环。PCR 扩增产物经检测和纯化后用于酶切和连接。

### 1.6 ALDC 活力的测定

按前文<sup>[1]</sup>所述的方法定量测定 ALDC 活力。一个酶活单位的定义为在 30 $^{\circ}$ C 和 pH6.0 条件下, 1min 产生 1 $\mu$ mol 乙偶姻的酶量。

在质粒稳定性研究中定性测定 ALDC 活力的方法: 将点种菌落的 LB 平皿 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 用无菌牙签挑取一些细胞于 40 $\mu$ l 裂解缓冲液中 (50 mmol / L Tris-HCl, pH7.5, 1mg / ml 溶菌酶, 0.1% Triton-X-100) 37 $^{\circ}$ C 裂解 15min, 加 20 $\mu$ l  $\alpha$ -乙酰乳酸, 反应 10 min, 加入 0.5 ml 显色剂 (0.1% 肌酸, 1%  $\alpha$ -萘酚, 1mol / L NaOH), 10~20min 后观察颜色的变化, ALDC 阳性菌落为明显红色。

### 1.7 重组质粒的稳定性

基本按文献 [7, 8] 的方法检测重组质粒 pALD1 在大肠杆菌中的稳定性。重组大肠杆菌 DH5 $\alpha$  (pALD1) 和 HB101 (pALD1) 在无抗生素的培养基中连续培养 50 代以上, 再在 41 $^{\circ}$ C 诱导不同时间, 分别取样分析菌落对氨苄青霉素的抗性和 ALDC 活性。

## 2 结果和讨论

### 2.1 重组质粒的构建

图 1 为表达 ALDC 的重组质粒 pALD1 的构建过程。以提取的短芽孢杆菌染色体 DNA 为模板, 用合成的引物进行 PCR 扩增, 电泳检测扩增片段 (图 2), 扩增的 DNA 片段与预期的大小一致, 约 0.85kb。PCR 扩增产物用氯仿纯化后, 用 EcoRI 和 SalI 双酶切, 质粒 pBV220 也用 EcoRI 和 SalI 双酶切, 上述 DNA 均用电洗脱纯化回收, 再用 T4 DNA 连接酶连接后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞。用测定酶活和小量提取质粒的方法筛选到产 ALDC 的阳性克隆 DH5 $\alpha$  (pALD1)。

提取重组质粒 pALD1, 用限制性内切酶进行酶切分析, 图 3 是 pALD1 用 EcoRI 和

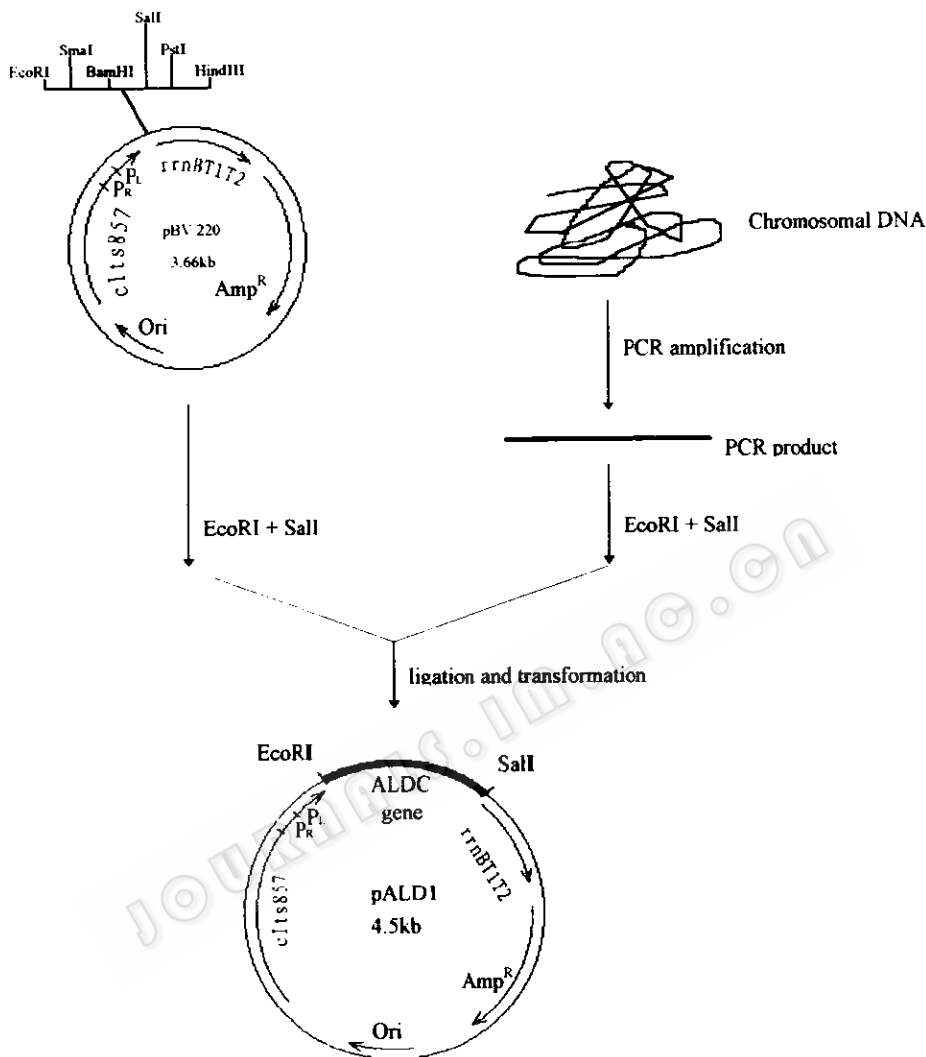


图1 重组质粒 pALD1 的构建

Fig.1 Construction of recombinant plasmid pALD1

SalI 双酶切后产生的 0.85kb DNA 插入片段和 3.6kb 的载体 DNA 片段, DNA 片段的大小和预期的结果一致。用 pALD1 转化大肠杆菌 HB101 和 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 得到的转化子全部都是 ALDC 阳性。

## 2.2 ALDC 活力的测定

重组大肠杆菌 HB101 (pALD1) 和 DH5 $\alpha$  (pALD1) 分别在 30 $^{\circ}$ C 培养到对数中期, 升温至 41 $^{\circ}$ C, 诱导 3 h 离心收集菌体, 超声波处理后测定 ALDC 活力。DH5 $\alpha$  (pALD1) 和 HB101 (pALD1) 发酵液的酶活力每毫升均在 80 单位以上。如 HB101 (pALD1) 培养到  $OD_{600} = 0.7$ , 诱导 3 h, 每毫升发酵液酶活 82.5 单位, DH5 $\alpha$  (pALD1) 热诱导 5 h, 每毫

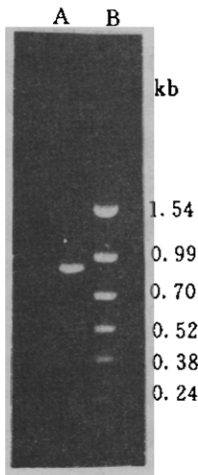


图2 短芽孢杆菌 ALDC 基因 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification product of ALDC gene from *Bacillus brevis*

A. PCR amplification product of ALDC structure gene;  
B. PCR molecular weight markers.

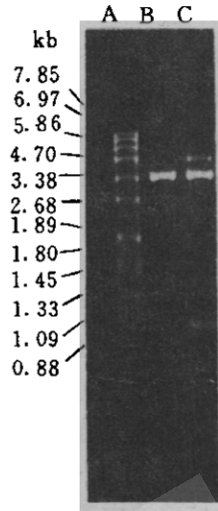


图3 重组质粒 pALDI 的酶切电泳图

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of pALDI digested with restriction enzymes

A. SPPI/EcoRI; B. pBV220/EcoRI/SalI;  
C. pALDI/EcoRI/SalI.

升发酵液产酶 157 单位，而原始菌株短芽孢杆菌在最适条件下每毫升发酵液产酶约 0.4 单位<sup>[3]</sup>，重组菌株比原菌株提高 200 余倍。

### 2.3 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

将 DH5 $\alpha$ (pALDI) 在 30 $^{\circ}$ C 培养至对数中期，41 $^{\circ}$ C 诱导 3 h。诱导前和诱导后分别取样，离心收集菌体。菌体直接溶于 SDS 样品缓冲液中，100 $^{\circ}$ C 处理 5 min，13 000 r / min 离心 5 min 除去不溶物，进行 12% SDS-PAGE 电泳分析。考马斯亮蓝染色后热诱导的样品比未诱导的样品有一条或两条很接近的特异的蛋白质带(图 4)，在 560nm 处进行薄层扫描(图略)，仪器自动积分结果表明细胞中表达的 ALDC 蛋白量占细胞总蛋白量的 40% 以上。据报道<sup>[4]</sup>，短芽孢杆菌 ALCD 的基因中有两个可能的信号肽加工位点，可切除 24 或 27 个氨基酸的信号肽，从基

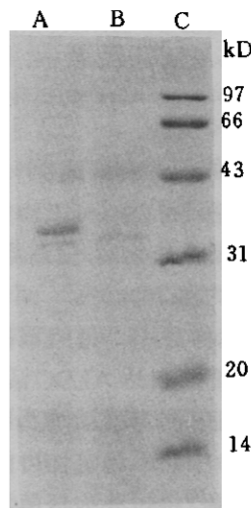


图4 重组质粒 pALDI 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of pALDI expression product  
A. Induced at 41 $^{\circ}$ C; B. Without induction;  
C. Protein molecular weight markers.

因工程菌株中提取的酶可以有两条蛋白带<sup>[4]</sup>。我们设计和扩增的 ALDC 基因包括编码信息肽的序列。

#### 2.4 DH5 $\alpha$ (pALD1) 和 HB101 (pALD1) 质粒的稳定性

在含氨苄青霉素的液体培养基中分别接种 DH5 $\alpha$  (pALD1) 和 HB101 (pALD1)，30℃ 培养过夜作为种子，将种子液按  $10^{-8}$  浓度接种到不含抗生素的新鲜培养液中，即将种子液稀释 100000 倍，取 50 $\mu$ l 接种到 50ml 培养基中，30℃ 培养过夜。如此再转接两次到不含抗生素的新鲜培养液中。每次转接时均将稀释的菌液涂在不含抗生素的 LB 平皿上，计数每批培养终了时的菌数和转接至下一批的菌数。计算细菌的生长代数方法为，第一次培养的代数为  $N_1$ ，接种的菌数  $\times 2^{N_1}$  = 培养终了时菌数，相同方法计算  $N_2$  和  $N_3$ ，总代数  $N = N_1 + N_2 + N_3$ 。最后一次细菌培养到  $OD_{600} = 0.8 \sim 1.0$ ，然后 41℃ 热诱导。诱导前和诱导后的不同时间分别取样，稀释后涂在不含抗生素的 LB 平皿上，再从每份样品取 100 个菌落点种在有氨苄青霉素的抗性平皿上，测定和计算每份样品中的菌落对氨苄青霉素的抗性的百分数 (表 1)。根据菌落计数计算的培养代数，各菌株在热诱导前均已在无抗生素的培养液中连续生长 50 代以上。

DH5 $\alpha$  (pALD1) 和 HB101 (pALD1) 在热诱导前在无抗生素的培养基中 30℃ 连续培养

表 1 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  (pALD1) 和 HB101 (pALD1) 中质粒的稳定性\*

Table 1 Plasmid stability of *E. coli* DH5 $\alpha$  (pALD1) and HB101 (pALD1)

菌株 Strains	抗性菌落的百分数 (%) Percentage of cells resistant to ampicillin					
	诱导时间 Time (h)					
	0	1	2	3	4	5
DH5 $\alpha$ (pALD1)	100	100	100	100	100	100
HB101 (pALD1)	99	97	97	94	58	29

细菌在无抗生素的培养基中 30℃ 连续培养 50 代以上，再在 41℃ 热诱导不同时间，检测细胞对氨苄青霉素的抗性。

Bacterial strains were cultivated in the absence of antibiotic at 30℃ for more than 50 generations, then induced at 41℃ for a period of time indicated. Examine the percentage of cells resistant to ampicillin.

50 代以上，检测的菌落全部或 99% 都抗氨苄青霉素。DH5 $\alpha$  (pALD1) 热诱导至 5 h，检测的全部菌落仍然都带抗性。HB101 (pALD1) 随着诱导时间的延长，抗性菌落逐渐减少。诱导 3 h 抗性菌落仍有 94%，随后质粒的丢失加快，诱导 5 h 后，抗性菌落只有 29%，即丢失质粒的细胞约占 70%。

在上述 12 组样品中，每组取抗性菌落 10 个测定 ALDC 活力，结果全部都是阳性。即带抗性的菌落都能表达 ALDC 活性。在 HB101 (pALD1) 不抗氨苄青霉素的菌落中，随机挑取的 20 个菌落测定酶活均为阴性，即细胞失去抗性也就失去酶活。这个结果表明 pALD1 在 HB101 中的不稳定性可能属于质粒的分离型不稳定性。

Diderichsen 等<sup>[4]</sup>将短芽孢杆菌 ALDC 基因克隆到大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中表达，最高表达水平分别为每毫升发酵液 74 单位和 51 单位。我们将 ALDC 基因引入温控型高效表达载体 pBV220 中，表达水平高于上述报道的水平。通过培养条件的研究还有可能进一步提高酶活。由于在分子克隆中使用的大多数载体都带有抗生素选择标记，而在工业生产中一般不希望使用抗生素，因此重组的工程菌株在无选择压力下质粒的稳定性至关

重要。我们研究了带 ALDC 基因的质粒 pALD1 在无选择压力下的稳定性。在无抗生素培养基中 30℃ 连续培养 50 代以上, 质粒保持稳定, 这个代数已大大超过实际生产所需的培养时间。DH5 $\alpha$ (pALD1) 在热诱导至 5 h(超过实际生产的诱导时间), 未发现任何质粒不稳定性。HB101(pALD1) 在热诱导时质粒稳定性较差, 若在生产中使用就必须严格控制诱导时间。

### 参 考 文 献

- [1] 陈 炜, 何秉旺, 杨家兴, 等. 微生物学通报, 1994, 21(2): 82~85.
- [2] Godtfredsen S E, Ottesen M. *Carlsberg Res Commun*, 1982, 47: 93~102.
- [3] Olsen F, Aunstrup K. 1988, Pat Appl EPO-128714.
- [4] Diderichsen B, wedsted U, Hedegaard L *et al. J Bacteriol*, 1990, 172(8): 4315~4321.
- [5] 张智清, 姚立红, 侯云德. 病毒学报, 1990, 6(2): 111~116.
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 1989.
- [7] Vehmaanpera J O, Korhola M P. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1986, 23: 456~461.
- [8] Pechan P, Bukovska G, Timko J *et al. Biotech Lett*, 1989, 11(10): 723~728.

## CLONING AND EXPRESSION OF $\alpha$ -ACETOLACTATE DECARBOXYLASE FROM *BACILLUS BREVIS* IN *ESCHERICHIA COLI*

Chen Wei    He Bingwang    Zhang Jianhua    Zhou Jian    Chen Naiyong

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

**Abstract** The  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase (ALDC) gene was amplified from *Bacillus brevis* by using PCR technique. The amplified 0.85kb DNA fragment was inserted into an expression vector, pBV220, to give the recombinant plasmid pALD1. ALDC gene in pALD1 was overexpressed by *E. coli* DH5 $\alpha$  (pALD1) and HB101(pALD1), the production of ALDC reached over 80 units / ml of the culture, 200 times more than the parental strain. The expressed ALCD protein in DH5 $\alpha$ (pALD1) accounted for more than 40% of the total protein in the recombinant *E. coli* cell. The stability of the plasmid pALD1 in *E. coli* was determined. *E. coli* DH5 $\alpha$ (pALD1) and HB101(pALD1) were cultivated in LB broth at 30℃ for more than 50 generations without antibiotic selection, then induced at 41℃ for up to 5 hours. The plasmid in DH5 $\alpha$ (pALD1) was proved to be stable, but about 70% of the plasmid in HB101(pALD1) was lost after 5 hours of heat induction.

**Key words**  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase (ALDC), Gene expression, *Escherichia coli*