

大肠杆菌色氨酸酶基因的克隆与表达

韦平和 吴梧桐 张玉彬

(中国药科大学生物化学教研室,南京 210009)

摘要 应用 PCR技术从 *E. coli* JM105中扩增出长约 1.4Kb的色氨酸酶基因,将其插入高表达载体 pET3a的 NdeI/BamHI位点,转化 *E. coli* BL21(DE3),构建高产色氨酸酶基因工程菌。SDS-PAGE电泳和薄层扫描表明,工程菌色氨酸酶的表达量占细胞总可溶性蛋白的 69.8%。酶活测定结果表明,7株工程菌色氨酸酶的活力比宿主菌均有不同程度的提高,其中 WW-11号比宿主菌高 16倍。

关键词 *L*-色氨酸;色氨酸酶;PCR;克隆;表达;基因工程菌

L-色氨酸是人和动物体内的重要必需氨基酸,在医药、食品和饲料添加剂等方面具有广泛的用途。其生产方法有蛋白水解提取法、化学合成法、微生物发酵法和酶促转化法四种,其中酶促转化法是目前较为有效的工业化方法。转化途径主要涉及色氨酸合成酶(EC4.2.1.20)及色氨酸酶(EC4.1.99.1),二者均可催化 *L*-丝氨酸和吲哚合成 *L*-色氨酸。尽管前者动力学特征明显优于后者,但吲哚对其抑制强烈,而色氨酸酶对吲哚则具有良好的稳定性,所以近年来人们更为关注色氨酸酶,并用于 *L*-色氨酸的生物合成。

Deeley等(1981)^[1]报道了 *E. coli* K-12的色氨酸酶基因序列。Shibatani等(1987)^[2]克隆了 *Alcaligenes fecalis* 的色氨酸酶基因,工程菌色氨酸酶产量比野生菌高 4倍。Tani等(1990)^[3]构建了含色氨酸酶基因的重组质粒 pMD6B,转化 *E. coli* K-12 MD55,工程菌色氨酸酶表达量占整个可溶性蛋白的 30%。张玉彬等(1996)^[4]构建重组质粒 pTase9,转化 *E. coli* JM105,其色氨酸酶表达量占菌体总蛋白的 30%,但酶活只是供体菌的 2倍。鉴于 *L*-色氨酸在医药上的重要性以及生产 *L*-色氨酸的基因工程菌研究现状,本文设计了一对引物,利用 PCR技术扩增了 *E. coli* JM105的色氨酸酶基因,并将其插入带有强 T₇启动子的高表达载体 pET3a中,转化 *E. coli* BL21(DE3),构建和筛选了高产 *L*-色氨酸酶基因工程菌,为用酶工程技术生产 *L*-色氨酸奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株

pET3a由南京军区医学研究所张林元教授惠赠, *E. coli* BL21(DE3)由南京大学生化系徐贤秀教授惠赠, *E. coli* JM105由中国药科大学生物化学教研室谭树华博士惠赠, LB培养基。

1.1.2 生化试剂

NdeI BamHI TaqDNA聚合酶、T₄DNA连接酶、IPTG购自 Promega公司, PLP购自 Sigma公司,丙烯酰胺和 N,N'-亚甲双丙烯酰胺分别为 Serva和 Merck公司产品, PCR marker和蛋白质分子量标准购自 SABC, *L*-色氨酸购自上海伯奥生物技术公司,对二甲氨基苯甲醛(PDAB)购自上海试剂三厂,其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 PCR扩增色氨酸酶基因

按文献^[5]制备 PCR反应模板。用牙签挑取 *E. coli* JM105单菌落悬浮于 50 μ l裂解液(1% Triton X-100, 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.2, 2mmol/L EDTA),充分振散后于 95 $^{\circ}$ C温浴 10 min,再 55 $^{\circ}$ C温浴 5 min,离心取上清 10 μ l用于总体积 100 μ l的 PCR反应。按色氨酸酶基因两侧序列设计引物,由中科院上海植生所合成,序列为引导引物 5'-GGAATTCCATATGAAAACCTTTAAAC-3';折返引物为 5'-CGGGATCCAAACTTCTTTAAGTTTTC-3'。

PCR操作按文献^[6]进行,反应参数为:模板 10 μ l,引物终浓度均为 100 pmol/L,经 94 $^{\circ}$ C变性 5 min,加 1 μ l Taq DNA聚合酶,然后以 94 $^{\circ}$ C变性 1 min 55 $^{\circ}$ C复性 2 min 72 $^{\circ}$ C延伸 3 min,循环反应 30次后,再 72 $^{\circ}$ C延伸 10 min

1.2.2 色氨酸酶表达质粒的构建及鉴定

用 NdeI BamHI酶切经酚、酚-氯仿和氯仿抽提纯化的 PCR扩增产物,并定向插入到表达质粒 pET3a的 NdeI和 BamHI之间,16 $^{\circ}$ C连接过夜后,CaCl₂法转化 *E. coli* BL21(DE3),再均匀涂布于含 Amp(100 μ g/ml)的 LB琼脂平板上,单菌落培养抽提质粒比较大小和酶切鉴定重组子。碱裂解法抽提质粒,限制性酶切反应、连接反应、转化和琼脂糖凝胶电泳等均按文献^[6]进行。

1.2.3 色氨酸酶的诱导表达

将鉴定的阳性克隆单菌落 37 $^{\circ}$ C振荡培养过夜以获饱和培养物,后者以 1%接种于含 Amp(100 μ g/ml)的 LB培养基中,37 $^{\circ}$ C继续培养 2h后,添加 IPTG至终浓度 1 mmol/L,按 0.5, 1, 2, 3 h诱导表达色氨酸酶

1.2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳

分别取不同诱导时间的菌液 1 ml离心收集菌体,加入 100 μ l载样缓冲液,沸水浴 3 min, 12000 g离心 2 min,取上清 15 μ l按文献^[6]方法进行 SDS-PAGE电泳。

1.2.5 色氨酸酶活力测定

按 Wood等(1947)^[7]方法加以改进,即在 10 ml三角瓶中依次添加 0.20 mg/ml PLP溶液 20 μ l 5 mmol/L还原型谷胱甘肽溶液 10 μ l 粗提酶液(磷酸二氢钾缓冲液悬浮, pH 8.0,约 100 mg湿菌体所含酶量) 270 μ l,上述 0.3 ml溶液用甲苯 1 ml覆盖,37 $^{\circ}$ C保温 5 min后,加入 5 mg/ml L-色氨酸溶液 100 μ l,置 37 $^{\circ}$ C摇床振荡使反应进行 10 min,然后添加 5% PDAB和 5% 硫酸正丁醇混合显色液 3 ml中止反应,30 min后于 570 nm处进行吸光度测定。酶的活力单位定义为:在上述反应条件下,于 37 $^{\circ}$ C、10 min内每形成 0.01 μ mol吲哚所需要的酶量称为一个酶活力单位。

2 结果

2.1 色氨酸酶基因的琼脂糖凝胶电泳分析

将 PCR扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳,可

得到一条长度约 1.4 kb的 DNA片段,该片段与 Deeley等(1981)报道的色氨酸酶基因(*TnaA*)大小一致。*E. coli*色氨酸酶基因上存在单一 PstI酶切位点^[1],用该限制性内切酶消化 PCR扩增产物,又可得到 0.8 kb和 0.6 kb的两个片段。见图 1

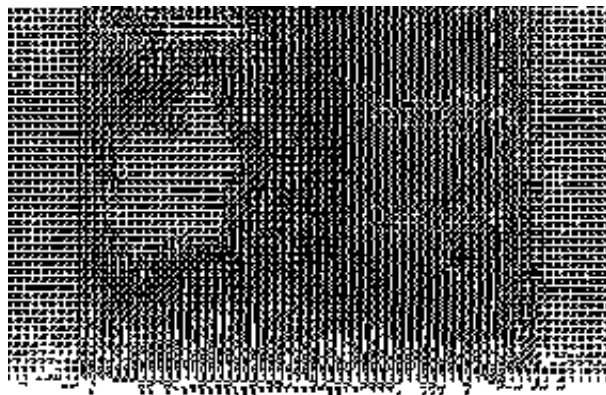


Fig 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products

1 PCR products were digested by PstI to form two fragments (0.8 kb and 0.6 kb); 2 amplified PCR products (approx 1.4 kb); 3 PCR marker (1, 543 994 695 515 377 237)

2.2 色氨酸酶表达质粒的构建及鉴定

用 BamHI NdeI消化经纯化的 pET3a和扩增产物,16 $^{\circ}$ C连接过夜,构建重组表达质粒 *tnaA*/pET3a,转化 BL21(DE3)在含 Amp的 LB平板上,37 $^{\circ}$ C培养过夜,随机挑取 60个转化菌落,碱裂解快速抽提质粒,琼脂糖凝胶电泳发现 8个重组子,进一步用 BamHI NdeI酶切并经琼脂糖凝胶电泳分析,重组质粒可形成约 1.4 kb的 DNA片段,结果见图 2 这表明扩增的色氨酸酶基因已插入表达质粒 pET3a中。

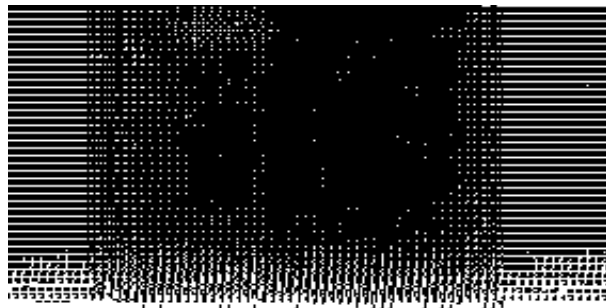


Fig 2 Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmids

1 2 recombinant plasmids digested with BamHI/NdeI; 3 recombinant plasmid; 4 plasmid pET 3a; 5 λ DNA/EcoRI+HindIII marker

2.3 色氨酸酶的 SDS-PAGE 检测

SDS-PAGE检测结果见图3 色氨酸酶是由4个相同亚基组成缔合体, Mr为200KDa^[8]。图3第2泳道可见一条分子量约为50KDa的显著加深蛋白带,这与色氨酸酶分子量相吻合。图3第3泳道出现一条分子量明显小于50KDa的显著加深蛋白带,这是重组菌 No. 1所表达的异常蛋白,可能是由于PCR扩增发生差错或者基因与质粒重组时发生错配所致,有待进一步验证。图4为5株工程菌(4、9、11、26和36号)经IPTG诱导表达3h后产物的SDS-PAGE薄层扫描结果表明,5株工程菌色氨酸酶的表达量占细胞中总可溶性蛋白的百分率平均为69.8%。

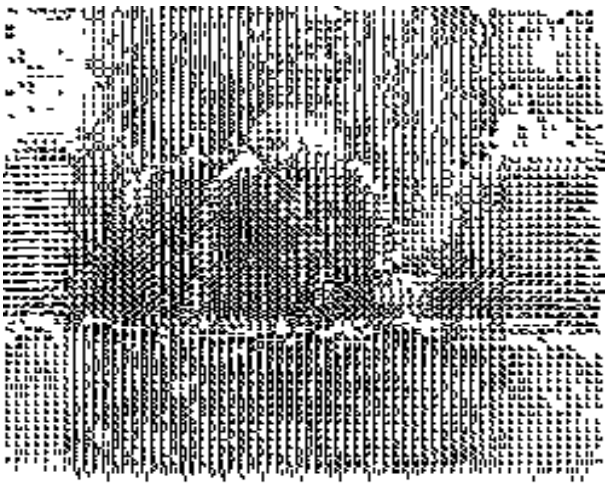


Fig 3. SDS-PAGE results of crude extracts
1 5 host strain (BL21); 2 tryptophanase expressed by engineering strain No. 53; 3 unidentified protein expressed by recombinant strain No. 2; 4 molecular weight marker of protein (14, 400 31, 000 42, 700 66, 200 97, 400D)



Fig 4. SDS-PAGE results of crude extracts of five engineering strains
1 2 3 4 5 No. 4 No. 9 No. 11 No. 26 No. 36 respectively

2.4 色氨酸酶的活力测定

酶活测定结果见表1。由表1可知,工程菌色氨酸酶的活力比宿主菌均有不同程度的提高,其中WW-1号比宿主菌高16倍。

Tab 1. Comparison of seven engineering strains and one host strain in activity of tryptophanase

Strain	A ₅₇₀	Activity units
4	0.375	13.9
9*	0.465	9.6
11*	0.427	16.0
20	0.288	10.3
26	0.455	4.3
36	0.340	3.1
53	0.338	12.3
host	0.141	1.0

* diluted four times; ** diluted two times

3 讨论

1) SDS-PAGE和薄层扫描结果表明,工程菌色氨酸酶表达量占菌体总蛋白的69.8%,这与Studier和Moffatt(1986)^[9]的报道相一致,从而进一步证明了T噬菌体RNA聚合酶启动子表达系统在控制高效表达方面的可行性和有效性。酶活测定结果同样表明,5株工程菌色氨酸酶的活力比宿主菌都有不同程度的提高,最高达16倍。就表达量和活力大小而言,本研究结果比Shibatani(1987)、Tani(1990)和张玉彬(1996)等报道的均有明显提高。

2)色氨酸的研究已有30年历史,但至今仍未取得令人满意的结果,其原因主要是色氨酸生物合成的调控系统复杂、底物L-色氨酸价格昂贵及吡啶对色氨酸合成酶抑制强烈,甚至使其完全失活。色氨酸酶和色氨酸合成酶都可催化L-色氨酸的合成,但本课题选择克隆色氨酸酶基因而不是色氨酸合成酶基因,可避开复杂的色氨酸操纵子调控系统,又可避开吡啶对色氨酸合成酶的强烈抑制作用,因为色氨酸酶操纵子调控系统相对简单^[10],且色氨酸酶对吡啶呈现良好的稳定性。另外,正常情况下色氨酸酶降解过量的色氨酸生成丙酮酸、吡啶和氨,但在高浓度的丙酮酸和氨条件下,色氨酸酶也能有效地催化丙酮酸、吡啶和氨合成L-色氨酸。以丙酮酸而不是价昂的L-丝氨酸为底物,通过色氨酸酶催化合成L-色氨酸,这为廉价生产L-色氨酸提供了一条可行的途径。因此,色氨酸酶基因的克隆和

高效表达对于工业化廉价生产 *L*-色氨酸具有重要的意义。

参 考 文 献

- 1 Deeley MC, Yanofsky C. Nucleotide sequence of the structural gene for tryptophanase of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 1981, **147**(3): 787
- 2 Shibata T, Omoni K, Tosa T. Cloning of tryptophanase gene of *Alcaligenes fecalis* for effective production of *L*-tryptophan. *America Society Microbiology Annual Meeting*, 1987, March 1 ~ 8, Poster presentation
- 3 Tani S, Tsujimoto N, Kawata Y, *et al.* Over-production and crystallization of tryptophanase from recombinant cells of *E. coli*. *Biotech Appl Biochem*, 1990, **12**: 28
- 4 张玉彬,王 昊,吴梧桐等. *L*-色氨酸酶基因工程菌的构建. *中国药科大学学报*, 1996, **27**(10): 624
- 5 吴梧桐,丁锡申,刘景晶编. *基因工程药物——基础与临床*. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 83
- 6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning*. 2nd ed New York Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989
- 7 Wood W, Gunsalus I, Umbreit W. Function of pyridoxal phosphate resolution and purification of the tryptophanase enzyme of *E. coli*. *J Biol Chem*, 1947, **170**: 313
- 8 Honda T, Tokushige M. Active site-directed modification of tryptophanase by 3-bromopyruvate. *J Biochem*, 1985, **97**(3): 851
- 9 Studier F, Moffatt A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, 1986, **189**: 113
- 10 Stewart V, Yanofsky C. Role of leader peptide synthesis in tryptophanase operon expression in *E. coli* K-12. *J Bacteriol*, 1986, **167**(1): 383

Molecular Cloning and Expression of Tryptophanase Gene of *Escherichia coli*

Wei Pinghe, Wu Wutong, Zhang Yubing

School of Biopharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract 1. 4kb DNA fragment was obtained from *E. coli* JM 105 by PCR. This fragment was inserted into NdeI/Bam HI sites of pET3a. The recombinant plasmids were transformed into host strain *E. coli* BL 21 (DE3). High-level expression of tryptophanase genetic engineering strains were constructed. SDS-PAGE and TLC were conducted, which proved that tryptophanase was 69. 8% of all proteins of engineering strain. The results of enzyme assays showed that the activities of tryptophanase from seven genetic engineering strains were higher than those of host strain to different extent, and the enzyme activity of No. 11 was of 16 times as high as that of the host.

Key words *L*-Tryptophan; Tryptophanase; PCR; Cloning; Expression; Genetic engineering strain