

光合细菌嗜酸柏拉红菌 5-氨基乙酰丙酸合成酶 基因的克隆与原核表达

张德咏¹, 成飞雪¹, 程菊娥¹, 张战泓², 刘 勇^{1*}

(¹ 湖南省植物保护研究所 长沙 410125)

(² 湖南省蔬菜研究所 长沙 410125)

摘 要 5-氨基乙酰丙酸(ALA)可作为除草剂、杀虫剂和植物生长调节剂在农业上应用,但由于其成本较高而限制了它的大面积使用。利用常规基因工程操作方法结合载体介导 PCR 法(Vectors PCR)克隆了嗜酸柏拉红菌(*Rhodoblastus acidophilus*)的 5-氨基乙酰丙酸合成酶(ALAS)基因。并将编码 ALAS 的基因插入到原核表达载体 pQE30 中,在大肠杆菌不同菌株(*E. coli* JM109、M15 及 BL21(DE3))中进行诱导表达。对产物进行 SDS-PAGE 分析表明, ALAS 基因已在细菌中成功表达。使用 Ni-NTA 亲和层析法对表达的 ALAS 进行分离、纯化,得到大小约为 44kD 的 ALAS 蛋白。通过优化工程菌株的培养条件,建立了发酵生产 ALA 的方法,其胞外分泌 ALA 产量达 5.379g/L,ALAS 酶活力高达 333U/min.mg。这是目前国内外利用生物法生产 ALA 产量最高的报道,为 ALA 的产业化应用打下了良好的基础。

关键词: 嗜酸柏拉红菌;ALAS 基因;载体介导 PCR;原核表达

中图分类号:Q936 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2007)04-0639-06

5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid,以下简称 ALA),是卟啉、(亚铁)血红素和维生素 B12 等四吡咯类化合物的共同前体,是一种广泛存在于细菌、真菌、动物及植物等生物机体活细胞中的非蛋白氨基酸。ALA 对植物无毒副作用,易降解无残留,在农业生产中可作为绿色无公害的壮苗剂、增产剂、抗逆剂、除草剂、杀虫剂、增色剂、绿化剂、落叶剂等,在临床医学上可以作为抗癌药物--光化疗剂(photodynamic agent)^[1],具有广阔的应用前景和市场开发价值。但在自然条件下 ALA 细胞外分泌量很低,很难用于实际生产。而 ALA 化学合成过程复杂,产量低、费用高、环境污染严重,从而也限制了它的广泛应用^[4]。

光合细菌生物合成 ALA 对人畜无毒性,对环境无污染且产率高、具有工业化生产潜力因而倍受国外研究者及产业界的关注^[2]。日本自 20 世纪 70 年代就率先开展了有关 ALA 的作用机理、应用和生产方法等的研究,并借助生物工程的方法获得了 ALA 高产量的重组菌株^[3]。但国内这方面的研究报道较少,只有刘秀艳等^[4]在 2002 年有关于光合细菌产

ALA 的研究。

从污水中分离了一株光合细菌 HB-1^[5],经鉴定为嗜酸柏拉红菌(*Rhodoblastus acidophilus*)^[5],田间试验结果显示该菌可促进作物生长、防治作物病毒病害^[6-8],进一步研究表明 ALA 是其中的活性成分之一。本文从嗜酸柏拉红菌(*Rhodoblastus acidophilus*)中成功地克隆了 5-氨基乙酰丙酸合成酶(δ -Aminolevulinic acid synthase,以下简称 ALAS)全长基因,并完成了 ALAS 基因序列的分析、原核表达载体构建及大肠杆菌原核表达,为今后 ALAS 基因重组工程菌产 ALA 的开发利用打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:光合细菌菌种嗜酸柏拉红菌(*Rhodoblastus acidophilus*)^[5]由本实验室分离、鉴定和保存。pBluescript SK- plasmid 购自 Stratagene(USA)公司,按照 Marchuk 等(1991)的方法制备 pBluescript SK(-)T 克隆载体^[9],受体菌为 DH5 α ;表达载体 pQE30 购自 Qiagen 公司(Germany),受体菌为 JM109、

基金项目: 基金项目: 国家“十五”科技支撑计划项目(2006BAD17B08)、国家“863 计划”(2006AA10Z401)

* 通讯作者。Tel 86-731-4691176 ;Fax 86-731-4691166 ;E-mail :haoasliu@163.com

作者简介: 张德咏(1973 -)男,山西河曲人,副研究员,博士,主要从事生物防治和分子植物病毒学研究。E-mail :dyzhang73@hotmail.com

其他作者: 谭新球,戴建平

收稿日期: 2006-11-27 ;接受日期: 2006-12-14 ;修回日期: 2007-03-29

冷却至室温。加入 2.5mL Ehrlich's 试剂(60%的冰醋酸(V/V) 2%对二甲氨基苯甲醛(m/V), 11.2%的高氯酸(V/V))。室温反应 15min,待显色完全后于 556 nm 测其吸光度。总蛋白含量采用 Bradford 法测定。酶活力单位定义为 37°C 1min 内合成 1 μ mol ALA 所需酶量。

1.6 不同菌株表达 ALAS 活性影响及 ALA 产量

将 ALAS-pQE30 质粒分别转化 M15 菌株、JM109 菌株和 BL21(DE3) 检测比较不同菌株表达 ALA 合成酶的活性及发酵液中胞外 ALA 产量。ALA 合成酶的活性测定方法同上。发酵液稀释 100 倍后进行

ALA 含量测定,测定方法采用比色法^[4]。

1.7 不同培养基对诱导表达 ALAS 活性及 ALA 产量的影响

为了提高胞外 ALA 产量,对工程菌培养基进行了优化。培养基的设计参照文献^[13]并结合实验室实际经验。将转化菌株分别培养在 4 种不同的培养基中,4 种培养基组成见表 1。在培养时,加入甘氨酸及琥珀酸,并找出其最佳浓度,同时比较 ALA 脱水酶抑制剂 LA 的浓度和加入时间对菌株产 ALA 的影响。

表 1 4 种不同培养基组成

Table 1 The composition of four kinds of medium

Medium 1(g/L)		Medium 2(g/L)		Medium 3(g/L)		Medium 4(g/L)	
Pepton	10.0	Pepton	20.0	Pepton	10.0	NaAc	1.64
Yeast extract	5.0	Yeast extract	30.0	Yeast extract	5.0	Mg ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	0.20
Glucose	5.0	Glucose	5.0	NaCl	10.0	K ₂ HPO ₄	0.90
NaCl	10.0	NaCl	3.0	Mg ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	0.5	KH ₂ PO ₄	0.60
Mg ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	0.5	Mg ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	1.0	KH ₂ PO ₄	2.0	Micronutrient b	10mL
KH ₂ PO ₄	2.0	(NH ₄) ₂ HPO ₄	3.5	K ₂ HPO ₄	4.0		
K ₂ HPO ₄	4.0	KH ₂ PO ₄	5.0	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	7.0		
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	7.0	Micronutrient a	1mL	NH ₄ Cl	1.0		
NH ₄ Cl	1.0			Micronutrient a	1mL		
Micronutrient a	1mL						

Micronutrient a (1L):CoCl₂·6H₂O 5g, MnSO₄·5H₂O 1g, Na₂MoO₄·2H₂O 2g, H₃BO₃ 0.5g, ZnCl₂ 2g, CuSO₄·5H₂O 1g, FeSO₄·7H₂O 20g, CaCl₂·2H₂O 20g. Micronutrient b (1L):CaCl₂·2H₂O 7.5g, EDTA 2g, (NH₄)₂SO₄ 132g, FeSO₄·7H₂O 1.18g, H₃BO₃ 28g, MnSO₄·4H₂O 21g, ZnSO₄·7H₂O 2.4g, Cu(NO₃)₂·3H₂O 0.4g, Na₂MoO₄·2H₂O 7.5g

1.8 序列分析

PCR 产物纯化后,双向测序,测序结果提交 GenBank。不同细菌间 ALAS 基因的序列比对(alignment)采用 CLUSTAL W(缺省参数)的方法^[14],并计算不同细菌间的相似性。使用 Kimura 2-parameter(Kimura, 1980)对核酸比对的遗传距离进行校正后^[15],采用邻位法(Neighbor-joining Saitou and Nei, 1987)进行进化关系分析和系统树的构建^[16]。进化关系分析和系统树的构建使用 MEGA(Version 2.1, Kumar *et al*, 2001)软件进行^[17],系统树各分支的置信度(Bootstrap)均进行 1000 次的重复检验,并删除置信度小于 70% 的分支^[18,19]。分析时采用 D10264(大肠杆菌 ALAS 基因)为外群。

2 结果和分析

2.1 ALAS 基因的扩增结果

以光合细菌总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,经回收克隆及序列测定,得到 601bp 核心序列。根据核心片段设计引物,载体介导 PCR 法对 DNA 进行扩增,在 5'端和 3'端分别得到大小为 1224bp 和 908bp

片段。对所获序列进行分析和拼接,得到 2428bp 序列,此序列包含有完整的 ALAS 基因及其前导序列等(此序列已经登陆 GenBank,登陆号:DQ288861)。根据已获序列信息设计的引物进行 DNA 特异扩增,得到 1267bp 长度序列,与预期大小一致。其中含有的 1239bp(12bp~1251bp)开放阅读框编码 413 个氨基酸,预计分子量为 44kD。

2.2 光合细菌不同种之间 ALAS 基因同源性分析

将所获光合细菌 ALAS 基因序列与 GenBank 中公布的其它光合细菌的 5-氨基乙酰丙酸合成酶基因进行同源性比较,发现与 *Rhodospseudomonas palustris* HemA 基因(AY489557)的同源性最近,为 95.0%,所编码的 413 个氨基酸中 16 个位点发生变化。而与其它序列同源性较低,为 64%~67% 之间。通过邻接法进行聚类分析得聚类图(图 1)。

2.3 表达载体的构建与重组质粒的鉴定

PCR 产物及 pQE30 载体经 *Sac* I 和 *Hind* III 进行双酶切后,连接并转化大肠杆菌 JM109,在含有 100 μ g/mL 的 Amp 平板上挑取阳性菌落,LB 液体培养基培养并抽提质粒,利用特异引物进行 PCR 扩

增,质粒扩增结果与光合细菌 DNA 直接 PCR 扩增片段大小一致。同时利用 *Sac* I 和 *Hind* III 对质粒进行双酶切,结果显示在 3.4kb 和 1.3kb 处各有一段,与预期结果相符,初步推断重组质粒构建成功。

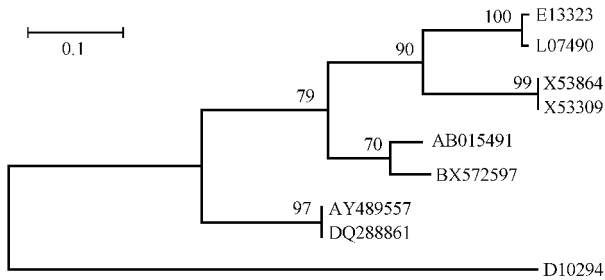


图 1 光合细菌 ALAS 基因序列聚类分析

Fig.1 Phylogenetic tree of ALAS. Bootstrap percentage values are shown above the branches. The tree is unrooted and the scale measures genetic distances in substitution per nucleotides. D10624 (*E. coli* ALAS gene) was used as outgroup.

2.4 重组 pQE30-ALAS 质粒的诱导表达及蛋白的纯化与检测

菌体裂解后上清液和沉淀的 SDS-PAGE 检测结果显示,重组蛋白 ALAS 以可溶性形式存在。对重组质粒进行诱导表达后抽提蛋白,经 Ni-NTA 树脂亲和层析纯化,SDS-PAGE 检测结果显示在 44kDa 左右有一条明显的表达条带(图 2),同预期的分子大小一致。

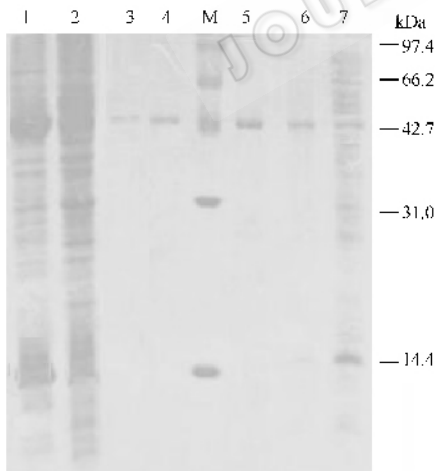


图 2 纯化蛋白 SDS-PAGE 胶电泳图

Fig.2 SDS-PAGE of affinity chromatography. M. Protein molecular weight marker. ; 1. Recombinant plasmid induced by IPTG for 4h; 7. Recombinant plasmid without induction; 2. Recombinant protein purified with wash buffer; 3~6. Recombinant protein purified with elution buffer.

2.5 不同菌株酶活性测定结果及 ALA 产量

含有 pQE30-ALAS 的大肠杆菌细胞、经过破碎后获得的上清液中 ALAS 的活性及胞外 ALA 产量见表 2。从表 2 中看到, JM109 菌株 ALAS 酶活力为

220U(min · mg), 经优化培养后胞外 ALA 产量为 628mg/L; BL21(DE3) ALAS 的合成酶活性为 251U(min · mg), 胞外 ALA 产量为 1.203g/L; 而菌株 M15 对 ALAS 能进行高效表达, 酶活性为 333U(min · mg), ALA 产量可达 5.379g/L。

表 2 不同基因工程菌株 ALA 含量及酶比活力的比较

Table 2 Comparison of ALA production and special activity of ALAS among different recombinant strains

Strains	OD value after 14h	Extracellular volume of ALA(g/L)	Special activity of ALAS (U(min · mg))
JM109	0.0609	0.628	220
M15	0.3808	5.379	333
BL21(DE3)	0.0996	1.203	251

2.6 培养基优化对 ALA 产量的影响

我们对工程菌在不同培养基中的培养情况进行的研究结果显示,在 4 种不同培养基中以一号培养基发酵培养最好,不仅能得到浓度较大的菌株而且胞外 ALA 产量也最大。二号培养基虽然菌体浓度较大,可 ALA 产量并不高。甘氨酸及琥珀酸浓度的研究结果显示,在一号培养基中加入 100mmol/L 的甘氨酸和 50mmol/L 的琥珀酸,诱导时可以得到最大浓度的胞外 ALA 产量。ALA 脱水酶抑制剂的加入能显著提高发酵液中 ALA 的含量,诱导时加入 40mmol/L LA 对 ALA 产量提高最大(数据未显示)。

3 讨论

3.1 不同光合细菌种间 ALAS 基因的同源性比较

采用 MEGA 软件邻位法(NJ)方法构建系统树。各分支的置信度(Bootstrap)均进行 1000 次的重复检验(图 1),由图 1 所示根据置信度,光合细菌 ALAS 基因可分为 3 个亚群:其中红球菌(*Rhodobacter*)包括 E13323、L07490、X53864 和 X53309 为一亚群;红假单胞菌(*Rhodospseudomonas*)包括 AB015491 和 BX572597 为一亚群;红假单胞菌(*Rhodospseudomonas*) AY489557 和嗜酸柏拉红菌(*Rhodoblastus*) DQ288861 为一亚群。序列比较发现,不同光合细菌种间 ALAS 基因的同源性比较低,为 64% ~ 95% 之间。嗜酸柏拉红菌(DQ288861)的 ALA 合成酶基因与沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris* , AY489557)的同源性最近,为 95.0%,所编码的 413 个氨基酸中 16 个位点发生变化。这种低同源性可能是不同光合细菌种间 ALA 表达量存在显著差异的遗传基础。

3.2 ALAS 目的基因的克隆策略

获得同源性低基因的完整序列常常是分子生物学工作者面临的难题之一。本试验在 ALAS 全基因

序列的获得中采用了载体介导 PCR 方法来获得基因两端序列信息。载体介导 PCR 方法在旁侧序列的获得上是一种非常有用的方法。目前对于已知序列的旁侧序列的扩增方法很多,常用而相对简单的方法有两种,反向 PCR 法和载体介导 PCR^[20]。两种方法都有成功扩增了旁侧序列的报道,Trilia 等于 1988 年建立了反向 PCR 技术,并通过反向 PCR 技术成功克隆 *E. coli* 中一个插入序列的上游及下游序列。在实验中我们也曾利用反向 PCR 方法试图对 ALAS 基因核心片段的旁侧序列进行扩增,但是由于此方法存在非特异性扩增而导致扩增目的片段失败(结果未显示)。而载体介导 PCR 法则表现出更特异而快速的特点。

3.3 ALA 的生物合成

光合细菌是产 ALA 的细菌之一,但是在自然条件下该菌 5-氨基乙酰丙酸产量很低,因此,需要筛选高产菌株或者调整发酵条件来提高 ALA 的产量。国内外已有学者进行了这方面的研究实验,如 Sasaki 等^[21]对 ALA 合成进行了详尽的研究,他们利用光合细菌 *Rhodobacter sphaeroides* 通过对生长速度和生物转化条件进行调控,可将 ALA 产量提高到 1.3g/L。在国内刘秀艳等^[4]也曾对光合细菌产 ALA 进行过研究,通过对红假单胞菌进行诱变筛选高产菌株,同时对光合细菌的发酵条件进行优化,使光合细菌 ALA 产量达到 22.15mg/L。而且由于光合细菌生长周期长,发酵培养时间久(至少需 4~5d),这对工业生产也是一个较大的限制因素。

1996 年, Werf 等^[3]将来源于光合细菌的 hemA 基因转入大肠杆菌菌株,并进行诱导表达,获得了高产量的重组菌株(其产量可达 3.3g/L)。后来 Xie 等^[22]也将光合细菌 *Rhodobacter sphaeroides* 的 ALAS 基因转入大肠杆菌 *E. coli* MG1655 及 *E. coli* CGSC4676 菌株中,获得了目前世界上 ALA 产量最高的重组菌株,ALA 产量达到了 5.1g/L,因此,进行 ALAS 重组工程菌的自主研发意义重大。重组工程菌产量高、发酵时间短,培养时间只需 14 小时左右。所以重组 *E. coli* 将是今后 ALA 大规模生产的一项很有前景的生物技术。

本研究利用实验室保存的光合细菌嗜酸柏拉红菌为材料,分离克隆了 ALA 合成酶基因,并转入大肠杆菌 JM109、M15 中进行诱导表达,获得了 pQE30-ALAS 重组菌株。诱导表达的 ALAS 活性较高,在 M15 中酶活性达到 333U/min·mg 蛋白质,在 JM109 中,活性也达到了 220U/min·mg 蛋白质。通过优化培养,ALA 产量达到了 5.379g/L,是目前利用工程菌

发酵生产 ALA 的最高产量报道,而且通过进一步优化发酵条件,其 ALA 产量还有望进一步的提高。由此可见,通过克隆 ALA 合成过程中的关键酶 ALAS 基因,来提高 ALA 合成产量,是 ALA 生物合成的一条有效途径。此研究为国内利用工程菌进行 ALA 规模化、工业化生产进行了有利的探索,为生物合成 ALA 建立了技术平台。

3.4 ALAS 基因原核表达菌株的选择以及培养条件的优化

从实验结果看到,ALAS 酶活性在大肠杆菌 M15 菌株中活性比 JM109 中高 4 倍,且培养发酵液中 ALA 含量在 JM109 中只有 628mg/L,而在 M15 菌株中高达 5.379g/L, BL21(DE3)菌株胞外 ALA 产量比 JM109 稍高,但比 M15 要低,而且随着诱导时间的延长,ALA 产量在 JM109 及 BL21(DE3)中增加很少甚至不增加,而 M15 菌株在诱导 14 个小时后 ALA 产量达到最高,为诱导 4 小时 ALA 产量的 3 倍。从实验结果推测,ALAS 基因表达产物对大肠杆菌 JM109 可能存在一定的毒性作用。所以利用重组菌生产 ALA 发酵中合适的宿主菌株的选择是非常重要的。这与 Werf(1996)等的结果也是一致的^[3]。

从我们对转化菌株的发酵培养条件进行的研究结果来看,不同培养基中克隆菌株产 ALA 有很大差别,其中以一号培养基最优,既有利于菌株的生长,胞外 ALA 产量也较高。此外培养基中甘氨酸和琥珀酸的浓度对 ALA 合成影响也非常大。而 ALA 脱水酶抑制剂 LA 的浓度以及加入时间也会很大程度上影响到 ALA 的产量。

参 考 文 献

- [1] 王俊卿,张肇铭. 5-氨基乙酰丙酸的光动力应用研究进展. 微生物学通报, 2004, 31(3): 136-140.
- [2] 朱章玉,俞吉安,林志新. 光合细菌的研究及其应用. 第一版. 上海:上海交通大学出版社, 1991.
- [3] van der Werf MG, Zeikus JG. 5-aminolevulinic acid production by *E. coli* containing the *Rhodobacter sphaeroides* hemA gene. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(10): 3560-3566.
- [4] 刘秀艳,徐向阳,陈蔚青. 光合细菌产生 5-氨基乙酰丙酸(ALA)的研究. 浙江大学学报(理学版), 2002, 29(3): 336-340.
- [5] 刘勇,张德咏. 光合细菌 PSB-1 菌株的分离鉴定及其生物学特性的研究. 生命科学研究, 2000, 4(4): 233-239.
- [6] 刘勇,张德咏,王小平. 光合细菌 PSB-1 对辣椒苗期生长和产量的影响. 湖南农业科学, 2000, 5: 19-20.
- [7] 刘勇,张德咏,王小平. 光合细菌 PSB-1 对辣椒病毒病的防治作用. 湖南农业科学, 2000, (6): 30-31.
- [8] 张德咏,刘勇. 光合细菌 PSB-1 对几种蔬菜种子发芽及成苗的作用. 湖南农业科学, 2000, 31(1): 32-33.

- [9] Marchuk D, Drumm M, Saulino A, *et al.* Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19**:1154.
- [10] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] Ravin V, Alatosava T. Three new insertion sequence elements ISLdl2, ISLdl3, and ISLdl4 in *Lactobacillus delbrueckii*: isolation, molecular characterization, and potential use for strain identification. *Plasmid*, 2003, **49**(3):253–268.
- [12] Burnham BF. δ -Aminolevulinic acid synthase (*Rhodospseudomonas sphaeroides*). *Methods Enzymol*, 1970, **17A**:195–204.
- [13] Weaver PF, Wall JD, Gest H. Characterization of *Rhodospseudomonas capsulata*. *Arch Microbiol*, 1975, **105**:207–216.
- [14] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22**:4673–4680.
- [15] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, 1980, **16**:111–120.
- [16] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, **4**:406–425.
- [17] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*, 2004, **5**:150–163.
- [18] Efron B, Halloran E, Holmes S. Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**:7085–7090.
- [19] Hills DM, Bull JJ. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst Biol*, 1993, **42**:182–192.
- [20] 王闰霞, 马欣荣, 代富英, 等. 全长基因的克隆. 世界科技研究与发展, 2005, **27**(1):81–85.
- [21] Sasaki K, Watanabe M, Tanaka T, *et al.* Biosynthesis, biotechnological production and applications of 5-aminolevulinic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **58**:23–29.
- [22] Xie L, Eiteman MA, Altman E. Production of 5-aminolevulinic acid by an *Escherichia coli* aminolevulinic acid dehydratase mutant that overproduces *Rhodobacter sphaeroides* aminolevulinic acid synthase. *Biotechnol Lett*, 2003, **25**:1751–1755.

Cloning and prokaryotic expression of *Rhodoblastus acidophilus* 5-aminolevulinic acid synthase gene

ZHANG De-yong¹, CHENG Fei-xue¹, CHENG Ju-e¹, ZHANG Zhan-hong², LIU Yong^{1*}

(¹ Hunan Plant Protection Institute, Changsha 410125, China)

(² Hunan Vegetable Institute, Changsha 410125, China)

Abstract 5-aminolevulinic acid (ALA) is formed by the enzyme ALA synthase (ALAS). However, the fidelity of ALAS gene among species is low. The ALAS gene of photosynthetic bacteria *Rhodoblastus acidophilus* was cloned from its genomic DNA by conventional PCR and Venter PCR and further sequenced. The identity of ALAS gene among photosynthetic bacteria species is from 64.0% to 95.1% according to phylogenetic analysis. Furthermore, the ALAS gene was subcloned into an expression vector pQE30. For the overproduction of ALA, the recombinant ALAS was overexpressed in *Escherichia coli* strains JM109, M15 and BL21(DE3), respectively. The expected 44kD protein was detected by SDS-PAGE in three *E. coli* strains after IPTG induction and further purified by affinity purification on Ni-NTA. The conditions including strain, medium, substrate of ALA synthesis (glycine and succinic acid), and ALA dehydratase inhibitor (levulinic acid) were optimized for attaining the maximum yield of ALA in *E. coli*. The ALA production was established on *E. coli* M15, medium 1 supplied with 100mmol/L glycine and 50mmol/L succinic acid, and 40mmol/L levulinic acid. The activity of ALAS was up to 333U/min·mg of protein. Meanwhile, the output of ALA was reached to 5.379g/L, which is the highest yield of ALA up to date by biofermentation. ALA has a variety of agricultural applications not only as an herbicide, insecticide, and growth promoting factor, but also based on its ability to confer salt and cold temperature tolerance in plants. Our recombinant bacteria are of great potential in the production of ALA. Our results offer an easy and simple ALA mass production method and may stimulate the application of ALA in agriculture.

Keywords: *Rhodoblastus acidophilus*; ALAS gene; Venter PCR; prokaryotic expression

Foundation item: Chinese National Programs for Science and Technology Development (2006BAD17B08); National Program for High Technology Research and Development of China (2006AA10Z401)

* Corresponding author. Tel: 86-731-4691176; Fax: 86-731-4691166; E-mail: haoasliu@163.com

Other authors: TAN Xin-qiu, DAI Jian-ping

Received: 27 November 2006 / Accepted: 14 December 2006 / Revised: 29 March 2007 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>