

大肠杆菌 *ptsG* 基因敲除及其缺陷株生长特性研究

韩 聪^{1,2} 张惟材^{1*} 游 松² 黄留玉¹

¹(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

²(沈阳药科大学, 沈阳 110016)

摘 要 在大肠杆菌磷酸转移酶系统中,葡萄糖主要由 *ptsG* 基因编码的酶 II CB^{Glc} 转运入细胞。利用代谢工程技术构建 *ptsG* 基因缺陷株,有望降低葡萄糖的摄取速率,减少乙酸累积,促进菌体生长。运用 PCR 技术,扩增出两翼与 *ptsG* 基因上下游序列同源,中间为氯霉素抗性基因的 DNA 片段。经电转化,将外源 DNA 片段分别转入 *Escherichia coli* DH5 α 、JM109 中。在 Red 重组酶的作用下,外源 DNA 片段与染色体上同源区域重组,将基因 *ptsG* 敲除,构建 *ptsG* 基因缺陷株 DH5 α P、JM109P。在 LB 培养基中,*ptsG* 基因缺陷株的生长状况与亲株无明显差异。在含有葡萄糖的 LB 培养基中,DH5 α P、JM109P 的最高菌密度分别是对照菌株 DH5 α 、JM109 的 3.47 倍和 4.25 倍,*ptsG* 基因缺陷株对葡萄糖的摄入量也明显高于对照菌株。重组蛋白肿瘤坏死因子(TNF)在 DH5 α P、JM109P 中的表达量分别占全菌蛋白的 24.3%、20.8%,*A*₆₀₀ 分别为 8.28、7.62,TNF 在缺陷株中单位体积的表达量明显高于对照菌株。以上结果说明,大肠杆菌 *ptsG* 基因缺陷株具有良好的生长能力和表达外源蛋白的能力,在大肠杆菌高密度发酵研究方面具有良好的应用前景。

关键词 Red 同源重组,*ptsG* 基因,基因敲除,代谢工程

中图分类号 Q933 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)01-0016-05

大肠杆菌在高密度发酵的过程中,产生乙酸等代谢副产物,乙酸累积抑制菌体生长和外源蛋白的表达。一般认为,乙酸的产生是由于菌体对葡萄糖的摄取速率与细胞的碳代谢速率不平衡所致^[1]。大肠杆菌对葡萄糖的摄取主要通过磷酸转移酶系统(PTS)完成,其中由 *ptsG* 基因编码的酶 II CB^{Glc} 在葡萄糖的跨膜转运中具有重要作用^[2]。利用代谢工程技术,构建 *ptsG* 基因缺陷株,能够很大程度地降低葡萄糖的摄取速率,由此可望降低乙酸的累积,促进菌体生长。关于 *ptsG* 基因缺陷株与大肠杆菌发酵的研究在国外仅有少数报道^[3],研究方法和结果也不一致,本文采用 Red 同源重组技术敲除大肠杆菌 *ptsG* 基因,对基因缺陷株进行了初步研究。

Red 同源重组技术作为一种新型基因打靶技术,可用于构建具有特定突变的基因工程菌,以改变生物代谢途径,减少有害副产物产生。Red 同源重组技术的原理是将一段携带与靶基因两翼各有 40~60 bp 同源序列的 PCR 片段导入宿主菌细胞,利

用 λ 噬菌体 Red 重组酶(Exo、Beta、Gam 三种蛋白)的作用,使线性 DNA 片段与染色体的特定靶序列进行同源重组,靶基因被标记基因置换下来(如图 1 所示)。PCR 反应的引物由两部分组成,靠近 5'端的区域与靶基因序列同源,靠近 3'端的区域与模板 DNA 互补。这种重组技术是最近发展起来的一项可在染色体水平上进行遗传操作的新技术,是基因功能研究和新菌株构建的有力工具^[4]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 *Escherichia coli* DH5 α 、JM109,质粒 pKD4(温敏型复制子,含有受 P_{araB} 启动子调控的 *exo*、*bet*、*gam* 基因,Amp^r)由美国 Purdue 大学 B. L. Wanner 惠赠^[4]。质粒 pKF3(含有氯霉素抗性基因 *cat*)、pMD18-T 购自大连宝生物工程公司。表达肿瘤坏死因子(TNF- α)的重组质粒 pMGZ001^[5](P_L 启动子,Amp^r)、对照质粒 pBV220(P_L 启动子,Amp^r)均由

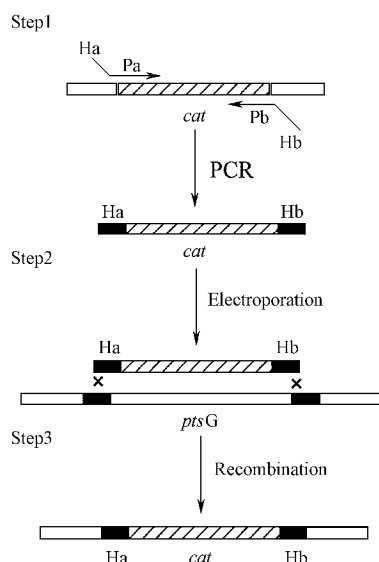


图 1 Red 同源重组技术用于基因敲除

Fig.1 Gene disruption strategy by Red technology

Ha and Hb refer to the homology regions. Pa and Pb refer to priming sites. Step1: PCR amplify *cat* gene. Step2: transform to strain expressing Red recombinase. Step3: select chloramphenicol-resistant transformants

本室保存。

1.1.2 引物扩增氯霉素抗性基因 *cat* 的引物 P_1 、 P_2 分别由两部分组成 靠近 5'端加下划线的序列与 *ptsG* 基因两翼序列同源,靠近 3'端未加下划线的序列与质粒 pKF3 上 *cat* 基因两侧序列互补。在大肠杆菌染色体上 *ptsG* 基因同源重组区域外侧,设计引物 P_3 、 P_4 用于检测重组菌株(如图 2 所示)。引物合成由上海博亚生物技术公司完成。

P_1 5'-GATGCCCTGTACACGGCGAGGCTCTCCC-
CCCTTGCCACGCTCAGTGGAACCTCCGTCG-3'

P_2 5'-GCAGCCATCTGGCTGCCCTTAGTCTCCCCAA-
CGTCTTACGGTGTAAAACGTCCGAAGGCC-3'

P_3 5'-CGCTTCCCGCCTTCAATCC-3'

P_4 5'-GACGCCGTATGGCACCTTCCG-3'

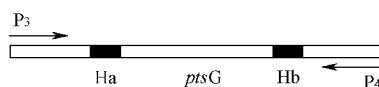


图 2 检测引物所在位置示意图

Fig.2 The scheme of priming sites

Ha and Hb denote the homology regions ;

P_3 and P_4 denote the detecting primers

1.1.3 主要试剂和仪器:限制酶、低分子量标准蛋白均购自华美生物工程公司, *Ex Taq* 聚合酶购自大连宝生物工程公司, L-阿拉伯糖为 Fluka 公司产品, 蛋白胨和酵母粉为英国 Oxford 公司产品, 其它为市

售分析纯化学试剂。MicroPulser Electroporator 购自 Bio-Rad 公司。

1.1.4 培养基:LB 培养基,蛋白胨 10 g/L、酵母粉 5 g/L、氯化钠 10 g/L; LBG 培养基,蛋白胨 10 g/L、酵母粉 5 g/L、氯化钠 10 g/L、葡萄糖 15 g/L; GYN 系列培养基,蛋白胨 1 g/L、酵母粉 1 g/L、NaCl 3 g/L、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 3.5 g/L、 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.46 g/L、葡萄糖浓度分别为 0、0.1、0.2、0.3、0.4 g/L。氨苄青霉素、氯霉素在培养基中的工作浓度分别为 100 mg/L、34 mg/L。

1.2 方法

1.2.1 PCR 片段的制备:以质粒 pKF3 为模板, P_1 、 P_2 为引物,进行 PCR 扩增,反应条件为 94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 30 个循环。加入 *Dpn* I 限制酶,降解残留的模板 DNA,PCR 产物经回收纯化后,溶于去离子水。

1.2.2 电转化:分别挑取大肠杆菌 DH5 α /pKD46、JM109/pKD46 的单菌落接种于新鲜 LB 培养基(含有氨苄青霉素)中,30℃振荡培养过夜,转接于 50 mL 培养基,继续培养至 $A_{600} = 0.2 \sim 0.3$,加入 L-阿拉伯糖,继续培养至 $A_{600} = 0.5 \sim 0.6$,将菌液置冰浴中 15 ~ 20 min,于 4℃,5000 \times g 离心 10 min,用灭菌的 10% 甘油洗涤菌体 3 次,将菌体重悬于 0.5 mL 甘油中,制成感受态细胞。移取上述 PCR 产物与感受态细胞混合,电击后加入 1 mL 预冷的 LB 培养基,30℃培养 1 h,移取 200 μ L 涂布于含有氨苄青霉素和氯霉素的 LB 平板上,30℃培养,筛选阳性转化子。

1.2.3 重组菌株的鉴定及质粒 pKD46 的消除:分别以得到的阳性转化子和对照菌株 DH5 α 、JM109 的基因组为模板, P_3 、 P_4 为引物进行 PCR 扩增,用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,并将重组子的 PCR 产物克隆于载体 pMD18-T,测序鉴定。

质粒 pKD46 具有氨苄青霉素抗性,其复制子具有温度敏感性,在高温条件下无法复制。将经过鉴定的重组菌株命名为 DH5 α P、JM109P,分别接种于 LB 培养基中,42℃培养 2 h 后,在 37℃条件下划线分离培养,对每个单菌落进行氨苄青霉素和氯霉素的抗性检测,挑选对氨苄青霉素敏感而对氯霉素具有抗性的克隆,得到消除质粒 pKD46 的重组菌株。

1.2.4 细胞产率的测定:分别挑取对照菌株、重组菌株的单菌落接种于 LB 培养基中,37℃、230 r/min 培养,转接于 GYN 系列培养基,继续培养,定时测定菌密度。

1.2.5 测定重组菌株的生长 :分别挑取对照菌株、重组菌株的单菌落接种于 LB 培养基中 ,37℃ 培养 10 h 后 ,转接于 LB 和 LBG 培养基中 ,37℃、250 r/min 继续培养 ,定时测定菌密度 ,葡萄糖含量的测定采用 3,5-二硝基水杨酸法^[6]。

1.2.6 TNF 的表达 :将表达肿瘤坏死因子(TNF)的质粒 pMGZ001 分别转化重组菌株和对照菌株 ,将质粒 pBV220 转化重组菌株。挑取单菌落接种于含有氨苄青霉素的 LB 培养基中 ,30℃、200 r/min 振荡培养过夜 ,转接于 LBG 培养基中 ,30℃、250 r/min 振荡培养 ,当菌株培养至对数生长期时 ,升温至 42℃ ,继续培养 6 h 后 ,测定菌密度 ,离心收获菌体 ,对表达产物进行 SDS-PAGE 检测。

2 结 果

2.1 PCR 片段的制备

以质粒 pKF3 为模板 ,P₁、P₂ 为引物 ,扩增出两端与 *ptsG* 基因上下游序列同源 ,中间为氯霉素抗性基因 *cat* 的 DNA 片段 ,经琼脂糖凝胶电泳鉴定约 1100 bp ,与理论值一致 ,如图 3 所示。

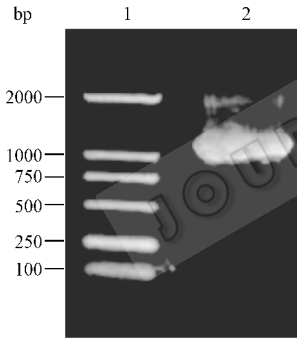


图 3 PCR 扩增产物的电泳鉴定

Fig.3 PCR amplification of chloramphenicol resistance gene(*cat*) in plasmid pKF3
1 :DL2000 marker ; 2 :PCR product

2.2 *ptsG* 基因缺陷株的鉴定

分别以从含有氨苄青霉素和氯霉素的平板上筛选到的转化子和对照菌株的基因组为模板 ,P₃、P₄ 为引物 ,进行 PCR 扩增 ,对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳。电击入感受态细胞的线性 DNA 片段 (含有 *cat* 基因)长度为 1086 bp ,而 *ptsG* 基因的长度为 1560 bp ,两者相差约 500 bp。如图 4 所示 ,转化子 PCR 产物约为 1500 bp ,而对照菌株 PCR 产物约为 2000 bp ,两片段长度的差异与预计相符 ,说明在重组菌株染色体上 *ptsG* 基因已完全被 *cat* 基因取代。转化子的 PCR 产物经测序后 ,进一步证明在重组菌

株染色体上 *cat* 基因已将 *ptsG* 基因完全置换下来。

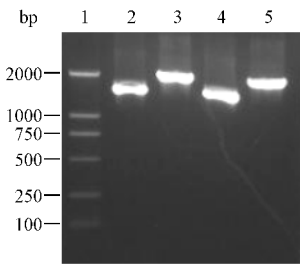


图 4 *ptsG* 基因缺陷株的 PCR 鉴定

Fig.4 PCR identification of *ptsG*-mutants
1 :DL2000 Marker ; 2 :DH5αP 3 :DH5α 4 :JM109P 5 :JM109

2.3 细胞产率

细胞产率指细菌细胞在生长过程中由基质转化为生物量的产率 ,以所测到的各葡萄糖浓度培养基下菌株生长的最高菌密度与葡萄糖浓度作图 ,所得曲线的斜率即为该菌株的细胞产率 ,结果见表 1。缺陷株 JM109P 的细胞产率是 JM109 的 1.89 倍 ,说明在菌株 JM109 中敲除基因 *ptsG* 后 ,摄取的葡萄糖更多的转化为菌体生长的生物量 ,但缺陷株 DH5αP 的细胞产率降低为 DH5α 的 89.1% ,可能因为在菌株 DH5αP 中 (1)生物产能降低 (2)葡萄糖转化为其它中性储藏产物 (如多糖等) (3)葡萄糖更多地转化为其它代谢物 (如琥珀酸等)。

表 1 大肠杆菌 *ptsG* 缺陷株的细胞产率

Table 1 Cell yields of parent and *ptsG*-mutant strains

Strain	DH5α	DH5αP	JM109	JM109P
Cell yield A ₆₀₀ /g(glucose)	1.65	1.47	0.945	1.788

2.4 重组菌株在 LB 培养基中的生长

以在 LB 培养基中各时刻所测定的菌密度对培养时间作图 ,从图 5 可以看出 ,DH5αP 与 DH5α 的生长曲线几乎完全重合 ,在培养后期 ,JM109P 的菌密度稍高于 JM109。以上结果说明在 LB 培养基中 ,对照菌株和重组菌株的生长并未有明显差异。

2.5 重组菌株在 LBG 培养基中的生长

以在 LBG 培养基中各时刻所测定的菌密度、培养液中葡萄糖含量对培养时间作图 ,如图 6 所示 ,在培养后期 ,DH5αP 与 DH5α 相比 ,菌密度是后者的 3.47 倍 ,培养液中葡萄糖浓度几乎降为 0 ;JM109P 的菌密度是 JM109 的 4.25 倍 ,培养液中葡萄糖浓度降为后者的 22.9%。以上结果说明 ,与对照菌株相比 ,大肠杆菌 *ptsG* 缺陷株可摄取更多的葡萄糖用于代谢 ,因而具有较强的生长能力。

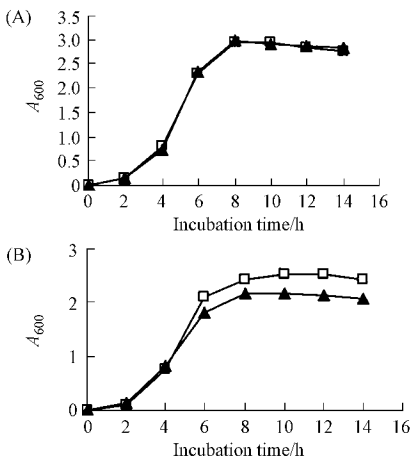


图 5 大肠杆菌 *ptsG* 缺陷株在 LB 培养基中的生长

Fig.5 Comparison of growth curves of parent and *ptsG*-mutant strains in LB medium

Open symbols :*ptsG* mutants ;Filled symbols :parent strains
(A) □ :DH5α ,▲ :DH5αP (B) □ :JM109 ,▲ :JM109P

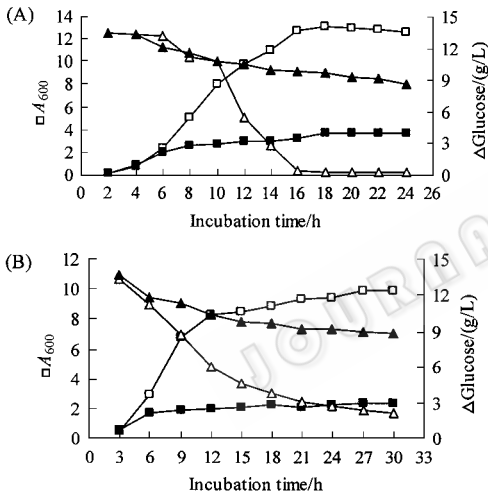


图 6 大肠杆菌 *ptsG* 缺陷株在 LBG 培养基中的生长

Fig.6 Growth characteristics of parent and *ptsG*-mutant strains in LBG medium

Open symbols :*ptsG* mutants ;Filled symbols : parent strains.

(A) ■ :DH5α □ :DH5αP ; (B) ■ :JM109 □ :JM109P

2.6 TNF 的表达

用 SDS-PAGE 检测 TNF 表达状况 ,结果如图 7 所示。在 *ptsG* 基因缺陷株的电泳图谱中 ,在 17 kD 处有一明显表达带 ,与 TNF 理论值相符 ,其中 DH5αP 和 DH5α 表达的 TNF 分别占全菌蛋白的 24.3%、16.5% ,JM109P 和 JM109 表达的 TNF 分别占全菌蛋白的 20.8%、12.7%。培养结束时 ,各菌株的菌密度见表 2。实验表明 ,在 LBG 培养基中 ,TNF 在重组菌株中单位体积表达量明显高于对照菌株。

表 2 大肠杆菌 *ptsG* 缺陷株及其对照菌株的菌密度

Table 2 *A*₆₀₀ of *ptsG* mutants and parent strains

	DH5αP	DH5α	DH5αP	JM109P	JM109	JM109P
	/pMGZ001	/pMGZ001	/pBV220	/pMGZ001	/pMGZ001	/pBV220
<i>A</i> ₆₀₀	8.28	2.84	8.38	7.62	2.30	7.58

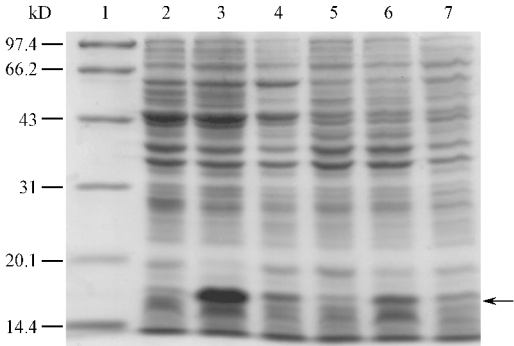


图 7 TNF 在 *ptsG* 缺陷株中的表达

Fig.7 SDS-PAGE analysis of TNF expressed in *ptsG* mutants

1 :protein marker ;2 :DH5αP/pBV220 ;3 :DH5αP/pMGZ001 ;4 :DH5α/pMGZ001 ;5 :JM109P/pBV220 ;6 :JM109P/pMGZ001 ;7 :JM109/pMGZ001

3 讨论

利用基因打靶技术 ,敲除生物代谢途径中的关键基因 ,改变代谢流分布 ,构建新的代谢途径 ,在微生物代谢工程研究中具有重要作用。本文利用 Red 同源重组技术敲除大肠杆菌 *ptsG* 基因后 ,基因缺陷株的生长能力明显增强。在 LBG 培养基中 ,基因缺陷株的菌密度是亲株的数倍 ,对葡萄糖的摄入量远远高于亲株 ,而在 LB 培养基中两者差别不大 ,这说明基因缺陷株在 LBG 培养基中的生长优势主要得益于葡萄糖的作用。造成这一现象的原因可能是 ,在大肠杆菌 PTS 系统中 ,酶 II^{Glc}、酶 II^{Man}、酶 II^{Fru}、酶 II^{Bgl}都可将葡萄糖转运入细胞内^[7] ,敲除基因 *ptsG* 后 ,细胞可通过其他转运酶的作用摄取葡萄糖 ,但进入糖酵解途径的总碳代谢流有所减少 ,使其与进入 TCA 循环的碳代谢流大体平衡 ,从而避免副产物乙酸大量积累 ,减轻了 Crabtree 效应 ,这就导致基因缺陷株在生长过程中可大量摄取葡萄糖用于菌体的生长和繁殖。在细胞产率的测定上 ,DH5αP 与 JM109P 的变化趋势截然相反 ,造成这一现象的原因还不清楚 ,有必要对基因缺陷株进行代谢流和中间产物分析 ,以进一步研究。通过考查 TNF 在重组菌株中的表达情况 ,表明重组菌株具有良好的表达外源蛋白的能力 ,在高密度发酵研究方面具有一定的应用前景。

料速率的方法,减少乙酸的生成。利用代谢工程技术,构建 *ptsG* 缺陷的基因工程菌,可大大简化复杂的工艺操作,降低生产成本。由于高密度发酵过程的复杂性,大肠杆菌 *ptsG* 基因缺陷株的发酵特性还有待在发酵罐中进一步研究,在实现基因工程菌高密度培养的同时,提高外源蛋白的表达量。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Lee SY. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol*, 1996, **14**(3): 98 – 105
- [2] Christian S, Karin F, Rudolf B *et al*. Carbohydrate transporters of the bacterial phosphoenolpyruvate : Sugar phosphotransferase system (PTS). *FEBS Letters*, 2001, **504**(3): 104 – 111
- [3] Chih-Hsiung C, George NB, Ka-Yiu S. Effect of modified glucose

uptake using genetic engineering techniques on high-level recombinant protein production in *Escherichia coli* dense cultures. *Biotechnol Bioeng*, 1994, **44**(8): 952 – 960

- [4] Kirill AD, Barry LW. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(12): 6640 – 6645
- [5] Zhou XW(周晓巍), Cheng DS(程度胜), Xu XY(徐秀英) *et al*. High expression of hTNF- α and its mutant protein in *Escherichia coli*. *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences*(军事医学科学院刊), 1996, **20**(3): 176 – 178
- [6] Millar GL. Use of dinitrosalicylic acid for the determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 1959, **32**: 426 – 428
- [7] Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR. Phosphoenolpyruvate : Carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev*, 1993, **57**(3): 543 – 594

Knockout of the *ptsG* Gene in *Escherichia coli* and Cultural Characterization of the Mutants

HAN Cong^{1 2} ZHANG Wei-Cai^{1 *} YOU Song² HUANG Liu-Yu¹

¹(Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China)

²(Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract Metabolic engineering provide powerful tools for the systematic manipulation of cellular metabolic activities. The *ptsG* gene for glucose-specific transporter Enzyme II CB^{Glc} of the phosphotransferase system was knock-out so as to reduce the accumulation of acetic acid in the high cell-density culture of *Escherichia coli* on excess glucose. The chloramphenicol-resistant cassette with short shared sequences on both ends generated by PCR was electroporated into *Escherichia coli* DH5 α and JM109. Recombination between linear DNA cassettes and *Escherichia coli* chromosomes took place by Red recombinase functions. Therefore, the *ptsG* gene was disrupted to construct the mutants called DH5 α P and JM109P. There was no difference between the mutants and parent strains in LB media. However, in LB media supplemented with glucose, the mutants of *Escherichia coli* deficient in *ptsG* showed greater biomass, together with exploiting more glucose. The maximal cell density obtained with DH5 α P was approximately 3 times more than that of DH5 α , then the result of JM109P increased fourfold. The products of recombinant protein TNF respectively accounted for 24.3% of total cellular protein in DH5 α P with A_{600} 8.28 and 20.8% of total cellular protein in JM109P with A_{600} 7.62. The specific volume expression amount of TNF was greater in the *ptsG* mutant than in its parent strain. These results demonstrate that the *ptsG*-mutant strains will be available for high cell-density culture.

Key words Red homologous recombination, *ptsG* gene, gene knock-out, metabolic engineering