

大豆异黄酮代谢途径在大肠杆菌中的构建及表达

Construction and Expression of the Soybean Isoflavonoid Biosynthetic Pathway in *Escherichia coli*

郝 佳¹, 马会勤², 代 茹², 陈尚武^{1*}

HAO Jia¹, MA Hui-Qin², DAI Ru² and CHEN Shang-Wu^{1*}

1 中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083

2 中国农业大学农学与生物技术学院 北京 100094

1 College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2 Department of Pomology, College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China

摘 要 自然界异黄酮合成途径主要存在于豆科植物中。以微生物为宿主研究异黄酮代谢,则需要将整个相关代谢途径的多酶体系组装到工程菌种,从而进行表达及代谢研究,这就需要用到多基因的转化和共表达技术。综合应用了多基因单载体和多基因多载体方法,将大豆异黄酮代谢途径中的五个关键酶基因导入到大肠杆菌中,对异黄酮代谢途径在大肠杆菌中的构建和表达进行了研究和探索,获得了含有五个外源基因的重组大肠杆菌,重组菌经 IPTG 诱导,以 L-酪氨酸为底物进行发酵,发酵产物经过 HPLC 测定,结果表明和空白对照相比有新的代谢产物生成,初步断定为异黄酮类化合物。

关键词 异黄酮代谢途径,多基因导引,重组菌

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)06-1022-07

Abstract The natural isoflavones biosynthetic pathway is only limited in legumes plant. To study the isoflavone in bacteria by metabolic engineering requires transformation of multi-gene of the whole pathway into the host strain to resembling the expression and metabolism of the genes. The multi-gene transformation and expression strategy become necessary because of this. This article talks about the multi-gene transformation strategy using one or many vectors, taking the five genes of isoflavonoid biosynthetic pathway to *E. coli*. The recombinant bacteria carry five genes with two vectors, the whole Isoflavonoid biosynthetic pathway was constructed into *E. coli*. Fermented with L-tyrosine as substrate and IPTG as an inducer, the recombinant bacteria can produce a new isoflavone related metabolite showed on HPLC analysis profile.

Key words isoflavonoid biosynthetic pathway, multi-gene transformation strategy, recombinant

自然界中,生物体某一代谢途径的中间或终端产物的形成通常需要一个多酶体系的参与才能完成。在代谢工程研究中,如何向宿主菌中同时转化和表达多个外源基因,是需要解决的具有重要应用价值的问题^[1]。多基因的组装与转化技术目前主要

分为两种,一种是多载体的共转化法^[2],即将外源基因构建在不同载体上,把多个重组载体导入受体细胞;另一种是多基因单载体的一次性转化法,即由一个载体携带多个基因到宿主细胞中。第二种方法又分为单启动子融和基因表达载体构建和多启动子多

Received: March 6 2007; Accepted: April 30 2007.

This work was supported by the grant from the National Natural Science Foundation of China(No. 30371005&39970469).

* Corresponding author. Tel: + 86-10-62731390; Fax: + 86-10-62731390; E-mail: swchen@cau.edu.cn

国家自然科学基金资助(No. 30371005&39970469)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

顺反子表达载体构建^[3]。

苯丙烷类代谢途径(phenylpropanoid pathway)是植物次生代谢途径中很重要的一条,产生木质素、花青素、芪类和黄酮类化合物等次生代谢物的共同代谢物中间体,对于植物抗性、植物品质以及人类的健康有重要的作用^[4]。大豆异黄酮代谢途径就是其中重要的一支,其代谢物大豆异黄酮是近年来备受关注的具有一系列保健功能的物质,其市场和未来的应用前景十分可观^[5]。大豆中的异黄酮的含量仅有0.1%~0.3%^[6],这一方面要求提取工艺的继续发展和完善,另一方面要求研究者去探索新的方法,以寻求异黄酮新的来源。现代基因工程的发展为此开拓了新的方法和思路,利用转基因技术构建工程菌发酵生产大豆异黄酮的研究具有重要意义。

异黄酮合成代谢途径由苯丙烷途径和异黄酮合成途径共同组成,主要存在于豆科植物^[7]。主要包括以下几个关键酶^[8]:苯丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸羟化酶(C4H)、4-香豆酸-辅酶A连接酶(4CL)、查耳酮合成酶(ChS)、查耳酮异构酶(Chi)和异黄酮合成酶(IFS)^[8]。具体途径如图1^[3,8]。

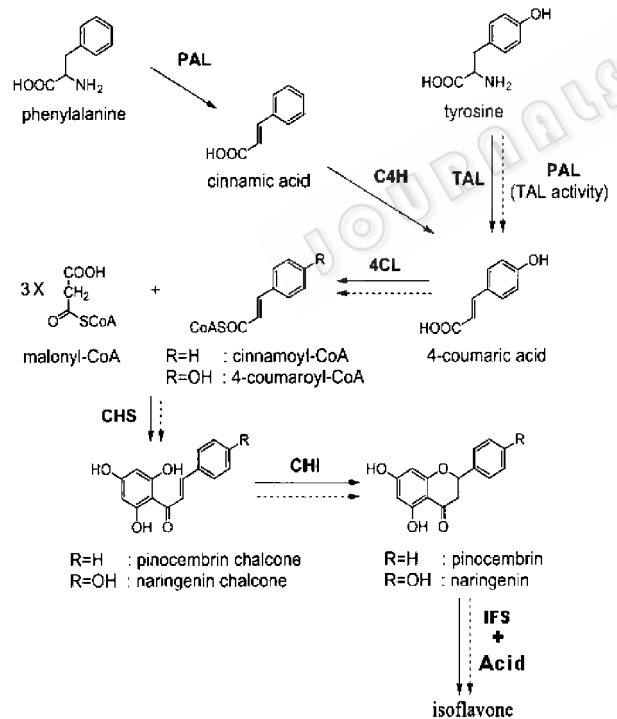


图1 异黄酮代谢途径示意图

Fig. 1 Isoflavonoid biosynthetic pathway

The dashed arrows represent the expected isoflavonoid biosynthetic pathway in *E. coli*; TAL: tyrosine ammonia-lyase.

在本研究中,采用多载体转化和单载体转化相结合的方法,将大豆异黄酮类代谢途径中五个关键酶基因(*pal* *Acl* *chs* *chi* *ifs*)由两个载体携带,成功的导入到大肠杆菌中;对重组菌进行发酵研究,

HPLC测定发酵产物检测到新的代谢产物,初步断定为异黄酮类物质。实验结果表明,本研究成功地实现了异黄酮代谢途径在大肠杆菌中的构建和表达,重组菌可以发酵L-酪氨酸生成异黄酮类物质,这为利用工程菌发酵生产大豆异黄酮打下了良好的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 基因:已连接到pMD-18T和pGEM-T-Easy上的*pal* *4cl* *chs* *chi* *ifs*基因由本试验室从我国栽培大豆基因组DNA和叶片cDNA文库中克隆^[9-11]。

1.1.2 质粒和菌种:质粒pGEM-T-Easy载体试剂盒(Promega公司);pMD-18T载体试剂盒(TaKaRa公司,大连);表达载体:pET-31b(+),pET-30a(Novagen, USA);大肠杆菌*E. coli* DH5 α 本实验室保存;大肠杆菌*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞(TIAGEN,北京)。

1.1.3 工具酶及其他试剂:限制性内切酶、T4 DNA Ligase、Ex Taq DNA聚合酶、dNTP、DL2000 DNA marker等(TaKaRa公司,大连);琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(Geneaid公司,台湾);质粒DNA小量提取试剂盒(道普科技公司,北京);染料木素、大豆甾元标品(慧科生物技术公司,西安);X-Gal、IPTG、氨苄青霉素等药品均为进口或国产生物试剂。

1.2 方法

1.2.1 pET-31b(+)载体改造:为了连接*4cl*基因,对pET-31b(+)载体进行了一定的改造^[12]。合成两条互补的寡核苷酸(图2),命名为DNC5,等摩尔退火,形成具有*Nsi*I和*Xho*I酶切后突出末端的双链;pET-31b(+)质粒用*Nsi*I和*Xho*I双酶切回收,与上述含突出末端的退火双链连接,转化测序。改造后的载体命名为pET-31b(+)C载体(图3)。

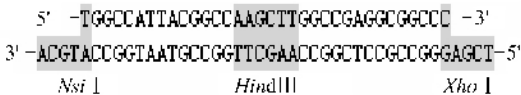


图2 载体改造互补寡核苷酸链

Fig. 2 The oligonucleotides for reconstructing the vector

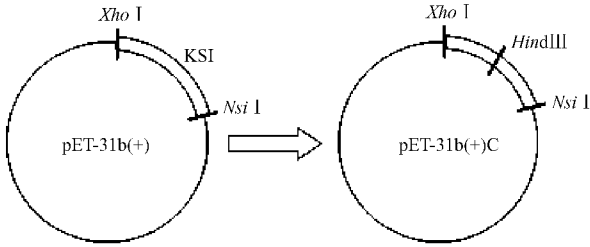


图3 pET-31b(+)改造示意图

Fig. 3 The process of reconstructing pET-31b(+)

1.2.2 单基因表达载体构建 :对每个基因设计带有酶切位点的引物 (表 1) ,PCR 扩增相应片段 ,与同样双酶切后的表达质粒连接。 *pal* 与 pET-30a 通过 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切为点相连 ;*4cl* 基因通过 *Hind* III 和 *Nde* I 位点与 pET-31b(+)C 连接 ;*chs*、*chi* 和 *ifs* 均通过和 *Xho* I 和 *Nde* I 位点与 pET-31b(+)连接。

表 1 用于 *E. coli* 单基因表达引物

Gene ,primer name	Primer sequence	Enzyme site
<i>pal</i> , PALF	TCT/GGATCC/GTATGGAAGCAACTAAT	<i>Bam</i> H I
<i>pal</i> , PALB	TTG/CTCGAG/TGT/CTCGAG/TGCATAG	<i>Xho</i> I , <i>Sal</i> I
<i>4cl</i> , 4CLF	GGGTCC/CATATG/ATAACTCTAGCTC	<i>Nde</i> I
<i>4cl</i> , 4CLB	GGC/AAGCTT/CAC TT/GGATCC/TCTA	<i>Hind</i> III , <i>Bam</i> H I
<i>chs</i> , CHSF	TT/CATATG/GTGAGCGTAGCTGAGATC	<i>Nde</i> I
<i>chs</i> , CHSB	A/CTCGAG/ATCTCAGATGGCCACACTGC	<i>Xho</i> I
<i>chi</i> , CHIF	TGGTTT/CATATG/GCAACGATCAG	<i>Nde</i> I
<i>chi</i> , CHIB	TGG/CTCGAG/AATTCAGACTATAATGC	<i>Xho</i> I
<i>ifs</i> , IFSF	CGGTTT/CATATG/TTCCTGGAAC	<i>Nde</i> I
<i>ifs</i> , IFSB	CGG/CTCGAG/TTAAGAAAGGAG	<i>Xho</i> I

1.2.3 共表达载体 pET-31b-4GS 的构建 :设计共表达引物(表 2) ,以 pET-31b(+)-CHS、pET-31b(+)-CHI 和 pET-31b(+)-IFS 为模版 ,PCR 扩增连接有 T7 启动子和相应核糖体结合位点(RBS)的各个基因 ,将 *chs* ,*chi* ,*ifs* 三个基因与 pET-31b-4CL 顺序连接^[3 13](图 4) 。最后构建为两个基因表达质粒 :pET-30a-PAL、pET-31b-4GS。进行 PCR 及酶切验证。

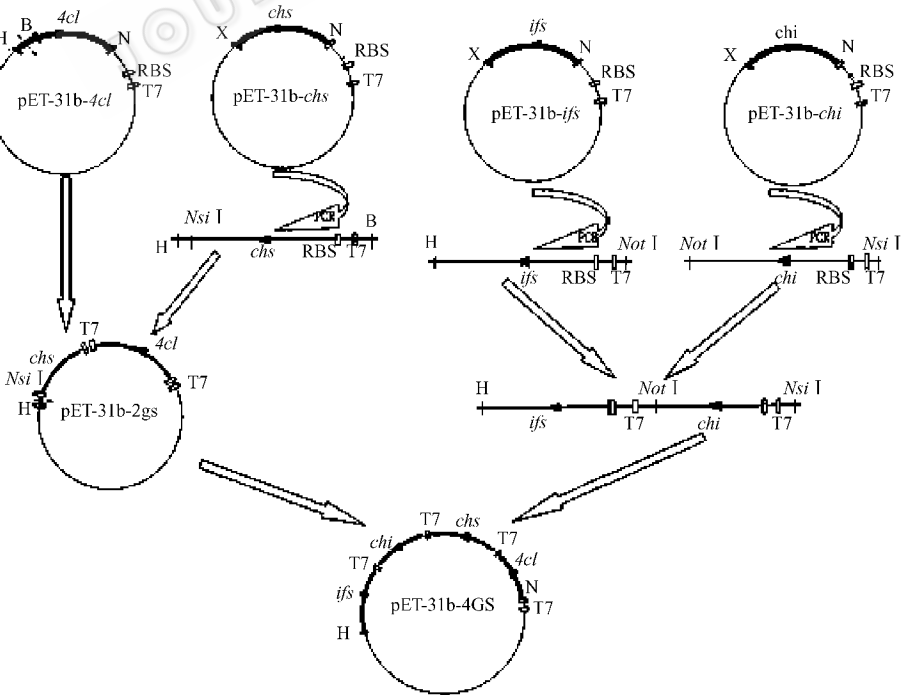


图 4 共表达质粒 pET-31b-4GS 构建示意图

Fig.4 The map of plasmid pET-31b-4GS for coexpression

表 2 共表达引物

Gene ,primer name	Primer sequence	Enzyme site
<i>chs</i> , CHScoF	CGC/GGATCC/AAT/TAATACGACTC	<i>Bam</i> H I
<i>chs</i> , CHScoB	GTC/AAGCTT/CTCT/ATGCAT/CAGATG	<i>Hind</i> III , <i>Nsi</i> I
<i>chi</i> , CHlcoF	CCA/ATGCAT/CGAAATTAATACG	<i>Nsi</i> I
<i>chi</i> , CHlcoB	TATTT/GCGGCCGC/TTCAGACTAT	<i>Not</i> I
<i>ifs</i> , IFScoF	ATTAA/GCGGCCGC/AATTAATACG	<i>Not</i> I
<i>ifs</i> , IFScoB	GCG/AAGCTT/GAGTTAAGAAAGGA	<i>Hind</i> III

1.2.4 pET-30a-PAL 和 pET-31b-4GS 共转化 *E. coli* BL21(DE3)及验证 :将等摩尔的 pET-30a-PAL 和 pET-31b-4GS 共转化化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞 ,在含有 100mg/L 氨苄青霉素及 50mg/L 卡那霉素的双抗性 LB 平板上筛选阳性共转化子。挑取单克隆以 PALF/PALB 和 IFScoF/ IFScoB 为引物做菌落 PCR ,验证 *pal* 基因和 *ifs* 基因在单克隆中的共存 ;同时 ,将单克隆接种到含有 100mg/L 氨苄青霉素及 50mg/L 卡那霉素的双抗性液体 LB 培养基中 ,过夜培养 ,提取质粒 ,电泳验证。

1.2.5 CHS 蛋白的表达验证及 MALDI-TOF/TOF 质谱分析 :对 CHS 蛋白进行表达验证。将 pET-31b-CHS 转化到 *E. coli* BL21(DE3)中 ,在含有 100mg/L 氨苄青霉素的 LB 平板上筛选阳性转化子。挑取单菌落进行验证后转入到含有 100mg/L 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中 ,37℃振荡培养 16h ,当 $OD_{600} = 0.9 \sim 1.0$ 时 ,以 1:200 比例接种于新鲜的含抗生素的培养基中 ,37℃振荡培养 3 ~ 5h 进行扩增 ,取 1mL 菌液

作为诱导前对照,然后加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG,在 37℃ 振荡培养中诱导工程菌表达 7h。以 *E. coli* BL21(DE3)及经 pET-31b 空载体转化的 BL21 (DE3)菌株培养物为阴性对照,作蛋白质表达水平 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检查。

切取 SDS-PAGE 胶上特异性表达条带,胰蛋白酶酶解后采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Mass Spectrometry, MALDI-TOF/TOF)测得肽质量指纹谱(PMF),以在数据库中查询识别的方式对表达的特异性蛋白条带进行鉴定^[10]。本实验采用仪器为德国 Autoflex MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics Inc);反射检测方式;飞行管长 3m;氮激光器,波长 337nm。

1.2.6 重组菌株的表达及发酵研究 将共转化菌株及空白对照菌株在 LB 培养基中预培养过夜,取其中 50μL 转接到 15mL 含 50mg/L 氨苄青霉素及 25mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中。26℃,120r/min 培养至 OD₆₀₀ = 0.7。在每支试管中加入 IPTG 至终浓度 1mmol/L,26℃,180r/min 振荡培养 7h。取出诱导菌,4500r/min 离心 8min 收集菌体,用 M9 培养基清洗 2 次。将所得菌体转入 15mL 的 M9 培养基中,加入 3mmol/L 的 L-酪氨酸,1mmol/L 的 IPTG,50mg/L 氨苄青霉素及 25mg/L 卡那霉素,26℃ 培养发酵 65h^[13-15]。

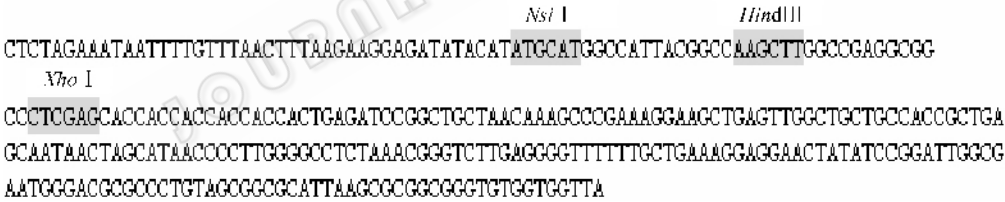


图 5 pET-31b(+) 测序结果
Fig. 5 The result of sequencing for pET-31b(+)

2.2 单基因表达载体构建结果及分析

五个基因分别与表达载体连接后,转化 *E. coli* BL21(DE3),培养后提取质粒。分别用相应内切酶做双酶切,酶切结果如图 6。酶切得到了与各基因大小一致的目标片段,证明各表达载体构建是成功的。

2.3 共表达载体构建结果及分析

将构建的 pET-31b-4GS 质粒转化到 *E. coli* BL21 (DE3)菌株中,在含有 Amp 抗性的 LB 平板上进行筛选,挑取单克隆到有 Amp 抗性的 LB 液体培养基中,过夜培养提取质粒。质粒用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切,酶切结果如图 7。因为四个基因前面均连接有 *Hind* III 位点,所以应得到 4 个相应大小的片段,结果显示与预期一致: *4cl* 1.8kb; *chs* 1.3kb; *chi* 0.75kb; *ifs* 1.7kb。结果说明, pET-31b-4GS 的构建是成功

的。取出发酵后菌液,用 6mol/L 的 HCL 调 pH 至 3.0,室温放置 1h。在其中加入 1:1 的乙酸乙酯进行萃取,静置 2h 后离心取上层有机相,在下层溶液里面再加入 3:2 的乙酸乙酯进行萃取,离心后取上清与前一次的上清合并,共约 20mL。用旋转蒸发器将有机相蒸干,加 750μL 甲醇溶解蒸干后的剩余物,保存备用。

采用高效液相色谱法测定发酵提取物^[3,14,15]。以 98% 的染料木素和 2% 的大豆甾元作为标品。高效液相色谱的条件是:色谱柱, ODS C18 柱(150mm × 2.1mm × 5m);流速, 1mL/min;柱温, 25℃;检测波长, 254nm;流动相, 0.1% 乙酸溶液(A)和乙腈(B);梯度洗脱: 0 ~ 6min, 100% A; 6 ~ 10min, 75% A, 25% B; 10 ~ 20min, 64.2% A, 35.8% B; 20min ~ 25min, 100% A。

2 结果与分析

2.1 pET-31b(+) 载体改造结果及分析

连接了 DNC5 片段的 pET-31b(+),经过转化、提取质粒 pET-31b(+) C,用 *Hind* III 可以切开,送样测序结果如图 5。原 pET-31b(+) 质粒不含 *Hind* III 位点,而改造后 pET-31b(+) C 可以用 *Hind* III 切开,说明正确插入了 DNC5 片段,测序结果也进一步证明 pET-31b(+) C 载体构建是成功的。

的。

2.4 共转化结果

将共转化的 BL21 菌株涂在含 Km 和 Amp 双抗的 LB 平板上,过夜培养,挑取单克隆直接进行菌落 PCR:以 PALF/PALB 为引物 PCR 验证 pET-30a-PAL 的导入;以 IFScoF/ IFScoB 为引物 PCR 验证 pET-31b-4GS 的导入。PCR 结果如图 8,得到 2.1kb 大小的片段,与 *pal* 大小一致,得到 1.7kb 大小的片段,与 *ifs* 大小一致。同时,将单克隆挑取到含双抗的 LB 液体培养基中,一株过夜培养,一株培养 50h,提取质粒。质粒电泳结果如图 9,显示所提取的为双质粒,且大小与 pET-30a-PAL 和 pET-31b-4GS 大小一致。由此可以说明, pET-30a-PAL 和 pET-31b-4GS 两个质粒同时导入 BL21 菌株是成功的,且在含有 Km 和 Amp 双抗的培养基中可以较长时间保持这两种质粒

的共存。

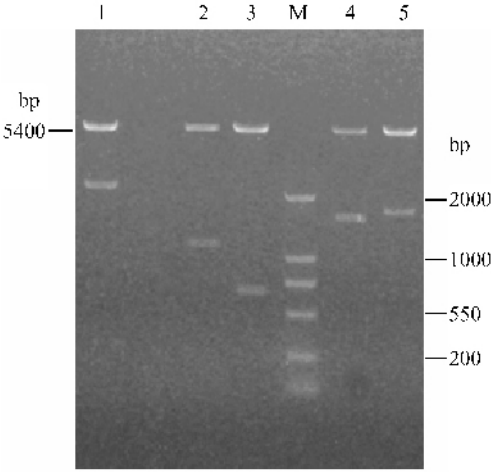


图6 各单基因表达载体酶切结果

Fig. 6 The results of restriction enzyme analysis of single genes expression

M: marker DL2000; 1: pET-31b-PAL; 2: pET-31b-CHS; 3: pET-31b-CHI; 4: pET-31b-IFS; 5: pET-31b-4CL.

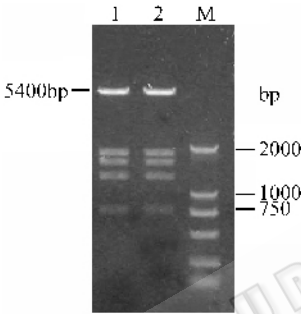


图7 pET-30a-4GS酶切结果

Fig. 7 The result of restriction enzyme analysis of pET-31b-4GS

M: marker DL2000; 1: 2 pET-31b-4GS.

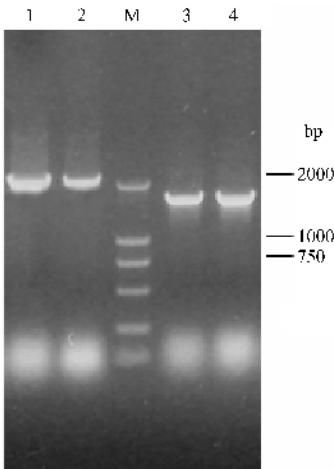


图8 共转化菌落PCR结果

Fig. 8 The results of colony PCR for cotransformation *E. coli* maker DL2000; 1, 2: PCR amplification product with primers PALF, PALB; 3, 4: PCR amplification product with primers.

2.5 CHS蛋白的 SDS-PAGE 分析及质谱分析结果
以 *E. coli* BL21(DE3) 和经 pET-31b(+) 质粒转

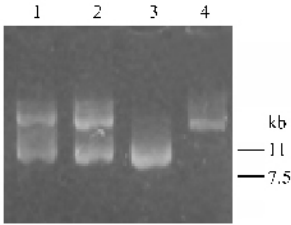


图9 共转化质粒提取结果

Fig. 9 The plasmids extracted from the cotransformation *E. coli* 1: 2 plasmids extracted from the cotransformation strains (1: overnight 2, 50h); 3: pET-30a-PAL; 4: pET-31b-4GS.

化的 BL21(DE3) 为对照, 与转化了 pET-31b(+) -CHS 质粒的 *E. coli* BL21(DE3) 工程菌在同等条件下培养、诱导表达、裂解后进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 10。根据 GenBank 中大豆 *chs* 全基因可以翻译出 390 个氨基酸, 分子量为 13.1kD。含 pET-31b(+) -CHS 质粒的 *E. coli* BL21(DE3) 工程菌经诱导后蛋白质抽提物在分子量 45kD 和 35kD 间, 出现一条明显的特异蛋白质表达条带, 表达产物的分子量约为 43kD, 与理论值一致。

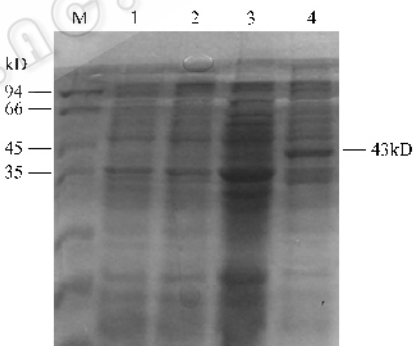


图10 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 10 SDS-PAGE analysis of the expressed products M: protein molecular weight marker; 1: *E. coli* BL21 control; 2: *E. coli* BL21/pET-31b(+) vector control; 3: *E. coli* BL21/pET-31b(+) -CHS culture without IPTG induction; 4: *E. coli* BL21/pET-31b(+) -CHS culture after IPTG induction.

对特异性条带进行蛋白采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Mass Spectrometry, MALDI-TOF-MS)测得肽质量指纹谱(PMF)在数据库中查询识别的方式鉴定蛋白质, 得出的肽段匹配图(图 11A)和定性分析得到的蛋白匹配分值图(图 11B)。从图中可以看出测定的目的蛋白与 NCBI 上大豆查尔酮合成酶(CHS)蛋白的匹配分值为 84, 大于系统的匹配分值 67 ($P < 0.05$), 可以证明本实验表达的特异性蛋白是大豆查尔酮合成酶(CHS)蛋白。另外, 苯丙氨酸解氨酶基因的表达产物也得到鉴定^[9]。

2.6 发酵结果分析

对重组菌的发酵提取物进行高效液相色谱测定, 以没有转化质粒的 BL21 空白菌株阴性对照, 以

Mascot Search Results

Protein View

Match to: gi|29293718 Score: 133 Expect: 1.4e-08
chalcone synthase [Glycine max]
Nominal mass (M_r): 42814; Calculated pI value: 6.14
NCBI BLAST search of gi|29293718 against nr
Cleavage by Trypsin/P: cuts C-term side of KR
Number of mass values searched: 54
Number of mass values matched: 17
Sequence Coverage: 47%
Matched peptides shown in Bold

1 MWSVAEIRQA QRAEGPATIL AIGTANPPNC VAQSTYPDYY FRITNSEHIT
51 ELKEKPRQMC DKSMIKRRY YLNEEILKEN PNCATMAPS LDARQDNVVV
101 EVPELGKEAA VEAKEWQGP KSKITHLIPC TTSGVDMPGA DYQLTKQLGL
151 RPYVKRYNNY QQCFAGGTV LRLAEDLAEN NEGARVLYVC SEITAVIFRG
201 PSDTHLDSLQ GQALPGDGAA AVIWGSDPIP QVEKPLYELV WTAQTIAPDS
251 EGAIDGHLRE WGLTFHLLK VPGIVSKNID KALFEAFNPL NISDYSIFW
301 IAHGGGPAIL DQVEKQLGLK PEKMEKTRDV LSEYGNSSA CVLFILDEIR
351 RKSAEGLKT TGEGLWGV LFGPGGLTIE TVVLRSAVI

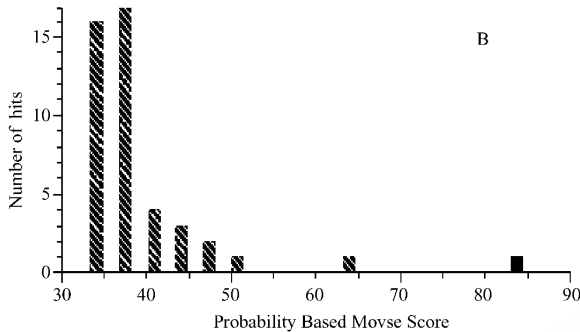


图 11 MALDI-TOF/TOF 鉴定 pET-31K(+)CHS 菌株表达产物

Fig.11 MALDI-TOF/TOF identification of expressed protein from pET-31K(+)CHS host strain

A the matched peptides from the trypsin digested protein band by PMF
Mascot search ;B the map protein scores is 84 for the gi|29293718.

染料木素(Genistein)和大豆甾元(Daidzein)为标准样品。液相图谱如图 12。结果表明 ,相对与阴性对照 在 14.5min 时样品出现明显的新峰。同时标品大豆甾元保留时间为 14.1min ,染料木素保留时间为 16.5min。可见样品新峰与大豆甾元和染料木素保留时间接近 ,且峰形一致 ,初步可以断定该新物质为大豆异黄酮类物质。这说明经过诱导的重组菌进行了有效的表达 ,可以发酵 L-酪氨酸产生大豆异黄酮物质 ,也证明以上的载体构建、多基因转化等工作都是成功的。

3 讨论

3.1 多基因导引的方法

本研究要将 5 个相关基因导入到大肠杆菌中进行表达代谢研究 ,因为基因数目比较多 ,所以综合考虑了单个质粒携带多个基因的方法和多个质粒共同导入的方法。经过酶切位点的巧妙设计和导入策略的探索 ,成功的将 5 个基因由两个质粒导入到了菌株中。而且在各个基因接入质粒之前先进行了单质

A

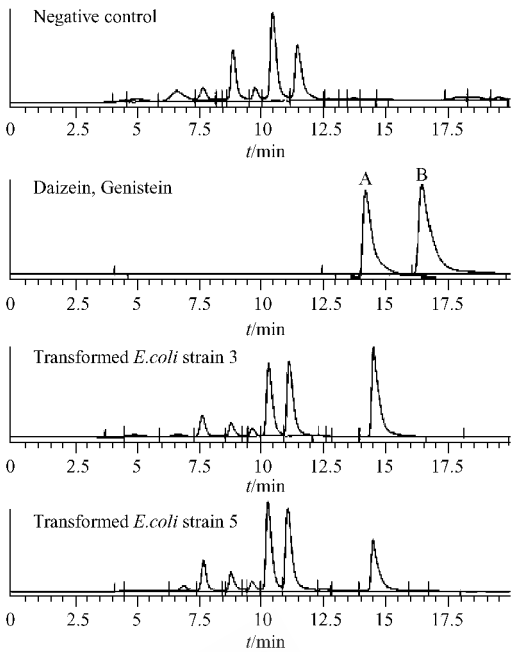


图 12 重组工程菌发酵产物 HPLC 分析结果

Fig. 12 HPLC analysis of products of engineered E. coli

A : standard sample-Daidzein ; B : standard sample-Genistein.

粒表达载体的构建 ,使每个基因之前都连接上了相应的启动子和核糖体结合位点 RBS ,然后设计共表达引物从启动子开始 PCR 扩增 ,回收并连接。这就使最后构建的多基因表达载体上各个基因都带有各自的启动子和核糖体结合位点 ,这为后续高效表达研究奠定了基础。

3.2 表达质粒的选择

一般认为同源性质粒因为具有相同的复制子在同一菌株中不能共存 ,多质粒共转化的研究一般采用非同源性质粒^[2,18]。但是也有研究证明 ,具有不同抗性的同源性质粒在双重选择压力下可共存 ,并且在一定时间内保持稳定^[19,20]。本研究选择同源性质粒 pET-30a 和 pET-31K(+)二者具有相同的启动子 ,具有同样的诱导表达方式 ,有利于载体上的多个基因同时进行诱导和表达。而且通过试验表明 ,在一定条件下二者稳定共存的时间较长 ,足够进行代谢及发酵研究。

3.3 苯丙氨酸解氨酶(PAL)的 TAL 活性

肉桂酸羟化酶(C4H)具有不稳定性 ,且其作用需要专一的细胞色素 P450 还原酶辅助 ,所以几乎不可能实现有活性的 C4H 的表达^[16] ;同时 ,有研究表明 ,一些 PAL 同时具有酪氨酸解氨酶(TAL)活性 ,可以作用酪氨酸使其脱氨参与生物反应^[3,17]。利用这一点这样可跳过 C4H 这个障碍 ,不妨碍代谢途径的正常进行。基于以上原因 ,本研究在进行发酵研究时 ,也跳过了 C4H 一步 ,利用 PAL 直接作用酪氨酸

这一旁路来完成异黄酮的合成(图1虚线所示)。从基因工程细菌的表达代谢结果看,大豆 PAL 也具有酪氨酸解氨酶活性,可以使酪氨酸脱氨,参与后面反应生成异黄酮类物质。这也证明,在大肠杆菌中构建的异黄酮代谢途径实现了由酪氨酸产生异黄酮的代谢过程。

3.4 表达体系的验证

为了保证表达体系及基因序列的正确性,选择性的对5个基因的蛋白质表达进行了验证。对PAL进行重组表达和活性鉴定,得到了酶比活力达到3529 μ kat/kg的粗酶液^[9];上述的CHS表达验证结果表明,表达体系可以正确表达大豆查尔酮基因,表达产生的CHS酶也具有相应活性^[11]。所以,所采用的表达体系是正确的、高效的,这为共表达的成功奠定了基础。

3.5 重组菌株的发酵表达

通过转基因技术使工程菌代谢产生黄酮类物质是近年来国外研究的一个热点,所利用的工程菌主要是大肠杆菌^[3,14]、酵母菌^[15,21]。已报道的相关研究所用的各基因都来源于不同物种,都没有实现完整大豆异黄酮代谢途径在工程菌中的构建。本研究通过多基因转化技术,将整个异黄酮代谢途径中的几个关键酶同时导入到大肠杆菌中,所有基因都来源于大豆叶片。构建的工程菌具有发酵L-酪氨酸生成新物质的能力,所得的新物质通过HPLC鉴定可以初步认为是大豆异黄酮类物质。利用质谱等技术对代谢产物的进一步鉴定实验还在进行中。另外,在高效发酵菌株的筛选以及发酵工艺和提取工艺优化的研究方面,还需要大量的工作。

REFERENCES(参考文献)

[1] Cao HQ(曹慧青), Ding JK(丁金凤). The constructing strategy of coexpression vector with multi-gene. *Journal of Medical Molecular Biology*(国外医学分子生物学手册) 2002, **24**(1): 1-4.

[2] Effendi L, Yan YJ, Koffas M. Functional expression of a hydroxylase for the biosynthesis of a plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 2006 **8**: 172-181.

[3] Eui II H, Masafumi K, Yasuo O, et al. Production of plant-specific flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(5): 2699-2706.

[4] Brenda WS. Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. *Physiologia Plantarum*, 1999, **107**: 142-149.

[5] Dixon RA, Ferreira D. Molecules in interest genistein. *Phytochemistry*. 2002 **60**: 205-211.

[6] Song T, Barua K, Buseman G, et al. Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. *American Society for Clinical Nutrition*, 1998 **12**(68): 1474-1479.

[7] Jung W, Yu O, Lau SC, O'Keefe DP, Odell J, Fader G, McGonigle B. Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. *Nature Biotechnology*, 2000 **18**: 208-212.

[8] Tian L, Dixon RA. Engineering isoflavone metabolism with an artificial bifunctional enzyme. *Planta*, 2006, **224**: 496-507.

[9] Song X(宋束), Ma HQ(马会勤), Chen SW(陈尚武), et al.. Expression and activity assay of recombinant phenylalanine ammonia lyase of *Glycine max* L. in *E. coli*. *Food Science*(食品科学), 2006 **27**: 29-35.

[10] Griffin PR, MacCoss MJ, Eng JK, Blevins RA, Aaronson JS, Yates JR 3rd. Direct database searching with MALDI-PSD spectra of peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1995, **9**(15): 1546-1551.

[11] Niu TM(牛天敏), Ma HQ(马会勤), Chen SW(陈尚武). Cloning and expression of chalcone synthase(CHS) of *Glycine max* L and analysis of it metabolize produce in the extracts from *Saussurea* spp. *China Biotechnology*(中国生物工程杂志), 2007 **27**: 58-63.

[12] Xiong S(熊盛), Lin J(林剑), Yao RH(姚汝华), et al. Construction and application of a pET3c derivative. *Pharmaceutical Biotechnology*(药物生物技术) 2001 **8**(1): 4-7.

[13] Yan YJ, Joseph C, Mattheos AG, et al. Metabolic engineering of anthocyanin biosynthesis in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 2005 **71**(7): 3617-3623.

[14] Miyahisa I, Kaneko M, Horinouchi S, et al. Efficient production of (2S)-flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial biosynthetic gene cluster. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2005, **68**: 498-504.

[15] Katsuyama Y, Miyahisa I, Horinouchi S, et al. One-pot synthesis of genistein from tyrosine by coinubation of genetically engineered *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied Microbiology Biotechnology* 2007 **73**: 1143-1149.

[16] Hotze M, Schroder G, Schroder J. Cinnamate 4-hydroxylase from *Catharanthus roseus*, and a strategy for the functional expression of plant cytochrome P450 proteins as translational fusions with P450 reductase in *E. coli*. *FEBS Lett*, 1995, **374**: 345-350.

[17] Rosler J, Krekel F, Amrhein N, et al. Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. *Plant Physiol*, 1997, **113**: 175-179.

[18] Wang H, Chong S. Visualization of coupled protein folding and binding in bacteria and purification of the heterodimeric complex. *Proceedings of National Academic Science USA*, 2003, **100**: 478-831.

[19] Yang W(杨巍), Zhang L(张岚), Lu ZG(卢智刚), et al. Coexpression of DNA fragmentation factor subunits in *E. coli* by two incompatible plasmids. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*(生物化学与生物物理学报) 2001 **33**: 238-2421.

[20] Fan LQ(范立强), Yuan QS(袁勤生), Wu XF(吴祥甫). Coexpression of *caiB* and *caiE* with two plasmids in *E. coli*. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*(生物化学与生物物理学报), 2002 **34**: 104-1081.

[21] Yan Y, Kohli A, Koffas M. Biosynthesis of natural flavanones in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*,