

在大肠杆菌中表达酮酸脱羧酶产异戊醇^{*}

肖仕圆^{1,2} 许敬亮^{1**} 陈小燕¹ 杨柳¹ 袁振宏¹

(1 中国科学院广州能源研究所 中国科学院可再生能源与天然气水合物重点实验室 广州 510640)

(2 中国科学院大学 北京 100049)

摘要 酮酸脱羧酶作为异戊醇生物合成的关键酶,不存在于大肠杆菌中。以乳酸乳球菌的基因组 DNA 为模板,经过 PCR 扩增得到酮酸脱羧酶基因 *kivD* (rbs),插入到大肠杆菌高效表达载体 pET-28a(+) 上形成 pET-*kivD*(rbs),重组质粒热击转化进大肠杆菌 BL21(DE3) 中,其成功表达了酮酸脱羧酶。对发酵产物进行分析,检测到了微量的目标产物—异戊醇。

关键词 酮酸脱羧酶基因 重组质粒 转化 异戊醇

中图分类号 Q789

全球环境的恶化、能源的不足等问题促进了对可再生生物燃料能源的研究^[1]。目前,研究的主要热点方向是生物燃料乙醇,在 2011 年,美国的产量达到了 10 亿加仑^[2]。然而,乙醇具有高蒸汽压、腐蚀性等性质,使其作为汽油代替燃料仍然存在一定的缺陷,异戊醇等高级醇比乙醇具有更高的能量密度、更低的蒸汽压、更高的辛烷值等特点,其性质更接近于汽油^[3],成为新一代可再生能源的研究方向。

过去一直没有微生物能够经由葡萄糖直接大量合成异戊醇等高级醇的报道。在 2008 年,美国加利福尼亚大学的研究团队在 *Nature* 上率先报道了通过非发酵途径合成高级醇的方法^[4]。他们以氨基酸合成的共同前体物 α -酮酸作为底物,在 α -酮酸脱羧酶和醇脱氢酶的作用下生产出异丁醇、异戊醇和 2-甲基-1-丁醇等高级醇(图 1)。而大肠杆菌作为研究得最为详尽的原核宿主菌,具有遗传背景清楚、生长周期短、培养条件温和、代谢易于控制等优点。近年来,研究者利用非发酵途径,通过相关基因的表达,在大肠杆菌中成功地合成了异丁醇、异戊醇等高级醇^[5-7]。但由于关键基因酮酸脱羧酶的低表达量,使其成为了阻碍高级醇大量生产的瓶颈。

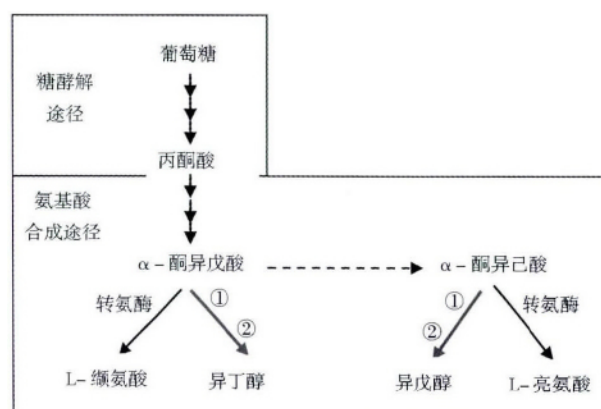


图 1 异戊醇生物合成途径

Fig. 1 The pathway for isoamyl alcohol production

① Keto acid decarboxylase; ② Alcohol dehydrogenase

本研究拟通过增加核糖体结合位点 rbs 优化表达条件,利用大肠杆菌强启动等策略,将乳酸乳球菌的酮酸脱羧酶基因 *kivD* 通过 PCR 扩增连接到大肠杆菌高效表达载体 pET-28a(+) 上,以实现其高效表达,为今后构建高产异戊醇工程菌株奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 本实验使用的菌株、质粒见表 1。

1.1.2 培养基和试剂 乳酸乳球菌 MRS 培养基: 1% 酪蛋白, 1% 牛肉膏, 0.5% 酵母提取物, 0.5% 乙酸钠, 0.2% 柠檬酸二钠, 0.1% 吐温 80, 0.2% 磷酸氢二钾,

收稿日期: 2015-01-14 修回日期: 2015-04-04

^{*} 国家自然科学基金(21176237, 21211140237), 国家“863”计划(2013AA065803), 广东省科技攻关项目(2013B010403021), 广州市科技攻关项目(2013J4300026), 中国科学院院地合作项目和中国科学院广州能源所所长创新基金培育项目(y407p11001)资助项目
^{**}通讯作者, 电子信箱: xjl@ms.giec.ac.cn

表 1 菌株与质粒
Table 1 Bacterial strains and plasmids

菌株/质粒	相关特性	来源/参考
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	野生型	本实验室
<i>E. coli</i> TRANS1	<i>F</i> - ϕ 80 <i>lac</i> <i>Z</i> Δ <i>M15</i> Δ (<i>lacZ</i> <i>Y</i> <i>A</i> - <i>arg</i> <i>F</i>) <i>U169</i> <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (<i>rk</i> ⁻ <i>mk</i> ⁺) <i>supE44-thi-1 gyrA96relA1phoA</i> <i>F</i> ⁻ <i>ompThsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ <i>m</i> ⁻)	北京全式金生物公司
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>gal</i> (<i>cl857 ind1 sam7 , nin5 , lacUV5-T7gene1</i>) <i>dem</i>	北京全式金生物公司
pEASY-T1	<i>P</i> _{T7} Kan ⁺ Amp ⁺ LacZ	北京全式金生物公司
pET-28a(+)	<i>P</i> _{T7} Kan ⁺ LacI	本实验室
pET-kivD	<i>P</i> _{T7} Kan ⁺ LacI KivD	本实验
pET-kivD-rbs	<i>P</i> _{T7} Kan ⁺ LacI KivD-rbs	本实验

0.02% 七水硫酸镁 0.005% 水合硫酸锰; 大肠杆菌 LB 培养基: 1% 胰蛋白胨 0.5% 酵母提取物 ,1% 氯化钠。固体培养基加入 2% 的琼脂粉。

Trans Start *Taq* 聚合酶链式反应试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、DNA Loading Buffer、DNA Marker、卡那霉素、Bradford 蛋白质定量试剂盒等购自北京全式金生物公司; T4 DNA Ligase、限制性内切核酸酶购自 Fermentas 公司; IPTG 购自生物化工; Trypton 和 Yeast Extract 购自 Oxoid; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、SDS、Tris、溴酚蓝、过硫酸铵、甘氨酸、TEMED、考马斯亮蓝 R250 均购自 Amresco; 琼脂糖购自 Biowest 公司; 其余试剂均为国产分析纯或生化级。

1.2 方 法

1.2.1 乳酸乳球菌酮酸脱羧酶基因 *kivD* 的克隆
Lactococcus lactis subsp *Lactis* 菌株划线于固体平板上 , 挑取单菌落于 10 ml MRS 液体培养基中 37℃、200 r/min 过夜培养 2~3 ml 离心收集菌体 ,基因组的提取方法参照 TIANGEN 细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书。

根据 NCBI 中乳酸乳球菌的酮酸脱羧酶 *kivD* 基因序列信息 ,利用 premier 5.0 设计引物 ,并在引物的两端加上 *Sac*I 和 *Sal*I 酶切位点 ,其中一个另加 *rbs*(核糖体结合位点) (表 2) 。

表 2 PCR 反应引物
Table 2 PCR primers

Primer	Sequence (5'→3')	Restriction	Size (bp)
F1	C GAGCTCATGTATACAGTAGGAGATTACC	<i>Sac</i> I	29
F2	C GAGCTC AAGAAGGAGATATACATGTATACAGTAGGAGATTACC	<i>Sac</i> I	44
R1	GTCGACTTATGATTTATTTGTTCAGCAAAT	<i>Sal</i> I	31

以乳酸乳球菌基因组 DNA 为模板 ,按照 *Taq* 聚合酶链式反应试剂盒的反应体系进行 PCR 实验 ,反应程序: 95℃ 预变性 5 min 95℃ 变性 30 s ,55℃ 退火 30 s ,72℃ 延伸 2 min 72℃ 延长 10 min 4℃ 终止反应; 循环数 35 次。

1.2.2 载体的构建和阳性克隆子筛选 PCR 产物连

接到克隆载体 pEASY-T1 上 ,得到重组质粒 T-kivD 和 T-kivD-rbs ,转化进 *E. coli* TRANS1 挑取单菌落 ,经菌落 PCR 初步鉴定 ,菌液送去测序 ,结果在 NCBI 中进行比对。

pET-28a(+)、T-kivD 和 T-kivD-rbs 分别用 *Sac* I 和 *Sal* I 双酶切 ,回收 pET-28a 酶切片段 ,回收 T-kivD

和 T-kivD-rbs 凝胶中的小片段,用 T4 DNA Ligase 连接。连接产物转化后,挑取单菌落过夜培养,提质粒,得到表达载体 pET-kivD 和 pET-kivD-rbs,双酶切验证。

利用北京全式金生物公司提取的方法把 pET-28a (+)、pET-kivD 和 pET-kivD-rbs 经过 42 °C 热击转化进 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中,培养于含卡那霉素终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 LB 培养基中,菌落 PCR 鉴定,验证是否为阳性克隆子。其中,转化进载体 pET-28a(+) 的菌为空载菌,转化进载体 pET-kivD 的菌为重组菌 1,转化进载体 pET-kivD-rbs 的菌为重组菌 2。

1.2.3 目的蛋白的表达和发酵条件优化 分别挑取平板上的空载菌、重组菌 1 和重组菌 2 的单菌落于含 kan^+ 的 3 ml LB 培养基中 37 °C、200 r/min 过夜培养,1% 转移到含 kan^+ 的 10 ml LB 培养基中 37 °C、200 r/min 培养 3 h,加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导发酵 4 h 后,各取培养液 2 ml,4 °C 下 8000 r/min 离心 10 min,收集菌体,上清液作为发酵液做成分分析。用双蒸水 500 μl 洗涤菌体 2 次,接着用 600 μl 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 重悬菌体,置于冰水浴中进行超声波破碎,处理 5 s,停歇 5 s,直至重悬液变澄清。将超声处理后的菌体重悬液 4 °C 下 12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,确定酶的表达情况。

将大肠杆菌重组菌 2 的种子液接种到 10 ml LB 发酵培养基中进行摇瓶培养,起始 OD_{600} 值为 0.3,37 °C、200 r/min 培养 1 ~ 2 h 后至 OD_{600} 值为 0.6 ~ 0.8,加入 1 mmol/L IPTG 诱导,然后在不同温度下培养,每隔一个时间段分别取样一次,通过测定溶液的 OD_{365} 值来考察温度和时间对发酵的影响。

1.2.4 发酵液成分分析 发酵上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后,用气相色谱-质谱联用仪检测发酵产物成分。气相程序:分流比 1:50,上样量 1 μl ,柱温 60 °C 平衡 1 min,10 °C/min 上升至 260 °C,保持 2 min。 H_2 气压达到 0.4 MPa,空气气压达到 0.4 MPa,氦气压达到 0.6 MPa,加热器 200 °C。

1.2.5 酮酸脱羧酶酶活测定 由于检测到 KivD 酶对酮异己酸具有更优的偏好性,所以酶活的测定参照文献[8]。底物为酮异己酸,测定的相应生成物为异戊醛。异戊醛与 2,4-二硝基苯肼反应,生成 2,4-二硝基苯腙,在碱性溶液中呈暗红色,用分光光度法在 365 nm 处测光密度值。粗酶液中蛋白质含量使用 Bradford 蛋白质定量试剂盒测定,重复测定 3 次取平均值。

2 结果

2.1 *kivD* 基因的克隆

以乳酸乳球菌的基因组 DNA 为模板,用引物对 F1、R1 和 F2、R1 进行 PCR 扩增,用 1.0% 的琼脂糖凝胶对产物进行电泳,得到与理论大小 1647 接近的目的条带(图 2)。

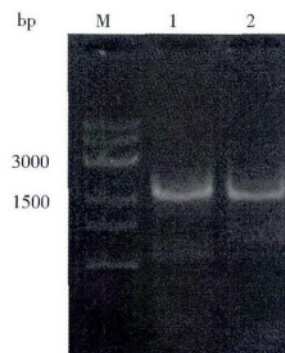


图 2 *kivD* 基因克隆

Fig.2 *kivD* gene cloning

M: 8k DNA marker; 1: *kivD*; 2: *kivD-rbs*

2.2 载体 pET-kivD 和 pET-kivD-rbs 构建

经 PCR 扩增的产物和 pEASY-T1 连接,转化进感受态细胞 *E. coli* TRANS1 中,菌落 PCR 获得阳性克隆子,菌液测序,测序结果经比对正确,目的基因、酶切位点和核糖体结合位点均成功扩增。

表达质粒 pET-kivD 和 pET-kivD-rbs 经过 *Sac* I 和 *Sal* I 双酶切,用 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳,得到图 3,大小约为 5400 bp 和 1650 bp,符合理论大小。

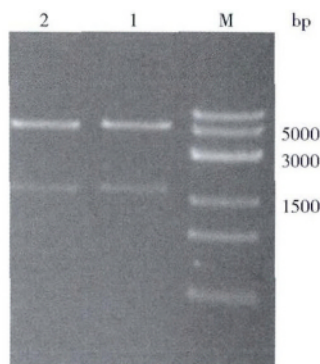


图 3 酶切结果

Fig.3 The results of enzyme digestion

M: 8k DNA marker 1: pET-kivD 2: pET-kivD-rbs

2.3 *kivD* 的表达

L. lactis subsp. *Lactis* 的酮酸脱羧酶基因 *kivD* 的分子质量大小约为 61 kDa^[8]. 经过 SDS-PAGE 电泳(图 4) ,在菌株其他蛋白质表达含量基本相同的情况下 ,三种工程菌的蛋白质分子质量在 61 kDa 表达含量各不相同 ,空载工程菌几乎没有目的条带 ,重组菌株中有明显的目的条带 .经过 Bradford 法对细胞总蛋白质量进行测定(表 3) ,表达量依次增加 ,说明酮酸脱羧酶基因表达菌种初步构建成功。

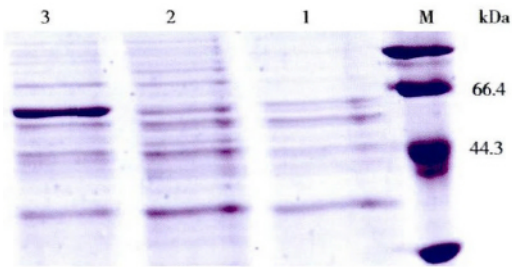


图 4 蛋白质电泳结果

Fig.4 The results of SDS-PAGE

M: Low molecular weight protein maker; 1: pET-28a(+); 2: pET-kivD; 3: pET-kivD-rbs

表 3 粗酶提取液中的蛋白质含量

Table 3 The protein content of crude extract

菌株	蛋白质含量/(mg/ml)
空载菌	0. 100 ± 12
重组菌 1	0. 158 ± 15
重组菌 2	0. 220 ± 10

2.4 酮酸脱羧酶的优化表达

选取酮酸脱羧酶表达更好的大肠杆菌重组菌 2 进行优化表达。根据文献[9]和[10]的报道 ,温度对异源基因的表达有很大的影响 ,低温会抑制酶活 ,而高温会加速细胞的老化 ,从而不利于发酵。因此 ,本实验选取了 25℃ ,30℃ ,37℃ 三个不同的温度 ,每隔 2 h 取样一次 ,后期每隔 4 h 取样。从图 5 中可以知道 ,在 30℃ 发酵 8 h 时 ,有最大光密度值 ,即酶活达到最大值。

2.5 产物测定

发酵液经 GC-MS 联用仪测定以后 ,结果如表 4 所示。与标准液测定结果相比 ,大肠杆菌空载菌[含 pET-28a(+)]没有检测到相应的目标产物 ,而大肠杆菌重组菌株 1(含 pET-kivd) 、大肠杆菌重组菌株 2(含 pET-kivd-rbs) 检测到异戊醇 ,而没有检测到异戊醛和异丁醇。由此可知 ,目的基因在大肠杆菌中成功表达和大

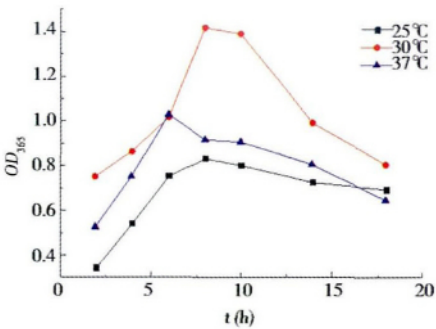


图 5 不同诱导温度对粗酶液 KivD 酶促反应的影响

Fig.5 Effect of different temperature on KivD activity in crude extract

肠杆菌本身就具有醇脱氢酶基因 ,且表现出相应的活性。

表 4 发酵产物结果

Table 4 The results of fermented product

菌株	异戊醛含量	异丁醇含量	异戊醇含量(mg/L)
空载菌	○	○	○
重组菌 1	○	○	72
重组菌 2	○	○	115

Note: ○ is no

3 讨论与分析

3.1 核糖体结合位点对基因表达的影响

本研究在大肠杆菌 *BL21* 的基础上 ,成功地构建了含有 *kivD* 基因的大肠杆菌重组菌。通过 IPTG 诱导 ,使其在重组菌中成功表达 ,但是表达量各有差异。造成差异的原因一方面是菌株本身并没有含有目的基因; 另一方面是加入了核糖体结合位点 *rbs*。核糖体结合位点的长短、菌种特异性、离起始位点的位置等特点对翻译起着重要的作用^[11-12]。翻译开始的效果是影响基因表达的一个重要因素 ,核糖体结合位点的选用不会使目的基因 5'端形成“茎环”结构 ,从而有利于 mRNA 5'端与核糖体 30S 亚基结合 ,促进翻译开始^[13-14]。从实验的结果来看 ,加入了 *rbs* 的菌株其表达量明显高于没有加入 *rbs* 的菌株 ,推测其原因主要在于 *rbs* 位点离起始密码子的距离近 ,导致了起始翻译的密码子多 ,翻译量相应地增加。尽管载体本身具有 *rbs* 位点 ,但是距离起始密码子较远 ,核糖体结合后在一些载体上会翻译 ,而在另外一些载体上的核糖体也许会因为距离太远而脱落 ,从而造成表达量出现差异。

3.2 酮酸脱羧酶特异性

作为异戊醇生物合成过程中的关键酶— α -酮酸脱羧酶(KivD),其来源不同,对底物催化专一性也不一样^[15-16]。工程菌转化进了乳酸乳球菌 KivD 表达以后,对其发酵产物进行分析,没有检测到有关文献报道的异丁醇^[17-18]而是检测到了异戊醇。从实验结果可以推测,在载体 pET-28a(+)的作用下,该酮酸脱羧酶对异戊醇的底物(酮异己酸)可能有更好的偏好性。基于此实验结果,本实验室成员对其进行了专利申请^[19]。

4 结论和展望

本实验研究的结果表明,在强启动子 T7 的作用下,菌株浓度 OD₆₀₀ 值为 0.6~0.8,加入 1 mmol/L IPTG 在 30℃ 条件下诱导发酵 8 h,酮酸脱羧酶的活性达到了最大值。发酵产物异戊醇的出现,也表明此基因在大肠杆菌高效表达载体 pET-28a(+)的作用下,表达的脱羧酶对酮异己酸具有更好的偏好性。

目前还没有报道有关野生型的大肠杆菌能产异戊醇,但是通过代谢工程的改造,美国 Liao 等^[20]实现了在大肠杆菌中产异戊醇。将来在进一步构建高产异戊醇菌株方面,可以对相关路径的关键基因进行表达,同时也可以通过基因敲除来降低底物竞争途径。

参考文献

- [1] Ingram L O, Aldrich H C, Borges A C C, et al. Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. *Biotechnology Progress*, 1999, 15(5): 855-866.
- [2] 蔡海龙, 王秀清. 美国燃料乙醇产量快速增长的原因及对国际玉米市场的影响. *中国农业大学学报*, 2013, 30(4): 127-132
Cai H L, Wang X Q. The reasons of U. S. fuel ethanol production increase and its impact on international maize market. *Journal of China Agricultural University*, 2013, 30(4): 127-132.
- [3] Savage N. Fuel options: the ideal biofuel. *Nature*, 2011, 474(7352): 9-11.
- [4] Atsumi S, Hanai T, Liao J C. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature*, 2008, 451(7174): 86-89.
- [5] 潘超强, 高强, 郑春阳, 等. 产异丁醇关键基因在大肠杆菌中表达的研究. *微生物学报*, 2012, 39(7): 912-920.
Pan C Q, Gao Q, Zheng C Y, et al. Coexpression of two essential isobutanol synthesis genes in *Escherichia coli*. *Microbiology China*, 2012, 39(7): 912-920.
- [6] 郑丽娟, 陈少云, 徐刚, 等. 利用双启动子载体构建产异丁醇大肠杆菌. *中国生物工程杂志*, 2013, 33(8): 66-72.
- [7] Zheng L J, Chen S H, Xu G, et al. Engineering *E. coli* for isobutanol production by two - promoter vectors. *China Biotechnology*, 2013, 33(8): 66-72.
- [8] Nicole N E, Shuchi S H, Anna A E, et al. Metabolic engineering for higher alcohol production. *Metabolic Engineering*, 2014, 25: 174-183.
- [9] Martadela P, Pilar F P, Carmen P. Biochemical and molecular characterization of α -ketoisovalerate decarboxylase, an enzyme involved in the formation of aldehydes from amino acids by *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 238(2): 367-374.
- [10] Sorensen H P, Mortensen K K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 2005, 4(1): 1-8.
- [11] Williams R E, Bruce N C. 'New uses for an old enzyme' — the old yellow enzyme family of flavoenzymes. *Annals of Microbiology*, 2002, 148(6): 1607-1614.
- [12] Shine J, Dalgarno L. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *National Academy of Sciences*, 1974, 71(4): 1342-1346.
- [13] Mary V M, Maurille J F, David A T. Depletion of Free 30S ribosomal subunits in *Escherichia coli* by expression of RNA containing shine-dalgarno-like sequences. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(2): 494-502.
- [14] 李育阳. 基因表达技术. 北京: 科学出版社, 2001. 15-46.
Li Y Y. Gene Expression Technology. Beijing: Science Press, 2001. 15-46.
- [15] 吴乃虎. 基因工程原理(下). 北京: 科学出版社, 1989. 113.
Wu N H. Genetic Engineering Principles. Beijing: Science Press, 1989. 113.
- [16] König S. Subunit structure, function and organisation of pyruvate decarboxylases from various organisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1998, 1385(2): 271-286.
- [17] Ezeji T, Qureshi N, Blaschek H P. Production of acetone - butanol - ethanol (ABE) in a continuous flow bioreactor using degermed corn and *Clostridium beijerinckii*. *Process Biochemistry*, 2007, 42(1): 34-39.
- [18] 林丽华, 郭媛, 庞浩, 等. 大肠杆菌中表达关键基因产异丁醇的研究. *生物技术*, 2011, 21(3): 19-23.
Lin L H, Guo Y, Pang H, et al. The construction of recombinant *E. coli* producing isobutanol. *Biotechnology Bulletin*, 2011, 21(3): 19-23.
- [19] Kevin M S, Kwang M C, James C L. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for isobutanol production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87(3): 1045-1055.

- [19] 袁振宏, 许敬亮, 陈小燕, 等. 一种 α -酮酸脱羧酶 KIVD-LL 及其编码基因和应用, 中国, 中华人民共和国国家知识产权局, CN201410309574 2014 7.
- Yuan Z H, Xu J L, Chen X Y, et al. An alpha keto acid decarboxylase KIVD-LL and its coding gene application. China, The national property office of the People's Republic of China, CN201410309574 2014 7.
- [20] Liao J C, Connor M R. Engineering of an *Escherichia coli* strain for the production of 3-methyl-1-butanol. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(18) : 5769-5775.

Production of the Isoamyl Alcohol in *E. coli* by Expression of *kivD* Gene

XIAO Shi-yuan XU Jing-liang CHEN Xiao-yan YANG liu YUAN Zhen-hong

(Key Laboratory of Renewable Energy and Gas Hydrate , Guangzhou Institute of Energy Conversion ,
Chinese Academy of Sciences , Guangzhou 510640 , China)

Abstract Keto acid decarboxylase is the key enzyme for biological synthesis of isoamyl alcohol , rarely existed in *E. coli*. Keto acid decarboxylase gene *kivD*(*rbs*) obtained from *Lactococcus lactis* subsp. Lactis genome DNA through reaction of PCR , was inserted into *E. coli* high expression vector pET-28a(+) . The formed pET-*kivD*(*rbs*) , was then transformed into *E. coli* BL21(DE3) by hot blow. The activity of keto acid decarboxylase and isoamyl alcohol were detected in the fermentation broth.

Key words *kivD* gene Recombinant plasmid Transform Isoamyl alcohol