富含古罗糖醛酸的褐藻多糖生产菌株的构建

胡　斌, 韩　峰, 林育姿, 宫倩红, 于文功

(中国海洋大学 医药学院 教育部海洋药物重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 为获得古罗糖醛酸(Guluronate)含量高的细菌胞外褐藻多糖, 利用 PCR 从海洋细菌 *Pseudomonas* sp. QDA 中克隆了其甘露糖醛酸 C-5 差向异构酶基因(*algG*), 连接入质粒 pMF54Km, 构建了重组表达载体 pMF54 Km-algG。利用三亲接合法将 pMF54 Km-algG 转入菌株 QDA 中, 获得 *algG* 过量表达重组菌株 QDA-G。^{1}H-NMR 测定结果表明, QDA-G 所产的褐藻多糖中β-D-甘露糖醛酸(M)与它的 C-5 差向异构体 α-L-古罗糖醛酸(G)的比值为 0.38, G 的质量分数达到 74.2%, 比野生菌株 QDA 提高了 26.4%。且重组菌株遗传稳定性良好, 连续传代 20 代后, M/G 的比值无明显变化。

关键词: 甘露糖醛酸 C-5 差向异构酶; 假单胞菌; 褐藻多糖; 过量表达

中图分类号: Q539　　文献标识码: A　　文章编号: 1000-3096(2008)01-0014-05

褐藻多糖是由β-D-甘露糖醛酸(Mannuronate, M)和它的 C-5 差向异构体 α-L-古罗糖醛酸(Guluronate, G)两种单体组成的线性聚合物。褐藻多糖中 M 与 G 的存在形式可能有 3 种: 聚甘露糖醛酸片段(poly-mannuronate, PM)、聚古罗糖醛酸片段(poly-guluronate, PG)和甘露糖醛酸-古罗糖醛酸混合嵌段(MG block)[1]。褐藻多糖及其低聚糖已广泛应用于食品、制药、化工等多个领域, 具有广阔的应用前景。褐藻多糖和寡糖分子中的 M/G 比决定其生物活性, 如富含 M 的褐藻多糖和寡糖具有抗肿瘤、免疫调节等作用[2~4], 而富含 G 的褐藻多糖具有抗艾滋病等重要药用价值[5]。许多假单胞菌属和固氮菌属的细菌能够产生胞外褐藻多糖[6,7], 并且其生物合成途径已经非常明确: 首先在生物体内合成的是聚甘露糖醛酸段, 在甘露糖醛酸 C-5 差向异构酶[8~11](AlgG)作用下部分甘露糖醛酸转变为古罗糖醛酸[1,12]。因此 AlgG 是决定褐藻多糖结构的一种关键酶, 近年来已成为研究与开发的热点。通过基因工程技术改造褐藻多糖生产菌株的生物合成途径, 或者直接利用此酶, 就可获得不同结构的褐藻多糖。

作者以 1 株产生胞外褐藻多糖的无病原性的海洋细菌 *Pseudomonas* sp. QDA[13] 为材料, 利用 DNA 重组技术构建了甘露糖醛酸 C-5 差向异构酶基因 *algG* 过量表达的工程菌株 QDA-G, 以期获得高 G 含量的细菌胞外褐藻多糖。

1　材料与方法

1.1　菌株、质粒及培养条件

Pseudomonas sp. QDA 是本实验室从海水中分离到的产生褐藻多糖的菌株, 无病原性; *Escherichia coli* DH5α 购自 Gibco BRL; *E. coli* HB101(含辅助质粒 pRK2013)和质粒 pMF54[11] 由 Ohman 教授惠赠。常规的细菌培养用 LB 培养基(每升含 10 g 蛋白胨、5 g 酵母提取物、10 g 氯化钠)。制备褐藻多糖时采用 MAP 培养基(100 mmol/L $Na_2C_5H_7O_4N$, 7.5 mmol/L NaH_2PO_4, 16.8 mmol/L K_2HPO_4, 10 mmol/L $MgSO_4$)。必要时在培养基中加入合适的抗生素: 卡那霉素(KAN), 30 mg/L 用于大肠杆菌, 300 mg/L 用于假单胞菌。

1.2　pMF36-Kan-algG 载体的构建

将来源于质粒 pET-24a(+)的 *Kan* 抗性基因重组于 pMF54 质粒, 获得 pMF54Km 载体。根据 GenBank 中 *Pseudomonas* sp. QDA 的 *algG* 序列, 设计用于表达 *algG* 基因的特异性引物, 序列如下:

algG1: 5′(*Nco* Ⅰ) CATGCCATGGATGAACCTTCACCCGCA 3′;

algG2: 5′(*Hind* Ⅲ) CCCAAGCTTAAGCTTATCGATCATTTCGGTC 3′。

以 *Pseudomonas* sp. QDA 基因组 DNA 为模板和 algG1/algG2 为引物进行 PCR。产物用 *Nco* Ⅰ/*Hind* Ⅲ双酶切, 琼脂糖凝胶电泳, 回收大小为 1.6 kb 的目的片段, 与同样双酶切的 pMF54 Km 载体连

收稿日期: 2006-06-12; 修回日期: 2006-09-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371683)

作者简介: 胡斌(1981-), 男, 山东青岛人, 硕士, 电话: 0532-82032067, E-mail: hubinqd@gmail.com; 于文功, 通讯作者: E-mail: yuwg66@ouc.edu.cn

接，构建成质粒 pMF54 Km-algG。测序检测序列正确性。

1.3 质粒 pMF54 Km-algG 的转化

转化采用三亲接合的方法[14]，供体菌为含有 pMF54 Km-algG 质粒的 *E. coli* DH5α，受体菌为 *Pseudomonas* sp. QDA，辅助菌为 *E. coli* HB101(含辅助质粒 pRK2013)。将滤膜上的细菌洗脱、稀释后，涂布于含有卡那霉素的假单胞菌分离培养基(Pseudomonas Isolation Agar, PIA)平板，于 25℃培养 24 h。挑取单克隆进行 PCR 验证。

1.4 *algG* 基因的诱导表达及表达产物的 SDS-PAGE 检测

将阳性 QDA-G 菌株培养至 600 nm 吸光值为 0.5，加入 IPTG 诱导，终浓度分别为 0.2，0.4，0.6，0.8，1 mmol/L，继续于 25℃振荡培养过夜。表达产物大小采用 SDS-PAGE 胶进行检测，以转入 pMF54 Km 质粒的 QDA 作为阴性对照。

1.5 细菌胞外褐藻多糖的分离纯化

将细菌划线于含有合适抗生素的 LB 固体平板上，25℃培养 16 h。挑取单克隆于 5 mL 新鲜的液体 LB 中培养至 600 nm 吸光值为 0.5，然后按 1∶100 的比例接种到 400 mL MAP 培养基中，25℃培养 48 h。10 000 r/min，离心 10 min，去除菌体。上清液加入同样体积的含 4 mol/L NaCl 的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)，然后用 2 倍体积的 95%乙醇沉淀过夜，离心，沉淀再用乙醇洗涤 2 遍。沉淀重新溶解后，经 phenylHP 疏水柱除去蛋白。溶液旋转蒸发浓缩至 10 mL，然后脱盐，冷冻干燥，-20℃保存备用。

1.6 核磁共振(NMR)

纯化后的细菌胞外褐藻多糖，用重水溶解、冻干重复 3 次，进行核磁^{1}H 谱分析。反应温度：45℃；积分时间：20 min。实验所用仪器为日本电子公司生产的 Jeol JNM-ECP600 M 超导核磁共振波谱仪(600 MHz)。

1.7 重组子 QDA-G 稳定性分析

将 QDA-G 在含有合适抗生素的 LB 固体平板上连续传代 20 代。取单克隆按 1.5 所述步骤分离纯化胞外多糖，按 1.6 所述步骤分析其结构，以检测 QDA-G 产胞外褐藻多糖结构的稳定性。

2 结果

2.1 pMF36-Kan-algG 载体的构建

将 *Kan* 抗性基因连接到表达载体 pMF54，构成 pMF54 Km 载体，以便于筛选。利用 PCR 从 QDA 菌株基因组 DNA 中克隆到甘露糖醛酸 C-5 差向异构酶基因 *algG*(图 1)，并重组于 pMF54 Km，构建成 *algG* 基因过量表达载体 pMF54 Km-algG(图 2)。

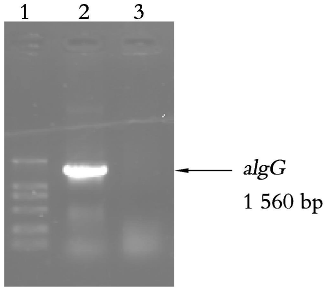

图 1 *algG* 基因的 PCR 产物的琼脂糖电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis anlysis of PCR product of *algG* gene

1. marker DL2000; 2. QDA 基因组 PCR 产物 *algG*(1 560 bp); 3. 阴性对照

1. marker DL2000; 2. PCR product of *algG*(1 560 bp); 3. negative comtrol

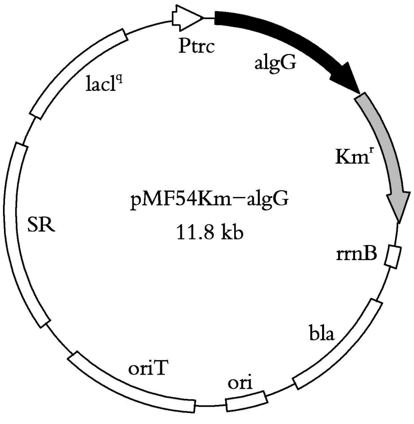

图 2 重组质粒 pMF54 Km-algG 示意

Fig. 2 Map of the plasmid pMF54 Km-algG

2.2 *algG* 基因在 QDA 菌株中的表达

用三亲接合的方法将 pMF54 Km-algG 质粒转化到 QDA 菌株中，利用含有卡那霉素的平板和 PCR 筛选得到阳性重组子，其一命名为 QDA-G。通过不同浓度的 IPTG 诱导，菌体总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳，结果如图 3 所示。含有质粒 pMF54 Km-algGP 的菌体出现 55 ku 的特异性目的带，说明转化入细菌体内的

质粒 pMF 54Km-algG 在 IPTG 诱导下, 能够使 *algG* 基因过量表达。当 IPTG 浓度为 0.4 mmol/L 时, 就能得到较高的表达量。

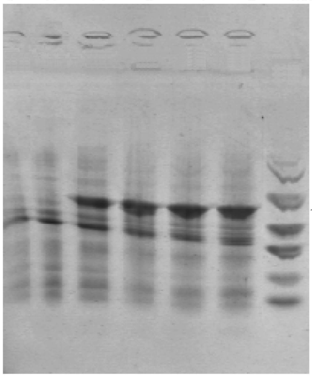

图 3　QDA 及 QDA-G 菌株中重组 *algG* 表达量的 PAGE 电泳图谱

Fig.3　PAGE analysis of expression of *algG* gene in QDA and QDA-G

0. 无 IPTG 诱导的 QDA 细胞裂解液; 1~5. 分别用 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mmol/L IPTG 诱导 6 h 后的 QDA-G 细胞裂解液; m. 标准蛋白质 Marker

0. Whole cell lysate of QDA without IPTG inducer; 1~5. Whole cell lysate of QDA-G with 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mmol/L IPTG inducers; m. protein molecular marker

2.3　QDA-G 胞外褐藻多糖结构的核磁分析

提取了菌株 QDA 和 QDA-G 的胞外褐藻多糖, 纯化后用重水溶解、冻干重复 3 次, 进行核磁 ^{1}H 谱分析。结果表明, 由野生菌 QDA(图 4A) 提取的胞外褐藻多糖在化学位移为 4.6 ppm 处出现了甘露糖醛酸(M) 1 位 H 的吸收峰, 同时在低场区化学位移为 5.0 ppm 位置附近处出现了古罗糖醛酸(G) 1 位 H 的吸收峰, 从而证明 QDA 所产的褐藻多糖中同时含有 M 和 G。根据峰面积积分值计算, 该菌株所产的褐藻多糖中 M/G 的比值为 1.09, G 的质量分数达到47.8%。突变株 QDA-G(图 4B) 所产的胞外褐藻多糖在化学位移为 4.6 ppm 处出现了甘露糖醛酸(M) 1 位 H 的吸收峰, 同时在低场区化学位移为 5.0 ppm 位置附近处出现了古罗糖醛酸(G) 1 位 H 的吸收峰, 从而证明 QDA-G 所产的褐藻多糖中同时含有 M 和 G。根据峰面积积分值计算, 该菌株所产的褐藻多糖中 M/G 的比值为 0.38, G 的质量分数达到 74.2%, 比野生菌株 QDA 提高了 26.4%。

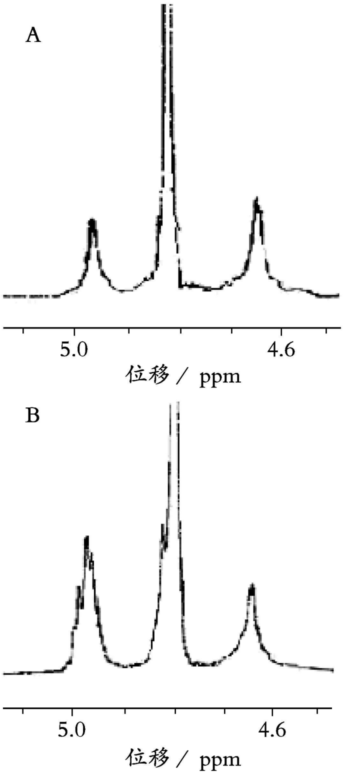

图 4　细菌胞外褐藻多糖的 ^{1}H 核磁图谱

Fig.4　^{1}H NMR spectrum of alginate from bacteria

A. 野生菌株 QDA 来源的褐藻多糖; B. 突变菌株 QDA-G 来源的褐藻多糖

A. alginate from wild QDA; B. alginate from QDA-G

2.4　QDA-G 产胞外褐藻多糖结构稳定性分析

QDA-G 菌株稳定性良好, 连续传代 20 代后, M/G 的比值无明显变化, 均保持在 0.4 左右(数据未给出)。

3　讨论

褐藻多糖是褐藻细胞壁间的主要填充物质, 采用稀酸提取法进行的研究表明, 褐藻的种类不同, 褐藻多糖的 M/G 的比例则不同[15]。Haug 等[16] 的研究也表明, 在同一种褐藻内, 细胞壁间填充物质的主体是甘露糖醛酸, 细胞壁则主要由古罗糖醛酸或者甘露糖醛酸与古罗糖醛酸所组成。研究还发现, 褐藻的种类、生长地点、季节、部位不同, 褐藻酸的含量、M/G 的比例也不同。因此, 不利于特定结构的褐藻多糖、寡糖的大规模制备与应用。

利用微生物生产褐藻多糖拥有从植物中提取多糖所不具备的优点: 生产周期短, 不受季节、地域和

病虫害条件限制，具有较强的市场竞争力和广阔的发展前景[17]。但是，微生物来源的褐藻多糖迄今未得到开发和利用，造成了资源的极大浪费。其原因是已发现的高产褐藻多糖的微生物均为病原微生物，如目前研究最多的铜绿假单胞菌是机会致病菌，用来制备褐藻多糖存在安全隐患。作者所采用的产生胞外褐藻多糖的细菌 *Pseudomonas* sp. QDA 是本实验室从海水中分离的，无病原性，并且已经克隆了 QDA 的褐藻多糖生物合成操纵元。研究结果表明 QDA 褐藻多糖的生物合成和调控与铜绿假单胞菌具有较高的相似性。因此 *Pseudomonas* sp. QDA 具有开发为褐藻多糖工业生产菌株的潜力。

作者从 *Pseudomonas* sp. QDA 中克隆到了甘露糖醛酸 C-5 差向异构酶基因 *algG*，并在 QDA 中进行了过量表达，获得了超表达重组菌株 QDA-G。实验结果表明，QDA-G 所产的褐藻多糖中 M/G 的比值为 0.38，G 的质量分数达到 74.2%，比野生菌株 QDA 提高了 26.4%，且重组菌株稳定性良好，为富含 G 的褐藻多糖的大规模制备与应用提供了有力条件。

参考文献：

[1] 纪明侯. 海藻化学[M]. 北京：科学出版社，1997.

[2] Fujihara M, Nagumo T. The effect of the content of D-mannuronic acid and L-guluronic acid blocks in alginates on antitumor activity[J]. **Carbohydr Res**, 1992, 224: 343-347.

[3] Flo T H. Involvement of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in cell activation by mannuronic acid polymers [J]. **J Biol Chem**, 2002, **277**(38): 35 489-35 495.

[4] Halaas O. Mannuronan enhances survival of lethally irradiated mice and stimulates murine haematopoiesis in vitro[J]. **Scand J Immunol**, 1997, **46**(4): 358-365.

[5] Liu H Y, Geng M Y. Multiple and multivalent interactions of novel anti-AIDS drug candidates, sulfated polymannuronate (SPMG)-derived oligosaccharides, with gp120 and their anti-HIV activities[J]. **Glycobiology**, 2005, 15: 501-510.

[6] Gorin PA, Spencer J F. Exocellular alginic acid from *Azotobacter vinelandii* [J]. **Can J Chem**, 1966, 44: 993-998.

[7] Linker A, Jones R S. A new polysaccharide resembling alginic acid isolated from *Pseudomonads*[J]. **J Biol Chem**, 1966, 241: 384-385.

[8] Sumita J, Michael J F, Helga E, *et al*. The dual roles of AlgG in C-5-epimerization and secretion of alginate polymers in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. **Mol Microbiol**, 2003, **47**(4): 1 123-1 133.

[9] Hoidal H K, Glaerum Svanem B I, Gimmestad M, *et al*. Mannuronan C-5 epimerases and cellular differentiation of *Azotobacter vinelandii*[J]. **Environ Microbiol**, 2000, **2**(1): 27-38.

[10] Nyvall P, Corre E, Boisset C, *et al*. Characterization of mannuronan C-5-epimerase genes from the brown alga *Laminaria digitata* [J]. **Plant Physiol**, 2003, **133**(2): 726-735.

[11] Franklin M J, Chitnis C E, Gacesa P, *et al*. *Pseudomonas aeruginosa* AlgG is a polymer level alginate C5-mannuronan epimerase[J]. **J Bacteriol**, 1994, **176**(7): 1 821-1 830.

[12] Gacesa P. Bacterial alginate biosynthesis- recent progress and future prospects[J]. **Microbiology**, 1998, 144: 1 133-1 143.

[13] 韩文君，路新枝，肖琳，等. 一株产褐藻酸多糖的海洋假单胞细菌 *Pseudomonas* sp. QDA 的筛选与鉴定[J]，中国海洋大学学报(自然科学版)，2004，**34**(1): 60-64.

[14] Fischer-Fantuzzi L, Girolamo D M. Triparental mating in *Escherichia coli*[J]. **Genetics**, 1961, 46: 1 305-1 315.

[15] 郑乃余，张燕霞，范晓，等. 海带和马尾藻中褐藻多糖的糖醛酸组成与序列结构的研究[J]. 海洋与湖沼，1992，**23**(4): 444-453.

[16] Haug A, Lesern B. Uronic acid sequence in alginate from different sources[J]. **Carbohydr Res**, 1971, 32: 217-215.

[17] 魏培莲. 微生物胞外多糖研究进展[J]. 浙江科技学院学报，2002，**14**(2): 8-12.

Construction of high-guluronate-containing-alginate producing mutant of *Pseudomonas* sp. QDA

HU Bin, HAN Feng, LIN Yu-zi, GONG Qian-hong, YU Wen-gong

(Key Laboratory of Marine Drugs of Ministry of Education, School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Jun., 12, 2006
Key words: mannuronan C-5 epimerases; *Pseudomonas* sp. QDA; alginate; over-expression

Abstract: *Pseudomonas* sp. QDA, which was isolated from seawater, has the ability of producing extracellular alginate. In order to obtain the high-guluronate-containing alginate, C-5-mannuronan epimerase gene (*algG*) of *Pseudomonas* sp. QDA was cloned by PCR and ligated in to plasmid pMF54Km. The resulting plasmid pMF54Km-*algG* was transferred to QDA by triparental mating, and an *algG* over-expressing strain, QDA-G, was obtained. The results of ^{1}H-NMR showed that the M/G ratio of alginate fragments by QDA-G was 0.38 and the content of guluronate was 74.2%, about 26.4% higher than that of wild strain QDA. The genetic stability of QDA-G was good. No significant changes were found in M/G ratio of alginate fragments of QDA-G after 20 passages.

(本文编辑: 张培新)