

链霉菌 M1033 同源重组葡萄糖异构酶缺陷型菌株的构建

徐冲 廖军 谢文 程阳 朱国萍 杨永辉
陈承露 陶丽梅 牛立文 王玉珍

(中国科学技术大学 生命科学学院; 结构生物学开放实验室,合肥 230026)

摘要 为实现有工业生产价值的葡萄糖异构酶双突变体酶 GI(G138P-G247D)的稳定高效表达,在建立7号淀粉酶链霉菌 M1033 原生质体转化条件的基础上,构建了含 600 bp 不完整 GI(G138P-G247D)结构基因片段的插入型同源重组质粒 pXW,并通过同源重组模式整合到 M1033 的染色体上,实现了 GI 基因的破坏(gene disruption),获得了同源重组葡萄糖异构酶缺陷型菌株.对同源重组片段的分析,突变引入的验证以及缺陷型菌株稳定性的检测证实了以此方法在染色体上引入突变的可行性.

关键词 葡萄糖异构酶 链霉菌 同源重组 基因破坏

葡萄糖异构酶(glucose isomerase, GI),又称木糖异构酶,是工业生产上大规模以淀粉制备高果糖浆的关键酶,同时也是一个较好的蛋白质工程研究模型.我们在分离得到7号淀粉酶链霉菌 M1033 的葡萄糖异构酶基因后^[1],利用 pT-7 系统实现了其在大肠杆菌中的高表达^[2].同时依据 0.19 nm 分辨率野生型晶体结构模型^[3]和分子模拟设计,分别构建成功单突变体酶 GI(G138P)^[4]和 GI(G247D).进一步通过 DNA 重组构建成功双突变体酶 GI(G138P-G247D).初步分析认为,由于 GI 第 138 位的 Gly 被突变后的 Pro 取代,引入的吡咯烷环侧链恰好填充了由于 Gly 无侧链基团而留下的空洞,使 GI 空间结构更具刚性,从而导致 GI(G138P)的最适反应温度提高约 10 °C,热稳定性提高约 1 倍(专利公开号:CN1156182A);而 GI 基因第 247 位的点突变引入 Asp 后可能由于 Asp 具有较强的电负性,从而改变了 GI 活性部位的电荷传递过程,导致 GI(G247D)的酶活提高约 50%.双突变体酶 GI(G138P-G247D)的酶活为 GI(G138P)的 1.58 倍,热失活半衰期在以葡萄糖为底物时提高到 1.24 倍,在以木糖为底物时提高到 4.06 倍,较两种单突变体酶中任一种具有更高的酶活及热稳定性.考虑到链霉菌质粒表达系统中的结构不稳定性和序列丢失现象,拟通过同源重组的方法将突变位点置换回 M1033 染色体,从而实现双突变体酶的稳定高效表达.本文报道了7号淀粉酶链霉菌 M1033 遗传背景分析及原生质体制备、转化条件的建立以及链霉菌 M1033 同源重组 GI 缺陷型菌株的构建.

1 材料与方 法

() 菌株与质粒. 大肠杆菌 NM522、7号淀粉酶链霉菌 M1033、单链丝状噬菌体 M13 K07 均为本实验室贮藏.含有 GI(G138P-G247D)基因全序列的重组质粒 pUB-GI 为本课题组构建.链霉菌插入型同源重组载体 pDH5 为法国 Eberhard-karls 大学 Wohlleben 教授惠赠.

() 酶及主要试剂. 限制性内切酶 Sph I, Sma I, Sal I, T4 DNA 连接酶, DNA 聚合酶 Klenow 片段为华美生物工程公司产品.限制性内切酶 Mst II, DIG DNA Labeling and Detection Kit 为 Boehringer Mannheim 产品.限制性内切酶 Bgl II, Not I 为 Promega 公司产品. Sephaglas

Band Prep Kit 为 Pharmacia 公司产品.

() 培养基. 大肠杆菌用 LB 培养基,按文献[5]方法配制,链霉菌用 YEME 液体培养基和 R₂YE 固体培养基均按文献[6]方法配制.

() 引物的设计与合成. 根据 *Gl* 基因编码序列分别设计了两组引物. 为便于克隆,在 P1 和 P2 引物内分别引入了 *Nde* 和 *Bam*H 位点.

P1: 5'-AAA CAT ATG AGC TAC CAG CCC ACC CCC GAG 3' (30 mer),

P2: 5'-AAA GGA TCC CTA GCC CCG CGC GCC CAG CAG 3' (30 mer),

P3: 5'-GGC CGC GGA GGC CCA GAC GCC 3' (21 mer),

P4: 5'-ACC ATC CGC AAC ATC GAC CTC 3' (21 mer).

引物由中国科学院上海生物工程研究中心合成.

() DNA 重组. 按文献[5]方法进行.

() 链霉菌总 DNA 及质粒的抽提,链霉菌原生质体的制备、转化. 按文献[6]方法进行.

() 葡萄糖异构酶活力的测定. 以 D-葡萄糖或 D-木糖为底物,采用改进的乙醇-吡啶法^[7].

() Dot blot 与 Southern 杂交分析. 均按 Boehringer Mannheim 公司的 DIG DNA Labeling and Detection Kit 说明书操作.

() Western 杂交分析. 以实验室分离纯化的电泳纯葡萄糖异构酶作为抗原,注射家兔,二次加强免疫后,提取兔血清为抗体,作为 Western 杂交的一抗(稀释倍数为 1:200). 二抗为华美生物工程公司生产的 HRP 耦联的羊抗兔抗体(稀释倍数为 1:250). Western 杂交参考文献[5]进行.

2 结果

2.1 M1033 菌株遗传背景分析,原生质体制备、再生及转化条件的建立

分别采用中性法和碱变性法提取 M1033 菌丝体的质粒,电泳检测未发现有内源质粒存在. 抗生素检测发现 M1033 对硫链丝菌素具有敏感性,抗性区间与变铅青链霉菌一致. 以常规链霉菌原生质体制备、转化条件制备 M1033 原生质体,并分别用 1.0 μg pJ702 和 pJ4083 质粒转化,发现转化率较低($10^2 \sim 10^3/\mu\text{g}$). 通过对 M1033 菌丝体生长时间、溶菌酶浓度、作用时间等条件的优化,转化频率提高至 $10^4 \sim 10^5/\mu\text{g}$.

2.2 插入型同源重组质粒 pXW 的构建

pDH5 为 Hillemann 等人^[8]构建的一种用于在链霉菌中进行同源重组的大肠杆菌噬菌粒. 它含有便于在大肠杆菌中进行基因操作的 *lacZ* 操纵子、多克隆位点及氨苄青霉素抗性基因 *bla*; 用于抽提单链 DNA 的 *f1* 噬菌体整合位点; 以及在链霉菌中作为重组子筛选标记的硫链丝菌素抗性基因 *tsr*. 通过二步亚克隆,我们将一段切除了 5 端与 3 端的不完整 *Gl* (*Gl38P-G247D*) 基因片段插入 pDH5, 构建成插入型同源重组质粒 pXW. 首先用 *Sph* 酶切质粒 pUB - *Gl*, 回收 *Gl* (*Gl38P-G247D*) 结构基因 5 端 1.1 kb 的片段与 *Sph* 酶解的载体 pDH5 连接,筛选获得反向插入的重组质粒 pXZ. 再用 *Mst* 酶切 pXZ, 回收 800 bp 的含 *Gl* (*Gl38P-G247D*) 结构基因中部的 DNA 片段, DNA 聚合酶 *Klenow* 片段补平后插入 pDH5 的 *Sma* 位点构建成 pXW. 重组质粒 pXW 含有 *Gl* (*Gl38P-G247D*) 结构基因中部从 *Mst* 位点至 *Sph* 位点约 600 bp 的不完整基因片段,其中包括 138 突变位点和 247 突变位点,其方向与在质粒 pUB -

GI 中相同(图 1).

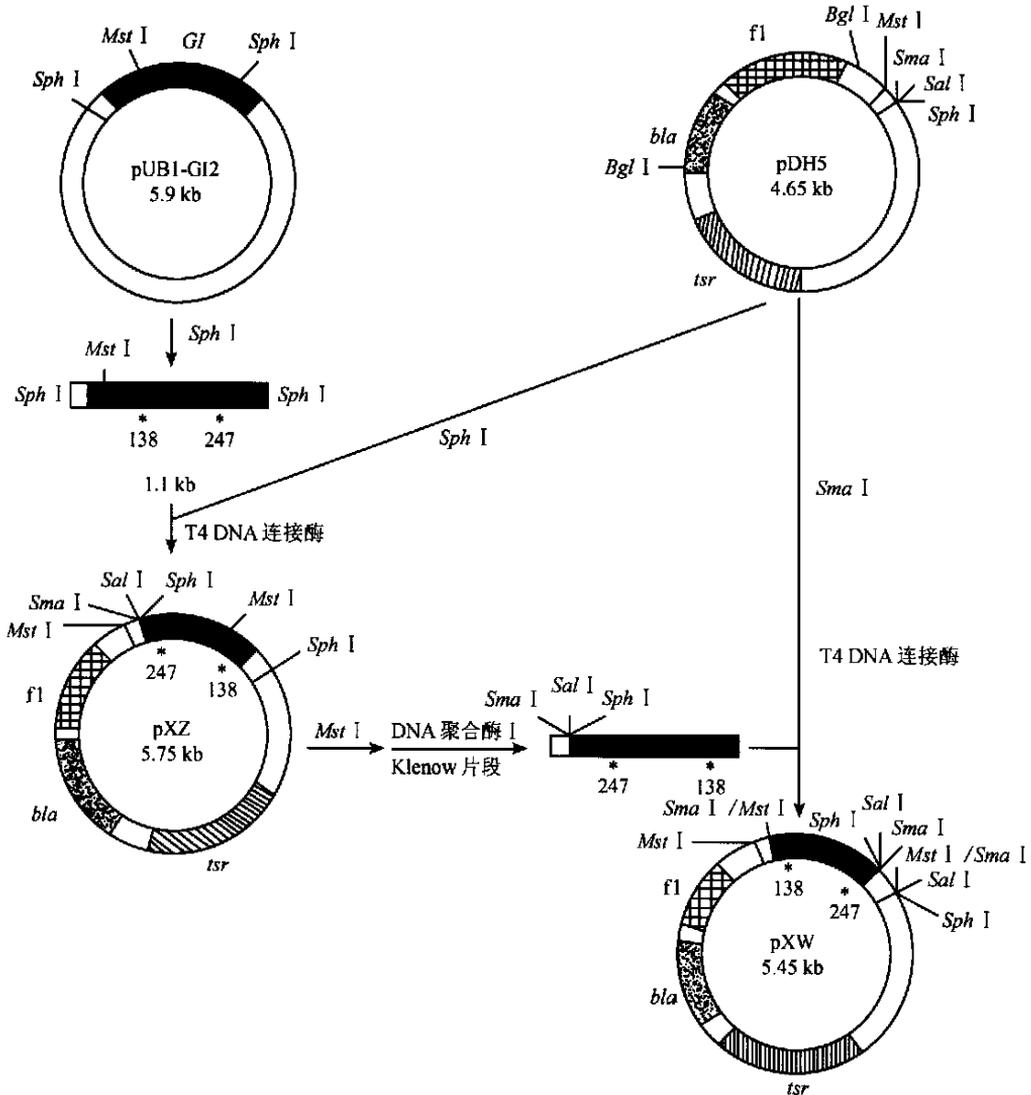


图 1 pXW 重组质粒构建示意图

2.3 通过同源重组获得链霉菌 M1033 的 GI 缺陷型菌株

pXW 不能通过质粒自主复制的方式在 M1033 中进行扩增,但是可以通过其上 600 bp 的 GI(GI38P-G247D) 基因片段与 M1033 染色体上的同源区域发生重组,从而整合到 M1033 的染色体上随染色体一起复制. 重组后一方面将 pXW 上的 *tsr* 基因引入 M1033 的染色体,使重组菌株产生对于硫链丝菌素的抗性;另一方面,pXW 的插入打断了 M1033 染色体上的 *GI* 结构基因,产生由两个不完整的 *GI* 结构基因构成的串联重复序列,其间被 pDH5 的质粒骨架间隔,从而实现 *GI* 基因的破坏(图 2(a)和(b)).

我们用常规的碱变性法和助噬菌体 M13 K07 感染法分别抽提 pXW 的双链 DNA 和单链环

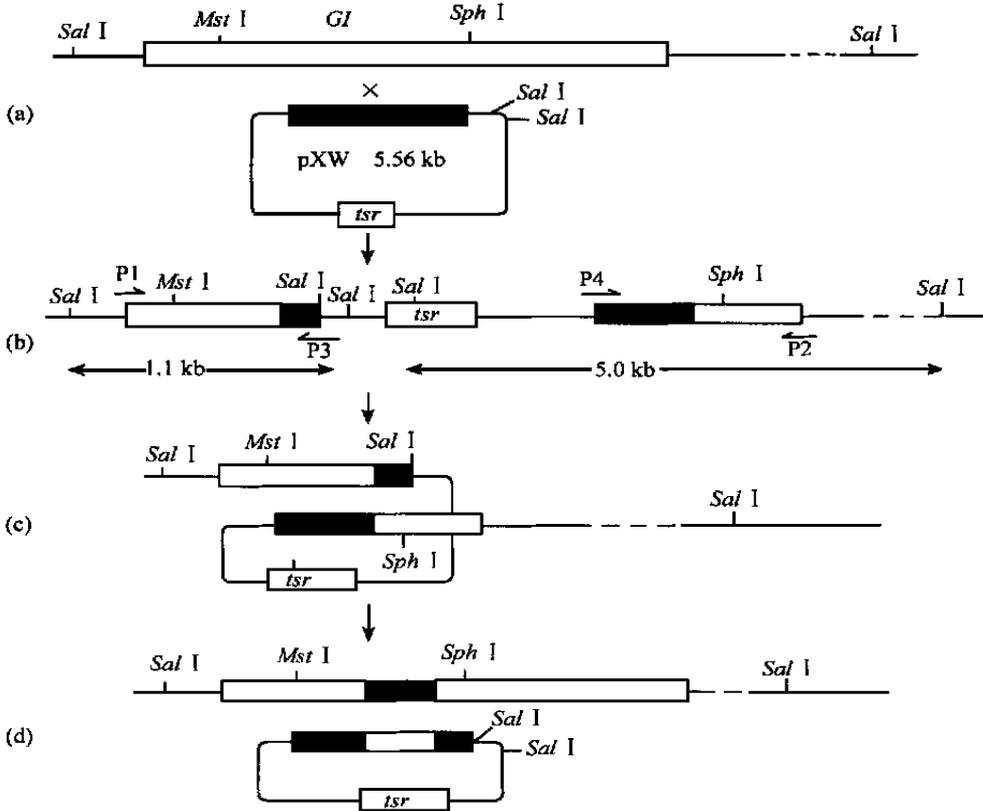


图 2 链霉菌 M1033 同源重组过程示意图

(a) 插入型同源重组质粒 pXW 上 600 bp 的 *Gl* (G138P-G247D) 基因片段与 M1033 染色体上同源区域发生重组; (b) 重组后 M1033 染色体上的序列分布, 其中 138 和 247 突变根据 pXW 插入位点的不同随机分布于染色体上的 2 个不完整 *Gl* 基因拷贝中; (c) 染色体内同源片段间自发进行第 2 次同源重组; (d) 第 2 次重组后移除 pXW, 染色体恢复原状, 但先后 2 次重组位点间的同源序列却发生了交换, 其中可能包括 138 和 (或) 247 突变

状 DNA, 转化 M1033 原生质体发现双链 DNA 的转化效率约为 $10 \sim 10^2/\mu\text{g}$, 而单链 DNA 的转化效率可达到 $10^3 \sim 10^4/\mu\text{g}$. 以硫链丝菌素为标记筛选出 356 个抗性转化子, 采取平板影印方法排除了其中 84 个抗性不稳定菌株. 进一步通过摇瓶测活的方法获得 2 个酶活丧失菌株, 命名为: M1033XW78, M1033XW194. 其胞内粗酶液酶活的测定结果显示, 其葡萄糖异构酶活性完全丧失. SDS-PAGE 电泳的结果 (图 3) 也表明, 其在 42.5 ku 处不具有 *Gl* 蛋白的特异性条带. Western 杂交分析 (图 4) 进一步证明了蛋白电泳检测结果的可靠性.

蛋白水平上确定基因破坏后, 我们又从分子水平上对其加以验证. 首先采用载体 pDH5 上的 1.2 kb 的 *Bgl* 酶切片段作为探针对 M1033 以及 2 个抗性菌株的总 DNA 进行点杂交 (图 5), 结果显示: 作为对照的质粒 pDH5 和 pXW 杂交结果呈阳性, M1033 的总 DNA 杂交结果呈阴性, 而 M1033XW78 和 M1033XW194 的总 DNA 杂交结果均呈阳性. 这证明 pXW 已整合入 M1033 染色体中. 进一步 Southern 杂交分析 (图 6) 显示同源重组后重组序列的分布模式: 以 *Gl* 基因中 1.1 kb 的 *Sph* 片段为探针, 与 *Sal* 酶解的 M1033 总 DNA 杂交, 出现了 3.2 kb 的杂交条带, 为 M1033 染色体上包含完整 *Gl* 基因的 *Sal* 片段; 与 M1033XW78 和 M1033XW194 *Sal*

酶解的总DNA杂交均出现1.1和5.0 kb的2条杂交条带,分别为M1033染色体上*Gl*基因上游和下游的*Sal*位点与质粒pXW上2个*Sal*位点间DNA片段的长度(图2(b)).

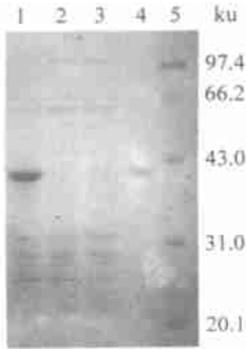


图3 SDS-PAGE结果
1—M1033胞内粗酶液, 2—M1033XW78胞内粗酶液, 3—M1033XW194胞内粗酶液, 4—葡萄糖异构酶纯酶, 5—蛋白质标准分子量



图4 Western杂交结果
1—M1033XW78胞内粗酶液, 2—M1033XW194胞内粗酶液, 3—M1033胞内粗酶液, 4—葡萄糖异构酶纯酶



图5 Dot blot结果
1—pDH5, 2—pXW, 3—M1033总DNA, 4—M1033XW78总DNA, 5—M1033XW194总DNA



图6 Southern杂交结果
1—M1033总DNA, 2—M1033XW78总DNA, 3—M1033XW194总DNA

2.4 同源重组序列中突变位点的确证

在实现*Gl*基因破坏的同时,位于pXW上的138和247突变位点是否已引入染色体对于实现对M1033上*Gl*基因的分子改造至关重要.利用设计合成的2对引物分别扩增M1033XW78, M1033XW194染色体中600 bp的2个基因片段,克隆入T-Vector,序列分析表明138和247突变位点已引入了M1033XW78, M1033XW194染色体中.

2.5 同源重组菌株稳定性的检测

在不含硫链丝菌素的条件下,对M1033XW78和M1033XW194进行传代培养,以检验同源重组后其染色体上重组区域的稳定性.经过数十次的传代培养和平板影印比较后,发现绝大多数后代仍保持了对硫链丝菌素的抗性和酶活丧失的特性,这证明重组后的*Gl*缺陷型菌株比较稳定.同时,我们也发现有少数的后代抗性消失,其发生频率约 $10^{-9} \sim 10^{-10}$ /代.对这些抗性消失的菌株进行酶活的测定,发现大多数菌株恢复了葡萄糖异构酶的活性.用PCR的方法,以P1和P2为引物,对M1033, M1033XW78, M1033XW194和酶活恢复菌株的总DNA进行扩增,发现M1033和酶活恢复菌株均扩增出完整*Gl*结构基因的1.2 kb条带;这表明有极少数M1033XW78和M1033XW194在传代过程中通过染色体内2个600 bp的同源片段自发重组,移除了插入的pXW质粒而回复成与野生型M1033菌株相同的染色体框架排列(图2(c), (d)).少数既不具有抗性又丧失酶活的菌株尚待进一步分析,推测是由于自发重组时质粒骨架的移除导致*Gl*基因内部发生重排引起的.

3 讨论

利用细胞染色体 DNA 与外源 DNA 的同源序列发生重组,可以达到定点修饰或缺失染色体上某一基因的目的. 这种基因打靶的方法已被广泛应用于小鼠的胚胎干细胞中^[9],国外利用此方法在链霉菌中亦开展了一些有意义的工作,主要用于对链霉菌发育分化调控中的相关基因如 *whiG* 和抗生素基因的研究中^[10,11]. 我们利用 Wohlleben 的 pDH5 系统,通过 pXW 单、双链对 M1033 原生质体的转化发现单链 DNA 的重组频率高于双链 DNA,这与 Wohlleben 教授的研究结果一致^[8]. 推测可能单链 DNA 的构型是链霉菌同源重组蛋白的较佳底物. 另一方面,在 pXW 插入 M1033 染色体进行基因破坏的同时,两个不完整的 *Gl* 基因拷贝会以较低频率自发产生第 2 次重组,移除 pXW 质粒骨架而恢复为基因破坏前的染色体基因排列. 在这一过程中,138 和 247 突变有可能会留在染色体上,这取决于重组过程中先后两次重组所发生的位点在 *Gl* 基因上的分布^[12,13]. 目前我们的实验已证实 138,247 突变的成功引入以及同源重组缺陷型菌株的低频率可回复性,利用这一特性可在大量筛选的基础上获得定向染色体分子水平改建的含 *Gl*(G138P-G247D)基因的 M1033 基因工程菌株. 筛选及突变子检测工作正在进行中.

致谢 本工作为国家“八六三”高技术计划(批准号:130-13-02-04)资助项目.

参 考 文 献

- 1 朱学良,王玉珍,黄震,等. 链霉菌 M1033 木糖异构酶的分子克隆. 生物工程学报,1992,8(3): 232~236
- 2 崔虹,刘咸安,李澄清,等. 7号淀粉酶链霉菌 M1033 菌株葡萄糖异构酶在大肠杆菌中的高效表达. 生物工程学报,1996,12(增刊): 97~100
- 3 朱学勇,龚为民,牛立文,等. 七号淀粉酶链霉菌木糖异构酶晶体结构研究. 中国科学,C辑,1997,27(1): 21~27
- 4 朱国萍,滕脉坤,伍传金,等. G138P 定点突变对葡萄糖异构酶热稳定性的改善. 生物化学与生物物理学报,1998,30(6): 605~609
- 5 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 6 Hopwood D A, Bibb M J, Charter K F, et al. Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual. Norwich: The John Innes Foundation Press, 1985
- 7 黄婉治,王淳,刘兢,等. 链霉菌 M1033 葡萄糖异构酶的分离、纯化及性质研究. 中国科学技术大学学报,1992,22(3): 283~288
- 8 Hillemann D, Puhler A, Wohlleben W. Gene disruption and gene replacement in *Streptomyces* via single stranded DNA transformation of integration vectors. Nucleic Acids Research, 1991, 19: 727~731
- 9 马先勇,姚开泰. 同源重组技术研究进展. 生物工程进展,1996,16: 16~23
- 10 Baltz R H, Høsted T J. Molecular genetic methods for improving secondary-metabolite production in actinomycetes. TIBTECH, 1996, 14: 245~250
- 11 Oh S, Chater K F. Denaturation of circular or linear DNA facilitates targeted integrative transformation of *Streptomyces coelicolor* 3(2): possible relevance to other organisms. Journal of Bacteriology, 1997, 179: 122~127
- 12 Macneil D J, Cewain K M, Ruby C L, et al. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. Gene, 1992, 111: 61~68
- 13 田泽君,陈光慧,汤健. 基因打靶进展. 国外医学分子生物学分册,1996,18(4): 182~187

(1999-03-17 收稿,1999-06-24 收修改稿)