

米根霉菌 *ldhL* 基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达

郭怡璠¹ 迟玉杰^{1*} 王君伟²

(1. 东北农业大学食品学院 哈尔滨 150030)

(2. 东北农业大学动物医学院 哈尔滨 150030)

摘要: 以米根霉菌基因组 DNA 为模板, 根据 GenBank 上已公布的米根霉 L-乳酸脱氢酶基因 (*ldhL*) 序列设计特异性引物, PCR 扩增得到 963 bp 的 DNA 片段, 经序列分析后将其亚克隆到原核表达载体 pET30a 上, 构建成重组质粒 pET30a-*ldhL*。将 pET30a-*ldhL* 转化到 BL21 感受态细菌中, 经 IPTG 诱导表达后进行 SDS-PAGE 分析, 可见约 43 kD 的与预期大小一致的目的蛋白条带, 结果表明 *ldhL* 基因在大肠杆菌中进行了表达, 经酶活分析产物的酶活力为 98 U/mL, 证明了表达产物具有预期的酶活性, 这为进一步研究利用乳清为发酵原料高产 L-乳酸的米根霉基因工程菌株奠定了基础。

关键词: 米根霉, *ldhL* 基因, 克隆, 原核表达

Cloning and Expression of *Rhizopus oryzae* of *ldhL* Gene in *Escherichia coli*

GUO Yi-Fan¹ CHI Yu-Jie^{1*} WANG Jun-Wei²

(1. Food College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

(2. College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract: The *ldhL*-encoding gene was amplified from *Rhizopus oryzae* genome DNA using PCR technique, and the PCR product was approximately 1000 bp DNA segment. The PCR products were cloned into pMD18-T vector and identified by enzyme cutting analysis. The sequence results showed that *ldhL* gene is 963 bp. The DNA fragment of *ldhL* was subcloned into prokaryotic expression vector pET30a and the specific fusion protein with molecular weight 43 kD was expressed, the result showed that the cloned *ldhL* was expressed in BL21. The levels of *ldhL* activity expressed by *E. coli* BL21/ pET30a-*ldhL* were up to 98 U/mL. The results are expected to lay foundation for further studies on the gene engineering *Rhizopus oryzae* strain of high yield L(+)-lactic acid by fermentation of whey.

Keywords: *Rhizopus oryzae*, Gene *ldhL*, Clone, Prokaryotic expression

乳酸是一种常见的有机酸,广泛存在于人、动植物及微生物体内,乳酸及其盐类和衍生物可用于食品、酿造、医药、皮革、卷烟、化工和印染等工业。由于人体只能利用L(+)-乳酸,因此世界卫生组织提倡在食品及医药行业使用L(+)-乳酸取代目前普遍使用的DL(+)-乳酸^[1]。乳酸的年需求量在几十万吨乃至几百万吨,而世界乳酸总产量仅为40万吨,远远不能满足人们对乳酸的需求^[2,3]。世界上以玉米淀粉为原料,通过米根霉发酵生产L(+)-乳酸技术基本成熟,但因其成本高导致乳酸价格一直居高不下^[4]。近年来,结合环境保护,利用有机废弃物乳清为原料的乳酸发酵,成为目前研究的热点,且具有良好的发展前景^[5,6],因此改良一株以有机废弃物乳清为原料,能够发酵生产L(+)-乳酸的米根霉菌株成为目前需要解决的问题。

米根霉(*Rhizopus oryzae*)作为制备高光学纯度L-乳酸的主要菌种得到了人们的重视,米根霉发酵生产L-乳酸的途径为:葡萄糖经EMP途径生成丙酮酸,丙酮酸由L(+)-乳酸脱氢酶(*ldhL*)催化生成L-乳酸^[7,8]。研究证明,米根霉细胞中*ldhL*活力大小与L-乳酸转化率有明显相关性,在高活力的*ldhL*发酵体系中,L(+)-乳酸转化率也随之提高^[9]。目前,在构建L(+)-乳酸高产米根霉工程菌的研究中,很多都是以*ldhL*为对象展开的,在菌种的改良上,可采用诱变^[10]、细胞融合、基因工程等多种方法^[11,12]。基因工程方法具有耗时短和目标明确的特点^[13,14],因此本研究采用PCR技术从米根霉基因组DNA中获得*ldhL*,并在大肠杆菌中实现初步表达,从而为进一步研究利用乳清发酵高产L(+)-乳酸的基因工程米根霉菌株奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

蛋白酶K、十二烷基磺酸钠(SDS)、微量胶回收试剂盒(Gel Extraction Kit)及质粒提取试剂盒购自长春宝泰克生物科技公司;限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、*rTaq* DNA 聚合酶、dNTP、RNA 酶抑制剂、DL15000 Marker、DL2000 Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司;常规试剂均为国内分析纯产品。

1.2 菌株及质粒

米根霉菌(As3.819)购于中国普通微生物菌种保藏管理中心;*E. coli* TG1 和 *E. coli* BL21 由东北农业

大学王君伟教授惠赠。pMD18-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司;pET30a(+)由东北农业大学王君伟教授惠赠。

1.3 基因操作及蛋白质操作

LB 培养基、分子克隆、表达产物 SDS-PAGE 分析参照文献^[15]进行,米根霉基因组 DNA 的提取参照文献^[16]进行,乳酸脱氢酶活性分析参照文献^[17]进行,DNA 胶回收及质粒的提取根据试剂盒提供的方法进行。

1.4 方法

1.4.1 目的基因的PCR扩增及克隆: 根据GenBank上的米根霉*ldhL*基因序列,利用Primer 5.0 引物设计软件设计一对扩增该基因的特异性引物P1 和P2,引物由北京华大基因研究中心合成,引物序列为:P1:5'-GGATCCATGGTATTACACTCA-3',P2:5'-CTCGAGTCAACAGCTACTTTTA-3'(划线序列分别为*Bam*H I、*Xho* I酶切位点)。利用氯化苄法提取米根霉基因组DNA^[16],以米根霉基因组DNA为模板,以P1、P2 为引物,对*ldhL*基因进行PCR扩增。PCR反应体系体积10 μL,扩增条件:94 预变性5 min;94 变性35 s,49 退火35 s,72 延伸35 s,共30个循环;最后72 延伸10 min。取5 μL PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

PCR产物用微量胶回收试剂盒进行纯化回收后,将回收到的PCR产物亚克隆到pMD18-T载体上,16 连接过夜,转化至利用CaCl₂法制备的TG1感受态菌液中^[15]。通过双酶切及PCR扩增鉴定后,获得阳性重组质粒pMD18-T-*ldhL*,送北京华大公司测序。

1.4.2 原核表达重组质粒的构建及目的基因的表达: 将重组质粒pMD18-T-*ldhL*和载体pET30a(+)用*Bam*H I和*Xho* I进行双酶切,分别切胶纯化和回收,在0.5 mL离心管中进行连接,反应体系如下:T4 DNA连接酶Buffer 2.0 μL;T4 DNA连接酶1.0 μL;经双酶切后回收的pET30a(+)载体3.0 μL;*ldhL*片段4.0 μL;去离子水10.0 μL,轻轻混匀,16 连接过夜。连接产物转化至BL21感受态菌液中,通过双酶切及PCR扩增鉴定后,筛选获得含有阳性重组质粒pET30a-*ldhL*的BL21菌株。

1.4.3 重组质粒 pET30a-*ldhL*/BL21 菌株的诱导表达: 将含有阳性重组质粒的BL21菌株接种于5 mL含卡那霉素抗性的LB液体培养基中,37

(210 r/min)培养过夜, 取 300 μ L 接种于 30 mL 含卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C (210 r/min) 培养 2.5 h 至对数中期 ($OD_{600}=0.4\sim0.6$), 加入 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L, 37 $^{\circ}$ C (210 r/min) 诱导培养, 4 h 后取样, 测 OD_{600} 值。以同样的方法诱导含空质粒 pET30a(+) 的 BL21 菌株, 4 h 后取样, 做空白对照。

将诱导后的菌液测 OD_{600} 值, 加入 OD 值 50 倍的 PBS 重悬。取出 10 μ L 重悬液, 加入 2 \times SDS 上样 Buffer 8 μ L, DTT 2 μ L, 沸水煮 5 min~10 min, 室温离心, 取上清蛋白进行 SDS-PAGE^[15] 分析。

1.4.4 乳酸脱氢酶活性的测定: 将含空质粒 pET30a(+) 的 BL21 菌株诱导后, 取 1 mL 菌液离心, 菌体用无菌水洗涤, 再离心, 加入 300 μ L 的柠檬酸缓冲液 (pH 6.7) 重悬菌体, 加入 36 μ L 的溶菌酶 (50 mg/mL) 和 3 μ L 的 TritonX-100。37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 离心取上清液, 进行酶活力测定。

将含有阳性重组质粒的 BL21 菌株诱导培养, 取 1 mL 培养液离心收集菌体用 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 6.7) 洗涤, 离心, 再加入 300 μ L 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 6.7) 重悬菌体, 然后加入 36 μ L 溶菌酶 (50 mmol/L) 和 3 μ L 的 TritonX-100。37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 11000 r/min 离心 30 min, 取其上清液, 得到 *ldhL* 的粗酶液。

乳酸脱氢酶活性分析参见文献[17,18]。基本原理是 NADH 在 340 nm 处有最大吸收峰, 通过光吸收值的改变定量测定酶的含量。乳酸脱氢酶活性通过 BECKMAN DU640 紫外分光光度计的 KINETICS/TIME 功能分析测定。丙酮酸钠和 NADH 分别用 0.1 mol 的磷酸缓冲液 (pH 5.0) 溶解, 取 2 只配对的比色皿, 一只加入 3 mL 丙酮酸钠溶液作为空白对照, 另一只作为样品检测皿, 依次加入 2.9 mL 丙酮酸钠溶液和 0.1 mL NADH 溶液混匀, 置于紫外分光光度计样品槽, 检测原始 NADH 浓度。读数稳定后, 在样品检测皿加入 2 μ L 的粗酶液。马上开始光度计读数, 光度计每秒自动测定一次吸光值, 反应结束给出 $A_{340\text{ nm/min}}$ 的结果, 根据公式计算酶活力。酶活的定义是在一定条件下 (温度为 30 $^{\circ}$ C, pH 为 5.0), L-乳酸脱氢酶催化的反应中, $A_{340\text{ nm/min}}$ 数值下降 1.0 个单位的酶量为 1 U。

酶活力计算公式如下:

$$\text{LDH 活力单位(U)/mL} = \frac{\Delta A_{340\text{ nm}}}{\text{酶液加入量}(2\text{ }\mu\text{L}) \times 10^{-3}}$$

2 结果和分析

2.1 PCR 扩增产物的克隆及序列分析结果

以米根霉基因组 DNA 为模板, 以 *ldhL* 的基因特异性引物进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 可见 1 条约 1000 bp 的 DNA 片段, 与预期 DNA 片段大小一致。

纯化的 PCR 产物与 pMD18-T Vector 连接, 通过单酶切、双酶切、PCR 扩增及序列分析鉴定重组质粒, 结果如图 1 所示, 以 *Bam*H I 进行单酶切得到约 3.6 kb 的 pMD18-T-*ldhL* 线性片段; 以 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切, 得到 2.6 kb 的 pMD18-T 线性片段和 1.0 kb 的插入片段。序列分析证实, 该 DNA 片段大小为 963 bp, 与 GenBank 中 *Rhizopus oryzae* NBRC 4707 株 *ldhL* 蛋白的基因序列同源性为 99.38%, 两者核苷酸序列在 104、189、570、859、915、927 位存在差异, 在比对株中分别为 T、T、C、T、T、G, 而在实验株中分别为 G、C、G、C、C、A。在氨基酸序列上, 两者没有差异, 同源性达到 100%。

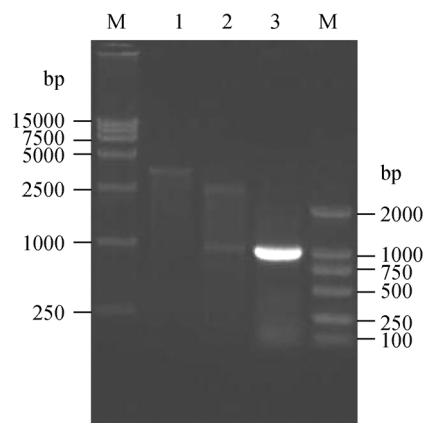


图 1 pMD18-T-*ldhL* 重组质粒的酶切及 PCR 鉴定

Fig. 1 PCR and restriction analysis of recombinant plasmid pMD18-T-*ldhL*

1: Digested by *Bam*H I; 2: Digested by *Bam*H I + *Xho* I; 3: PCR identification of pMD18-T-*ldhL*

2.2 原核表达重组质粒的构建及鉴定

pMD18-T-*ldhL* 和 pET30a(+) 均以 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切和纯化后, 由 T4 DNA 连接酶连接, 构建重组质粒 pET30a-*ldhL*。通过单酶切及双酶切鉴定重组质粒, 结果如图 2 所示, 以 *Bam*H I 单酶切得到约 6.4 kb 的 pET30a-*ldhL* 线性片段; 以 *Bam*H I、*Xho*

双酶切 pET30a-*ldhL* 得到 5.4 kb 的 pET30a 线性片段和 963 bp 的插入片段, 表明成功的构建出阳性 pET30a-*ldhL* 原核表达重组质粒。

2.3 SDS-PAGE 分析

经 IPTG 诱导含 pET30a-*ldhL* 的 BL21 菌株 4 h 后的表达结果如图 3 所示, *ldhL* 基因获得了表达, 经原核表达的融合蛋白相对分子量约为 43 kD, 与预期大小一致, 而含空质粒 pET30a(+) 的 BL21 菌株中未见此蛋白表达。

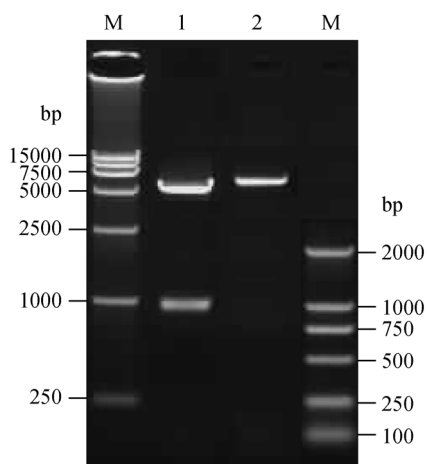


图 2 pET30a-*ldhL* 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction analysis of recombinant plasmid pET30a-*ldhL*

1: Digested by *Bam*HI+*Xho*I; 2: Digested by *Bam*HI

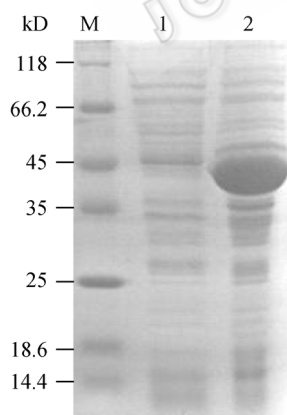


图 3 重组质粒 pET30a-*ldhL* 在 *E. coli* 中的表达图谱

Fig. 3 pET30a-*ldhL* expression in *E. coli* BL21

1: pET30a expression result in *E. coli* BL21 with IPTG induced 4 h, as control; 2: pET30a-*ldhL* expression result in *E. coli* BL21 with IPTG induced 4 h, respectively

2.4 乳酸脱氢酶活性分析

利用反应过程中 NADH 吸光值的变化来测定菌

株的酶活力。由酶活公式可知, 酶活力和 NADH 吸光值的变化斜率成正比, 依据每个时间点的 NADH 吸光值作图, 结果如图 4、图 5 所示。代入酶活计算公式, 得到含有空质粒 pET30a(+) 的大肠杆菌检测不到 L-乳酸脱氢酶的酶活, 而含重组质粒 pET30a-*ldhL* 的大肠杆菌的粗蛋白中 L-乳酸脱氢酶活力为 98 U/mL。

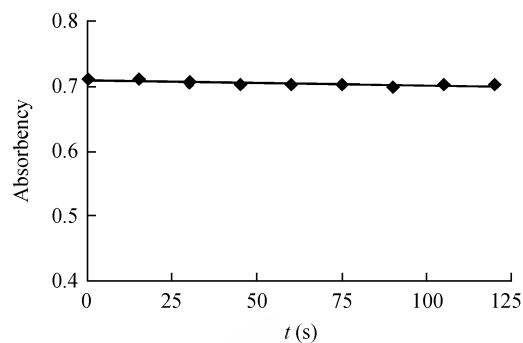


图 4 含空质粒 pET30a(+) 的 *E. coli* 的酶活测定图

Fig. 4 *ldhL* activity of BL21/pET30a

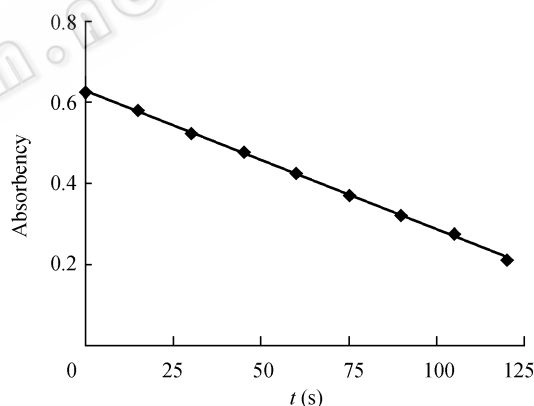


图 5 含重组质粒 pET30a-*ldhL* 的 *E. coli* 酶活测定图

Fig. 5 *ldhL* activity of BL21/pET30a-*ldhL*

3 讨论

本研究以米根霉基因组 DNA 为模板 PCR 扩增 *ldhL* 基因, 选用 pMD18-T Vector 克隆了米根霉 *ldhL* 基因, 通过酶切鉴定和 PCR 鉴定, 证实了所克隆的基因与目的基因大小一致, 通过序列测定及 DNASTAR 分析发现, 所克隆的 *ldhL* 蛋白基因序列与 *Rhizopus oryzae* NBRC 4707 的 *ldhL* 蛋白基因序列的同源性为 99.38%, 氨基酸序列的同源性为 100%, 表明该基因在米根霉中是十分保守的, 进一步将克隆至 pMD18-T 中的 *ldhL* 蛋白基因亚克隆至 pET30a

(+)表达系统中,构建了高效原核表达重组质粒,该表达重组质粒在与之匹配的 *E. coli* BL21 中,经 IPTG 诱导 4 h 后,蛋白进行了表达。通过活性分析,测定出含重组质粒 pET30a-ldhL 的大肠杆菌粗蛋白中 L-乳酸脱氢酶活力为 98 U/mL,从而表明 ldhL 在 *E. coli* BL21 中的表达产物具有生物活性。

目前关于米根霉 ldhL 蛋白基因的克隆及在大肠杆菌中表达的研究国内少有报道,国外特别是欧美发达国家关于基因工程菌发酵生产 L-乳酸的研究较早,但我国大部分仍停留在利用根霉和乳酸菌发酵的研究上,而以细菌发酵生产 L-乳酸的报道不多,本文以米根霉菌为出发菌株扩增乳酸脱氢酶基因转化至大肠杆菌中,弥补了以根霉发酵 L-乳酸存在的能耗高、转糖率低及乳酸菌类发酵 L-乳酸营养要求高等方面的缺陷和不足。通过在大肠杆菌中引入 L-乳酸脱氢酶基因,人为的构建代谢模型,大幅度提高大肠杆菌发酵生产 L-乳酸的产量和光学纯度,降低生产 L-乳酸的成本,适合大批量生产,进一步通过改良菌种和提高发酵液中菌体浓度来提高产酶率,因此利用大肠杆菌发酵生产 L-乳酸将成为今后的趋势。同时,本研究也为进一步研究通过基因工程技术改良以乳清为原料发酵生产 L-乳酸高产米根霉菌株奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 白冬梅,赵学明,李鑫钢,等. 米根霉发酵生产 L(+)-乳酸研究进展. 现代化工, 2002, 22(6): 9-12.
- [2] Tamada M, Begum AA, Sadi S. Production of L(+)-Lactic acid by immobilized cells of *Rhizopus oryzae* with polymer supports prepared by γ ray induce dpolymerization. *Biotechnol Bioeng*, 1992, 74(6): 379-383.
- [3] Rathin D. The technology and economy potential of poly (lactic acid) and its ramification. *FEMS Microbiology Reviews*, 1995, 16: 221-231.
- [4] Cotton JC, Pometto AL, Gvozdenovic JJ. Continuous lactic acid fermentation using plactic composite biofilm reactor. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 57: 626-630.
- [5] Kosakai Y, Park YS, Okabe M. Enhancement of L(+)-lactic acid production using mycelial flocs of *Rhizopus oryzae*. *Biotechnol Bioeng*, 1997, 55: 461-470.
- [6] 王 俐. 乳酸/聚乳酸生产技术进展. 化工技术经济, 2005, 23(7): 50-56.
- [7] Angelika L, Jacqueline M R, James E G, *et al.* Flux analysis of glucose metabolism in *Rhizopus oryzae* for the purpose of increasing lactate yields. *Fungal Genetics and Biology*, 1997, 21: 30-39.
- [8] Yu RC, Hang YD. Kinetics of direct fermentation of agricultural commodities to L(+)-lactic acid and glucoamylase. *Lett Appl Micro*, 1994, 19: 249-252.
- [9] Skory CD. Induction of *Rhizopus oryzae* pyruvate decarboxylase genes. *Current Microbiology*, 2003, 47: 59-64.
- [10] 乔长晟, 汤凤霞, 苏建军, 等. L(+)-乳酸高产菌株的诱变选育. 食品工业科技, 2002, 23(2): 36-37.
- [11] Skory CD. Lactic acid production by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a *Rhizopus oryzae* lactate dehydrogenase gene. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2003, 30: 22-27.
- [12] Skory CD. Lactic acid production by *Rhizopus oryzae* transformants with modified lactate dehydrogenase activity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64(2): 237-242.
- [13] Ruengruglikit C, Hang YD. L(+)-lactic acid production by pellet-from *Rhizopus oryzae* R1021 in a stirred tank fermentor. *Chemical Engineering Science*, 2003, 58: 785-791.
- [14] Katsuichi S, Akane S, Masao O. Genetic diversity in *Rhizopus oryzae* strains as revealed by the sequence of lactate dehydrogenase genes. *Arch Microbiol*, 2004, 182: 30-36.
- [15] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南(上、下册). 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002, p. 8.
- [16] 张莉莉, 张苓花, 史剑斐, 等. 利用氯化苄提取真菌基因组 DNA 及其分子生物学分析. 大连轻工业学院学报, 2000, 19(1): 36-39.
- [17] Skory CD. Isolation and expression of lactate dehydrogenase genes from *Rhizopus oryzae*. *Applied and Environ Microbiology*, 2000, 66(6): 2343-2348.
- [18] 白冬梅, 赵学明, 李鑫钢, 等. 高效液相色谱法测定米根霉乳酸发酵液中乳酸的光学纯度. 色谱, 2001, 19(1): 13-15.