

苯丙氨酸合成的关键酶基因 *aroG* 与 *pheA* 串联表达*

范长胜 曾小冰 柴运嵘

(复旦大学微生物学系 上海 200433)

江培翊 黄伟达

(复旦大学生物化学系 上海 200433)

摘 要 *aroG* 和 *pheA* 是与苯丙氨酸合成有关的两个重要基因。在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中, *aroG* 基因编码脱氧阿拉伯糖型庚酮糖磷酸合酶(DS), 该酶催化由糖代谢中心途径分流出来的磷酸烯醇丙酮酸(PEP)和赤鲜糖 4-磷酸(E-4-P)缩合形成脱氧阿拉伯糖型庚酮糖磷酸(DAHP)的反应; *pheA* 基因编码一个双功能酶蛋白, 它同时催化两步关键反应, 即具有分枝酸变位酶(CM)和预苯酸脱水(PD)的两种功能。采用 PCR 技术分别从两个不同品系的大肠杆菌染色体 DNA 中扩增至 *aroG* 和 *pheA*。当这两个基因串联在一个质粒上导入大肠杆菌 P2392 中进行表达时, 它们编码的酶 DS、CM 和 PD 活性分别提高 4.3、4.4 和 2.2 倍; 导入短杆菌 (*Brevibacterium*) 2731 中表达时, 相应的酶活性分别提高 12.3、2.3 和 5.6 倍。两基因的串联表达能大幅度地提高工程菌株的苯丙氨酸发酵产量。

关键词 苯丙氨酸生物合成, *aroG* 基因, *pheA* 基因, 基因串联表达

分类号 Q78 Q789 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)04-0430-35

苯丙氨酸是一种很有价值的必需氨基酸, 人及动物不能合成, 而微生物能够合成。该氨基酸在医药和甜味剂制造方面市场需求量大, 目前市场所需的产品除少量化学合成外, 大都是通过微生物发酵生产的。微生物合成苯丙氨酸以糖类为碳源, 首先由糖代谢中心途径分流出来的磷酸烯醇丙酮酸(PEP)和赤鲜糖-4-磷酸(E-4-P)缩合形成脱氧阿拉伯糖型庚酮糖磷酸(DAHP), 然后经过一系列生化反应来完成^[1]。催化各步反应的酶及其合成代谢调控方式因微生物种类不同而有所差别。例如在大肠杆菌中^[2], 催化第一个关键反应的酶称之为脱氧阿拉伯糖型庚酮糖磷酸合酶(DS), 是分别由 *aroF*、*aroG* 和 *aroH* 三个基因编码的三个同功酶; 催化该途径中第二、第三个关键反应的酶分别称之为分枝酸变位酶(CM)和预苯酸脱水酶(PD), 它们是由同一个基因 *pheA* 编码的双功能酶蛋白; 大肠杆菌的苯丙氨酸合成途径的代谢调控方式比较复杂。而在短杆菌及其亲缘关系相近的棒状杆菌中^[3], 催化第一个关键反应的酶由一个基因编码, 催化第二、第三个关键反应的分别由二个基因编码; 它们的代谢调控方式也相对简单。为了使微生物大量合成苯丙氨酸, 我们从消除反馈抑制的大肠杆菌中通过 PCR 技术得到二个苯丙氨酸合成相关的基因 *aroG* 和 *pheA*, 将这二个基因插入不同的质粒中进行表达研究, 最终插入穿梭质粒, 导入短杆菌的苯丙氨酸产生菌株中, 构建基因工程菌株。结果表明外源基因对短杆菌的苯丙

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 396700020), 云南省应用基础研究基金部分资助项目 (No. 97C061M)

本文作者还有陆军、彭永济、陈永青

收稿日期: 1998-04-27, 修回日期: 1998-10-15

氨酸合成有显著促进作用,能使菌种的苯丙氨酸发酵产量大幅度提高。本文报道 *aroG* 与 *pheA* 串联表达研究的结果。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒(表1)

表1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids

菌株和质粒 Strains and plasmids	特征 Characters	来源 Source or reference
<i>Escherichia coli</i> XL-1-blule-G	TA'FP ^r 供体菌(donor of <i>aroG</i>)	本室筛选 Screened by our lab.
<i>Escherichia coli</i> MV1184 \ A	TA'FP ^r 供体菌(donor of <i>pheA</i>)	本室筛选 Screened by our lab.
<i>Escherichia coli</i> P2392	基因表达菌株(recipient strain)	文献 Reference[4]
<i>Brevibacterium flavum</i> F75	营养缺陷型(<i>pheA</i> ⁻ auxotroph)	文献 Reference[5]
<i>Brevibacterium flavum</i> 2731	Nx'FP ^r 受体菌(recipient strains)	本室筛选 Screened by our lab.
<i>Brevibacterium flavum</i> 3621	Nx'FP ^r 受体菌(recipient strain)	文献 Reference[5]
Plasmid pUC119	Ap ^r 基因克隆载体(cloning vector)	文献 Reference[4]
pLPR35	Ap ^r 基因表达载体(expressing vector)	本工作 This work
pJL65	Km ^r 表达载体(expressing vector)	本工作 This work
pJL88	Km ^r <i>aroG pheA</i>	本工作 This work
pLPR58	Ap ^r <i>aroG pheA</i>	本工作 This work

1.2 培养基

基本培养基、完全培养基和发酵培养基,参照文献[1]。

1.3 试剂

氟代苯丙氨酸(FP)购自 Sigma Co., 噻吩丙氨酸(TA)购自 Sigma Co., 氨基青霉素(Ap)购自上海第三制药厂,卡那霉素(Km)购自上海第四制药厂, 萘啶酮酸(Nx)购自 Sigma Co., 限制性内切酶和连接酶购自 Biolabs Co., 酶测定底物和试剂购自 Sigma Co.

1.4 DNA操作与质粒制备

大肠杆菌 DNA 操作参照文献[4],短杆菌 DNA 操作参照文献[5], *pheA* 和 *aroG* 的 PCR 引物设计分别参考文献[6]和[7]。

1.5 酶活性测定

分枝酸变位酶(CM)测定,参照文献[8],改进如下:0.2mL 酶提取液加 0.2mL2mmol/L 的分枝酸钡(100mmol/L Tris-HCL,pH7.8 的缓冲液配制),37℃ 保温 20 min 后加入 0.4mL 的 1.0 mol/L Hcl,再 37℃ 保温 10 min,加入 3.2 mL 的 1.0 mol/L NaOH 混匀,在波长 320nm 处比色测定。

预苯酸脱水酶(PD)测定参照文献[8],改进如下:0.4mL 酸液加 0.6 mL 5mmol/L 的预苯酸钡(25mmol/L Tris-HCL,pH8.2 的缓冲液配制),37℃ 保温 30 min,加入 3 mL 的 1.0 mol/L NaOH 混匀,在波长 320nm 处比色测定。

脱氧阿拉伯糖型庚酮糖磷酸合酶(DS)测定,参照文献[9],改进如下:1.0mL pH6.4 的 Tris-HCL 加 0.1 mL5μmol/L 的磷酸赤藓糖,再加 0.050 mL 10μmol/L 的 PEP,37℃ 10

min 后 ,加入 0.2mL 酶液 ,继续保温 37℃ 10min。加 0.4mL10%。三氯醋酸 ,离心 ,取上清液 ,加等体积的 25mmol/L 的高碘酸 ,室温 40min 之后加入等体积的 2% 的亚砷酸钠 ,加入二倍体积的 0.3% 的硫巴比妥酸 ,沸水浴 5 min ,在波长为 549nm 处快速比色测定。

1.6 *aroG* 基因的 DNA 序列测定

委托 CyberSyn BJ Co. 对 *aroG* 基因进行全序列测定。

1.7 苯丙氨酸发酵产量测定

参照文献 [10] 样品经低层析后用茚三酮显色 ,以标准品作对照 ,在波长 570nm 处比色测定。

2 结果

2.1 基因克隆与表达载体构建

操作过程如图 1 所示。

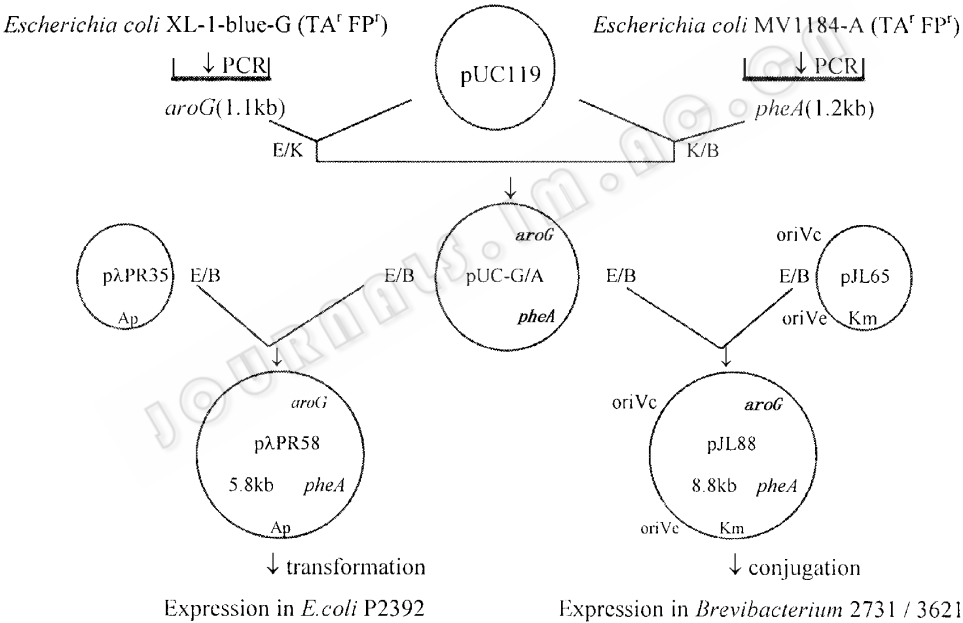


图 1 *aroG* 与 *pheA* 基因克隆与表达示意图

Fig. 1 Cloning and expression of *aroG* and *pheA* genes

TA β(2-Thienyl)-DL-alanine ;FP :DL-Fluorophenylalanine ;r :resistance ;PCR :Polymerase chain reaction ;
E :EcoR I ;K :Kpn I ;B :BamH I ;Ap :Ampicillin ;Km :Kanamycin ;oriVc :origin of vegetable replicon in *E. coli* ;oriVc :origin of vegetable replicon in coryneform bacteria.

2.2 基因克隆的鉴定

从大肠杆菌中扩增到的基因 ,用琼脂糖凝胶电泳进行初步鉴定。然后克隆在 pUC119 或其它质粒上 ,经酶切电泳鉴别 ,并进行营养缺陷型菌株互补鉴定和 DNA 测序。

2.2.1 *pheA* 基因与黄色短杆菌营养缺陷型 F75 的互补鉴定 :F75 是一株苯丙氨酸营养缺陷型。在基本培养基上不能生长 ,只有添加苯丙氨酸之后才能使之生长。将携带 *phe*

基因的质粒导入该菌株中,获得重组子 F75(pJL42),进行生长谱鉴定。结果证实 *pheA* 基因能与营养缺陷型 F75 互补,使携带质粒的 F75(pJL42)菌株能在基本培养基上生长(表 2)。

表 2 携带 *pheA* 的 pJL42 质粒与营养缺陷型 F75(*phe*)互补鉴定
Table 2 Complementation of plasmid pJL42 carrying *pheA* gene with auxotroph F75(*phe*)

菌株 Strains	MM	MM + F	MM + Y	M + W
F75	不生长 Not growth	生长 Growth	不生长 Not growth	不生长 Not growth
F75(pJL42)	生长 Growth	生长 Growth	生长 Growth	生长 Growth

MM :Minimal medium ; F :phenylalanine ; Y :Tyrosine ; W :Tryptophan

2.2.2 *aroG* 基因的序列测定 将克隆到的 *aroG*(1170bp)基因进行全序列测定的结果与文献 [7]报道的序列进行比较,发现该基因的 DNA 序列上第 626 位的碱基由 T 变为 C,密码子由 TTC 变为 TCC,相应的氨基酸由苯丙氨酸变成丝氨酸。除此之外其余的序列与文献报道的一致。由于该基因的供体菌株是经过诱变处理后筛选得到的对苯丙氨酸结构类似物有抗性的突变菌,因此有理由相信这一点突变可能是基因突变所致。突变的结果导致菌株产生代谢类似物抗性(另文发表),然而并没有影响基因所编码的酶蛋白的催化功能。下面的研究结果证实这一点。

2.3 基因的表达

2.3.1 SDS-PAGE 检测基因表达的产物 工程菌株用缓冲液洗涤,加热处理,先进行 Bradford 法测总蛋白含量,然后按文献[4]进行 SDS-PAGE 梯度凝胶电泳,考马斯亮蓝 R250 染色,检测蛋白条带。获得图 2 的电泳图谱。在 d 和 f 电泳条带中出现比正常菌体蛋白更浓的条带,它们分别是 *aroG* 和 *pheA* 两个基因的表达产物,分子量分别为 41kD 和 44kD。

2.3.2 酶活性检测 酶提取参考文献 [8]改进如下:新鲜的菌体用超声波破碎,高速离心,每 100mL 上清液加入 25g 的硫酸铵盐析,析出的沉淀物用 pH7.4 的 1/30 mol/L 磷酸缓冲液透析,再进行 DEE 纤维素柱层析,用 0.1 ~ 1.0mol/L 的 NaCl 梯度洗脱,收集洗脱液中的 A₂₈₀ 高峰部分即为酶的粗提物。三种酶的测定按“材料和方法”叙述的操作进行。以无质粒的受体菌为对照,将测定数据换算为相对酶活力,结果列于表 3。

2.3.3 基因串联表达对苯丙氨酸生物合成的促进作用 将 *aroG* 与 *pheA* 两基因串联起来,嵌入穿梭表达载体(图 1)中,用接合转移方法导入苯丙氨酸产生菌株中,构建基因工

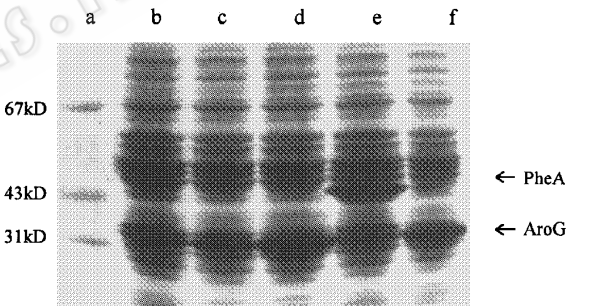


图 2 菌体蛋白 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of strain protein

a: 蛋白标准分子量 Marker ; b, c: 不带质粒的菌体蛋白 Proteins of parent ; d: 携带 *aroG* 的工程菌体蛋白 Proteins of engineered strain carrying *aroG* ; e: 携带 *pheA* 的工程菌体蛋白 Proteins of engineered strain carrying *pheA* ; f: 携带 *aroG*-*pheA* 的工程菌体蛋白 Proteins of engineered strain carrying *aroG*-*pheA* .

程菌株。随机挑选 40 株短杆菌的工程菌株进行摇瓶发酵,取发酵液测定苯丙氨酸含量,结果表明,所有工程菌株的苯丙氨酸发酵产量都显著高于没有外源基因的亲株(对照菌)产量。工程菌的平均产量比对照高 85.3%。其中,22 株的发酵产量比对照产量高 1.8 倍,占总菌株数的 55%;5 株菌株的发酵产量比对照高一倍,占总菌株数的 12.5%。对高产工程菌株的基因表达产物进行检测,结果发现,工程短杆菌中外源基因编码的三种相对应的酶 DS、CM 和 PD 活性均有明显增加(表 3)。

表 3 细胞抽提物中的酶活力测定

Table 3 The activities of enzymes in crude extract

菌株 Strains	质粒 Plasmids	基因 Genes	相对酶活力 Relative activity of enzyme		
			DS	CM	PD
<i>E. coli</i> P2392	pλPR35	—	1.0	1.0	1.0
<i>E. coli</i> P2392	pλPRA	<i>pheA</i>	/	14.1	7.9
<i>E. coli</i> P2392	pλPRG	<i>aroG</i>	7.5	/	/
<i>E. coli</i> P2392	pλPR58	<i>aroG-pheA</i>	4.3	4.4	2.2
<i>B. flavum</i> 2731	pJL65	—	1.0	1.0	1.0
<i>B. flavum</i> 2731	pJL88	<i>aroG-pheA</i>	12.3	2.3	5.6
<i>B. flavum</i> 3621	pJL88	<i>aroG-pheA</i>	14.6	1.2	2.1

aroG-pheA 表示 *aroG* 与 *pheA* 两基因串联在一起 Linkage of *aroG* and *pheA*.
“—” 无外源目的基因(对照菌株) Control; “/” 未测 Not test.

3 讨论

从表 3 测定的数据看出,基因单个表达的酶活力比两个串联表达的酶活力高许多。我们曾经报道大肠杆菌的 *pheA* 单个基因导入 *B. flavum* 3621 中的 CM 和 PD 酶活力分别提高 14 倍和 5.4 倍^[4]。而在本研究中,将 *pheA* 串联在 *aroG* 之后再导入 *B. flavum* 3621 中表达时,两种酶活力分别比宿主菌株仅仅提高 1.2 和 2.1 倍(表 3),这表明 *pheA* 基因的串联在其它基因之后会降低它的表达效率。然而两基因串联之中的 *aroG* 表达效率并不降低,它不仅在大肠杆菌中表达效率没有显著的降低,而且在短杆菌中也能高效表达,这也许与基因串联位置有关。尽管 *aroG-pheA* 在短杆菌中串联表达时 *pheA* 编码的 CM 和 PD 酶活力不很高,但串联表达的酶活力足以促进工程菌株合成大量的苯丙氨酸。从我们随机挑选 40 株工程菌发酵结果可以得出这一结论。

研究工作中发现,构建高产苯丙氨酸的工程菌株时,受体菌的选择很重要。当目的基因克隆到大肠杆菌中时,尽管相应的酶活力提高许多倍,但是不能使受体菌产生过量的苯丙氨酸;当目的基因克隆到营养缺陷型时,虽然它们可以产生基因互补效应,但是也不能使缺陷型菌株积累苯丙氨酸;只有当目的基因转入自身能够产苯丙氨酸的受体菌中时,才能使工程菌合成大量的苯丙氨酸。由此可知,苯丙氨酸生物合成是复杂的系统工程,要提高苯丙氨酸生产菌种的合成产量仅仅克隆一二个基因还不够,应该从菌种选育、代谢控制等多方面做更多的工作。

- [2] Sugimoto S , Yabuta M , Seki T *et al.* *Appl Microbio. Biotechnol* ,1985 **22** :336~342.
- [3] Ikeda M , Katsumata R. *Appl Environ Microbiol* ,1992 **58** (3) :781~785.
- [4] 彭永济 ,黄伟达 ,沈水源等 . 复旦学报 ,1996 **35** (6) :643~648.
- [5] 雷呈祥 ,范长胜 ,黄伟达等 . 生物工程学报 ,1996 **12** (增刊) :179~184.
- [6] Graham S H , Barrie E D. *J Mol Biol* ,1984 **180** :1023~1051.
- [7] Davis W D , Davidson B E. *Nucleic Acids Research* . ,1982 **10** (13) :4045~4058.
- [8] Richard G , Cotton H , Gibson F. *Biochem Biophys Acta* ,1965 **100** :76~88.
- [9] Ilona D , Geza D. *Biochim Biophys Acta* ,1976 **438** :563~573.
- [10] Lei C x , Fan C S , Duan F H *et al.* *Progress in Natural Science* ,1996 **10** (2) :243~247.

EXPRESSION OF GENES *aroG* AND *pheA* IN PHENYLALANINE BIOSYNTHESIS*

Fan Changsheng Zeng Xiaobing Chai Yunrong

(Department of Microbiology Fudan University Shanghai China 200433)

Jiang Peihong Huang Weida

(Department of Biochemistry Fudan University Shanghai China 200433)

Abstract *aroG* and *pheA* genes , encoding 3-Deoxy-D-arabinoheptulonate-7-phosphate synthase(DS) and Chorismate mutase (CM)-prephenate dehydratase(PD) in the pathway of phenylalanine biosynthesis respectively , were amplified by polymerase chain reaction(PCR). The genes were assembled on the multicopy vectors and expressed in both *Escherichia coli* and *Brevibacterium* . The products of two gene were detected by SDS-PAGE. The activities of relevant enzymes were measured in the crude extract of the host strain. When *aroG-pheA* genes were introduced into *E. coli* p2392 , the activities of DS , CM and PD were increased by 4. 3-fold , 4. 4-fold and 2. 2-fold respectively. Whereas in the case of *Brevibacterium flavum* 2732 , the activities of DS , CM and PD were increased by 12. 3-fold , 2. 3-fold and 5. 6-fold , respectively. As the results , the overproduction of phenylalanine was brought about by using the genetic engineering strain of *B. flavum* .

Key words Phenylalanine biosynthesis , *aroG* gene , *pheA* gene , Genes co-expression

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(No. 396700020)

Lu Jun , Peng Yongji and Chen Yongqing took part in the work.