

黄色短杆菌 GDK-9 谷氨酸脱氢酶基因的克隆、序列分析及表达

邓培生 苏 静 谢希贤 徐庆阳 陈 宁*

(天津科技大学生物工程学院 天津工业微生物重点实验室 天津 300457)

摘要: 利用 PCR 技术从黄色短杆菌 GDK-9 的基因组 DNA 中扩增出谷氨酸脱氢酶基因(*gdh*)片段(EC.1.4.1.4), 连到 pUCm-T 载体上测序。核酸序列分析结果表明, 该片段全长 1927 bp, 包含一个 ORF, 推测此 ORF 区编码一条 448 个氨基酸的多肽, 分子量约为 48 kD。与已报道的 *gdh* 序列相似性为 99.55%, 其中 1190 位碱基(C→A)突变导致了编码氨基酸的变化(Thr→Asn), 其它的碱基变化不影响编码的氨基酸。将 *gdh* 基因克隆入穿梭质粒 pXMJ19 中, 并转化 *E. coli* XL-Blue 和 *Brevibacterium flavum* GDK-9, 经 IPTG 诱导后, SDS-PAGE 电泳结果显示, 在预计位置出现明显的诱导蛋白条带, 分子量约为 48.7 kD。谷氨酸发酵实验表明, 尽管谷氨酸脱氢酶 GDH 能明显提高胞内的谷氨酸含量, 但其不影响谷氨酸的分泌。

关键词: 谷氨酸脱氢酶, 基因克隆, 表达

Cloning, Sequence Analysis and Expression of Glutamate Dehydrogenase in *Brevibacterium flavum* GDK-9

DENG Pei-Sheng SU Jing XIE Xi-Xian XU Qing-Yang CHEN Ning*

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The glutamate dehydrogenase (EC.1.4.1.4) gene which amplified from the genome of *Brevibacterium flavum* GDK-9 by polymerase chain reaction was linked with pUCm-T for sequence alignment. Analysis of *gdh* sequences revealed that the whole sequence is 1927 bp, only one ORF existed, which used ATG as the initiation codon and coded a peptide of 448 amino acids with a calculated molecular weight of 48 kD. The comparability between the cloned *gdh* sequence to the reported sequence is high to 99.55%. Only the 1190th base mutation (C → A) lead to the change of amino acid sequence (Thr → Asn), the others are not. The recombinant plasmid pXG was then transformed into *E. coli* XL-Blue and *Brevibacterium flavum* GDK-9 which was induced by IPTG. SDS-PAGE analysis revealed that there was a clear induced protein band with molecular mass of 48.7 kD on expected position. Standard glutamate fermentations indicated that although the level of GDH increases the intracellular glutamate pool, the level of GDH has no influence on glutamate secretion.

Keywords: Glutamate dehydrogenase, Gene cloning, Expression

L-谷氨酸(L-glutamic acid)既是蛋白质的结构氨基酸之一, 又是游离氨基酸。在医药、食品、人造制革、化妆品工业及农业上具有广泛的用途。谷氨酸脱氢酶是谷氨酸产生菌合成谷氨酸代谢过程中的关键酶, 它能可逆性地催化 α -酮戊二酸和谷氨酸之间的还原性胺化和氧化性脱氨反应。为了进一步提高谷氨酸产量, 本实验室在原有工作基础上, 利用PCR技术从目前谷氨酸发酵工业上应用的主要生产菌黄色短杆菌GDK-9 中克隆了NADPH依赖型谷氨

酸脱氢酶 gdh 基因(EC.1.4.1.4)^[1], 构建了穿梭质粒pXG^[2], 并将其电转化进入黄色短杆菌GDK-9 中, 之后进行产酸验证。本实验为进一步提高谷氨酸产量奠定理论和实践基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本实验所用菌株和质粒见表 1。

表 1 菌株和质粒
Table 1 The strains and plasmids used in this work

菌株和质粒 Strains and plasmids	特征 Characteristics	来源 Sources
Strains		
<i>E. coli</i> XL-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1 lac⁻F'</i>	Stored in this lab
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	Wild Type	Stored in this lab
<i>Brevibacterium flavum</i> GDK-9 ^[3]	FA ^R KM ^R GL ^R SG ^R	Stored in this lab
Plasmids		
pUCm-T	T-vector, 2.7 kb, Amp ^R , <i>lacZ</i>	TaKaRa
pXMJ19	<i>C. glutamicum E. coli</i> shuttle vector, <i>plac</i> , <i>lacI^q</i> , Cm ^R	Stored in this lab
pUCG1	1.9 kb PCR fragment containing GDK-9 <i>gdh</i> gene in pUCm-T	This study
pUCG2	1.4 kb PCR fragment containing GDK-9 <i>gdh</i> gene in pUCm-T	This study
pXG	1.4 kb PCR fragment containing GDK-9 <i>gdh</i> gene in pXMJ19	This study

1.1.2 培养基: LB 培养基用于细菌培养。37 g/L 脑心浸提物及 91 g/L 山梨醇用于谷氨酸棒杆菌的电感受态细胞的培养。抗生素使用浓度为氨苄青霉素 100 μ g/mL, 氯霉素 30 μ g/mL。

1.1.3 试剂: 限制性内切酶, T4 DNA 连接酶, *Taq* DNA 聚合酶购于 TaKaRa 公司; DNA 片段纯化回收试剂盒、质粒小样快速提取试剂盒、细菌基因组提取试剂盒购于北京博大泰克生物公司; IPTG、X-gal、蛋白分子量标准、溶菌酶、氨苄青霉素及氯霉素购于北京索莱宝科技有限公司; SDS 为日本进口分装; β -巯基乙醇为 Elmerk 公司产品; Tris 为 Sigma 公司产品; N, N'-亚甲基双丙烯酰胺为 Fluka 公司产品; 蛋白胨、酵母粉为 Oxoid 公司产品; 山梨醇、甘露醇购于天津博美科生物技术有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物合成: 由上海生物工程技术服务有

限公司合成。

1.2.2 谷氨酸脱氢酶基因 gdh 的PCR扩增: 根据 GenBank 中 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 基因组序列, 设计引物P1、P2、P3^[4], 引物上分别添加酶切位点 *Hind* 和 *Xba* (下划线所示):

P1 : 5'-TGC~~GT~~TGTTCTAGCTAGCCTC -3';

P2 : 5'-GAGAAGCTTGGGAACGAGGAAATCATGAC-3';

P3 : 5'-GAGTCTAGAAAAGCGCAGGGGTCTTAGAT-3';

引物对 P1/P3 用于扩增 *Brevibacterium flavum* GDK-9 的 *gdh* 基因及上游部分序列; 引物对 P2/P3 用于扩增 GDK-9 基因序列。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。DNA 片段的回收、酶切、纯化、与载体的连接和转化等操作参见《分子克隆实验指南》。质粒的抽提按试剂盒说明书操作。

1.2.3 谷氨酸脱氢酶 gdh 基因的克隆与测序: PCR反应产物在 1.0%琼脂糖凝胶上电泳检测, 切下目的条带。用DNA凝胶回收试剂盒回收。以质粒pUCm-T为载体, 与回收的PCR产物直接进行连接, 连接产物转化感受态*E. coli* XL-Blue。在含IPTG(24 mg/mL)和X-gal(20 mg/mL)的Amp^r(100 μg/mL)的LB平板上37°C培养 16 h, 随机挑取白色菌落进行菌落PCR, 并提取质粒单酶切验证, 得到重组质粒pUCG1 和 pUCG2, 对重组质粒pUCG1 进行测序和序列分析。

1.2.4 重组 gdh 基因表达载体的构建: 分别用Hind和Xba 双酶切重组质粒pUCG2 和质粒pXMJ19^[5], 琼脂糖凝胶电泳回收酶切片段, 按照质粒DNA: 目的基因=1 :5 进行连接转化, 在氯霉素抗性平板上筛选转化子, 随机挑取单菌落进行菌落PCR验证, 之后提质粒单酶切验证^[6]。得到重组表达质粒pXG。

1.2.5 重组谷氨酸脱氢酶在大肠杆菌中的诱导表达: 经鉴定的阳性pXG重组质粒转化到*E. coli* XL-Blue中, 同时以空质粒pXMJ19 转化的*E. coli* XL-Blue作为对照^[7]。挑取单菌落到含有 30 μg/mL 氯霉素的LB液体培养基中, 37°C、200 r/min培养 16 h 后以 1%接种量转接至新鲜LB培养基中, 37°C培养至菌体光密度值 $OD_{600} \approx 0.6$ 时, 加入IPTG, 浓度分别为 0 mmol/L、0.2 mmol/L、0.4 mmol/L、0.6 mmol/L、0.8 mmol/L、1.0 mmol/L, 对照菌株中加入IPTG浓度为 0.8 mmol/L, 继续培养 6 h后, 取适量菌液进行SDS-PAGE蛋白电泳分析^[8]。

1.2.6 黄色短杆菌 GDK-9 的电转化法: 重组质粒pXG 电转化到*Brevibacterium flavum* GDK-9 中, 方法见参考文献^[9]。

1.2.7 谷氨酸脱氢酶对谷氨酸分泌量及细胞内谷氨酸含量的影响: 谷氨酸的分泌与培养基中生物素的含量密切相关, 生物素限量的条件下, 谷氨酸才能大量分泌, 因此, 本实验研究了分别在生物素亚适量和过量的情况下, 谷氨酸脱氢酶对细胞内和细胞外谷氨酸含量的影响。分别以转化的GDK-9 和未转化的GDK-9 进行产酸实验^[10], 以发酵 15 h时, 两

株菌的谷氨酸分泌量(mmol/g[dry wt])做为对比。胞内谷氨酸含量测定方法见参考文献^[11]。

2 结果与分析

2.1 谷氨酸脱氢酶基因 gdh 的PCR扩增及重组子鉴定

提取黄色短杆菌 GDK-9 的基因组 DNA 为模板, 采用引物对 P1/P3, 扩增出一条约 1.9 kb 大小的 DNA 片段。回收 PCR 产物与载体 pUCm-T 连接, 转化 *E. coli* XL-Blue, 涂布在含 IPTG(24 mg/mL)和 X-gal(20 mg/mL)的 Amp^r(100 μg/mL)的 LB 平板上 37°C 培养 16 h, 随机挑取白色菌落进行菌落 PCR, 并提质粒进行 Xba 单酶切验证, 酶切片段与预期相符。对重组质粒 pUCG1 进行测序和序列分析。采用引物对 P2/P3, 以黄色短杆菌 GDK-9 染色体 DNA 为模板 PCR 扩增出一条约 1.4 kb 大小的 DNA 片段, 之后与载体 pUCm-T 连接, 得到重组质粒 pUCG2。

2.2 谷氨酸脱氢酶基因 gdh 序列分析

随机挑取 pUCG1 的 2 个阳性克隆, 对插入片段进行测序, 结果一致。2 个阳性克隆的插入片段均长为 1927 bp, 序列分析显示, 仅含有 1 个 ORF (1344 bp), 起始密码子为 ATG, 终止子为 TAA。在起始密码子上游 8 bp 有一个典型的核糖体结合位点 AGG。推测此 ORF 编码一条 448 个氨基酸的多肽, 分子量为 48 kD。与已报道的 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032(gdh)序列比对分析结果如图 1 所示, 核苷酸相似性为 99.55%, GDK-9 的 gdh 基因共有 6 处发生碱基取代, 其中只有 1 个碱基取代引起编码氨基酸的改变, 即 1190 位 C 替换为 A, 即对应编码的氨基酸由 T(苏氨酸)变为 N(天门冬酰胺), 其他 5 种碱基变化均未引起编码氨基酸的变化, 属于沉默突变。

2.3 带有 gdh 基因的重组质粒构建

用 Hind 和 Xba 双酶切 pUCG2 重组质粒, 回收 1.4 kb 片段与用相同酶切 pXMJ19 得到的大片段相连, 转化 *E. coli* XL-Blue, 涂布在加有氯霉素的

	386		405
	N A S R D S W S F E Y N D E R L Q V I M		
GDK-9	AACGCTTCGCGCGATTCTGGAGCTTCGAGTACAACGACGAGCGCCTCCAGGTGATCATG		
ATCC 13032	AACGCTTCGCGCGATTCTGGAGCTTCGAGTACACCGACGAGCGCCTCCAGGTGATCATG		
	N A S R D S W S F E Y T D E R L Q V I M		
	386		405

图 1 测序比对结果

Fig. 1 The result of sequence alignment

LB 培养基平板上, 挑取转化子。提质粒酶切鉴定重组子。结果见图 2, 与预期一致。将此重组质粒命名为 pXG。将该重组质粒转化 *E. coli* XL-Blue, 得到重组子 XL-Blue(pXG); 电击转化 *Brevibacterium flavum* GDK-9 得到重组子 GDK-9(pXG)。

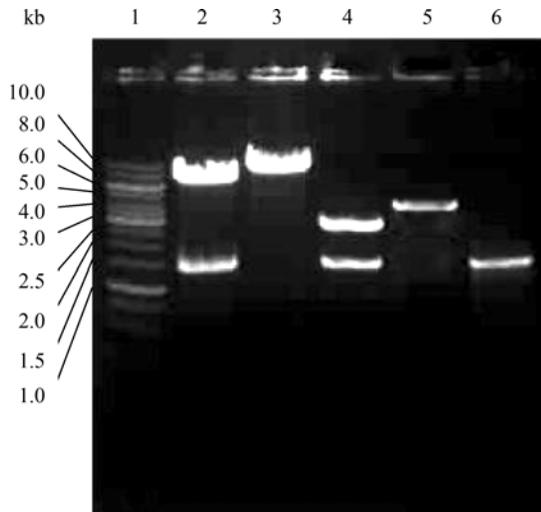


图 2 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳及质粒 pUCG2 和 pXG 酶切验证

Fig. 2 Agarose gel electrophoretogram of PCR product and restriction endonuclease digested plasmid pUCG2 and pXG

Note: 1: 1 kb marker; 2: The plasmid pXG digested by *Hind* III + *Xba* I ; 3: The plasmid pXG digested by *Hind* III ; 4: The plasmid pUCG2 digested by *Hind* III + *Xba* I ; 5: The plasmid pXG digested by *Hind* III ; 6: PCR product of *gdh* from GDK-9.

2.4 谷氨酸脱氢酶在大肠杆菌中的表达

SDS-PAGE 分析结果如图 3 所示。经不同浓度的 IPTG 诱导后, 在 48 kD 处均出现一条很明显的诱导蛋白条带, 未诱导的和对照菌株均无此条带。谷氨酸脱氢酶包含 448 个氨基酸, 预计其分子量大约为 48 kD。结果与预期相符, 说明 GDH 蛋白获得诱导表达。另外不同浓度 IPTG 诱导的蛋白条带量相差不明显, 说明低浓度 IPTG 即可诱导 GDH 高效表达。

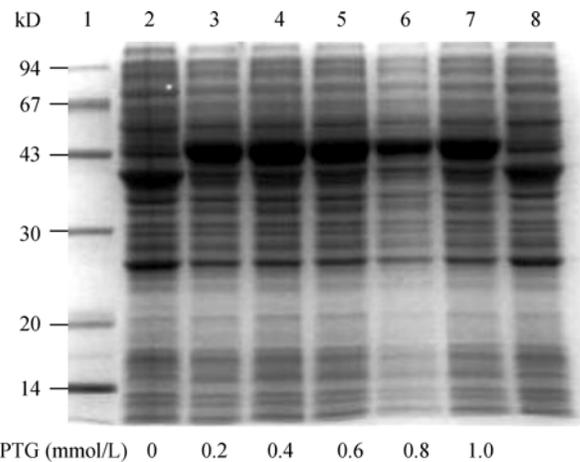


图 3 SDS-PAGE 分析重组蛋白表达

Fig. 3 SDS-PAGE(10%) analysis of expression of the protein GDH

Note: 1: Protein marker; 2-7: *E. coli* XL-Blue (pXG) induced by IPTG from 0 mmol/L to 1.0 mmol/L; 8: Non-induced *E. coli* XL-Blue (pXMJ19).

2.5 谷氨酸脱氢酶对谷氨酸分泌量及细胞内谷氨酸含量的影响

将质粒 pXG 电转化到 *Brevibacterium flavum* GDK-9 中, 提质粒酶切鉴定, 大小与预期相符。分别对 GDK-9 和重组子 GDK-9(pXG) 进行发酵实验, 由表 2 可知, 两株菌的谷氨酸分泌量几乎均为 19 mmol/g(dry wt), 表明谷氨酸脱氢酶对谷氨酸的分泌没有影响, 同时其活性的提高不会影响谷氨酸的分泌。生物素限量和过量的情况下, 重组子 GDK-9(pXG) 中谷氨酸含量均明显高于 GDK-9, 说明谷氨酸脱氢酶与提高细胞内谷氨酸含量密切相关。同时, 胞内和胞外谷氨酸含量之间没有关联, 说明谷氨酸分泌量受到其运输系统的限制。

3 讨论

根据已发表的 *gdh* 序列, 利用 PCR 和基因重组技术克隆了黄色短杆菌 GDK-9 的谷氨酸脱氢酶 (Gdh) 基因, 同时构建了可在大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌中表达的穿梭质粒 pXG。本实验所克隆的 *gdh* 基

表 2 2 株菌中谷氨酸的分泌量及胞内谷氨酸浓度
Table 2 Glutamate secretion rates and internal glutamate concentrations of two strains

菌株 Strains	谷氨酸分泌量 Glutamate secretion (mmol/g[dw])	细胞内谷氨酸浓度 Internal glutamate concentration (mmol/L)	
		1 $\mu\text{gV}_H/\text{L}$	200 $\mu\text{gV}_H/\text{L}$
<i>Brevibacterium flavum</i> GDK-9	19 \pm 2	87 \pm 5	110 \pm 5
<i>Brevibacterium flavum</i> GDK-9(pXG)	18 \pm 2	170 \pm 5	200 \pm 5

因片段, 经测序分析表明, 与 GenBank 中 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 的 *gdh* 基因长度完全相同, 核苷酸相似性为 99.55%, 在 6 处碱基的替换中, 只有 1 处替换引起氨基酸的变化, 作为谷氨酸合成代谢过程中的关键酶, 氨基酸的变化是否有利于减弱产物的反馈抑制有待进一步研究。利用 SDS-PAGE 电泳分析可知重组 GDH 蛋白在大肠杆菌中得到表达, 因为重组质粒 pXG 为 *C. glutamicum*/*E. coli* 穿梭载体, 将其电转化到 *Brevibacterium flavum* GDK-9 中, 发酵实验表明, 谷氨酸脱氢酶量的提高不会影响谷氨酸的分泌量, 但明显增加细胞内的谷氨酸含量, 并且胞内和胞外谷氨酸含量之间没有影响, 推测谷氨酸分泌受到其自身的运输系统的限制, 因此, 对其运输系统的研究为进一步提高谷氨酸的产量奠定基础, 目前我们正在进行这方面的研究工作。

参 考 文 献

- [1] 王 燕, 宋 香, 杨平平, 等. 谷氨酸生产菌 S₉₁₁₄ 中的谷氨酸脱氢酶的研究. 生物工程学报, 2003, **19**(6): 725-729.
- [2] 张惠烈. 基因工程概论. 上海: 华东理工大学出版社, 2002, pp.124-132.
- [3] 杜 军, 徐庆阳, 谢希贤, 等. 谷氨酸高产菌 GDK-9 的定向选育及其发酵过程研究. 食品与发酵工业, 2008, **34**(7): 17-19.
- [4] Mark JE, Andrew D, Randall K, *et al.* Bacteriophage-based vectors for site-specific insertion of DNA in the chromosome of *Corynebacteria*. *Gene*, 2007, **391**: 53-62.
- [5] Jakoby M, Ngouoto-Nkili CE, Burkovski A. Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors. *Biotechnology Techniques*, 1999, **13**: 437-441.
- [6] 阮 红, Bernhard E. 谷氨酸棒杆菌基因缺失菌株的定点构建. 微生物学报, 2002, **42**(4): 458-464.
- [7] 杨 哲, 李太华, 徐维明. 大肠杆菌中外源基因的表达的研究进展. 微生物学免疫学进展, 2000, **28**(2): 69-72.
- [8] Hideaki Y, Masayuki I, Alain A. Genomes and genome-level engineering of amino acid-producing bacteria. *Microbiol*, 2006, **66**: 349-391.
- [9] Tauch A, Kirchner O, Löffler B, *et al.* Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1. *Current Microbiology*, 2002, **45**: 362-367.
- [10] Hoischen C, Krämer R. Evidence of an efflux carrier system involved in the secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiol*, 1989, **151**: 342-347.
- [11] Gutmann M, Hoischen C, Krämer R. Carrier mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1112**: 115-123.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。