

谢琮琮, 许文武, 李至敏, 等. 蓝杆藻 ATCC 51142 中 α -酮戊二酸脱羧酶的克隆与表达[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(19): 37-39.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.19.009

蓝杆藻 ATCC 51142 中 α -酮戊二酸脱羧酶的克隆与表达

谢琮琮¹, 许文武¹, 李至敏², 王小琴¹, 雷国风¹, 张伟¹, 黄婷¹, 李志敏¹

(1. 江西农业大学生物科学与工程学院, 江西南昌 330045; 2. 江西农业大学理学院, 江西南昌 330045)

摘要: α -酮戊二酸脱羧酶催化 α -酮戊二酸的非氧化脱羧生成琥珀酸半醛, 其在琥珀酸半醛脱氢酶的作用下转化为琥珀酸, 蓝藻的三羧酸循环由于这 2 个酶的存在而变得完整。Blast 序列分析发现, 蓝杆藻 ATCC 51142 中 *cce4227* 基因编码 α -酮戊二酸脱羧酶。为了证实 *cce4227* 基因编码蛋白的催化功能, 从蓝杆藻 ATCC 51142 基因组中克隆 *cce4227* 基因, 然后构建 pET28a-*cce4227* 表达质粒。将该质粒与 pTf16 分子伴侣质粒共转化 BL21 (DE3) 大肠杆菌感受态细胞后进行重组蛋白的诱导表达。利用镍亲和层析方法对 *cce4227* 蛋白进行分离纯化, 得到纯度 > 95% 的 *cce4227* 蛋白, 菌体蛋白收率约为 12 mg/g。酶动力学测试表明, *cce4227* 蛋白是 1 个焦磷酸硫酸素 (TPP) 依赖型的 α -酮戊二酸脱羧酶。

关键词: 蓝杆藻 ATCC 51142; α -酮戊二酸脱羧酶; 基因克隆; 重组表达; 蛋白质纯化

中图分类号: S188 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)19-0037-03

蓝藻, 别称蓝绿藻或蓝细菌, 在藻类中是最简单、最原始的单细胞原核生物, 也是目前发现的最早的光合释氧生物。蓝杆藻 ATCC 51142 是一种白天进行光合作用, 夜间通过固氮作用产氮的固氮型蓝细菌^[1]。由于在蓝藻基因组中没有检测到 α -酮戊二酸脱氢酶基因^[2-3], 长期以来学术界一直认为蓝藻没有经典的三羧酸循环途径。2011 年 Zhang 等研究发现, 在聚球藻 PCC7002 中 *a2770* 和 *a2771* 基因分别编码 α -酮戊二酸脱羧酶和琥珀酸半醛脱氢酶, 这 2 个酶的存在使得蓝藻的三羧酸循环变得完整^[4]。实际上, 编码 α -酮戊二酸脱羧酶和琥珀酸半醛脱氢酶的基因存在于除少数海洋蓝藻外的大多数蓝藻中^[4]。

笔者所在研究组通过 Blast 序列分析, 发现蓝杆藻 ATCC 51142 中 *cce4227* 基因与聚球藻 PCC7002 中 *a2770* 基因的同源性达到 81.8%, 与集胞藻 PCC6803 中 *sll1981* 基因的同源

性为 76%。同样, 集胞藻 PCC6803 中 *sll1981* 基因编码蛋白已被证明具有 α -酮戊二酸脱羧酶功能^[5-6]。因此本研究推测 *cce4227* 蛋白也具有 α -酮戊二酸脱羧酶的功能。

近年来生物合成可再生燃料的研究吸引了越来越多研究者的关注^[7]。其中, 引人注目的是 Genomatica 公司的研究人员报道了基因工程大肠杆菌利用琥珀酸半醛生物合成 1,4-丁二醇^[8]。然而通过基因工程蓝藻生物合成 1,4-丁二醇的研究还未见报道。琥珀酸半醛正是 α -酮戊二酸脱羧酶催化 α -酮戊二酸非氧化脱羧生成的产物。因此对 α -酮戊二酸脱羧酶开展研究将为未来利用蓝藻生物合成 1,4-丁二醇提供理论基础。

本研究从蓝杆藻 ATCC 51142 基因组中扩增得到 *cce4227* 基因, 将其连接到 pET28a 载体上构建得到 pET28a-*cce4227* 质粒。将该质粒与 pTf16 分子伴侣质粒共转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞后得到表达菌株。摇瓶培养表达菌株经阿拉伯糖和异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导后纯化得到 *cce4227* 重组蛋白。本研究为进一步阐明 *cce4227* 蛋白的催化功能及机制奠定了重要基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和载体 试验于 2017 年 11 月至 2018 年 1 月在江西农业大学生物科学与工程学院分子生物学实验室完成。

收稿日期: 2018-02-08

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31560250, 31400054); 江西省自然科学基金重大项目 (编号: 20161ACB21012); 江西省教育厅科技研究重点项目 (编号: GJJ160353); 江西农业大学国家级大学生创新创业训练项目 (编号: 201710410005)。

作者简介: 谢琮琮 (1993—), 女, 江西赣州人, 硕士研究生, 主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: 1547368064@qq.com。

通信作者: 李志敏, 博士, 副教授, 主要从事酶催化反应机理研究。

Tel: (0791) 83813459; E-mail: zmlizm@126.com。

析[J]. 草业学报, 2012, 21(6): 159-165.

[9] 李海生. ISSR 分子标记技术及其在植物遗传多样性分析中的应用[J]. 生物学通报, 2004, 39(2): 19-21.

[10] 郭红媛, 贾举庆, 吕晋慧, 等. 燕麦属种质资源遗传多样性及遗传演化关系 ISSR 分析[J]. 草地学报, 2014, 22(2): 344-351.

[11] 刘欢, 慕平, 赵桂琴, 等. 燕麦 ISSR 反应体系的建立与优化

[J]. 中国草地学报, 2010, 32(4): 80-85.

[12] 王茅雁, 傅晓峰, 齐秀丽, 等. 利用 RAPD 标记研究燕麦属不同种的遗传差异[J]. 华北农学报, 2004, 19(4): 24-28.

[13] Pal N, Sandhu J S, Domier L L, et al. Development and characterization of microsatellite and RFLP-derived PCR-markers in oat[J]. Crop Science, 2002, 42(3): 912-918.

pTf16 分子伴侣质粒、大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞、表达载体 pET28a 为笔者所在实验室保存;蓝杆藻 ATCC 51142 基因组购于美国模式菌种保藏中心。

1.1.2 工具酶和主要试剂 限制性内切酶 *Nde* I、*Xho* I、*T₄* DNA 连接酶、5K DNA Marker 购于北京全式金生物技术有限公司; Protein Marker 购于 Thermo Scientific 公司; 2 × *Taq* (Pfu)、2 × *Taq* Mix、普通 DNA 产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒均购于天根生化科技(北京)有限公司;镍离子亲和层析树脂(Ni-NTA)购于 QIAGEN(凯杰)公司;所用引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成;质粒测序由上海祥音生物科技有限公司完成;其他主要试剂均购于北京索莱宝科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的 PCR 扩增 以蓝杆藻 ATCC 51142 基因组为模板(1 μL,约 30 ng),加入上下游引物各 1 μL(表 1),引物终浓度为 0.2 μmol/L。加入 2 × *Taq* (Pfu)25 μL 后加入灭菌水 22 μL 至总体积为 50 μL。扩增反应条件:95 ℃预变性 3 min;95 ℃变性 30 s,52 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 2 min,30 个循环;72 ℃延伸 10 min。反应结束后于 4 ℃保温。

表 1 PCR 引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')
<i>cce4227</i> - <i>Nde</i> I	TGTAAGCTC <u>ATATGGGGG</u> AAATGAACACAGCAG
<i>cce4227</i> - <i>Xho</i> I	TATCTCGAGT <u>TACTCCCA</u> AATCTGACAAC

注:下划线部分为酶切位点。

1.2.2 pET28a - *cce4227* 重组质粒的构建与鉴定 将 PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后回收,利用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切回收片段。用同样的酶双酶切 pET28a 载体。将双酶切的基因片段 *cce4227* 和载体线性片段 *pET28a*(基因片段与载体片段的物质的量之比为 6 : 1)在 16 ℃金属浴恒温下用 *T4* DNA 连接酶过夜连接。取连接产物 10 μL 转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态(80 μL)后,用含有 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 固体平板培养基筛选阳性克隆。将经菌落 PCR 验证正确的阳性克隆单菌落摇菌提取质粒后送检测序。

1.2.3 *cce4227* 重组蛋白的诱导表达 将重组质粒 pET28a - *cce4227* 和 pTf16 分子伴侣质粒共转化 BL21(DE3)感受态细胞(100 μL),涂布于含卡那霉素(50 μg/mL)和氯霉素(25 μg/mL)的双抗性 LB 固体平板培养基上,于 37 ℃恒温箱内倒置过夜培养,将其克隆单菌落 PCR 验证为正确的阳性克隆菌进行诱导表达。将单克隆菌落加入 10 mL 含有卡那霉素(50 μg/mL)和氯霉素(25 μg/mL)的 LB 液体培养基中,于 37 ℃、180 r/min 过夜培养。然后按 0.5% 接种量将过夜培养液加入 1.2 L LB 液体培养基(含有 50 μg/mL 卡那霉素、25 μg/mL 氯霉素和 1 mg/mL 阿拉伯糖)中进行菌体扩大培养。待培养液 *D*_{600 nm} 为 0.6 时冰浴后加入 IPTG(终浓度为 0.2 mmol/L)于 16 ℃、180 r/min 继续培养 24 h。

1.2.4 *cce4227* 重组蛋白的分离纯化 将离心所得菌体用 20 倍体积的平衡缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl,pH 值为 8.0)重悬,于冰水浴中超声破碎 32 min(超声工作 2 s,间歇 8 s,有效功率为 10%)。菌体裂解液于 4 ℃、12 000 r/min 离心 1 h 得到菌体上清液,经 0.22 μm 滤膜过滤后,将上清过 Ni-NTA 树脂(事先用平衡缓冲液进行平衡处理),然后用含咪唑

的平衡缓冲液进行浓度梯度洗脱,分别收集每个浓度的流出液,用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测目的蛋白。合并含有目的蛋白的洗脱液后,于 4 ℃采用透析袋进行浓缩透析。

2 结果与分析

2.1 pET28a - *cce4227* 表达载体的构建与鉴定

以蓝杆藻 ATCC 51142 基因组为模板,经 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳后获得约 1.7 kb 大小的 DNA 条带,该基因片段与 *cce4227* 基因理论碱基数(1 653 bp)相吻合(图 1)。将双酶切后的 *cce4227* 基因片段和 pET28a 载体线性片段(图 2)经 *T4* DNA 连接酶过夜连接后转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,挑取阳性克隆摇菌后提取质粒。将该质粒进行 DNA 测序,测序结果表明,该基因序列与 National Center for Biotechnology Information(美国国立生物技术信息中心)数据库中的 *cce4227* 基因序列完全一致。因此可见,本试验成功构建了 pET28a - *cce4227* 表达载体。

2.2 *cce4227* 重组蛋白的诱导表达

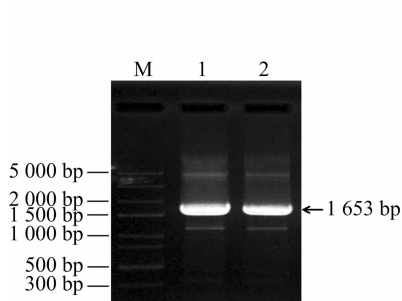
将 pET28a - *cce4227* 表达质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,摇瓶培养菌液后经 IPTG(0.2 mmol/L)诱导发现 *cce4227* 重组蛋白为包涵体,在上清液中没有可见的 *cce4227* 重组蛋白(图 3)。因此本试验将 pET28a - *cce4227* 质粒和 pTf16 分子伴侣质粒共转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞。菌落 PCR 研究发现,pET28a - *cce4227* 质粒成功转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,即构建成功 pET28a - *cce4227*/pTf16 BL21(DE3)(图 4 中 2、3、5、6 条带片段大小与 *cce4227* 基因片段大小相符合)。挑取图 4 中 2 号单克隆菌落摇菌培养。结果发现,pTf16 分子伴侣质粒的共表达明显增加了 *cce4227* 蛋白的可溶性(图 3)。*cce4227* 基因的碱基数为 1 653 bp,编码 1 个含有 550 个氨基酸残基的蛋白质,其分子量为 59.91 ku,与图 3 中大小约为 60 ku 的条带一致。

2.3 pET28a - *cce4227*/pTf16 重组蛋白的分离纯化

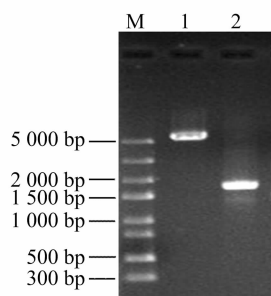
将含有目的蛋白的上清液用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化。用含有 20 ~ 200 mmol/L 咪唑的缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl,pH 值为 8.0)进行洗脱(图 5)。由于 pTf16 分子伴侣质粒表达的促发因子(trigger factor,简称 TF)蛋白没有组氨酸标签,不能被 Ni-NTA 吸附。当咪唑浓度增加到 40 mmol/L 时,TF 蛋白基本被洗脱,此时有少量 *cce4227* 重组蛋白被洗脱。当咪唑浓度提高到 60 mmol/L 时,大量 *cce4227* 重组蛋白被洗脱。然后用含有 100 mmol/L 咪唑的缓冲液将 *cce4227* 重组蛋白全部洗脱。合并图 5 中含有 *cce4227* 重组蛋白的洗脱液后浓缩脱盐,得到纯度 > 95% 的 *cce4227* 重组蛋白。菌体蛋白收率约为 12 mg/g。

3 讨论

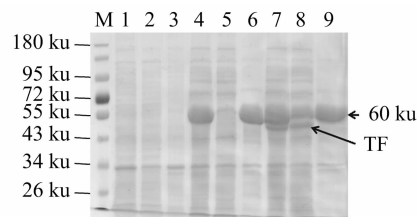
本研究通过 Blast 序列分析发现,蓝杆藻 ATCC 51142 中 *cce4227* 基因与集胞藻 PCC6803 中 *sll1981* 基因的同源性为 76%^[6],与鱼腥藻 PCC7120 中 *all3555* 基因的同源性为 74%;蓝杆藻 ATCC 51142 中 *cce4228* 基因与聚球藻 PCC7002 中 *a2771* 基因的同源性为 68%,与鱼腥藻 PCC7120 中 *all3556* 基因的同源性为 71%^[9-10]。重要的是蓝杆藻 ATCC51142 中



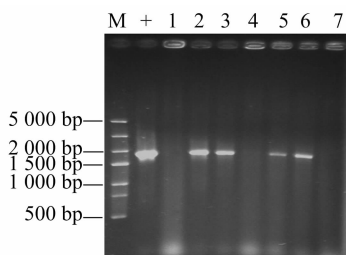
M—DNA marker; 1~2—PCR 产物
图1 *cce4227* 基因 PCR 扩增产物鉴定结果



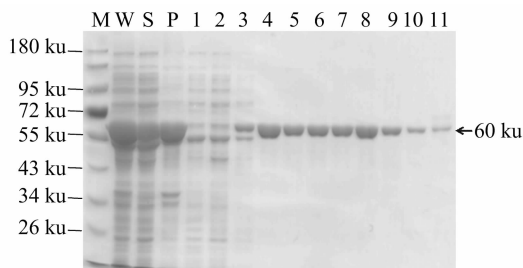
M—DNA marker; 1—双酶切后的 pET28a 载体; 2—双酶切后的 *cce4227* 基因
图2 *cce4227* 基因和 pET28a 载体双酶切鉴定结果



M—蛋白质标准; 1~3—pET28a 空载体的表达(分别为细胞破碎液、离心后上清液和离心后沉淀重悬液); 4~6—pET28a-*cce4227* 质粒的表达(分别为细胞破碎液、离心后上清液和离心后沉淀重悬液); 7~9—pET28a-*cce4227*/pTf16 质粒共表达(分别为细胞破碎液、离心后上清液和离心后沉淀重悬液)
图3 pET28a、pET28a-*cce4227* 和 pET28a-*cce4227*/pTf16 重组蛋白的表达情况



M—DNA marker; +—pET28a-*cce4227* 质粒(正对照); 1~7—pET28a-*cce4227*/pTf16 共转化克隆单菌落
图4 pET28a-*cce4227*/pTf16 BL21 (DE3) 双质粒共转化克隆的菌落 PCR 鉴定结果



M—蛋白质标准; W—细胞破碎液; S—离心后上清液; P—细胞沉淀重悬液; 1~4—分别为流穿液、20 mmol/L 咪唑洗脱液、40 mmol/L 咪唑洗脱液、60 mmol/L 咪唑洗脱液; 5~11—100 mmol/L 咪唑洗脱液
图5 pET28a-*cce4227*/pTf16 共表达重组蛋白的亲亲和层析纯化结果

cce4227 蛋白与集胞藻 PCC6803 中 *sll1981* 蛋白的氨基酸序列同源性达 86%, 且 *sll1981* 蛋白已经被证实具有 α -酮戊二酸脱羧酶的功能^[5], 因此推测 *cce4227* 蛋白也具有 α -酮戊二酸脱羧酶的功能。

本研究通过常规 PCR 技术从蓝杆藻 ATCC 51142 基因组中成功克隆到 *cce4227* 基因, 然后将其连接到 pET-28a 载体后转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 阳性单克隆菌落经测序正确后得到蛋白表达质粒 pET28a-*cce4227*。虽然该表达菌株中 *cce4227* 重组蛋白的表达效果较好, 但是其在上清液中的含量较低, 大部分为包涵体蛋白。因此, 将 pET28a-*cce4227* 质粒与 pTf16 分子伴侣质粒共转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞。研究发现, 与分子伴侣蛋白 (TF 蛋白) 共表达时, *cce4227* 重组蛋白的可溶性得到提高, 在上清液中有明显可见的 *cce4227* 蛋白。经摇瓶培养后通过 Ni-NTA 亲和层析方法获得纯度较高的 *cce4227* 蛋白, 菌体蛋白收率达到

12 mg/g。SDS-PAGE 测得的 *cce4227* 蛋白分子量约为 60 ku, 与 *cce4227* 蛋白的理论分子量 (59.91 ku) 比较接近。

笔者所在实验室已有的试验数据表明, 在焦磷酸硫酸素作辅因子时, *cce4227* 蛋白可以催化 α -酮戊二酸转化为琥珀酸半醛。当用 pH 值为 7.5、浓度为 100 mmol/L 的 HEPES (4-羟乙基哌嗪乙磺酸) 缓冲液时, *cce4227* 蛋白对 α -酮戊二酸的 K_m (米氏常数) 为 1.21 mmol/L, k_{cat} (催化常数) 为 1.16 s。后续研究将对 *cce4227* 蛋白的详细酶动力学参数及结构功能关系作进一步测定。

参考文献:

- [1] Alagesan S, Gaudana S B, Sinha A, et al. Metabolic flux analysis of *Cyanospora* sp. ATCC 51142 under mixotrophic conditions [J]. Photosynthesis Research, 2013, 118 (1/2): 191-198.
- [2] Smith A J, London J, Stanier R Y. Biochemical basis of obligate autotrophy in blue-green algae and thiobacilli [J]. Journal of Bacteriology, 1967, 94 (4): 972-983.
- [3] Pearce J, Carr N G. The metabolism of acetate by the blue-green algae, *Anabaena variabilis* and *Anacystis nidulans* [J]. Journal of General Microbiology, 1967, 49 (2): 301-313.
- [4] Zhang S, Bryant D A. The tricarboxylic acid cycle in cyanobacteria [J]. Science, 2011, 334 (6062): 1551-1553.
- [5] Wang X Q, Lei G F, Wu X Y, et al. Expression, purification and characterization of *sll1981* protein from cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. Protein Expression and Purification, 2017, 139: 21-28.
- [6] 龙昊知, 李至敏, 王小琴, 等. 集胞藻 PCC6803 中 *sll1981* 基因的克隆与表达研究 [J]. 江西农业大学学报, 2015, 37 (6): 1076-1079.
- [7] Lai M C, Lan E I. Advances in metabolic engineering of cyanobacteria for photosynthetic biochemical production [J]. Metabolites, 2015, 5 (4): 636-658.
- [8] Yim H, Haselbeck R, Niu W, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol [J]. Nature Chemical Biology, 2011, 7 (7): 445-452.
- [9] 王小琴, 李至敏, 雷国风, 等. 鱼腥藻 PCC7120 中琥珀酸半醛脱氢酶的初步表征及结构分析 [J]. 生命科学研究, 2017, 21 (4): 318-324.
- [10] 王小琴, 李至敏, 雷国风, 等. 鱼腥藻 PCC7120 中 *all3556* 蛋白的表达与纯化 [J]. 江西农业大学学报, 2017, 29 (5): 1-4.