

• 生物技术与方法 •

LB 克隆系统的构建及在鞘氨醇单胞菌基因融合表达中的应用

薛含^{1#}, 李慧^{1#}, 陈萌琦¹, 张再美¹, 郭中瑞¹, 朱虎², 王继乾¹, 孙亚伟¹

1 中国石油大学 (华东) 化学化工学院 生物与能源化工系, 重质油国家重点实验室, 山东 青岛 266580

2 福建师范大学化学与材料学院, 工业生物催化福建省高校工程研究中心, 福建 福州 350007

薛含, 李慧, 陈萌琦, 张再美, 郭中瑞, 朱虎, 王继乾, 孙亚伟. LB 克隆系统的构建及在鞘氨醇单胞菌基因融合表达中的应用. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1576-1588.

XUE H, LI H, CHEN MQ, ZHANG ZM, GUO ZR, ZHU H, WANG JQ, SUN YW. Development of an LB cloning system and its application in expression of fusion genes in *Sphingomonas* sp. WG. Chin J Biotech, 2022, 38(4): 1576-1588.

摘 要: 为摆脱限制性酶切位点不足的限制, 构建可灵活改变多基因融合方向的表达载体, 基于 IIS 型和 IIT 型限制性内切酶 *Lgu* I 和 *Bbv* C I 设计开发了 LB 克隆系统。该克隆系统是以广宿主质粒 pBBR1MCS-3 为初始载体, 利用 PCR 的方法, 在其多克隆位点区插入 LB 片段 (GCTCTTCCTCAGC) 构建得到的。LB 片段含 *Lgu* I 和 *Bbv* C I 部分重叠识别位点, 经这两种限制性内切酶酶切后可以产生相同非回文序列, 利用这一性质可快速、灵活地将多个基因逐步、定向插入表达载体。为验证该克隆系统的有效性, 将鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas* sp.) WG 中两个糖基转移酶基因 *welB*、*welK* 逐步定向融合至 LB 克隆载体, 并将重组质粒转入鞘氨醇单胞菌中表达。结果表明, 基因融合表达对鞘氨醇胶产量影响较小, 但是, 对鞘氨醇胶粘度有重要影响。在发酵 84 h 时, 重组菌株 *Sphingomonas* sp. WG/pBBR1MCS-3-LB-*welKB* 的发酵液粘度较野生株提高约 24.7%, 粘度提升将有助于该鞘氨醇胶在石油开采、食品等多个领域的应用。综上所述, 以鞘氨醇单胞菌为研究对象, 验证了 LB 克隆系统在多基因融合中的应用, 为构建融合酶提供了一种高效的方法。

关键词: 鞘氨醇单胞菌; 鞘氨醇胶; LB 克隆系统; 基因融合; 糖基转移酶

Received: June 9, 2021; **Accepted:** September 24, 2021; **Published online:** October 15, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31800075, U1805234); National High-tech R&D Program, China (863 Program) (2015AA020925); Fundamental Research Funds for the Central Universities and the Development Fund of State Key Laboratory of Heavy Oil Processing, China (20CX02202A); Open Fund of Engineering Research Center of Industrial Biocatalysis, Fujian Province Universities, China (ERCIB2020-01)

[#]These authors contributed equally to this study

Corresponding author: LI Hui. Tel: +86-532-86981562; E-mail: lihui@upc.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31800075, U1805234); 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (2015AA020925); 中央高校基本科研业务费专项资金及重质油国家重点实验室开发基金 (20CX02202A); 工业生物催化福建省高校工程研究中心开放基金 (ERCIB2020-01)

Development of an LB cloning system and its application in expression of fusion genes in *Sphingomonas* sp. WG

XUE Han¹, LI Hui¹, CHEN Mengqi¹, ZHANG Zaimei¹, GUO Zhongrui¹, ZHU Hu²,
WANG Jiqian¹, SUN Yawei¹

¹ State Key Laboratory of Heavy Oil Processing, Department of Biological and Energy Chemical eEngineering, College of Chemistry and Chemical Engineering, China University of Petroleum (East China), Qingdao 266580, Shandong, China

² Engineering Research Center of Industrial Biocatalysis, College of Chemistry and Materials Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, Fujian, China

Abstract: In order to overcome the challenges of insufficient restriction enzyme sites, and construct a fusion-expression vector with flexible fusion direction, we designed an LB cloning system based on the type IIS and type IIT restriction enzymes *Lgu* I and *Bbv*C I. The LB cloning system is constructed by inserting the LB fragment (GCTCTTCCTCAGC) into the multiple cloning site region of the broad-host plasmid pBBR1MCS-3 using PCR. The LB fragment contains partially overlapped recognition sites of *Lgu* I and *Bbv*C I. Therefore, the same non-palindromic sequence will be generated by these two restriction endonucleases digestion. This feature can be used to quickly and flexibly insert multiple genes into the expression vector in a stepwise and directed way. In order to verify the efficacy of the cloning system, two glycosyltransferase genes *welB* and *welK* of *Sphingomonas* sp. WG were consecutively fused to the LB cloning vector, and the recombinant plasmid was transferred into *Sphingomonas* sp. WG by triparental mating. The results showed that gene fusion expression has little effect on sphingane titer, but enhanced the viscosity of sphingane. The viscosity of the sphingane produced by recombinant strain *Sphingomonas* sp. WG/pBBR1MCS-3-LB-*welKB* was 24.7% higher than that of the wild strain after fermentation for 84 h, which would be beneficial for its application. In conclusion, the application of LB cloning system were verified using *Sphingomonas* sp. WG. The LB cloning system may provide an efficient tool for fusion expression of target genes.

Keywords: *Sphingomonas* sp. WG; sphingane; LB cloning system; gene fusion; glycosyltransferase

鞘氨醇胶 (sphingans) 是由鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas* sp.) 分泌的胞外杂多糖^[1]。常见的鞘氨醇胶如威兰胶、结冷胶和定优胶等, 具有较高的粘度、良好的剪切稀释性、热稳定性、增稠性等性能, 可作为增稠剂、保水剂等应用于石油工业、混凝土工业、日化行业以及医药领域等诸多方面^[2-3]。但是, 鞘氨醇胶生产中存在糖转化率低等问题^[4], 限制了此类多糖

的工业化生产与广泛应用, 因此, 提高鞘氨醇胶生产菌株的性能具有重要意义。目前, 研究者多通过发酵工艺优化^[5-6]或诱变育种^[7]来提高鞘氨醇胶的产量和粘度, 但是, 发酵工艺优化受菌株生理极限的限制, 而诱变育种又存在一定的盲目性。相比于传统方法, 基因工程育种是一种较为高效的育种方式, 它可以根据菌株的代谢途径, 对菌株进行理性设计, 具有针对性强、育

种周期短的优点。Zhang 等^[8]在鞘氨醇单胞菌中过表达了 *vgb* 基因以提高对溶氧的吸收,使威兰胶产量较野生株提升了 14%。Huang 等^[9]在鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas sanxanigenens*) NX02 中过表达了糖前体合成过程中的葡萄糖磷酸变位酶基因 (phosphoglucomutase, *pgmG*),使鞘氨醇胶产量提高了约 17%。但是,由于缺乏天然代谢途径的调控机制,单个基因的过量表达通常会导致宿主的代谢失衡并产生胁迫效应,从而影响目的产物产量的提高^[10-11]。

融合酶是利用融合表达技术,通过分子设计将几种功能蛋白集成于一体形成的多功能酶嵌合体,它可以模拟体内底物沟道传递机制,促进反应向生成目标产物的方向移动,提供反应驱动力;同时,还可以阻止目标途径与竞争性途径之间对话,缓解反应中不稳定或有毒中间体带来的不利影响,提高酶的催化效率^[12]。Lerchner 等^[13]将两个级联酶醇脱氢酶与氨基转移酶融合,完成醇到氨的高效转化。因此,利用有效的手段将级联酶组装成多酶复合体是从代谢水平提高鞘氨醇胶产量的有效方法。本课题组前期筛选得到一株高产鞘氨醇胶的菌株鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas* sp. WG^[14],通过基因组测序^[15] (GenBank 登录号: LNOS000000000.1) 及基因功能分析,发现了两个重要的糖基转移酶 WelB 和 WelK。WelB 将葡萄糖-1-磷酸从尿苷二磷酸-葡萄糖转移连接到脂质载体异戊二烯上,形成葡萄糖基-异戊二烯磷酸中间体,随后, WelK 将葡萄糖醛酸-1-磷酸从尿苷二磷酸-葡萄糖醛酸转移到中间体上^[16-17]。因此,本研究选择这两个级联酶,研究鞘氨醇单胞菌的基因工程育种,以获得具有优良性能的菌株。

基因融合技术是构建多酶复合体的一种有效手段,多采用基因重组或融合 PCR 技术^[18-20]。Marquardt 等^[21]利用 *Lgu* I / *Eco*81 I 设计了 LE 克

隆系统,可以灵活地将不同的基因以不同的顺序进行融合,以构建不同的融合酶。但是,LE 克隆系统的宿主主要为大肠杆菌 (*Escherichia coli*),不适用于鞘氨醇单胞菌等天然菌株。因此,本文基于基因重组技术与 LE 克隆系统的原理,以广宿主载体 pBBR1MCS-3 为初始质粒,选择 IIS 型限制性内切酶 *Lgu* I 和 IIT 型限制性内切酶 *Bbv*C I,设计开发了 LB 克隆系统,用于对鞘氨醇单胞菌等多种野生菌株的基因工程改造。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与质粒

Sphingomonas sp. WG 由本实验室从胶州湾海域筛选得到,保藏号 CCTCC No: M2013161; 大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli*/pRK2013 由本实验室保藏;质粒 pBBR1MCS-3 购自武汉森灵生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Lgu* I、*Bbv*C I 购自 NEB; *Bam*H I、DNA Ligation Kit Ver.2.1、T4 DNA 连接酶、TaKaRa LA *Taq*[®] with GC Buffer、dNTPs、10 \times 上样缓冲液购自 TaKaRa 公司;KOD FX DNA 聚合酶购自东洋纺(上海)生物科技有限公司。细菌基因组提取试剂盒、细菌质粒小量抽提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。琼脂糖凝胶回收纯化试剂盒购自 FAVORGEND, D8000 DNA Marker 购自北京全式金生物技术有限公司。

培养基: Luria-Bertani 培养基 (g/L): 氯化钠 10, 酵母粉 5, 蛋白胨 10; 种子培养基 (g/L): 葡萄糖 10, 酵母粉 1, 蛋白胨 5, 磷酸二氢钾 2, 硫酸镁 0.1; 发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 67, 酵母粉 3.4, 磷酸氢二钾 3, 硫酸镁 0.1。抗生素:

四环素 (10 $\mu\text{g/mL}$)、链霉素 (50 $\mu\text{g/mL}$)、卡那霉素 (50 $\mu\text{g/mL}$)。上述药品均购自国药集团。

1.2 实验方法

1.2.1 试验设计与引物合成

LB 克隆系统利用 *Lgu* I (5'-GCTCTTC N'NNN-3') 和 *Bbv*C I (5'-CC'TNAGC-3') 酶切后可以产生相同非回文序列的性质, 灵活地将多个基因片段逐步定向融合到载体中。因此, 以 pBBR1MCS-3 为初始质粒, 在该质粒多克隆位点区插入含 *Lgu* I、*Bbv*C I 部分合并识别位点的 LB 片段 (GCTCTTCCTCAGC, 下划线表示二者均可识别的序列), 从而生成 LB 克隆系统 (构建流程如图 1 所示)。同时, 为避免产生移码突变, 在设计目的基因扩增引物时, 在 *Bbv*C I 酶切位点上游添加 T 碱基, 使连接后两个融合基因之间形成 TCCTCA 的 Scar 序列, 编码含有两个丝氨酸的连接子 (linker)。

利用一对含有 LB 片段及其反向互补序列的引物 LB-F/LB-R, 扩增质粒用于改造多克隆位点区域, 引入 *Lgu* I 和 *Bbv*C I 识别位点, 根据本实验室对 *Sphingomonas* sp. WG 全基因组测序结果分析, 分别设计两对引物 *welB*-F/

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)
LB-F	AAAGCTCTTCCTCAGCGGGGATCCACTAGTTCT	34
LB-R	TTTGCTGAGGAAGAGCCTGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATC	48
<i>welB</i> -F	AAAGCTCTTCCTCAATGTTGCGCAAGTCCG	30
<i>welB</i> -R	AAAGCTGAGGAGAAGGCGTTGGAGTGGAC	29
<i>welK</i> -F	AAAGCTCTTCCTCAATGGCGGAACAGAGCGACGCGGAT	38
<i>welK</i> -R	AAAGCTGAGGATCGCTTCGCTCCCCATTTGGC	32
M13-F	ATTAACCTCACTAAAG	17
M13-R	AATACGACTCACTATAG	17
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	20
T3	ATTAACCTCACTAAAGGGA	20
pMCS3-F	GCGGCGAGCTCTTGTAAGCGTTAATATTTTG	31
pMCS3-R	ACGGGTACCAATTGCGTTGCGCTCACTGC	29

The underlined parts of primer LB-F and LB-R indicate reverse complemented sequences; the underlined parts of primer *welB*-F and *welK*-F indicate *Lgu* I recognition site; the underlined parts of primer *welB*-R and *welK*-R indicate *Bbv*C I recognition site.

或 *Bbv*C I 单酶切对重组质粒进行初步验证,由生工生物工程(上海)股份有限公司对验证正确的质粒进行双向测序,测序引物为 T7/T3,测序结果比对由 DNAMAN 完成。

1.2.3 单基因重组载体的构建

将菌株 *Sphingomonas* sp. WG 在 Luria-Bertani 培养基中 28 ℃、165 r/min 培养过夜,利用细菌基因组提取试剂盒提取全基因组 DNA。以基因组为模板,分别以 *welB*-F/*welB*-R、*welK*-F/*welK*-R 为引物,利用 KOD FX DNA 聚合酶进行 PCR 扩增,得到目的基因 *welB* 和 *welK*。分别将目的基因利用 *Lgu* I 和 *Bbv*C I 进行双酶切,经凝胶电泳分离、胶回收试剂盒处理后得到双酶切的纯化产物;将 LB 克隆载体 pBBR1MCS-3-LB 利用限制酶 *Lgu* I 或 *Bbv*C I 进行单酶切并进行纯化,随后利用碱性磷酸酶 (CIAP) 处理,以减少载体自连;最后,将线性化载体与双酶切后的目的片段利用 T4 DNA 连接酶进行过夜连接。

连接产物转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α , 转化

及筛选方法与 1.2.2 中所述方法一致。分别以获得的重组质粒为模板,利用扩增目的基因的相应引物进行 PCR 扩增,以对重组质粒进行鉴定,将初步鉴定正确的质粒进行双向测序比对验证。

1.2.4 双基因融合载体的构建

在双基因融合载体构建过程中,当以重组质粒 pBBR1MCS-3-LB-*welK* 为载体时,若利用限制酶 *Lgu* I 单酶切载体,通过连接酶可将双酶切的 *welB* 基因克隆至 *welK* 基因上游,得到重组质粒 pBBR1MCS-3-LB-*welBK*;若以限制酶 *Bbv*C I 单酶切该载体,则可在 *welK* 下游插入 *welB* 基因,得到重组质粒 pBBR1MCS-3-LB-*welKB*。同样,以质粒 pBBR1MCS-3-LB-*welB* 为载体,选择 *Lgu* I 或 *Bbv*C I 酶切载体,也可以获得对应的不同连接顺序的双基因融合表达载体(图 1)。本研究选择 pBBR1MCS-3-LB-*welK* 为载体,按照 1.2.3 中所述具体方法进行质粒单酶切、目的片段双酶切,二者经连接及转化得到重组子,通过 PCR 验证以及基因双向测序验证。

1.2.5 重组 *Sphingomonas* sp. WG 菌株的构建

将受体菌 *Sphingomonas* sp. WG 接种于 Luria-Bertani 液体培养基中, 28 °C 培养约 24 h, 辅助菌 *E. coli*/pRK2013、供体菌 *E. coli*/pBBR1MCS-3-LB-*welBK* 和 *E. coli*/pBBR1MCS-3-LB-*welKB* 分别接种于含有浓度为 50 µg/mL 卡那霉素和 10 µg/mL 四环素的 Luria-Bertani 培养基中, 37 °C 培养 12–16 h。

取 25 mL 菌液于 5 000 r/min 离心 10 min 得到菌体, 用 Luria-Bertani 培养基洗涤菌体 2–3 次后重悬于 100 µL Luria-Bertani 培养基中。将 3 种菌悬液按 3 : 1 : 1 (受体菌 : 辅助菌 : 供体菌) 充分混合并置于 Luria-Bertani 固体培养基的滤膜上, 将平板在 37 °C 下孵育 24 h 接合培养。将菌液重悬于 800 µL Luria-Bertani 液体培养基中, 取 50 µL、100 µL、150 µL 菌液分别涂布于含有 50 µg/mL 链霉素和 10 µg/mL 四环素的 Luria-Bertani 固体培养基平板上培养 3–5 d 至长出单菌落。挑取单菌落于含有 10 µg/mL 四环素的 Luria-Bertani 液体培养基中, 28 °C 培养直至菌液浑浊, 对筛选得到的重组子利用水煮法提取总遗传物质, 以总遗传物质为模板, 利用引物对 pMCS3-F/pMCS3-R 扩增质粒 pMCS3 片段, 并对 PCR 扩增得到的片段进行单酶切, 对重组菌株进行验证, 将获得重组菌株命名为 *Sphingomonas* sp. WG/pBBR1MCS-3-LB-*welBK* 及 *Sphingomonas* sp. WG/pBBR1MCS-3-LB-*welKB*。

1.2.6 基因融合对鞘氨醇胶合成过程的影响

为研究基因融合表达产物对鞘氨醇单胞菌生产鞘氨醇胶的影响, 对野生株与重组菌株进行发酵验证。将重组菌株接种于终浓度为 10 µg/mL 四环素的 LB 培养基中活化, 然后转接入含相同浓度四环素的种子培养基中, 最后按照 5% 的接种量接种至 50 mL 发酵培养基中, 32.5 °C、175 r/min 分别培养 36、60、84 h, 根据周万龙

等^[22]的方法, 利用紫外分光光度计在 OD_{600} 条件下测定生物量、利用旋转粘度计 (LV-3 转子, 1 r/min) 测定发酵液粘度、借助生物传感分析仪测定发酵液中残糖、通过硫酸苯酚法测定总糖含量等。

1.2.7 鞘氨醇胶样品分析

选取发酵 84 h 的发酵液, 利用乙醇沉淀等^[21]方法进行鞘氨醇胶样品纯化, 对纯化得到的鞘氨醇胶进行糖醛酸含量、O-乙酰基含量以及单糖组成含量进行测定。糖醛酸含量的测定选用硫酸-咔唑法^[23], O-乙酰基含量的测定与陈玲等^[24]所述方法一致。鞘氨醇胶利用三氟乙酸水解, 然后经过糖腈乙酸酯衍生化处理, 利用气相色谱法分析鞘氨醇胶中单糖组成^[22], 色谱条件如下: 色谱柱 HP-5, 检测器为 FID 检测器。程序升温: 初温 150 °C, 保留 4 min, 升温至 250 °C (8 °C/min), 保留 5 min, 检测器温度 300 °C, 载气 N_2 , 分流进样, 分流比为 1 : 10, 进样量 1 µL。

2 结果与分析

2.1 LB 克隆质粒 pBBR1MCS-3-LB 的鉴定

挑取筛选得到的重组子并提取质粒 DNA, 经限制性内切酶 *Lgu* I 单酶切得到 5 300 bp 大小的目的条带 (图 2), 同时利用通用引物 T7/T3 对单酶切验证得到的质粒进行双向测序验证, 测序结果由 DNAMAN 对比完成。测序结果 (图 3) 表明, 在质粒 pBBR1MCS-3 的 *Sam* I 限制酶位点处正确插入 13 bp 的 LB 序列, 成功构建得到 pBBR1MCS-3-LB 质粒。

2.2 单基因重组表达载体的鉴定

以提取的单基因重组表达载体为模板, 分别利用 *welB*-F/*welB*-R、*welK*-F/*welK*-R 引物, 扩增 *welB* 和 *welK* 基因片段, 由图 4 可知, 可扩增得到 1 335 bp 和 1 047 bp 目的条带, 初步判

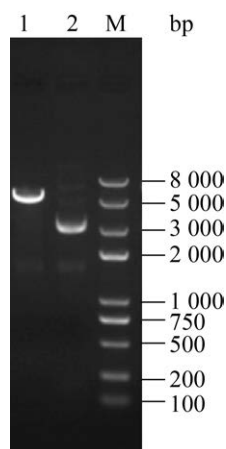


图2 质粒 pBBR1MCS-3-LB 的酶切验证

Figure 2 Verification of pBBR1MCS-3-LB by restriction enzyme digestion. M: DNA marker D8000; 1: pBBR1MCS-3-LB digested by *Lgu* I; 2: pBBR1MCS-3-LB plasmid.

断应为正确的重组质粒。将 PCR 验证正确的重组质粒利用通用引物 T7/T3 进行双向测序验证, 结果表明 *welB*、*welK* 均成功插入 pBBR1MCS-3-LB 质粒中, 得到重组质粒 pBBR1MCS-3-LB-*welB* 以及 pBBR1MCS-3-LB-*welK*。

2.3 双基因融合表达载体的鉴定

提取重组质粒为模板, 以 *welB*-F/*welK*-R 和 *welK*-F/*welB*-R 为引物, PCR 扩增插入目的片段 *welBK* 和 *welKB*。琼脂糖凝胶电泳结果表明, PCR 扩增均可得到大小为 2 382 bp 的条带, 与预期大小相符, 初步判断获得重组载体 (图 5A-B)。实验结果与测序结果均表明双基因融合表达载体 pBBR1MCS-3-LB-*welBK* 和 pBBR1MCS-3-LB-*welKB* 构建成功。

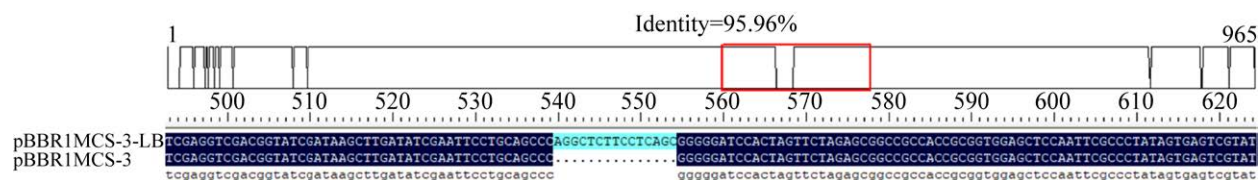


图3 LB 片段与原始序列对比结果

Figure 3 Comparison of the LB sequence and the original sequence.

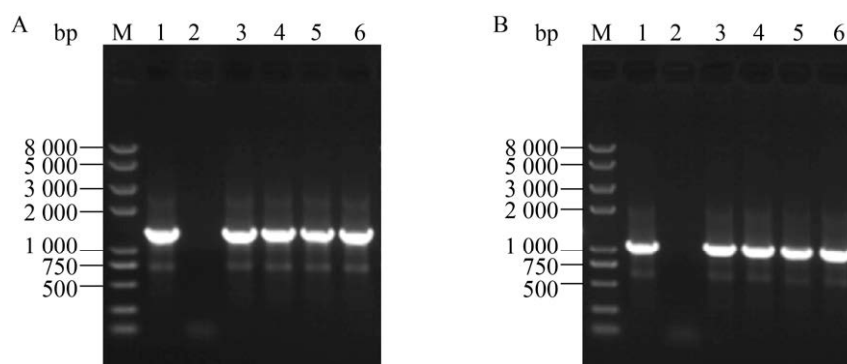


图4 质粒 pBBR1MCS-3-LB-*welB* (A) 和 pBBR1MCS-3-LB-*welK* (B) 的验证

Figure 4 Identification of the plasmids pBBR1MCS-3-LB-*welB* and pBBR1MCS-3-LB-*welK*. (A) PCR using primer pairs of *welB*-F/*welB*-R to identify the pBBR1MCS-3-LB-*welB*. M: DNA marker D8000; lane 1: genome of *Sphingomonas* sp. WG; lane 2: empty vector pBBR1MCS-3; lane 3-6: recombinant plasmid. (B) PCR using primer pairs of *welK*-F/*welK*-R to identify the pBBR1MCS-3-LB-*welK*. M: DNA marker D8000; lane 1: *Sphingomonas* sp. WG; lane 2: empty vector pBBR1MCS-3; lane 3-6: recombinant plasmid.

2.4 融合基因在 *Sphingomonas* sp. WG 中表达与鉴定

双基因融合构建得到重组质粒, 经三亲杂交的方法转入野生型鞘氨醇单胞菌中, 采用水煮法提取两株重组鞘氨醇单胞菌中的总遗传物质, 以遗传物质为模板, pMCS3-F/pMCS3-R 为引物扩增质粒 pMCS3 区, 得到 4 500 bp 左右的

清晰条带 (图 6A、图 7A)。pMCS3 区再经 *Bam*H I 单酶切得到特异性条带, 大小分别约为 1 100 bp 和 3 300 bp 的条带 (图 6B、图 7B), 上述实验结果均与预期结果相符。与此同时, 利用扩增位点位于多克隆位点上/下游的引物 M13-F/M13-R 分别扩增包含 *welBK*、*welKB* 基因在内的片段, 从电泳图中可以看到成功扩增

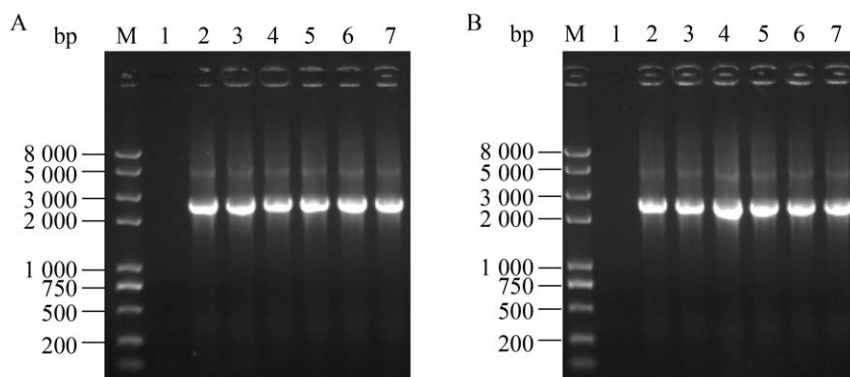


图 5 质粒 pBBR1MCS-3-LB-*welBK* (A) 和 pBBR1MCS-3-LB-*welKB* (B) 的验证

Figure 5 Identification of the plasmids pBBR1MCS-3-LB-*welBK* and pBBR1MCS-3-LB-*welKB*. (A) PCR using primer pairs of *welB*-F/*welK*-R to identify the pBBR1MCS-3-LB-*welBK*. M: DNA marker D8000; lane 1: empty vector pBBR1MCS-3; lane 2–7: recombinant plasmid. (B) PCR using primer pairs of *welK*-F/*welB*-R to identify the pBBR1MCS-3-LB-*welKB*. M: DNA marker D8000; lane 1: empty vector pBBR1MCS-3; lane 2–7: recombinant plasmid.

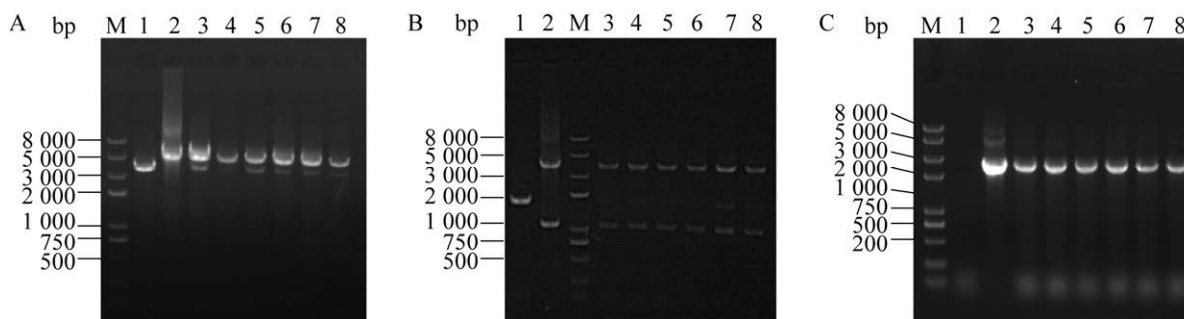


图 6 重组菌株 *Sphingomonas* sp. WG/pBBR1MCS-3-LB-*welBK* 的验证

Figure 6 Identification of the recombinant strain *Sphingomonas* sp. WG/pBBR1MCS-3-LB-*welBK*. (A) PCR product of pMCS3. M: DNA marker D8000; lane 1–6: recombinant strain; lane 7: genome of *Sphingomonas* sp. WG; lane 8: pBBR1MCS-3-*welBK*. (B) pMCS3 fragment digested by *Bam*H I. M: DNA marker D8000; lane 1: *Bam*H I digested PCR products amplified by *Sphingomonas* sp. WG; lane 2: *Bam*H I digested pMCS3 fragment amplified by pBBR1MCS-3-*welBK*; lane 3–8: *Bam*H I digested pMCS3 fragment amplified by recombinant strain. (C) PCR product of *welBK*. M: DNA marker D8000; lane 1: *Sphingomonas* sp. WG; lane 2: pBBR1MCS-3-*welBK*; lane 3–8: recombinant strain.

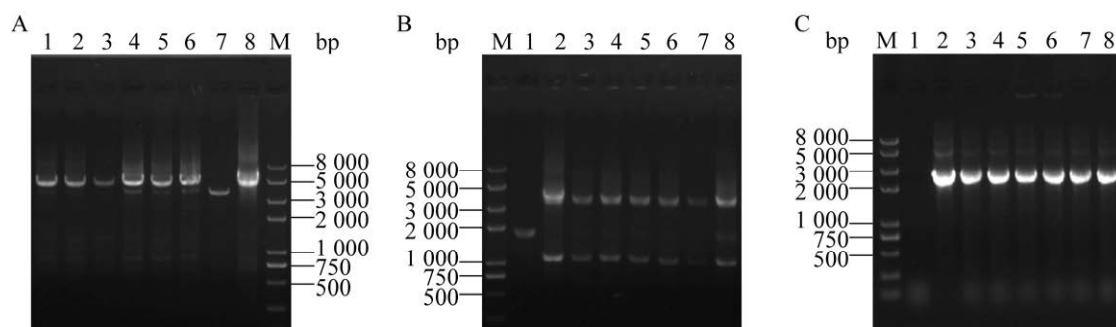


图7 重组菌株 *Spingomonas* sp. WG/pBBR1MCS-3-LB-*welKB* 的验证

Figure 7 Identification of the recombinant strain *Spingomonas* sp. WG/pBBR1MCS-3-LB-*welKB*. (A) PCR product of pMCS3. M: DNA marker D8000; lane 1: genome of *Spingomonas* sp. WG; lane 2: pBBR1MCS-3-*welKB*; lane 3–8: recombinant plasmid. (B) pMCS3 fragment digested by *Bam*H I. lane 1: *Bam*H I digested pMCS3 fragment amplified using *Spingomonas* sp. WG as the template; lane 2: *Bam*H I digested pMCS3 fragment amplified using pBBR1MCS-3-*welKB* as the template; M: DNA marker D8000; lane 3–8: *Bam*H I digested pMCS3 fragment amplified using recombinant plasmid. (C) PCR product of *welKB*. M: DNA marker D8000; lane 1: *Spingomonas* sp. WG; lane 2: pBBR1MCS-3-*welKB*; lane 3–8: recombinant plasmid.

出约 2 400 bp 的目的条带 (图 6C、图 7C)。上述结果均表明重组菌株 *Spingomonas* sp. WG/pBBR1MCS-3-LB-*welKB* 以及 *Spingomonas* sp. WG/pBBR1MCS-3-LB-*welKB* 构建成功。

2.5 基因融合对鞘氨醇胶发酵的影响

通过检测发酵过程中生物量的变化可以发现,随着发酵时间延长,60 h 后野生株逐渐进入衰亡期,生物量出现下降趋势。不同于野生株,在 84 h 的发酵过程中,重组菌株一直处于稳定期。同野生株相比,重组菌株的生物量较低,尤其是 *Spingomonas* sp. WG/pBBR1MCS-3-LB-*welKB*,生物量要低于其他菌株 (图 8A)。随着发酵进行,菌株代谢产酸,导致菌株发酵液 pH 均逐渐下降 (图 8B),其中,重组菌株 *Spingomonas* sp. WG/pBBR1MCS-3-LB-*welKB* 的 pH 值在 36 h 和 84 h 时都高于其他菌株,这可能是由于该菌株生物量较低,代谢产酸少,导致 pH 变化较小。

随着发酵时间的延长,鞘氨醇胶不断积累,到发酵过程结束时,重组菌株与野生株鞘氨醇

胶积累量同时达到最大 (图 8C),三者不存在显著差异。高粘度发酵是鞘氨醇胶发酵的一个非常重要的特征,随着鞘氨醇胶的积累,发酵液粘度不断提升。但是,重组菌株 *Spingomonas* sp. WG/pBBR1MCS-3-LB-*welKB* 在发酵过程中发酵液粘度显著高于其他菌株 (图 8D),在发酵 84 h 时,其发酵液粘度较野生株提高约 24.7%,与该菌株相反,在发酵 60 h 时,重组菌株 *Spingomonas* sp. WG/pBBR1MCS-3-LB-*welKB* 的发酵液粘度要低于野生株。

2.6 基因融合表达对鞘氨醇胶的影响

糖醛酸含量、O-乙酰基含量以及单糖组成如表 2 所示。鞘氨醇胶 WT、BK 和 KB 糖醛酸的含量分别为 12.72%、12.90%和 12.53%,结果表明 *welBK* 和 *welKB* 基因融合表达对鞘氨醇胶糖醛酸含量影响较小;而重组菌株产鞘氨醇胶中的乙酰基含量较野生株分别上升 40.45%和 22.31%。鞘氨醇胶 BK 中甘露糖占比明显提升,葡萄糖含量存在下降趋势,而多糖 KB 中鼠李糖占比下降,甘露糖与半乳糖含量明显上升。

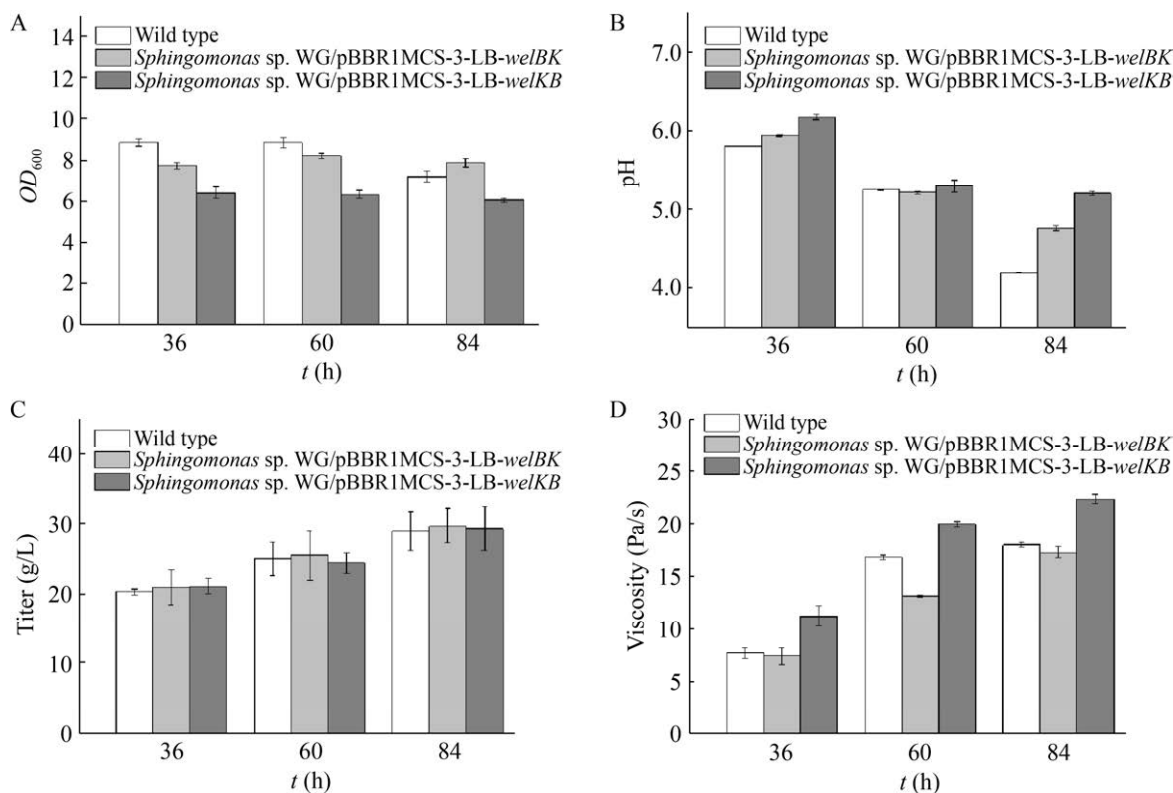


图 8 发酵参数比较

Figure 8 Comparision of fermentation parameters. (A) OD_{600} . (B) pH. (C) Titer. (D) Viscosity.

表 2 鞘氨醇胶组分分析

Table 2 Components analysis of sphingans

Project	WT	BK	KB
Uronic acid (%)	12.72	12.90	12.53
O-acetyl (%)	5.29	7.43	6.47
Molar ratio of (Man:Glu:Rha:Gal)	1:10.89:15.87:0.56	1:5.80:8.88:0.29	1:6.82:9.47:0.43

鞘氨醇胶化学组成的区别可能与 WelB 和 WelK 的融合顺序有关, 融合顺序不同导致融合酶中各亚基活性也存在区别, 从而导致单糖组成发生变化, 可能是双功能酶表达对碳代谢流量造成影响, 该假设还需要进一步实验验证。

3 讨论

基因融合技术是构建多功能酶的一种有效手段^[25], 但是对于重组 DNA 技术来说, 插入基因的数目及连接顺序受到限制性核酸内切酶

位点的制约, 要改变基因融合方向需要设计大量包含不同限制性内切酶识别位点的引物, 程序复杂且工作量大; 而 PCR 技术由于 DNA 聚合酶的扩增极限、长基因片段的保真性等因素限制了其在多基因融合中的应用^[20]。Golden Gate 克隆利用 IIS 型限制性内切酶, 克服了重组 DNA 技术及 PCR 技术的缺点, 能够进行高效基因融合, 但是, 目的基因的插入顺序是相对固定的, 且连接后限制性内切酶的识别位点会消失。同 Golden Gate 技术相比, LE 克隆和

LB 克隆仅利用一对能够产生相同非回文序列的限制性内切酶, 每个目的基因仅需要设计一对引物即可实现多步基因融合, 这是因为基因融合后酶切位点会被保留, 在下一步克隆中可以利用相同的酶切位点对中间克隆进行进一步修饰, 灵活地将同一个入门克隆中的目的基因以不同的顺序融合进入下一个目的克隆中; 此外, 融合基因间产生的短氨基酸 linker (两个丝氨酸), 已被证明具有高度柔性并可以作为 linker 使用^[26]。同 LE 克隆多适用于大肠杆菌等常用的基因工程菌株相比, LB 克隆使用广宿主载体, 该载体属于 pBBR1MCS 系列载体, 已报道可以在木醋杆菌 (*Acetobacter xylinum*)、真养产碱菌 (*Alcaligenes eutrophus*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholera*)、*Sphingomonas* sp.、野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) 等多种微生物中使用, 使用范围更广^[27]。同时, LB 克隆载体也适用于多基因融合。我们采用 LB 克隆系统构建了多种不同的双基因融合载体, 在此基础上, 将双片段融合基因以不同顺序插入双基因融合载体, 快速高效地获得了多个具有不同融合顺序的四基因融合载体, 证明该系统可以有效地将多个基因进行快速灵活地融合^[28]。LB 克隆系统的效率受到限制性内切酶活性、目的片段与载体比例以及载体的去磷酸化程度的影响。为保证酶切的高效进行, 要选用高效的内切酶。同时, 随着融合基因数目的增加, 片段与载体有效连接的效率也会降低, 因此, 可以将摩尔比由常规的 3:1-10:1 扩大到 10:1-100:1, 连接效率会大幅提高。此外, 由于选择单酶切进行载体线性化, 载体自连的概率较大, 利用碱性磷酸酶处理线性化的载体, 也能够有效地提高克隆效率。

以 *Sphingomonas* sp. WG 为实验对象, 对

LB 克隆体系进行验证, 结果表明该克隆系统可以有效应用于鞘氨醇单胞菌中。此外, 不同的基因融合顺序对鞘氨醇胶生产存在影响。尽管两个重组菌株的鞘氨醇胶产量均没有显著提升, 但是, 菌体生长和发酵液粘度有所区别。重组菌株 *Sphingomonas* sp. WG/pBBR1MCS-3-LB-welBK 菌体生长受影响较小、但发酵液粘度降低; *Sphingomonas* sp. WG/pBBR1MCS-3-LB-welKB 生长较慢、但是发酵液粘度明显上升。通常来讲, 鞘氨醇胶含量越高, 溶液粘度越高。但是, 重组菌株在产量相同的情况下粘度仍有较大区别, 这可能是由于鞘氨醇胶的分子量及结构组成不同引起的。粘度同分子量密切相关, 分子量变化会引起多糖粘度的变化。通过基因工程策略可以获得分子量较低而导致粘度降低的胞外多糖^[11]。凝胶渗透色谱测定分子量结果显示, KB 的分子量显著高于 WT 和 BK, 说明发酵液粘度的升高可能是由于分子量的升高引起的。此外, 丙酮酸化和乙酰化的程度也会影响其粘度, 丙酮酸化程度越高, 粘度越高, 而乙酰化程度越高, 粘度越低^[29]。重组菌株所产鞘氨醇胶的乙酰化程度较高, 可能会导致粘度降低, 因此, 尽管 BK 的分子量略高于野生株, 但是发酵液的粘度较野生株略有下降。基因融合顺序带来的影响可能与多功能酶中各亚基的构象有关。通常, 合适的融合顺序可以使多酶复合体中功能模块独立运转, 避免各亚基空间构象相互干扰, 从而稳定蛋白构象, 提高催化性能。因此, 融合蛋白连接的先后顺序对蛋白质的构象稳定有影响, 从而影响多酶复合体的功能^[25,30]。Neddersen 等^[31]通过 LE 克隆的方法将内切葡聚糖酶 Cel5A (C) 和 β -葡萄糖苷酶 Bgl1 (B) 构建为两个不同融合顺序的纤维素融合酶 BC 和 CB, CB 底物特异性降低, 而 BC

表现出优于两种酶混合体系的催化活性。

鞘氨醇胶是一种高分子化合物,在低浓度时,可以通过与水分子相互作用而增加溶液的粘度,当浓度增大时,多糖分子之间发生相互作用,缠绕成网状结构,从而使粘度大大增加^[32]。粘度是粘性多糖非常重要的性质,较高的粘度将会促进多糖在三次采油、食品、水泥等领域的应用。Galvan 等^[11]在野油菜黄单胞菌中将糖基转移酶 GumB 和 GumC 同时表达,结果表明二者共同过表达可调节黄原胶链长,黄原胶样品的特性粘度与野生型样品相比增加了 47%。重组菌株 *Sphingomonas* sp. WG/pBBR1MCS-3-LB-*welKB* 表现出发酵液高粘度的特点,对于该鞘氨醇胶在三次采油等领域进一步应用具有重要影响。

4 结论

设计并利用 LB 克隆系统,构建得到两株重组鞘氨醇单胞菌菌株,二者表达不同融合顺序的多酶复合体,重组菌株 *Sphingomonas* sp. WG/pBBR1MCS-3-LB-*welKB* 发酵液粘度显著提升。LB 克隆具备高效筛选特性,能够在短时间内对多基因、多方向融合的重组菌株进行筛选,有望快速得到性质更为优良的重组菌株。同时, LB 克隆载体是基于广宿主载体 pBBR1MCS-3 设计,不仅可用于鞘氨醇单胞菌的改造,也可以扩展到其他生物体,是一种高效、便捷地实现多基因融合的克隆方法,应用前景广阔,是对多种天然菌株进行基因工程改造的有力工具。

REFERENCES

- [1] Fialho AM, Moreira LM, Granja AT, et al. Occurrence, production, and applications of gellan: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 79: 889-900.
- [2] Schmid J, Sperl N, Sieber V. A comparison of genes involved in sphingane biosynthesis brought up to date. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(18): 7719-7733.
- [3] 黄海东, 刘云, 刘如林. 合成生物聚合物的重要微生物资源-鞘氨醇单胞菌. *微生物学报*, 2009, 49(5): 560-566.
Huang HD, Liu Y, Liu RL. *Sphingomonas* sp.: an important microbial resource for biopolymer synthesis. *Acta Microbiol Sin*, 2009, 49(5): 560-566 (in Chinese).
- [4] Rehm BH. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(8): 578-592.
- [5] Liu XL, Lin LJ, Xu XY, et al. Two-step economical welan gum production by *Sphingomonas* sp. HT-1 from sugar industrial by-products. *Carbohydr Polym*, 2018, 181: 412-418.
- [6] Li H, Xu H, Li S, et al. Optimization of exopolysaccharide welan gum production by *Alcaligenes* sp. CGMCC2428 with Tween-40 using response surface methodology. *Carbohydr Polym*, 2012, 87(2): 1363-1368.
- [7] Li H, Xu H, Li S, et al. Strain improvement and metabolic flux modeling of wild-type and mutant *Alcaligenes* sp. NX-3 for synthesis of exopolysaccharide welan gum. *Biotechnol Bioproc E*, 2010, 15(5): 777-784.
- [8] Zhang W, Chen Z, Wu M, et al. Improved production of carotenoid-free welan gum in a genetic-engineered *Alcaligenes* sp. ATCC31555. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(6): 991-997.
- [9] Huang HD, Li XY, Wu MM, et al. Cloning, expression and characterization of a phosphoglucomutase/phosphomannomutase from sphingane-producing *Sphingomonas sanxanigenens*. *Biotechnol Lett*, 2013, 35(8): 1265-1270.
- [10] Li N, Huang Y, Liu Z, et al. Regulation of EPS production in *Lactobacillus casei* LC2W through metabolic engineering. *Lett Appl Microbiol*, 2015, 61(6): 555-561.
- [11] Galvan EM, Ielmini MV, Patel YN, et al. Xanthan chain length is modulated by increasing the availability of the polysaccharide copolymerase protein GumC and the outer membrane polysaccharide export protein GumB. *Glycobiology*, 2013, 23(2): 259-272.
- [12] Elleuche S. Bringing functions together with fusion enzymes—from nature's inventions to biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(4): 1545-1556.

- [13] Lerchner A, Daake M, Jarasch A, et al. Fusion of an alcohol dehydrogenase with an aminotransferase using a PAS linker to improve coupled enzymatic alcohol-to-amine conversion. *Protein Eng Des Sel*, 2016, 29(12): 557-562.
- [14] Li H, Jiao X, Sun Y, et al. The preparation and characterization of a novel sphingan WL from marine *Sphingomonas* sp. *WG. Sci Rep*, 2016, 6: 37899.
- [15] Li H, Feng ZM, Sun YJ, et al. Draft genome sequence of *Sphingomonas* sp. WG, a welan gum-producing strain. *Genome Announc*, 2016, 4(1): e01709-15.
- [16] 孙亚杰. 关键酶过表达对威兰胶合成的影响[D]. 青岛: 中国石油大学(华东), 2017.
- Sun YJ. Effects of key enzyme overexpression on the synthesis of welan gum[D]. Qingdao: China University of Petroleum (East China), 2017 (in Chinese).
- [17] Li H, Li KH, Guo ZR, et al. The function of β -1, 4-glucuronosyltransferase WelK in the sphingan WL gum biosynthesis process in marine *Sphingomonas* sp. *WG. Mar Biotechnol*, 2021, 23(1): 39-50.
- [18] Liu ZL, Li HN, Song HT, et al. Construction of a trifunctional cellulase and expression in *Saccharomyces cerevisiae* using a fusion protein. *BMC Biotechnol*, 2018, 18(1): 43.
- [19] Elleuche S, Piascheck H, Antranikian G. Fusion of the OsmC domain from esterase EstO confers thermostability to the cold-active xylanase Xyn8 from *Pseudoalteromonas arctica*. *Extremophiles*, 2011, 15(2): 311-317.
- [20] Wang SZ, Zhang YH, Ren H, et al. Strategies and perspectives of assembling multi-enzyme systems. *Crit Rev Biotechnol*, 2017, 37(8): 1024-1037.
- [21] Marquardt T, Von Der Heyde A, Elleuche S. Design and establishment of a vector system that enables production of multifusion proteins and easy purification by a two-step affinity chromatography approach. *J Microbiol Methods*, 2014, 105: 47-50.
- [22] 周万龙. 鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas* sp. WG 发酵产威兰胶的研究[D]. 青岛: 中国石油大学(华东), 2017.
- Zhou WL. Study on the welan gum fermentation by *Sphingomonas* sp. WG[D]. Qingdao: China University of Petroleum (East China), 2017 (in Chinese).
- [23] 李亚平, 周鸿立. 多糖中糖醛酸含量测定方法的研究进展. *食品研究与开发*, 2019, 36(17): 214-218.
- Li YP, Zhou HL. Progress on determination content of uronic acid in polysaccharides. *Food Res Dev*, 2019, 36(17): 214-218 (in Chinese).
- [24] 陈玲, 汤丽昌, 王宁, 等. 海南库拉索芦荟的 *O*-乙酰基含量的测定. *食品研究与开发*, 2011, 32(2): 103-105.
- Chen L, Tang LC, Wang N, et al. Determination of the *O*-acetyl group from *Aloe vera* in Hainan. *Food Res Dev*, 2011, 32(2): 103-105 (in Chinese).
- [25] Aalbers FS, Fraaije MW. Enzyme fusions in biocatalysis: coupling reactions by pairing enzymes. *Chembiochem*, 2019, 20(1): 20-28.
- [26] Rizk M, Antranikian G, Elleuche S. End-to-end gene fusions and their impact on the production of multifunctional biomass degrading enzymes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 428(1): 1-5.
- [27] Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 1995, 166(1): 175-176.
- [28] 薛含. 基于多糖基转移酶基因融合表达的高产鞘氨醇胶生产菌株的构建[D]. 青岛: 中国石油大学(华东), 2021.
- Xue H. Construction of high-producing sphingans strain based on fusion expression of glycosyltransferases gene[D]. Qingdao: China University of Petroleum (East China), 2021 (in Chinese).
- [29] 郭中瑞. 鞘氨醇胶 WL 合成过程中限速酶的研究[D]. 青岛: 中国石油大学(华东), 2021.
- Guo ZR. Study on the rate-limiting enzymes in the synthesis of sphingan WL[D]. Qingdao: China University of Petroleum (East China), 2021 (in Chinese).
- [30] Zhang YH. Substrate channeling and enzyme complexes for biotechnological applications. *Biotechnol Adv*, 2011, 29(6): 715-725.
- [31] Neddersen M, Elleuche S. Fast and reliable production, purification and characterization of heat-stable, bifunctional enzyme chimeras. *AMB Express*, 2015, 5(1): 122.
- [32] 孙达锋, 张卫明, 张锋伦, 等. 瓜尔胶与结冷胶复配协效作用规律及粘度流变性研究. *中国野生植物资源*, 2017, 36(3): 10-13.
- Sun DF, Zhang WM, Zhang FL, et al. Study on the synergistic effect and rheological properties of guar gum and gellan gum. *Chin Wild Plant Resour*, 2017, 36(3): 10-13 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)