

大肠杆菌丝氨酸羟甲基转移酶基因 (glyA)的克隆和表达*

沈天翔 那淑敏 喻国策 谢家仪 贾盘兴

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 利用插入失活及营养缺陷型互补法将大肠杆菌 K12 13kb 的 glyA 基因克隆到质粒 pBR329 中。将重组质粒酶切, 亚克隆, 确定 2.6kb PstI-EcoRI 亚克隆片段带有完整的 glyA 基因。共获得 12 株 glyA 基因重组菌, 对重组质粒进行了酶切鉴定。不同重组菌丝氨酸羟甲基转移酶 (SHMT) 活性及其酶表达量均不相同。受体菌未检测到丝氨酸的产生。重组菌株 JM109 (pSM13)、K12 (pSM13)、K12 (pSM14) 和 K12 (pSM15) SHMT 酶表达量分别占全菌可溶性蛋白的 15.7%、15.4%、11.8% 和 9.48%。

关键词 丝氨酸羟甲基转移酶, glyA 基因

丝氨酸羟甲基转移酶 (SHMT) 催化丝氨酸降解成甘氨酸和 5, 10-甲基四氢叶酸, 是细胞中一碳单位的主要提供途径。由于一碳单位在许多代谢途径中担当重要角色^[1], 因此 SHMT 基因 (glyA) 的表达引人注目。1981 年, Stauffer 等人^[2]克隆了大肠杆菌 glyA 基因, 并在 DNA 水平上研究了该基因的表达。

酶法生产氨基酸与传统的发酵方法相比它具有产量大、产率高、低纯化成本等优点, 特别是有些氨基酸, 由于其代谢途径较复杂或受严格的调控, 以发酵方法氨基酸积累量有限, 若能找到相应的酶促反应工艺以及廉价的反应前体, 将会使这些氨基酸的工业生产得到解决。丝氨酸可用于氨基酸混合液配制或化妆品添加剂, 也可以作为其它化合物合成的前体, 例如丝氨酸加吡啶在色氨酸合成酶催化下合成色氨酸^[3], 而丝氨酸本身可用 SHMT 催化甘氨酸加甲醛反应得到。根据 Hamilton^[4]的报道, 以酶促转化法在生物反应器中每升反应液中丝氨酸产量超过 400 g。

采用酶法生产氨基酸的关键之一是获得高活力的酶制备物, 而以基因工程手段高效表达酶蛋白成为解决此问题的重要途径。本工作利用营养缺陷型互补法克隆大肠杆菌 SHMT 基因, 并研究了该基因在多拷贝载体上的表达。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

见表 1。

* 国家“八五”攻关项目。

本文于 1996 年 9 月 17 日收到。

表1 细菌菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids

菌株和质粒 Strain and plasmid	特性及基因型 Properties and genotype	来源和参考 Source and references
质粒 Plasmid		
pBR322	Ap, Tc, 4.363kb	Lab collection
pBR329	Ap, Tc, Cm, 4.15kb	Lab collection
pUC19	Ap, 2.686kb	Lab collection
pSWY901	Ap, Km, a deriviat of pACYC177, 4.149kb	Lab collection
pSM11	13kb DNA fragmnt with glyA gene cloned in pBR329, 17.1kb	This work
pSM12	2.6kb subcloned fragment with glyA in pUC19, 5.286kb	This work
pSM13	2.6kb subcloned fragment in pBR329 6.75kb	This work
pSM14	2.6kb subcloned fragment in pBR322 6.963kb	This work
pSM15	2.6kb subcloned fragment in pSWY901 6.749kb	This work
菌株 Strain		
<i>E. coli</i> K12		Lab collection
<i>E. coli</i> JM109	recA1 supE44endA1 hsdR17 gyrA96 reIA1 thiΔ (lac-proAB)	Lab collection
<i>E. coli</i> GS245	pheA905, thi, Δ glyA, araD139, strA Δ lacU169	Lab collection

1.2 培养基和试剂

LB 培养基用于一般菌体培养,基本培养基用于转化子筛选和酶活力测定中的菌体培养,可根据具体要求添加:50 μg/ml 氨基酸(丝氨酸和甘氨酸添加量为 200 μg/ml),10 μg/ml 嘌呤和嘧啶,1 μg/ml 维生素 B₁,培养基中的抗生素浓度是:氨苄青霉素 50~100 μg/ml,氯霉素 20 μg/ml,卡那霉素 20 μg/ml。

1.3 DNA 提取

大肠杆菌染色体提取方法参照文献[2];质粒 DNA 采用碱法提取,并以 PEG 沉淀去除 RNA。

1.4 染色体 DNA 酶切和片段分离

将 30 μl 染色体 DNA 溶于 300 μl 缓冲液中,并加入 3 μl (30 个单位)的限制内切酶 EcoRI 水解 3h。琼脂糖凝胶电泳检查酶切效果。待达到完全酶切,加 TE 缓冲液至总体积 1ml。

以 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 0.15 mol/L NaCl 溶液配制 10%、20%、30% 和 40% 四种浓度的蔗糖溶液。在离心管中铺制 10%~40% 四个浓度的蔗糖梯度。4℃ 放置过夜后,将 1ml 溶有酶切 DNA 片段的 TE 溶液加在蔗糖液表面上,20℃ 下离心(Beckman 离心机,SW28 转头)22 h。按每管 0.4ml 穿刺收集,并以电泳检查各收集管中 DNA 片段大小分布和含量。合并后用 TE 缓冲液透析去除高浓度的蔗糖。

1.5 克隆策略

大肠杆菌 K12 染色体 DNA 以限制性内切酶 EcoRI 完全降解,利用蔗糖梯度离心法将 EcoRI 酶切片段的 10~20 kb 部分分出,以用于以后的连接反应,以缩小筛选阳性克隆的范围。

采用 pBR329 作为初级克隆的载体,用 JM109 作为初级克隆的受体菌,采用插入失活方式,筛选 Tc^r、Cm^r 的重组转化子。将这些转化子分成若干组,提取总质粒,再转化大肠杆菌 GS245,筛选 Tc^r、glyA⁺ 阳性转化子。

1.6 酶活力测定

参照文献 [3]。

1.7 丝氨酸的测定

参照 Hsiao^[3]的方法,用 Beckman 6300 高效氨基酸分析仪直接测定丝氨酸的形成。根据蛋白量计算出每毫克酶蛋白产生丝氨酸的毫摩尔数。

1.8 全菌蛋白电泳及基因表达量的测定

SDS-PAGE方法参照文献 [5]。胶浓度 13%,电泳后用考马斯亮兰 R250 染色 2 h,洗去背景后用 CS-9000 (日本产)扫描仪在波长 560 nm 进行凝胶蛋白扫描,低分子量标准蛋白为 Pharmacia 产品。

2 结果和讨论

2.1 大肠杆菌 glyA 基因的克隆

采用插入失活筛选方法,共获得约 870 个 Tc^r、Cm^r 重组转化子,提取 15 个转化子中的质粒做电泳检查,结果发现绝大多数重组质粒中都有较大的插入片段(大于 9~10kb)。将

表2 不同宿主中的重组质粒对丝氨酸产生及SHMT活力的影响

Table 2 The effect of recombinant plasmids in different hosts on serine production and SHMT activity

菌株/质粒	OD ₆₀₀	丝氨酸 Serine (nmol/ml)	丝氨酸 Serine (nmol/mg)	SHMT (u/mg)
GS245/pSM12	0.252	0	0	0
JM109/pSM12	0.170	0	0	0
JM109/pSM13	0.560	222.20	300.3	33.38
GS245/pSM13	0.310	115.79	209.3	26.37
K12/pSM13	0.890	258.67	266.9	30.29
K12/pSM14	0.760	277.74	222.0	30.40
K12/pSM15	0.780	70.30	96.9	15.38
JM109/pSM15	0.770	37.37	30.6	—
GS245/pSM15	0.310	6.92	16.1	—
K12	0.770	0	0	0
JM109	0.465	0	0	0.96
GS245	0.350	0	0	0

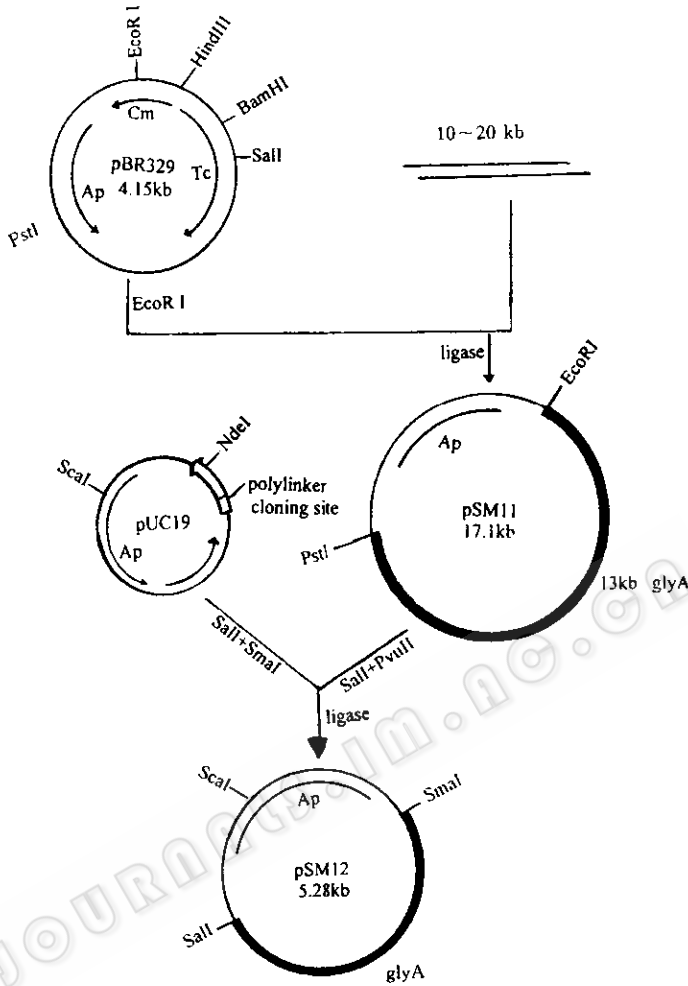


图1 重组质粒pSM12的构建

Fig.1 Construction of recombinant plasmids pSM12

800 多个转化子分成 21 组, 每组 40~50 个转化子, 提取各组的混合质粒, 转化大肠杆菌 GS245, 在 21 组混合质粒的转化实验中, 发现其中三组得到 Tc^r, glyA⁺ 阳性转化子。

提取阳性转化子中的质粒, 再次转化, 在基本培养基上长出许多阳性转化子。质粒 DNA 酶切电泳实验也证实重组质粒中 13kb 插入片段 DNA 酶切图谱与已报道的基本相同。我们将这个质粒命名为 pSMII。

根据酶切图谱, 将带 glyA 基因的 SalI-PvuII(部分酶切)酶切的 2.6kb 片段插入 pUC19 的 Sal I-Sma I 切点之间。转化 GS245, 同时得到 Ap^r, glyA⁺ 的阳性转化子, 其中的质粒称之为 pSM12(图 1)。用 PstI + EcoRI 酶切将 2.6kb 片段由 pSM12 中切出并装入 pBR329、pBR322 和 pSWY901 的相应位点中, 得到的重组质粒分别命名为 pSM13、pSM14 和 pSM15, 这些重组质粒的酶切图谱见图 2。

2.2 带重组质粒的重组菌株产丝氨酸及 SHMT 活性的比较

表 2 是不同重组菌产丝氨酸和 SHMT 活力的比较。由于 SHMT 水平不同, 带重组质

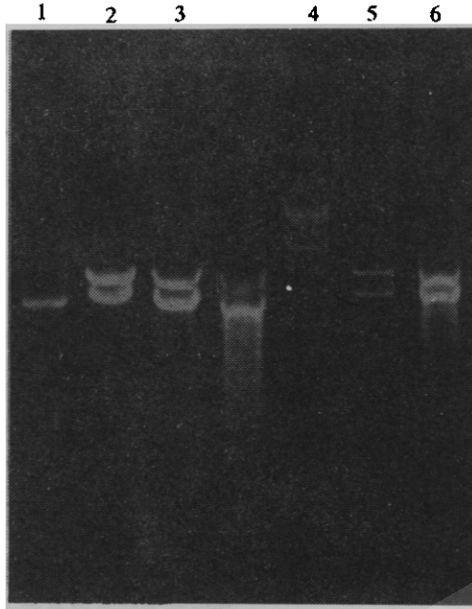


图2 重组质粒的琼脂糖凝胶电泳

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of recombinant Plasmids (in different host)

1. pSM12DNA / EcoRI + PstI; 2. pSM13DNA / EcoRI + PstI; 3. pSM13DNA / EcoRI + PstI;
4. SPPIDNA / EcoRI; 5. pSM15DNA / EcoRI + PstI; 6. pSM14DNA / EcoRI + PstI.

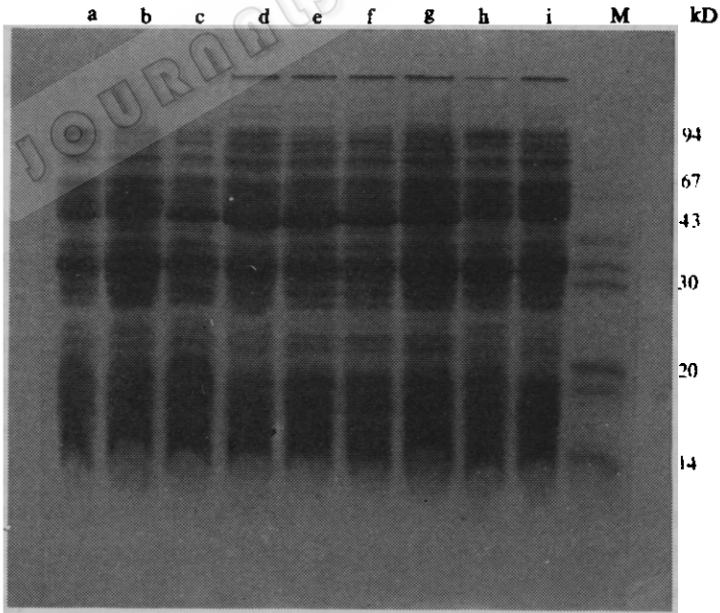


图3 重组菌表达产物的 SDS-PAGE图谱

Fig.3 SDS-PAGE of gene products expressed with recombinant strains

- a. GS245(pSM11); b. GS245(pSM12); c. GS245(pSM13); d. JM109(pSM13); e. K12(pSM13);
f. K12(pSM14); g. K12(pSM15); h. GS245; i. JM109, M. Marker.

粒的不同菌株产丝氨酸量有很大差别。基因数目的不同(使用不同拷贝数的质粒载体)对酶活力的表达有影响。重组质粒 pSM12 的质粒载体是 pUC19, 拷贝数高, 但可能由于产物积累过多, 不但菌体生长缓慢, 几乎不产丝氨酸。重组质粒 pSM13 和 pSM14 的载体分别是 pBR329 和 pBR322, 拷贝数差不多, 在不同宿主中产丝氨酸和 SHMT 活性相近。pSM15 的载体是 pSWY901, 该质粒由 pBR322 的 EcoRI-PstI 片段与低拷贝质粒 PACYC177 重组而成, pACYC177 拷贝数少, 所以 SHMT 活力也相对低些。

2.3 glyA 基因的表达

重组菌 GS245(pSM13)、JM109(pSM13)、K12(pSM13)、K12(pSM14) 和 K12(pSM15) 蛋白电泳结果见图 3。与标准蛋白相比, glyA 基因蛋白产物的分子量为 46 500, 与文献 [6] 的报道一致。在波长 560nm 对图 3 中 a~i 凝胶蛋白扫描(图略)的结果表明, 上述各重组菌 SHMT 酶表达量分别占全菌可溶性蛋白的 10.71%、15.77%、15.40%、11.84% 和 9.48%, 而宿主菌 GS245 和 JM109 的相应带只占 0.292% 和 0.455%。

参 考 文 献

- [1] Stauffer G V, Baker C A, Brechley J E. *J Bacteriology*, 1974, 20: 1071~1025.
- [2] Stauffer G V, Plamann M D, Stauffer L T. *Gene*, 1981, 14: 63~72.
- [3] Hsiao H Y, Wei T, Campbell K. *Biotechnology and Bioengineering*, 1986, 28: 857~867.
- [4] Hamilton B K, Hsiao H Y. *Tread in Biotechnology*, 1985, 3: 64~68.
- [5] 莽克强, 徐乃正, 方荣祥. 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 北京: 科学出版社, 1975.
- [6] Plamann M D, Stauffer G V. *Gene*, 1983, 22: 9~18.

CLONING AND EXPRESSION OF THE *E. COLI* SERINE HYDROXYMETHYLTRANSFERASE GENE (glyA)

Shen Tianxiang Na Shumin Yu Guoce Xie Jiayi Jia Panxing

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract The *E. coli* K12 glyA gene(13kb), encoding serine hydroxymethyltransferase (SHMT), has been cloned in the plasmid vector pBR329 using insertion inactivation and complementation test. Subcloning of segments of the original insert (13kb) into plasmids pBR322, pBR329 and pSMY901 established that a 2.6kb PstI-EcoR fragment carries the glyA gene. The 12 strains of transformants containing recombinated plasmid. were obtained. SHMT and glyA gene product level in strains carrying glyA plasmids were different. No SHMT activity was observed in host strains. The glyA gene products for JM109(pSM13), K12(pSM13), K12(pSM14) and K12(pSM15) account for 15.7%, 15.4%, 11.8%, and 9.48% of the total dissoluble cell protein, respectively.

Key words Serine hydroxymethyltransferase (SHMT), glyA gene