

嗜热细菌木糖异构酶基因 *xylA* 在酿酒酵母中的高效表达*

鲍晓明 高 东 王祖农

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

提 要 采用 PCR 技术克隆得到嗜热细菌 *Clostridium thermohydrosulfuricum* 木糖异构酶 (xylose isomerase XI) 基因 *xylA*, 将该基因连接于酵母表达载体 pMA91 的磷酸甘油激酶 (PGK) 启动子下, 得到重组质粒 pBX-1。通过 LiAc 完整细胞转化法将重组质粒转移至酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) H158 受体菌中, 得到重组酵母转化子 H612, 酶活测定结果表明, 成功地在酿酒酵母中得到木糖异构酶的活性表达。SDS-PAGE 电泳结果显示出明显的特异性表达产物带, 单体分子量为 43kD。由酿酒酵母重组子 H612 产生的木糖异构酶最高酶活条件与其在自然状态下的一致, 均为 85℃, pH7.0, 在这一条件下酶的比活力为 1.0U/mg 蛋白, 而在接近酵母最适生长温度的 30℃ 和 40℃ 时, 其相对酶活分别下降 3.7% 和 11%。研究结果显示在酿酒酵母中得到木糖异构酶的活性表达, 为进一步在酿酒酵母菌中建立新的木糖代谢途径打下了基础。

关键词 木糖代谢 木糖异构酶 *xylA* 酿酒酵母

分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)01-0049-54

代谢工程 (metabolic engineering) 也称途径工程 (phthway engineering), 是基因工程的一个重要分支, 一般为多基因的基因工程。改变代谢流向, 开辟新的代谢途径是代谢工程的主要目的之一^[1~3]。

木糖是除葡萄糖以外自然界中含量最为丰富的单糖之一, 其广泛存在于可再生的木质纤维素材料中, 如农副产品及林产业的木质废弃物, 以及以农产、林产品为原料的工业如造纸厂废弃物中^[4]。当前随着能源危机和环境污染的日益严重, 对再生资源的利用已受到广泛的关注, 其中对木糖的利用, 特别是通过微生物转化木糖产生乙醇的研究也成为热点之一^[1, 2, 5~7]。自然界中存在着某些利用木糖的丝状真菌、酵母菌如树干毕赤氏酵母 (*Pichia stipitis*)、休哈塔假丝酵母 (*Candida shehatae*) 和细菌如大肠杆菌 (*E. coli*)、克氏杆菌属 (*Klebsiella* sp.) 等^[7]。在利用木糖的真菌中, 木糖首先经依赖 NADPH 的木糖还原酶 (xylose reductase, XR) 还原形成木糖醇, 再由依赖 NAD⁺ 的木糖醇脱氢酶 (Xylitol dehydrogenase, XDH) 酶促反应形成木酮糖^[8, 9]。而利用木糖的细菌中则是在木糖异构酶的作用下直接转化木糖形成木酮糖^[10]。酿酒酵母菌由于缺乏将木糖转化为木酮糖的酶, 而不能利用木糖, 但其可以代谢木糖的异构体形式——木酮糖。木酮糖由木酮糖激酶催化形成 5-磷酸木酮糖, 然后进入磷酸戊糖途径 (PPP 途径), 并经糖酵解途径或在厌氧条件下产生乙醇, 或在好氧条件下经 TCA 循环彻底氧化^[5, 7]。通过代谢工程手段引入木糖代

* 山东省自然科学基金资助项目 (No. Q97D01133)

收稿日期: 1997-04-25, 修回日期: 1998-01-12

谢基因,以改变酿酒酵母的代谢途径,使其利用木糖的研究已有不少报道^[5,11,12]。

木糖异构酶(XI)(EC 5.3.1.5)在细胞体内催化木糖转化成木酮糖,在体外可以转化葡萄糖形成果糖,在工业上用于生产高果糖浆。由于直接完成木糖的木酮糖的转化,并且不需要任何辅助因子,最初认为是构建利用木糖酿酒酵母代谢工程菌株的便利途径。*E. coli*、*Actinoplanes missouriensis*、*Bacillus subtilis* 和 *Lactobacillus pentosus* 的木糖异构酶基因 *xylA* 曾先后被克隆于酿酒酵母菌中,但均没有得到有活性的表达^[13~16],这一结果一直没有充分的理由予以解释。为此在酿酒酵母中引入木糖 \leftrightarrow 木糖醇 \leftrightarrow 木酮糖的真菌木糖代谢途径的工作成为构建利用木糖酿酒酵母的另一尝试,大量结果^[5,6,8,12]表明,虽然这条途径上的木糖还原酶基因 *XYL1* 和木糖醇脱氢酶基因 *XYL2* 在酿酒酵母菌中均得到高活性的表达,但由于这两步可逆反应的 K_m 值及两酶所用的辅酶不同造成氧化还原平衡失调的影响,导致中间代谢产物木糖醇的积累,严重影响乙醇的形成,使得构建利用木糖酿酒酵母菌的工作处于徘徊的局面,因而有必要重新探讨木糖异构酶在酿酒酵母中的表达及其对发酵木糖产生乙醇的影响。

由于嗜热细菌 *Clostridium thermohydrosulfuricum* 的木糖异构酶基因 *xylA* 在茄科植物细胞中得到活性表达(个人通讯),因而本文克隆该基因,并转化酿酒酵母,以期在酿酒酵母菌中得到木糖异构酶基因的活性表达。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒及基因

E. coli DH5 α [F⁻ Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *deoR* *recA1* *endA1* *hsdR1*(*rk*⁻ *mk*⁺) *supE44* λ ⁻ *thi*-1 *gyrA96* *relA1*] (GIBCO BRL, Gaithersburg, Md.) 用于亚克隆。

S. cerevisiae GPY55-15Ba 又名 H158(*leu2-3 leu2-112 ura3-52 trp1-289 his4-519 prbl cir*⁺) 来自美国加州大学,用于转化的酵母受体菌株。

用于 *xylA* 基因表达的质粒为酵母表达质粒 pMA91,其携带有酵母的磷酸甘油激酶(PGK)的启动子,为 *E. coli* 与 *S. cerevisiae* 之间的穿梭载体,在 *E. coli* 中的选择标记为 *amp*^r,而在 *S. cerevisiae* 中的选择标记为 *LEU*⁺。

C. thermohydrosulfuricum HB8 来自 ATCC 编号 ATCC33223。

1.2 培养基

E. coli 用 LB 培养基,添加 50 μ g/mL 氨卞青霉素以选择转化子。*S. cerevisiae* 用完全合成培养基(SC⁺) 0.67% 不含氨基酸的酵母氮源(YNB),2% 葡萄糖并添加必要的氨基酸及维生素^[5]。选择培养基则根据质粒的选择标记在配方中去掉相应的氨基酸,记作 SC-leu 等。

1.3 核酸操作程序

标准核酸操作程序参照文献^[17]及有关公司提供的操作手册进行。经琼脂糖凝胶电泳分离的 DNA 片段的回收采用美国 Biochemicals 公司的 GeneClean 试剂盒,PCR 反应采用美国 ERKIN-PELMERD 的 PCR 仪。

1.4 *E. coli* 及 *S. cerevisiae* 的转化

E. coli 的转化采用常规 CaCl_2 法 ;*S. cerevisiae* 的转化参照 Schiestl 等人^[18]的 LiAc 完整细胞转化法。

1.5 SDS-PAGE 电泳

采用 Lamoni 不连续缓冲系统的 SDS-PAGE 电泳 ,操作程序参照文献 [17]及有关公司提供的操作手册进行。表达产物在菌体可溶性蛋白中所占的比例用光密度薄层扫描确定。

1.6 酶粗提液的制备

酿酒酵母转化子摇瓶培养在 SC 选择培养基中至对数生长期 ,离心收集菌体 ,以 0.1 mol/L $\text{pH}7.0$ 的磷酸钠缓冲液离心洗涤两次 ,菌体悬浮于裂解缓冲液 (0.1 mol/L , $\text{pH}7.0$ 的磷酸缓冲液中含 0.5 mmol/L EDTA , 1 mmol/L PMSF , 0.5 mmol/L DTT)中 ,加入一定数量的玻璃珠 (直径 0.5 mm)在保持低温 ($<10^\circ\text{C}$)状态下 ,旋涡振荡器振荡处理 10 min 左右 ,在显微镜下镜检细胞的破碎程度 ,当破碎率达 90% 以上时停止振荡处理 ,将细胞破碎液离心 10 min (4°C $10\,000 \text{ r/min}$) ,收集上清液作为粗酶液 ,储存于 -20°C 用于测定酶活及蛋白含量。

1.7 酶活测定方法

木糖异构酶的活性以转化果糖为葡萄糖的能力表示之。将酶活反应液 $1000 \mu\text{L}$ (0.1 mol/L $\text{pH}7.0$ 的 HEPES 缓冲液 , 400 mmol/L 果糖 , 10 mmol/L MnCl_2 , $100 \mu\text{L}$ 酶粗提液)保温处理 10 min ,加 0.3 mL 50% 的三氯乙酸以终止反应。所产生的葡萄糖通过葡萄糖氧化酶试剂盒 (Sigma Diagnostics , St Louis)进行定量^[19] ,木糖异构酶的一个比活力单位 (U/mg)定义为每毫克酶蛋白每分钟转化底物的毫克分子数。

蛋白含量的测定按 Coomassie Blue 法 ,以牛血清蛋白为标准品。

1.8 木糖利用平板生长实验

在以木糖替代葡萄糖的培养基固体平板上 ,划线酵母菌株 , 30°C 培养 4 d ,观察菌株的生长状况。

2 结果和讨论

2.1 *C. thermohydrosulfuricum* 木糖异构酶基因 *xylA* 的克隆

参照 Dekker 等人^[10]报道的 *C. thermohydrosulfuricum* 中 *xylA* 基因的序列 ,并以计算机进行内切酶图谱分析 ,同时兼顾载体 pMA91 的克隆位点为 BglII ,因而设计 PCR 引物为 :

5'引物为 $5'-\text{GCGCTGATCATCTAGAATGTACGAGCCCAAACCGGAGCACAG}-3'$;

3'引物为 $5'-\text{GCTTTGATCATCTAGATCACCCCCGCACCCCCAGGAGGTACT}-3'$ 。

这对引物含有 BclI (斜体)及 XbaI (黑体)位点 ,前者可以与载体 pMA91 的克隆位点 BglII 进行粘性互补连接 ,但不再被这两种酶回收 ,因而加一 XbaI 的位点。引物中将原基因内的 GTG 起始密码改为酵母菌更偏爱的 ATG 起始密码。以 Boehringer Mannheim 公司新产的 Pwo-DNA 多聚酶进行 PCR 扩增 ,结果见图 1。回收 PCR 产物 ,经内切酶 BclI 酶切处理 ,与事先经 BglII 酶切并去磷酸化处理载体 pMA91 连接 ,转化 *E. coli* DH5 α ,得到转化子 ,随机挑取一定数量的转化子 ,小量制备质粒 ,通过 BamHI 酶切 ,鉴定其片段大小 ,以

确定结构基因的方向与转录方向一致,获得携带 *xylA* 基因的酵母重组质粒 pBX-I,见图2。图2显示 *xylA* 基因在 PGK 启动子控制下,酵母 PGK 启动子是组成型强启动子,适合在酿酒酵母中高效表达外源基因。

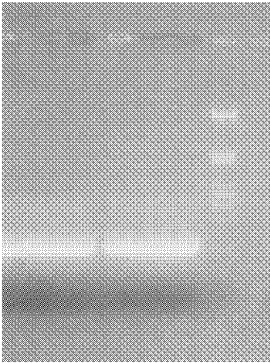


图1 PCR对 *xylA* 基因的扩增

Fig.1 Amplification of *xylA* gene by PCR
1. λ DNA/PstI 2. *xylA* Gene.

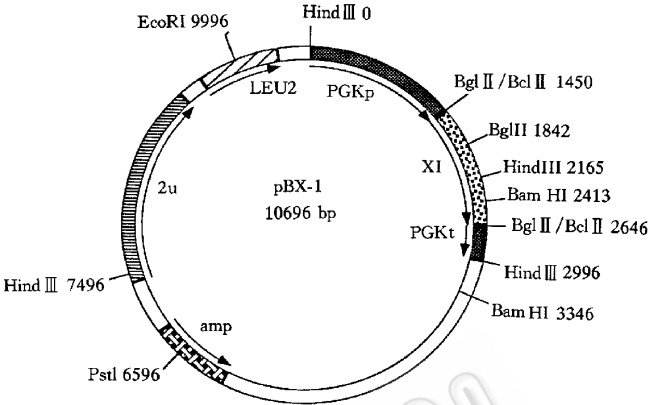


图2 重组质粒 pBX-1 的物理图谱

Fig.2 Physical map of recombinant plasmid pBX-1

2.2 外源基因 *xylA* 在酿酒酵母 H158 中的表达

上述重组质粒 pBX-1 通过 LiAc 完整细胞转化法转化酿酒酵母 H158,得到酵母转化子,以酵母转化子为模板进行 PCR 以及反转化到 *E. coli* 再酶切其中质粒以确定得到酵母转化子,编号为 H612。将 H612 培养在 SC 选择液体培养基中,30℃ 摇瓶培养 30 h,离心收集细胞,制备酶粗提液,取适量进行 SDS-PAGE 电泳,结果(图3)显示酵母重组菌株 H612 有明显特异性表达产物带产生,分子量为 43kD,这个分子量与 Dekker 等人^[10]报道的木糖异构酶单体的分子量相同。表明该木糖异构酶基因已在酿酒酵母中得到表达,530 nm 光密度扫描结果表明外源蛋白表达量约占可溶性蛋白的 30%。

2.3 酿酒酵母工程菌 H612 木糖异构酶的活性测定

以酿酒酵母工程菌 H612 的酶粗提液,分别测定不同温度及不同 pH 下木糖异构酶的酶活,结果见图4。图4-A显示,重组酵母转化子产生的木糖异构酶,在所测定的 22℃ 到 95℃ 的温度范围内,最适作用温度为 85℃,此时木糖异构酶的比活力为 1.0U/mg 蛋白。而温度在 30℃ 及 40℃ 时,该酶的相对酶活力分别仅有 4% 和 11%。这一结果暗示在酵母菌的最适生长温度下,此木糖异构酶的活力不会很高。图4-B显示重组酵母转化子产生的木糖异构酶最适 pH 为 7。重组酵母菌株 H612 的木糖异构酶的最适 pH 及最适温度均与其在 *C. thermohydrosulfuricum* 中相同^[10]。而对照菌株(H158-pMA91)在所测定条件下均未检测到木糖异构酶酶活。但利用木糖的平板实验表明,仅表达木糖异构酶的酿酒酵母

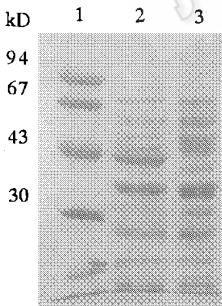


图3 SDS-PAGE 电泳图

Fig.3 Pattern of SDS-PAGE
1. Low-molecular weight standard;
2. Recombinants *S. cerevisiae* H612 with *xylA* gene;
3. Reference strain.

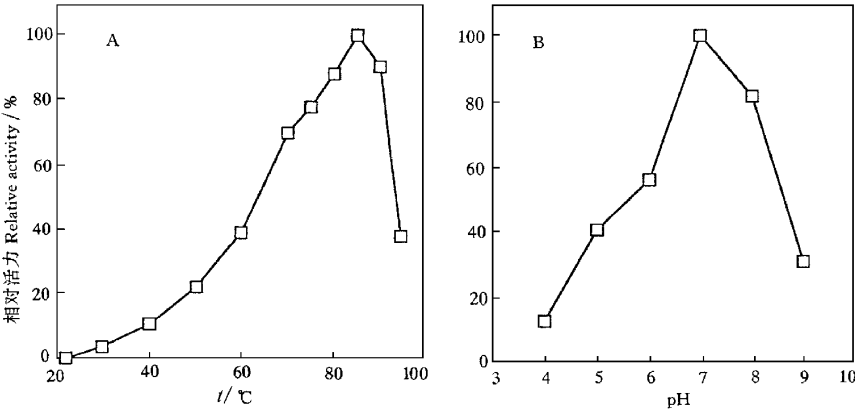


图 4 不同温度(A)及 pH(B)下重组酿酒酵母菌株的木糖异构酶活性

Fig. 4 The relative activity at different temperatures(A) and pH(B) of the recombinant isomerase

重组菌株 H612 在木糖平板上的生长状况与对照菌株相差不多。

本文将 *C. thermohydrosulfuricum* 的木糖异构酶基因 *xylA* 置于 PGK 启动子下,转化酿酒酵母,成功地在酿酒酵母中得到木糖异构酶的活性表达,由酿酒酵母重组子 H612 产生的木糖异构酶最高酶活条件与其自然状态下的一致,均为 85℃,pH7.0^[10]。在这一反应条件下,重组木糖异构酶的比活力为 1.0U/mg 蛋白,外源蛋白表达量占可溶性蛋白的 30%。

为了构建利用木糖酿酒酵母代谢工程菌株,曾先后将 *E. coli*、*Actinoplanes missouriensis*、*Bacillus subtilis* 和 *Lactobacillus pentosus* 的木糖异构酶基因 *xylA* 克隆于酿酒酵母菌中,虽然有些基因被翻译,但均没有得到有活性的表达^[13~16]。利用电脑数据库,分析上述细菌的木糖异构酶基因 *xylA* 密码在酿酒酵母中的使用频率,并不呈现一定的规律性,这似乎表明密码的使用频率并不是细菌基因在酿酒酵母中成功表达的关键。*C. thermohydrosulfuricum* 的木糖异构酶基因 *xylA* 在酿酒酵母中成功表达更主要的原因可能是较近的亲缘关系,从分类上看,嗜热细菌属于古细菌,许多特性比真细菌更接近酿酒酵母。比较几种细菌 *xylA* 基因的氨基酸序列,*C. thermohydrosulfuricum* *xylA* 基因的底物结合区域及催化区域与其他细菌有较大不同,而其他细菌木糖异构酶之间的这两个位点有较高的同源性^[10]。

本研究虽然得到细菌木糖异构酶在酿酒酵母中的活性表达,但利用木糖的平板生长实验表明,仅有该酶活性的酿酒酵母重组菌株 H612 仍不能利用木糖。根据代谢工程原理,今后的工作将通过引入磷酸戊糖途径(PPP 途径)上的关键酶基因,期望代谢工程菌株不仅可以利用木糖并产生乙醇。

参 考 文 献

[1] Ohta K, Beall D S, Mejia J P et al. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57** 2810~2815.
[2] Zhang M, Eddy C, Deanda K et al. *Science* 1995, **5267** 240~243.
[3] 郁竟怡, 杨胜利. 生物工程学报, 1996, **12** (2): 109~112.

- [4] Ladisch M ,Lin K W ,Voloch M *et al* . *Enzyme Microb Technol* ,1983 **5** 82~102.
- [5] Walfridsson M , Hallborn J ,Penttila M *et al* . *Appl Environ Microbiol* ,1995 **61** 4184.
- [6] Kotter P ,Ciriacy M. *Appl Microbiol Biotechnol* ,1993 **38** 776~783.
- [7] Hahn-Hagerdal B ,Hallborn J ,Jeppsson H *et al* . Petose fermentation to alcohol ,In Sadler J N ed. Bioconversion of forest and agricultural plant residues. Wallingford ,United Kingdom CAB International ,1993. 231~290.
- [8] Hahn-Hagerdal B ,Jeppsson H ,Skoog K *et al* . *Enzyme Microb Technol* ,1994 **16** 933~943.
- [9] Smiley K ,Bolen P L. *Biotechnol Lett* ,1982 **4** 607~610.
- [10] Dekker K ,Yamagata H ,Sakaguchi K ,*Agric Biol Chem* ,1991 **55** 221~227.
- [11] Schaaff-Gertenschlager I ,Miosga T ,Zimmermann F K. *Biores Technol* ,1994 **50** 59~64.
- [12] Tantirungki M ,Nakashima N ,Seki T *et al* . *J Ferment Bioeng* .1993 **75** 83~88.
- [13] Amore R ,Wilhelm M ,Hollenberg C P. *Appl Microbiol Biotechnol* ,1989 **30** 351~357.
- [14] Moes C J ,Pretorius I S van Zyl W H. *Biotechnol Lett* ,1996 **18** 269~274.
- [15] Ho N W Y ,Stavis P ,Rosenfeld S *et al* . *Biotechnol Bioeng Symp* ,1983 **13** 245~250.
- [16] Sarthy A V ,McConaughy B L ,Lobo Z *et al* . *Appl Environ Microbiol* ,1987 **53** 1996~2000.
- [17] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. *Molecular Cloning :Laboratory manual* . 2nd ed. New York Cold Spring Harbor Laboratory ,1989.
- [18] Schiestl R H ,Gietz D ,*Curr Genet* ,1989 **16** 339~346.
- [19] Trinder P. *Ann Clin Biochem* ,1969 **6** 24~27.

EXPRESSION OF XYLOSE ISOMERASE GENE(*xylA*) IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE FROM CLOSTRIDIUM THERMOHYDROSULFURICUM*

Bao Xiaoming Gao Dong Wang Zunong

(State Key Lab of Microbial Technology ,Shandong University Jinan 250100)

Abstract The *Clostridium thermohydrosulfuricum xylA* gene encoding xylose(glucose)isomerase was cloned in the yeast expression vector pMA91 under the control of the PGK promoter ,resulting in pBX-1 and transformed into *Saccharomyces cerevisiae* . Production of recombinant xylose isomerase was seen in the a Coomassie stained SDS-PAGE gel and the molecular mass was estimated to be 43kD. The recombinant xylose isomerase showed the highest activity at 85℃ and pH7. The specific activity under these condition was 1.0U/mg protein. At 30℃ and 40℃ ,the relative activity was reduced to 3.7% and 11% ,respectively of the maximum.

Key words Xylose metabolism ,Xylose isomerase ,*xylA* *Saccharomyces cerevisiae*