

# 大肠杆菌 L-天门冬酰胺酶Ⅱ基因的高效表达

刘景晶 李晶<sup>1</sup> 吴梧桐 胡梅清<sup>1</sup>

(中国药科大学生物化学教研室, 南京 210009; <sup>1</sup>南京铁道医学院生物化学教研室, 南京 210009)

**摘要** 用一对与大肠杆菌天门冬酰胺酶Ⅱ基因(AnsB)两侧序列互补的寡核苷酸 E1,E2 作引物, 以大肠杆菌野生株 CPU 210009 的染色体 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增得到约 1.2 kb 的 DNA 片段, 将此片段插入 pKK 233-2 的 tac 启动子下游, 转化不同的大肠杆菌宿主菌株, 结果表明以 CPU 210009 为宿主菌时, 转化子的酶表达量最高, 重组 L-天门冬酰胺酶占菌体总蛋白 48.3%, 发酵液酶活力达 400 IU/ml, 比活为 48 IU/mg 蛋白。SDS-PAGE 显示纯化后的重组 L-天门冬酰胺酶分子量与天然酶相同, 均为 140 KD。

**关键词** 大肠杆菌; L-天门冬酰胺酶Ⅱ; 基因表达

L-天门冬酰胺酶Ⅱ(AnsB)能催化天门冬酰胺水解生成天冬氨酸和氨。淋巴瘤和白血病细胞通常不能合成天门冬酰胺,L-天门冬酰胺酶将阻止癌细胞蛋白质合成而导致癌细胞死亡。在临幊上,L-天门冬酰胺酶已广泛用于治疗白血病和淋巴瘤。但目前国内尚不能生产,国外也仅有低产酶能力的大肠杆菌野生株产品,生产成本高,药价昂贵。基因工程菌产品既能填补国内空白,又能大幅度降低生产成本。本文报道高效表达 L-天门冬酰胺酶基因工程菌的构建。

## 1 材 料

限制酶 NcoI、Hind III 及 T<sub>4</sub>DNA 连接酶购自 Promega 公司; Taq 酶、dNTP、IPTG 购自华美公司; 丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺、SDS 购自 Sigma 公司。

pKK 233-2 购自 Clonetech 公司; pKK 233-ansB 是将 PCR 扩增得到的 AnsB 基因 DNA 用 NcoI 和 Hind III 消化后, 定向插入 pKK 233-2 的多克隆位点而得到的重组质粒。实验菌株及来源如下:

菌 株	基 因 型	来 源
CPU 210009	<i>E. coli</i> 野生型菌株	中国药科大学生化教研室保存
ATCC 9637	<i>E. coli</i> 野生株,L-ASP I 生产菌株	购自美国国家模式菌种保存委员会
HB101	supE44 supF58 hsdS3(rBma) recA <sub>56</sub> galT <sub>22</sub> melB	南京大学生化系惠赠
71/18	supE <sub>thi</sub> △(lac-proAB)	南京军区军事医学研究所
	F' [proAB + lacI <sup>c</sup> lacZ△M15];	张林元教授惠赠
JM107	supE44 endA <sub>1</sub> hsdR17 gyrA96 relA, thi△(lac-proAB);	美国肯德基大学
	f' Itra D36 proAB + lacI <sup>c</sup> lacZ△M15	戴信雄教授惠赠
CTA1	pKK 233-ansB 转化 71/18	
CTA2	pKK 233-ansB 转化 HB101	
CTA3	pKK 233-ansB 转化 ATCC9637	
CTA4	pKK 233-ansB 转化 JM107	
CTA5	pKK 233-ansB 转化 CPU 210009	

收稿日期 1996-07-11

## 2 方法

### 2.1 PCR 扩增 AnsB 基因

模板的制备:用接种环挑取 CPU 210009

菌体少许,在裂解液(1% Triton X-100, 2 mmol/L Tris-HCl pH 8.5, 2 mmol/L EDTA)1 ml 中振散,95℃加热处理 10 min,吸取处理液 5 μl 用于 PCR。

引物: E1: 5'-GGCCATGGAGTTTCAAAAAGACGGCACTTGC-3'

E2: 5'-GGAAGCTTGAGAATGCCGTGATAC-3'

I1: 5'-GGCCATGGAGTTTCAAAAAGACGGCACTTGC-3'

I2: 5'-GGAAGCTTAGACTGATTGAAGATCTGCTGG-3'

扩增条件:84℃变性 1 min; 60℃复性 2 min; 72℃延伸 1 min; 循环 28 次。

### 2.2 重组质粒 pKK 233-ansB 的构建

PCR 扩增后的 DNA 片段及质粒 pKK 233-2 同时分别用限制酶 NcoI 和 Hind III 消化并用琼脂糖凝胶电泳分离和回收质粒大片段;将消化后的 DNA 片段和电泳回收的质粒大片段用 T<sub>4</sub>DNA 连接酶连接,连接产物经琼脂糖凝胶电泳回收后转化 HB 101、71/18、ATCC 9637、JM107、CPU 210009,筛选获得相应的阳性转化子。

### 2.3 阳性转化子的筛选

将涂布在含氨苄青霉素的 LB 平板上生长出的单菌落用牙签逐个挑入方格化的新鲜 LB 平板上,为每个克隆编号。平板置 37℃温箱中过夜,待菌落形成后,用灭菌牙签逐个挑取少量菌体,移入预先加有 0.1 mol/L 硼酸缓冲液(pH 8.4)50 μl 的酶标板反应孔内,待菌体分散后,每孔各加入 0.04 mol/L 天门冬酰胺底物溶液 50 μl,37℃保温 15 min,加奈氏试剂 50 μl,呈深棕红色孔内对应的单菌落即为阳性转化子。

### 2.4 L-天门冬酰胺酶活力测定

取 0.04 mol/L L-天门冬酰胺 1 ml, 0.1 mol/L pH8.4 硼酸-硼酸钠缓冲液 1 ml, 细胞悬液或酶液 0.2 ml 于试管中, 于 37℃水浴保温 10 min, 加 15% 三氯乙酸 0.5 ml 终止反应, 经 4000 r/min 离心, 取上清液 1 ml, 加奈氏试剂 2 ml 和蒸馏水 7 ml, 放置 15 min 后于 500 nm 波长比色测定生成的氨。在上述条件

下,每分钟催化 L-天门冬酰胺水解释放 1 μmol 氨所需的酶量定义为一个酶活力单位。

### 2.5 酶的提取和纯化<sup>[1]</sup>

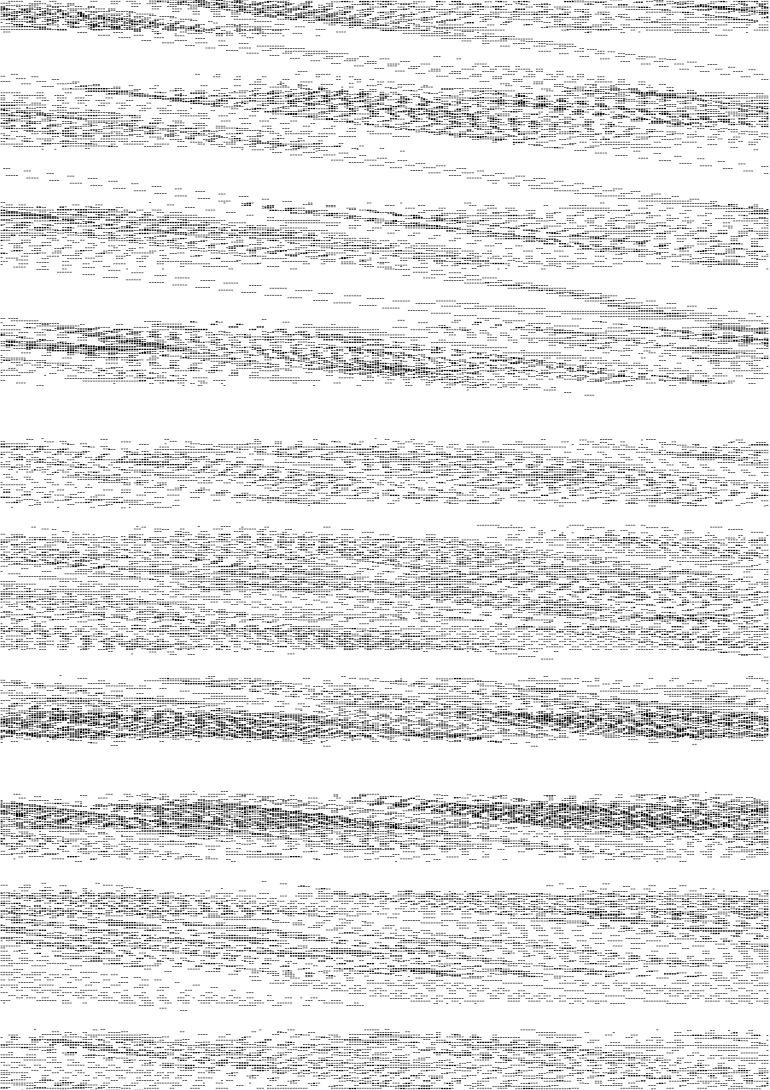
### 2.6 蛋白质浓度测定<sup>[2]</sup>

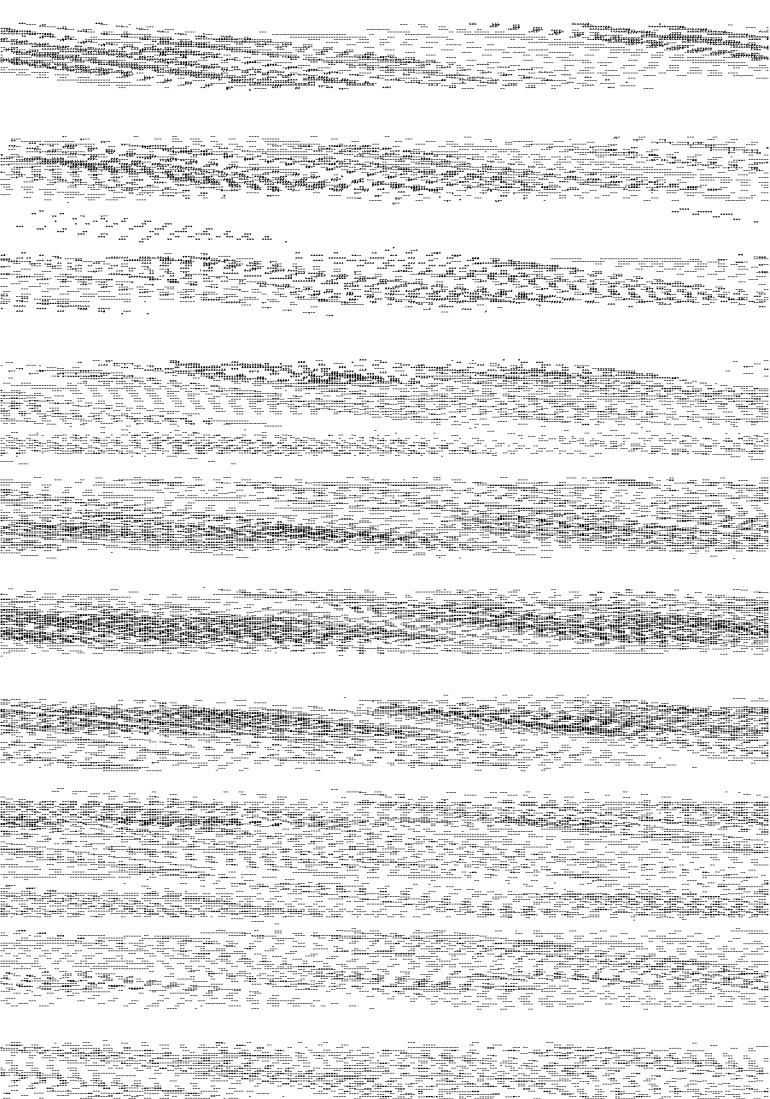
### 2.7 蛋白质 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳<sup>[3]</sup>

## 3 结果和讨论

### 3.1 L-天门冬酰胺酶 I 基因工程菌的构建

在 L-天门冬酰胺酶 I 基因 N 端编码序列附近有一段 TTTTCAAAA 序列, 在引物 E<sub>1</sub> 和 I<sub>1</sub> 中这段序列易形成发夹结构。通过适当提高复性温度(60℃)的 PCR, 可以从大肠杆菌 CPU 210009 染色体 DNA 中特异地扩增得到长约 1.2 kb 的 DNA 片段, 该片段经限制酶消化后直接连接到表达型质粒 pKK 233-2 的 tac 启动子下游, 转化大肠杆菌 71/18, 筛选得到产酶能力高低不同的两类转化子, 分别扩大培养后快速抽提质粒, 琼脂糖凝胶电泳比较质粒大小, 结果显示产酶能力高的转化子所载荷的质粒较低者的质粒大。从凝胶上将两类质粒分别切下, 抽提出其中的质粒 DNA 作为模板, 用一对根据 ansB 基因编码序列设计的引物 I<sub>1</sub> 和 I<sub>2</sub> 进行 PCR 扩增, 结果显示(图 1), 产酶能力高的转化子所载荷的 DNA 作模板时得到长约 1.08 kb 的 ansB 基因片段; 而产酶能力低者, 不能得到 ansB 基因 DNA。





## 参考文献

- 1 刘景晶,金建勤,戴冰滨. 大肠杆菌L-天门冬酰胺酶的提取和纯化. 药物生物技术,1995,2(1):16
- 2 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193; 265
- 3 Sanbrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning*; 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 49
- 4 李晶·刘景晶·吴梧桐等. 大肠杆菌天门冬酰胺酶I的基因克隆与表达. 药物生物技术,1995,2(4):8
- 5 Gilbert HJ, Blazek R, Bullman HMS, et al. Cloning of the *Erwinia chrysanthemi* asparaginase gene in *Escherichia coli* and *Erwinia carotovora*. *J Gen Microbiol*, 1986, 132:151
- 6 Ebright RH, Cossart P, Gicquel-Sanzey B, et al. Mutations that alter the DNA sequence specificity of the catabolite gene activator protein of *E. coli*. *Nature*, 1984, 311:232

## High Expression of the Asparaginase II Gene of *Escherichia coli*

Liu Jingjing<sup>1</sup>, Li Jing<sup>1</sup>, Wu Wudong, Hu Meiqing<sup>1</sup>

Department of Biochemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Nanjing Railway Medical College, 210009

**Abstract** The coding sequence of the L-asparaginase II gene was amplified from *E. coli* CPU 210009 by PCR. The produced 1.2 kb fragment was cloned in pKK 233-2 under the tac promoter, and the resulting plasmid was transformed into 5 strains of *E. coli*. The results showed that the expression level of the transformant, which was obtained by transforming the new construct into *E. coli* CPU 210009, was higher than that of the other four. The fermentation experiment of this genetic engineered strain showed that the asparaginase activity of the broth culture was 400 IU/ml at the top of the expression. The specific activity of the cells was 48 IU/mg. The amount of the recombinant asparaginase was 48.3 percent of total bacterial proteins. The molecular weight of the recombinant asparaginase purified into homogeneous was 140 kD, and was the same as native asparaginase.

**Key words** *E. coli*; L-asparaginase II gene; Expression