

## 北京棒杆菌 DAHP 合成酶 基因的克隆、序列分析及表达

张春花<sup>1,2</sup>, 赵智<sup>1</sup>, 张英姿<sup>1</sup>, 王宇<sup>1</sup>, 丁久元<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院微生物研究所, 北京 100101)

(<sup>2</sup>中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:**【目的】从北京棒杆菌(*Corynebacterium pekinense*)中克隆 DAHP 合成酶 (EC 2.5.1.54, 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase, DS) 基因, 对其进行功能验证; 并将 DAHP 合成酶 基因在 *C. pekinense* PD-67 进行同源表达, 研究该酶的比活力与生长的相关性。【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 方法扩增了 DAHP 合成酶 的全基因序列 *aro* 和前端控制序列; 通过 pAK6 载体提高 DAHP 合成酶 基因在 *C. pekinense* PD-67 中的拷贝数实现其同源表达。【结果】核苷酸序列分析结果表明, *C. pekinense* 野生株 AS1.299 与突变株 PD-67 相比较, DAHP 合成酶 I 基因序列完全一样; 通过 PCR 方法得到的 DAHP 合成酶 基因结构功能完整, 能与 DAHP 合成酶完全缺陷的 *E. coli* 3257 实现异源互补。突变株 PD-67 来源的 DAHP 合成酶 基因在重组菌 PD-67(pAD1)中进行了表达, 在稳定期初期重组菌 PD-67(pAD1)的 DAHP 合成酶 的酶比活力比同期的对照菌株 PD-67(pAK6)中的该酶酶比活力提高了约 5 倍。【结论】本工作首次证实了 *C. pekinense* 1.299 和 PD-67 中存在 DAHP 合成酶 基因, 异源互补试验证明扩增得到的 DNA 片段编码 DAHP 合成酶, 酶学性质研究表明 DAHP 合成酶 基因在 *C. pekinense* PD-67 中的同源表达将有助于提高该菌的色氨酸积累。

**关键词:** 北京棒杆菌; DAHP 合成酶; 莽草酸合成途径; L-色氨酸

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 11-1466-07

莽草酸途径是芳香族氨基酸合成的共同途径, 包含 7 步酶催化反应, 最终生成分支酸。在分支酸以后即分为 2 条途径, 其中一条途径生成酪氨酸和苯丙氨酸, 另一条途径生成色氨酸。根据已经测序的基因组, 发现莽草酸途径广泛存在于微生物和植物中, 最近在动物的寄生虫 *Plasmodium falciparum* 中也发现有该途径, 但是莽草酸途径在更高级的生物中是不存在的, 这使得该途径的各个酶成为研制抗生素和除草剂的靶标, 同时也是提高芳香族氨基酸产量的靶标<sup>[1, 2]</sup>。

DAHP 合成酶 (EC 2.5.1.54, 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase, DS) 是莽草酸途径的第一个酶, 通过催化磷酸烯醇式丙酮酸 (phospha-

enolpyruvate PEP) 和 4-磷酸赤藓糖 (Erythrose-4-P E4P) 之间的醛缩反应生成 DAHP; 同时也是该途径的关键酶, 受反馈调节作用。已知的 DAHP 合成酶在核苷酸序列和蛋白亚基分子量上存在很大差异, 据此将它们分成两大明显不相关的类型: 型和型<sup>[3]</sup>。DAHP 合成酶型与型基因的蛋白编码区核苷酸序列的同源性小于 10%; 在蛋白亚基分子量上, 型 DAHP 合成酶小于 40 kDa, 型 DAHP 合成酶约为 50 kDa。在棒杆菌属中 DAHP 合成酶有较大差别: 谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* R 只有 DAHP 合成酶, *Corynebacterium diphtheriae* 和 *Corynebacterium jeikeium* 只有 DAHP 合成酶, *Corynebacterium glutamicum*

\*通讯作者。Tel/Fax: +86-10-64807415; E-mail: dingjy@sun.im.ac.cn

作者简介: 张春花(1981-), 女, 江苏镇江人, 硕士研究生, 主要从事氨基酸代谢研究。E-mail: yiqiu127@163.com

收稿日期: 2008-04-28; 修回日期: 2008-07-11

ATCC 13032 同时有 DAHP 合成酶 和 [4, 5]。在 *Corynebacterium glutamicum* CCRC 18310 中,已发现存在 DAHP 合成酶 且受酪氨酸反馈抑制调控,是芳香族氨基酸合成途径中的关键酶[6]。

北京棒杆菌 AS1.299(*Corynebacterium pekinense* n.sp.AS1.299)是我国研究者分离到的一株革兰氏阳性、无芽孢的产 L-谷氨酸的细菌[7]。其突变株 PD-67 为 L-苯丙氨酸完全缺陷型和 L-酪氨酸不完全缺陷型,可积累 L-色氨酸。本文报道了北京棒杆菌 AS1.299 及其突变株 PD-67 的 DAHP 合成酶 基因序列,对

它们的核苷酸序列和氨基酸序列进行了分析,并将突变株 PD-67 中的 DAHP 合成酶 基因在 *E.coli* 3257 和 *C. pekinense* PD-67 中进行表达。

## 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;标准分子量蛋白为北京全式金公司和美国 GenScript 公司产品;赤藓糖-4-P 购自 Sigma

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>		
3257	<i>aro F363, aro G365, aro H367</i> <i>thi-1 hisG4(Oc) Δ(gpt-pro)62 argE3(Oc) ilvC7</i>	<i>E.coli</i> Stock Center of Yale University
<i>Corynebacterium pekinense</i>		
AS1.299	Wild type	This lab
PD-67	<i>phe<sup>-</sup> tyr<sup>±</sup></i>	This lab
Plasmids		
pMD19-T	T-vector, 2.7kb, Amp <sup>R</sup> , <i>lacZ</i>	TaKaRa Co.
pAK6	5.7 kb, <i>E.coli-C. glutamicum</i> shuttle vector, Km <sup>R</sup>	This lab <sup>[8]</sup>
pCD1	2.1 kb PCR fragment containing AS1.299 DS gene in pMD19-T	This study
pCD2	2.1 kb PCR fragment containing PD-67 DS gene in pMD19-T	This study
pAD1	2.1 kb PCR fragment containing PD-67 DS gene in pAK6	This study

*phe<sup>-</sup>*:no cell growth without phenylalanine addition in minimal medium, *tyr<sup>±</sup>*:meager cell growth without tyrosine addition in minimal medium.

公司;其余生化药品为进口或国产分析纯试剂;基因扩增仪为 MJ 公司 PTC-150 型基因扩增仪;BIO-RAD MicroPulser<sup>TM</sup> 电击仪;721 分光光度计及 BioSpec-1601 紫外分光光度计;Alphalmager EC 凝胶成像仪。

1.1.3 培养基和培养条件: LB 培养基<sup>[9]</sup>用于 *E. coli* 培养; M63 基本培养基<sup>[10, 11]</sup>中加入 0.5%的甘油,脯氨酸、组氨酸、异亮氨酸和缬氨酸各 50 μg/mL, 5 μg/mL 的硫胺素用于 *E. coli* 重组菌的筛选; LB 培养基加入 1%葡萄糖和 0.2%尿素用于培养 *C. pekinense*;

LB 培养基加入 4%甘氨酸<sup>[12]</sup>用于制备电击转化用 *C. pekinense* 细胞; 种子培养基和用于培养细胞制备粗酶液的培养基:每升含葡萄糖 30 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 1 g, 尿素 2 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 20 mg, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 20 mg, 生物素 100 μg, 硫胺素 500 μg, 0.1 mg/mL L-苯丙氨酸, 0.05 mg/mL L-酪氨酸。若要制备固体培养基,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 μg/mL, 卡那霉素 50 μg/mL。

### 1.2 DNA 操作

*E. coli* 质粒提取参照文献[9], *C. pekinense* 质粒提取采用改进碱法。*E. coli* 转化采用 CaCl<sub>2</sub> 法, *C. pekinense* 转化采用电击转化法<sup>[12]</sup>。

### 1.3 PCR 扩增及测序

根据同源性,参照 *C. glutamicum* ATCC 13032 DAHP 合成酶 基因序列(GenBank No.BA000036)设计一对引物,分别引入一个酶切位点,用于扩增 *C. pekinense* 1.299 和 PD-67 的 DAHP 合成酶 基因序列和前端控制序列。正向引物:5'-TCTA GATGAG-GGTGTTTCGCAAGGCAATGGC-3';反向引物:5'-GG-ATCCAGCATGAATCCGGAAAGTTCGCTGC-3';下划线处分别为 *Xba* 和 *Bam*H 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,引物合成由奥莱博生物公司完成。

DNA 测序由北京诺赛基因组研究中心有限公司完成。

#### 1.4 *aro* 的异源互补实验

将 pCD1, pCD2 转化 *aroF*, *aroG*, *aroH* 基因缺陷型 *E. coli* 3257, 涂布在加有氨基青霉素的 LB 培养基平板上, 获得转化子。然后分别将带有空载体 pMD19-T, 重组质粒 pCD1 和 pCD2 的 *E. coli* 3257 接种于 LB 培养基平板, M63 基本培养基和含有氨基青霉素 M63 基本培养基平板进行异源互补实验。

#### 1.5 DAHP 合成酶 活性测定

**1.5.1 粗酶液制备:** 将 *C. pekinense* PD-67 接种于种子培养基 30 摇床培养 24 h 后, 接种于测酶活用基本培养基, 培养 24 h 后离心收集菌体。用 50 mmol/L Tris-HCl(pH7.5) 洗涤两次, 用该缓冲液悬浮菌体, 置冰浴中超声波破碎细胞。细胞破碎液经 8000 r/min, 离心 10 min 后, 上清液用于酶活测定和蛋白电泳。

**1.5.2 DAHP 合成酶 活性测定<sup>[13]</sup>:** 75  $\mu$ L 反应体系含: 3.75  $\mu$ L 100 mmol/L 磷酸烯醇式丙酮酸, 1.5  $\mu$ L 100 mmol/L 4-磷酸赤藓糖 适量粗酶液, 用 50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5) 补足体积, 在 30 水浴中温育 10 min; 加入 400  $\mu$ L 10% 三氯乙酸和 100  $\mu$ L 25 mmol/L 高碘酸钠(用 125 mmol/L 硫酸配制), 在 37 水浴中温育 30 min; 加入 100  $\mu$ L 2% 亚硫酸钠混匀, 再加入 1 mL 0.36% 硫代巴比妥酸, 100 煮沸 10 min, 冷却至室温, 于 549 nm 测吸光值。一个酶活力单位(U)定义为: 反应体系中每分钟催化形成 1  $\mu$ mol DAHP 所需的酶量。

**1.5.3 粗酶液中蛋白含量测定:** 采用考马斯亮兰法<sup>[14]</sup>。

#### 1.6 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%。

#### 1.7 核苷酸和氨基酸序列分析

核苷酸序列分析使用 DNAMAN 和 BLASTN ; 氨基酸序列分析使用 DNAMAN ,CPHmodels ,BLASTP , Jpred3 , 以及 GENEDOC。

## 2 结果和分析

### 2.1 *C. pekinense* AS1.299 和 PD-67 DAHP 合成酶 基因的 PCR 扩增

分别提取 *C. pekinense* AS1.299 和 PD-67 的基因组 DNA 作为模板, 扩增出约 2.1kb 含 DAHP 合成酶基因的 DNA 片段各一条。回收 PCR 产物与 pMD19-T 载体连接, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。随机挑取阳性克隆提取质粒, 进行酶切鉴定后测序, 各得到两个序列结果一致的克隆, 重组质粒分别命名为 pCD1 和 pCD2。

### 2.2 核苷酸序列分析

测序结果表明 pCD1 和 pCD2 插入片段长度均为 2168 bp, 核苷酸序列分析显示, 插入片段均含有 2 个 ORF。第一个 ORF 为 DAHP 合成酶 结构基因(1101 bp), 编码一条由 366 个氨基酸残基组成的多肽, 第二个 ORF 编码一个由 35 个氨基酸残基组成的功能未知的多肽。DAHP 合成酶 结构基因的起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TAA; 在起始密码子上游-8 bp 有一可能的核糖体结合位点 5'-AAGGCA-3', 与枯草芽孢杆菌的 SD 序列 5'-AAGGAG-3' 相似性很高<sup>[15]</sup> 在起始密码子上游-39 处有一可能的启动子元件 5'-TAAGTT-3', 与大肠杆菌和其他 G<sup>+</sup> 细菌中启动子的“-10”区 5'-TATATT-3' 相似度很高, 只有两个碱基的差别; 在起始密码子上游-63 处有另一可能的启动子元件 5'-TAGAGG-3', 与大肠杆菌的“-35”区 5'-TTGACA-3' 相比, 有 3 个碱基的差别; 在终止密码子下游 10 bp 处存在可能的终止子序列<sup>[16]</sup>。 *C. pekinense* AS1.299 的调控区序列与 *C. glutamicum* CCRC 18310(GenBank No.L07603)相比, 在类似“-10”区和终止子各有一个碱基的变化(图 1)。

```

AACAGAACCGGAGTCGAGCAGCACCTCCCGCAAGGGTAGAGGGCTGCTTTTTTGT
                                     -35
TTCTTAAGTTCACCCACCCCATGCATAGCCCTGAAAGGCAAGAAAAATG.....TAA...
      -10                                     SD
GGACTGCTGTACCCGGTGTATGAGCGCCGCTTTTAAAGAGAACTAGACGGCGCCAAAC
      ←                                     →

```

图 1 *C. pekinense* 1.299 *aro* 基因的调控序列

Fig. 1 Regulatory sequences of the *C. pekinense* 1.299 *aro* gene. The putative promoter region (-10 region and -35 region) for *aro* ORF, and the proposed ribosome binding site (SD) are indicated. The putative terminator is shown with pairs of facing arrows. The dot under the nucleotide indicates the difference between *C. pekinense* and *C. CCRC* 18310.

*C. pekinense* AS1.299 与 PD-67 的 DAHP 合成酶基因序列比较:DAHP 合成酶 基因编码序列完全一致,前端的调控序列也完全一致。

在 *E. coli* 中有 3 种分别受酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸反馈抑制调控的 DAHP 合成酶同工酶,同属于 DAHP 合成酶 型,对应的结构基因分别为 *aroF*, *aroG*, *aroH*(GenBank No.NC000913)<sup>[10]</sup>, *C. pekinense* AS1.299 的 DAHP 合成酶 基因编码区核苷酸序列与 *E. coli* 的 *aroF*,*aroG*, *aroH* 同源性分别为 48.92%, 52.61%和 48.29%。*C. pekinense* AS1.299 的 DAHP 合成酶 基因编码区核苷酸序列与 *C. glutamicum* ATCC 13032(GenBank No.BA000036),*C. glutamicum* R(GenBank No.AP009044)和 *C. glutamicum* CCRC 18310(GenBank No.L07603)<sup>[17]</sup>的同源性分别为 99.91%、99.41%和 97.74%;

### 2.3 氨基酸序列分析

氨基酸序列分析结果表明, *C. pekinense* 1.299 和 PD-67 的 DAHP 合成酶 亚基均由 366 个氨基酸残基组成;推测分子量为 39 kDa,与电泳测得的结果相近;理论等电点为 4.71。

对 DAHP 合成酶 进行 Blastp 分析,在其一级结构上, *C. pekinense* PD-67 的 DAHP 合成酶 的氨基酸序列与 *E. coli* *aroF*,*aroG*, *aroH* 所编码的同工酶的氨基酸序列同源性分别为 45.14%、49.59%和 45.26%;

与 *C. glutamicum* R, *C. glutamicum* ATCC 13032 和 *C. glutamicum* CCRC 18310 的氨基酸序列同源性分别为 100%, 99%和 97.74%。

通过 ExPASy 的 Jpred3 搜索发现,虽然 *C. pekinense* PD-67 的 DAHP 合成酶 与已经解出晶体结构的 *E. coli* 的受苯丙氨酸,酪氨酸,色氨酸反馈调节的 3 种 DAHP 合成酶 同工酶在一级结构上差异较大;但在蛋白二级结构上,相似性很高。它们在相应的位置形成  $\beta$ -strands 和  $\alpha$ -helices,且  $\beta$ -strands 和  $\alpha$ -helices 的数目及在一级结构上的排列顺序一致,blast-E-value 值为:  $5e-96$ ,二级结构的相似性进一步决定了三级结构和四级结构的相似性。目前未见棒杆菌属中 DAHP 合成酶 晶体结构的报道。

通过 CPHmodels 软件对 *C. pekinense* PD-67 DAHP 合成酶 蛋白亚基的空间结构进行模拟,它们与 *E. coli* 的 3 种 DAHP 合成酶 同工酶都具有  $(\beta/\alpha)_8$ -TIM barrel 的核心结构。基于核心的  $(\beta/\alpha)_8$ -TIM barrel 结构,将它们的 DAHP 合成酶 亚基重叠(图 2),发现 *C. pekinense* PD-67 DAHP 合成酶 与 *E. coli* 的 3 种同工酶在二级结构上非常相似,它们在相应的位置形成 core  $\beta$ -strands 和 core  $\alpha$ -helices。*E. coli* 的 3 种 DAHP 合成酶 同工酶中与催化活性相关的关键氨基酸残基在 *C. pekinense* PD-67 的该酶中也是严格保守的,

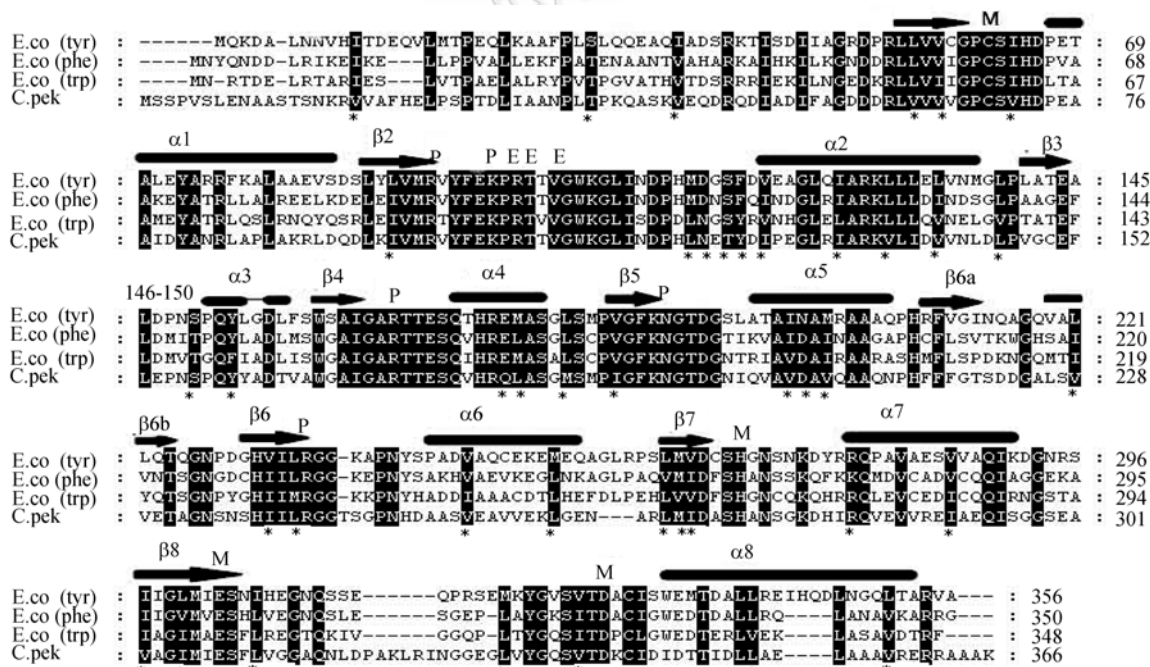


图 2 基于蛋白质二级结构的 *C. pekinense* 1.299 DS I 基因的氨基酸序列比对分析

Fig. 2 Structure-based primary sequence alignment of DS I. The sequence are for the *E. coli*(Tyr-sensitive) DS I, *E. coli*(Phe-sensitive) DS I, *E. coli*(Trp-sensitive) DS I. The position of Core  $\beta$ -strands and core  $\alpha$ -helices are indicated by black arrows and gray cylinders respectively. Residues that are unlimited conservative are indicated by \*. The invariant residues are highlighted in dark. Residues in contact with metal or PEP are denoted with M or P respectively. The positions 146-150 which was found associated closely with feedback regulation was indicated by rhombus.

并且在一级结构和二级结构上处在相似的位置,推测这些氨基酸残基在 *C. pekinense* PD-67 DAHP 合成酶

中起着相同的作用: *Cys67*, *His273*, *Glu307* 和 *Asp338* 参与与金属离子结合; *Lys193*, *Arg172*, *Arg241*, *Arg100* 和 *Lys105* 参与与底物 PEP 结合; *Arg107*, *Thr108* 和 *Val110* 参与与底物 E4P 结合<sup>[18,19]</sup>(图 2)。对 *C. glutamicum* CCRC 18310 DAHP 合成酶的 3 个半胱氨酸残基进行定点突变分析,结果表明 *Cys67* 对酶起催化作用是必须的<sup>[22]</sup>。上述分析表明,不同种属来源的 DAHP 合成酶很可能源自于共同的祖先,虽然在漫长的进化过程中被不同的宿主修饰或改变,但是其起活性作用的关键残基还是保持了高度的保守性。

*E. coli* DAHP 合成酶的 146-150 氨基酸残基是芳香族氨基酸的结合位点,与酶的反馈调节相关<sup>[11, 20, 21]</sup>。在 *C. pekinense* PD-67 的 DAHP 合成酶中与之对应是 153-158 氨基酸残基。*E. coli* 的 *aroF* 编码的 DAHP 合成酶的 Pro-148 的改变使得其对酪氨酸反馈抑制不敏感。*C. glutamicum* CCRC 18310 中的 DAHP 合成酶只受酪氨酸反馈抑制,定点突变的结果表明 Ser187 是反馈抑制发生作用的重要氨基酸并且处在调节位点和催化位

点的重叠区<sup>[6]</sup>。*C. pekinense* PD-67 的 DAHP 合成酶的 153-158 氨基酸序列与 *E. coli* 的受酪氨酸反馈抑制调控的 DAHP 合成酶的 146-150 氨基酸序列相比只有一个氨基酸残基的差别,且其中起关键作用的 Pro-155(*E. coli*:Pro-148)没有发生改变;与 *C. glutamicum* CCRC 18310 相比, *Cys67* 和 *Ser187* 没有发生改变,推测 *C. pekinense* 中 DAHP 合成酶也只受酪氨酸反馈抑制(图 2)。*C. pekinense* AS1.299 和 PD-67 DAHP 合成酶基因的核苷酸序列已提交 GenBank 登记,登录号分别为: EU668194 和 EU668193。

#### 2.4 *C. pekinense* AS1.299 和 PD-67 DAHP 合成酶基因的功能鉴定

图 3 所示为 *aro* 的异源互补实验的结果。可以看到: *E. coli* 3257 只能在 LB 培养基平板上生长,在氨基青霉素抗性的 M63 基本培养基平板和 M63 基本培养基平板上不能生长。而带有重组质粒 pCD1 和 pCD2 的 *E. coli* 3257 能在 3 种平板上生长。此结果表明来自 *C. pekinense* AS1.299 和 PD-67 的 DAHP 合成酶基因在 *E. coli* 3257 中得到表达,实现了异源互补。由此证明,我们克隆到的 DAHP 合成酶基因片段是有功能的片段。

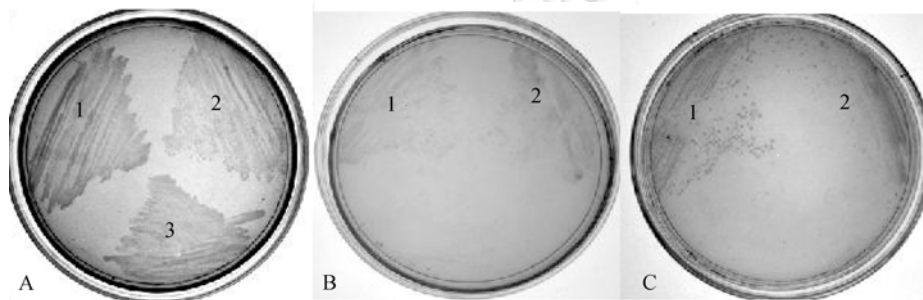


图 3 *aro* 的异源互补实验

Fig. 3 Heterogeneous complementation of *aro I* gene. A: LB Medium; B: M63 Medium containing 100 µg/mL Ampicillin; C: M63 medium. 1: *E. coli* 3257 harboring pCD1; 2: *E. coli* 3257 harboring pCD2; 3: *E. coli* 3257 harboring pMD19-T.

#### 2.5 带有 DAHP 合成酶基因的重组质粒 pAD1 和重组菌株 PD-67 (pAD1) 的构建

用 *Xba* 和 *Bam*H 双酶切重组质粒 pCD2, 凝胶回收 2.1 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 $\alpha$  后涂布在加有卡那霉素的 LB 平板上, 挑取转化子。用 *Bam*H 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 pAD1。

将质粒 pAD1 和 pAK6 分别电击转化 PD-67, 得到带有同源 DAHP 合成酶基因的 *C. pekinense* PD-67(pAD1) 重组菌和带有空载体的对照菌 PD-67(pAK6)。

#### 2.6 重组质粒 pAD1 在 *C. pekinense* PD-67 的表达

为了检测 DAHP 合成酶基因在 *C. pekinense* PD-67 中的表达水平, 我们对粗酶液进行了 SDS-PAGE 分析。从图 4 可以看出, 在推测的 DAHP 合成酶亚基 (39 kDa) 位置, 重组菌 PD-67(pAD1) 与对照菌株 *C. pekinense* PD-67(pAK6) 相比, 在该位置有较明显加深的条带。这一结果表明 pAK6 携带的 DAHP 合成酶基因在 *C. pekinense* PD-67 中实现了表达。

#### 2.7 *C. pekinense* PD-67 DAHP 合成酶酶活测定

对 *C. pekinense* PD-67(pAD1) 和 *C. pekinense*

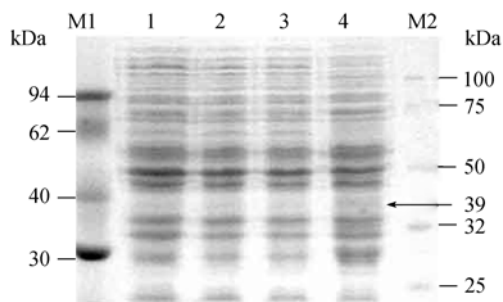


图 4 各菌株蛋白粗提液的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of crude extracts of different strains of *C. pekinense*. M1: Protein marker; 1: *C. pekinense* AS1.299; 2: *C. pekinense* PD-67; 3: *C. pekinense* PD-67(pAK6); 4: *C. pekinense* PD-67(pAD1); M2: Protein marker.

PD-67(pAK6)的 DAHP 合成酶 活性分别进行了测定。在生长周期的不同时间重组菌 PD-67(pAD1)相对于对照菌 PD-67(pAK6)的酶比活力都有所提高。对照菌株 PD-67(pAK6)DAHP 合成酶 的酶比活力在指数后期达到最高,进入稳定期后酶活呈现出明显下降趋势。重组菌 PD-67(pAD1)DAHP 合成酶 的酶比活力在稳定期初期达到最高值 0.37 U/mg,比同时期 PD-67(pAK6)中相应酶的酶比活力提高了 5 倍,在稳定期后期酶比活力开始下降(图 5)。

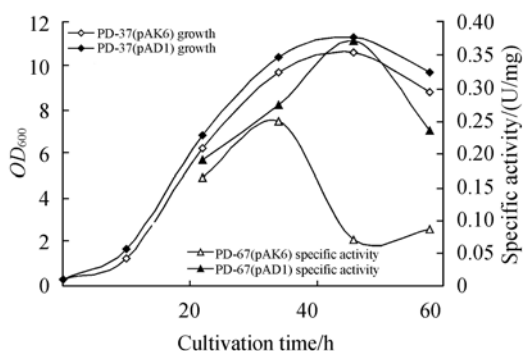


图 5 菌株生长和 DAHP 合成酶 比活相关性

Fig. 5 The relationship between growth and the DS specific activity in the strains of PD-67(pAD1)and PD-67(pAK6).

### 3 讨论

本工作首次证实了 *C. pekinense* 1.299 和 PD-67 中存在 DAHP 合成酶 基因。核苷酸序列分析结果表明,突变株 PD-67 的该基因序列与野生型菌株完全相同。在这两个菌株中是否还存在 DAHP 合成酶 II 基因尚需要进一步验证。

异源互补试验结果表明:*C. pekinense* AS1.299 和 PD-67 的 DAHP 合成酶 基因,能够在大肠杆菌细胞内被翻译并形成具有酶活性的空间结构。核苷酸

序列分析和基于蛋白质二级结构的氨基酸序列分析结果也支持了这一结论。

DAHP 合成酶 基因在 *C. pekinense* PD-67(pAD1) 中表达,在 46h 酶比活力达到最高,比对照菌株 PD-67(pAK6)提高了近 5 倍,而且在整个生长周期一直维持在较高水平。值得注意的是,*C. pekinense* PD-67(pAD1)与对照菌株 PD-67(pAK6)的酶比活力变化都与菌株的生长相关联,二者的变化都呈先升后降的趋势。但是达到最大酶比活力的时间不一致,这很可能是因为重组菌细胞内 DAHP 合成酶 基因拷贝数增加影响了该酶的酶蛋白合成。

作为莽草酸途径的关键酶,该酶活性的提高应该能使重组菌 PD-67(pAD1)的代谢流被更多导向莽草酸合成途径,重组菌 PD-67(pAD1)的色氨酸积累比对照菌 PD-67(pAK6)应该会有有一定的提高。有关 *C. pekinense* AS1.299 和 PD-67 的 DAHP 合成酶 酶学特性以及 PD-67(pAD1)中 DAHP 合成酶 酶比活力的增加对该重组菌产色氨酸性能的影响的研究正在进行中。

### 参 考 文 献

- [1] Webby CJ, Baker HM, Lott JS, *et al.* The structure of 3-deoxy-d-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase from *Mycobacterium tuberculosis* reveals a common catalytic scaffold and ancestry for type and type enzymes. *J Mol Biol*, 2005, 354(4): 927-939.
- [2] Ikeda M. Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 69(6): 615-626.
- [3] Walker GE, Dunbar B. Evidence for a novel class of microbial 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Streptomyces rimosus* and *Neurospora crassa*. *Microbiology*, 1996, 142: 1973-1982.
- [4] Kloosterman H, Hessels GI, Euverink GJ, *et al.* (De)regulation of key enzyme steps in the shikimate pathway and phenylalanine-specific pathway of the actinomycete *Amiclotopsis methanolica*. *Microbiology*, 2003, 149: 3321-3330.
- [5] Silakowski B, Kunze B, Rolf Müller. *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 carries genes encoding type and type 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthases: involvement of a type synthase in aurachin biosynthesis. *Arch Microbiol*, 2000, 173(5-6): 403-411.
- [6] Liao HF, Lin LL, Chien HR, *et al.* Serine 187 is a crucial residue for allosteric regulation of *Corynebacterium glutamicum* 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, 194(1): 59-64.
- [7] 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.
- [8] 李开, 赵智, 张英姿, 等. 谷氨酸棒状杆菌/大肠杆菌穿梭型启动子探测载体的构建. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*,

- 2007, 47(2): 191–196
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, 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.
- [10] Monod J, Cohen Bazire. The biosynthesis of beta-galactosidase (lactase) in *Escherichia coli*; the specificity of induction. *Biochim Biophys Acta*, 1951, 7(4): 585–599.
- [11] Ray JM, Yanofsky C, Bauerle R, *et al.* Mutational analysis of the catalytic and feedback sites of the tryptophan-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase of *Escherichia coli* *J Bacteriol*, 1988, 170(12): 5500–5506
- [12] 沈天翔, 那淑敏, 肖文中, 等. 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.
- [13] Roe RM, Burtan JD, Kuhr RJ. *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology*, Edition 1st, Netherlands: IOS Press, January 1997.
- [14] Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248–254.
- [15] Moran CP, Lang N. Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet*, 1982, 186(3): 339–346.
- [16] Graves MC and Rabinowitz JC. In vivo and in vitro transcription of the *Clostridium pasteurianum* ferredoxin gene. Evidence for "extended" promoter elements in gram-positive organisms. *J Biol Chem*, 1986, 261(24): 11409–11415.
- [17] Chen CC, Liao CC, Hsu WH, *et al.* The cloning and nucleotide sequence of a *Corynebacterium glutamicum* 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase gene. *FEMS Microbiol Lett*, 1993, 107(2-3): 223–229.
- [18] Shumilin IA, Kretsinger RH, Ronald Bauerle, *et al.* Crystal structure of phenylalanine-regulated 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *Structure*, 1999, 7(7): 865–875.
- [19] Trixie Wagner, Shumilin IA, Ronald Bauerle, *et al.* Structure of 3-deoxy-d-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase from *Escherichia coli*: comparison of the Mn(2+)\*2-phosphoglycolate and the Pb(2+)\*2-phosphoenolpyruvate complexes and implications for catalysis. *J Mol Biol*, 2000, 301(2): 389–399.
- [20] Kikuchi Y, Tsujimoto K, and Kurahashi O. Mutational analysis of the feedback sites of phenylalanine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(2): 761–762.
- [21] Weaver LM and Herrmann KM. Cloning of an *aroF* allele encoding a tyrosine-insensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase. *J Bacteriol*, 1990, 172(11): 581–584.
- [22] LongLiu Lin, HuiFen Liao, Hungchien Roger, *et al.* Identification of essential cysteine residues in 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase from *Corynebacterium glutamicum*. *Curr Microbiol*, 2001, 42(6): 426–431.

## Cloning, expression and sequence analysis of DS gene in *Corynebacterium pекinense* AS1.299 and PD-67

Chunhua Zhang<sup>1,2</sup>, Zhi Zhao<sup>1</sup>, Yingzi Zhang<sup>1</sup>, Yu Wang<sup>1</sup>, Jiuyuan Ding<sup>1\*</sup>

<sup>(1)</sup>Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

<sup>(2)</sup>Graduate school of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** [Objective] 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase (EC 2.5.1.54; DS) is the key enzyme in tryptophan synthesis pathway. Cloning DS gene from *Corynebacterium pекinense* and expression of DS gene might facilitate testing the existence and function of DS in *Corynebacterium pекinense*. [Methods] According to the homology between *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 and *Corynebacterium pекinense*, we designed a pair of PCR primers to clone the DS gene from wild-type *C. pекinense* AS1.299 and its mutant PD-67, then the mutant DS gene was expressed in *C. pекinense* PD-67 by subcloning the the PCR fragment into plasmid pAK6. [Results] Analysis of PCR fragments revealed that they contained the whole DS gene. There was no base change all over the structure genes and regulatory sequences between *C. pекinense* AS1.299 and PD-67. An internal promoter was found in the upstream of the DS gene from *C. pекinense* and<sup>1</sup> it functioned in *E. coli* 3257. The DS gene from *C. pекinense* PD-67 was expressed homogenously, and the specific enzyme activity of DS in *C. pекinense* PD-67(pAD1) was much higher than that of the control strain *C. pекinense* PD-67(pAK6). [Conclusion] This is the first report that DS gene existed in *Corynebacterium Pекinense*, The amplification of the specific activity of DS is expected to increase L-tryptophan accumulation of *C. pекinense* PD-67.

**Keywords:** *Corynebacterium pекinense*; 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase; shikimate pathway; L-tryptophan

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

Received: 27 April 2008/ Revised: 11 July 2008