

脱氢奎尼酸合成酶和奎尼酸脱氢酶基因在大肠杆菌中的共表达

周长林*, 杨毅刚, 窦洁

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

摘要 目的:构建共表达载体 pETDuet-*aroB-quinB*, 在大肠杆菌中同时表达奎尼酸合成途径中的关键酶脱氢奎尼酸合成酶(DHQase)和奎尼酸脱氢酶(QDHase)。**方法:**分别以大肠杆菌(B21)和构巢曲霉(ATCC 24919)基因组为模板, 采用 PCR 法扩增得到脱氢奎尼酸合成酶基因 *aroB* 和奎尼酸脱氢酶基因 *quinB*, 克隆接入 pETDuet-1 载体中, 转化入大肠杆菌 BL21, 在宿主菌中共表达脱氢奎尼酸合成酶和奎尼酸脱氢酶。**结果:**获得了包含 pETDuet-*aroB-quinB* 共表达载体的重组大肠杆菌。IPTG(0.5 mmol/L)诱导重组菌 4 h 后, 脱氢奎尼酸合成酶和奎尼酸脱氢酶表达量分别占菌体总蛋白的 18.7% 和 30.5%, 酶活力为 70.4 U/L, 40.2 U/L, 分别提高了 14.1 倍和 22.3 倍。**结论:**实现了脱氢奎尼酸合成酶和奎尼酸脱氢酶基因在大肠杆菌中的高效共表达, 为基因工程法生物合成奎尼酸奠定了基础。

关键词 脱氢奎尼酸合成酶; 奎尼酸脱氢酶; 奎尼酸; 生物合成

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-5048(2006)04-0367-04

Genes coexpression of dehydroquinase synthase gene (*aroB*) and quinate dehydrogenase gene (*quinB*) in *E. coli*

ZHOU Chang-lin, YANG Yi-gang, DOU Jie

School of Life Science & Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Aim: To construct coexpression vector of pETDuet-*aroB-quinB* and transform it into *E. coli*, in which two key enzymes of dehydroquinase synthase (DHQase) and quinate dehydrogenase (QDHase) in quinic acid biosynthesis were highly coexpressed. **Methods:** Dehydroquinase synthase gene (*aroB*) and quinate dehydrogenase gene (*quinB*) were amplified from the genome of *E. coli* B21 and *Aspergillus nidulans* (ATCC 24919) by PCR, which in turn cloned into pETDuet-1 vector and transformed into *E. coli* BL21 to express dehydroquinase synthase and quinate dehydrogenase. **Results:** The experiments showed that the recombinant *E. coli* B21/pETDuet-*aroB-quinB* expressed dehydroquinase synthase and dehydroquinase dehydrogenase proteins after induced by 0.5 mmol/L IPTG for 4 h, which accounted for 30.5% and 18.7% of the total soluble protein, respectively. And the activities of dehydroquinase synthase and quinate dehydrogenase were 70.4 U/L and 40.2 U/L, increased by 14.1-fold and 22.3-fold, respectively. **Conclusion:** High coexpression of dehydroquinase synthase (*aroB*) and quinate dehydrogenase (*quinB*) genes in *E. coli* suggests it a potential strategy for the biosynthesis of quinic acid by the use of genetic engineering technology.

Key words dehydroquinase synthase; quinate dehydrogenase; quinic acid; biosynthesis

奎尼酸(quinic acid, QA), 即 1, 3, 4, 5-四羟基环己烷 1-羧酸, 最早从金鸡纳树皮中提取加工获得, 又名金鸡纳酸。奎尼酸是重要的抗乙型肝炎病毒药物 IBE-5 的合成中间体, 目前国内所需的奎尼酸原料主要依靠进口。国外奎尼酸的生产方法主要有化学合成法和酶法^[1], 化学合成法会产生大量有

害物质、收率低、成本高、工艺复杂, 并且难以得到 L-奎尼酸。酶法是以莽草酸为底物通过酶转化合成奎尼酸, 但其工艺不完善, 合成成本高, 尚不宜大规模生产。

微生物体内存在莽草酸代谢途径^[2], 脱氢奎尼酸合成酶(DHQase)是莽草酸代谢途径中的关键酶

之一,它能催化底物形成脱氢奎尼酸;脱氢奎尼酸在脱氢奎尼酸脱水酶等作用下可最终生成莽草酸,而在奎尼酸脱氢酶(QDHase)作用下可生成奎尼酸。利用大肠杆菌生物合成奎尼酸时,脱氢奎尼酸合成酶基因(*aroB*)和 DAHP 合成酶基因(*aroF^{FBR}*)需高效表达,从而使代谢途径中的碳源向脱氢奎尼酸的合成方向进行。需将编码 DHQ 脱水酶的基因(*aroD*)敲除,则可阻断 DHQ 经 DHS 最终形成莽草酸,而尽可能多地合成奎尼酸^[2]。通过基因工程方法在宿主菌中高效表达奎尼酸脱氢酶基因(*qutB*)可提高宿主菌将脱氢奎尼酸转化为奎尼酸的能力。Frost 等^[3]在大肠杆菌中克隆表达了奎尼酸合成途径中的一些关键酶基因 *aroB*、*aroF* 等,并使大肠杆菌染色体 *aroD* 基因灭活,其构建的工程菌株,利用葡萄糖 80 mmol/L 发酵获得奎尼酸 24 mmol/L。本文从大肠杆菌和构巢曲霉基因组中分别克隆了奎尼酸合成过程中的关键酶基因 *aroB* 与 *qutB*,并在大肠杆菌中高效共表达,以期利用基因工程发酵法生物合成药物中间体奎尼酸。

1 材料

E. coli BL21 为中国药科大学生命科学与技术学院保存,构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*, ATCC 24919, 中国工业微生物菌种保藏中心); pETDuet-1 (Novagen 公司); 限制性内切酶 *Nco* I、*Hind* III、*Nde* I、*Kpn* I 及 T4 DNA 连接酶(大连宝生物公司); 少量质粒抽提试剂盒、PCR 清洁试剂盒(上海生物工

程公司); 基因组抽提试剂盒(上海生物工程公司)。

2 实验方法

2.1 构巢曲霉基因组的提取^[4]

将构巢曲霉接种于查氏培养基(每 1 000 mL 中含 NaNO_3 3 g, K_2HPO_4 1 g, MgSO_4 0.25 g, KCl 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 蔗糖 30 g, 琼脂 15 g), 30 °C 恒温培养 72 h, 用灭菌竹签刮下菌苔并置于灭菌研钵内, 加入液氮研磨 1 h 左右, 加入 TE 缓冲液 2 mL 充分混合, 静置 2 min, 于 12 000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 得到构巢曲霉基因组粗提液。

2.2 重组质粒 pETDuet-*aroB* 和 pETDuet-*aroB-qutB* 的构建

重组质粒 pETDuet-*aroB* 的构建见文献^[5, 6]。重组质粒 pETDuet-*aroB-qutB* 的构建参照《分子克隆实验指南》^[7], 根据 Genbank 数据库中 *qutB* 基因 (Accession number: X13525) 序列, 设计一对寡核苷酸引物, 两端分别加上了酶切位点 *Nde* I、*Kpn* I 和保护碱基。上游引物为 5'-AAACATATGGAGCCAATCACCATTCCCACCGAC-3' (下划线为 *Nde* I 酶切位点), 下游引物为 5'-AAAGGTACCCTACAAATTTGACTTCGACCGCTC-3' (下划线为 *Kpn* I 酶切位点)。以构巢曲霉基因组为模板扩增 *qutB*, 将 PCR 产物与载体质粒 pETDuet-*aroB* 分别双酶切后用 T4 DNA 连接酶酶连, 转化 *E. coli* BL21, 筛选阳性重组子得到 pETDuet-*aroB-qutB* 重组子(见图 1)。重组质粒经 PCR 后酶切验证和测序。

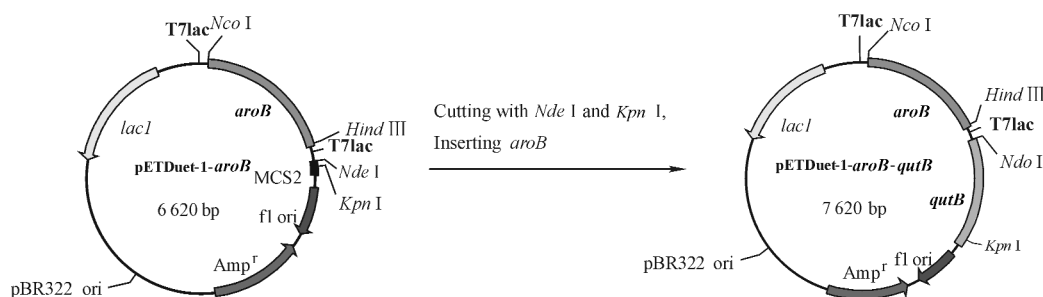


Fig. 1 Construction of the recombinant plasmid pETDuet-*aroB-qutB*

2.3 脱氢奎尼酸合成酶和奎尼酸脱氢酶酶活测定

脱氢奎尼酸合成酶和奎尼酸脱氢酶粗酶液的制备、脱氢奎尼酸合成酶的活力测定见文献^[8, 9]。奎尼酸脱氢酶酶活力测定在 0.1 mol/L 甘氨酸缓冲

液(pH 9.8)中进行, 1 mL 反应体系中含有 2 mmol/L NAD、1.4 mmol/L β -巯基乙醇、20 mmol/L QA (用 NaOH 中和), 加入酶粗提液 100 μL , 30 °C 反应 10 min, 沸水浴 5 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 于 340

nm 处测吸收度。

3 结果

3.1 *qutB* 基因的克隆

以构巢曲霉基因组为模板进行 PCR 扩增获得目的基因 *qutB*, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析其大小为 1 kb(图 2), 与文献[10]报道一致。

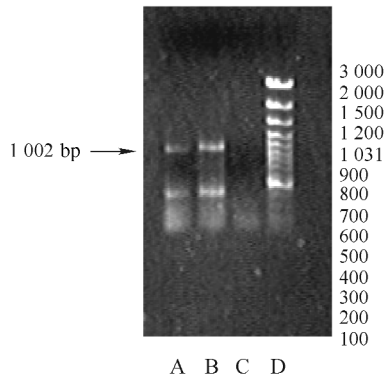


Fig.2 1.0% Agarose gel electrophoresis of *qutB* gene
A, B: *qutB* gene amplified from the genome of *Aspergillus nidulans* (ATCC 24919) in different PCR conditions; C: Negative control; D: DNA marker (100~3 000 bp)

3.2 pETDuet-*aroB-qutB* 表达重组质粒的构建与鉴定

将重组质粒 pETDuet-*aroB* 和纯化的 PCR 产物分别用内切酶 *Nde* I 和 *Kpn* I 双酶切, DNA 胶回收试剂盒纯化, 用 T4 DNA 连接酶酶连, 构建重组质粒。利用 *Amp^r* 筛选得到阳性重组子 *E. coli* BL21/pETDuet-*aroB-qutB*, 重组质粒经酶切验证(图 3)和 DNA 测序确证阳性重组子中插入了 *qutB* 基因片段。

3.3 脱氢奎尼酸合成酶和奎尼酸脱氢酶在重组 *E. coli* BL21/pETDuet-*aroB-qutB* 中的表达

利用 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导共表达脱氢奎尼酸合成酶(DHQase)和奎尼酸脱氢酶(QDHase), SDS-PAGE 检测菌体裂解物, 显示重组 *E. coli* BL21/pETDuet-*aroB-qutB* 中分别有相对分子质量大小约为 36 kDa、38 kDa 的蛋白得到高表达(图 4)。IPTG(0.5 mmol/L)4 h 后, 凝胶定量扫描结果表明, DHQase 占菌体总蛋白的 18.7%, QDHase 表达量占菌体总蛋白的 30.5%。分别用 *E. coli* BL21 和 *E. coli* BL21/pETDuet-*aroB-qutB* 的粗酶液测定脱氢奎尼酸合成酶的活性。野生菌发酵液中 DHQase

和 QDHase 的酶活力分别为 5.0 U/L 和 1.8 U/L, 而经 IPTG(0.5 mmol/L)诱导 4 h 的重组菌发酵液中, DHQase 和 QDHase 酶活力可达 70.4 U/L 和 40.2 U/L, 其酶活力分别提高了 13.1 倍和 21.3 倍。

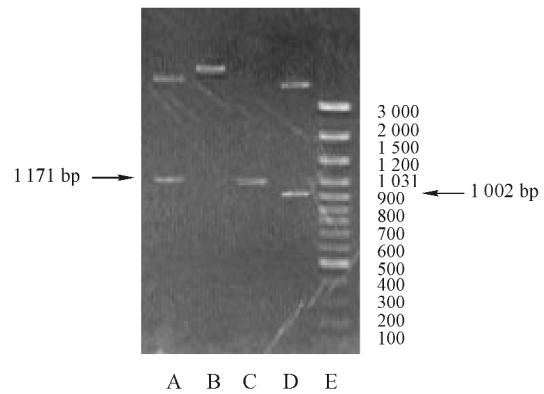


Fig.3 1.0% Agarose gel electrophoresis of the recombinant plasmid (pETDuet-*aroB-qutB*)

A: Recombinant plasmid digested with *Nco* I and *Hind* III (*aroB* gene, 1 171 bp); B: Recombinant plasmid; C: PCR product of the *aroB* gene; D: Recombinant plasmid digested with *Nde* I and *Kpn* I (*qutB* gene, 1 002 bp); E: DNA marker (100~3 000 bp)

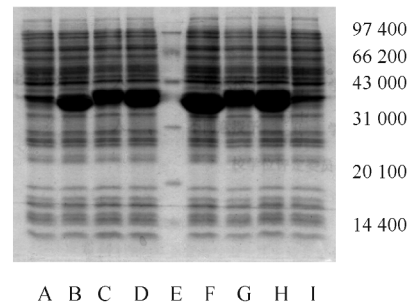


Fig.4 15.0% SDS-PAGE of the total soluble protein induced by 0.5 mmol/L IPTG in recombinant *E. coli* B21/pETDuet-*aroB-qutB*

A: *E. coli* BL21; B: Bacteria containing pETDuet-*qutB* induced for 4 h; C: Bacteria containing pETDuet-*aroB* induced for 4 h; D: Bacteria containing pETDuet-*aroB-qutB* induced for 4 h; E: Protein markers (14.4~97.4 kDa); F: Bacteria containing pETDuet-*qutB* induced for 6 h; G: Bacteria containing pETDuet-*aroB* induced for 6 h; H: Bacteria containing pETDuet-*aroB-qutB* induced for 6 h; I: *E. coli* BL21

分别用 *E. coli* BL21 和 *E. coli* BL21/pETDuet-*aroB-qutB* 的粗酶液测定脱氢奎尼酸合成酶的活性。野生菌发酵液中 DHQase 和 QDHase 的酶活力分别为 5.0 U/L 和 1.8 U/L, 而经 IPTG (0.5 mmol/L)诱导 4 h 的重组菌发酵液中, DHQase 和 QDHase 酶活力可达 70.4 U/L 和 40.2 U/L, 其酶活力分别提高了 13.1 倍和 21.3 倍。

4 讨 论

小分子化合物奎尼酸等药物中间体的生物合成是生物技术重要的研究方向之一。在大肠杆菌中发酵生产奎尼酸的过程中,莽草酸代谢途径中的 DHQase、DAHP 合成酶和 QDHase 等需要大量表达,同时还要使脱水酶缺失或抑制,奎尼酸才能有效积累。Frost 等^[3]通过构建多质粒表达系统表达莽草酸代谢途径中多个关键酶基因,并且敲除了宿主菌的脱氢奎尼酸脱水酶基因从而使奎尼酸得到合成。本实验使用了多基因共表达载体进行奎尼酸代谢途径中关键酶的大肠杆菌表达,避免了多质粒表达系统构建复杂、重组质粒易丢失和发酵产物浓度低等缺点。实验采用的 pETDuet-1 质粒是含有两个串连 T7lac 启动子,两个多克隆位点的表达质粒,可同时表达两个目的基因。

研究表明,重组基因工程菌 *E. coli* BL21/pETDuet-*aroB-quiB* 的脱氢奎尼酸合成酶和奎尼酸脱氢酶活力比野生菌明显提高。由于这两种酶为大肠杆菌莽草酸代谢途径中的关键酶,它们的高效表达可以使代谢系统的碳源流向合成脱氢奎尼酸的方向,引入的外源酶基因 *quiB* 编码的奎尼酸脱氢酶可以使脱氢奎尼酸向奎尼酸转化,从而使工程菌具有将葡萄糖代谢为奎尼酸的能力^[11]。然而,要使葡萄糖大量代谢为奎尼酸,必须强化莽草酸代谢途径,使脱氢奎尼酸方向合成酶在宿主菌中高效表达^[12];DAHP 合成酶也能在宿主菌中高效表达并解除该酶可能受到的反馈抑制作用^[13];同时需要敲除宿主菌的脱氢奎尼酸脱水酶基因,从而使脱氢奎尼酸向奎尼酸方向合成,而不是向莽草酸方向合成。此外,克隆入宿主菌的多个酶基因均衡高效表达也是克隆和表达所要注意的问题^[14]。

参 考 文 献

- [1] Boudet AM. Studies on quinic acid biosynthesis in *Quercus pedunculata* Ehrh. Seedlings [J]. *Plant Cell Physiol*, 1980, **21** (5): 785 - 792.
- [2] Knop DR, Draths KM, Chandran SS, et al. Hydroaromatic equilibration during biosynthesis of shikimic acid [J]. *J Am Chem Soc*, 2001, **123**(42): 10 173 - 10 182.
- [3] Frost JW, Draths KM, Ward TC. Synthesis of quinic acid from glucose: US, 5798236 [P]. 1998-08-25.
- [4] Borgia PT, Eagleton LE, Miao YH. DNA preparations from *Aspergillus nidulans* and other filamentous fungi [J]. *Biotechniques*, 1994, **17**(3): 430 - 434.
- [5] 杨毅刚 (Yang YG), 周长林 (Zhou CL), 窦洁 (Dou J), 等. 脱氢奎尼酸合成酶基因 *aroB* 在大肠杆菌中的克隆表达及酶活力测定 [J]. 中国药科大学学报 (*J China Pharm Univ*), 2005, **36** (4): 378 - 380.
- [6] Millar G, Coggins JR. The complete amino acid sequence of 3-dehydroquinase synthase of *Escherichia coli* K12 [J]. *FEBS Lett*, 1986, **200**(1): 11 - 17.
- [7] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 1 713 - 1 720.
- [8] Frost JW, Bendr JL, Kadonaga JT, et al. Dehydroquinase synthase from *Escherichia coli*: purification, cloning, and construction of overproducers of enzyme [J]. *Biochemistry*, 1984, **23**(19): 4 470 - 4 475.
- [9] Kang X, Scheibe R. Purification and characterization of the quinate: oxidoreductase from *Phaseolus mungo* sprouts [J]. *Phytochemistry*, 1993, **33**(4): 769 - 774.
- [10] Hawkins AR, Lamb HK, Smith M, et al. Molecular organization of the quinic acid utilization (QUT) gene cluster in *Aspergillus nidulans* [J]. *Mol Gen Genet*, 1998, **214**(2): 224 - 231.
- [11] Berry A. Improving production of aromatic compounds in *E. coli* [J]. *Trends Biotechnol*, 1996, **14**(7): 250 - 256.
- [12] Barker JL, Frost JW. Microbial synthesis of *p*-hydroxybenzoic acid from glucose [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2001, **76**(4): 376 - 390.
- [13] Katsumata R, Ikeda M. Hyperproduction of tryptophan in *Corynebacterium glutamicum* by pathway engineering biosynthetic pathway engineering [J]. *Bio Technol*, 1993, **11**(8): 921 - 925.
- [14] Bailey JE, Sburlati A, Vassily H, et al. Inverse metabolic engineering: a strategy for directed genetic engineering of useful phenotypes [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1996, **52**(1): 109 - 115.

[1] Boudet AM. Studies on quinic acid biosynthesis in *Quercus*