

大肠杆菌 *mtlD* 基因和 *gutD* 基因的克隆、 全序列测定和高效表达

刘俊君 彭学贤 王海云 莽克强

(中国科学院微生物研究所植物生物工程实验室 北京 100080)

摘 要 使用指示性培养基,筛选含有正常甘露醇操纵子和山梨醇操纵子的大肠杆菌菌株。从细菌染色体 DNA 中,通过多聚酶链式反应(PCR)扩增出 1-磷酸甘露醇脱氢酶基因(*mtlD*)和 6-磷酸山梨醇脱氢酶基因(*gutD*)。将它们分别克隆至载体 pBluescript SK 或 KS 以后,完成了这两个基因 DNA 的全序列分析。序列测定结果表明:所克隆的 *mtlD* 基因除编码区第 96 位密码子由 GCA 变成了 GCT 之外,其它序列与所报道的修正序列一致;所克隆的 *gutD* 基因除 3' 端非编码区缺失一个碱基 C 之外,基因全序列与文献报道一致。完成此两个基因的大肠杆菌高效表达载体的构建之后,表达的 1-磷酸甘露醇脱氢酶和 6-磷酸山梨醇脱氢酶分别占菌体可溶性蛋白的 24.79% 和 29.38%。

关键词 1-磷酸甘露醇脱氢酶基因(*mtlD*), 6-磷酸山梨醇脱氢酶基因(*gutD*), 序列分析, 基因表达, 大肠杆菌

大肠杆菌对不同的己糖醇的代谢具有相似的过程。第一步是己糖醇的跨膜吸收和磷酸化,由依赖于磷酸烯醇式丙酮酸的糖磷酸转移酶体系(PTS)来完成;第二步是磷酸己糖醇转化为糖醇解的中间产物 6-磷酸果糖,由相应的磷酸己糖醇脱氢酶来完成。涉及这两个步骤的酶类由大肠杆菌染色体 DNA 上的各种己糖醇操纵子(如甘露醇操纵子、山梨醇操纵子等)所编码^[1]。在大肠杆菌中,1-磷酸甘露醇脱氢酶(E. C. 1. 1. 1. 17)和 6-磷酸山梨醇脱氢酶(E. C. 1. 1. 1. 140)分别导致甘露醇和山梨醇的氧化、分解。最近发现将大肠杆菌 1-磷酸甘露醇脱氢酶基因(*mtlD*)转化烟草,它的表达导致原来不含有甘露醇和 1-磷酸甘露醇脱氢酶的烟草获得了合成和积累甘露醇的能力^[2],从而使得转基因植物表现出强的耐盐性^[3]。因此,细菌的这类糖醇脱氢酶基因的克隆、表达和植物转化,不但对于研究糖醇在不同生物体内的代谢途径,而且对于研究糖醇本身的生物学作用均有重要的意义。

本文报道大肠杆菌 1-磷酸甘露醇脱氢酶基因(*mtlD*)和 6-磷酸山梨醇脱氢酶基因(*gutD*)的克隆和全序列分析,并且首次获得此两个基因的大肠杆菌高效表达。这为深入探索这两个基因在高等植物体内的功能及其相互作用打下了基础。

1 材料与方法

1.1 菌种与质粒

大肠杆菌 K12 菌株(BR141)为 *mtlD* 基因和 *gutD* 基因的来源菌种。大肠杆菌 DH5 α 、JM107 菌株为克隆时重组质粒的受体菌。克隆和测序载体为 pBluescript KS 或 SK。基因

表达载体 pBV220^[4]的衍生质粒 pBV221 由中国预防医学科学院病毒学研究所侯云德教授惠赠。

1.2 生化试剂

各种限制酶, TaqDNA 聚合酶, T4DNA 连接酶等购自 Promega 公司或华美公司。T7DNA 聚合酶序列分析试剂盒和 Base Master DNA 序列分析试剂盒购自 Pharmacia 公司。 α -³⁵S-dATP、 α -³²P-dATP、 α -³²P-dCTP 为 NEN 产品。PCR 引物由中国科学院微生物研究所技术室合成。

1.3 菌种鉴定和细菌染色体 DNA 的提取

用 Bochner 指示培养基^[5]鉴定菌种中甘露醇操纵子、山梨醇操纵子的存在。挑选指示性平板上红色菌落, 接种于 LB 液中, 培养过夜后收集菌体。用适量 TE 悬浮以后, 加溶菌酶至 1 μ g/ml, 37℃ 保温 30 分钟。再加 SDS 至 1.2%, 37℃ 处理 30 分钟。然后酚抽提, 酒精沉淀回收细菌染色体 DNA。

1.4 目的基因的 PCR 合成和克隆

根据已报道的 mtl 操纵子序列^[6]和 mtlD 基因的修正序列^[7], 设计 mtlD 基因 PCR 扩增反应的两个引物:

5'端引物: 5'AGGATCCATGAAAGCATTACATTTTGGCG 3'

3'端引物: 5'TGTCGACATTATTGCATTGCTTTATAAGC 3'

根据文献[8]设计 gutD 基因 PCR 扩增反应的两个引物:

5'端引物: 5'AGGATCCATGAATCAGGTTGCCGTTGT 3'

3'端引物: 5'TGTCGACGGAAGTCCTGTATGCCTG 3'

为了便于进一步双元载体的构建, 在此两对引物的 5'引物和 3'引物分别引入了 BamHI 和 SalI 限制酶位点。

取适量细菌染色体 DNA, 95℃ 预变性 5 分钟以后, 用作 PCR 的模板。此两个基因的 PCR 反应条件均为: 94℃ 30 秒, 58℃ 30 秒, 72℃ 90 秒, 循环 30 周期。PCR 产物经琼脂糖电泳检查以后, 平头连接到 pBluescript KS 或 SK 载体的 EcoRV 位点内。在含 IPTG 和 X-gal 的氨苄 LB 平板上, 筛选白色重组克隆。

1.5 DNA 序列分析

根据 mtlD 基因和 gutD 基因的限制酶图谱, 制作亚克隆, 按常规双脱氧链终止法对 DNA 进行双链碱基序列测定。

1.6 大肠杆菌表达分析

将 mtlD 基因或者 gutD 基因的重组阳性菌种 DH5 α 接种于 LB 液中, 30℃ 培养过夜。次日扩大培养至 OD₆₀₀ 值约 0.5, 升温至 42℃ 培养 3—4 小时, 离心收获菌体, 用样品处理缓冲液(SB)悬浮, 100℃ 处理 3—4 分钟。用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离、鉴定基因的表达产物。用考马斯亮蓝染色, 薄层扫描确定各条带的含量。

2 结果与讨论

2.1 基因的合成、克隆和全序列测定

含有正常甘露醇操纵子和山梨醇操纵子的大肠杆菌菌株, 在含有甘露醇或山梨醇的

Bochner 指示性培养基上产生红色菌落。以其染色体 DNA 为模板,按所设计的反应条件进行 PCR 扩增。0.8%琼脂糖凝胶电泳分析表明:用 mtlD 基因两个引物扩增的 DNA 片段长约 1.15kb(见图 1B);用 gutD 基因两个引物扩增的 DNA 片段长约 0.88kb(见图 1A)。这两种扩增 DNA 片段的大小与引物设计时的预期值高度一致。将 1.15kb 片段平头插入到 pBluescript SK 的 EcoRV 位点,获得重组质粒 pMTD。将 0.88kb 扩增片段平头连接到 pBluescript KS 的 EcoRV 位点,获得重组质粒 pGUD。对 pMTD 和 pGUD 进行限制酶图谱分析,mtlD 基因和 gutD 在载体中的插入方向和酶谱如图 2 所示。

为了保证 mtlD 基因序列分析完全准确无误,利用基因内的 KpnI 和 SphI 位点,制备 mtlD 基因片段的三个亚克隆(见图 2),并

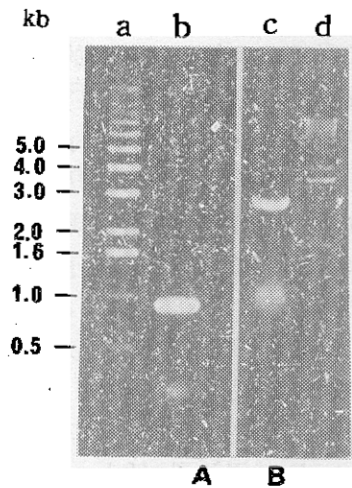


图 1 mtlD 和 gutD 基因 PCR 产物的电泳图
Fig. 1 Electrophoresis of PCR products from mtlD and gutD genes
a,d;1kb ladder molecular standards
b;PCR product of gutD gene
c;PCR product of mtlD gene

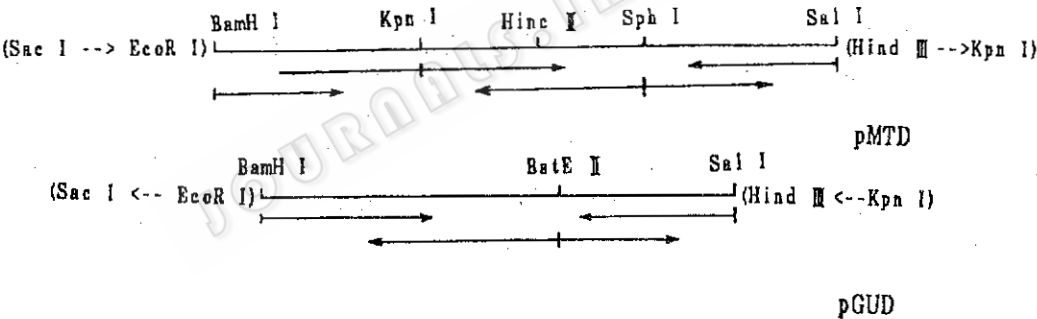


图 2 重组质粒 pMTD 和 pGUD 的测序策略

Fig. 2 Sequencing strategies of recombinant plasmids pMTD and pGUD

The polylinker sites of the vectors are shown in the parenthesis

对其进行 DNA 序列分析。mtlD 基因序列测定表明:此基因开放阅读区全长 1146bp,编码 382 个氨基酸。与国外报道 mtlD 基因的操纵子序列^[6]以及随后报道的 mtlD 基因修正序列^[7]进行比较,结果表明本文克隆的 mtlD 基因序列与国外报道的 mtlD 基因修正序列基本一致,仅第 96 位密码子由 GCA 变成了 GCT,其编码的氨基酸未变。因此,本工作进一步验证了所报道的 mtlD 基因修正序列的正确性。

利用 gutD 基因内部的 BstE II 位点,制备两个亚克隆(见图 2),完成了 gutD 基因双链 DNA 的全部碱基序列测定。序列分析结果显示:gutD 基因的开放阅读框架全长 777bp,编码 259 个氨基酸。所克隆的 gutD 基因的编码区序列与文献[8]报道一致,但在基因 3' 端非编码区内,终止密码 TAG 之后的第 31 位碱基 C 发生缺失。这一碱基的缺失

并不影响所克隆基因的进一步遗传操作。

2.2 大肠杆菌高效表达载体的构建及其表达分析

磷酸己糖醇脱氢酶基因在大肠杆菌的己糖醇操纵子中,都远离操纵子本身的启动子。因此,所克隆的 *mtlD* 基因和 *gutD* 基因均没有自己的启动子。为了获得 *mtlD* 基因和 *gutD* 基因的大量表达产物,分别构建了这两个基因的大肠杆菌高效表达载体。表达载体 pBV221 是 pBV220^[4] 的衍生质粒,除插入外源基因的多酶位点以外,结构与 pBV220 一致。它包括串联的 P_{RPL} 启动子,根据计算机设计人工合成的 SD 序列, λ 噬菌体阻遏蛋白温度敏感突变型 CIts857 基因,以及大肠杆菌 *rrnB* 核糖体基因转录终止信号 *rrnBT1T2*。BamHI 酶切 pMTD、补平切口之后,再用 SalI 酶切获得 *mtlD* 基因片段。先用 EcoRI 酶切 pBV221、补平切口之后,再用 SalI 酶切获得切开的空载 pBV221,将来源于 pMTD 的 *mtlD* 基因片段插入其中,得到 *mtlD* 基因的表达载体 pBVM。通过 EcoRI/SalI 从 pGUD 中切出 *gutD* 基因片段,插入 pBV221 对应的 EcoRI/SalI 位点,得到 *gutD* 基因的表达载体 pBVG。在这两个表达载体中,目的基因位于串联的双启动子 P_{RPL} 的下游,从前面的序列分析可知,核糖体识别位点 SD 序列到目的基因起始密码 ATG 之间的距离,在 pBVM 中为 9bp,在 pBVG 中为 15bp。这样,在 pBVM 和 pBVG 中,保证了目的基因高效表达所必需的强启动子,典型的 SD 序列以及 SD 序列至起始密码的适当距离。这些因素为 1-磷酸甘露醇脱氢酶和 6-磷酸山梨醇脱氢酶在大肠杆菌中的大量合成提供了有利的条件。

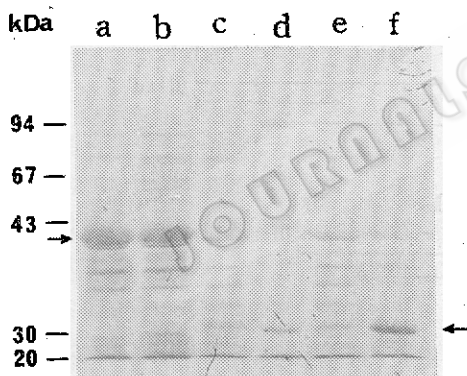


图3 重组质粒 pBVM 和 pBVG
在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of recombinant
plasmids pBVM and pBVG expression
in *E. coli*

Arrows indicate the expression products.

a, b; pBVM in DH5 α , c, e; pBV221 in DH5 α ,

d; Molecular standards (kDa: 94, 67, 43, 30, 20),

f; pBVG in DH5 α

从基因序列推导出的 1-磷酸甘露醇脱氢酶理论分子量约为 41.221kDa, 6-磷酸山梨醇脱氢酶的理论分子量为 27.886kDa。SDS-PAGE 分析表明:在大肠杆菌受体菌中,经过 42℃ 热诱导之后, pBVM 产生的 1-磷酸甘露醇脱氢酶分子量约为 41kDa (见图 3); pBVG 产生的 6-磷酸山梨醇脱氢酶的分子量约为 28kDa (见图 3)。二者均与理论分子量高度一致。薄层扫描结果表明:表达的 1-磷酸甘露醇脱氢酶和 6-磷酸山梨醇脱氢酶分别占菌体可溶性蛋白的 24.79% 和 29.38%。SD 序列至 ATG 的这一段序列是决定翻译效率的重要因素之一^[9]。因此, *mtlD* 基因和 *gutD* 基因在 pBV221 载体的表达效率的差别很可能与 SD 序列至 ATG 的不同距离和不同碱基组成有关。另外,采用酶

切补平方法构建 pBVM, 是为了消除 *mtlD* 基因起始密码 ATG 之前的另外一个 ATG 三联体, 否则以靠近 SD 序列的第一个 ATG 开始翻译, 造成移码突变, 无法产生正常的 1-磷酸甘露醇脱氢酶 (数据未列出)。为了分离、纯化 1-磷酸甘露醇脱氢酶和 6-磷酸山梨醇脱氢酶, Michael, J. N.^[1] 等报道: 构建的表达载体表达的这两种酶分别占菌体可溶性蛋白的 3.75% 和 2.11%。关于这两种酶在大肠杆菌中的高效表达的研究, 对于酶的纯化、抗体制

备及其高等植物的糖代谢基因工程研究均有重要的意义。

我们已经完成两个基因的单价和双价高等植物表达载体构建, 用这三种类型的载体分别转化烟草等植物。目前已经分别获得三种类型的转基因烟草。在补加 1.75% NaCl 的水培条件下, 与对照相比较, 两类单价转基因烟草植株的耐盐性明显增强。在补加 2.0% NaCl 的生根培养基中, 筛选出了双价转基因烟草植株^[10]。详细结果我们将进一步报道。

参 考 文 献

- [1] Michael J N *et al.* J Bacteriol, 1984, 159(3): 986—990.
- [2] Michell C T *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 2600—2604.
- [3] Michell C T *et al.* Science, 1993, 259(22): 508—510.
- [4] 张智清等. 病毒学报, 1990, 6(2): 111—116.
- [5] Bochner B R *et al.* Appl Environ Microbiology, 1977, 33(2): 434—444.
- [6] Davis T *et al.* Molecular Microbiology, 1989, 2(3): 405—412.
- [7] Jiang W *et al.* Molecular Microbiology, 1990, 4(11): 2003—2006.
- [8] Mamoru Y and Milton H S J. The Journal of Biological Chemistry, 1987, 262(12): 5455—5463.
- [9] DeBoer H A *et al.* DNA, 1983, 2: 231—237.
- [10] Liu J J *et al.* Abstracts 4th International Congress of Plant Molecular Biology, Amsterdam, June 1994, 19—24.

Cloning, Sequencing and High Level Expression of *mtlD* Gene and *gutD* Gene from *Escherichia coli*

Liu Junjun Peng Xuexian Wang Haiyun Mang Keqiang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract *Escherichia coli* strain containing the *mtl* operon and *gut* operon were selected with indicator plate. Taking the bacterial genomic DNA as template, the genes coding for D-mannitol-1-phosphate dehydrogenase (*mtlD*) and D-glucitol-6-phosphate dehydrogenase (*gutD*) were cloned through polymerase chain reaction (PCR). The complete sequence of both genes were determined. The results of sequence analysis showed that the cloned genes had nearly the same nucleotide sequences as those reported previously, except that the 96th codon GCA of *mtlD* gene was changed to GCT, and one deletion of base C was found in the 3'-untranslated region of the *gutD* gene. Two vectors were constructed for the high level expressions of both genes in *E. coli*. The expressed products of *mtlD* and *gutD* accounted for 24.79% and 29.38% of the total soluble cell protein, respectively.

Key words *mtlD* gene, *gutD* gene, sequence analysis, *Escherichia coli*, high level expression