

文章编号: 1000-5013(2008)03-0383-04

木糖还原酶基因在大肠杆菌中活性表达

王晓霞, 方柏山, 李雯君

(华侨大学 工业生物技术福建省高等学校重点实验室, 福建 泉州, 362021)

摘要: 利用聚合酶链式反应(PCR)方法,从休哈塔假丝酵母(*Candida shehatae*)基因组 DNA 扩增得到了木糖还原酶(Xylose Reductase, XR)基因,并在大肠杆菌中活性表达.重组菌在诱导 6 h 时的 XR 表达量最大,约为总蛋白的 20%.实验考察不同质量浓度的乳糖和异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)对酶活性的影响,结果表明,重组菌在以乳糖作为诱导剂时酶活最高为 232.38 $\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$,以 IPTG 作为诱导剂时酶活最高为 206.04 $\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$.

关键词: 木糖还原酶; 乳糖诱导; 聚合酶链式反应; 大肠杆菌; 活性表达

中图分类号: TQ 923; Q 789

文献标识码: A

木糖醇(戊五醇)是一种五碳糖醇,广泛存在于各种水果和蔬菜中,它是人类在葡萄糖醛酸-木酮糖循环代谢的中间体,在其他动物代谢中也有发现.木糖醇在食用后不消耗胰岛素^[1],可作为糖尿病人的营养剂.另它具有特殊的防龋功能,可作为儿童防龋食品的添加剂.木糖醇还具备类似甘油和其他多元醇的许多优异特性,因而广泛用于国防、医药、化工、皮革、涂料、化妆品及食品行业等^[2-3].目前,国内外工业规模生产木糖醇采用化学法催化加氢得到,工艺复杂、成本高、产量低.近来由于人们期望降低下游加工成本,使微生物转化生产木糖醇受到广泛的重视.微生物转化法是利用微生物中的还原酶来生产木糖醇,某些天然利用木糖的酵母菌在代谢过程中能够产生木糖醇,但由于木糖是碳源及能源物质,有相当部分的木糖要转变为生物量,影响木糖醇得率的提高^[4].基因工程菌打破了原有的代谢途径^[3],可以使木糖转化为木糖醇,又不会作为碳源及能源,因而不会产生相关代谢副产物.本文将休哈塔假丝酵母(*C. shehatae* CICC 1766)中编码木糖还原酶(XR)的基因 *xr* 在大肠杆菌中稳定高效表达,考察了诱导时间对表达量的影响,及不同物质质量浓度乳糖和异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)作为诱导剂时对酶活的影响,并对重组 *E. coli* 发酵木糖产木糖醇做了初步研究.

1 材料与方法

1.1 材料

休哈塔假丝酵母 *C. shehatae* CICC 1766(中国工业微生物菌种保藏中心),*E. coli* DH5 α (福建厦门大学生命科学学院彭宣究教授惠赠),质粒 pET-22b(福建厦门亚热带生态研究所);*E. coli* BL21(DE3) plysS(简称为 *E. coli*,广东深圳晶美生物工程有限公司);TaqTM DNA 聚合酶以及限制性内切酶 NdeI 和 BamH I(TAKARA 公司);T4 DNA 连接酶(PROMEGA 公司);琼脂糖凝胶回收试剂盒和质粒回收试剂盒(OMEGA BIO-TEK 公司);GeneRulerTM Ladder Mix(广东深圳晶美生物工程有限公司);还原型辅酶 I(NADH, AMRESCO 公司).其他试剂均为分析纯,引物合成与测序由北京奥科生物技术有限公司完成.

1.2 实验方法

收稿日期: 2007-10-08

作者简介: 王晓霞(1981-),女;通信作者:方柏山(1957-),男,教授,博士生导师,主要从事微生物生化研究. E-mail: fangbs@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(C96068)

1.2.1 目的基因的克隆及序列分析 根据美国国立生物技术信息中心(NCBI) 上发布的 *C. shehatae* CS051 木糖还原酶基因序列和大肠杆菌表达载体上多克隆位点的特征, 设计合成引物.

上游引物: 5'- ATCCATATGAGCCCAAGCCCAATTCC-3' (含 Ndeⅳ酶切位点).

下游引物: 5'- CCCGGATCCAACAAGCAGCTTAAACGA-3' (含 BamH ⅳ酶切位点).

以 *C. shehatae* 基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增. 循环参数: 94 ℃预变性 4 min, 94 ℃变性 1 min, 54 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 2 min(反应 30 个循环), 最后 72 ℃延伸 10 min.

1.2.2 表达载体 pET22-xr 的构建及在 *E. coli* 中的表达 将 PCR 产物用质量分数为 1% 琼脂糖凝胶电泳纯化, 回收的 PCR 产物及表达载体质粒 pET-22b 用 Ndeⅳ和 Bam H ⅳ双酶切后, 用 T4DNA 连接酶连接. 连接的产物转化感受态 *E. coli* DH5α, 利用 Ndeⅳ和 BamH ⅳ单、双酶切筛选重组子. 将重组质粒 pET22-xr 转化感受态 *E. coli*, 在 37 ℃下培养至 A_{600} 为 0.6~ 0.8 时, 加入 IPTG 至终物质的浓度为 $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 28 ℃诱导表达.

1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 分析 采用质量分数为 10% 分离胶的不连续垂直平板电泳, 用考马斯亮蓝 R-250 染色, 以大肠杆菌 *E. coli* (pET22-xr) 未经 IPTG 诱导做为对照.

1.2.4 XR 粗酶液的制备和活力检测 取适当诱导的培养液, 最大转速离心 1 min, 沉淀用 pH 值约为 8.0 的结合缓冲液重悬(每 1 mL 菌液加 100 μL 结合缓冲液), 超声 300 W(超声 1 min, 超声 2 s, 间歇 2 s), $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 上层清液即为粗酶液. 酶活力测定用 $0.3\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 值 6.5), $0.707\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 木糖, $0.2\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 还原型辅酶 Ⅱ 钠(NADH). 反应从加入适量酶液开始, 反应温度保持在 30 ℃^[5].

1.2.5 利用重组 *E. coli* 生产木糖醇 将重组 *E. coli* 在含苄苄青霉素(AMP) 的固体(LB) 培养基中培养 3 h 后, 加入乳糖(质量浓度为 $3\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和木糖(质量浓度为 $50\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 发酵 24 h 后, 利用高效液相色谱(HPLC) 检测木糖醇质量浓度. 色谱柱为 Aminex HPLC-87H, 流动相的浓度为 $5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂SO₄, 柱温为 45 ℃.

2 实验结果

2.1 目的基因 PCR 扩增

提取 *C. shahatae* 的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增产物经质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定在 1 000 bp 处可见一清晰的扩增条带, 与报道序列 AF278715 大小相同, 如图 1 所示.

2.2 表达载体的构建及序列测定

构建好的表达载体 pET22-xr 用 BamH ⅳ进行单酶切鉴定时发现一条带, 大小为 6 500 bp; 而用 Nde ⅳ和 BamH ⅳ进行双酶切鉴定时发现两条带, 大小分别为 5 500, 1 000 bp, 如图 2 所示. 结果表明, 酶切鉴定结果与理论值是一致.

2.3 表达产物的电泳分析

pET22-xr 转化 *E. coli* 后, 培养至光密度值 $D(600)$ 为 0.6~ 0.8 时, 加入 IPTG 至浓度为 $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. 经 28 ℃诱导表达, 分别在不同时间段取样, 样品经电泳分析, 结果如图 3 所示. 从图 3 可以看出, 在 1 h 后开始有少量蛋白表达, 随着时间延长, 重组蛋白表达量增加; 但在诱导时间大于等于 4 h 时, 蛋白表达量增加不多, 且背景带多. 经测定, 重组蛋白的相对分子质量约为 36 kDa.

2.4 诱导剂对酶活的影响

当诱导温度为 28 ℃时, 实验考察了不同诱导剂 IPTG 浓度和乳糖质量浓度对酶活(u) 的影响, 如

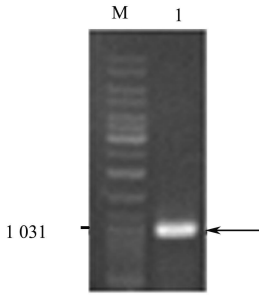


图 1 xr 基因的 PCR 扩增
Fig. 1 Electrophoresis of PCR products of xr

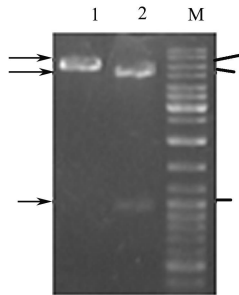


图 2 表达载体 pET22-xr 的酶切鉴定
Fig. 2 Characterization of pET22-xr digested by BamH ⅳ and Nde ⅳ/BamH ⅳ

图 4, 5 所示. 由图 4, 5 可知, *E. coli* (pET 22-xr) 用乳糖作诱导剂时, 乳糖最佳添加质量浓度为 $3\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, XR 的活力达到 $232.38\text{ }\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$; 而以 IPTG 作诱导剂时, 酶活最高为 $206.04\text{ }\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$. 因此得出结论, 无论用乳糖作诱导剂还是用 IPTG 作诱导剂, 酶活是基因供体菌 *C. shehatae* XR 酶活 ($73.51\text{ }\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$) 的 3 倍左右.

2.5 重组 *E. coli* 生产木糖醇

对利用重组 *E. coli* 发酵木糖生产木糖醇做初步考察, 在发酵 24 h 后, 取样进行高效液相色谱(HPLC)实验, 得到木糖醇的质量浓度只有 $1.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. 因此, 需要进一步优化以提高木糖醇产量.

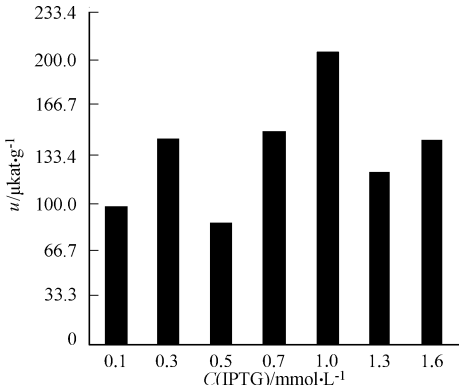


图 4 IPTG 浓度对酶活的影响

Fig. 4 the effect of IPTG concentration on specific activity of XR

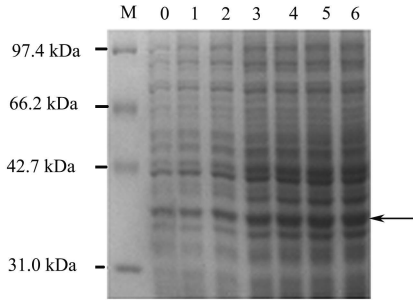


图 3 全细胞蛋白的电泳分析

Fig. 3 SDS-PAGE results of target protein induced

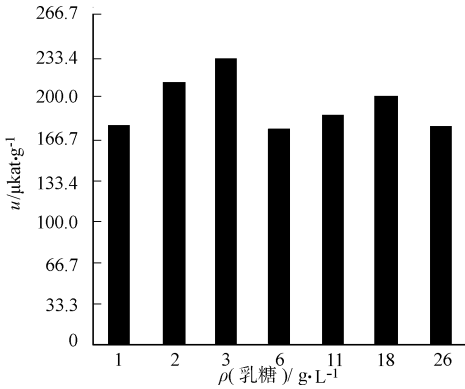


图 5 乳糖质量浓度对酶活的影响

Fig. 5 the effect of lactose concentration on specific activity of XR

3 讨论

NCBI 数据库报道的 *C. shehatae* CS051 的 *xr* 基因的编码区长度为 1 000 bp 左右, 实验所扩增出的 *C. shehatae* CICC1766 的编码 XR 的基因 *xr* 经测序与报道的基因大小一致. 通过 BLAST 比对发现只有 1 个碱基的差异, 其第 83 个核苷酸由 A 变为 G, 导致编码的氨基酸由天冬氨酸变为甘氨酸.

在对诱导时间进行考察的实验中, 随着诱导时间延长, 表达量相应增大, 但诱导时间大于等于 4 h 后, 表达量增加并不显著. 本实验利用 Nde I 酶切位点直接将目的基因克隆到载体上, 制备了不带融合标签的天然蛋白, 可能使表达量有所增加, 表达量为 20% 左右.

IPTG 能在较大的浓度范围内诱导基因表达, 但浓度为 $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG 常可以达到完全诱导. 由于细胞本身代谢作用超负荷的限制, LAC 启动子的完全诱导并不一定能使基因表达最大化^[6-9]. 由于质粒 pET-22b 带有 LAC 操纵子, 而乳糖是 LAC 操纵子的天然诱导剂. 由实验结果可知, 用乳糖作诱导剂代替昂贵的 IPTG 具有可行性, 可以大大降低 XR 的生产成本并提高酶活. 此外, 由于 IPTG 具有一定的毒性^[9], 而乳糖无毒, 为了尽可能降低生产的木糖醇的毒性, 因而在发酵生产木糖醇时采用乳糖作为诱导剂.

重组的 XR 无论以 IPTG 还是以乳糖作为诱导物, 其酶活都比 Govinden 等^[10] 将 *C. shehatae* CS051 的 *xr* 基因在 *S. cerevisiae* 中表达的酶活要高, 是其以 pGC1 为表达载体时酶活 ($157.53\text{ }\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$) 的 1.5 倍左右, 是其以 pDLG1 为表达载体时酶活 ($2.83\text{ }\mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1}$) 的 70 多倍. 由于用乳糖做诱导剂比用 IPTG 作为诱导剂的效果较好, 且无毒廉价, 因此在以后的发酵培养基表达优化及产木糖醇优化中, 均选择乳糖作为诱导剂.

重组 *E. coli* 在没有优化的情况下, 产生的木糖醇较少. 一方面可能是由于木糖的运输受到限制, 或者 NAD(P)H 在供氧条件下不能维持再生而导致氧化还原不平衡造成的. 另一方面可能由于大肠杆菌

本身木糖代谢系统中木糖异构酶的存在影响了木糖醇的积累. 对于前者可考虑通过与木糖运输基因和 NAD(P)H 再生基因共表达或限制供氧来解决, 对于后者可考虑利用 *E. coli* xylA 缺陷型. 由于本研究的直接目的是制备具有较高活性的 XR, 以便构建辅酶再生体系酶法生产木糖醇, 因此不顾及木糖异构酶的存在, 所以没有用 *E. coli* xylA 缺陷型菌株.

虽然以 *E. coli* 为受体的工程菌不宜用于生产食品及药品所需的木糖醇, 但对于基因表达、酶学性质和蛋白质工程的研究具有重要意义, 而且木糖醇在食品及药品以外的轻化工领域也有广泛用途. 另外, 来源于 *C. shehatae* 的 XR 的酶学性质还未见报道, 这方面的研究将在后续报道中出现.

参考文献:

- [1] WINKELHAUSEN E, KUZMANOVA S. Microbial conversion of *D*-xylose to xylitol[J]. J Ferment Bioeng, 1998, 86(1): 1-14.
- [2] 董丽辉, 周晓云, 张朝晖. 生物转化生产木糖醇研究进展[J]. 科技通报, 2004, 20(1): 37-41.
- [3] 怀文辉, 何秀萍, 张博润. 微生物产木糖醇的研究进展及应用前景[J]. 微生物学通报, 2000, 27(1): 66-69.
- [4] 李 敏, 马 涛, 生举正, 等. 稳定高效表达木糖还原酶基因工业酿酒酵母的构建及木糖醇发酵的初步研究[J]. 食品与发酵工业, 2005, 32(1): 1-5.
- [5] NEUHAUSER W, HALTRICH D, KULBE K, et al. NAD(P)H-dependent aldose reductase from the xylose-assimilating yeast *Candida tenuis*, isolation, characterization and biochemical properties of the enzyme[J]. J Biochem, 1997(326): 683-692.
- [6] DONOVAN R S, ROBINSON C W. Optimizing the expression of a monoclonal antibody fragment under the transcriptional control of the *Escherichia coli* Lac promoter[J]. Can J Microbiol, 2000(46): 532-541.
- [7] XIE L, HALL D, EITEMAN M A, ALTMAN E. Optimization of recombinant aminolevulinate synthase production in *Escherichia coli* using factorial design[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003(63): 267-273.
- [8] GLICK B R. Metabolic load and heterologous gene expression[J]. Biotechnol Adv, 1995(13): 247-261.
- [9] KWEON D H, HAN N S, PARK K M, et al. Overproduction of phytolectin protein in batch and fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*[J]. Process Biochem, 2001, 36(6): 537-542.
- [10] GOVINDEN R, PILLAY B, van ZUL W H, et al. Xylitol production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *Pichia stipitis* and *Candida shehatae* XYL1 genes[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001(55): 76-80.

Expression of Xylose Reductase Genes from *Candida shehatae* in *E. coli*

WANG Xiao-xia, FANG Bai-shan, LI Wen-jun

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Fujian Province University, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: The *xr* gene encoding xylose reductase was amplified by using the genomic DNA of *Candida shehatae* CICC1766 as the template and expressed heterologously with protein in *E. coli* BL21(DE3) plysS. The expression level which accounted for 20% of total cell protein reached the maximum degree after 6 h of induction. And the effect of lactose and IPTG was investigated as the inducer on specific activity of XR. The maximum activity was 232.38 $\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$ with lactose as the inducer, while with IPTG was 206.04 $\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$.

Keywords: xylose reductase; induct by lactose; polymerase chain reaction; *Candida shehatae*; activity expression

(责任编辑: 黄仲一 英文审校: 陈国华)