

文章编号: 0427-7104(2007)03-0366-05

# 大肠杆菌 *aroL* 基因敲除及其对莽草酸合成的影响

付小花, 高益范, 郝思捷, 张伯生, 任大明

(复旦大学 生命科学学院 遗传学研究所, 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433)

**摘要:** 以 *E. coli* DH5 $\alpha$  基因组为模板克隆莽草酸激酶 II 基因 (*aroL*), 构建质粒 pMD-*aroL*, 经 *Hpa*I、*Bsa*BI 酶切后插入卡那霉素抗性基因 (*kan*) 得 pMD-*aroL*::*kan*, 利用 pKD46 的  $\lambda$  重组系统, 用该质粒上的 *kan* 及两端的 *aroL* 同源序列替换 *E. coli* Top10F' 基因组上的 *aroL* 基因, 再运用质粒 pCP20 编码的 FLP 重组酶消除 *kan* 基因. Southern blot 证实基因敲除是成功的, 测序结果表明 *kan* 已经从基因组上消除, 摇瓶发酵显示构建的基因工程菌的莽草酸产量是原始菌株的 1.57 倍.

**关键词:** *aroL*; 基因敲除; Red 重组系统

**中图分类号:** Q 96

**文献标识码:** A

莽草酸 (shikimic acid) 是芳香族氨基酸和芳香维他命的生物合成通路——莽草酸途径的重要中间体<sup>[1]</sup>. 它具有众多生理功能: 通过影响花生四烯酸代谢来抑制血小板聚集, 从而可以抑制动、静脉血栓及脑血栓形成; 具有抗炎、镇痛作用; 还可作为抗病毒和抗癌药物的中间体, 有广泛的药用价值<sup>[2]</sup>. 莽草酸还是可以抑制 H5N1 型禽流感病毒的药物磷酸奥司米 (oseltamivir phosphate, 商品名达菲) 的原料, 随着禽流感疫情在全球蔓延, 莽草酸更加供不应求.

虽然莽草酸途径在植物、微生物和寄生生物中广泛存在, 但该途径的中间代谢物, 如莽草酸、奎尼酸等的大量生产却并不容易, 目前主要是从八角属植物果实中提取莽草酸, 但是提取工艺繁琐, 且成本较高<sup>[3]</sup>. 因此利用微生物发酵生产是解决此问题的最佳方法, 但我国目前还没有可以发酵生产莽草酸的菌种.

莽草酸激酶催化莽草酸磷酸化为 3-磷酸莽草酸的反应. 大肠杆菌中有两个莽草酸激酶, 即: 莽草酸激酶 I 和莽草酸激酶 II, 分别由 *aroK* 和 *aroL* 编码. *aroL* 编码的莽草酸激酶 II 是大肠杆菌中起主要作用的酶, 其  $K_m$  值比莽草酸激酶 I 小约一百倍<sup>[4]</sup>, 由于莽草酸激酶 I 的  $K_m$  值大, 底物莽草酸必须累积到一定浓度该酶才能起作用, 所以在大肠杆菌中催化此反应的酶主要是莽草酸激酶 II. 本文利用近年来发展起来的基因敲除方法——Red 重组系统<sup>[5]</sup>, 用构建的内部带有抗性筛选标记、两端为靶基因同源序列的线性片段, 替换基因组上的 *aroL* 基因, 获得具有卡那霉素抗性且 *aroL* 基因敲除的菌株.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与质粒

*E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* Top10F' [ $\Psi$ 80 *lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX*74 *deoR* *recA1* *araD*139  $\Delta$ (*ara-leu*)7 679 *galU* *galK*  $\lambda$ -*rpsL*(*str*<sup>r</sup>)*endA1* *nupG* F' {*lacIq* Tn10(Tet<sup>r</sup>)} *mcrA* $\Delta$ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*) 购自美国典型菌种保藏中心 (ATCC), 本室保存. 质粒 pKD46 (温度敏感型, 含有受阿拉伯糖启动子调控的 *gam*, *bet* 和 *exo* 基因, Amp<sup>r</sup>), pKD4 (含有两边带有 FRT 位点的卡那霉素抗性基因, Amp<sup>r</sup>Kan<sup>r</sup>), pCP20 (温度敏感型, 编码 FLP 重组酶, 可专一识别 FRT 位点), 均由 Wanner B. L. <sup>[5]</sup> 馈赠.

### 1.2 培养基, 酶和试剂

大肠杆菌培养基和质粒增殖培养基 LB: 5 g/L 酵母膏、10 g/L 蛋白胨、10 g/L NaCl, pH 7.2; 发酵培养基: 30 g/L 葡萄糖、10 g/L 酵母膏、3 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12 g/L NH<sub>4</sub>Cl, 1 g/L MgSO<sub>4</sub>, 0.3

收稿日期: 2006-08-30

作者简介: 付小花 (1978—), 女, 硕士研究生; 通讯联系人任大明教授.

g/L CaCl<sub>2</sub>, 6 g/L 柠檬酸钠、0.6 g/L 谷氨酸钠、2 g/L 蛋白胨、20 mg/L V<sub>B1</sub>, pH 7.5.

dNTP、Taq DNA 聚合酶购自上海华诺公司,质粒提取试剂盒购自 Promega 公司,pMD18-T、限制性核酸内切酶及 DNA 胶回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司,L-阿拉伯糖购自 Sigma 公司,Southern 杂交和检测试剂盒购自 Amersham Bioscience 公司,引物合成及测序由上海生工生物技术有限公司完成.

### 1.3 PCR 引物设计

根据 Genbank 上 *E. coli* K12 的 *aroL* 基因序列设计引物:P<sub>1</sub>: 5'-ATGACACAACCTCTTTTCTGA-3'和 P<sub>2</sub>: 5'-TGGCTGGGTTTCGTTTGTG-3';根据质粒 pKD4 序列设计引物扩增卡那霉素抗性基因:P<sub>3</sub>: 5'-AGGGATACCGATCGGATTGTGTAGGCTGGAG-3'和 P<sub>4</sub>: 5'-AGGGTAAACACTTAACGGCTGACATGG-3'.

### 1.4 *aroL* 基因破坏质粒的构建及片段的线性化

先将 *aroL* 基因与 pMD-18T 载体连接,然后将 *kan* 抗性基因插入到 *aroL* 内部的 *Hpa* I、*Bsa* B I 酶切位点间,最后用 *Eco* R I 和 *Pst* I 双酶切将两端带有靶基因同源臂的 *kan* 抗性基因片段切下回收.

### 1.5 Red 重组功能的诱导和感受态细胞的制备

参考文献[6]作适当修改,将编码 Red 重组系统的 pKD46 转化至 *E. coli* Top10F',在含 60 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中 30℃ 培养过夜,将 400 μL 培养物加入到装有 40 mL LB 培养基的 250 mL 锥形瓶中,30℃,200 r/min 培养至 A<sub>600</sub> = 0.3~0.4,加入 L-阿拉伯糖,使其终浓度为 30 mmol/L,并继续培养 1.5 h.培养物在冰水浴中冷却 10~15 min,转移到预冷的 50 mL 离心管中,2℃,4 000 r/min 离心 10 min,沉淀用预冷的无菌水洗涤 2 次,预冷的 10% 甘油洗涤 1 次,最后用 10% 甘油重悬,80 μL/管分装于预冷的微量离心管中.

### 1.6 电转化

将 *aroL* 破坏的线性片段( $\Delta$ *aroL*::*kan*)1 μg 与感受态细胞混匀,用 Bio-Rad 公司的 Pulser X Cell 于 2 500 V,25 μF,200 Ω 条件下电击,电击后快速加入 1 mL LB 培养基,30℃ 培养 1 h,涂布于含有 25 μg/mL 卡那霉素的 LB 平板.

### 1.7 基因敲除菌株的筛选及 pKD46 质粒的消除

待平板上长出菌落后,筛选 Amp<sup>s</sup>Kan<sup>r</sup> 克隆,用 P<sub>1</sub>,P<sub>2</sub> 和 P<sub>3</sub>,P<sub>4</sub> 分别进行 PCR 鉴定,鉴定为阳性的克隆在含 25 μg/mL Kan<sup>r</sup> 平板上划线,待菌落长出后,再进行 Amp<sup>s</sup>Kan<sup>r</sup> 筛选和 PCR 鉴定.如此进行 5 轮筛选,保存阳性菌株.

### 1.8 基因敲除菌株的 Southern blot 鉴定

按试剂盒说明对 *kan* 基因探针进行生物素标记并检测效价,提取对照菌株 *E. coli* Top10F'、基因敲除菌株 LKT<sub>op</sub> 的基因组,用合适的酶进行酶切,在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳,然后进行凝胶的变性、中和、毛细管转移、固定、杂交及免疫检测.

### 1.9 FLP 位点专一性重组

将卡那霉素抗性的大肠杆菌制成感受态细胞(卡那霉素抗性基因两端带有 FRT 位点),导入编码 FLP 位点专一性重组酶的质粒 pCP20,于含 50 μg/mL 氨苄青霉素和 30 μg/mL 氯霉素的 LB 平板上 30℃ 培养筛选阳性转化子,然后转接无抗性的 LB 培养基,37℃ 培养 8 h,42℃ 培养 1 h,再在 37℃ 条件下划线培养分离单菌落,对各个单菌落进行卡那霉素、氨苄青霉素和氯霉素抗性检测,获得对 3 种抗生素均敏感的克隆.

### 1.10 摇瓶发酵及莽草酸测定

在 2 mL LB 培养基中接种单菌落,37℃ 培养 12 h,用生理盐水洗涤 1 次,用发酵培养基洗涤 1 次,按 1% 接种于 20 mL 发酵培养基,37℃,200 r/min,振荡培养 60 h 离心,上清用高碘酸氧化法测定莽草酸的含量<sup>[7]</sup>,即:发酵液加高碘酸于 37℃ 温育 30 min 后加入 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 和 NaOH,混匀后用 Hitachi 公司的 U3000 分光光度计测定 382 nm 处的光密度值.

## 2 结 果

### 2.1 同源重组质粒 pMD-*aroL*::*kan* 的构建

以 *E. coli* DH5α 总 DNA 为模版,以 P<sub>1</sub>,P<sub>2</sub> 为引物扩增 *aroL*,产物约 480 bp,胶回收后连 pMD18-T 得

质粒 pMD-aroL; 以 P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub> 为引物, 质粒 pKD4 为模板扩增 kan 基因, 回收扩增产物, Hpa I, BsaB I 双酶切; 同时用 Hpa I, BsaB I 双酶切 pMD-aroL, 回收 2 900 bp 左右的片段, 将两者连接, 转化 E. coli DH5 $\alpha$ , 涂布于含氨苄青霉素和卡那霉素的平板. 待长出菌落, 以 P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> 为引物做 PCR 鉴定, 扩增产物约 1 769 bp, 与预期大小一致, 经测序证明载体构建正确, 如图 1 所示. Hpa I, BsaB I 双酶切后的线性片段两边各留有 100 bp 左右序列与宿主菌的染色体同源, 有利于电击转化后同源重组的进行.

2.2 aroL 基因敲除突变体的获得

如图 1 所示, 利用 EcoR I, Pst I 将  $\Delta$ aroL::kan 片段从质粒 pMD-aroL::kan 切下, 回收约 1 800 bp 的片段, 电击转化后涂布含 25  $\mu$ g/mL 卡那霉素的平板, 待长出菌落, 以引物 P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> 做 PCR 鉴定, 产物如图 2 中泳道 3 所示(小于 100 bp 的条带为引物二聚体), 对 PCR 产物的测序结果表明转化的  $\Delta$ aroL::kan 片段确实替换了基因组中的 aroL 基因. 阳性菌株命名为 E. coli LKTop.

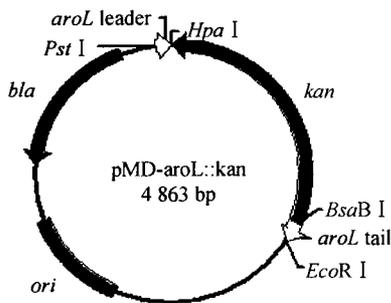


图 1 质粒 pMD-aroL::kan 的物理图谱  
Fig.1 Structure of plasmid pMD-aroL::kan

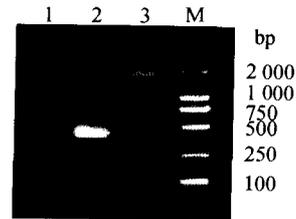


图 2 aroL 基因敲除菌株的 PCR 鉴定  
Fig.2 PCR identification of the aroL gene knockout strain

lane1: 无模板对照; lane2: E. coli Top10F' PCR 产物; lane3: E. coli LKTop PCR 产物; M: DL2000 marker

2.3 质粒 pKD46 的消除

将 PCR 鉴定为阳性的整合子接种于 LB 中, 42  $^{\circ}$ C 培养 2 h, 转入 37  $^{\circ}$ C 培养过夜, 再于 LB 上划线分离单菌落, 37  $^{\circ}$ C 培养, 将长出的菌落分别点种于含氨苄青霉素和卡那霉素的平板上, 选取氨苄青霉素敏感且具卡那霉素抗性的菌株, 得到消除质粒 pKD46 且 aroL 敲除的菌株.

2.4 Southern blot 鉴定基因敲除菌株

提取对照菌株 E. coli Top10F' 和基因敲除菌株 E. coli LKTop 的基因组, 用 Bgl I 单酶切及 BamH I 和 HindIII 双酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳. Southern 印迹结果显示: BamH I 和 HindIII 酶切基因敲除菌株 DNA(包含 kan), 在约 4 000 bp 左右有一条杂交带, Bgl I 切基因敲除菌株 DNA(包含 kan) 约 6 500 bp 处有一条杂交带, HindIII 酶切质粒 pMD-aroL::kan 在 4 863 bp 处有一条杂交带; 而对照菌株因不含有可与 kan 探针结合部分, 没有杂交信号, 如图 3 所示.

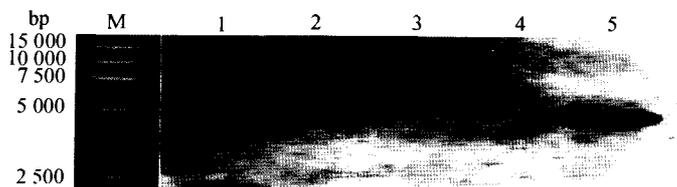


图 3 基因敲除菌株的 Southern 杂交结果(kan 基因作为探针)  
Fig.3 Southern blot analysis of gene knock out strain after digestion ( kan as probe)  
M: DNA molecular weight marker DL15000; lane1: BamH I 和 HindIII 酶切 E. coli LKTop;  
lane2: BamH I 和 HindIII 酶切 E. coli Top10F'; lane3: Bgl I 酶切 E. coli LKTop;  
lane4: Bgl I 酶切 E. coli Top10F'; lane5: HindIII 酶切 pMD-aroL::kan

## 2.5 敲除突变体的稳定性检测

挑取一株阳性克隆接种于 LB 中,连续传代 10 次后在 LB 平板上划线,待长出单菌落后分别点种于含 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素和 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素的平板上,结果点种在含卡那霉素平板上的均生长,而在含氨苄青霉素的平板上都不长,说明 *kan* 基因在基因组上稳定存在。

## 2.6 *kan* 抗性基因的消除

将 pCP20 分别转化至 *E. coli* LKTop 中,先在 30  $^{\circ}\text{C}$  培养于含氨苄青霉素和氯霉素的平板上获得阳性转化子.在该过程中,pCP20 表达 FLP 重组酶,后者识别 *kan* 基因两边的 FRT 位点,从而激发 FLP 重组的发生,使两个 FRT 位点之间的 *kan* 基因丢失.随即转接至无抗性选择的培养基中,42  $^{\circ}\text{C}$  培养数小时后,37  $^{\circ}\text{C}$  平板划线培养.对获得的单菌落进行 Kan, Amp, Cm 敏感性检测.得到的 Amp, Cm, Kan 均敏感的克隆,命名为 K1Top.以 P<sub>1</sub> 和 P<sub>2</sub> 为引物进行 PCR 扩增,得到大于 500 bp 的 PCR 产物(图 4),与预期结果一致.测序结果进一步表明,在 LKTop 基因组中 *kan* 基因已丢失,并且在引物 P<sub>3</sub> 和 P<sub>4</sub> 对应序列之间只留下一个 FRT 位点及一些侧翼序列(序列略)。

## 2.7 *aroL* 基因敲除对莽草酸生物合成的影响

LB 活化菌种过夜,按 1% 接种量接入 20 mL 发酵培养基,37  $^{\circ}\text{C}$  200 r/min 摇床培养 60 h,用高碘酸氧化法<sup>[7]</sup>测定发酵液中莽草酸含量(表 1),敲除 *aroL* 基因的 *E. coli* LKTop 菌株发酵生产莽草酸的能力是原始菌株的 1.57 倍。

表 1 发酵液中莽草酸的含量

Tab. 1 Outputs of shikimic acid in fermentation broth

编号	$\rho(\text{莽草酸})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	
	<i>E. coli</i> LKTop	<i>E. coli</i> Top10F'
1	21.15	15.91
2	22.37	12.36
3	22.68	13.97
平均值	22.07	14.08

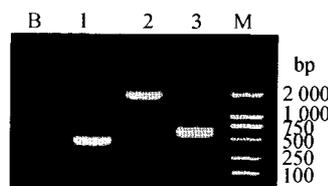


图 4 *kan* 抗性基因消除的 PCR 鉴定

Fig. 4 PCR identification of the elimination of the *kan* gene

B: 空白对照; lane1: *aroL* 基因; lane2: *E. coli* LKTop 基因组扩增产物; lane3: *E. coli* K1Top 基因组扩增产物; M: DNA marker

## 3 讨论

Red 系统是近年来发展起来的一种可以在染色体水平进行分子克隆操作的新技术. Red 同源重组系统来源于  $\lambda$  噬菌体的 *exo*, *bet*, *gam* 三个基因组成,在这三个基因产物的作用下,染色体 DNA 可以与线性 DNA 片段通过两翼较短的同源序列高频重组,使外源 DNA 片段整合到染色体上,染色体上的对应序列被置换下来,该技术可以用于染色体上的特定基因的敲除和外源基因在染色体上的整合<sup>[8]</sup>. 本研究在体外构建 *aroL* 基因的打靶载体,然后利用 Red 重组系统,将 *E. coli* Top10F' 基因组上的 *aroL* 基因用打靶载体上的 *kan* 及两端的 *aroL* 同源序列替换,从而实现基因组上 *aroL* 的敲除,获得 *aroL* 基因功能丧失并携带选择标记的突变型. Southern blot 验证了重组子和实验结果的可靠性;从摇瓶发酵结果来看,基因敲除菌株的莽草酸平均产量是原始菌株的 1.57 倍。

微生物合成芳香氨基酸的途径长,代谢调控复杂. 莽草酸途径上游的 4-磷酸赤藓糖和磷酸烯醇式丙酮酸的获得以及关键酶 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸合酶的反馈抑制都会影响下游各代谢物的产量. 定点突变 *aroL* 基因,破坏其编码的主要的莽草酸激酶——莽草酸激酶 II 的酶活性,使合成的莽草酸转化为 3-磷酸莽草酸的量大为减少,从而累积莽草酸. 这些工作只是构建莽草酸基因工程菌的第一步,若要得到高产菌株还必须对代谢途径上游的酶进行调控,使莽草酸途径得到优化,从而提高莽草酸的产量<sup>[9]</sup>,这些工作我们正在进行. 为方便后续的工作及考虑到工业生产的安全性问题,利用 FLP 重组去除了 *aroL* 基因破坏菌株 *E. coli* LKTop 基因组上的 *kan* 基因。

文献[3,9]报道基因工程菌发酵生产莽草酸同时敲除 *aroL* 和 *aroK*, 将莽草酸途径从中间完全切断, 这样就完全阻断了芳香族氨基酸和芳香维他命的合成, 则需要在培养基中补充这些物质, 但补充又会引起一个矛盾: 添加的量少会引起菌体生长不良, 发酵产量难以增加; 添加的量多又会引起反馈抑制<sup>[10]</sup>. 如只敲除编码主要酶——莽草酸激酶 II 的基因 *aroL*, 由于 *aroK* 编码的莽草酸激酶 I 的  $K_m$  值较大, 只有当莽草酸累积到较高浓度该酶才能起作用, 这样敲除突变体既可以合成少量的芳香氨基酸和芳香维他命维持菌体生长也可以累积莽草酸. 本工作就是在这方面做研究, 为构建莽草酸基因工程菌奠定基础.

### 参考文献:

- [1] Bongaerts J, Kramer M, Muller U, et al. Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds[J]. *Metab Eng*, 2001, 3: 289-300.
- [2] 仇国苏. 莽草酸与禽流感治疗药——达菲[J]. *化学与社会*, 2006, 2: 1-2.
- [3] Knop D R, Draths K M, Chandran S S, et al. Hydroaromatic equilibration during biosynthesis of shikimic acid [J]. *J Am Chem Soc*, 2001, 123: 10173-10182.
- [4] Defeyter R C, Pittard J. Genetic and molecular analysis of *aroL*, the gene for shikimate kinase II in *Escherichia coli* K-12 [J]. *J Bacteriology*, 1986, 165(1): 226-232.
- [5] Datsenko K A, Wanner B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. *PNAS USA*, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [6] 高书颖, 张惟材, 汪建华, 等. 山梨糖脱氢酶基因在大肠杆菌染色体上整合及表达[J]. *微生物学报*, 2005, 45(1): 139-141.
- [7] 先正达有限公司. 莽草酸的检测方法[P]. 中国: 00806428. 8, 2002-05-29.
- [8] Chaveroche M K, Ghigo J M, Enfert C. A rapid method for efficient gene replacement in the fungus *Aspergillus nidulans* [J]. *Nucleic Acid Research*, 2000, 28(22): 97-103.
- [9] Draths K M, Knop D R, Frost J W. Shikimic acid and quinic acid: replacing isolation from plant sources with recombinant microbial biocatalysis[J]. *J Am Chem Soc*, 1999, 121: 1603-1604.
- [10] Johansson L, Lindskog A, Silfversparre G, et al. Shikimic acid production by a modified strain of *E. coli* (W3110. shik1) under phosphate-limited and carbon-limited conditions[J]. *Wiley InterScience*, 2005, 92(5): 541-552.

## Knockout of *aroL* Gene in *Escherichia coli* Top10F' and Its Effects on the Shikimic Acid Biosynthesis

FU Xiao-hua, GAO Yi-fan, HAO Si-jie, ZHANG Bo-sheng, REN Da-ming

(State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

**Abstract:** Shikimate kinase II gene (*aroL*) was amplified from genomic DNA of *E. coli* DH5 $\alpha$ , and then was linked with pMD18-T vector. The complete gene of kanamycin resistance gene (*kan*), amplified from plasmid pKD4, was also inserted into the vector to form the plasmid pMD-*aroL*: :*kan*. After that, the linear cassette achieved from digestion of pMD-*aroL*: :*kan* by *EcoR* I and *Pst* I was electroporated into *E. coli* TopF'/pKD46. The successful knockout of *aroL* gene from the chromosome was confirmed by Southern blot and stabilization test. Using the FLP homologous recombination system, the *kan* gene is eliminated from the knockout strain's genome. The data from the flasks fermentation showed that the yield of shikimic acid in the modified strain increased 1.57 folds than that of the original strain.

**Keywords:** *aroL*; gene knockout; Red recombinant system