

aroA 基因的克隆和优化^{*}

何 鸣¹, 曾海燕², 徐培林¹, 叶长明¹

(1. 中山大学生物工程中心//基因工程教育部重点实验室, 广东 广州 510275;

2. 中山大学地球与环境科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 除草剂草甘膦 (glyphosate, N phosphonomethylglycine) 的靶标酶是由 *aroA* 基因编码的 EPSP (5-烯醇式丙酮酰莽草酸 3-磷酸, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate) 合成酶。采用先进的基因优化技术, 以鼠伤寒沙门氏杆菌和大肠杆菌的 EPSP 合成酶基因为模板, 通过随机结合, 交错延伸的 PCR 扩增过程, 克服定点突变的局限性, 使基因获得多位点突变, 并使之在大肠杆菌中得到表达。对纯化后的表达产物的酶动力学性质的测定结果表明, 获得了与作为模板的野生型相比, 具有高得多的酶活力 (降低的 K_m (PEP)) 和大大增强的草甘膦抗性 (升高的 K_i (glyphosate)) 的突变基因。

关键词: *aroA*; EPSP (5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸) 合成酶, 草甘膦

中图分类号: Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2002) 02-0076-04

草甘膦是目前使用最为广泛的一种广谱除草剂, 具有对人畜低毒, 杂草难对之产生抗性, 低土壤残留量等特点, 市场潜力巨大。它通过抑制由 *aroA* 基因编码的 EPSP 合成酶^[1], 阻断芳香族氨基酸的合成, 从而杀灭绝大多数的植物, 杂草和农作物皆不例外。为适应大规模机械化生产及施用草甘膦的需要, 从 20 世纪 80 年代中期开始, 人们为培育抗草甘膦农作物做了大量的工作。其中, 对草甘膦靶标酶 EPSP 合成酶的改造, 是这项工作的重要组成部分。EPSP 合成酶仅存在于微生物和植物中, 催化莽草酸 3-磷酸 (S-3-P, shikimate 3-phosphate) 与磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP, phosphoenolpyruvate) 反应, 生成 EPSP^[2]。由于草甘膦具有与 PEP 相似的结构, 可作为竞争性抑制剂, 形成 EPSP 合成酶·S-3-P·Glyphosate 复合物, 阻遏 PEP 与酶的结合, 从而阻断芳香族氨基酸的合成。因为细菌来源的 EPSP 合成酶对草甘膦的抗性比植物来源的酶高 2 个数量级左右^[1], 所以, 用基因工程的方法, 把细菌的 EPSP 合成酶基因转入植物当中, 可使植物获得一定的抗性。采用提高该基因的表达量或通过定点突变降低酶对草甘膦亲和力等措施, 皆可提高转基因植物的抗性水平^[1,3]。但外源基因的过量表达, 必然会影响植物自身的生长^[4]。而由于对酶活性中心附近氨基酸残基的作用并不明了, 所以, 定点突变的效果也十分有限。突变后的 EPSP 合成酶对草甘膦亲和力下降的同时往往伴随着对原底物亲和力的下降, 从而降低了酶的催化活性^[5]。

本文要报导的是有关采用独特基因优化技术, 利用鼠伤寒沙门氏杆菌和大肠杆菌的 EPSP 合成酶基因的重组, 获得突变后与原底物亲和力增大, 而对草甘膦亲和力下降的 EPSP 合成酶的研究。

1 材料和方法

1.1 材 料

大肠杆菌 *Escherichia coli* (XL1blue, BL-21 (DE3))、鼠伤寒沙门氏杆菌 *Salmonella typhimurium*、质粒 pET 11d 均为本实验室保藏。各种限制性内切酶和 taqDNA 聚合酶购自 TAKARA 公司。Plasmid Minipreps Kit 和 Gel Extraction Kit 购自 Omega 公司。草甘膦由 Monsanto 公司提供。PEP 购自 Sigma 公司。S-3-P 采用 Knowles 等的方法^[6], 从 *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 25597) 的培养液中提取。

1.2 方 法

1.2.1 野生型 *aroA* 基因的克隆和突变的 *aroA* 新基因的获得 具体方法参见文献[3]。

1.2.2 EPSP 合成酶表达载体的构建及转化子的获得 把上述 1.2.1 获得的野生型和突变型的 *aroA* 基因 DNA 片段走 $w = 1\%$ 琼脂糖凝胶电泳, 并割下大小约为 1.3 kb 的 DNA 带, 用 Gel Extraction Kit 纯化这些 DNA 片段, 与质粒 pET11d 同时分别用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Bam* H I 酶切, 再按载体:插入片段=1:3 的比例混合, 用 T_4 连接酶在 16 °C 连接 12 h。取部分连接液, 用标准氯化钙转化法转化大肠杆菌 BL21 (DE3)。把由野生型 *aroA* 基因获得的转

* 收稿日期: 2002-01-15

基金项目: 国家 863 资助项目 (2001AA212191); 广州市科技局重点攻关项目 (2000-I-013-01)

作者简介: 何 鸣 (1965-), 女, 博士研究生; 通讯联系人: 叶长明; E-mail: lsbric10@zsu.edu.cn

化子转到含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨卞的 M9 固体培养基。把由突变的 *aroA* 基因获得的转化子转到含有 30 mmol/L 草甘膦和 1 mmol/L IPTG 的 M9 固体培养基上, 再把具抗性的转化子转到含有 60 mmol/L 草甘膦和 1 mmol/L IPTG 的 M9 固体培养基上, 筛选具有较强抗草甘膦活性的转化子。

1.2.3 转化子草甘膦抗性的检验 把含有野生型 *aroA* 基因和突变的 *aroA* 基因的大肠杆菌 BL21 (DE3) 转化子, 分别接种到含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨卞、1 mmol/L IPTG 和不同浓度的草甘膦的 M9 液体培养基中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 空气浴, 200 r/min 振动培养, 定时测定 A_{600} , 以检验各转化子耐受草甘膦能力的强弱。

1.2.4 表达产物 EPSP 合成酶蛋白的提取和纯化 把含有野生型 *aroA* 基因和突变的 *aroA* 基因的大肠杆菌 BL21 (DE3) 转化子, 分别接种到含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨卞的 LB 液体中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 空气浴, 200 r/min 振动培养至 $A_{600}=0.75$, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L , 把培养温度调节至 30 $^{\circ}\text{C}$, 继续以 200 r/min 振动培养 3 h。然后离心收集菌体, 用缓冲液 A (50 mmol/L Tris HCl, 0.1 mmol/L DTT, pH 7.2) 重悬菌体。用冻融法使细胞破壁。离心弃去细胞碎片。冰浴条件下, 缓慢向上清液加入分析纯的硫酸铵, 直至硫酸铵饱和度达到 60%。13 000 r/min 离心 30 min, 弃上清, 沉淀溶于缓冲液 A, 以缓冲液 A 为透析外液透析过夜。透析毕再用 AMERSHAM PHARMACIA 公司 HiPrep DEAE 分离柱和 HPLC 层析系统作进一步的纯化。先用缓冲液 A 充分平衡 HiPrep DEAE 分离柱, 把上述透析后的 EPSP 合成酶液加到柱上, 再用相同的缓冲液充分洗柱。然后, 用含有从 50~250 mmol/L 梯度递增浓度 KCl 的缓冲液 A 洗脱。分步收集洗出液, 并取适量走 $w=10\%$ 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 确定 EPSP 合成酶蛋白在洗出液中的分布。

1.2.5 EPSP 合成酶活力及米氏常数的测定 EPSP 合成酶活力的测定采用 Lanzetta^[8] 所述的定量测定无机磷的方法。酶反应系统含有 50 mmol/L Hepes/NaOH, pH 7.2, 1 mmol/L PEP, 1 mmol/L S 3 P, 0.1 mmol/L $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 。酶促反应持续一定时间后, 即取出 50 μL 反应液, 加入孔雀绿显色液定量测定无机磷。米氏常数的测定, 采用传统的双倒数作图法。

2 结 果

2.1 *aroA* 基因的克隆

经 $w=1\%$ 琼脂糖电泳, 证明方法 1.2.1 获得 *aroA* 基因片段的大小与 GeneBank 的资料相吻合。把来自野生型的两个基因片段分别连接上表达质粒

pET11d 的 *Nco* I 和 *Bam*HI 酶切位点间, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 后, 获得的转化子分别命名为 *EcaroA*, *StaroA*。

2.2 突变的 *aroA* 基因的克隆

经方法 1.2.1 的 PCR 反应和方法 1.2.2 筛选后, 挑选出一个表现最好, 能在含有 60 mmol/L 草甘膦和 1 mmol/L IPTG 的 M9 固体培养基上正常生长的转化子, 命名为 *aroAM12*, 提取质粒。用 ABI 377 型测序仪, 测定 *Nco* I 和 *Bam*HI 酶切位点间的 DNA 序列。测序结果表明, 该转化子所含的 *aroA* 基因, 与来自鼠伤寒沙门氏杆菌的 *aroA* 基因片段相比, 发生了多个位点的变化 (具体测序结果已经申请了中国专利, 申请号: 01114745.8)。

2.3 转化子草甘膦抗性强弱的检验

对转化子 *EcaroA*, *StaroA* 和 *aroAM12* 在含有不同浓度草甘膦的 M9 液体中的生长情况的测定结果见图 1。转化子 *aroAM12* 在含有 60 mmol/L 草甘膦的 M9 基本培养基上仍能良好生长, 而转化子 *EcaroA*, *StaroA* 在含有 20 mmol/L 的草甘膦的 M9 基本培养基上生长已受到严重的抑制。由此可见, 突变子的抗草甘膦能力比野生型有了明显提高。

2.4 EPSP 合成酶的纯化效果

聚丙烯酰胺凝胶电泳结果 (图 2) 和纯化效果 (表 1)。根据文献[1], *aroA* 基因的表达产物 EPSP 合成酶蛋白的大小约为 45 000。从电泳结果可清楚看出, 诱导前的菌体蛋白在 45 000 处无明显是蛋白带, 而经 IPTG 诱导后, 转化子 *StaroA* 和 *aroAM12* 该产生了较浓的 45 000 蛋白带, 表示插入基因有了很好的表达。而且表达产物是水溶性的。

酶粗提液经过硫酸铵沉淀和 FPLC-DEAE 柱层析系统分离后, EPSP 合成酶蛋白已与粗提液中的绝大部分蛋白分开, 纯化效果较好。

表 1 *StaroA* 和 *aroAM12* 表达的 EPSP 合成酶的纯化效果

Tab 1 Purification of the EPSP synthase from *StaroA* and *aroAM12*

菌种	纯化步骤	比活力 ($\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$)	纯化倍数
<i>aroAM12</i>	可溶性粗提物	2.26 $\pm$ 0.39	1
	DEAE 柱层析	28.31 $\pm$ 5.94	12.5
<i>StaroA</i>	可溶性粗提物	0.094 $\pm$ 0.031	1
	DEAE 柱层析	1.203 $\pm$ 0.217	12.8

图 2 中, M 为蛋白质标准物; 1—5 分别表示 *aroAM12* 菌体未诱导前全蛋白, 诱导后全蛋白, 可溶性粗提物, 硫酸铵沉淀后透析液, 经 FPLC-DEAE 分离提纯后的酶蛋白溶液; 6—10 分别表示 *StaroA*

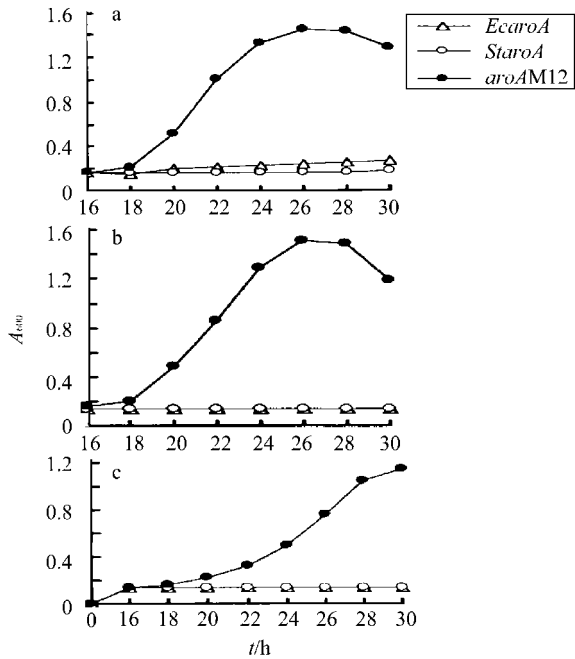


图 1 转化子在含不同浓度草甘膦的 M9 液体培养其中的生长情况

Fig. 1 Growth of *EcaroA* *staroA* and *aroAM12* in lignid M9 minimal medium with glphos at concentrations in dioated

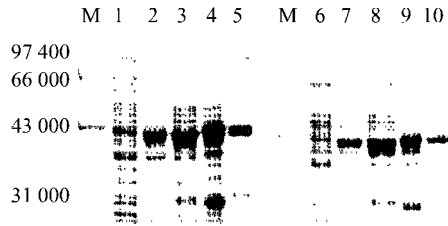


图 2 *StaroA* M12 和 *aroA* 表达的 EPSP 合成酶在聚丙烯酰胺凝胶上的电泳图

Fig. 2 Electropherogram of EPSP synthase from *aroAM12* and *StaroA* on SDS polyacrylamide gel

菌体未诱导前全蛋白，诱导后全蛋白，可溶性粗提物，硫酸铵沉淀后透析液，经 FPLC-DEAE 分离提纯后的酶蛋白溶液。

2.5 EPSP 合成酶活力及米氏常数

测定 PEP 所对应的米氏常数 K_m (PEP) 和抑制作用常数 K_i (glyphosate) 的结果见图 3 和表 2)。从图 3 可见，草甘膦是 PEP 的竞争性抑制剂^[5]。

从表 2 可以看出，突变子 *aroAM12* 所表达的 EPSP 合成酶，比 *StaroA* 所产生的酶， K_m (PEP) 减少 23 倍，而 K_i (glyphosate) 则增大 19 倍。

表 2 *StaroA* 和 *aroAM12* EPSP 合成酶的动力学性质
Tab. 2 Kinetic properties of *StaroA* and *aroA* M12 EPSP synthase

酶	K_m (PEP) ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	K_i (glyphosate) ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
<i>aroA</i> M12	1.8 ± 0.234	10.72 ± 2.04
<i>StaroA</i>	43.6 ± 13.08	0.54 ± 0.13

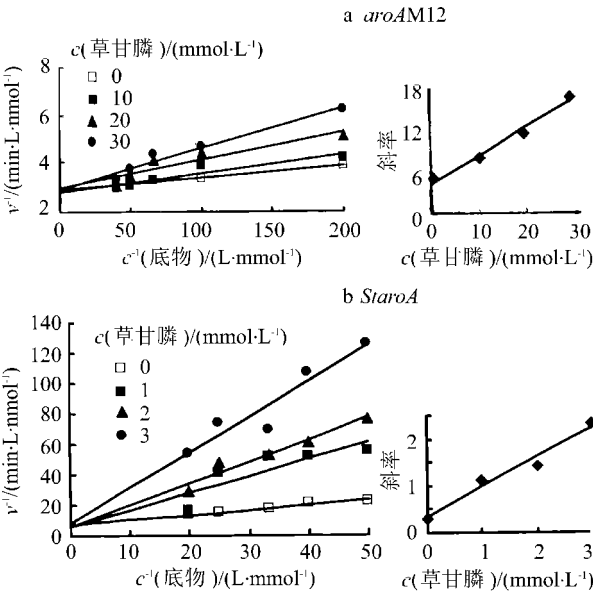


图 3 草甘膦对 EPSP 合成酶动力学性质的作用
Fig. 3 Effect of glyphosate on EPSP synthase

S-3-P 浓度固定在 $500 \mu\text{mol/L}$ ，草甘膦作如图 3 中所示的一系列变化时的初速度对 c (PEP) 的双倒数线，小图反映的是草甘膦的影响情况。

3 讨论

同时采用 2 个同源模板，通过在 PCR 过程中合成片段从不同模板的随机结合，交错延伸，增加了突变的机会，可望将两模板的不同优良性状重组起来，获得优于原模板的新基因^[9, 10]。

由于对 EPSP 合成酶活性中心附近氨基酸残基的作用尚未明了，所以，通过定点突变改良该酶的效果十分有限^[1, 3]。本文以鼠伤寒沙门氏杆菌和大肠杆菌的 EPSP 合成酶基因为模板，通过随机结合，交错延伸的 PCR 扩增过程，使基因获得多位点突变，并在大肠杆菌中获得表达。对该基因片段进行测序，证实它的确是在鼠伤寒沙门氏杆菌 EPSP 合成酶基因的基础上，发生了多位点突变，使酶蛋白上的几个氨基酸残基发生了置换。提取其表达产物 EPSP 合成酶蛋白，测定动力学指标，结果证明获得了与作为模板的野生型酶相比，具有高得多的酶活力和底物亲和力 (K_m (PEP) 是野生型酶的 1/24) 和大大增强的草甘膦抗性 (K_i (glyphosate) 是野生型酶的 20 倍) 的突变基因。

2000 年全球转基因作物种植面积估计达 $4.42 \times 10^8 \text{ hm}^2$ ，其中使用抗除草剂抗性的作物占了 74%^[19]。从 1999 年开始，中国以较大的经费强度设立“国家转基因植物研究与产业化专项”，从而将中国转基因植物研究和开发推向新高潮，但国内至今未见

其它关于抗草甘膦基因克隆和应用的报道。在中国加入 WTO 后, 面临着国外基因专利垄断和转基因植物大量涌入的压力。本文的结果, 一方面证明了所采用的基因优化方法的有效性。另一方面, 所获得的突变子, 酶动力学性质的显著改良, 对草甘膦抗性的显著增强, 并拥有自主知识产权, 这无疑具有重要的现实意义。目前已经构建出含该基因的植物表达载体, 转入模式植物烟草中, 使转基因烟草的耐草甘膦能力增强 (结果另文发表), 显示了该突变基因良好的应用前景。

参考文献:

[1] COMAI L, FACCIOITI D, HIATT W R, et al. Expression in plant of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate[J] . Nature, 1985, 317: 741—744.

[2] PADGETTE S R, RE D B, GASSER C S. Site-directed mutagenesis of a conserved region of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase active site[J] . J Biol Chem, 1991, 266: 22364—22369.

[3] HE M, YANG Z Y, NIE Y F, et al. A new type of class I

bacterial 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase mutants with enhanced tolerance to glyphosate[J] . Biochimica et Biophysica Acta, 2001, 1568: 1—6.

[4] SHUTTLEWORTH W A, POHL M E, HELMS G L, et al. Site-directed mutagenesis of putative active site residues of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase[J] . Biochemistry, 1999, 38: 296—302.

[5] KNOWLES P F, SPRINSON D B. Preparation of shikimate-5-phosphoate[J] . Methods Enzymol, 1970, 17A: 351—354.

[6] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术(第二版)[M] . 武汉: 中国协和医科大学出版社, 1999.

[7] LANZETTA P A, ALVAREZ L J, REINACH P S, et al. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate [J] . Anal Biochem, 1979, 100: 95—97.

[8] GRAMERI A. DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution[J] . Nature, 1998, 391: 288—291.

[9] ZHAO H, GIVER L, SHAO Z, et al. Molecular evolution by staggered extension process (StEP) *in vitro* recombination [J] . Nature Biotech, 1998, 16: 258—261.

[10] 闫新甫. 全球转基因作物种植概况[J] . 国外科技动态, 2001, 8: 15.

Cloning and Mutagenesis of the *aroA* Gene

HE Ming¹, ZENG Hai yan², XU Pei lin¹, YE Chang ming¹

(1. The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education //Biotechnology Research Center, Sun Yat sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China;

2. The Earth and Environmental Sciences College, Sun Yat sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The herbicide glyphosate inhibits EPSP synthase (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) encoded by the *aroA* gene, a key enzyme in the aromatic amino acid biosynthetic pathway in crops and weeds. The staggered PCR extension process has been applied with *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium aroA* genes as templates to obtain one variant that exhibits significantly enhanced tolerance to glyphosate. Kinetic patterns of the mutant reveal the successful generation of EPSP synthase glyphosate tolerant variant with high *K_i* (glyphosate) and low *K_m* (PEP) .

Key words: *aroA*; 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase; glyphosate