

# 谷氨酰胺合成酶腺苷酰化位点的定点突变和产胺的初步研究

黄星, 曾行, 刘铭, 龚博, 胡淼, 曹竹安

(清华大学化学工程系, 北京 100084)

**摘要:** 为解决谷氨酰胺合成酶腺苷酰化修饰失活的问题, 利用基因定点突变的方法将谷氨酸棒杆菌的谷氨酰胺合成酶(Glutamine Synthetase, GS)腺苷酰化位点由 Tyr405 突变为 Phe405, 并在大肠杆菌中获得突变后 GS 的表达. 对比腺苷酰化位点突变前后的重组大肠杆菌 pET-3a/GSI 和 pET-3a/GSIM 在高氨环境下的 GS 活性和谷氨酰胺产量, 发现重组菌 pET-3a/GSIM 在高氨环境下的最大酶活是 150 U/L, 产谷氨酰胺浓度为 17.5 g/L, 分别是 pET-3a/GSI 酶活(30 U/L)的 5.0 倍和产谷氨酰胺水平(3.4 g/L)的 5.1 倍, GS 定点突变使谷氨酸转化为谷氨酰胺的途径得到强化.

**关键词:** 谷氨酰胺; 大肠杆菌; 谷氨酰胺合成酶; 腺苷酰化位点

**中图分类号:** TQ033      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1009-606X(2008)01-0135-05

## 1 前言

L-谷氨酰胺(L-Glutamine, L-Gln)是 L-谷氨酸(L-Glutamate, L-Glu)的 $\gamma$ -羧基酰胺化的产物, 是细胞中合成核酸、蛋白质等物质的前体, 是组织间氨转移的主要载体, 对维持生物体内氮的平衡具有重要意义, 具有很高的营养价值. 谷氨酰胺作为细胞内一种重要能源物质, 可以增强免疫系统的功能<sup>[1]</sup>, 因此也具有很高的药用价值. 目前谷氨酰胺的生产主要采用发酵法<sup>[2]</sup>, 利用谷氨酸产生菌, 以葡萄糖为主要原料, 通过改变发酵条件积累谷氨酰胺. 随着工业生物催化技术的快速发展, 利用基因重组技术构建产谷氨酰胺的基因工程菌也是目前的发展方向之一.

酶法生产谷氨酰胺具有极大的应用前景, 其基本思路是以谷氨酸单钠盐和铵盐作为原料, 在谷氨酰胺合成酶(Glutamine Synthetase, GS)和提供能量 ATP 的条件下催化合成谷氨酰胺(如图 1 所示). 与微生物发酵法相比,

酶法生产谷氨酰胺具有成本低、反应步骤简单、副反应少、易分离等优点. 目前, 已有少量用酶法成功合成谷氨酰胺的报道<sup>[3,4]</sup>.

GS 在细菌体内存在两种形式<sup>[5]</sup>: 一种是未修饰的, 另一种是经腺苷共价修饰的. GS 的腺苷酰化就是 AMP 以共价键方式与肽链上的酪氨酸残基结合产生 GS (AMP)的过程, GS 的腺苷酰化和去腺苷酰化都由腺苷酰基转移酶(Adenylyltransferase, Atase)催化. 腺苷酰化会使 GS 的活性降低或丧失. 另外, GS 的腺苷酰化修饰失活及其逆过程也受到铵浓度的调控, 在限制铵盐的培养条件下, 生长到稳定期的细胞内的 GS 是未被腺苷修饰的; 在过量铵盐的培养条件下, 腺苷酰化程度增强, GS 酶活力下降甚至失活. 但在酶法生产谷氨酰胺的过程中, 铵是 GS 的催化底物, 欲提高谷氨酰胺产量, 必须加大铵盐的供给, 以实现谷氨酸和铵向谷氨酰胺的转化. 因此, 迫切需要解除对 GS 的腺苷酰化修饰作用.

获得高活力的 GS 是生物法生产谷氨酰胺的关键<sup>[6]</sup>. 为提高 GS 的活力, 研究人员进行了工艺调控<sup>[7]</sup>、菌株筛选<sup>[8]</sup>、重组菌构建<sup>[9]</sup>等方面的工作. 本研究则针对 GS 腺苷酰化问题进行研究, 并将其用于酶法生产谷氨酰胺. 在谷氨酰胺生物代谢途径分析的基础上, 拟通过基因工程方法将谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)的 GS 基因克隆到大肠杆菌中进行表达, 生产谷氨酰胺. *Corynebacterium glutamicum* 的 GS 的腺苷酰化位点是 Tyr405<sup>[10]</sup>, 因此本研究拟将 *Corynebacterium glutamicum* 谷氨酰胺合成酶 I(Glutamine Synthetase I, GSI)的 Tyr405 定点突变为 Phe405, 以去除 GSI 所受的腺苷酰化修饰作用. 克隆了 *Corynebacterium glutamicum* 中 GSI 的结

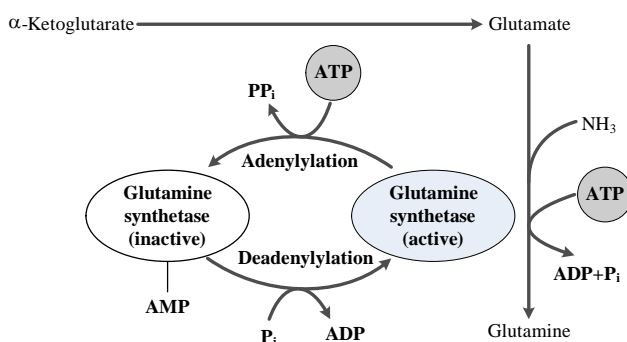


图 1 谷氨酰胺合成酶催化合成谷氨酰胺的机理  
Fig.1 The mechanism of conversion from glutamate to glutamine catalyzed by GS

收稿日期: 2007-05-25, 修回日期: 2007-07-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 20506012); 国家重点基础研究发展规划(973)基金资助项目(编号: 2003CB716007)

作者简介: 黄星(1976-), 女, 北京市人, 博士, 助理研究员, 生物化工专业; 曹竹安, 通讯联系人, E-mail: cza-dce@tsinghua.edu.cn.

构基因 *glnA*, 并利用重叠引物法对其进行了定点突变, 以去除 GS 的腺苷酰化位点. 将所得的目的基因与 pET-3a 载体构建用于蛋白表达的重组质粒 pET-3a/GSIM, 对比腺苷酰化位点突变前后的重组大肠杆菌 pET-3a/GSI 和 pET-3a/GSIM 在高氨环境下的谷氨酰胺产量和 GS 活性, 以考察 GS 定点突变对谷氨酸转化为谷氨酰胺的影响.

## 2 实验

### 2.1 材料与仪器

#### 2.1.1 质粒和菌种

谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067 由清华大学生物系陈国强教授实验室惠赠, 原核表达质粒 pET-3a 购自 Novagen 公司, *E. coli* BL21(DE3) 为本实验室保藏.

#### 2.1.2 分子生物学实验用试剂

Taq 聚合酶(Ex Taq), 限制性内切酶 *NdeI*, *HindIII*, T4 DNA 连接酶, DNA Marker DL15000 均购自大连 TaKaRa 公司, DNA Marker DGL4000, DNA ladder 1000 均购自北京鼎国公司, 硅胶模型 TM 基因组 DNA 提纯试剂盒、UltraPureTMPCR 产物(DNA 片段)纯化试剂盒、硅胶模型 TM 质粒 DNA 小量提纯试剂盒均购自北京赛百盛公司.

#### 2.1.3 仪器及分析软件

SBA-40 氨基酸自动分析仪购自山东省科学院生物研究所, DNA 序列分析比较采用 OMIGA 2.0 软件, 引物设计采用 Primer Premier 5 软件, 质粒分析采用 DNAMAN 软件, 电泳图分析采用 Imagemaster TotalLab v1.00 软件.

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 谷氨酰胺合成酶定点突变

研究的出发菌株为谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067. 根据 NCBI 上检索到的一种谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 的 GSI 基因 *glnA* 的核苷酸序列设计引物, 用于 GSI 基因的克隆和定点突变. 在 0.2 mL PCR(Polymerase Chain Reaction, 聚合酶链反应)反应管中加入引物、聚合酶、缓冲液等, 同时设置空白对照.

定点突变采用重叠引物法<sup>[11]</sup>, 在通过 PCR 克隆出目的基因片段的同时引入突变位点. 重叠引物法共需 4 条引物, 其中引物 1, 4 用于最终扩增, 引物 2, 3 含有突变位点且部分互补, 在引物 1 和 4 中分别引入 *NdeI* 和 *HindIII* 的酶切位点(如下划线所示), 引物 2 和 3 中方框所示为突变密码子:

1. 5'-ATAAGGGAGGAGTGCATATGGCGTTTGGAAA-3',
2. 5'-CAAGGACCTCTTC $\square$ GAACTACCACCAGAGGAA-3',
3. 5'-GGTAG $\square$ TTCGAAGAGGTCCTTGCCACTGGAG-3',
4. 5'-AATCAAGCTTACCACACGGAACCGTCTCACT-3'.

软件设计结果表明, 由引物 1 和 3 扩增出的目的片段长度为 1240 bp, 由引物 2 和 4 扩增出的目的片段长度为 442 bp, 由引物 1 和 4 扩增出的目的片段长度为 1661 bp.

根据重叠引物法的原理, 从基因组中克隆出目的基因片段并引入突变位点需要 3 轮 PCR: 在第 1 轮 PCR 中, 以基因组 DNA 为模板, 用引物 1 和 3 将 *glnA* 的上游片段扩增出来并引入突变; 在第 2 轮 PCR 中, 以基因组 DNA 为模板, 用引物 2 和 4 将 *glnA* 的下游片段扩增出来并引入突变; 在第 3 轮 PCR 中, 以扩增出的上下游片段为模板, 用引物 1 和 4 最终扩增出完整的带有突变位点的基因片断. 将定点突变后的 *glnA* 送赛百盛公司进行核苷酸测序, 结果证明原 *glnA* 的 Tyr405 已突变为 Phe405.

#### 2.2.2 重组大肠杆菌表达质粒的构建

将扩增出含有突变位点的 *glnA* 片段以常规分子克隆手段连入 pET-3a 载体中, 所含抗性标记为 Amp, 得到重组菌株 pET-3a/GSIM.

#### 2.2.3 重组蛋白质的诱导表达及鉴定

将重组菌 pET-3a/GSIM 于 37℃ 培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.6~1.0, 根据实验需要加入 0.1 mmol/L IPTG, 收集菌体, 经超声破碎后取上清以 12% SDS-PAGE 鉴定, 并测定 GS 酶活.

#### 2.2.4 GS 的活性测定

配制活性测定反应混合物(mmol/L): 咪唑缓冲溶液 40, 磷酸二氢钾 20, 盐酸羟胺 60, 氯化锰 0.33, 谷氨酰胺 30, ADP 0.5, pH=7.0; 配制反应终止液: 氯化铁 33 g/L, 三氯醋酸 20 g/L, 2.5 mL 浓盐酸. 取 150 μL 酶活性测定反应混合物, 37℃ 预保温 5 min 后, 分别加入 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 μmol/L 谷氨酰羟肟酸( $\gamma$ -Glutamylhydroxamate)及酶液各 150 μL, 37℃ 保温 15 min, 加入 600 μL 反应终止液终止反应并显色, 摇匀后 540 nm 比色, 以无谷氨酰羟肟酸对应的反应液作对照. 酶活力单位定义为在上述标准条件下, 催化生成 1 μmol/(min·L)谷氨酰羟肟酸所需的酶量. 酶活标准曲线为: 酶活(U)=17.893OD<sub>540</sub>/t, 其中 t 为时间.

#### 2.2.5 葡萄糖、谷氨酸、谷氨酰胺和铵离子含量的测定

葡萄糖及谷氨酰胺的测定: 发酵液稀释后离心除菌, 用 SBA 生物传感分析仪测量, 仪器测量范围为 0.1~1 g/L. 将样品稀释适当倍数后进样 25 μL, 平行测定 3 次,

取平均值.

谷氨酰胺浓度测定: 采用酸解-酶膜联用法<sup>[12]</sup>, 用 SBA-40 氨基酸自动分析仪分别测量水解前后溶液中谷氨酸的浓度, 根据谷氨酸浓度的增量及谷氨酰胺的水解度标准曲线计算出原溶液中谷氨酰胺的浓度.

铵离子浓度依据发酵体系中氨态氮含量测定方法测定<sup>[13]</sup>.

### 2.2.6 谷氨酰胺合成酶的摇瓶培养条件

将冰箱中保藏的菌种于含 100 μg/mL Amp 的 LB 平板培养基中 37 °C 过夜培养活化后, 接种于 30 mL 含 100 μg/mL Amp 的 LB 液体培养基中进行种子培养, 37 °C 下 170 r/min 摇床培养 4 h 左右; 以 4% 的接种量接种于 50 mL 含 100 μg/mL Amp 的 LB 液体培养基中, 37 °C 下 170 r/min 摇床培养 2 h, 加入 IPTG 并转为 30 °C 诱导培养, 诱导 20 h 后加入 5 g/L 葡萄糖、40 g/L 谷氨酸和 29 g/L NH<sub>4</sub>Cl 进行酶催化, 2 h 后取样测定发酵液中底物谷氨酸、葡萄糖、NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 及产物谷氨酰胺的浓度.

## 3 结果与讨论

### 3.1 谷氨酰胺合成酶定点突变

PCR 反应结束后用琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 2 所示. 经 DNA 电泳验证, 扩增片断大小与预测值符合, 初步认为经过 3 轮 PCR 成功地扩增出完整的 *glnA* 片段. 将其连接到质粒上后, 送大连 TaKaRa 公司测序, 经过分子生物学软件分析, 所得 GSI 基因序列与 NCBI 上已有的 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 的 GSI 基因序列具有很高的同源性. 通过测定其核苷酸序列, 最终确认扩增出的基因为含有目的突变的 *glnA* 基因.

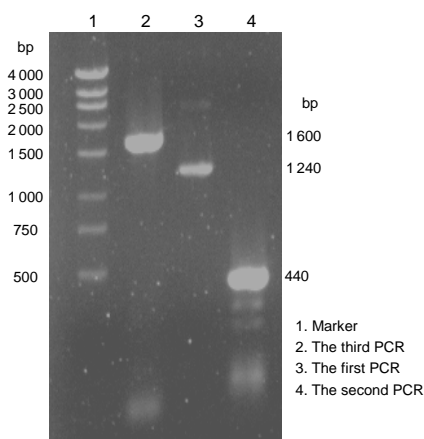


图 2 三轮 PCR 产物的电泳图  
Fig.2 DNA electrophoresis of the amplified product in agarose gels for each PCR

### 3.2 重组大肠杆菌表达质粒的构建

对大肠杆菌重组质粒 pET-3a/GSIM 的构建进行验

证, 对重组菌进行菌落 PCR, 将菌落 PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测, 并紫外照相, 结果如图 3(a)所示. 根据菌落 PCR 的筛选结果, 从每种重组质粒的单菌落中挑取菌体培养, 取适量培养液, 用赛百盛公司的质粒 DNA 小量提取试剂盒提取质粒, 将提纯的质粒分别用 *Nde*I 和 *Hind*III 进行单酶切反应, 同时进行双酶切反应. 对酶切反应液用琼脂糖凝胶电泳检测反应产物, 结果如图 3(b)所示. 对所得基因进行测序和序列分析表明, 扩增的基因确实是含有 GSI Tyr405-Phe405 突变的基因, 且与已知的 GSI 基因具有很高的同源性.

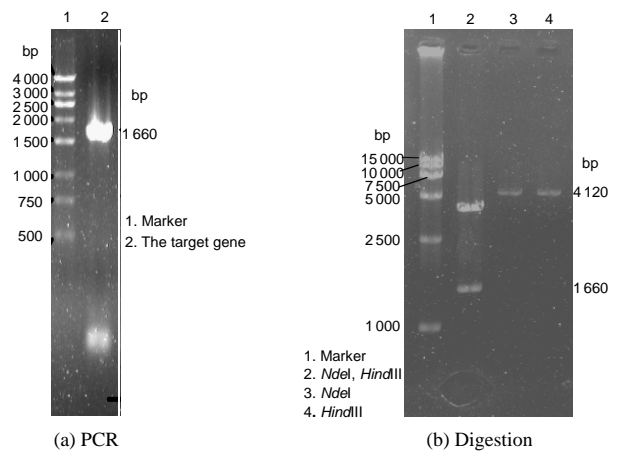


图 3 重组菌菌落 PCR 和酶切产物的电泳检测  
Fig.3 DNA electrophoresis for recombinant colony PCR and digestion

### 3.3 GS 的诱导表达及鉴定

将未转化重组质粒的 *E. coli* BL21(DE3)和重组大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET-3a-GSIM 分别培养, 其中重组菌分为 2 个样, 1 个用 IPTG 诱导, 另外 1 个不诱导, 然后取菌样做 SDS-PAGE 蛋白质电泳, 结果如图 4 所示. 大多数细菌中的 GS 是由 12 个相同的亚基(55 kDa)组成的. 由蛋白质电泳结果可以看出, 重组大肠杆菌经过诱导有大量外源蛋白表达, 而未转化重组质粒的大肠

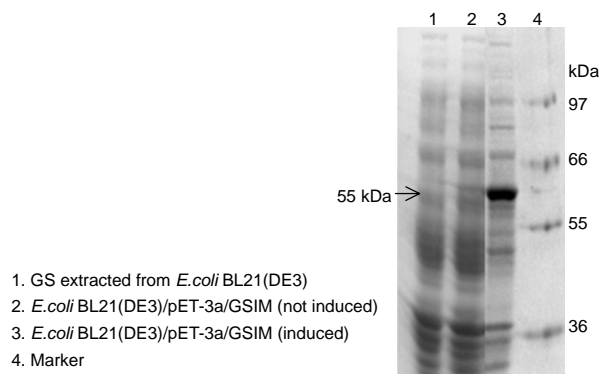


图 4 GS 表达的 SDS-PAGE  
Fig.4 SDS-PAGE of GS expression

杆菌和重组菌未经诱导的情况下 GS 表达量很小。

进一步测定 GS 酶活进行验证,结果如图 5 所示。可知重组的基因工程菌经过诱导后,表达出的 GS 具有较高的活性,明显优于未转化重组质粒的大肠杆菌和重组菌不诱导的情况。

### 3.4 高 $\text{NH}_4^+$ 浓度下腺苷酰化的比较

通过 PCR 法可从 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067 中克隆出 GSI 的结构基因 *glnA*, 并利用引物 1 和 4 构建未突变 Tyr405 的大肠杆菌重组质粒 pET-3a/GSI。对比在高铵环境( $\text{NH}_4\text{Cl}$  29 g/L)下的摇瓶发酵结果,以考察含突变后的 *glnA* 基因的大肠杆菌 pET-3a/GSIM 是否去除了腺苷酰化问题。发酵所消耗的谷氨酸和氯化铵对比如图 6(a)所示,产生的谷氨酰胺和

GS 酶活性对比如图 6(b)所示。

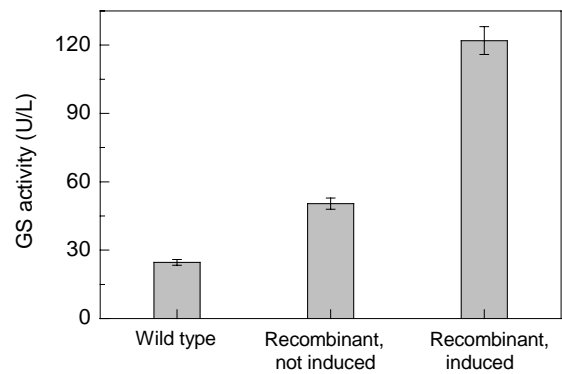


图 5 大肠杆菌 GS 的酶活

Fig.5 Enzymatic activity assay of GS

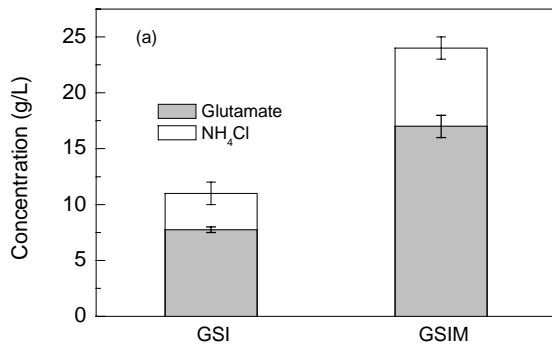
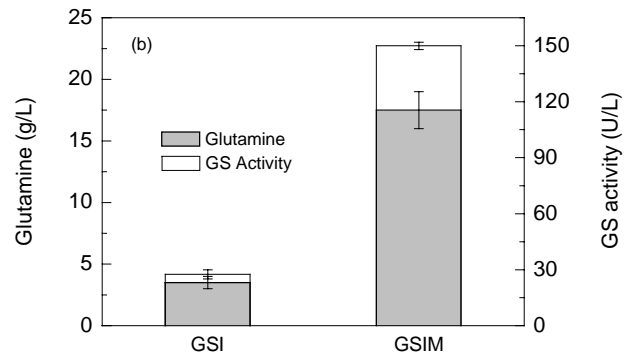


图 6 腺苷酰化位点突变前后的 pET-3a/GSI 和 pET-3a/GSIM 在高氨环境下的谷氨酸和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  消耗及谷氨酰胺产量和 GS 酶活性对比

Fig.6 Comparisons of glutamate and  $\text{NH}_4\text{Cl}$  consumption, productivity and GS activity between pET-3a/GSI and pET-3a/GSIM



对比腺苷酰化位点突变前后的重组大肠杆菌 pET-3a/GSI 和 pET-3a/GSIM 在高氨环境下所消耗的谷氨酸及氯化铵,表明重组大肠杆菌 pET-3a/GSI 对底物的利用低于含有突变后的 *glnA* 基因的大肠杆菌 pET-3a/GSIM。对比谷氨酰胺产量和 GS 酶活,突变后菌株 pET-3a/GSIM 产生的谷氨酰胺浓度为 17.5 g/L,是突变前菌株 pET-3a/GSI (3.4 g/L) 的 5.1 倍。重组菌 pET-3a/GSIM 在高氨环境下的最大酶活为 150 U/L,是 pET-3a/GSI 酶活(30 U/L)的 5.0 倍。实验结果表明,突变 *glnA* 基因所表达的 GS 的腺苷酰化问题得到了改善,强化了谷氨酸转化为谷氨酰胺的途径。

## 4 结 论

本研究克隆了谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)中 GSI 的结构基因 *glnA*, 并利用重叠引物法将 *glnA* 的 Tyr405 突变为 Phe405 以去除 GS 的腺苷酰化位点。利用扩增出的未突变和突变 *glnA* 基因及 pET-3a 质粒,成功地构建了用于大肠杆菌表达的重组质

粒 pET-3a/GSI 和 pET-3a/GSIM, 并将其转化入大肠杆菌 BL21(DE3)。通过 SDS-PAGE 蛋白质电泳和酶活测定证明了重组大肠杆菌可以表达出活性 GS。pET-3a/GSI 在高铵环境下发酵对谷氨酸和氯化铵的消耗及谷氨酰胺产量和 GS 酶活显著低于 pET-3a/GSIM, 表明突变 *glnA* 基因所表达的 GS 的腺苷酰化问题得到了改善。腺苷酰化位点突变菌株的成功构建为酶法生产谷氨酰胺过程的深入研究提供了很好的基础。

### 参考文献:

- [1] 陆维玮, 沈亚领, 王树力, 等. 谷氨酰胺的研究及开发进展 [J]. 中国生化药物杂志, 1998, 19(3): 161-163.
- [2] 杨燕凌. 谷氨酰胺发酵的研究 [J]. 食品科学, 2005, 26(7): 122-124.
- [3] 杨春玉, 马翠卿, 许平, 等. 酶法转化谷氨酰胺 [J]. 过程工程学报, 2002, 2(6): 529-533.
- [4] 陈群英, 陈国安, 薛彬, 等. 基因工程酶法结合酵母能量耦联高效合成 L-谷氨酰胺的研究 [J]. 生物工程学报, 2004, 20(3): 456-460.
- [5] Nelson D L, Cox M M. Lehninger Principles of Biochemistry, 3rd Ed. [M]. New York: Worth Publishers, 2000. 818-868.

- [6] Kusumoto I. Industrial Production of L-Glutamine [J]. *J. Nutr.*, 2001, 131(9): 2552S–2555S.
- [7] 李春, 刘雨磊, 陈奎发, 等. 原位氮饥饿发酵工艺中梯度补氮对谷氨酰胺合成酶的调控 [J]. *化工学报*, 2004, 55(1): 155–159.
- [8] 魏杰, 李昱, 寇巍, 等. 三种节杆菌产生谷氨酰胺合成酶的研究 [J]. *微生物学杂志*, 2006, 26(2): 22–25.
- [9] 刘俊红, 刘顺谊, 殷志敏. 乳糖诱导大肠杆菌中重组谷氨酰胺合成酶的表达 [J]. *南京师大学报(自然科学版)*, 2006, 29(3): 66–70.
- [10] Jakoby M, Krämer R, Burkovski A. Nitrogen Regulation in *Corynebacterium glutamicum*: Isolation of Genes Involved and Biochemical Characterization of Corresponding Proteins [J]. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999, 173(2): 303–310.
- [11] 徐芳, 姚泉洪, 熊爱生, 等. 重叠延伸 PCR 技术及其在基因工程上的应用 [J]. *分子植物育种*, 2006, 4(5): 747–750.
- [12] 陈奎发, 蒋楠, 杨艳, 等. 酸解-酶膜联用法检测谷氨酰胺 [J]. *食品与发酵工业*, 2002, 28(9): 26–28.
- [13] 梁剑光, 朱玲, 徐正军. 发酵体系中氨态氮含量的测定及影响因素的探讨 [J]. *氨基酸和生物资源*, 2006, 28(3): 65–68.

## Site-directed Mutagenesis of Putative Adenylation Site of Glutamine Synthetase and Glutamine Production

HUANG Xing, ZENG Xing, LIU Ming, GONG Bo, HU Miao, CAO Zhu-an

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**Abstract:** To avoid deactivation of glutamine synthetase (GS) resulting from adenylation, site-directed mutagenesis was used to replace Tyr405, the putative adenylation site of GS in *Corynebacterium glutamicum*, by Phe405. The mutant gene was expressed in *E. coli* to obtain GS which can enhance the enzymatic conversion from glutamate to glutamine. The wild gene with Tyr405 and the mutant gene with Phe405 were constructed into the recombinant *E. coli* pET-3a/GSI and pET-3a/GSIM, respectively. GS activity expressed in pET-3a/GSIM is 150 U/L which is 5.0 times as 30 U/L in pET-3a/GSI. Glutamine productivity in pET-3a/GSIM is 17.5 g/L which is 5.1 times as 3.4 g/L in pET-3a/GSI.

**Key words:** glutamine; *E. coli*; glutamine synthetase; putative adenylation site