

缬氨酸转氨酶基因原核表达载体构建及表达

张飞, 魏涛, 刘寅, 何培新

(郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001)

摘要:构建了具有缬氨酸转氨酶基因的大肠杆菌工程菌,对该酶表达条件进行了优化. PCR 结果表明,扩增出一特异 DNA 条带且长度与 avtA 基因长度1 254 bp符合. 通过纸层析检测,筛选到了阳性克隆,但是酶活偏低. SDS-PAGE 凝胶电泳显示目的蛋白表达量较低. 酶表达优化结果显示:蛋白肽浓度 12 g/L, IPTG 浓度 0.4 mmol/L, 经过 8 h 诱导,酶活达到最大值.

关键词:缬氨酸转氨酶;大肠杆菌;基因克隆;蛋白表达

中图分类号:Q939.97 **文献标志码:**A **DOI:**10.3969/j.issn.2095-476X.2013.01.002

Construction and expression of prokaryotic vector of valine-pyruvate transaminase gene

ZHANG Fei, WEI Tao, LIU Yin, HE Pei-xin

(College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: The engineered strain of *Escherichia coli* with valine-pyruvate transaminase gene was constructed and the expression condition for valine-pyruvate transaminase was optimized. The result of PCR showed that a special DNA band was amplified and the length of the band was accord with the length of avtA, 1 254 bp. Activity of valine-pyruvate transaminase was found by paper chromatography but the enzyme activity was not high. The expression of valine-pyruvate transaminase was evaluated by SDS-PAGE and a high expression was displayed. The optimal conditions were peptone 12 g/L, IPTG 0.4 mmol/L and induced time 8 h.

Key words: valine-pyruvate transaminase; *Escherichia coli*; gene cloning; protein expression

0 引言

D-氨基酸作为重要的中间体,在食品添加剂、医药、农药及化妆品行业应用广泛,市场需求较大. D-丙氨酸作为丙氨酸的一种光学异构体,在食品中主要作为增味剂和调味料使用,也是合成甜味剂阿力甜的主要原料之一. 此外, D-丙氨酸还是农药

精甲霜灵的合成原料之一^[1-2]. D-缬氨酸作为重要的中间体也广泛用于药物合成. 以 D-缬氨酸为原料可以合成高效杀虫剂氟胺菊酯^[3-4], 其青霉胺衍生物可以用来治疗一些由于免疫缺陷引起的疾病,如艾滋病^[5].

转氨酶在酶法合成氨基酸领域具有潜在应用价值. 目前,关于转氨酶的研究报道较多的是该酶

收稿日期:2012-08-23

基金项目:郑州轻工业学院博士基金资助项目(2010BSJJ020)

作者简介:张飞(1976—),男,内蒙古自治区包头市人,郑州轻工业学院讲师,博士,主要研究方向为食品生物技术.

通信作者:何培新(1970—),男,河南省民权县人,郑州轻工业学院教授,博士,主要研究方向为食品生物技术.

的酶学性质、催化机制及抑制动力学研究^[6-8]. 大肠杆菌缬氨酸转氨酶可以催化 L-缬氨酸与丙酮酸反应生成 α -酮异戊酸和 L-丙氨酸. 理论上, 利用该酶可以把缬氨酸外消旋混合物中的 L-缬氨酸转化为 α -酮异戊酸, 从而实现外消旋缬氨酸的拆分. 目前, 关于缬氨酸转氨酶在氨基酸手性拆分领域的应用报道甚少. 本文拟利用原核表达载体构建具有缬氨酸转氨酶活性的工程菌, 并对目的蛋白表达条件进行优化.

1 实验

1.1 材料与仪器

材料: 大肠杆菌 BL21 (DE3) 和大肠杆菌 DH5 α , 由本实验室提供; 原核表达载体 pET—32a, Nonagen 公司产; PCR 引物, 上海生工生物工程技术服务公司产; 限制性内切酶 Nco I 和 Xho I, DNA 聚合酶, DNA 连接酶和 DNA Marker, TaKaRa 生物工程(大连)有限公司产; 氨苄青霉素、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 南京基天生物科技有限公司产; DNA 凝胶回收试剂盒、PCR 纯化试剂盒、蛋白电泳 Marker, 天根生化公司产. 其他试剂, 均为国产分析纯. 实验中用到的 LB 培养基、SOC 培养基、DNA 琼脂糖电泳所用溶液、SDS-PAGE 电泳相关溶液的配制参见《分子克隆实验指南》(第 2 版).

仪器: PCR 仪 Model MG 48+, 杭州朗基公司产; 凝胶电泳仪 DYY—8C, 北京六一仪器厂产; 凝胶成像系统 LG2000 Gel Documentation System, 杭州朗基公司产; Waters600 高效液相色谱仪、色谱柱, 美国 Waters 公司产; 日立 CR22E 型离心机, 日本 Hitachi 公司产; 超声波细胞粉碎仪 JY88—II, 宁波新芝生物科技股份有限公司产; 日立 UV—3000 型分光光度计, 日本 Hitachi 公司产; 高压灭菌锅 G154DW, 南京庚辰科学仪器有限公司产; 恒温振荡器 THZ—C, 太仓博莱特实验仪器厂产; P2S 电子天平, 上海恒平科学仪器有限公司产.

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计及 PCR 反应条件 通过检索 genbank 中 *E. coli* K—12 的缬氨酸转氨酶基因 (avtA) 序列, 并参考 pET—32a 载体多克隆位点, 设计 2 条引物. 在上游引物 5' 端引入了 Nco I 酶切位点, 在下游引物的 5' 端引入 Xho I 酶切位点, 由下划

线标出. 上游引物为 5'-TGGCCATGGGCATGACAT-TCTCCCTTTT-3', 下游引物为 5'-TT-GCTCGAGTTAGTGACTTTCAGCCCAGG-3'. PCR 反应体系为: ddH₂O 37.4 μ L, 10 \times PCR buffer 5 μ L, MgCl₂ 3 μ L, dNTP 1 μ L, 引物各 1 μ L, 模板 1 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.6 μ L, 总体积 50 μ L. PCR 反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后进入循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 55 $^{\circ}$ C 复性 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 经过 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min 结束反应.

1.2.2 重组质粒 pET32a—avtA 的构建及转化

大肠杆菌质粒提取、基因组 DNA 提取、感受态细胞制备等常规方法参考 J. Sambrook 著《分子克隆》(第 3 版). DNA 凝胶回收、DNA 双酶切反应和 DNA 片段连接反应参考试剂盒说明. avtA 基因 PCR 产物和提取得到的表达载体, 经双酶切和凝胶回收纯化, 在 16 $^{\circ}$ C 连接 20 h. 然后取连接液 5 μ L 与 100 μ L 大肠杆菌感受态细胞混合, 于冰上放置 30 min, 于 42 $^{\circ}$ C 水浴 60 s, 冰上放置 2 min; 加入 800 μ L SOC 液体培养基于 37 $^{\circ}$ C 培养 1 h, 将培养液均匀涂布在含 Amp⁺ 的培养基平板上; 将平板放置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 12~14 h, 然后观察结果.

1.2.3 阳性克隆的筛选 采用酶活性检测的方法来筛选阳性克隆, 具体方法如下: 从转化平板挑取 20 单菌落分别接种于含氨苄青霉素 50 μ g/mL 的 2 mL LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养 12~14 h; 吸取上述菌液 250 μ L 接种于 25 mL LB 液体培养基于 37 $^{\circ}$ C 进行放大培养 6 h; 同时接种剩余菌液保存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱; 然后加入 IPTG, 在 30 $^{\circ}$ C 继续培养 8 h; 取 50 mL 离心管, 离心收集菌体 (4 000 r/min, 12 min), 弃上清, 加入 5 mL 含有浓度为 0.1 mol/L L-缬氨酸和 0.1 mol/L 丙酮酸的混合液, 加入 10% 吐温-80 50 μ L, 调节 pH 至 8, 于 37 $^{\circ}$ C 摇床反应 5 h; 纸层析检测是否有底物的消耗和产物 L-丙氨酸产生; 检测到有酶活性的, 将对应菌种进行甘油保种. 纸层析展开剂为苯酚: 乙醇: 水 = 5: 1: 2 (v/v/v). 纸层析显色剂: 0.5% (w/v) 茚三酮水溶液.

1.2.4 阳性克隆 SDS-PAGE 凝胶电泳检测 取阳性克隆对应菌液 1 mL, 同时取 1 mL 没有被转化的菌液作对照, 分别离心, 超声波细胞破碎, 然后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳.

1.2.5 酶活的测定 取 10 mL 含有浓度为 0.1 mol/L

L-缬氨酸和0.1 mol/L丙酮酸的混合液,加入待测菌体,充分混匀,调节pH至8,37℃摇床反应10 min.离心终止反应,测定上清液中丙氨酸含量.酶单位定义:1 min内反应生成1 μmol L-丙氨酸所用的酶量.实验中酶的比活力由每mL菌液含有的酶单位数表示.

1.2.6 表达条件优化 通过考察培养基蛋白胨浓度、IPTG诱导浓度以及诱导时长等3个因素对工程菌酶活的影响,来确定该酶的最佳表达条件.每个实验的培养基成分均为酵母膏、蛋白胨、氯化钠,培养基中氯化钠用量固定为5 g/L,酵母膏用量固定为5 g/L,定容前用NaOH调节pH=8.0,120℃高压灭菌备用.每个实验组培养基体积均为25 mL,接种250 μL菌液于含氨基青霉素50 μg/mL的液体培养基,37℃摇床培养6 h,然后加入IPTG,30℃摇床诱导.诱导结束,离心收集菌体,检测酶活性.

2 结果与分析

2.1 PCR产物的凝胶电泳分析

PCR产物的琼脂糖凝胶电泳结果如图1所示.由图1可见一条特异DNA条带,该条带长度与genebank中avtA基因长度1 254 bp符合.

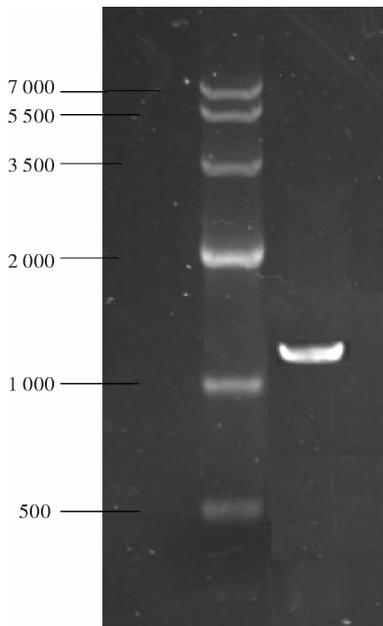


图1 PCR产物凝胶电泳图谱

2.2 阳性克隆活性筛选

采用酶活性检测的方法筛选阳性克隆,具体方法如前所述.反应液用纸层析检测,结果如图2所

示.可以明显地看出,相同反应条件下,1#,6#,7#和8#反应液中有L-丙氨酸产生,因此初步认定以上反应液中检测到了目的酶活性.同时可以看出,反应5 h产物生成量较少,说明该工程菌酶活力需要进一步优化.

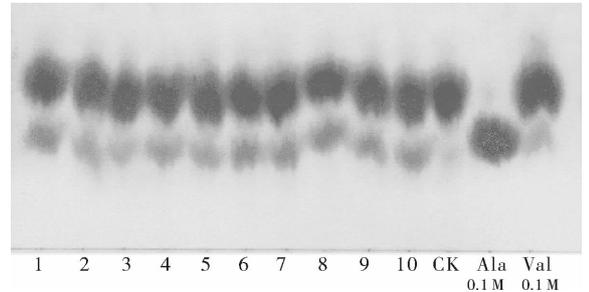


图2 单菌落筛选纸层析图谱

2.3 阳性克隆的SDS-PAGE凝胶电泳验证

上述筛选到的阳性克隆与对照菌同时进行SDS-PAGE凝胶电泳,结果见图3.供试菌在45 KDa出现特异条带,该条带位置与目的蛋白理论分子量相符.该条带在全菌和上清中含量高于沉淀中含量,说明目的蛋白表达正常.同时可以看出,目的蛋白的相对含量不高.

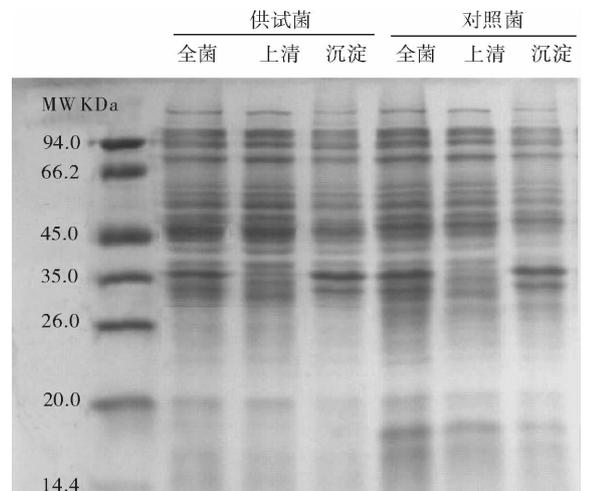


图3 阳性克隆的SDS-PAGE凝胶电泳图谱

2.4 培养基蛋白胨浓度对酶活的影响

蛋白胨作为本实验培养基中最主要的氮源,其浓度变化对目的蛋白表达的影响是基础性的(见图4):在蛋白胨浓度较低时,酶活随着蛋白胨浓度的增加而明显增加;蛋白胨浓度为12 g/L时,酶活达到最大;之后,蛋白胨浓度的进一步增加对酶活影响不明显.

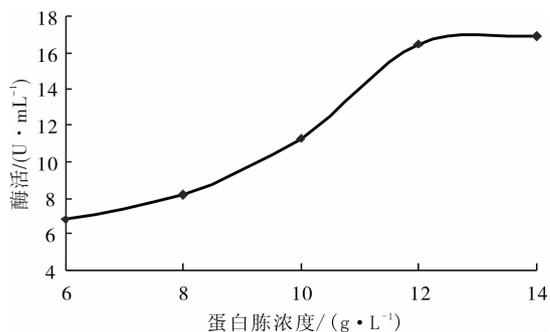


图4 蛋白胨浓度对酶活的影响

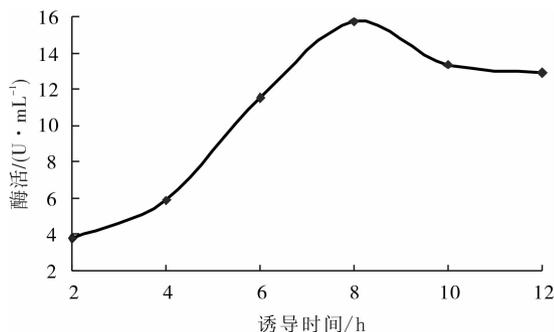


图6 诱导时间对酶活的影响

2.5 IPTG 诱导浓度对酶活的影响

IPTG 诱导浓度对目的蛋白表达的影响也是基础性的(见图5):在 IPTG 诱导浓度较低时,酶活随着 IPTG 诱导浓度的增加而有所增加;IPTG 诱导浓度增加到 0.4 mmol/L 时,酶活达到最大;此后,酶活随着 IPTG 诱导浓度进一步增加而降低.理论上, IPTG 诱导浓度过高会使目的蛋白表达过量形成包涵体而影响酶活.本实验结果与理论分析基本吻合.

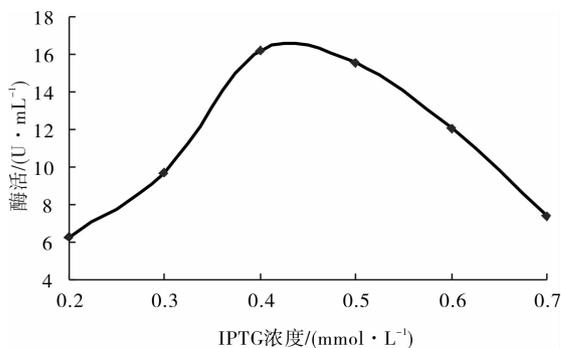


图5 IPTG 诱导浓度对酶活的影响

2.6 诱导时间对酶活的影响

诱导时间对酶活的影响见图6.酶活随着诱导时间的增加而有所增加;在诱导时间为 8 h 时,酶活达到最大;之后,酶活随着诱导时间的增加而缓慢降低;此后,随着诱导时间的进一步延长,酶活性降低不是很剧烈,可能此时营养物质已经基本耗尽,菌体停止生长.

3 结论

本文构建了具有缬氨酸转氨酶基因的大肠杆菌工程菌,并对该酶表达条件进行了初步优化.琼脂糖凝胶电泳显示,成功克隆了大肠杆菌 avtA 基因.通过纸层析检测,筛选到了阳性克隆,但是酶活性偏低.通过 SDS-PAGE 凝胶电泳检测到目的蛋白

表达正常.随后,对目的蛋白表达条件进行优化,结果显示最佳诱导条件为蛋白胨浓度 12 g/L, IPTG 浓度 0.4 mmol/L, 经过 8 h 诱导,酶活达到最大值.

本文通过构建工程菌,将缬氨酸转氨酶用于酶法合成氨基酸领域,结果表明该酶有一定应用价值.本研究为利用该类酶制备某些手性氨基酸提供了参考.

参考文献:

- [1] 严传鸣. 氟胺氰菊酯的合成[J]. 现代农药, 2003, 2(1):13.
- [2] 赵克健. 中国化学药品大全[M]. 2版. 北京: 新时代出版社, 1999.
- [3] 汤家芳, 刘芝兰, 肖玉秀, 等. 缬氨酸杀虫菊酯的合成[J]. 氨基酸和生物资源, 1998, 20(1):45.
- [4] 刘鹏飞, 刘西莉, 马安捷, 等. 精甲霜灵与外消旋体甲霜灵对掘氏疫霉菌的抑菌活性比较[J]. 农药学报, 2003, 5(3):45.
- [5] Suzuki H, Yamada C, Kato K. γ -Glutamyl compounds and their enzymatic production using bacterial γ -glutamyl-transpeptidase[J]. Amino Acids, 2007(32):333.
- [6] Banks J M, Yvon M, Gripon J C, et al. Enhancement of amino acid catabolism in Cheddar cheese using α -ketoglutarate: amino acid degradation in relation to volatile compounds and aroma character[J]. International Dairy Journal, 2001, 11(4-7):235.
- [7] Bartek T, Zönnchen E, Klein B, et al. Analysing overexpression of L-valine biosynthesis genes in pyruvate-dehydrogenase-deficient *Corynebacterium glutamicum* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2010, 37(3):263.
- [8] Wieschalka S, Blombach B, Eikmanns B J. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for the production of pyruvate[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 94(2):449.