



来源于马赛菌(*Massilia* sp.) UMI-21 的 ACS_{MU} 和 PhaC_{MU} 体外表达及功能研究

王明², 李雪², 韩雪容^{1,2*}

1 吉林农业大学 吉林省菌物表型组学重点实验室, 吉林 长春 130118

2 长春理工大学生命科学技术学院, 吉林 长春 130022

王明, 李雪, 韩雪容. 来源于马赛菌(*Massilia* sp.) UMI-21 的 ACS_{MU} 和 PhaC_{MU} 体外表达及功能研究[J]. 微生物学报, 2024, 64(4): 1162-1174.

WANG Ming, LI Xue, HAN Xuerong. Overexpression and functional characterization of ACS_{MU} and PhaC_{MU} from *Massilia* sp. UMI-21[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(4): 1162-1174.

摘要: 【目的】构建马赛菌(*Massilia* sp.) UMI-21 来源乙酰辅酶 A 合成酶 ACS_{MU} 和聚羟基脂肪酸酯 (polyhydroxyalkanoate, PHA) 合酶 PhaC_{MU} 的体外重组表达体系并过表达 2 种酶, 利用体外合成体系确定 2 种酶在 *Massilia* sp. UMI21 聚 3-羟基丁酸 (polyhydroxybutyrate, PHB) 合成途径中的主要功能。

【方法】利用无缝克隆技术将来源于 *Massilia* sp. UMI-21 的乙酰辅酶 A 合成酶基因 *acs_{MU}* 和 PHA 合酶基因 *phaC_{MU}* 扩增后与 pQE-80L 质粒连接, 转导大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3) 构建 2 个基因的重组表达体系; 利用 6×His 标签纯化蛋白 ACS_{MU} 和 PhaC_{MU}, 并采用 5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸) [5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB] 法测定其活性; 使用体外单相合成系统 (one-phase reaction system, OPRS), 以 (R)-3HB 为底物, 验证 ACS_{MU} 和 PhaC_{MU} 这 2 种酶在合成 PHB 途径中的功能。【结果】成功构建了 ACS_{MU} 和 PhaC_{MU} 蛋白重组表达菌株 BL21-pQE-80L-*acs_{MU}* 和 BL21-pQE-80L-*phaC_{MU}*, 提纯得到过表达蛋白 ACS_{MU} 和 PhaC_{MU} 产率分别为 24.8 mg/L 和 25.6 mg/L; ACS_{MU} 酶比活力为 (0.148±0.011) U/mg。PhaC_{MU} 酶对 (R)-3HBCoA 的比活力为 (0.102±0.011) U/mg; 核磁共振氢谱 (nuclear magnetic resonance hydrogen spectroscopy, ¹H-NMR) 分析结果表明, 使用 ACS_{Pt}-PCT_{CP}-PhaC_{Re}、ACS_{MU}-PCT_{CP}-PhaC_{Re} 和 ACS_{MU}-PCT_{CP}-PhaC_{MU} 这 3 条 OPRS 途径均能合成 PHB, 产量分别为 0.62、0.76 和 0.64 g/L。【结论】*acs_{MU}* 和 *phaC_{MU}* 基因可利用大肠杆菌表达体系过表达并可获得具有活性的可溶性蛋白; 对比 ACS_{Pt}-PCT_{CP}-PhaC_{Re} 合成体系, ACS_{MU} 替代 ACS_{Pt} 合成 PHB 产量增加 22.58%, 在聚合酶相同的情况下, PHB 的合成产量依赖乙酰辅酶 A 合成酶 (acetyl-CoA

资助项目: 国家自然科学基金(31971252)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31971252).

*Corresponding author. E-mail: hanxuerong@jlau.edu.cn

Received: 2023-10-19; Accepted: 2024-01-19; Published online: 2024-01-22

synthase, ACS)合成乙酰辅酶 A 的稳定性。使用 PhaC_{MU} 代替 PhaC_{Re} , 对比 $\text{ACS}_{\text{MU}}\text{-PCT}_{\text{CP}}\text{-PhaC}_{\text{Re}}$ 组合, 合成 PHB 产量减少了 15.79%。在聚合前体浓度相同的情况下, PHB 合成量依赖聚合酶的活性。

关键词: 马赛菌 UMI-21; 乙酰辅酶 A 合成酶(ACS); 聚羟基脂肪酸酯(PHA)合酶; 聚 3-羟基丁酸 (PHB)合成途径

Overexpression and functional characterization of ACS_{MU} and PhaC_{MU} from *Massilia* sp. UMI-21

WANG Ming², LI Xue², HAN Xuerong^{1,2*}

1 Jilin Province Key Laboratory of Fungal Phenomics, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China
2 School of Life Science and Technology, Changchun University of Science and Technology, Changchun 130022, Jilin, China

Abstract: [Objective] To obtain the proteins of acetyl-CoA synthase (ACS_{MU}) and PHA synthase (PhaC_{MU}) from *Massilia* sp. UMI-21 by structuring an *in vitro* recombinant expression system, and to elucidate their roles in the biosynthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) using the one-phase reaction system (OPRS). [Methods] Seamless cloning was employed to ligate the acetyl-CoA synthase gene acs_{MU} and the PHA synthase gene phaC_{MU} amplified from *Massilia* sp. UMI-21 to the pQE-80L plasmid to construct the recombinant plasmids. The recombinant plasmids were transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3), and the recombinant strains were obtained. ACS_{MU} and PhaC_{MU} were purified using a 6×His tag, and their activities were determined by the 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) method. With 3HB as a substrate, the one-phase reaction system (OPRS) was employed to validate the functions of ACS_{MU} and PhaC_{MU} in the biosynthesis of PHB. [Results] The recombinant strains BL21-pQE-80L- acs_{MU} and BL21-pQE-80L- phaC_{MU} were successfully engineered, with the ACS_{MU} and PhaC_{MU} yields of 24.8 mg/L and 25.6 mg/L, respectively. The specific activity of ACS_{MU} was (0.148±0.011) U/mg, and that of PhaC_{MU} for (R)-3HBCoA was (0.102±0.011) U/mg. Nuclear magnetic resonance hydrogen spectroscopy (¹H-NMR) results showed that products from the all three PHB synthesis pathways, $\text{ACS}_{\text{Pt}}\text{-PCT}_{\text{CP}}\text{-PhaC}_{\text{Re}}$, $\text{ACS}_{\text{MU}}\text{-PCT}_{\text{CP}}\text{-PhaC}_{\text{Re}}$, and $\text{ACS}_{\text{MU}}\text{-PCT}_{\text{CP}}\text{-PhaC}_{\text{MU}}$, in OPRS were PHB. The yields of PHB *via* the three pathways were 0.62, 0.76, and 0.64 g/L, respectively. [Conclusion] The genes acs_{MU} and phaC_{MU} can be overexpressed in the *E. coli* expression system to yield active soluble proteins. Compared with the $\text{ACS}_{\text{Pt}}\text{-PCT}_{\text{CP}}\text{-PhaC}_{\text{Re}}$ pathway, substitution of ACS_{Pt} with ACS_{MU} increased the PHB yield by 22.58%. The yield of PHB was contingent upon the stability of acetyl-CoA synthase (ACS), which provided acetyl-CoA for reaction under identical PhaC. Replacing PhaC_{Re} with PhaC_{MU} decreased the PHB yield by 15.79% compared with $\text{ACS}_{\text{MU}}\text{-PCT}_{\text{CP}}\text{-PhaC}_{\text{Re}}$. The polymerase PhaC plays a crucial role in PHB synthesis under identical precursor concentrations.

Keywords: *Massilia* sp. UMI-21; acetyl-CoA synthase (ACS); polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase; polyhydroxybutyrate (PHB) synthesis pathway

聚羟基脂肪酸酯 (polyhydroxyalkanoates, PHAs) 是微生物在碳过量 and 氮或磷酸盐等必需生长营养素的限制浓度下以颗粒形式贮藏在细胞内的水不溶性链状高分子聚合物^[1]。根据 PHAs 单体中碳原子数的不同, PHAs 主要分为两类: 短链长 PHAs (short chain length PHAs, SCL-PHAs) 和中链长 PHAs (medium chain length PHAs, MCL-PHAs), 具有从脆性到弹性的广泛材料性能^[2]。其中 SCL-PHAs 单体主要由 3-5 个碳原子组成, 其材料特性和生物降解性与石油基塑料相似, 因此可以作为传统石化基塑料的替代品^[3]。

聚 3-羟基丁酸 (polyhydroxybutyrate, PHB) 是 SCL-PHAs 的典型代表^[4]。目前, 已发现包括光能、化能自养和异养菌共计 65 个属以上的 300 多种微生物都能产生 PHB, 如: 芽孢杆菌属 (*Bacillus*)^[5]、固氮菌属 (*Azotobacter*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 等^[6]。这些不同菌属的微生物主要通过糖代谢途径合成 PHB, 在合成过程中起关键作用的是 3 种酶, 分别由 *phaA*、*phaB* 和 *phaC* 编码的 β -酮硫解酶 (β -ketothiolase, PhaA)、NADPH/NADH 依赖型乙酰乙酰辅酶 A 还原酶 (acetylacetyl-CoA reductase, PhaB) 和 PHA 合酶 (PHA synthase, PhaC)。由两分子乙酰辅酶 A 依次经过 PhaA 生成乙酰乙酰辅酶 A, 经 PhaB 生成单体 (*R*)-3-羟基丁酰辅酶 A [(*R*)-3-hydroxyacyl-CoA, (*R*)-3HB-CoA] 后经 PhaC 的催化聚合生成 PHB^[7]。在大多数产 PHB 细菌体内, 乙酰辅酶 A 是合成的起点, 当以糖为碳源时, 通过糖酵解生成的丙酮酸经过丙酮酸脱氢酶复合物的催化生成乙酰辅酶 A; 当以乙酸 (盐) 为碳源时, 乙酰辅酶 A 的合成是通过 AMP-ACS (乙酸浓度低) 或 PTA-AK (乙酸浓度高) 的催化生成^[8], 提高胞内乙酰辅酶 A 浓度可有效提高 PHB 的合成量^[9]。因此, 高效提供乙

酰辅酶 A 的合成酶是提高 PHB 产量的重要环节。

近期, 研究者们报道了使用葡萄糖^[10]或淀粉^[11-12]合成 PHB 的马赛菌 (*Massilia*)。马赛菌 (*Massilia*) 能利用海藻衍生的多糖生产 PHA, 是生产可降解生物塑料有希望的候选者。其中, 本团队从石莼分离出一株以淀粉、麦芽糖或麦芽三糖作为唯一碳源产 PHB 的微生物, 鉴定为马赛菌 (*Massilia* sp.) UMI-21^[13]。马赛菌 UMI-21 具有能利用多糖而不能利用单糖作为碳源的特点, 这可能与菌株的细胞膜对多糖的转运有关。与模式菌富养罗尔斯通氏菌 (*Ralstonia eutropha*) 不同, *Massilia* sp. UMI-21 的 PHB 合成相关基因编码了多个 PHA 合酶基因, 推测其中 *phaC1* 为 I 类 PhaC^[14], 但是否为 PHB 合成途径中的关键酶仍需确认。另外, 该菌株编码乙酰辅酶 A 合成的 *acs_{MU}* 的功能和活性未知。

根据模式菌株 PHB 的合成过程涉及的相关酶, 研究人员使用体外过表达相关酶作为催化剂, 通过合成生物学手段开发了 2 种体外合成体系, 一种是在缓冲液中使用体外过表达的酶提供聚合酶所需的单体进行聚合的单项反应体系 (one-phase reaction system, OPRS), 另一种是使用两相界面的酯交换反应获得聚合前体的水-有机溶剂两相反应体系称为两相反应体系 (two-phase reaction system, TPRS)^[15]。体外合成体系因为合成途径清晰、反应可视化、产物提取便利等优点, 在新型 PHA 开发、酶活力和底物特异性分析、酶的功能验证等方面具有优势。本研究利用 OPRS 设计 3 条 PHB 合成途径, 将来源于 *Massilia* sp. UMI-21 的 *acs_{MU}* 和 *phaC_{MU}* 作为乙酰辅酶 A 供给酶和底物聚合酶, 验证其在合成 PHB 途径中的功能。首先, 利用基因异源重组方法构建 *acs_{MU}* 和 *phaC_{MU}* 的过表达体系; 其次, 利用镍柱纯化法从大量培养的重组菌中获得过表达的 2 种蛋白, 采用 5,5'-二硫双

(2-硝基苯甲酸) [5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB]法测定 ACS_{MU} 和 PhaC_{MU} 酶活性; 最后, 通过 OPRS 体系, 根据设计的合成途径, 对 2 种酶在 PHB 合成途径中的功能进行验证。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

本实验中所涉及的马赛菌(*Massilia* sp.) UMI-21、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、大肠杆菌 BL21(DE3)均由本实验室保存。

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0。固体培养基另添加 15.0 g/L 琼脂, 121 °C 灭菌 20 min。

R2A 培养基(g/L): 3.2 g R2A Liquid Medium 加热溶解于 1 000 mL 蒸馏水中, 121 °C 灭菌 15 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

胰蛋白胨、酵母提取物, 赛默飞世尔科技公司; 辅酶 A (CoA)、乙酰辅酶 A、(R)-3HB、ATP、DTNB、氘代氯仿, 合肥博美生物科技有限责任公司; R2A Liquid Medium, 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 2 \times Phanta Flash Master Mix 高保真 DNA 聚合酶、ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit, 南京诺维赞生物科技股份有限公司; 限制性内切酶, 纽英伦生物技术(北京)有限公司。

超声波破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 紫外-可见分光光度计, 岛津制作所; 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; 核磁共振波谱仪, Bruker Daltonics 公司。

1.2 *acs*_{MU} 和 *phaC*_{MU} 基因克隆

挑取 *Massilia* sp. UMI-21 单菌落进行活化

后, 转接至 5 mL 的 R2A 培养基中, 30 °C、180 r/min 培养过夜后, 4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 使用酚抽提法提取基因组 DNA, 具体步骤参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书操作。

根据全基因组测序结果, 设计 *acs*_{MU} 的 PCR 扩增引物 Facs_{MU} (5'-accatcaccatcacggatccATGGAAGATGTCGTCATCGTGG-3')和 Racs_{MU} (5'-aagctcagctaattaagcttGCCCAACGCGCTCAGTC-3'), *phaC*_{MU} 的 PCR 扩增引物 FphaC_{MU} (5'-accatcacca tcacATGCCTGACCCCAAGCTT-3')和 RphaC_{MU} (5'-ccgggggtaccgagctAAGTGCATCGACTGTCTG AACG-3')。PCR 反应体系: 基因组 DNA 1.0 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1.5 μ L, 2 \times Phanta Flash Master Mix 高保真 DNA 聚合酶 10 μ L, ddH₂O 补充到 20 μ L。PCR 反应条件: 98 °C 3 min; 98 °C 10 s, 60 °C 5 s, 72 °C 10 s, 循环 35 次; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。

1.3 含有目的基因 *acs*_{MU} 和 *phaC*_{MU} 重组菌的构建与鉴定

1.3.1 重组菌构建

取 *acs*_{MU} (*Bam*H I 和 *Hind* III)和 *phaC*_{MU} (*Bam*H I 和 *Sac* I) PCR 产物各 3.5 μ L, 与经对应的相同酶切位点处理的表达载体 pQE-80L 1.5 μ L 混合后加入到 5 μ L ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit, 在 50 °C 连接 30 min。反应产物热激转化至 100 μ L *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 加入 900 μ L LB, 37 °C、180 r/min 复苏 1 h 后, 涂布到 LB-Amp (100 mg/L)培养基筛选阳性克隆。

1.3.2 重组菌的鉴定

含 *acs*_{MU} 基因重组质粒使用 *Bam*H I 单酶切切割法, 1%琼脂糖凝胶电泳后出现的基因片段大小与理论值进行对比验证。含 *phaC*_{MU} 基因的重组质粒使用引物 FphaC_{MU} 和 RphaC_{MU} 进行扩增, 与空白质粒的扩增结果进行对比验证。验

证成功后, 使用热转化方法将含有目的基因 *acs_{MU}* 和 *pha_{MU}* 的重组质粒分别转入 BL21(DE3) 感受态细胞, 涂布于 LB-Amp (100 mg/L) 培养基, 培养至长出菌落。

1.4 ACS_{MU} 和 PhaC_{MU} 的体外表达及诱导条件优化

ACS_{MU} 蛋白表达: 将 BL21-pCold IV-*acs_{MU}* 接种于 5 mL LB-Amp (100 mg/L) 培养基中, 37 °C、180 r/min 培养过夜。以 1:20 的比例转接到两瓶 50 mL LB-Amp (100 mg/L) 培养基中, 37 °C、180 r/min 培养 4 h 后分成两组, 一组无 IPTG 诱导, 另一组加入 IPTG (终浓度 0.5 mmol/L), 30 °C、180 r/min 培养 16 h, 于 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min 收集菌体沉淀。向每组菌体沉淀中加入 2.5 mL PBS 缓冲液(10 mmol/L 磷酸盐, 150 mmol/L NaCl, pH 7.2–7.4)重悬菌体, 冻融 2 次后, 超声破碎处理(超声条件: 开 2 s, 间隔 2 s, 超声 10 min, 重复 2 次), 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min 分离上清和沉淀进行 SDS-PAGE 检测。

诱导温度优化: 重组菌株 BL21-pQE-80L-*acs_{MU}*, 37 °C、180 r/min 培养 4 h 后, 添加 IPTG (终浓度 0.5 mmol/L) 后培养 16 h。诱导温度梯度为 37、30、20 和 15 °C, 优化菌株的诱导温度。

IPTG 浓度优化: 重组菌株 BL21-pQE-80L-*acs_{MU}*, 37 °C、180 r/min 培养 4 h 后, 分别添加终浓度为 0.2、0.5、0.8 mmol/L IPTG, 15 °C、150 r/min 培养 16 h, 优化诱导剂浓度。

PhaC_{MU} 培养条件: 30 °C、180 r/min 培养 4 h 后, 添加 IPTG (终浓度 0.5 mmol/L), 15 °C、150 r/min 条件下, 诱导 16 h。在此条件下, 可溶性蛋白的表达量与形成包涵体的量大致相同, 大量提取目标蛋白时采用相同的培养条件。

1.5 PHB 合成相关酶的提纯

ACS 合成的乙酰辅酶 A 的 CoA 基团需要

被丙酰 CoA 转移酶 PCT_{Cp} 转移至游离的 3HB 上形成 3HB-CoA 后, 在 PHA 合酶 PhaC 催化下合成 PHB^[16]。为了使用 OPRS 验证 ACS_{MU} 和 PhaC_{MU} 酶的 PHB 合成能力, 本研究使用丙酸梭菌(*Clostridium propionicum*) JCM 1430 来源的 PCT_{Cp} 作为聚合前体 3HBCoA 的供给酶, 使用来源于嗜热丙酸厌氧肠状菌(*Pelotomaculum thermopropionicum*) JCM 10971 ACS_{Pt} 和来源于 *R. eutropha* 的 I 类 PHA 合酶 PhaC_{Re} 作为对比。以下是 3 种酶的表达与提纯方法。

ACS_{Pt} 培养条件: 37 °C、180 r/min 扩大培养 4 h 后, 加入 IPTG (终浓度 0.5 mmol/L), 培养 16 h。PCT_{Cp} 培养条件: 37 °C、180 r/min 扩大培养 4 h 后, 添加 IPTG (终浓度 0.5 mmol/L), 15 °C、150 r/min 培养 16 h。PhaC_{Re} 培养条件: 37 °C、180 r/min 扩大培养 4 h 后, 添加 IPTG (终浓度 0.5 mmol/L) 于 30 °C、150 r/min 培养 8 h。

His-Tag 提纯(4 °C): 收集 1 L 培养后菌体使用 50 mL PBS 缓冲液重悬, 采用超声破碎处理, 12 000 r/min 离心 20 min 弃上清后, 使用 50 mL PBS 缓冲液重悬获得蛋白上清液。上清液与 3 mL 镍柱柱料于 4 °C 混合 3 h 后, 去掉流出液, 用 10 倍柱体积含 20 mmol/L 咪唑的 PBS 缓冲液洗涤, 然后用含 200 mmol/L 咪唑的 PBS 缓冲液洗脱目的蛋白, 经 SDS-PAGE 鉴定洗脱液后收集浓度高的组分, 在 4 °C 下, 使用 2 L PBS 缓冲液透析 24 h, 期间换 4 次透析液以除去咪唑, 得到纯化的蛋白溶液。使用 BSA 蛋白标准曲线法测定蛋白浓度并保存在 -80 °C。

1.6 PHB 合成相关酶的活性测定

ACS_{Pt}/ACS_{MU} 和 PhaC_{Re}/PhaC_{MU} 的活性测定方法与先前采用的 DTNB 法一致^[15]。PCT_{Cp} 活性使用间接法测定, PCT_{Cp} 催化 CoA 转移反应中, 仅有 CoA 供体乙酰辅酶 A 的消耗。使用柠檬酸合酶催化草酰乙酸和乙酰辅酶 A 生成柠

柠檬酸同时释放 CoA, 通过检测 CoA 浓度间接计算 PCT_{Cp} 的活性。 PCT_{Cp} 活性测定: 反应体积 500 μL 包含 100 mmol/L NaH_2PO_4 (pH 7.5)、10 mmol/L (R)-3HB、2 mmol/L 乙酰辅酶 A 混匀后置于 30 $^\circ\text{C}$ 预热, 加入 0.5 mg/mL PCT_{Cp} 酶后, 于 0–30 min 中每隔 5 min 分别取出 45 μL 反应液, 立即加入已分装好的 5 μL (50 mmol/L 草酰乙酸和 1 mg/mL 柠檬酸合酶) 的 EP 管中, 10 min 后测量 412 nm 吸光度值。根据 CoA 浓度计算酶比活力。每种蛋白活性测定至少重复 3 次。

1.7 PHB 的体外合成和提取

PHB 的体外合成体系(5 mL)包括 100 mmol/L NaH_2PO_4 (pH 7.5)、200 mmol/L (R)-3HB、10 mmol/L MgCl_2 、30 mmol/L ATP、0.2 mg/mL BSA、1 mmol/L CoA、10 mmol/L 乙酸、0.2 mg/mL ACS、0.2 mg/mL PCT 和 0.5 mg/mL PhaC。先加缓冲液, 后加其他组分并充分混匀, 最后按 ACS、PCT、PhaC 的顺序加入生物酶, 密封后将合成管放入 30 $^\circ\text{C}$, 静置 72 h。反应结束后, 加入等量的氯仿, 于 100 $^\circ\text{C}$ 水浴 3 h。冷却后通过 0.22 μm PTFE 滤膜收集氯仿相, 经旋转蒸发

仪旋蒸至体积约 1 mL 后加入 5 倍体积预冷的甲醇, 4 $^\circ\text{C}$ 过夜沉淀。使用 0.22 μm PTFE 滤膜收集沉淀物, 并于 30 $^\circ\text{C}$ 恒温干燥 24 h。

1.8 PHB 的体外合成的产物结构分析

取干燥后的白色沉淀物 3–4 mg 放到核磁管中, 加入 2–3 mL 氘代氯仿。使用 Bruker 核磁共振波谱仪(Ascend 500 MHz)以 90 $^\circ\text{C}$ 脉冲 4 ms, 3 000 Hz 频谱宽度和 4 s 重复率获得聚合物的核磁共振氢谱。

2 结果与分析

2.1 含有 acs_{MU} 和 $phaC_{MU}$ 重组菌的构建与鉴定

acs_{MU} 、 $phaC_{MU}$ 基因的 PCR 扩增产物的 1% 琼脂糖电泳结果如图 1 所示。图 1A 中泳道 1 在 1 000 bp 上方有条带, 与目的基因 acs_{MU} 1 200 bp 理论大小相符。图 1B 中泳道 1 在 2 000 bp 下方有条带, 与目的基因 $phaC_{MU}$ 1 857 bp 大小相符。此结果表明成功扩增了 acs_{MU} 和 $phaC_{MU}$ 。

重组质粒 pQE-80L- acs_{MU} 的 $Bam\text{H I}$ 单酶切验证结果如图 2A 所示, 对比 pQE-80L 经 $Bam\text{H I}$

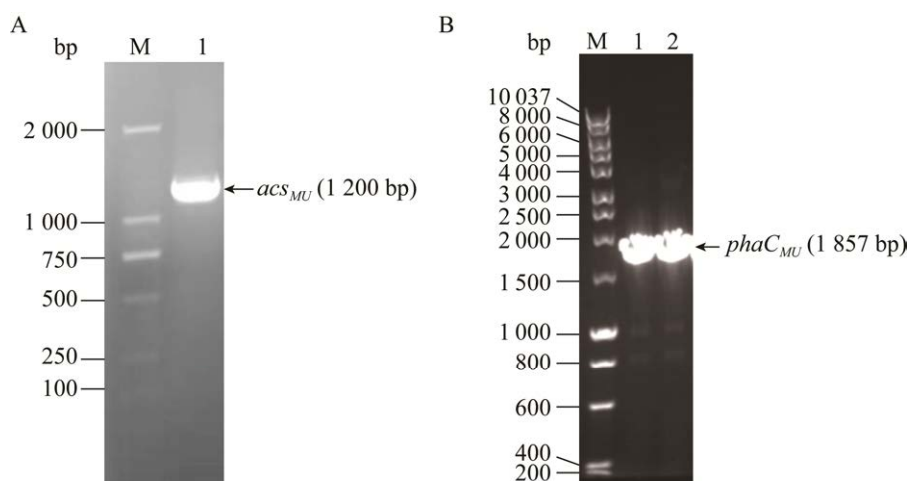


图 1 目的基因 acs_{MU} 和 $phaC_{MU}$ 的 PCR 电泳结果图

Figure 1 PCR electrophoresis results of genes acs_{MU} and $phaC_{MU}$. A: acs_{MU} PCR result. M: DL2000 DNA marker; Lane 1: Gene acs_{MU} . B: $phaC_{MU}$ PCR results. M: DNA marker Q; Lane 1 and 2: Gene $phaC_{MU}$.

单酶切后的线性载体在 5 000 bp 下方出现条带(理论值 4 751 bp), pQE-80L-*acs_{MU}* *Bam*H I 单酶切后的线性载体在 5 000 bp 以上出现明显条带(理论值 5 930 bp), 证明重组质粒含有目的基因 *acs_{MU}*。重组质粒 pQE-80L-*phaC_{MU}* 的 PCR 验证结果如图 2B 所示, 3 条 PCR 产物均在 2 000 bp 下方出现明亮且单一条带(理论值 1 857 bp), 证明重组质粒含有目的基因 *phaC_{MU}*。

2.2 ACS_{MU} 和 PhaC_{MU} 的表达条件优化

重组菌株 BL21-pQE-80L-*acs_{MU}* 的表达结果如图 3A 所示, 与不添加诱导剂(图 3A 泳道 1 和 2)相比, 添加 0.5 mmol/L IPTG (图 3A 泳道 3 和 4)在约为 40.0 kDa 有明显条带, 与 ACS_{MU} 蛋白理论值 40.8 kDa 大小相符, 证明 ACS_{MU} 蛋白要经 IPTG 诱导后表达, 然而表达的蛋白大部分形成包涵体在沉淀中出现(图 3A 泳道 4), 因此要进一步优化 ACS_{MU} 的蛋白表达条件。

诱导温度优化结果如图 3B 所示, 随着温度降低蛋白在上清液中表达量增加, 15 °C 时(图 3B 泳道 4), 蛋白表达量最高。诱导剂浓度的优化

结果表明, ACS_{MU} 表达的最适 IPTG 浓度为 0.5 mmol/L (图 3C 泳道 2)。优化后的 ACS_{MU} 的表达条件为 37 °C、180 r/min 扩大培养 4 h 后, 添加 IPTG (终浓度 0.5 mmol/L), 15 °C、150 r/min 诱导 16 h。PhaC_{MU} 在 30 °C、180 r/min 扩大培养 4 h 后, 降低温度至 15 °C 后, 添加 IPTG (终浓度 0.5 mmol/L), 150 r/min 诱导 16 h 的结果如图 3D 所示, 总酶液中(图 3D 泳道 1)和上清液中(图 3D 泳道 2)均出现 PhaC_{MU} 条带, 浓度大致相同, 大量提纯时使用此条件培养。

2.3 PHB 合成相关酶的纯化与活性测定

为了使用 OPRS 检验 ACS_{MU} 和 PhaC_{MU} 的 PHB 合成能力, 本研究使用 PCT_{Cp} 将乙酰辅酶 A 的 CoA 转移至 3HB 的羧基端形成 3HBCoA, 为 PhaC 提供前体。ACS_{Pt} 是一种既知的能为体外合成体系提供乙酰辅酶 A 的乙酰辅酶 A 合成酶^[17], 本研究以 ACS_{Pt} 为对照, 设计 ACS_{Pt}/ACS_{MU}-PCT_{Cp}-PhaC_{Re} 两条 PHB 合成途径, 通过合成产物量和产物结构分析确定 ACS_{MU} 合成能力。马赛菌(*Massilia* sp.) UMI-21 的 PhaC_{MU} 属于 I 类

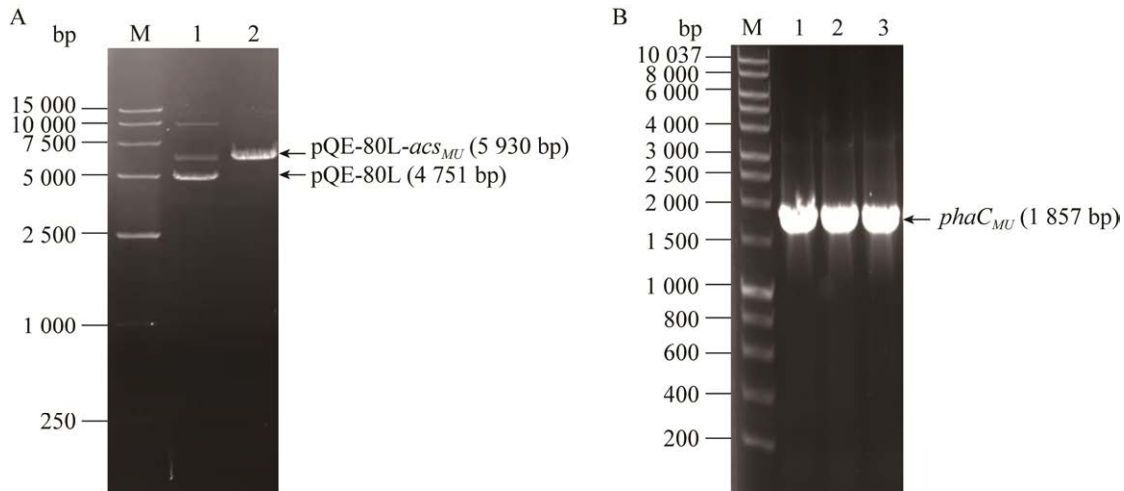


图 2 pQE-80L-*acs_{MU}* 和 pQE-80L-*phaC_{MU}* 鉴定电泳图

Figure 2 Identification of pQE-80L-*acs_{MU}* and pQE-80L-*phaC_{MU}*. A: Identification of pQE-80L-*acs_{MU}*. M: DL15000 DNA marker; Lane 1: pQE-80L single digestion; Lane 2: pQE-80L-*acs_{MU}* single digestion. B: Identification of pQE-80L-*phaC_{MU}*. M: DNA marker Q; Lane 1-3: *phaC_{MU}* PCR validation.

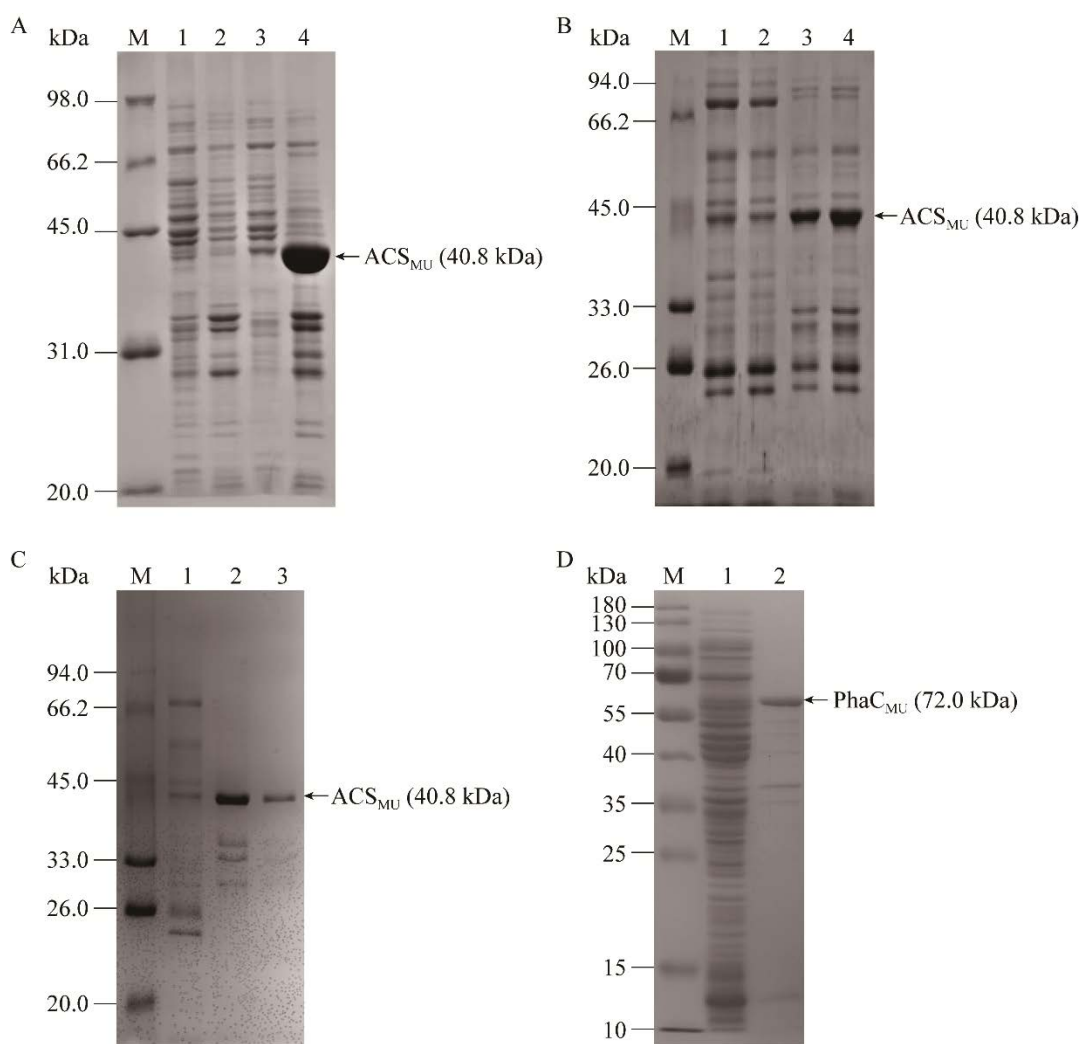


图3 ACS_{MU}和PhaC_{MU}的表达条件优化电泳结果

Figure 3 Electrophoresis results of optimized expression conditions for ACS_{MU} and PhaC_{MU}. A: ACS_{MU} induced expression. M: Protein marker; Lane 1: Supernatant protein without inducer addition; Lane 2: Precipitated protein without added inducer; Lane 3: Supernatant protein with inducer addition; Lane 4: Precipitated protein with added inducer. B: ACS_{MU} expression temperature optimization. M: Protein marker; Lane 1: 37 °C; Lane 2: 30 °C; Lane 3: 20 °C; Lane 4: 15 °C. C: ACS_{MU} expression inducer concentration optimization. M: Protein marker; Lane 1: 0.2 mmol/L; Lane 2: 0.5 mmol/L; Lane 3: 0.8 mmol/L. D: PhaC_{MU} induced expression. M: Protein marker; Lane 1: Total enzyme solution; Lane 2: Supernatant protein.

PhaC^[13], 来源于 *R. eutropha* 的 PHA 合酶 PhaC_{Re} 是 I 类 PhaC 的代表性酶^[18], 因此以 PhaC_{Re} 为对照设计 ACS_{MU}-PCT_{CP}-PhaC_{Re}/PhaC_{MU} 两条合成途径验证 PhaC_{MU}PHB 合成能力。

本研究根据设计的合成途径, 大量提取 ACS_{MU}、ACS_{Pt}、PCT_{CP}、PhaC_{Re} 和 PhaC_{MU} 并测

定了其酶活性。三类酶(5 种)的纯化结果如图 4 所示, ACS_{MU} 和 ACS_{Pt} 分子量分别约为 40.8 kDa 和 74.0 kDa, PCT_{CP} 分子量约为 65.0 kDa, PhaC_{MU} 和 PhaC_{Re} 分子量分别约为 64.0 kDa 和 72.0 kDa, 均与理论分子量一致。经纯化后目的蛋白条带清晰且浓度较高。

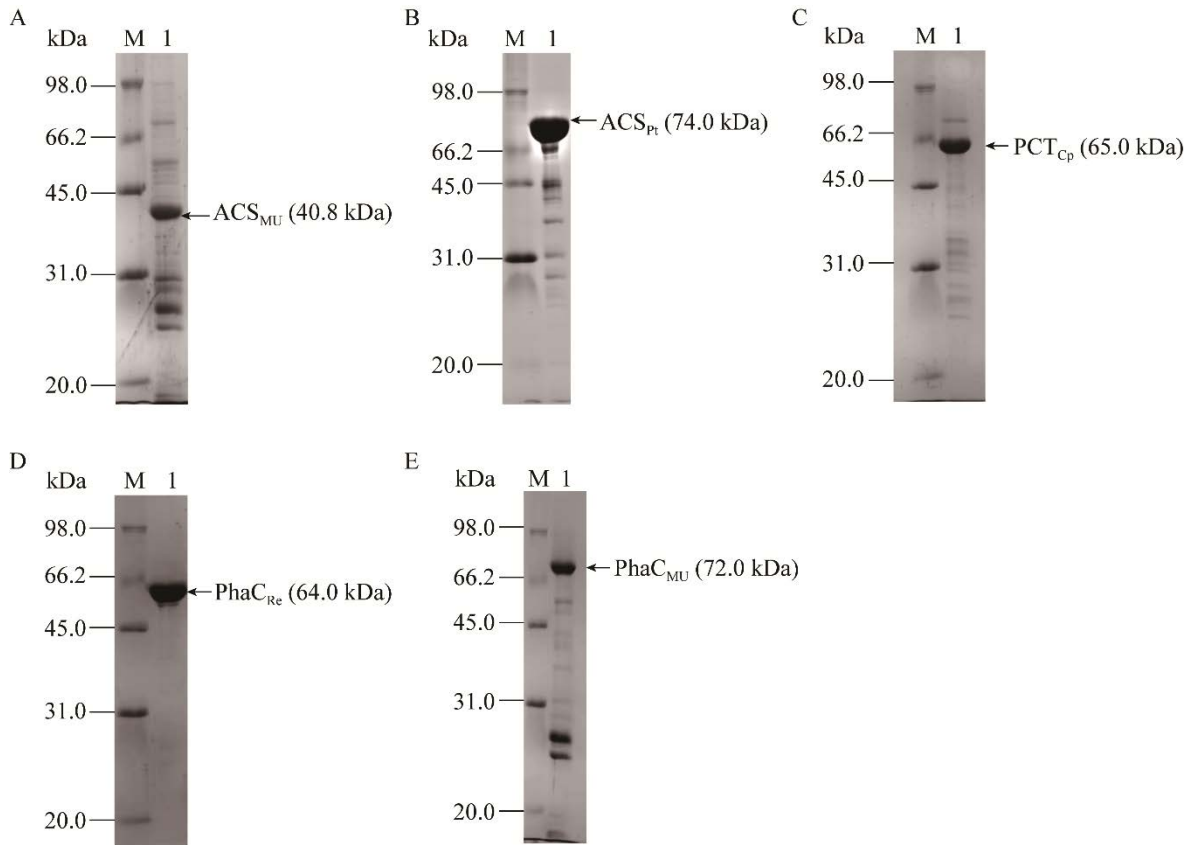


图 4 PHA 合成相关酶的纯化电泳图

Figure 4 Electrophoresis of purification PHA synthesis-related enzymes. A: ACS_{MU} purification result. M: Protein marker; Lane 1: ACS_{MU}. B: ACS_{Pt} purification result. M: Protein marker; Lane 1: ACS_{Pt}. C: PCT_{Cp} purification result. M: Protein marker; Lane 1: PCT_{Cp}. D: PhaC_{Re} purification result. M: Protein marker; Lane 1: PhaC_{Re}. E: PhaC_{MU} purification result. M: Protein marker; Lane 1: PhaC_{MU}.

五种蛋白表达量和比活性结果总结于表 1。ACS_{Pt} 和 ACS_{MU} 的表达量分别为 70.0 mg/L 和 24.8 mg/L；PCT_{Cp} 的表达量为 70.0 mg/L；PhaC_{Re} 和 PhaC_{MU} 表达量分别为 88.0 mg/L 和 25.6 mg/L。ACS_{Pt} 和 ACS_{MU} 的酶比活力分别为 (0.289±0.015) U/mg 和 (0.148±0.011) U/mg，ACS_{MU} 只有 ACS_{Pt} 的 50%；PCT_{Cp} 的酶比活力为 (0.389±0.026) U/mg；PhaC_{Re} 的酶比活力为 (0.246±0.017) U/mg，PhaC_{MU} 的酶比活力为 (0.102±0.011) U/mg，约为 PhaC_{Re} 的 40%。

2.4 PHB 的体外合成结果及产物结构

使用 ACS_{Pt}/ACS_{MU}-PCT_{Cp}-PhaC_{Re} 设计 OPRS，

合成产物的结果如表 2 所示，对比使用 ACS_{Pt} 合成产物量为 0.62 g/L，使用 ACS_{MU} 合成产物量为 0.76 g/L，增加了 22.58%。根据设计的 ACS_{MU}-PCT_{Cp}-PhaC_{Re}/PhaC_{MU} 合成途径，使用

表 1 PHB 合成相关酶产量及酶比活力

Table 1 Yields and enzyme specific activities of PHB synthesis-related enzymes

Proteins	Concentration (mg/mL)	Yield (mg/L)	Specific activity (U/mg)
ACS _{MU}	6.2	24.8	0.148±0.011
ACS _{Pt}	14.0	70.0	0.289±0.015
PCT _{Cp}	12.0	70.0	0.389±0.026
PhaC _{Re}	16.0	88.0	0.246±0.017
PhaC _{MU}	6.4	25.6	0.102±0.011

表 2 PHB 的体外合成产物提取结果

Table 2 Extraction results of products of PHB by *in vitro* OPRS

Enzymes in PHB synthetic pathways	Dry weight of product (mg)	Yield (g/L)
ACS _{Pt} , PCT _{Cp} , PhaC _{Re}	3.10	0.62
ACS _{MU} , PCT _{Cp} , PhaC _{Re}	3.80	0.76
ACS _{MU} , PCT _{Cp} , PhaC _{MU}	3.20	0.64

PhaC_{MU} 合成产物量为 0.64 g/L, 比使用 PhaC_{Re} 低 15.79%。不同途径获得产物的核磁共振氢谱 (nuclear magnetic resonance hydrogen spectroscopy, ¹H-NMR) 结果如图 5 所示, 样品分别在 5.3、2.6、1.3 ppm 有强信号, 与 PHB 的各个 C 上 H 的位移一致^[19], 证明 3 组反应产物均为 PHB。

3 讨论与结论

R. eutropha 通过糖酵解生成的丙酮酸经过丙酮酸脱氢酶复合物的催化生成乙酰辅酶 A, 由两分子乙酰辅酶 A 依次经过 PhaA, 经 PhaB 生成 3HB-CoA 和 PhaC 的催化合成 PHB^[20]。微生物体内乙酰辅酶 A 持续供给是 PHB 合成产量增加的必要条件, 在糖酵解过程中, 存在 3 个限速酶, 分别为己糖激酶、6-磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶, 这使得通过基因工程手段改造糖酵解过程从而提高乙酰辅酶 A 胞内浓度具有挑战性, 陈涛等在乙酸存在的条件下, 通过过表达基因工程菌体内 ACS 从而提高乙酰辅酶 A

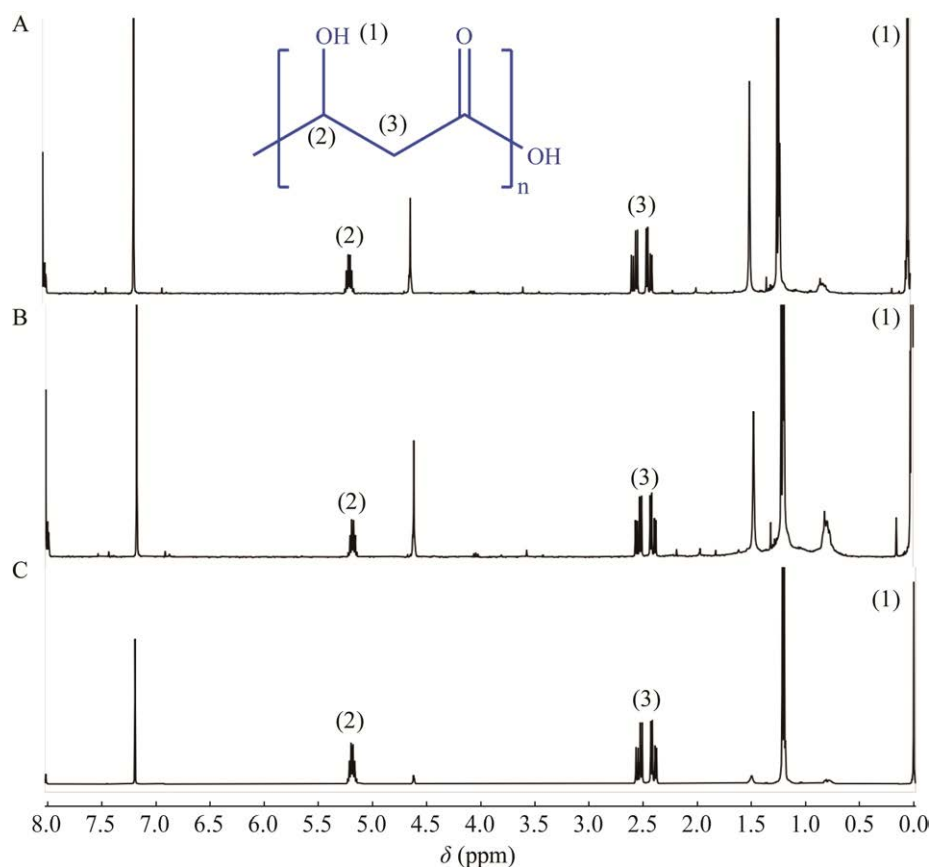
图 5 体外合成产物的 ¹H-NMR 结果

Figure 5 ¹H-NMR results of *in vitro* synthesis products. A: ¹H-NMR results of PHB synthesized by ACS_{Pt}-PCT_{Cp}-PhaC_{Re}. B: ¹H-NMR results of PHB synthesized by ACS_{MU}-PCT_{Cp}-PhaC_{Re}. C: ¹H-NMR results of PHB synthesis by ACS_{MU}-PCT_{Cp}-PhaC_{MU}.

胞内浓度成功获得了更高的 PHB 产量^[9]。本研究团队在 *Massilia* 中鉴定了多种编译 ACS 的基因,但都与其他菌属一致性低且未对其功能进行验证。比活力高低表明在底物浓度相同时,酶提供产物的能力。本研究克隆并表达了 *Massilia* sp. UMI-21 的 *acs_{MU}* 基因,ACS_{MU} 对乙酸的比活力是 ACS_{Pt} 的 51.2%,是来源于 *R. eutropha* 的 ACS (AcoE) 的 44%^[16],为后续在 *Massilia* sp. UMI-21 中调控胞内乙酰辅酶 A 浓度提供了靶点。本研究使用 OPRS 设计的合成途径,分析 ACS_{MU} 在 PHB 合成中的功能结果表明,该酶通过将乙酸转化为乙酰辅酶 A,为 PCT 酶提供 CoA 供体用于底物 3HBCoA 合成,并在 PhaC 作用下合成 PHB。低比活性的 ACS_{MU} 合成 PHB 产量高于高比活性 ACS_{Pt},这个结果与 ACS_{Pt} 合成 PHB 的产量也高于活性更高的 AcoE 类似^[15],该结果说明 ACS 活性高低并不影响 PHB 合成量,该酶不是聚合物合成的关键酶,但可能酶的稳定性比活性更重要,为提供 CoA 所必需。

PHA 合酶能利用(R)-3HB-CoA 为底物,催化(R)-3HB-CoA 聚合成 PHA,是 PHA 生物合成过程中的关键酶,决定着所合成 PHA 的类型及聚合度^[21]。蛋白质序列比对结果显示 PhaC_{MU} 和最典型的 I 类 PHA 合酶 PhaC_{Re} 有 60% 的一致性,推测 PhaC_{MU} 属于 I 类 PHA 合酶^[19]。在 ACS_{MU}-PCT_{Cp}-PhaC_{Re}/PhaC_{MU} 两组实验中,ACS_{MU}-PCT_{Cp}-PhaC_{MU} 组 PHB 产率低于对照组,在合成途径中提供聚合前体的两种酶相同的情况下,产 PHB 的高低取决于聚合酶的活性,PhaC_{MU} 的活性低于 PhaC_{Re} 是合成 PHB 产量降低的主要原因。尽管 PhaC_{MU} 是 I 类 PHA 合酶,但蛋白序列同源性较低将会导致酶的立体结构改变较大,这些氨基酸的改变对该酶的活性及底物特异性影响仍需进一步研究。

综上所述,本研究成功构建了来源于 *Massilia* sp. UMI-21 的 *acs_{MU}* 和 *phaC_{MU}* 基因的重组表达体系,获得两种蛋白的表达量分别为 24.8 mg/L 和 25.6 mg/L,ACS_{MU} 比活性为 (0.148±0.011) U/mg,PhaC_{MU} 对(R)-3HBCoA 比活性为 (0.102±0.011) U/mg。利用 OPRS,对比 ACS_{Pt}-PCT_{Cp}-PhaC_{Re} 合成 PHB 途径组合,ACS_{MU} 代替 ACS_{Pt} 合成 PHB 产量为 0.76 g/L,提高 22.58%。该结果表明,PHB 的合成产量不依赖为合成反应提供乙酰辅酶 A 的 ACS 酶的比活性,可能与酶稳定性有关。对比对照组 ACS_{MU}-PCT_{Cp}-PhaC_{Re} 途径,使用 PhaC_{MU} 代替 PhaC_{Re} 合成 PHB 产量为 0.64 g/L,下降 15.79%。PhaC_{MU} 比活性低于 PhaC_{Re} 是导致 PHB 合成量降低的主要原因,进一步证明了 PhaC 是 PHB 合成途径中的关键限速酶。本研究通过体外重组表达手段,结合使用 OPRS 设计的合成途径,成功验证了 ACS_{MU} 和 PhaC_{MU} 在合成 PHB 途径中的酶学功能,为 *Massilia* sp. UMI-21 的 PHB 合成途径解析、改造以及新型 PHA 的合成提供新的思路。

参考文献

- [1] 赵志强, Lacmata Tamekou Stephen, 咸漠, 刘修涛, 冯新军, 赵广. 重组大肠杆菌转化甘油合成聚 3-羟基丙酸-co-乳酸[J]. 中国生物工程杂志, 2018, 38(2): 46-53.
ZHAO ZQ, STEPHEN LT, XIAN M, LIU XT, FENG XJ, ZHAO G. Biosynthesis of poly(3-hydroxypropionate-co-lactate) from glycerol by engineered *Escherichia coli*[J]. China Biotechnology, 2018, 38(2): 46-53 (in Chinese).
- [2] 高翠娟, 连思琪, 祁庆生. 代谢工程构建重组耶氏解脂酵母生产中长链聚羟基脂肪酸酯[J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(5): 53-58.
GAO CJ, LIAN SQ, QI QS. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by recombinant *Yarrowia lipolytica* through metabolic

- engineering[J]. Chinese Journal of Biological Engineering, 2016, 36(5): 53-58 (in Chinese).
- [3] 杨鹏, 王琦, 咸漠, 薛永常, 赵广. 聚 3-羟基丙酸及其共聚物的生物合成[J]. 科学通报, 2014, 59(22): 2137-2144.
YANG P, WANG Q, XIAN M, XUE YC, ZHAO G. Biosynthesis of poly(3-hydroxypropionate) and its copolymers[J]. Chinese Science Bulletin, 2014, 59(22): 2137-2144 (in Chinese).
- [4] 陈国强, 张广, 赵锴, 田格, 陈金春, 吴琼. 聚羟基脂肪酸酯的微生物合成、性质和应用[J]. 无锡轻工业大学学报, 2002(2): 197-208.
CHEN GQ, ZHANG G, ZHAO K, TIAN G, CHEN JC, WU Q. Microbial synthesis, properties and applications of polyhydroxyalkanoates[J]. Journal of Wuxi Light Industry University, 2002(2): 197-208 (in Chinese).
- [5] 陈心宇, 李梦怡, 陈国强. 聚羟基脂肪酸酯 PHA 代谢工程研究 30 年[J]. 生物工程学报, 2021, 37(5): 1794-1811.
CHEN XY, LI MY, CHEN GQ. Thirty years of metabolic engineering for biosynthesis of polyhydroxyalkanoates[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(5): 1794-1811 (in Chinese).
- [6] GUMEL AM, ANNUAR MSM, HEIDELBERG T. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates copolymers produced by *Pseudomonas putida* Bet001 isolated from palm oil mill effluent[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e45214.
- [7] 刘俊梅, 王庆, 王丹, 杨盼盼, 丁伟, 朴春红, 王玉华, 于寒松. 假单胞菌的聚- β -羟基丁酸酯聚合酶基因的克隆与表达[J]. 中国食品学报, 2018, 18(4): 299-305.
LIU JM, WANG Q, WANG D, YANG PP, DING W, PIAO CH, WANG YH, YU HS. Cloning and expression of poly- β -hydroxybutyrate polymerase gene from *Pseudomonas koreensis*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(4): 299-305 (in Chinese).
- [8] 陈露, 刘丁玉, 汪保卫, 赵玉姣, 贾广韬, 陈涛, 王智文. 大肠杆菌乙酰辅酶 A 代谢调控及其应用研究进展[J]. 化工进展, 2019, 38(9): 4218-4226.
CHEN L, LIU DY, WANG BW, ZHAO YJ, JIA GT, CHEN T, WANG ZW. Advances in acetyl coenzyme A metabolic engineering with *Escherichia coli*[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2019, 38(9): 4218-4226 (in Chinese).
- [9] 晋彪, 张静, 洪坤强, 王智文, 陈涛. 嗜盐单胞菌利用乙酸盐合成 PHB 的研究[J]. 化学工业与工程, 2022, 39(5): 119-126.
JIN B, ZHANG J, HONG KQ, WANG ZW, CHEN T. Studies on PHB production in *Halomonas* using acetate as substrate[J]. Chemical Industry and Engineering, 2022, 39(5): 119-126 (in Chinese).
- [10] BASSAS-GALIA M, NOGALES B, ARIAS S, ROHDE M, TIMMIS KN, MOLINARI G. Plant original *Massilia* isolates producing polyhydroxybutyrate, including one exhibiting high yields from glycerol[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 112(3): 443-454.
- [11] WEON HY, KIM BY, HONG SB, JEON YA, KOO BS, KWON SW, STACKEBRANDT E. *Massilia niabensis* sp. nov. and *Massilia niastensis* sp. nov., isolated from air samples[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(7): 1656-1660.
- [12] CERRONE F, del MAR SÁNCHEZ-PEINADO M, RODRÍGUEZ-DÍAZ M, GONZÁLEZ-LÓPEZ J, POZO C. PHAs production by strains belonging to *Massilia* genus from starch[J]. Starch-Stärke, 2011, 63(4): 236-240.
- [13] HAN XR, SATOH Y, KURIKI Y, SEINO T, FUJITA S, SUDA T, KOBAYASHI T, TAJIMA K. Polyhydroxyalkanoate production by a novel bacterium *Massilia* sp. UMI-21 isolated from seaweed, and molecular cloning of its polyhydroxyalkanoate synthase gene[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2014, 118(5): 514-519.
- [14] JIANG N, WANG M, SONG LX, YU DB, ZHOU SZ, LI Y, LI HY, HAN XR. Polyhydroxybutyrate production by recombinant *Escherichia coli* based on genes related to synthesis pathway of PHB from *Massilia* sp. UMI-21[J]. Microbial Cell Factories, 2023, 22(1): 1-11.
- [15] HAN XR, SATOH Y, TAJIMA K, MATSUSHIMA T, MUNEKATA M. Chemo-enzymatic synthesis of polyhydroxyalkanoate by an improved two-phase reaction system (TPRS)[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2009, 108(6): 517-523.
- [16] 车雪梅, 司徒卫, 余柳松, 王辉, 陈亚精, 司徒建崧, 李耀, 余景升, 陈国强. 聚羟基脂肪酸酯的应用展望[J]. 生物工程学报, 2018, 34(10): 1531-1542.
CHE XM, SITU W, YU LS, WANG H, CHEN YJ,

- SITU JS, LI Y, YU JS, CHEN GQ. Application perspectives of polyhydroxyalkanoates[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2018, 34(10): 1531-1542 (in Chinese).
- [17] TAJIMA K, HAN XR, HASHIMOTO Y, SATOH Y, SATOH H, TAGUCHI S. *In vitro* synthesis of polyhydroxyalkanoates using thermostable acetyl-CoA synthetase, CoA transferase, and PHA synthase from thermotolerant bacteria[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2016, 122(6): 660-665.
- [18] 郭秀君, 于昕. 一种新型生物塑料(PHB)的研究进展和开发前景[J]. *生物工程进展*, 1997(5): 61-65, 68. GUO XJ, YU X. Progress in the research and utilization of a new kind of bioplastics (PHB)[J]. *Progress in Biotechnology*, 1997(5): 61-65, 68 (in Chinese).
- [19] GERNGROSS TU, MARTIN DP. Enzyme-catalyzed synthesis of poly[(R)-(-)-3-hydroxybutyrate]: formation of macroscopic granules *in vitro*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(14): 6279-6283.
- [20] 祁莹莹, 贾丁柔, 张红蕾, 刘刚, 王冬梅. 一株聚羧基脂肪酸酯合成菌的筛选及鉴定[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(3): 881-893. QI YY, JIA DR, ZHANG HL, LIU G, WANG DM. Screening and identification of a polyhydroxyalkanoate-synthesizing strain[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(3): 881-893 (in Chinese).
- [21] MCCOOL GJ, CANNON MC. PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(14): 4235-4243.