

大肠杆菌 N-乙酰神经氨酸裂合酶基因的组成型高效表达^{*}

韦平和 李 谦 邢为藩¹(中国药科大学生物化学教研室; ¹应用药学研究所, 南京 210009)

摘 要 应用 PCR 技术从 *E. coli* JM 105 中扩增出长约 890 bp 的 N-乙酰神经氨酸裂合酶基因, 将其插入高表达载体 pET28a 的 NcoI/ BamHI 位点, 转化 *E. coli* BL21 (DE3), 构建高产 N-乙酰神经氨酸裂合酶基因工程菌, 其表达量占菌体总可溶性蛋白的 76.8%, 活力比宿主菌均有不同程度的提高, 其中 107 号比宿主菌高 14 倍。基因克隆结果导致 N-乙酰神经氨酸裂合酶的表达由诱导型转变为组成型。

关键词 N-乙酰神经氨酸裂合酶; 基因工程菌; 组成型表达

临床上, 炎性或恶性疾病的发生常伴随血清和其它体液中唾液酸含量的改变。酶法测定唾液酸具有特异、可靠和简便等优点。N-乙酰神经氨酸裂合酶(NPL, EC4.1.3.3)是酶法测定唾液酸的关键酶^[1]。因此, NPL 对于炎性或恶性肿瘤的临床诊断具有重要意义。NPL 正常情况下催化 N-乙酰神经氨酸(NANA)裂解为 N-乙酰-D-甘露糖胺(ManNAc)和丙酮酸, 但在一定条件下也可催化 ManNAc 和丙酮酸合成 NANA。所以, NPL 对于 NANA 的酶法合成也具有重要意义。许多致病细菌如产气荚膜梭状芽胞杆菌、白喉杆菌、出血败血性巴斯德菌、霍乱弧菌和大肠杆菌等体内都有 NPL, 但其表达多为诱导型, 须在培养基中添加 NANA 作为诱导物时才可生成, 而 NANA 价格昂贵, 限制了该酶的大规模生产及其在临床诊断中的应用。

Ohta 等(1985)^[2]报道了 *E. coli* NPL 基因的核苷酸序列。Aisaka 等(1986)^[3]构建工程菌 pNAL1/*E. coli* SF8, 重组 NPL 活力比野生菌高 2~3 倍。Ohta 等(1989)^[4]构建工程菌 pMK6/*E. coli* M8328, 重组 NPL 活力比宿主菌高 5 倍。Mahmoudian 等(1997)^[5]构建工程菌 pMeXAld/*E. coli* TG1, 并用于酶法生产 NANA。鉴于 NPL 在临床诊断恶性肿瘤及酶法合成 NANA 上的重要性, 本文设计了一对引物, 利用 PCR 技术扩增了 *E. coli* JM 105 的 N-乙酰神经氨酸裂合酶基因(nanA), 并将其插入高表达载体 pET28a 中, 转化 *E. coli* BL 21, 构建和筛选了高产 NPL

基因工程菌, 旨在实现 NPL 的组成型表达, 并为工业化酶法生产 NANA 奠定基础。

1 材 料

1.1 质粒和菌株

pET28a 由南京军区医学研究所李光富惠赠, *E. coli* BL 21 (DE3) 由南京大学生化系徐贤秀教授惠赠, *E. coli* JM 105 由本室保存。

1.2 试剂

NcoI、BamHI、Taq DNA 聚合酶、dNTP、T4 DNA 连接酶、IPTG 购自 Promega 公司, NANA 购自 Sigma 公司, 丙烯酰胺、N, N'-亚甲双丙烯酰胺、PCR marker 和蛋白质分子量标准购自华美生物工程公司, 对二甲氨基苯甲醛购自上海试剂三厂, 其它试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器

2400 PCR 扩增仪(PE 公司), DDHZ-300 多用途台式恒温振荡器(江苏太仓实验设备厂), TGL-16G 台式高速离心机(上海分析仪器厂), DYY-III 型稳压稳流高压电泳仪(北京六一仪器厂), CS-930 薄层扫描仪(日本岛津公司)。

2 方 法

2.1 PCR 扩增 nanA 基因

用牙签挑取 *E. coli* JM 105 单菌落悬浮于裂解液 50 μ l (1% Triton X-100, 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.2, 2 mmol/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 作为模板用于总体积 100 μ l 的 PCR 反应。按 nanA 基因两侧序列设计引物, 由宝(大连)生物工程公司合成, 序列为引导引物 5'-CC-CATGGGTATTTATGGCAACG-3'; 折返引物 5'-CGGGATCCTCACCCGCGCTCTTGC-3'。PCR 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 Taq DNA 聚合酶 1 μ l, 然后以 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 50 $^{\circ}$ 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。

2.2 含 nanA 重组质粒的构建

用 NcoI、BamHI 酶切 PCR 产物和质粒 pET28a, 酶切产物经酚-氯仿抽提纯化后组成 10 μ l 的反应体系, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, CaCl₂ 法转化 *E. coli* BL 21 (DE3), 将其均匀涂布于含 Kan (50 μ g/ml) 的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 16 h。单菌落振荡培养过夜, 碱裂解法快速抽提质粒, 琼脂糖凝胶电泳比较质粒大小及酶切鉴定重组子。

2.3 nanA 基因的诱导表达

将鉴定的阳性克隆单菌落 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜以获得饱和培养物, 后者以 1% 接种于含 Kan (50 μ g/ml) 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 继续培养到 A₆₀₀ 为 0.5 时, 添加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 按 0.5, 1, 2, 3, 4 h 诱导表达 NPL。

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, 加入载样缓冲液 100 μ l, 沸水浴 3 min, 12 000 g 离心 2 min, 取上清 20 μ l 按文献^[6]方法进行 SDS-PAGE 电泳。

2.5 NPL 的活力测定

按 Reissig 等(1955)^[7]方法改进后进行, 即由 5 μ mol 底物 NANA、50 μ mol 磷酸钾缓冲液 (pH 7.2) 和粗提酶液组成 200 μ l 的反应体系, 37 $^{\circ}$ C 反应 10 min 后置 100 $^{\circ}$ C 温浴 2 min 中止反应, 反应中生成的 ManNAc 以 Morgan-Elson 颜色反应于 580 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, 37 $^{\circ}$ C、10 min 催化形成 1 μ mol ManNAc 所需要的酶量为一个活力单位。

3 结 果

3.1 PCR 产物的琼脂糖电泳分析

将 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 可得到一条长约 890 bp 的区带, 与 Ohta 等(1985)报

道的 nanA 基因编码序列 894 bp 大小一致(图 1)。

3.2 含 nanA 重组质粒的鉴定

随机挑取转化平板上的单菌落, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, 碱裂解法快速抽提质粒, 琼脂糖凝胶电泳发现 37 个重组子, 进一步用 NcoI/BamHI 酶切并经琼脂糖凝胶电泳分析, 重组质粒可形成一条长约 890 bp 的 DNA 片段, 与 PCR 扩增产物在同一位置。这表明由 PCR 扩增的 nanA 基因已插入表达质粒 pET28a 中(图 1)。

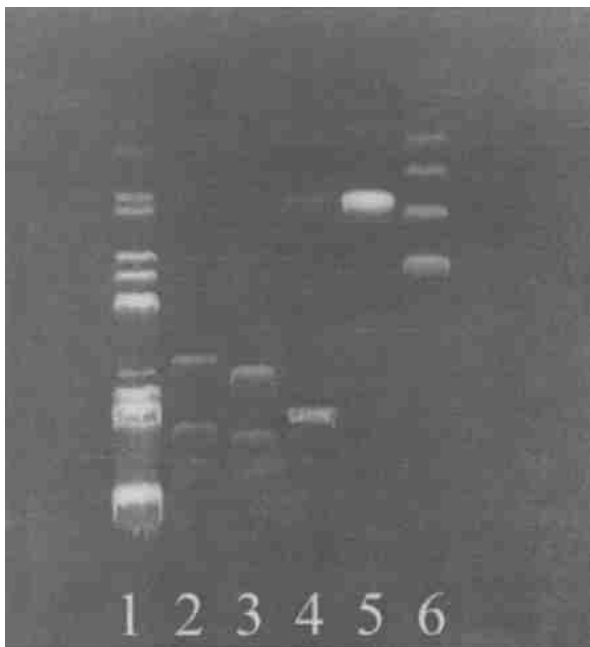


Fig 1. Agarose gel electrophoresis identification of PCR products and recombinant plasmids

1: λ DNA/EcoRI + Hind III marker; 2: plasmid pET28a; 3: recombinant plasmids contained nanA gene; 4: recombinant plasmids digested by NcoI/BamHI to release nanA gene; 5: PCR products; 6: PCR marker (1543 994 695 515 377 237)

3.3 NPL 的 SDS-PAGE 检测

SDS-PAGE 检测结果见图 2。NPL 由三个相同亚基组成, 分子量为 98 kD。图 2 第 1、2、3 条泳道各可见一条分子量约 33 kD 的显著加深蛋白带, 这与 NPL 亚基分子量相吻合。薄层扫描结果表明, 经 IPTG 诱导 3 h 三株工程菌 NPL 的表达量占菌体总可溶性蛋白的百分率平均为 76.8%。不同诱导时间工程菌粗提液的 SDS-PAGE 结果见图 3。经薄层扫描分析, 诱导 0.5, 1, 2, 3 和 4 h 工程菌 107 号 NPL 的表达量分别占菌体总可溶性蛋白的 44.7%、61.0%、74.2%、76.7% 和 76.9%。

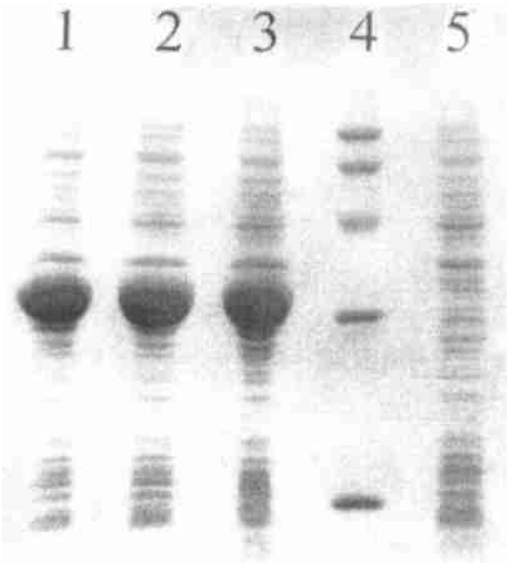


Fig 2. SDS-PAGE results of crude extracts
1, 2, 3; engineered strain No. 15, No. 39, No. 93 respectively; 4;
molecular weight marker of protein (97, 400, 66, 200, 42, 700, 31,
000, 14, 400 D); 5; host strain (BL 21)

4 讨 论

NPL 是一种典型的诱导酶。对于工业化生产 NPL 来说,在培养基中添加昂贵的 NANA 显然是不经济的。本文通过 PCR 扩增该酶的结构基因,并将其插入高拷贝质粒 pET28a,所构建的工程菌其 NPL 的合成则是组成型的。这种由诱导型表达转变为组成型表达的可能原因一是克隆的 nanA 基因缺乏调控区,另一是 nanA 基因被高拷贝质粒去阻遏。*E. coli* NANA 操纵子含结构基因 nanA 和 nanT,前者涉及唾液酸降解,后者影响唾液酸运输。Kawakami 等(1986)^[9]从 *E. coli* JE 1011 中分离出 7.7 kb 的染色体 DNA Hind III 片段(含 nanA 和 nanT)和 1.3 kb 的染色体 DNA EcoRI-Hind III 片段(只含 nanA),并将其分别插入 pBR 322,构建重组菌 pNL1/*E. coli* HB 101 和 pNL4/*E. coli* HB 101,这两者在培养基中缺乏 NANA 时也能有效表达 NPL,但上述 7.7 kb 和 1.3kb 的插入片段均含 NANA 操纵子的启动子及上游转录控制成分。这表明 NPL 由野生菌的诱导型表达转变为工程菌的组成型表达更可能是 nanA 基因被高拷贝质粒去阻遏所致。

参 考 文 献

- 1 Shamberger RJ. Serum sialic acid in normals and cancer patients. *J Clin Chem Clin Biochem*, 1984, **22**: 647
- 2 Ohta Y, Watanabe K, Kimura A. Complete nucleotide sequence of the *E. coli* N-acetylneuraminate lyase. *Nucleic Acids Res*, 1985, **13**(24): 8843
- 3 Aisaka K, Uwajima T. Cloning of the N-acetylneuraminate lyase gene of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1986, **51** (3): 562
- 4 Ohta Y, Tsukada Y, Sugimori T, *et al*. Isolation of a constitutive N-acetylneuraminate lyase-producing mutant of *Escherichia coli* and its use for NPL production. *Agr Biol Chem*, 1989, **53** (2): 477
- 5 Mahmoudian M, Noble D, Drake C S, *et al*. An efficient process for production of N-acetylneuraminic acid using N-acetylneuraminic acid aldolase. *Enzyme Microbial Technol*, 1997, **20**: 393
- 6 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning*. 2nd ed. New York Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 880 ~ 885
- 7 Reissig JL, Strominger JL, Leloir LF. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars. *J Biol*

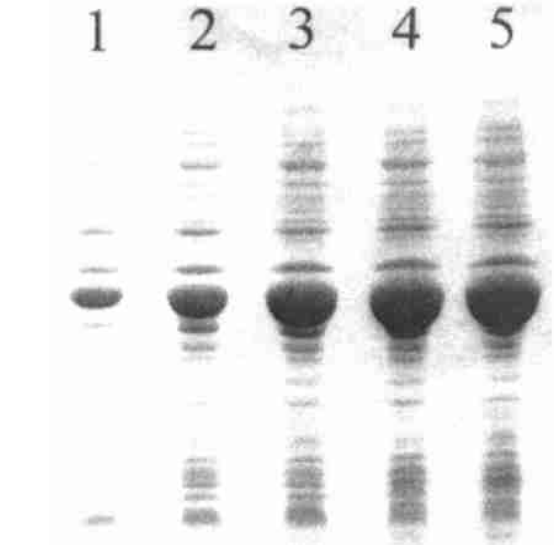


Fig 3. SDS-PAGE of total soluble proteins of engineered strain No. 107 with different induction time
1, 2, 3, 4, 5 represents 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 h after induction by IPTG respectively

3. 4 NPL 的活力测定

对 37 株工程菌 NPL 的活力测定结果表明,工程菌 NPL 的活力比宿主菌均有不同程度的提高,其中 107 号比宿主菌高 14 倍,91 号比宿主菌高 2 倍,其它 35 株工程菌比宿主菌平均高 8.4 倍。对不同诱导时间工程菌 NPL 的活力测定表明,诱导 1 h 时酶活最高,但酶活高低并不与其表达量呈平行关系,与文献^[8]报道一致。

Chem, 1955, **217**: 959

- 8 韦平和, 吴梧桐, 余方兵. 色氨酸酶基因工程菌的活力及其与表达关系研究. 药物生物技术, 1999, **6**(2): 70

- 9 Kawakami B, Kudo T, Narahashi Y, *et al.* Genetic and molecular analyses of *Escherichia coli* N-acetylneuraminate lyase gene. *J Bacteriol*, 1986 **167**(1): 404

Constitutive High-Expression of the N-Acetylneuraminate Lyase Gene of *Escherichia coli*

WEI Ping-He, LI Qian, XIN Wei-Fan¹

Department of Biochemistry,¹ Research Institute of Applied Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract 890 bp DNA fragment encoded N-acetylneuraminate lyase was amplified from *E. coli* JM 105 by PCR. This fragment was inserted into NcoI/BamHI sites of pET28a. The recombinant plasmids were transformed into host strain *E. coli* BL 21 (DE3). High-level expression of N-acetylneuraminate lyase genetic engineered strains was constructed. The expression amounts of N-acetylneuraminate lyase were 76.8% of total soluble proteins of engineered strain. The activities of N-acetylneuraminate lyase from engineered strains were higher than those of host strain to different extent, and the enzyme activity of No. 107 was 14 times as high as that of the host. The cloning of N-acetylneuraminate lyase gene resulted in the change from inducible to constitutive expression of the enzyme.

Key words N-Acetylneuraminate lyase; Genetic engineered strain; Constitutive expression