

丝氨酸羟甲基转移酶基因的功能表达及其活性鉴定*

刘万红 刘爱福 李文鑫 王君英

(武汉大学生命科学学院氨基酸研究所 武汉 430072)

摘 要 从大肠杆菌染色体 DNA 中成功克隆到丝氨酸羟甲基转移酶基因 , 并将其插入表达载体 pET15b 中 , 在大肠杆菌中得到了高表达。基因互补实验鉴定了其活性。

关键词 丝氨酸羟甲基转移酶 基因克隆 原核表达 活性鉴定

L-丝氨酸是组成蛋白质的 20 种基本氨基酸之一 , 系生糖氨基酸 , 是氨基酸输液的重要组成部分。在食品和保健方面有着非常广泛的用途。目前 , L-丝氨酸价格昂贵 , 市场需求量也较大 , 但国内生产处于空白状况 , 只能依靠进口。L-丝氨酸的生产方法有 4 种^[1] , 即发酵法、蛋白质水解提取法、化学法和酶促法。其中酶促法受到国内外的重视 , 其反应过程单纯 , 投资小 , 副反应少 , 时间短 , 生产效率高 , 产品单一 , 提取方便 , 几乎不会带来环境污染。

丝氨酸羟甲基转移酶(serine hydroxymethyltransferase , SHMT) 是酶促法制备 L-丝氨酸的关键酶 , 它在生物体内由 *glyA* 基因编码 , 它是一种以 5-磷酸吡哆醛(PLP) 为辅酶的吡哆醛酶 , 能在四氢叶酸(THF) 存在的条件下催化甲醛与甘氨酸缩合生成 L-丝氨酸。据 Hamilton 报道^[2] , 在生物反应器中以酶促法生产 , 获得很高的 L-丝氨酸的产率。获得高活力的丝氨酸羟甲基转移酶制备物是提高产量的关键 , 而以基因工程方法高效表达该酶蛋白成为解决此问题的新方法。本文构建的丝氨酸羟甲基转移酶基因的重组表达载体在大肠杆菌中得到了高表达 , 基因互补实验证明该基因是有活性的基因 , 这为以基因工程方法大量获得高活力的丝氨酸羟甲基转移酶制备物提供了重要的解决途径。

1 材料与方法

1.1 材 料

E. coli AB90054(来源于中国典型培养物保藏中心) , *E. coli* GS245⁻ (*pheA905 araD139 lacU169 ΔglyA strA thi1*)(Dr. Staffer G.V. 惠赠) , *E. coli* JM109(本室保存) , 载体 pMD18-T(购自 TaKaRa 公司) , 表达载体 pET15b(孟疆辉博士惠赠) , 表达菌株 BL21(DE3)(本室保存) 。限制性内切酶 *Bam*H、*Hind* III、*Nde* I , T4DNA 连接酶(均购自 TaKaRa 公司) , λDNA/*Hind* III Marker 和蛋白质分子量标准(均购自华美生物工程公司) , DNA 快速回收试剂盒(购自 Purigene 公司) ; 其他生化试剂均为国产和进口分析纯。

1.2 *glyA* 基因的分离和序列测定

参照 *glyA* 基因序列^[3]设计了一对寡核苷酸引物(正向引物 1 5'CTGTAGCGATG-GTTTGAGCGTC3' , 反向引物 1 : 5'CAAT-TAAGCCGCGCACAACAGGTG 3') 。以大肠杆菌染色体 DNA 为模板进行 PCR 扩增 , 循环参数为 : 94℃ 预变性 300 s , 94℃ 变性 60 s , 63℃ 退火 60 s , 72℃ 延伸 120 s , 反应为 33 个循环 , 最后 72℃ 延伸 300 s 。将 PCR 产物纯化后与载体 pMD18-T 连接 , 转化感受态细胞 *E. coli* JM109 , 蓝白菌落筛选阳性重组子 , 提取重组质粒 pMD18-T-*glyA* , 并用双酶

第一作者 : 硕士研究生。

* 湖北省科技攻关基金资助项目(No. 982P1301)

收稿时间 2001-07-11 改回时间 2001-10-15

切 *Bam*H I 和 *Hind* III)进行鉴定。鉴定的重组子用 M13 的通用引物和链终止法在 ABI PRISM™ DNA 自动测序仪上进行双向测序。

1.3 重组表达载体的构建及表达

参照 1.2 中测定的 *glyA* 基因序列设计了第 2 对寡核苷酸引物(正向引物 2:5'CC-CATATGTTAAAGCGTGAAATGAAC3', 反向引物 2:5' CACGGATCCTTAT-GCGTAAA-CCGGGTAACG3')。用此对引物,以重组质粒 pMD18-T-*glyA* 为模板,用 PCR 方法扩增 *glyA* 基因编码区(即 SHMT 基因),循环参数同 1.2。PCR 产物纯化后双酶切(*Nde* I 和 *Bam*H I)与已双酶切(*Nde* I 和 *Bam*H I)的质粒 pET15b 进行连接反应,连接产物转化感受态细胞 DH5 α , 氨苄青霉素平板筛选阳性重组子并进行序列测定,将对框正确的重组表达质粒 pET15b-SHMT 转化 BL21(DE3)菌株用于表达系统。将过夜培养的含重组表达质粒 pET15b-SHMT 的 BL21(DE3)菌液,按 2% 接种量转接到 LB 培养液中,37℃ 振荡培养至 OD_{600} 0.6~0.8 时,加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L。诱导 6 h 后制备上样样品,从中取 15 μ L 进行 SDS-PAGE 电泳^[4],分离胶浓度为 10%。

1.4 活性鉴定

用基因互补实验鉴定丝氨酸羟甲基转移酶基因的活性。*E. coli* GS245⁻(*phyA905 araD139 lacU169 Δ glyA strA thi1*)菌株是用来检测 pET15b-SHMT 在体内活性的受体菌。在基本培养基($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NaCl , NH_4Cl , CaCl_2 , MgSO_4 , 0.4% 葡萄糖)中添加 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苯基丙氨酸、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ V_{B_1} 、2% 琼脂制成检测丝氨酸羟甲基转移酶活性的平板。

2 结果与分析

2.1 *glyA* 基因的克隆及序列分析

以染色体 DNA 为模板进行 PCR 扩增,

将 PCR 产物用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳,在 1.8 kb 左右处有一条典型的特异性扩增带。PCR 产物纯化后与载体 pMD18-T 连接成为重组质粒 pMD18-T-*glyA*,转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,用双酶切(*Bam*H I 和 *Hind* III)鉴定,90% 以上的白色菌落均含有大小合适的插入片段。随机挑取一个阳性克隆用于测序。

测序结果(图略)表明,PCR 方法克隆的 *glyA* 基因含有 1878bp 核苷酸,它从第 356 位核苷酸到第 1606 位核苷酸有一个重要的开放阅读框,此开放阅读框编码 417 个氨基酸长肽,是 *glyA* 基因的编码区,编码丝氨酸羟甲基转移酶。在 ATG 前面的 SD 序列为 TCAGGAGAT, Pribnow box 序列为 TAT-ACT,与文献报道^[3]一致。在推测的氨基酸序列中,222 位氨基酸和 231 位氨基酸之间的氨基酸序列 Val-Val-Thr-Thr-Thr-Thr-His-Lys-Thr-Leu 是 5'-磷酸吡哆醛联结位点;166 位氨基酸和 177 位氨基酸之间的氨基酸序列 Lys-Pro-Lys-Met-Ile-Ile-Gly-Gly-Phe-Ser-Ala-Tyr 是大肠杆菌中丝氨酸羟甲基转移酶的活性位点^[3]。虽然测定的序列中有 3 个碱基不一样(第 1442 位 C 变 G、1498 位 A 变 C、1517 位 A 变 G),引起了 3 个氨基酸的变化(第 363 位 Arg 变 Gly,第 381 位 Glu 变 Asp,第 388 位 Asp 变 Gly),但是联结位点和活性位点的氨基酸没有变化,且核苷酸序列和氨基酸序列的同源性分别高达 99.8% 和 99.3%。

2.2 重组表达载体的构建及功能表达

按 1.3 所述构建重组表达载体。在氨苄青霉素平板筛选的阳性重组子中,根据序列测定的结果,将插入 SHMT 基因且对框正确的重组表达质粒 pET15b-SHMT 转化 BL21(DE3)菌株用于表达系统。SDS-PAGE 电泳结果(见图 1)表明,在约 46500 u 处有一条明显的蛋白表达带,与 Stauffer 报道^[3]的一致。之所以有这样高的表达量,可能与表达系统或者 PCR 克隆时引起的 3 个点突变有一定

的关系。

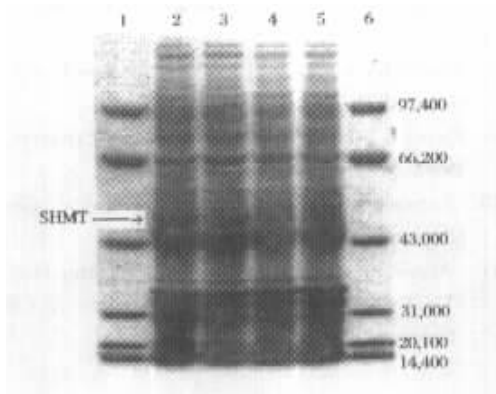


图 1 SDS-PAGE 图谱

- 1 6-SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质；
- 2-BL21(DE3) pET15b-SHMT) 加 IPTG 诱导表达 6 h；
- 3-BL21(DE3) pET15b-SHMT) 未加 IPTG 诱导表达；
- 4-BL21(DE3) pET15b) 加 IPTG 诱导表达 6 h；
- 5-BL21(DE3) pET15b) 未加 IPTG 诱导表达

2.3 活性鉴定

SHMT 基因首先被克隆到表达质粒 pET15b 中成为重组表达质粒 pET15b-SHMT, 再将质粒 pET15b-SHMT 转化到 *E. coli* GS245- 中, 使其成为 *E. coli* GS245 (pET15b-SHMT) 菌株。然后将 *E. coli* GS245⁻、*E. coli* GS245(pET15b-SHMT) 这 2 种菌株分别划线于按 1.4 所述制备的平板上。结果(见图 2)显示, *E. coli* GS245⁻ 不能

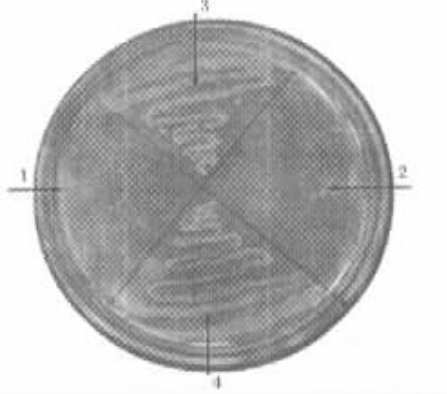


图 2 基因互补实验结果图示

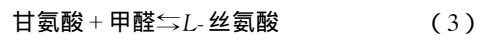
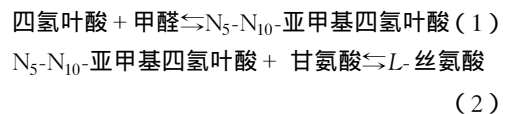
- 1 2-GS245-*E. coli* 菌株不能在缺少甘氨酸的基本培养基上生长；
- 3 4-GS245(pET15b-SHMT) *E. coli* 菌株能在缺少甘氨酸的基本培养基上生长

在平板上生长, 而 *E. coli* GS245 (pET15b-SHMT) 则可以在平板上生长。这证实 PCR 方法克隆到的 SHMT 基因是完全有活性的基因, 它的重组蛋白有酶促活性, 能够拯救 *glyA*⁻ *E. coli* 菌在缺少甘氨酸的培养基中生长。

3 讨论

人们科学地研究了许多生物的丝氨酸羟甲基转移酶, 如 *C. jejuni*^[5]、含羞草^[6]、兔肝脏^[7]、人肝脏^[8]等的丝氨酸羟甲基转移酶。最近 Renwick 等人^[9]绘制了人肝脏细胞质中的丝氨酸羟甲基转移酶的三维结构, Scarsdale 等人^[10]利用 X- 射线证实了兔肝脏细胞质中的丝氨酸羟甲基转移酶的三维结构。随着大量的有用信息的积累, 特别是对其三维结构的绘制, 人们发现了利用丝氨酸羟甲基转移酶设计治疗癌症的药物的新途径^[11]。

本文着眼点不同, 利用丝氨酸羟甲基转移酶可以催化甲醛与甘氨酸缩合生成 L- 丝氨酸的特性, 反应式如下:



将研究目的定位于工业化生产 L- 丝氨酸, 因此构建了表达质粒 pET15b-SHMT, SDS-PAGE 显示 SHMT 表达量高。如果进一步优化表达条件, 诸如最合适的培养基、最佳 pH 值、最佳发酵时间等, 将会进一步提高 SHMT 表达量。这些工作为下一步构建高效表达 SHMT 的基因工程菌株提供了强有力的技术支持, 并为以后利用发酵工程技术和细胞固定化技术实现大规模国产化生产 L- 丝氨酸奠定了坚实的基础。

参 考 文 献

- 1 冯美卿, 曹秀格, 卢永辉. 氨基酸和生物资源, 2000 23(3): 42~44

- 2 Hamilton B K , Hsiao H Y. Trend in Biotechnology , 1985 , 3 : 64 ~ 68
- 3 Michael D P , Lorraine T S , Stauffer G V et al. Nucleic Acids Research , 1983 , 11(7) : 2 065 ~ 2 075
- 4 Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T 著. 金冬雁 黎孟枫等译. 分子克隆实验指南(第 2 版). 北京 科学出版社 , 1998. 880 ~ 887
- 5 Voon L C , Hermine L B. Gene , 1990 , 101 : 51 ~ 58
- 6 Lin H B , Falchetto R , Mosca P J et al. The Journal of Biological Chemistry , 1996 , 271 : 2 548 ~ 2 556.
- 7 Filippo M , Bruno M , Pala T et al. The Journal of Bio-logical Chemistry , 1989 , 265(15) : 8 509 ~ 8 519
- 8 Sameh Girgis , Tlya M Nasrallah , Jae Rinsuh et al. Gene , 1998 , 210 : 315 ~ 324
- 9 Renwick S B , Snell K , Baumann U. Structure , 1998 , 6 : 1 105 ~ 1 116
- 10 Scarsdale J N , Kazarina G , Radaev S et al. Biochemistry , 1999 , 38 : 8 347 ~ 8 358
- 11 Appaji Rao N , Rashmi Talwar , Aavithri H S. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology , 2000 , 32 : 405 ~ 416

Expression and Identification of Serine Hydroxymethyltransferase Derived from *Escherichia coli*

Liu Wanhong Liu Aifu Li Wenxin Wang Junying

(Institute of Amino Acids , College of Life Sciences , Wuhan University , Wuhan , 430072)

ABSTRACT The *glyA* gene for serine hydroxymethyltransferase(SHMT) was obtained from chromosomal DNA of *E. coli* and inserted into vector pET15b. After expressed in *E. coli* , its activity was identified by the genetic complementation.

Key words serine hydroxymethyltransferase , gene cloning , procaryotic expression , activity identification

日本学者从茶叶中发现新抗过敏物质

日本蔬菜和茶叶研究所通过分析和试验确认 ,茶叶中有一种新的抗过敏性物质 ,能够减轻花粉症等过敏病症。

该所科学家山本万里发表的科研成果说 ,这种新的抗过敏物质是儿茶素的一种 ,属于表儿茶酸(简称 EGCg)的衍生物。通过动物试验及让 50 名花粉症患者饮用含有该种物质的绿茶 ,结果发现它比已知的表儿茶酸有更好的抗过敏症效果。

根据山本万里的研究试验 ,这种有用的物质在制作红茶的过程中会因发酵而消失 ,而在制作绿茶过程中由于没有发酵工序因而得以保留。

国家质量技术监督局发布 GB4480.1 - 2001《食品添加剂 胭脂红》 和 GB4480.2 - 2001《食品添加剂 胭脂红铝色淀》新国标

国家质量技术监督局于 2001 年 10 月 24 日发布 GB4480.1 - 2001《食品添加剂 胭脂红》和 GB4480.2 - 2001《食品添加剂 胭脂红铝色淀》新国标 ,同时代替国标 GB4480.1 - 1994 和 GB4480.2 - 1994。新国标将于 2002 年 6 月 1 日起实施。