

北京棒杆菌转酮酶:基因克隆、序列分析与表达

季维克^{1,2}, 赵智¹, 张英姿¹, 王宇¹, 丁久元^{1*}

(¹ 中国科学院微生物研究所, 北京 100101)

(² 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:【目的】转酮酶是非氧化磷酸戊糖途径中的关键酶。从北京棒杆菌(*Corynebacterium pekinense* PD-67)中克隆转酮酶(transketolase, EC 2.2.1.1, TK)基因,并将转酮酶基因在*C. pekinense* PD-67中进行表达,研究增加转酮酶活性对*C. pekinense* PD-67生理特性的影响。【方法】分别以*C. pekinense*野生株AS1.299和突变株PD-67的基因组为模板,用PCR方法扩增*tkt*的全基因序列和前端控制序列;通过pAK6载体提高*tkt*基因在*C. pekinense* PD-67中的拷贝数,从而提高*C. pekinense* PD-67中转酮酶的活性。【结果】*tkt*基因核苷酸序列及其编码的氨基酸序列与结构分析结果表明,*C. pekinense*突变株PD-67与野生株AS1.299相比较,二者调控序列及结构基因核苷酸序列完全一致。与谷氨酸棒杆菌ATCC 13032相比较,突变株PD-67的氨基酸序列有5个氨基酸差异,其中4个位于与辅因子硫胺素焦磷酸结合的结构域内。突变株PD-67来源的*tkt*基因在北京棒杆菌PD-67中得到了表达,重组菌转酮酶比活力比对照菌株提高了2倍。*C. pekinense* PD-67(pTK3)与对照菌株PD-67(pAK6)相比,生长加快,L-色氨酸的最终积累量也较高。【结论】本工作从*C. pekinense* 1.299和PD-67中克隆到*tkt*基因,并实现*tkt*基因的同源表达。适当提高菌株转酮酶活力,有助于菌体生长和色氨酸积累。

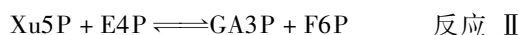
关键词: 北京棒杆菌; 转酮酶; 非氧化磷酸戊糖途径; L-色氨酸

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2010)11-1474-07

转酮酶(transketolase, EC 2.2.1.1),是非氧化磷酸戊糖途径中的关键酶^[1],可逆催化酮醇基团在磷酸酮糖与磷酸醛糖之间的转移^[2]。该酶以焦磷酸硫胺素和二价金属离子为辅因子,广泛存在于动物、植物和微生物中。不同来源的转酮酶其底物特异性存在很大差异,酵母和菠菜叶绿体的TK的底物特异性不强,可以催化多种含有醛与酮糖化合物之间C-C的形成^[3-4]。而哺乳动物TK只能以木酮糖-5-磷酸(Xu5P),果糖-6-磷酸(F6P),景天庚酮糖-7-磷酸(S7P)作为供体,以核糖-5-磷酸(R5P),赤藓糖-4-磷酸(E4P),甘油醛-3-磷酸(GA3P)和乙醇醛为受体催化反应^[5]。来源于大肠杆菌(*Escherichia coli*),玉米及酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的

TK已经纯化并得到晶体^[6-7]。*E. coli*及*S. cerevisiae*中的TK具有两个同工酶。在*E. coli*中,*tktA*基因编码的转酮酶主要在对数生长期起作用,*tktB*编码的转酮酶主要在稳定期起作用^[8]。而在棒杆菌中只存在一种TK^[9-10]。

在细菌的磷酸戊糖途径中,TKT催化以下两个可逆反应:



通过这两个反应,TK单独或与转醛酶协同作用将磷酸戊糖途径的非氧化支路与糖酵解途径联系起来,共同参与芳香族氨基酸合成的前体物E4P的合成(图1)。在DAHPh合酶的催化下,E4P与磷酸烯

* 通信作者。Tel: +86-10-64807415; Fax: +86-10-64807415; E-mail: dingjy@sun.im.ac.cn

作者简介:季维克(1985-),男,山东平邑人,硕士研究生,主要从事氨基酸代谢研究。E-mail: Jiwk@im.ac.cn

收稿日期:2010-05-10;修回日期:2010-06-11

醇式丙酮酸(PEP)缩合生成芳香族化合物合成途径的第一个化合物 2-酮-3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸(DAHP)。E4P 的可利用性直接影响到芳香族化合物的合成。因此,转酮酶是芳香族氨基酸合成调控的重要靶点。

Draths and Frost 首先报道了将 TK 应用于芳香族化合物合成过程的研究^[11]。此后,Ikeda 和 Katsukama 研究了谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)中 TK 对于芳香族氨基酸生产的影响^[9,12]。

北京棒杆菌 AS1.299 (*Corynebacterium pekinense*

AS1.299)是我国研究者分离到的 L-谷氨酸的产生菌^[13],其突变株 PD-67 可以积累 L-色氨酸。我们已经对其芳香族氨基酸合成途径中的两个关键酶: DAHP 合酶和邻氨基苯甲酸合成酶进行了研究^[14-15]。本文报道了北京棒杆菌 AS1.299 及其突变株 PD-67 的转酮酶基因(*tkt*)序列,对它们的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列和结构元件进行了序列比对与分析,并将突变株 PD-67 中的 *tkt* 基因在 *C. pekinense* PD-67 中进行同源表达,研究了基因表达对 *C. pekinense* PD-67 生理特性的影响。

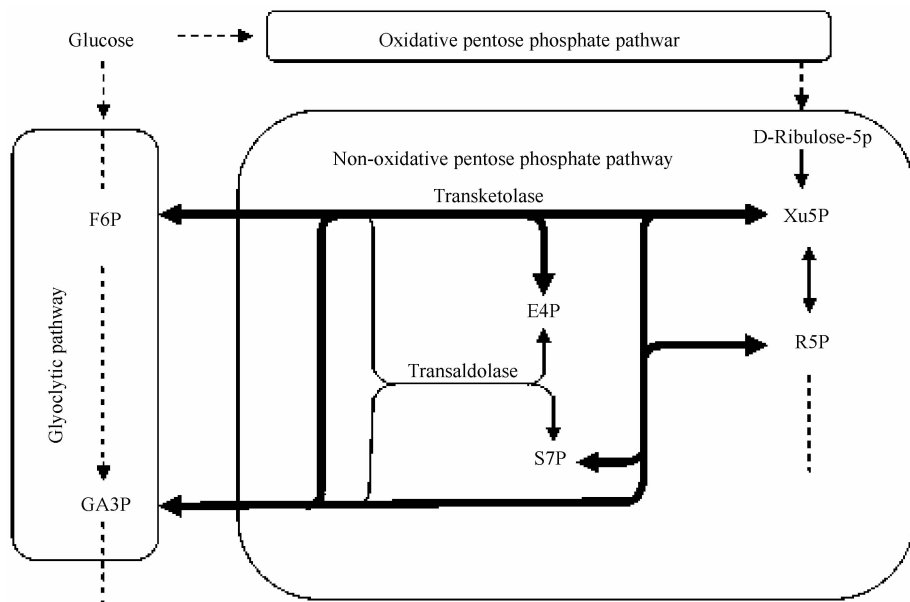


图 1 细菌中磷酸戊糖途径与糖酵解途径示意图

Fig. 1 The pentose phosphate pathway and glycolysis in bacteria. Dashed lines represent multiple enzymatic steps.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本实验所用菌株和质粒见表 1。

1.1.2 主要试剂和仪器: 所有分子生物学工具酶均购自 TaKaRa 公司; 标准蛋白质分子量 marker 为 Unstained protein ladder (PageRuler, Fermentas); Xu5P、R5P、E4P、F4P 及 GA3P 均购自 Sigma 公司; 其余生化试剂为进口或国产分析纯试剂; 所用仪器

表 1 实验所用的菌株和质粒

Table 1 The strains and plasmids used in this work

Strains and plasmids	Characteristics	Source
Strains		
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	ϕ 80 LacZ Δ M15, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i>	Stored in this Lab
<i>Corynebacterium pekinense</i>		
AS1.299	Wild type	This Lab
PD-67	<i>phe</i> ⁻ <i>tyr</i> ⁺	This Lab
Plasmids		
pMD19-T	T-vector, 2.7 kb, Amp ^R , <i>lacZ</i>	TaKaRa Co.
pAK6	5.7 kb, <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> shuttle vector, Km ^R	This Lab ^[8]
pTK1	2.6 kb PCR fragment containing AS1.299 <i>tkt</i> gene in pMD19-T	This study
pTK2	2.6 kb PCR fragment containing PD-67 <i>tkt</i> gene in pMD19-T	This study
pTK3	2.6 kb PCR fragment containing PD-67 <i>tkt</i> gene in pAK6	This study

phe⁻: no cell growth without phenylalanine addition in minimal medium, *tyr*⁺: meager cell growth without tyrosine addition in minimal medium.

为 MJ 公司 PTC-150 基因扩增仪; BIO-RAD MicroPulser™ 电击仪; 721 分光光度计及 Beckman UltraSpecII 4050 紫外分光光度计; AlphaImager™ EC 凝胶成像仪; 生物传感分析仪 SBA-40C。

1.1.3 培养基和培养条件: ① LB 培养基用于 *E. coli* 培养; ② 添加 1% 葡萄糖和 0.2% 尿素的 LB 培养基用于培养 *C. pekinense*; ③ 添加 4% 甘氨酸的 LB 培养基^[12] 用于制备电击转化用 *C. pekinense* 感受态细胞; ④ 用于发酵的培养基: 每升含葡萄糖 80 g, (NH₄)₂SO₄ 20 g, KH₂PO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ · 3H₂O 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, FeSO₄ · 7H₂O 20 mg, MnSO₄ · H₂O 20 mg, 生物素 50 μg, 盐酸硫胺素 200 μg, L-苯丙氨酸 150 mg, L-酪氨酸 150 mg, L-精氨酸 600 mg, L-丝氨酸 100 mg。如需制备固体培养基, 按 1.3% 的量加入琼脂粉。*E. coli* 在 37℃ 培养, *C. pekinense* 在 30℃ 培养。抗生素使用浓度为: 氨苄青霉素 100 mg/L, 卡那霉素 50 mg/L。

1.2 DNA 操作

E. coli 质粒提取参照文献[16], *C. pekinense* 质粒提取采用改进碱法。*E. coli* 转化采用 CaCl₂ 法, *C. pekinense* 转化采用电击转化法^[17]。

1.3 PCR 扩增及测序

根据同源性, 参照 *C. glutamicum* ATCC 13032 *tkt* 基因序列 (GenBank accession number GN126788) 设计一对引物, 分别引入一个酶切位点, 用于扩增 *C. pekinense* AS1.299 和 PD-67 的 *tkt* 基因序列和两端调控序列。

正向引物: 5'-ATGGAATTCCACGCTTGATTGGC GGACGGT-3'; 反向引物: 5'-CGGTCTAGAGCGCCA AACAGCAGGGCAATT-3'; 下划线处分别为 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切位点。PCR 反应条件: 94℃ 4 min; 94℃ 40 s, 56℃ 1 min, 72℃ 3 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。引物设计采用软件 Primer premier 5.0, 引物合成由上海生工生物公司完成。DNA 测序由上海生工生物公司完成。

1.4 TK 活性测定

1.4.1 粗酶液制备: 将 *C. pekinense* PD-67 (pAK6) 与 *C. pekinense* PD-67 (pTK3) 分别接种于培养基②, 30℃ 摇床培养 24 h 后, 接种于添加 1% 葡萄糖和 0.2% 尿素的 LB 培养基, 培养 24 h 后离心收集菌体。用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.7) 洗涤 2 次, 用该缓冲液悬浮菌体, 置于冰浴中超声波破碎细胞。细胞破碎液以 18000 r/min 离心 30 min 后, 上清液用于酶活测定和蛋白质电泳。

1.4.2 TK 活性测定^[18-19]: 200 μL 反应体系含:

20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.7), 3.3 mmol/L Xu5P (Sigma), 1.7 mmol/L R5P (Sigma), 50 μmol/L TPP (Sigma), 10 mmol/L MgCl₂, 0.4 mmol/L NADH, 20U α-甘油磷酸脱氢酶/丙糖磷酸异构酶 (α-G3P-DH/TPI, 酶活力单位根据丙糖异构酶而定, Sigma)。加入 10 μL 粗酶液起始反应, 测定 340 nm 处吸光值。

一个酶活力单位 (U) 定义为: 反应体系中 (pH 7.7, 25℃), 在 R5P 存在时, 以 TPP 和 Mg²⁺ 为辅因子, 偶联 α-GDH/TPI 体系时, 每分钟生成 1 μmol NAD⁺ 所需要的酶量。

1.4.3 粗酶液中蛋白含量测定: 采用考马斯亮兰法^[20]。

1.5 SDS-PAGE

根据各样品的蛋白浓度, 取一定体积的粗酶液, 使上样孔样品的总蛋白量一致, 加入两倍体积样品缓冲液, 混合后沸水煮 5 min, 上样电泳。聚丙烯酰胺分离胶浓度为 12.5%。

1.6 核苷酸和氨基酸序列分析

核苷酸序列分析使用 DNAMAN (v. 5.2.2.0), BLASTN 和 BDGP Neutral Network Promotor Prediction (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html); 氨基酸序列分析使用 DNAMAN (v. 5.2.2.0), ExPASy Database (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html) 与 KEGG SSDB Motif Search (http://www.ssdb.genome.jp/ssdb-bin/ssdb_motif?kid=NCgl1512)。

1.7 发酵实验

将 *C. pekinense* 接于培养基②中培养 24 h 后, 接入发酵培养基中。于 30℃ 摇床培养, 定时取样分析。在波长 600 nm 测定菌体生长, 发酵液中糖含量用生物传感分析仪 SBA-40C 测定, L-色氨酸测定按照文献[21]进行并加以适当的修改。取适量无细胞发酵液以蒸馏水补足到 1 mL, 加入 2.5 mL 9 mol/L H₂SO₄ 和 0.5 mL 3% 的对二甲氨基苯甲醛, 混匀, 置暗处反应 1 h 后, 加入 100 μL 2% 的 NaNO₂, 再于暗处反应 30 min, 于 600 nm 处测定光吸收值。

1.8 质粒稳定性测定

取一定量发酵液, 适当稀释后涂布于不含抗生素的平板 (添加 1% 葡萄糖和 0.2% 尿素的 LB 培养基)。待平板上长出菌落后, 将菌落分别挑至不含抗生素平板与含有 50 μg/mL 卡那霉素的平板上。随机挑取菌落数大于 100。计算在含有卡那霉素平板上长出的菌落数与不含卡那霉素的平板上长出的菌落数的比值。

2 结果和分析

2.1 *C. pekinense* AS1.299 和 PD-67 *tkt* 基因的 PCR 扩增

分别以 *C. pekinense* AS1.299 和 PD-67 的基因组 DNA 作为模板,扩增出两条长度约为 2.6 kb 的包含有 *tkt* 基因的片段。回收 PCR 产物并与 pMD19-T 载体连接,转化 *E. coli* DH5 α 。随机挑取阳性克隆提取质粒,进行酶切鉴定后测序,各得到 3 个插入片段序列结果一致的克隆,重组质粒分别命名为 pTK1 和 pTK2。

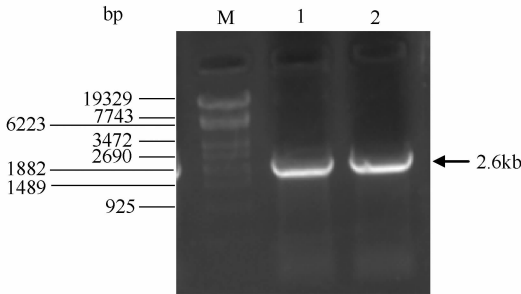


图 2 北京棒杆菌 AS 1.299 及突变株 PD-67 转酮酶基因的 PCR 扩增

Fig. 2 The PCR amplification of *tkt* gene from *C. pekinense* AS 1.299 and its mutant PD-67. M, λ -EcoT14 I digest DNA Marker; Lane 1, the PCR products of *tkt* gene from *C. pekinense* AS 1.299; Lane 2, the PCR products of *tkt* gene from *C. pekinense* PD-67.

2.2 核苷酸序列分析

测序结果表明,pTK1 和 pTK2 内部插入片段长度均为 2541 bp,核苷酸序列分析显示,插入片段均含 1 个 ORF。该 ORF 为 *tkt* 结构基因(2103 bp),编码一条由 700 个氨基酸残基组成的多肽。*tkt* 结构基因的起始密码子为 TTG,终止密码子为 TAA。利用 BDGP Neutral Network Promotor Prediction 分析得出,在起始密码子上游存在可能的启动子元件 5'-TATAAA-3',与大肠杆菌和其他 G⁺ 细菌中启动子的“-10”区 5'-TATATT-3'相似度较高;在起始密码子

上游可能存在启动子元件 5'-TTGACA-3'与大肠杆菌的“-35”区 5'-TTGACA-3'序列完全一致^[22](图 3)。

C. pekinense AS1.299 与 PD-67 的 *tkt* 的结构基因以及前端调控序列均完全一致。它们的结构基因与 *C. glutamicum* ATCC 13032 相比较存在 7 个核苷酸的差异,相似性为 99.57%。而与 *E. coli* 的 *tktA*、*tktB* 结构基因的相似性分别为 52.46% 和 51.42%。它们的前端调控序列与 *C. glutamicum* ATCC 13032 完全一致。

2.3 氨基酸序列分析

对 *C. pekinense* PD-67、*C. pekinense* AS1.299 以及 *C. glutamicum* ATCC 13032 的 TK 氨基酸序列进行了比较分析。结果表明,*C. pekinense* AS1.299 的 TK 与其突变株 PD-67 的 TK 的氨基酸序列完全相同,二者与 *C. glutamicum* ATCC 13032 的 TK 在氨基酸序列上存在 5 个氨基酸的差异,同源率为 99.71%。

C. pekinense PD-67 TK 氨基酸序列中第 328 位谷氨酸、第 332 位苏氨酸、第 431 位缬氨酸、第 556 位异亮氨酸及第 700 位的丝氨酸,在 *C. glutamicum* ATCC 13032 的 TK 中分别为谷氨酰胺、丙氨酸、丙氨酸、缬氨酸和谷氨酸。

结合 KEGG SSDB 中对 *C. glutamicum* ATCC 13032 TK motif 的解析可知,第 328 位和第 332 位氨基酸残基位于 motif pf:Transketolase_N 中。由于该 motif 是 TK 的硫胺素焦磷酸(TPP)结合结构域的一部分,在酶与 TPP 的结合过程中起到重要作用,因此我们推测以上两个位点氨基酸残基的差异可能造成两种来源的 TK 与 TPP 结合能力上的不同。第 431 位和第 556 位氨基酸位于 pf:Transket_pyr 中。作为嘧啶结合结构域的特征结构,该 motif 作用在于提供 TK 与 TPP 中的嘧啶环相结合的位点。由于第 431 和 556 位点氨基酸残基在性质(如疏水性)及结构(如 R 基)的不同可能会影响嘧啶结合结构域的

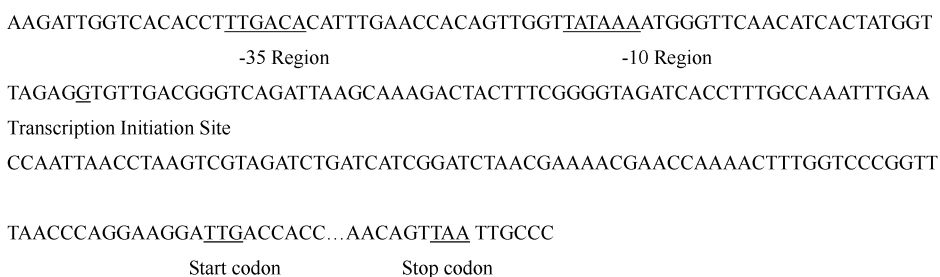


图 3 *C. pekinense* PD-67 *tkt* 基因的调控序列

Fig. 3 Regulatory sequences of the *C. pekinense* PD-67 *tkt* gene. The putative promoter regions (-10 region and -35 region) for *tkt* ORF are indicated.

结构,进而影响 TK 与 TPP 的结合的能力。由于第 700 位的氨基酸残基并没有参与构成任何 motif,因而我们推测该位点的差异可能不会对 TK 的功能带来影响。

C. pekinense AS1.299 和 PD-67 *tkl* 基因的核苷酸序列已提交 GenBank 登记,登录号分别为: HM167515 和 HM167514。

2.4 带有 *tkl* 基因的重组质粒 pTK3 和重组菌株 PD-67 (pTK3) 的构建

为了研究 *tkl* 基因在 *C. pekinense* PD-67 中的表达,用 *EcoRI* 和 *Xba I* 双酶切重组质粒 pTK2,凝胶回收长度约为 2.6 kb 片段,与用相同酶切的穿梭载体 pAK6 得到的大片段相连,转化 DH5 α 后涂布在加有卡那霉素的 LB 平板上,挑取转化子。用 *EcoRI* 和 *Xba I* 双酶切鉴定重组子,得到的结果与预期一致,重组质粒命名为 pTK3。

将质粒 pTK3 和 pAK6 分别电击转化 *C. pekinense* PD-67,得到带有同源 *tkl* 基因的 *C. pekinense* PD-67 (pTK3) 重组菌转化子以及带有空载体的对照菌 PD-67 (pAK6)。

2.5 *tkl* 基因在 *C. pekinense* PD-67 的表达

为了检测 *tkl* 基因在 *C. pekinense* PD-67 中的表达水平,我们对重组菌和对照菌的粗酶液进行了 SDS-PAGE 分析。从图 4 可以看到,在大约 80 kDa 位置处,重组菌 *C. pekinense* PD-67 (pTK3) 与对照菌株 *C. pekinense* PD-67 (pAK6) 相比,有较明显加深的

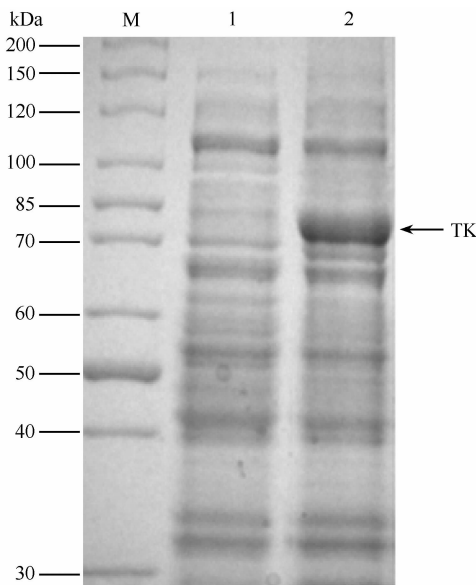


图 4 各菌株蛋白粗提液的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of crude extracts of different strains of *C. pekinense*. M: Protein marker; Lane 1: *C. pekinense* PD-67 (pAK6); Lane 2: *C. pekinense* PD-67 (pTK3).

条带。这与计算的亚基分子量 75.9 kDa 相近,表明 pAK6 携带的 *tkl* 基因在 *C. pekinense* PD-67 中实现了表达。

同时,测定了重组菌转化子 *C. pekinense* PD-67 (pTK3) 以及对照 *C. pekinense* PD-67 (pAK6) 的 TK 活性。结果表明,重组菌转化子粗酶液中 TK 的比活力为 0.144 ± 0.0004 U/mg,对照菌株中的 TK 比活力为 0.046 ± 0.013 U/mg。重组菌 TK 比活力比对照菌提高了 2 倍。

2.6 TK 酶活力增加对重组菌生理特性的影响

为研究 TK 活性增加对重组菌生理特性的影响,我们进行了摇瓶发酵实验。重组菌与对照菌株相比,生长加快。至发酵结束时,重组菌的细胞量比对照菌高了 31% (图 5)。TK 酶活力增加有助于对 *C. pekinense* PD-67 的 L-色氨酸积累,与对照菌相比,重组菌的 L-色氨酸积累提高 15.3% (图 6)。质粒稳定性测定结果表明,至发酵结束时重组菌的质粒保持率为 100%。

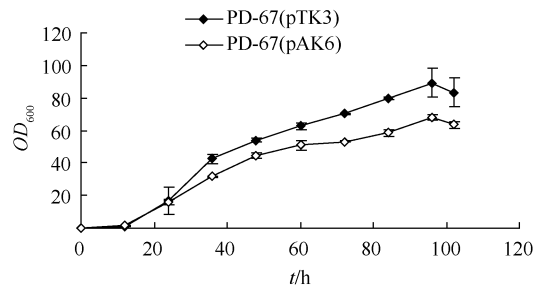


图 5 *tkl* 基因表达对 *C. pekinense* PD-67 生长的影响

Fig. 5 The effects of expression of *tkl* gene on the growth of *C. pekinense* PD-67.

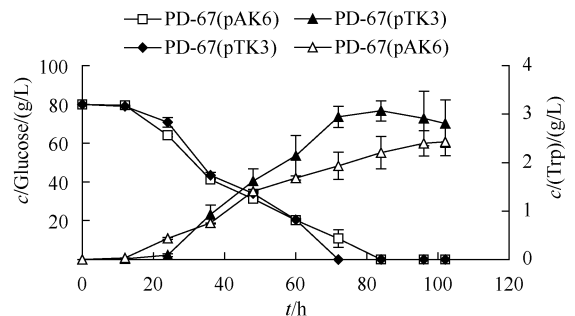


图 6 *tkl* 基因表达对 *C. pekinense* PD-67 糖耗及 L-色氨酸积累的的影响

Fig. 6 The effects of expression of *tkl* gene on glucose consumption and L-tryptophan accumulation of *C. pekinense* PD-67.

3 讨论

本工作从 *C. pekinense* AS1.299 及其突变株

PD-67 中克隆到 *tkt* 基因,对它们的核苷酸序列以及编码的氨基酸序列进行了分析。与谷氨酸棒杆菌模式菌株 *C. glutamicum* ATCC 13032 相比,在蛋白质一级结构上存在 5 个氨基酸的差异,其中 4 个氨基酸位于与辅因子结合的结构域内,可能会影响到酶的活力。

作为非氧化磷酸戊糖途径的关键酶,转酮酶通过其催化的可逆反应,实现了非氧化磷酸戊糖途径的中间代谢物与糖酵解途径的中间代谢物之间的相互转换。同时,转酮酶单独或与转醛酶协同作用,参与芳香族氨基酸的前体化合物的合成。在细胞的不同生长时期,通过调节流经这两个代谢途径的碳流量,满足不同时期细胞生长和产物合成的需要。因此,对转酮酶活力进行修饰成为改善芳香族氨基酸生产菌株性能的策略之一。有关棒杆菌转酮酶的工作较少,国内尚未见到有关转酮酶的工作。

Ikeda 等的工作表明,TK 对谷氨酸棒杆菌 L-色氨酸积累有促进作用,而且这种促进作用随着 *tkt* 基因剂量的增加而更加显著。该工作指出,TK 活力增大使得赤藓糖-4-磷酸的合成量增加,从而使 L-色氨酸的积累量变大^[9]。我们的实验结果也证实 TK 活力的增加对于北京棒杆菌 PD-67 中 L-色氨酸的积累是有利的。

Ikeda 等的另一项工作将转酮酶与色氨酸操纵子、DAHPI 合酶基因以及 PGD(三磷酸甘油酸脱氢酶)基因整合于同一个质粒载体中,研究该重组菌色氨酸生产的性能。该工作指出,过高表达量的 TK(酶活力提高 7 倍)不利于 L-色氨酸的积累,原因在于 TK 的高活力将过多的碳流量从糖酵解导向磷酸戊糖途径,导致细胞内磷酸戊糖代谢物的积累,从而抑制菌体的生长和对糖的利用,最终导致 L-色氨酸的积累量降低。TK 活力提高 3 倍,可以使色氨酸积累增加,但生长略低于对照菌^[12]。

我们的实验结果表明,适当增加 TK 活力(酶活力提高 2 倍)对北京棒杆菌 PD-67 的生长具有促进作用,我们推测,这是由于 TK 催化的可逆反应 II 在生理条件下的反应方向是从非氧化磷酸戊糖途径向糖酵解途径进行(未发表数据)。当 TK 总活力在一定程度上提高以后,在细胞内磷酸戊糖代谢物浓度尚未达到对细菌的生长和糖耗造成抑制的水平。同时由于 TK 总活力的提高,单位时间内从非氧化磷酸戊糖途径流向糖酵解途径的碳流量变大,进而使得流经三羧酸循环的碳流量增大,从而有利于菌体生长。这种解释同样适用于本工作中重组菌的 L-色氨酸积累量较之于对照菌高的结果。TK 催化反

应 I 的进行,总酶活力的提高使得单位时间内由氧化磷酸戊糖途径流入非氧化磷酸戊糖途径的碳流量增大,在转醛酶的协同作用下生成更多的赤藓糖-4-磷酸,为芳香族氨基酸的合成提供了更多的前体化合物,从而使得 L-色氨酸的积累量增大。但由于 TK 催化的反应 II 的存在,使得从反应 I 中流到非氧化磷酸戊糖途径的碳流量有一部分回流至糖酵解途径,进而使得流经三羧酸循环的碳流量变大,促进了菌体的生长。总体效果表现为重组菌生长较快的同时 L-色氨酸的积累量增加。由此可见,适度调节细胞内转酮酶活力的大小对于改善棒杆菌芳香族氨基酸的生产性能具有非常重要的作用。这对于产色氨酸工程菌的构建具有重要的指导意义。

参考文献

- [1] Wood T. The pentose phosphate pathway. USA: Academic Press, Orlando, FL, 1985.
- [2] Datta AG, Racker E. Mechanism of action of transketolase. I. Properties of the crystalline yeast enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 1961, 236: 617-623.
- [3] Demuyne C, Bolte J, Hecquet L, Dalmas V. Enzyme-Catalyzed Synthesis of Carbohydrates - Synthetic Potential of Transketolase. *Tetrahedron Letters*, 1991, 32 (38): 5085-5088.
- [4] Kobori Y, Myles DC, Whitesides G M. Substrate-Specificity and Carbohydrate Synthesis Using Transketolase. *Journal of Organic Chemistry*, 1992, 57 (22): 5899-5907.
- [5] Esakova OA, Meshalkina LE, Golbik R, Hübner G, Kochetov GA. Donor substrate regulation of transketolase. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271 (21): 4189-4194.
- [6] Nikkola M, Lindqvist Y, Schneider G. Refined structure of transketolase from *Saccharomyces cerevisiae* at 2.0 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 1994, 238 (3): 387-404.
- [7] Gerhardt S, Echt S, Busch M, Freigang J, Auerbach G, Bader G, Martin WF, Bacher A, Huber R, Fischer M. Structure and properties of an engineered transketolase from maize. *Plant Physiology*, 2003, 132 (4): 1941-1949.
- [8] Iida A, Teshiba S, Mizobuchi K. Identification and characterization of the *tktB* gene encoding a second transketolase in *Escherichia coli* K-12. *The Journal of Bacteriology*, 1993, 175 (17): 5375-5383.
- [9] Ikeda M, Okamoto K, Katsumata R. Cloning of the transketolase gene and the effect of its dosage on aromatic amino acid production in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, 51 (2): 201-206.

- [10] Ikeda M, Okamoto K, Katsumata R. A transketolase mutant of *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, 50(3):375-378.
- [11] Draths KM, Frost JW. Synthesis using plasmid-based biocatalysis: plasmid assembly and 3-deoxy-D-arabinoheptulose production. *Journal of the American Chemical Society*, 1990, 112(4):1657-1659.
- [12] Ikeda M, Katsumata R. Hyperproduction of tryptophan by *Corynebacterium glutamicum* with the modified pentose phosphate pathway. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(6):2497-2502.
- [13] 陈琦 张震元, 李玲阁. 产生 L-谷氨酸的棒状杆菌新种. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 1973, 13(1):1-6.
- [14] 张春花, 赵智, 张英姿, 王宇, 丁久元. 北京棒杆菌 DAHP 合成酶 I 基因的克隆、序列分析及表达. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, (11):1466-1472.
- [15] 陈小芳, 赵智, 张英姿, 王宇, 丁久元, 李开, 张春花. 北京棒杆菌邻氨基苯甲酸合成酶基因的克隆、序列分析及表达. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, (01):48-53.
- [16] Sambrook JFE, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992.
- [17] 沈天翔, 那淑敏, 肖文中. 棒状类细菌电击转化中多种条件对转化效率的影响. *生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)*, 1995, 11(3):245-249.
- [18] de la Haba G, Leder IG, Racker E. Crystalline transketolase from bakers' yeast: isolation and properties. *Journal of Biological Chemistry*, 1955, 214(1):409-426.
- [19] Naula C, Alibu VP, Brock JM, Veitch NJ, Burchmore RJS, Barrett MP. A new erythrose 4-phosphate dehydrogenase coupled assay for transketolase. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2008, 70(6):1185-1187.
- [20] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72:248-254.
- [21] S G S S a J-e. Factors affecting the biosynthesis of L-tryptophan by genetically modified strains of *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 1984, 130:3091-3100.
- [22] Graves MC, Rabinowitz JC. In vivo and in vitro transcription of the *Clostridium pasteurianum* ferredoxin gene. Evidence for "extended" promoter elements in gram-positive organisms. *The Journal of biological chemistry*, 1986, 261(24):11409-11415.

Corynebacterium pekinense transketolase: gene cloning, sequence analysis and expression

Weike Ji^{1,2}, Zhi Zhao¹, Yingzi Zhang¹, Yu Wang¹, Jiuyuan Ding^{1*}

(¹Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(²Graduate school of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: [**Objective**] Transketolase (EC 2. 2. 1. 1; TK) is the key enzyme in non-oxidative phosphate pentose pathway. We cloned *tkt* gene from *Corynebacterium pekinense* AS 1. 299 and its mutant PD-67 in order to investigate the effect of gene expression on physiological characteristics of *C. pekinense*. PD-67. [**Methods**] According to the homology between *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 and *C. pekinense*, we designed a pair of PCR primers to clone the *tkt* gene from wild-type *C. pekinense* AS1. 299 and its mutant PD-67, then the mutant *tkt* gene was expressed in *C. pekinense* PD-67 by subcloning the PCR fragment into plasmid pAK6. The physiological characteristics of the recombinant *C. pekinense* PD-67 was investigated by fermentation. [**Results**] Analysis of PCR fragments reveals that, besides the regulatory sequence, they contain the whole structure of *tkt* gene. There is no base change all over the structure genes and regulatory sequences between *C. pekinense* AS1. 299 and PD-67. Comparing with *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, there exist 5 amino acids change in amino acid sequence. Four of them were located in the motifs involved in thiamine pyrophosphate binding sites. The *tkt* gene from *C. pekinense* PD-67 was expressed homogenously, and the specific enzyme activity of TK in *C. pekinense* PD-67(pTK3) is two times over that of the control strain *C. pekinense* PD-67(pAK6). The recombinant *C. pekinense* PD-67 exhibits higher cell mass and accumulation of more tryptophan. [**Conclusion**] The moderate amplification of TK activity resulted in increase of L-tryptophan production without affecting the cell growth.

Keywords: *Corynebacterium pekinense*; transketolase; non-oxidative phosphate pentose pathway; L-tryptophan

(本文责编: 张晓丽)

* Corresponding author. Tel: +86-10-64807415; Fax: +86-10-64807415; E-mail: dingjy@sun.im.ac.cn

Received: 10 May 2010/Revised: 11 June 2010