

# 大肠杆菌磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的克隆和表达

何晓亮<sup>1</sup>, 李竹<sup>2</sup>, 梁立强<sup>2</sup>, 孟万利<sup>1</sup>, 苗兰天<sup>1</sup>, 孙耀祖<sup>1</sup>, 蔡红光<sup>2</sup>

(1. 河北科技大学生物科学与工程学院, 河北石家庄 050018 2. 甘肃瑞和祥生物科技有限公司, 甘肃张掖 734000)

**摘要:**为了更好地研究磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的结构和功能, 采用 PCR(聚合酶链式反应)、双酶切和细胞转化等基因工程方法对磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因进行克隆并使用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行表达分析, 扩增出一个新的大肠杆菌磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因, 将其基因克隆到原核表达载体 pET-30a 上, 并导入到大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3) 中。通过 IPTG 诱导成功表达出大肠杆菌的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶。所提出的方法能够高效表达磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶, 为进一步大规模表达纯化和应用提供参考。

**关键词:**基因工程; 大肠杆菌; 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶; 基因表达; 二氧化碳

**中图分类号:**Q812 **文献标志码:**A

## Cloning and expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Escherichia coli*

HE Xiaoliang<sup>1</sup>, LI Zhu<sup>2</sup>, LIANG Liqiang<sup>2</sup>, MENG Wanli<sup>1</sup>, MIAO Lantian<sup>1</sup>, SUN Yaozu<sup>1</sup>, CAI Hongguang<sup>2</sup>

(1. School of Biological Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018, China; 2. RECONDEX, Zhangye, Gansu 734000, China)

**Abstract:** In order to better study the structure and function of phosphoenolpyruvate carboxylase, the phosphoenolpyruvate carboxylase gene is cloned and expressed by PCR (polymerase chain reaction), double enzyme digestion and cell transformation. The results show that the new phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Escherichia coli* is successfully amplified and cloned into the prokaryotic expression vector pET-30a, and then introduced into *Escherichia coli* BL21 expression system. The phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli* is successfully induced by IPTG. The phosphoenolpyruvate carboxylase can be efficiently expressed by using the proposed method, which provides preparation for further scale expression, purification and application.

**Keywords:** genetic engineering; *Escherichia coli*; phosphoenolpyruvate carboxykinase; protein expression; CO<sub>2</sub>

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)是一种存在于磷酸烯醇式丙酮酸和二氧化碳反应生成草酰乙酸过程中的催化酶<sup>[1-3]</sup>。PEPC 酶在 Mg<sup>2+</sup> 和 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 存在的情况下催化磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)不可逆的 β-羧化

收稿日期:2018-12-10;修回日期:2019-03-08;责任编辑:李 穆

基金项目:河北省自然科学基金(C2014208093)

第一作者简介:何晓亮(1981—),男,河北饶阳人,讲师,博士,主要从事基因工程相关方面的研究。

E-mail: realren@sina.com

何晓亮,李竹,梁立强,等.大肠杆菌磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的克隆和表达[J].河北科技大学学报,2019,40(2):133-137.

HE Xiaoliang, LI Zhu, LIANG Liqiang, et al. Cloning and expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Escherichia coli* [J]. Journal of Hebei University of Science and Technology, 2019, 40(2): 133-137.

生成草酰乙酸(OAA)和无机磷酸(Pi)<sup>[4-5]</sup>。

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶广泛存在于植物和细菌中,而动物和丝状霉菌中缺少这种酶。磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶属于变构酶,主要功能为三羧酸循环提供草酰乙酸,另外也与C4植物光合二氧化碳固定反应(C4二羧酸循环)及景天科植物的苹果酸形成(景天酸代谢)等有关<sup>[6]</sup>。非光合型PEPC酶参与四碳酸的回收代谢途径<sup>[7]</sup>。植物PEPC的生理作用还包括:种子萌发和形成<sup>[8]</sup>、调节保卫细胞<sup>[9]</sup>、促进苹果酸的合成为固氮根瘤菌提供呼吸基质<sup>[10]</sup>,并且在植物抗生物和非生物胁迫中有重要作用<sup>[11]</sup>。

此外,PEPC酶参与NADPH代谢、C-N的交互反应、CO<sub>2</sub>的重吸收、苹果酸发酵和pH调节等众多重要的生理过程<sup>[12]</sup>。磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶分子的二级结构主要以β桶型结构、α螺旋为主,还有少量的β链<sup>[13-14]</sup>。它的4个亚基是以同构方式结合,其四级结构属于D2对称性,在空间上可能排列成拟四面体<sup>[15]</sup>。通常植物PEPC的氨基酸序列具有高度的保守型<sup>[16]</sup>,残基数一般为960~970<sup>[17]</sup>,在N末端附近有磷酸化位点(E/DR/KxxSIDAQL/MR)是植物特有的结构<sup>[18]</sup>。位于C端的963QNTG966基序与PEPC催化活性有关<sup>[19]</sup>。

为了更好地研究PEPC酶的结构和功能的特征,本研究克隆了大肠杆菌的PEPC基因的序列并进行了诱导表达,旨在为PEPC酶结构和功能的研究提供一定的信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

原核表达载体pET-30a由河北科技大学周晓辉教授馈赠,大肠杆菌JM109, DH5α, BL21(DE3)购自北京天根生物科技有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 PCR扩增

大肠杆菌JM109基因组DNA提取的方法按照细菌基因组DNA提取试剂盒的说明书(北京天根)进行。按照从National Center for Biotechnology Information (NCBI)上检索到的大肠杆菌*pepc*基因序列的ORF使用Prime primer 5.0设计上、下游引物,分别加入Bam HI(GGATCC)和Hind III(AAGCTT)限制性内切酶的酶切位点,引物由上海英潍捷基公司合成,具体序列如下:

上游引物:5'-CGC GGATCCATGCGCGTTAACAATGGTTTGAC-3'。

下游引物:5'-GGC AAGCTTTTACAGTTTTCGGACCAGCCGCTAC-3'。

以大肠杆菌基因组DNA为模板在Gene Amp PCR system 9700进行PCR反应扩增*pepc*基因序列,PCR反应条件:94℃ 5 min;94℃ 45 s,60℃ 45 s,72℃ 2 min,循环35次;72℃延伸10 min。PCR产物经1%的琼脂糖凝胶电泳检测确认后使用胶回收试剂盒(北京全式金)回收,送交测序公司(上海英潍捷基)测序<sup>[20]</sup>。

#### 1.2.2 重组表达载体pET-30a-*pepc*的构建

pET-30a质粒的提取按照质粒提取试剂盒(GenStar BioSolutions)的说明书进行。质粒提取完毕之后,进行琼脂糖凝胶电泳检测。*pepc*基因扩增产物的回收产物和pET-30a质粒分别用Bam HI和Hind III(TAKARA)进行双酶切,pET-30a质粒经双酶切后要用去磷酸化酶(New England Biolabs)处理,酶切反应和去磷酸化反应后均用胶回收试剂盒(北京全式金)进行回收。经过双酶切处理的基因和载体,用T4DNA连接酶(TAKARA)连接。连接好的重组体使用热激的方法转入大肠杆菌DH5α,利用PCR技术和双酶切技术进行验证,进而将验证正确的送交测序公司(上海英潍捷基)测序进行鉴定。

#### 1.2.3 PEPC酶的表达

将测序成功的重组质粒转化到大肠杆菌BL21(DE3)中,获得pET-30a-*pepc*-BL21重组菌株。将过夜培养的pET-30a-*pepc*-BL21菌液,按2%接种量,依次转接于9瓶50 mL的LB(100 μg/mL Kan)液体培养基中,160 r/min,37℃培养。至OD<sub>600 nm</sub>为0.4~0.6,加入终浓度依次为0,0.01,0.5 mmol/L的IPTG诱导剂,37℃时诱导3~4 h,OD<sub>600 nm</sub>值到2.0左右。8 000 r/min,4℃离心15 min。用细胞悬浮液重新悬浮上述离心后的菌体沉淀,加入终浓度为0.1 mmol/L PMSF和一片蛋白酶抑制剂。使用超声波细胞破碎机(宁波新芝)进行细胞破碎(破碎10 min,其中工作3 s间隔5 s),进而用超速冷冻离心机(Beckman Coulter)14 000 r/min,4℃离心30 min,取上清液。分别取各组的上清液,制备样品,用SDS-PAGE鉴定蛋白的表达情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 大肠杆菌 *pepc* 基因的克隆

#### 2.1.1 大肠杆菌基因组 DNA 的提取

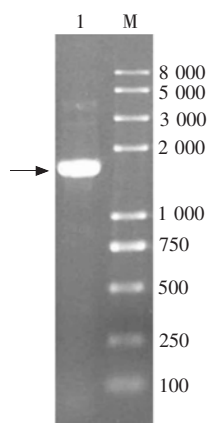
按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒所提供的提取方法提取大肠杆菌 JM109 的基因组 DNA,并用琼脂糖凝胶电泳检测提取结果,如图 1 所示。结果显示出现了目的条带,且该条带的大小比 DNA Marker 的最大条带要大得多,说明基因组提取成功。

#### 2.1.2 *pepc* 基因的 PCR 扩增

以大肠杆菌基因组 DNA 为模板,利用上、下游引物克隆 *pepc* 基因,用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,结果显示在 1 600 bp 左右出现了条带,并且条带单一,大小与理论值相符,结果见图 2 所示,说明引物设计正确,目的基因扩增成功。

#### 2.1.3 重组表达载体 pET-30a-*pepc*

将 *pepc* 基因和 pET-30a 质粒分别经 Bam HI 和 Hind III 酶切,然后在 T4 DNA 连接酶的作用下,将酶切产物连接成为重组质粒 pET-30a-*pepc*,用琼脂糖凝胶电泳检测连接结果,如图 3 所示。结果显示重组质粒的大小明显比空载的 pET-30a 大,说明目的基因成功连接到载体 pET-30a 上。



M 为 DNA Marker;1 为 PCR 产物。箭头所指为目的片段。

图 2 *pepc* 基因 PCR 扩增结果电泳鉴定

Fig. 2 Gel analysis of the *pepc* by PCR

#### 2.1.4 双酶切验证

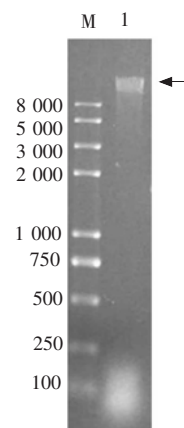
提取重组质粒 pET-30a-*pepc*,并将质粒进行双酶切验证,结果为酶切后的混合物内含有与目的基因大小一致的片段,表明 *pepc* 基因成功插入 pET-30a 质粒,电泳结果与预期结果相符,如图 4 所示。

#### 2.1.5 重组质粒的测序验证

将双酶切验证正确的质粒,送交测序公司测定碱基序列,并与 NCBI 上的 *pepc* 基因的测序结果比对,其比对结果为 99%,如图 5 所示,即重组质粒构建成功,该基因编码完整的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶。

### 2.2 重组表达载体 pET-30a-*pepc* 在大肠杆菌中的表达

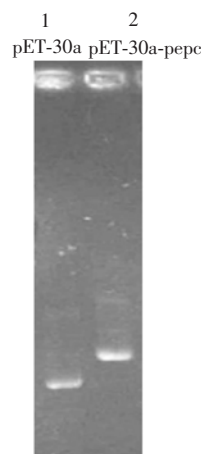
用 15% 的 SDS-PAGE 验证表达结果。由图 6 可知,在 66.2 kDa 附件出现一条明显的条带,与理论值 66 kDa



M 为 DNA Marker(北京全式金);  
1 为大肠杆菌基因组 DNA。箭头所指为目的片段。

图 1 大肠杆菌基因组 DNA 电泳鉴定

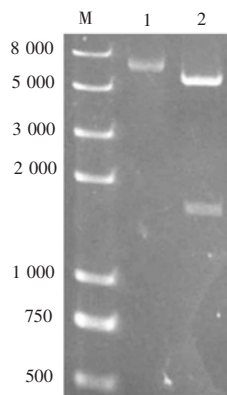
Fig. 1 Gel analysis of genome DNA from *Escherichia coli*.



1 为空载质粒 pET-30a,2 为重组质粒 pET-30a-*pepc*。

图 3 重组质粒 pET-30a-*pepc* 电泳鉴定

Fig. 3 Construction and identify of expression vector pET-30a-*pepc*



M 为 DNA Marker;1 为重组质粒 pET-30a-*pepc*;  
2 为双酶切产物。

图 4 双酶切产物电泳鉴定

Fig. 4 Construction and identify of expression vector

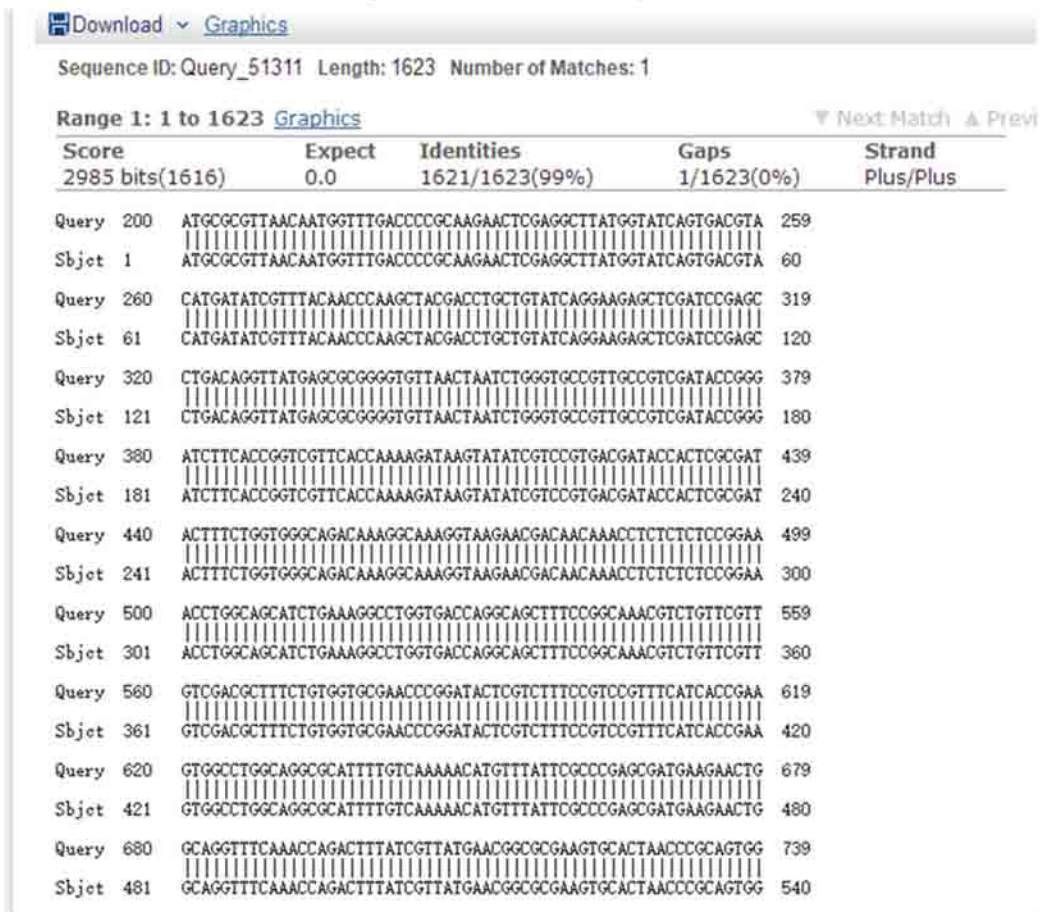


图5 *pepc* 基因的 PCR 扩增产物和 NCBI 序列比对图

Fig. 5 MegAlign between the sequences of *pepc* by PCR and NCBI

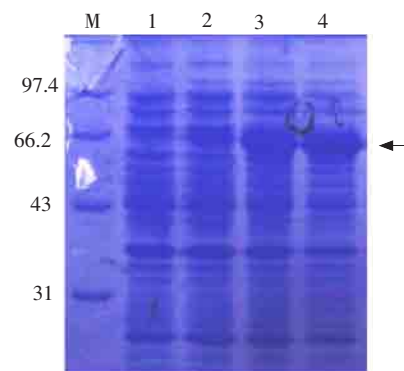
相符,说明该蛋白能够单独表达,IPTG 浓度高蛋白表达量也高。

### 3 结论

1) 利用基因工程的技术和方法成功克隆到新的 大肠杆菌磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶,并且成功构建了表达菌株。接种量的多少直接影响菌种的生长情况,通过对表达菌株的生长曲线进行测定,经过优化确定了 2% 的接种量最合适,为大规模的培养磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的基因工程菌株提供了数据参考。

2) IPTG 的浓度对基因的表达效果和蛋白质的最终浓度,通过添加不同浓度的 IPTG,确定了最佳诱导浓度。

3) 建立的方法确实能够高效表达磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶,如何更大规模地表达该酶是今后需要进一步关注的重点。



M 为低分子量蛋白 Marker(索莱宝);1 为含有空载质粒的大肠杆菌的菌体全蛋白;2 为还有重组质粒未经 IPTG 诱导表达的菌体全蛋白;3 和 4 分别为加入 0.01 和 0.5 mmol/L IPTG 诱导表达的菌体全蛋白。

图 6 不同浓度 IPTG 诱导表达的 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 6 SDS-PAGE analysis for the expression by different concentrations of IPTG

## 参考文献/References:

- [1] GOWIK U, WESTHOFF P. C<sub>4</sub>-phosphoenolpyruvate Carboxylase[M].Netherlands:Springer, 2011:257-275.
- [2] CHRISTIN P A, PETITPIERRE B, SALAMIN N, et al. Evolution of C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxykinase in grasses, from genotype to phenotype[J]. Molecular Biology and Evolution, 2009, 26(2): 357-365.
- [3] GEHRIG H, TAYBI T, KLUGE M, et al. Identification of multiple PEPC isogenes in leaves of the facultative crassulacean acid metabolism(CAM) plant *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. cv. Tom Thumb[J]. FEBS Letters, 1995, 377(3):399-402.
- [4] UHRIG R G, O'LEARY B, SPANG H E, et al. Coimmunopurification of phosphorylated bacterial-and plant-type phosphoenolpyruvate carboxylases with the plastidial pyruvate dehydrogenase complex from developing castor oil seeds[J]. Plant Physiology, 2008, 146(3): 1346-1357.
- [5] O'LEARY B, RAO S K, KIM J, et al. Bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase(PEPC)functions as a catalytic and regulatory subunit of the novel class-2 PEPC complex of vascular plants[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(37):24797-24805.
- [6] IZUI K, MATSUMURA H, FURUMOTO T, et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase: A new era of structural biology[J]. Annu Rev Plant Biol, 2004, 55:69-84.
- [7] NUNES-NESE A, FERNIE A R, STITT M. Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogeninteractions[J]. Molecular Plant, 2010, 3(6):973-996.
- [8] O'LEARY B, FEDOSEJEVS E T, HILL A T, et al. Tissue- specific expression and post- translational modifications of plant- and bacterial- type phosphoenolpyruvate carboxylase isozymes of the castor oil plant, *Ricinus communis* L [J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(15): 5485-5495.
- [9] COUSINS A B, BAROLI I, BADGER M R, et al. The role of phosphoenolpyruvate carboxylase during C<sub>4</sub> photosynthetic isotope exchange and stomatal conductance [J]. Plant Physiology, 2007, 145(3): 1006- 1017.
- [10] NOMURA M, MAI H T, FUJII M, et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase plays a crucial role in limiting nitrogen fixation in *Lotus japonicus* nodules [J]. Plant & Cell Physiology, 2006, 47(5): 613- 621.
- [11] CHENG G, WANG L, LAN H. Cloning of PEPC-1 from a C<sub>4</sub> halophyte Suaeda aralocaspica without Kranz anatomy and its recombinant enzymatic activity in responses to abiotic stresses [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2016(83): 57- 67.
- [12] BRENDAN O L, JOONHO P, WILLIAM C P. The remarkable diversity of plant PEPC(phosphoenolpyruvate carboxylase):Recent insightsinto the physiological functions and post-translational controls ofnon-photosynthetic PEPCs[J]. Biochemical Journal, 2011, 436(1):15-34.
- [13] MATSUMURA H X Y, SHIRAKATA S. Crystal structures of C<sub>4</sub> form maize and auaternary complex of E. coli phosphoenolpyruvate carboxylases[J]. Structure, 2002, 10(12): 1721- 1730.
- [14] 王岳坤, 阳江华. 橡胶树磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因 Hb PPC1 的克隆和表达分析[J]. 热带作物学报, 2015, 36(5):895-900.  
WANG Yuekun, YANG Jianghua. Cloning and expression analysis of phosphoenolpyruvate carboxylase gene Hb PPC1 from hevea brasiliensis[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2015, 36(5):895-900.
- [15] 魏绍巍, 黎茵. 植物磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的功能及其在基因工程中的应用[J]. 生物工程学报, 2011, 27(12): 1702-1710.  
WEI Shaowei, LI Yin. Functions of plant phosphoenolpyruvate carboxylase and its applications for genetic engineering[J]. Chin J Biotech, 2011, 27(12): 1702-1710.
- [16] KAI Y M H, INOUE T, TERADA K, et al. Three dimensional structure of phosphoenolpyruvate carboxylase: A proposed mechanism for the allosteric inhibition[J]. Pro Natl Acad Sci, 1999(96): 823- 828.
- [17] SHYLAJANACIYAR M, DINESHBABU G, RAJALAKSHMI R, et al. Analysis and elucidation of phosphoenolpyruvate carboxylase in cyanobacteria [J]. The Protein Journal, 2015, 34(1): 73- 81.
- [18] RUIZ-BALLESTA I, FERIA A B, NI H, et al. In vivo monoubiquitination of anaplerotic phosphoenolpyruvate carboxylase occurs at Lys624 in germinating sorghum seeds [J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(2): 443- 451.
- [19] ALVAREZ R, GARCÍA-MAURI O S, FERIA A B, et al. A conserved 19-amino acid synthetic peptide from the carboxy terminus of phosphoenolpyruvate carboxylase inhibits the in vitro phosphorylation of the enzyme by the calcium-independent phosphoenolpyruvate carboxylase kinase [J]. Plant Physiology, 2003, 132(2): 1097- 1106.
- [20] HE X, ZHOU X, YANG Z, et al. Cloning, expression and purification of d-tagatose 3-epimerase gene from Escherichia coli JM109[J]. Protein Expression & Purification, 2015, 114(2):77-81.