

绿色化工新例—利用基因重组蓝细菌生产 PHB 的初步结果

吴桂芳, 沈忠耀

(清华大学化工系生物化工研究所, 北京 100084)

摘要: 在发现蓝细菌糖原合成与 PHB 合成相竞争的基础上, 提出用基因工程手段改造蓝细菌, 使催化糖原合成的关键酶—ADP-葡萄糖焦磷酸羧化酶的 *agp* 基因部分为红霉素抗性基因所取代, 从而将与 PHB 合成形成竞争反应的糖原合成途径删除. 对该突变株的构建过程及培养进行了初步研究, 所得突变株生长速度提高, 最终生物量较野生株高, 表明突变株细胞的光合效率较野生株细胞提高. 在突变株体内未检测到糖原, 光合自养时 PHB 含量由野生株的 3.4% 提高到约 15%.

关键词: 绿色化工; 蓝细菌; PHB; 基因重组

中图分类号: Q789; TQ016 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2002)03-0273-05

1 前言

随着全球对环境污染问题的日益关注, “绿色化学”与“生态化工”的概念应运而生, 倡导以低物耗、无污染、资源再生和综合利用、废物无害化分离和降解等方式进行化工产品的生产^[1].

聚- β -羟基丁酸酯(Poly- β -Hydroxybutyrate, 简称 PHB)是发现最早的一种可生物降解的高分子材料. 迄今为止, PHB 的生产主要是利用有机碳源和氮源通过异养微生物发酵实现的, 生产成本过高. 从原料成本考虑, CO₂ 是地球上最廉价的碳源. 而利用植物生产 PHB 又因生长周期长、需占用可耕地、PHB 表达量低、分离提取困难等缺点而大大阻碍了该技术向实际生产的转化^[2]. 蓝细菌是一类微藻, 可利用 CO₂ 经光合作用合成细胞生长和分裂所需的其它所有分子^[3]. 在某些蓝细菌中发现与细菌 PHB 类似的颗粒之后, 蓝细菌作为 PHB 的表达载体便成为可能.

对野生型单细胞球状蓝细菌集胞藻 *Synechocystis* sp. PCC6803(简称 S.6803)中 PHB 的积累规律进行了研究, 发现限氮培养有利于 PHB 的积累, 但对细胞生长有明显抑制作用. 进一步的研究^[4]表明, 在蓝细菌体内, 糖原取代了 PHB 作为贮存物质的生理功能, 糖原的合成在底物水平上与 PHB 的合成形成竞争. 蓝细菌糖原的合成涉及 3 种酶, 其中 ADP-葡萄糖焦磷酸羧化酶由 *agp* 基因编码, 催化 ADP 与自由葡萄糖分子生成 ADP-葡萄糖, 为糖原合成酶提供专一性底物^[5]. 因此, 切断 ADP-葡萄糖的供应, 即可抑制糖原合成, 从而将碳源底物流引向 PHB 合成途径, 提高蓝细菌 PHB 的表达量. 本文报道该突变株的构建过程及初步培养结果.

2 材料与方法

2.1 细菌和质粒

大肠杆菌 DH10B, 转化受体菌; 质粒 pUC118, 多克隆位点接受 *agp* 片段插入; 质粒 pRL425, 用以提供红霉素抗性标记(Erm). 大肠杆菌的培养采用 LB 培养基, 并根据所携带质粒的不同而添加相应的氨苄青霉素至终浓度为 100 μ g/ml, 或添加红霉素至终浓度为 750 μ g/ml.

收稿日期: 2001-10-24, 修回日期: 2002-01-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 20076024)

作者简介: 吴桂芳(1974-), 女, 湖南省醴陵市人, 博士研究生, 讲师, 生物化工专业; 沈忠耀, 通讯联系人.

集胞藻培养用 BG11 培养基^[6], 由 40 W 日光灯提供强度为 $50 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的光照, 连续无菌通气提供搅拌, 恒温 30°C . 进行光合混养培养时, 向培养基中加入葡萄糖至终浓度为 1 g/L .

2.2 蓝细菌突变株的构建

如图 1 所示, 首先以制得的 S.6803 染色体 DNA 为模板, 按 S.6803 中 *agp* 上游与下游核苷酸顺序^[7]合成寡核苷酸引物, 用 PCR 反应扩增 *agp* 片段. 反应温度程序为 $(94^\circ\text{C}, 10 \text{ min}) \times 1$, $(94^\circ\text{C}, 1 \text{ min}; 56^\circ\text{C}, 2 \text{ min}; 72^\circ\text{C}, 3 \text{ min}) \times 25$, $(72^\circ\text{C}, 10 \text{ min}) \times 1$. 将酶切后的目的片段在 T4 DNA 连接酶作用下连入 pUC118 多克隆位点, 转化感受态大肠杆菌 DH10B. 在生色底物 X-gal 平板上筛选无 α 互补能力的白色菌落, 扩大培养后提取质粒, 命名为 pUCA. 以来自 pRL425 质粒的红霉素抗性基因部分取代 pUCA 中的 *agp* 片段, 形成新质粒 pUCAE. 用该质粒转化 S.6803 野生株细胞, 在含 $30 \mu\text{g/ml}$ 红霉素的固体培养基中对缺失 *agp* 片段的突变藻株进行筛选, 再转入含 $30 \mu\text{g/ml}$ 红霉素的液体培养基中培养.

2.3 突变藻株染色体 DNA 分析

经分析野生株及突变株染色体 DNA 的核苷酸序列, 设计 6 段不同的引物, 分别以野生株和突变株 DNA 为模板进行 PCR 扩增反应, 反应温度程序为 $(94^\circ\text{C}, 10 \text{ min}) \times 1$, $(94^\circ\text{C}, 1 \text{ min}; 54^\circ\text{C}, 2 \text{ min}; 72^\circ\text{C}, 3 \text{ min}) \times 25$, $(72^\circ\text{C}, 10 \text{ min}) \times 1$. 用琼脂糖凝胶电泳验证 PCR 产物的正确性.

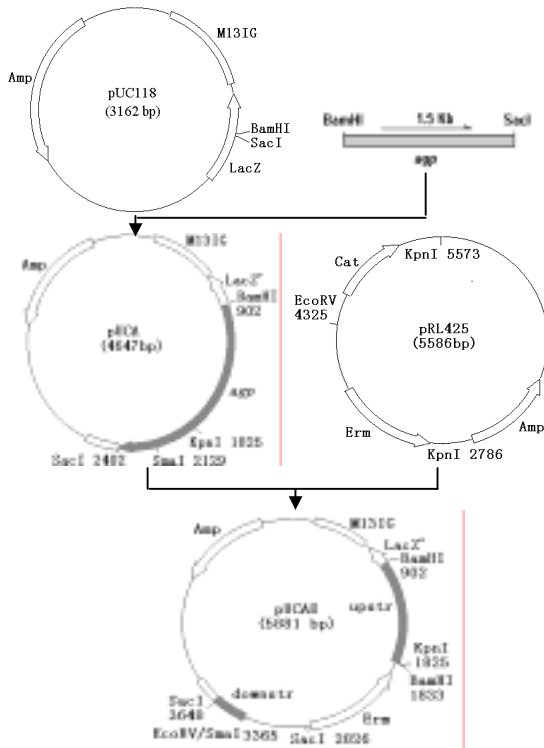


图 1 单细胞集胞藻 ADPG-焦磷酸化酶基因(*agp*)的体外改造

Fig.1 *In vitro* recombination of the *agp* gene encoding ADP-glucose pyrophosphorylase in the unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803

2.4 分析测定

生长测定、PHB 含量分析见文献[4]; 糖原提取与测定见文献[8, 9]; 色素分析: 取 4 ml 培养液, 用无水甲醇在黑暗条件下抽提 10 min , 测定 665 nm 处的吸光值, 计算叶绿素 a(chl a)的含量^[10]; 采用 Clark 型电极(Hansa-Tech, Kings Lynn, UK)测定培养液的光合放氧情况.

3 结果与讨论

3.1 蓝细菌突变株的获得

目的基因 *agp* 片段在体外克隆并部分为 Erm 取代后, 保留了足够长的上游及下游序列, 使得质粒 pUCAE 很容易与野生株染色体上的 *agp* 片段进行同源重组而使原有 *agp* 基因发生缺失突变. 所获得的突变株同时具有了红霉素抗性, 在含红霉素的固体平板上可以存活, 而未经有效同源重组的细胞没有红霉素抗性, 在红霉素存在条件下不能存活. 挑取具有红霉素抗性的藻落, 继续在含红霉素的平板上培养 2~3 代, 以使细胞内所有染色体拷贝都发生同源交换, 获得稳定遗传.

提取突变株的染色体 DNA, 采用多重 PCR 扩增方法进行验证, 所用引物及扩增结果如图 2

所示. 利用设计的不同引物对不同模板进行扩增后, 得到的 DNA 片段符合预计长度, 表明在所获得的突变株中, 原有 *agp* 基因片段的确发生了预计的重组.

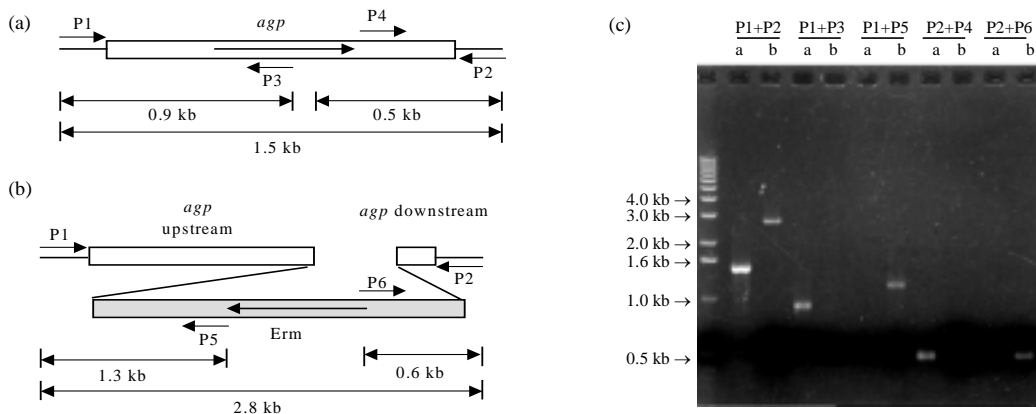


图 2 野生株(a)及突变株(b)基因组 DNA 的 PCR 分析及产物电泳图(c)

Fig.2 PCR analysis of genomic DNA of wild-type (a), *agp* strain (b) and electrophoresis of PCR products (c) (P1~P6: Primers for PCRs)

3.2 蓝细菌突变株的生长及产物形成特性

为研究 *agp* 基因产物对光合作用的影响, 对比了光合自养及混养条件下野生株及突变株的细胞密度、chl a 含量及光合放氧速率, 生长曲线见图 3. 相同条件下, 突变株细胞较野生型细胞生长速度快, 表明 ADP-葡萄糖焦磷酸羧化酶基因突变未对细胞的正常新陈代谢带来任何负面影响.

由表 1 可知, 经光合自养或混养培养 7 d 后, 收获的突变株生物量分别比野生株高 10.1% 及 63.2%, 突变株细胞中 chl a 含量也较野生株高. 在对数生长中期, 突变株细胞在自养、混养两种条件下的光合放氧速率(r_{O_2})较野生株细胞分别高 16% 和 22%, 表明突变株光合效率提高, 细胞同化 CO_2 的能力增强, 可以释放更多的 O_2 .

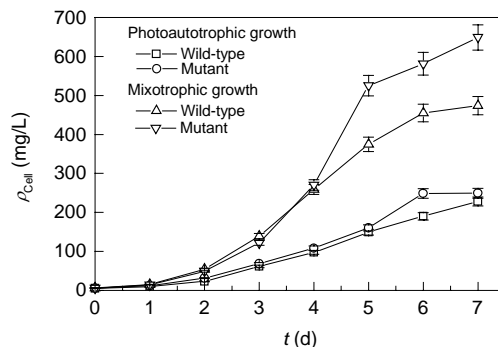


图 3 突变株与野生株细胞的生长比较
Fig.3 Comparison of cell growth of the mutant with that of wild-type strains

表 1 培养 7 d 后突变株与野生株生物量、chl a 含量、光合放氧速率、PHB 及糖原含量对比
Table 1 Comparison of obtained biomass, content of chl a, rate of oxygen evolution, PHB and glycogen content after 7 d cultivation between the mutant and the wild-type strains

Strain	Wild-type		Mutant	
	Photoautotrophic	Mixotrophic	Photoautotrophic	Mixotrophic
Growth condition	Photoautotrophic	Mixotrophic	Photoautotrophic	Mixotrophic
$\Delta\rho_{cell}$ (mg/L)	220.7 ± 11.0	448.2 ± 22.0	242.9 ± 12.0	731.5 ± 37.0
chl a (% , ω)	2.09 ± 0.10	2.40 ± 0.12	2.28 ± 0.11	2.46 ± 0.12
r_{O_2} [mol/(g·h)] (chl a)	0.335 ± 0.017	0.227 ± 0.011	0.410 ± 0.020	0.312 ± 0.016
PHB (% , ω)	3.41 ± 0.17	0.57 ± 0.03	14.87 ± 0.70	3.79 ± 0.20
Glycogen (% , ω)	8.12 ± 0.40	18.51 ± 0.90	0.00 ± 0.05	0.00 ± 0.05

在突变株培养样中未检测到糖原,而光合自养时野生株细胞中糖原可积累至细胞总重的 8.1%,混养时可达 18.5%。这完全符合设计初衷,进一步证实了蓝细菌体内 ADP-葡萄糖焦磷酸羧化酶在糖原合成过程中起了至关重要的作用。

作为代谢调控的结果,在无任何外加有机碳源存在的条件下,PHB 在突变株中可积累至细胞总重的 14.9%,而野生株细胞中仅达 3.4%。培养基中补充以葡萄糖时,突变株也具有更高的积累 PHB 的能力。这一结果表明,在蓝细菌体内糖原是作为一种碳源和能量的贮存物质而与 PHB 同时存在的,糖原合成途径的缺失促进了 PHB 的生物合成。

从细胞代谢角度分析,突变株中 *agp* 基因的删除阻断了细胞内糖原的合成,使光合作用形成的葡萄糖或由培养基直接进入细胞的葡萄糖被更有效地用于合成其它结构物质及代谢中间产物,其中 3-磷酸甘油酸是蓝细菌合成氨基酸及光合色素的底物。随着代谢活性的增加,其被依次转变为磷酸烯醇式丙酮酸、丙酮酸、乙酰 CoA,从而为 PHB 的生物合成提供更多的底物。由此可见,通过基因工程改造获得的突变藻株具有比野生型藻株更高的碳利用率,也具有高效合成目的产品 PHB 的潜力。

4 今后的工作

以上初步研究结果表明,利用抑制竞争性物质生物合成的手段,可以明显提高目的产物的合成。但生物体内 PHB 合成的代谢调控可以是多方面的,还包括:(1) 利用某种环境因素,如营养限制,来激活 *phb* 基因的表达;(2) 利用特定的细胞组份或代谢中间体激活 PHB 合成酶的活性;(3) 以上各因素的综合调控^[11]。接下来的工作将集中在优化培养条件和强化 PHB 的合成,并在此基础上进行大规模培养,最大限度地提高基因工程藻株的固碳能力,得到更多的可生物降解塑料。

在发酵液的分离纯化方面,可以采用一些易于实现的方法取代传统的离心分离,如加入氯化铁使细胞絮凝后,过滤收集细胞^[12],再采用多年来发展的细菌胞内 PHB 的分离纯化方法,可对收获细胞进行后续处理^[13]。蓝细菌与大肠杆菌细胞结构类似,同属于革兰氏阴性细菌,不同之处在于,作为一种光合微生物,蓝细菌体内具有更多的光合色素。但这些色素一般都是与蛋白质形成复合物而存在的,因此在用 SDS 进行处理时,可以与蛋白质同时被除去。

参考文献:

- [1] 刘会洲,何鸣鸿.绿色化学与生态化工的研究内涵[J].化工冶金,1999,20(4):405-409.
- [2] 吴桂芳,沈忠耀.转基因植物生产可生物降解塑料的研究进展[J].自然杂志,2000,22(2):84-88.
- [3] Barry B A, Boerner R J, Paula J C. The Use of Cyanobacteria in the Study of the Structure and Function of Photosystem II [A]. Bryant D A. The Molecular Biology of Cyanobacteria [C]. Dordrecht: Kluwer Academic Publications, 1994. 217-257.
- [4] WU G F, WU Q Y, SHEN Z Y. Accumulation of Poly- β -Hydroxybutyrate in Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. Bioresource Technology, 2001, 76(2): 86-90.
- [5] Meyer C R, Borra M, Igarashi R, et al. Characterization of ADP-glucose Pyrophosphorylase from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: Evidence of the Involvement of Arginine in Allosteric Regulation [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1999, 372: 179-188.
- [6] WU G F, SHEN Z Y, WU Q Y. Possibility to Improve the Cyanobacterial Poly- β -Hydroxybutyrate Biosynthesis Level [J]. Journal of Chemical Engineering of Japan, 2001, 34(9): 1187-1190.
- [7] Kaneko T, Sato S, Kotani H, et al. Sequence Analysis of the Genome of the Unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803 — II. Sequence Determination of the Entire Genome and Assignment of Potential Protein-coding Regions [J]. DNA Research, 1996, 3: 109-136.
- [8] Ernst A, Kirschenlohr H, Diez J, et al. Glycogen Content and Nitrogenase Activity in *Anabaena variabilis* [J]. Archives of Microbiology, 1984, 140: 120-125.

- [9] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric Methods for Determination of Sugars and Related Substances [J]. Analytical Chemistry, 1956, 28: 350–356.
- [10] MacKinney G. Absorption of Light by Chlorophyll Solution [J]. Journal of Biological Chemistry, 1941, 140: 315–322.
- [11] Kessler B, Witholt B. Factors Involved in the Regulatory Network of Polyhydroxyalkanoate Metabolism [J]. Journal of Biotechnology, 2001, 86: 97–104.
- [12] Chow C W K, House J, Velzeboer R M A, et al. The Effect of Ferric Chloride Flocculation on Cyanobacterial Cells [J]. Water Research, 1998, 32(3): 808–814.
- [13] 尹进, 于慧敏, 沈忠耀. 用 SDS-NaClO 从重组大肠杆菌中分离聚- β -羟基丁酸酯 [J]. 生物工程学报, 1998, 14(3): 342–344.

Preliminary Results on PHB Production by Recombinant Cyanobacterium in Line with Green Chemical Industry

WU Gui-fang, SHEN Zhong-yao

(Dept. Chemical Engineering, Biochemical Engineering Institute, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Based on the understanding that the cyanobacterial glycogen biosynthesis is a competitive pathway to cyanobacterial PHB biosynthesis, a genetically engineered cyanobacterium was constructed by partially replacing the *agp* gene encoding the ADP-glucose pyrophosphorylase involved in cyanobacterial glycogen synthesis by an erythromycin resistance cassette. The obtained mutant propagated faster and the final biomass was higher against its wild-type species, which indicated a much higher photosynthetic efficiency in the mutant. No glycogen was detected in the mutant. Under the photoautotrophic condition, the intracellular PHB content was improved to 15% of the dry weight as compared to 3.4% in the wild-type strain.

Key words: green chemical industry; cyanobacteria; PHB; recombination