

# 低氧诱导透明颤菌血红蛋白基因 在大肠杆菌中的表达

张 锋, 赵晓瑜, 周艳芬

(河北大学 生命科学院, 河北 保定 071002)

**摘要:** 合成透明颤菌血红蛋白基因(*vgb*)的天然低氧启动子, 与 *vgb* 结构基因拼接得到 570 bp 的 *vgb* 基因, 将该基因克隆到 pUC18 质粒中重组为 pUC-LV 质粒, 转化大肠杆菌得到重组子。通过低氧诱导 10 h 后, 重组菌的密度较对照增加了 67.4%, 经 SDS-PAGE 和 CO 差光谱分析证明重组菌表达了有活性的透明颤菌血红蛋白(VHb)。

**关键词:** 透明颤菌血红蛋白基因; 天然启动子; 大肠杆菌; 低氧诱导

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006)增刊-0020-03

## Hypoxia induced Expression of *Vitreoscilla* Hemoglobin Gene in *Escherichia coli*

ZHANG Feng, ZHAO Xiao yu, ZHOU Yan fen

(College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

**Abstract:** The 570 bp *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*) was obtained by synthesizing the native promoter of *vgb* and jointing it with *vgb* structural gene. The recombinant vector pUC-LV constructed by cloning the gene into pUC18 plasmid was transformed into *Escherichia coli*. After ten hours of induction under low dissolved oxygen conditions, the density of recombinant strain increased 67.4% compared with that of control. The results of SDS-PAGE and carbon monoxide(CO) difference spectrum analysis indicated that the recombinant strain expressed *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) having biological activity.

**Key words:** *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*); Native promoter; *Escherichia coli*; Hypoxia induction

氧是好氧微生物进行能量物质代谢的重要物质, 微生物生长越旺盛, 对氧的需求量也就越大。目前微生物工业普遍遇到生产菌对氧的需求量与发酵设备供氧能力间的矛盾。透明颤菌血红蛋白基因(*vgb*)的表达可促进微生物细胞内氧的传输, 提高氧的利用效率<sup>[1]</sup>, 因而可在限氧条件下促进细胞生长和产物合成, 从而大幅度提高发酵过程中目的产物的产量和收率。因此, 利用基因重组技术将 *vgb* 基因在工程菌中克隆表达这一策略, 对于解决微生物发酵工业中的供氧, 提高产品的产量和品质, 降低发酵成本等问题有重要意义, 并可能带来巨大的经济效益, 因而有广阔的应用前景。

目前, 对 *vgb* 基因的研究越来越深入, 已将其克

隆到大肠杆菌<sup>[2]</sup>、假单胞菌、固氮菌、根瘤菌<sup>[3]</sup>、变铅青链霉菌和天蓝色链霉菌<sup>[4]</sup>等多种异源微生物体内并获得表达, 从而促进了重组菌的生长并提高了目的产物的产量。

从透明颤菌(野生菌)中获得的 *vgb* 基因为 1.4 kb<sup>[3]</sup>, 除结构基因外还有较长的 3'端非编码区。本文通过化学合成和 PCR 方法, 将天然启动子与 *vgb* 结构基因直接拼接, 获得了由低氧启动子控制的 *vgb* 基因, 并在大肠杆菌中获得表达。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株与质粒

1.1.1 菌株 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 本室保存; 大肠杆菌

DH5α(pUC18), 本室保存。

1.1.2 质粒 大肠杆菌质粒 pUC18, 购自 TaKaRa 公司; pUC19-800(含 *vgb* 结构基因), 本室构建。

## 1.2 方法

1.2.1 引物设计, PCR 扩增 *vgb* 结构基因 根据 GenBank 中已报道的 *vgb* 基因的序列设计引物。

5'端引物: CCGGAATTCATGTTAGACCAGCAAAAC

3'端引物: AACTGCAGTCCTGAAAGCGCCTGAAAC

PCR 反应条件为: 94℃预变性 3 min; 94℃变性 20 s, 45℃退火 20 s, 72℃延伸 1 min, 共 30 个循环; 最后 72℃延伸 5 min。

1.2.2 *vgb* 基因天然启动子的合成及其与结构基因的拼接 委托上海生工公司进行。

1.2.3 质粒的提取、重组以及大肠杆菌的转化 均参照《现代分子生物学实验技术》的方法<sup>[6]</sup>。

1.2.4 重组子的诱导表达 利用低转速摇床培养(约 100 r/min)降低发酵液内的溶氧, 实现透明颤菌血红蛋白(VHb)的低氧诱导表达<sup>[7]</sup>, 以 *E. coli* DH5α(pUC18)为对照。

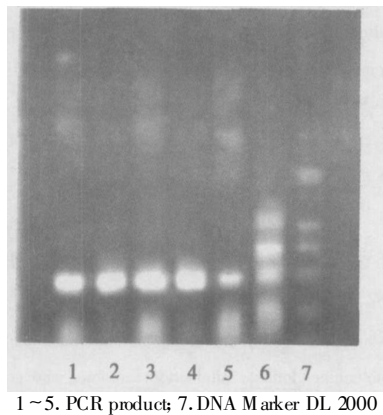
1.2.5 SDS PAGE 检测 VHb 的表达。

1.2.6 VHb 的活性检测—CO 差光谱分析<sup>[8]</sup>。

## 2 试验结果

### 2.1 表达载体 pUC-LV 的构建

利用 1.2.1 中设计的引物, 以 pUC19-800 质粒为模板, 扩增得到 470 bp 的 *vgb* 结构基因(图 1)。



1~5. PCR product; 7. DNA Marker DL 2000

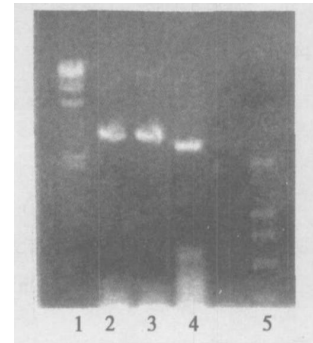
图 1 *vgb* 结构基因的扩增

Fig. 1 PCR of *vgb* structural gene

根据 *vgb* 基因天然启动子部分的 DNA 序列 (GenBank 序列号 M30794) 合成以下 DNA 片段: 5' tgtggattaa gtttaagag gcaataaaga ttataataag tgctgctaca ccatactgat gtaaggcaaa accataataa tgaacttaag gaagaccctc 3', 与扩增得到的 470 bp 的 *vgb* 结构基因拼接, 构成的

*vgb* 基因全长 570 bp。测序结果表明, 该 570 bp 的 DNA 片段与 GenBank 中所报道的 *vgb* 基因序列一致。

依据拼接后的序列设计引物, 正向引物含 *Eco*RI 酶切位点, 反向引物含 *Bam*HI 酶切位点, 并以该片段为模板进行 PCR。将获得的扩增片段转化到大肠杆菌 DH5α, 得到重组子 pUC-LV。正如图 2 所示, 从 pUC-LV 质粒的酶切结果可以看到, 经 *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切得到一个约 600 bp 的片段。



1. λDNA/ *Hind* III; 2. pUC-LV/ *Eco*RI;

3. pUC-LV/ *Bam*HI; 4. pUC-LV/ *Eco*RI & *Bam*HI;

5. DL 2000

图 2 pUC-LV 质粒的酶切图谱

Fig. 2 Restriction analysis of pUC-LV plasmid

测序和 pUC-LV 质粒的酶切鉴定证明, pUC-LV 质粒插入了携带天然启动子的 *vgb* 基因。

2.2 VHb 的诱导表达和鉴定 由于重组的天然启动子为低氧启动子, 当发酵液中的溶氧低于 20% 时即会诱导 *vgb* 基因表达<sup>[9]</sup>, 按照 1.2.4 利用低转速对上述重组菌进行诱导表达。

2.2.1 重组子表达产物的 SDS PAGE 检测 收集低氧诱导的菌体, 进行 SDS PAGE 分析, 结果见图 3。可以看出, 重组子 pUC-LV 表达了约 16kD 的 VHb。

2.2.2 VHb 的活性测定 由于血红蛋白类物质的 CO 差光谱在 419 nm 具有特征吸收峰<sup>[10]</sup>, 因此可以采用 CO 差光谱法测定血红蛋白的活性。重组子 pUC-LV 与对照菌相比在 420 nm 左右有明显的吸收峰(图 4), 表明该重组菌表达的 VHb 有生理活性。

2.2.3 VHb 的表达对菌体生长的影响 低氧诱导重组子 pUC-LV, 以 *E. coli* DH5α(pUC18)为对照, 从接种后 2 h 开始每小时取发酵液一次, 以水稀释适当倍数, 测定 OD<sub>600</sub>, 结果见表 1。由表中数据可知在同样培养条件下, VHb 的表达明显促进了重组菌的生长, 10 h 后菌量较对照增加了 67.4%。

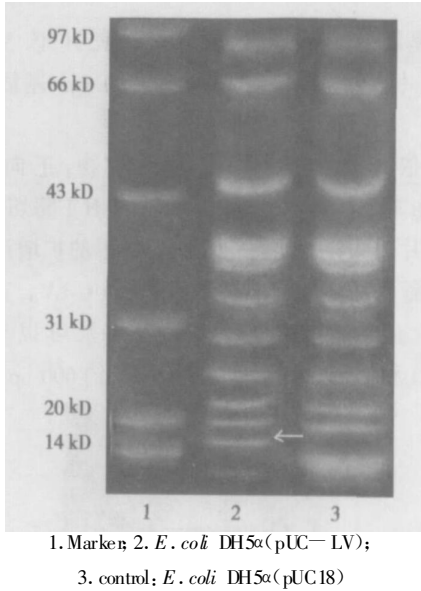


图 3 大肠杆菌重组子的 VHb 表达

Fig. 3 Expression of VHb in recombinant *E. coli*

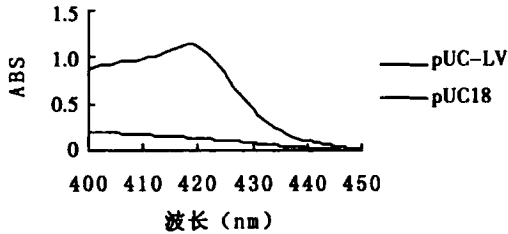


图 4 重组菌表达产物 VHb 的 CO 差光谱

Fig. 4 CO difference spectrum analysis of expressed VHb

表 1 低氧诱导对菌体密度(OD<sub>600</sub>)的影响

Tab.1 Effect of hypoxia induction on bacteria density (OD <sub>600</sub> )										
培养时间(h)	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
pUC18(control)	0.020	0.030	0.115	0.225	0.460	0.540	0.720	1.000	1.150	
pUC-LV	0.020	0.050	0.130	0.335	0.535	0.755	1.000	1.460	1.925	

3 讨论

*vgb* 基因的天然启动子为低氧启动子,它是一个强启动子,且不需要特殊试剂诱导,当发酵液中的溶氧低于 20%时 VHb 即被诱导表达。为了充分发挥 VHb 在发酵过程中运输氧的能力,本试验用 *vgb* 结构基因及其天然启动子构建了一个大肠杆菌的表达载体 pUC-LV,将该重组质粒转入大肠杆菌中,重组菌表达了有活性的 VHb,并且明显促进了菌体的

生长。

另外,本研究组已将 pUC-LV 质粒转化到黄单胞菌中,发现利用低氧启动子诱导 VHb 的表达,可以促进该菌的生长并提高了其发酵产物黄原胶的产量。对于其他生产菌作用的研究也在进行当中。

参考文献:

[ 1 ] 于慧敏,沈忠耀. 透明颤菌血红蛋白及其基因的研究进展[ J ]. 微生物学报, 1999, 39(5): 478—482.

[ 2 ] Khosla C, Bailey J E. Heterologous expression of a bacterial haemoglobin improves the growth properties of recombinant *Escherichia coli*[ J ]. Nature, 1988, 331: 633—635.

[ 3 ] Dikshit K L, Dikshit R P, Webster D A. Study of *Vitreoscilla* globin (*vgb*) gene expression and promoter activity in *E. coli* through transcriptional fusion[ J ]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(14): 4149—4155.

[ 4 ] Magnolo S K, Leenutaphong D L, DeModena J A, et al. Actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* and growth of *Streptomyces lividans* are improved by the expression of a bacterial hemoglobin[ J ]. Biotechnology, 1991, 9(5): 473—476.

[ 5 ] Dikshit K L, Webster D A. Cloning, characterization and expression of the bacterial globin gene from *Vitreoscilla* in *Escherichia coli*[ J ]. Gene, 1988, 70(2): 377—386.

[ 6 ] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[ M ]. 北京: 高等教育出版社, 1993.

[ 7 ] Geckil H, Stark B C, Webster D A. Cell growth and oxygen uptake of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* are differently effected by the genetically engineered *Vitreoscilla* hemoglobin gene[ J ]. Biotechnology, 2001, 85(1): 57—66.

[ 8 ] 于慧敏,史悦,沈忠耀,等. CO 差光谱法分析重组大肠杆菌中的透明颤菌血红蛋白[ J ]. 清华大学学报(自然科学版), 2002, 42(5): 615—618.

[ 9 ] 吴奕,杨胜利. 透明颤菌血红蛋白的表达及对基因工程菌的影响[ J ]. 生物工程学报, 1996, 12(2): 177—182.

[ 10 ] Khosla C, Bailey J E. The *Vitreoscilla* hemoglobin gene: molecular cloning, nucleotide sequence and genetic expression in *Escherichia coli*[ J ]. Mol Gene Genet, 1988, 214(1): 158—161.