

噬夏孢欧文氏菌(*Erwinia uredovora*) 类胡萝卜素合成相关基因 crtE 的克隆 及其在大肠杆菌中的表达

汪靖超¹, 孙东平¹, 杜桂彩², 郭道森¹, 李荣贵^{1, 2, *}

(1. 青岛大学生物系, 山东 青岛 266071; 2. 青岛大学 天然色素山东省重点实验室, 山东 青岛 266071)

摘 要: 噬夏孢欧文氏菌基因 crtE 编码 GGPP 合成酶。通过 PCR 扩增获得 crtE 基因, 克隆进表达载体, 构建表达质粒 pET-15b-crtE。重组质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3), 构建工程菌; 重组 GGPP 合成酶在大肠杆菌中实现了高效表达, 表达量占菌体总蛋白的 42%。重组蛋白以包含体形式存在, 包含体经洗涤、尿素溶解、复性并经镍离子亲和层析树脂纯化, 得到了电泳纯的重组噬夏孢欧文氏菌 GGPP 合成酶, 带有 His-tag 的该蛋白分子量为 34kDa, pI 值为 6.3。

关键词: 噬夏孢欧文氏菌; crtE; GGPP 合成酶; 表达; 纯化

Cloning and Expression of crtE from *Erwinia uredovora* in *Escherichia coli*

WANG Jing-chao¹, SUN Dong-ping¹, DU Gui-cai², GUO Dao-sen¹, LI Rong-gui^{1, 2, *}

(1. Department of Biology, Qingdao University, Qingdao 266071, China

2. Key Laboratory for Natural Pigments of Shandong Province, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

Abstract: Gene crtE of *Erwinia uredovora*, encoding the GGPP synthase, was amplified by PCR, and cloned into pET-15b expression vector. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* to construct engineering bacterium. Overexpression of recombinant GGPP synthase was achieved in engineering bacterium by IPTG induction. The expression level was up to 42% of the total cellular proteins. The recombinant protein was found mainly in inclusion bodies, after being solved in 8mol/L urea and refolded. The recombinant GGPP synthase in inclusion bodies was purified on a Ni²⁺ chelating resin column. The purified protein with a N-terminal His-tag shows a molecular weight of 34 kDa and pI of 6.3.

Key words: *Erwinia uredovora*; crtE; GGPP synthase; expression; purification

中图分类号: Q785 Q786

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)07-0276-04

类胡萝卜素是自然界中广泛存在的一大类色素, 在猝灭自由基、增强人体免疫力、预防心血管疾病和防癌抗癌等保护人体健康方面起着非常重要的作用。所有的类胡萝卜素均通过异戊二烯化合物和萜类化合物途径合成。异戊烯焦磷酸(IPP)是该途径的前体物质, IPP在IPP异构酶作用下生成DMAPP, 然后再与三个IPP缩合, 生成牻牛儿基牻牛儿焦磷酸(GGPP), 两分子的GGPP在八氢番茄红素合成酶作用下生成八氢番茄红素, 八氢番茄红素经过连续的脱氢反应, 直至形成番茄红素, 番茄红素在不同环化酶作用下分别生成 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素, 然后可进一步形成结构更为复杂的叶黄素^[1-2]。

噬夏孢欧文氏菌的玉米黄素二糖苷合成途径是最早被阐明的类胡萝卜素合成途径之一, 参与代谢的多个相关酶的编码基因也被克隆^[3], 其中crtE基因编码GGPP合成酶^[4-5]。本研究利用PCR技术, 从噬夏孢欧文氏菌基因组中扩增出了crtE基因, 构建成重组表达质粒, 转化大肠杆菌, 得到了高效表达重组蛋白的工程菌株; 经镍离子亲和层析树脂, 获得了电泳纯的重组GGPP合成酶。为进一步研究噬夏孢欧文氏菌合成类胡萝卜素的分子机理和转类胡萝卜素合成基因的工程菌构建奠定了基础。

1 材料与方法

收稿日期: 2007-04-25

*通讯作者

基金项目: 山东省优秀中青年科学家奖励基金项目(2003); 青岛市自然科学基金项目(05-1-JC-91)

作者简介: 汪靖超(1973-), 男, 讲师, 研究方向为生物技术。

1.1 材料

噬夏孢欧文氏菌 *Erwinia uredovora* 20D3 (ATCC 19321) 美国模式菌种收集中心(ATCC); 引物 上海生物工程技术有限公司; 克隆所需工具酶 大连宝生物工程公司; 镍离子螯合树脂 Amersham 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 噬夏孢欧文氏菌基因组 DNA 的提取

参照 Masawa 等^[6]方法进行。

1.2.2 crtE 基因的 PCR 扩增及回收

根据噬夏孢欧文氏菌 crtE 的基因序列, 设计了一对引物:

引物 1: 5'-GAATTCCATATGACGGTCTGCGCAAAAAAC-3'

引物 2: 5'-ATTCTCGAGTTAACTGACGGCAG-3'

其中, 引物 1 中含有 *Nde* I 酶切位点, 引物 2 中含有 *Xho* I 酶切位点。以噬夏孢欧文氏菌基因组 DNA 为模板, 利用合成的引物, 通过 PCR 扩增出 crtE 基因。PCR 参数为: 94℃预变性 5min 后进入循环: 94℃变性 45s, 52℃退火 45s, 72℃延伸 1min, 共进行 35 个循环。产物经琼脂糖凝胶电泳分离后, 使用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收 crtE 基因。

1.2.3 重组质粒和基因工程菌的构建

将回收的 crtE 基因直接连入 pGEM-T 载体, 并转化 *E. coli* DH5 α , 涂布于含氨苄青霉素(100 μ g/ml)且表面涂有 7.5 μ l IPTG 和 10 μ l X-gal 的 LB 平板, 培养过夜。挑取白斑菌落, 转接到含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37℃培养过夜后, 提取质粒 pGEM-TcrtE。用 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切鉴定, 并进行序列分析。

用 *Xho* I 和 *Nde* I 酶切 pGEM-TcrtE 质粒, 琼脂糖凝胶电泳分离后, 回收 crtE 片段, 并将其连接到以同样酶切割的载体 pET-15b 上, 构建表达载体, 重组质粒进行酶切鉴定。将重组质粒 pET-15bcrtE 转化 *E. coli* BL21 (DE3), 构建基因工程菌株。

1.2.4 DNA 序列测定

插入 pGEM-T 中的 crtE 基因序列分析由华大基因上海鼎安生物技术有限公司完成。

1.2.5 crtE 基因的表达及重组蛋白的纯化

将基因工程菌单菌落接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37℃振荡培养 6h, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5mmol/L, 诱导 4h, 4℃下 8000r/min 离心收集菌体。

将菌体用结合缓冲液(20mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 0.5mol/L NaCl, 5mmol/L 咪唑)悬浮, 低温下超声波破碎细胞, 细胞裂解液 6000r/min(4℃)离心 10min, 收集包含体, 再用脲(8mol/L)悬浮, 室温静置 1h。10000r/min

(4℃)离心 10min, 上清即为变性的包含体。向上清中缓缓加入 15 倍体积的含 0.1% Triton X-100 的结合缓冲液进行稀释复性, 放置 1h, 流过已整合 Ni²⁺ 的 Chelating Sepharose 4B 柱(0.5 \times 5cm), 先用 50ml 结合缓冲液冲洗, 再用 50ml 的洗涤缓冲液(20mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 0.5mol/L NaCl, 60mmol/L 咪唑, 0.1% Triton x-100)冲洗, 最后用洗脱缓冲液(20mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 0.5mol/L NaCl, 0.5mol/L 咪唑, 0.1% Triton x-100)洗脱, 洗脱液中的蛋白进行 SDS-PAGE 分析。

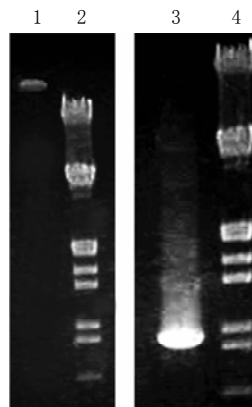
1.2.6 其他方法

SDS-PAGE、等电聚焦法测定等电点、蛋白浓度的测定参照文献[7~9]进行。

2 结果与分析

2.1 噬夏孢欧文氏菌基因组 DNA 的提取与 crtE 的扩增

如图 1 所示, 提取到了完整的噬夏孢欧文氏菌基因组 DNA, 分子量大于 21kb; 以此为模板, 利用设计的一对引物通过 PCR 扩增出了大小约为 900bp 的 DNA 片段, 该片段与已报道的 crtE 基因(906bp)的大小一致。



1. 噬夏孢欧文氏菌基因组 DNA; 2、4. λ DNA/*Eco*R I, *Hind* III; 3. PCR 扩增 crtE 基因。

图 1 噬夏孢欧文氏菌基因组 DNA 的提取与 crtE 的 PCR 扩增

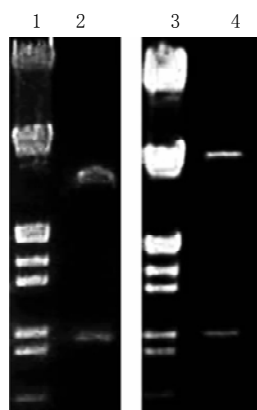
Fig.1 Isolation of genomic DNA from *E.uredovora* and PCR amplification of crtE

2.2 重组质粒的酶切鉴定

将构建的重组质粒 pGEM-TcrtE 用 *Nde* I 与 *Xho* I 双酶切后, 可见约 900bp 的目的片段, 大小与 crtE 基因相符(图 2)。将测序正确的 crtE 基因从 pGEM-TcrtE 上切下, 插入 pET-15b, 重组质粒 pET-15bcrtE 用 *Nco* I 与 *Xho* I 双酶切鉴定, 结果如图 2 所示, 切下的片段大小约 950bp 的目的片段, 包含 His-tag 的编码区, 大小与预期的一致。

2.3 序列测定

将重组质粒 pGEM-TcrtE 中 crtE 进行序列分析, 结



1,3. λ DNA/*EcoRI*, *HindIII*; 2. pGEM-TertE双酶切结果 3. pET-15b-crtE的酶切结果。

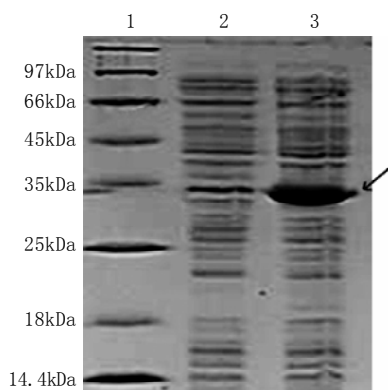
图2 重组质粒的双酶切分析

Fig.2 Identification of recombinant plamid by restriction endonucleases

果表明所测序列与文献报道的 *crtE* 序列完全相同。

2.4 重组蛋白的表达

crtE 基因全长 909 个 bp, 加上 His-tag 编码区, 重组蛋白由 322 个氨基酸构成。工程菌经 IPTG 诱导后, *crtE* 基因得到了高效表达, 菌体总蛋白中出现了分子量约为 34kDa 的重组蛋白(图 3 中箭头所示), 占菌体总蛋白的 4.2%。菌体经超声破碎、离心、SDS-PAGE 分析发现, 重组蛋白主要以包含体的形式存在。



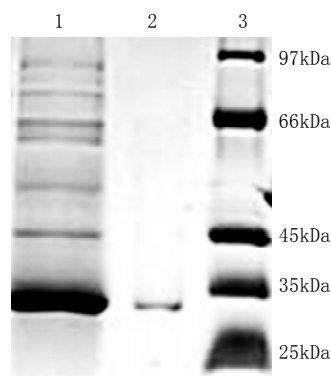
1. 蛋白质分子 Marker; 2. 大肠杆菌 BL21 (DE3) 全蛋白; 3. 工程菌菌体全蛋白。

图3 GGPP 合成酶在大肠杆菌中的表达

Fig.3 Overexpression of GGPP synthase in *E. coli*

2.5 重组蛋白的复性、纯化及性质

低速离心得到的包含体经洗涤、尿素溶解、复性、 Ni^{2+} 螯合树脂亲和层析后, 得到了电泳纯的重组蛋白(图 4), 由图 4 可以看出纯化后的重组蛋白的分子量为 34kDa, 用等电聚焦法测得 N-末端含 His-tag 的重组 GGPP 合成酶的等电点为 6.3。



1. 复性包含体; 2. 纯化的重组蛋白; 3. 蛋白质 Marker。

图4 复性与纯化后的重组 GGPP 合成酶的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of refolded and purified recombinant GGPP synthase

3 讨论

深入地了解类胡萝卜素的生物合成途径具有十分重要的商业价值和科学意义^[10]。嗜夏孢欧文氏菌可以合成类胡萝卜素, 其合成途径与其他类胡萝卜素合成细菌有所不同, 而与高等植物的类胡萝卜素合成途径极为相似^[6, 11]。Ruther 等^[12]认为 GGPP 的合成是类胡萝卜素合成中的限速过程。Lois^[13]和 Matthews^[14]也都认为由 GGPP 的合成是类胡萝卜素代谢途径的“瓶颈”。对 GGPP 合成酶性质的研究对于了解类胡萝卜素合成的分子机理及其调控机制是非常重要的。但 GGPP 合成酶主要定位在膜上, 量非常少, 且在体外不稳定, 其纯化颇为困难。Kuntz 等^[15]将辣椒的编码 GGPP 合成酶的 cDNA 转到大肠杆菌中, 使辣椒 (*Capsicum annuum*) GGPP 合成酶在大肠杆菌中得到了表达。Engprasert 等^[16]将毛茛藜花 (*Coleus forskohlii* Briq) 的 GGPP 合成酶 cDNA 转入大肠杆菌, 表达出了重组 GGPP 合成酶。本研究从嗜夏孢欧文氏菌基因组中克隆出 GGPP 合成酶的编码基因 *crtE*, 插入质粒 pET-15b, 转化大肠杆菌, 经 IPTG 诱导, 获得了高效表达的重组蛋白; 利用质粒 pET-15b T7 启动子表达的重组蛋白 N 端的 His-tag, 借助镍离子亲和层析, 一步纯化得到了电泳纯的重组嗜夏孢欧文氏菌 GGPP 合成酶。

本研究为进一步研究嗜夏孢欧文氏菌 GGPP 合成酶的酶学性质和晶体结构奠定了基础, 为今后研究细菌以及高等植物中类胡萝卜素合成的分子机理及其代谢调控机制, 以及类胡萝卜素合成工程菌的构建创造了条件。

参考文献:

- [1] BRITTON G, LIAAEN-JENSEN S, PFANDER H, et al. Overview of carotenoid biosynthesis[M]//carotenoids: biosynthesis and metabolism: vol. 3. Basel, Switzerland: Birkhauser, 1999: 13-237.
- [2] 陶俊, 张上隆, 徐昌杰, 等. 类胡萝卜素合成的相关基因及其基因工程[J]. 生物工程学报, 2002, 18(3): 276-281.

固定化脂肪酶 Lipozyme TL IM 催化菜籽油 制备生物柴油稳定性的研究

徐炜枫, 陆兆新*, 吕凤霞, 别小妹, 房耀维
(南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095)

摘 要: 研究了固定化脂肪酶 Lipozyme TL IM 催化菜籽油制备生物柴油的反应, 探索了酶的预处理方式、后处理方式、反应温度、甲醇的加入方式等对酶活稳定性的影响。结果表明: 将酶在油酸甲酯中浸泡 0.5h, 过滤后用菜籽油淋洗, 在菜籽油中浸泡 12h 可以提高酶活的稳定性; 多批次反应温度 40℃ 为适宜; 用丙酮洗涤酶除去甘油可以提高酶的稳定性; 分三步加入甲醇的方式可以减轻甲醇对酶的毒害。Lipozyme TL IM 经过预处理, 40℃ 下进行多批次反应, 每批反应 24h, 并在反应 0、8、16h 时加入 1 摩尔当量甲醇, 并在 8、16h 以及反应结束时用丙酮洗涤固定化酶并重新投入体系, 连续反应 10 批次, Lipozyme TL IM 相对酶活仍有 85%。

关键词: 生物柴油; Lipozyme TL IM; 菜籽油

Stability of Immobilized Lipozyme TL IM for Biodiesel Synthesis from Rapeseed Oil

XU Wei-feng, LU Zhao-xin*, LÜ Feng-xia, BIE Xiao-mei, FANG Yao-wei
(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Lipozyme TL IM was used for the synthesis of biodiesel from rapeseed oil. The effects of pretreatment of the lipase,

收稿日期 2007-04-08

* 通讯作者

作者简介: 徐炜枫 (1981-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。

-
- [3] ARMSTRONG G A. Genetics of eubacterial carotenoids biosynthesis: a colorful tale[J]. *Annu Rev Microbiol*, 1997, 51: 628-659.
 - [4] SANDMANN G, MISAWA N. New functional assignment of the carotenogenic genes crtB and crtE with constructs of these genes from *Erwinia* species[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1992, 69(3): 253-257.
 - [5] MATH S K, HEARST J E, POULTER C D. The crtE gene in *Erwinia herbicola* encodes geranylgeranyl diphosphate synthase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(15): 6761-6764.
 - [6] MISAWA N, NAKAGAWA M, KOBAYASHI K, et al. Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene produce expressed in *Escherichia coli*[J]. *J Bacteriol*, 1990, 172(12): 6704-6712.
 - [7] SAMBROOK J, RUSSELL D W. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
 - [8] RIGHETTI P G. Isoelectric focusing: theory, methodology and applications[M]. New York: Elsevier Biomedical Press, 1983.
 - [9] BRADFORD M M. A novel method for protein estimation assay using brilliant blue G[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
 - [10] OH S K, KIM I J, SHIN D H, et al. Cloning, characterization, and heterologous expression of a functional geranylgeranyl pyrophosphate synthase from sunflower (*Helianthus annuus* L.) [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2000, 157: 535-542.
 - [11] FRASER P D, MISAWA N, LINDEN H, et al. Expression in *Escherichia coli*, purification, and reactivation of the recombinant *Erwinia uredovora* phytoene desaturase[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267: 19891-19895.
 - [12] RUTHER A, MISAWA N, BOGE P, et al. Production of zeaxanthin in *Escherichia coli* transformed with different carotenogenic plasmids[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, 48: 162-167.
 - [13] LOIS L M, RODRIGUEZ-CONCEPCION M, GALLEG0 F, et al. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase[J]. *The Plant Journal*, 2000, 22(6): 503-511.
 - [14] MATTEWS P D, WURTZEL E T. Metabolic engineering of carotenoid accumulation in *Escherichia coli* by modulation of the isoprenoid precursor pool with expression of deoxyxylulose phosphate synthase[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 53: 396-400.
 - [15] KUNTZ M, ROMER S, SUIRE C, et al. Identification of a cDNA for the plastid-located geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annuum*: correlative increase in enzyme activity and transcript level during fruit ripening[J]. *Plant J*, 1992, 2(1): 25-34.
 - [16] ENGPRASERT S, TAURA F, KAWAMUKAI M, et al. Molecular cloning and functional expression of geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Coleus forskohlii* Briq[J]. *BMC Plant Biol*, 2004, 18(4): 18-26.