



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102181412 B

(45) 授权公告日 2012. 12. 12

(21) 申请号 201110056470. 6

C12P 13/04 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 03. 09

(56) 对比文件

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO :M2011043 2011. 02. 21

WO 2007105203 A3, 2007. 09. 20, 全文 .

WO 200914699 A1, 2009. 12. 03, 全文 .

GI:297195114.

(73) 专利权人 南京工业大学

地址 210009 江苏省南京市新模范马路 5 号

diaminobutyrate-2-oxoglutarate
transaminase [Streptomyces
pristinaespiralis ATCC 25486].

(72) 发明人 徐虹 夏军 冯小海 张扬 李莎
倪芳 欧阳平凯

《Genbank》. 2010, 全文 .

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所
(普通合伙) 32204

审查员 高宇

代理人 肖明芳

(51) Int. Cl.

C12N 9/10 (2006. 01)

C12N 15/54 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

C12N 1/15 (2006. 01)

C12N 1/19 (2006. 01)

C12N 1/21 (2006. 01)

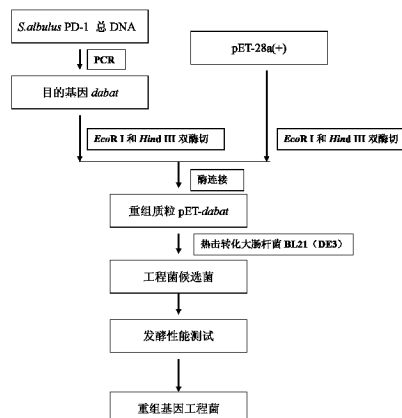
权利要求书 2 页 说明书 6 页
序列表 10 页 附图 3 页

(54) 发明名称

一种二氨基丁酸-2-酮戊二酸转氨酶及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种二氨基丁酸-2-酮戊二酸转氨酶及其应用,它具有如 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列;本发明还公开了上述酶的编码基因,如 SEQ ID NO :1 所示的核苷酸序列。本发明同时公开了包含上述二氨基丁酸-2-酮戊二酸转氨酶的编码基因的表达载体、基因工程菌及其构建方法。本发明首次从小白链霉菌 (Streptomyces albulus) 中提取、测序、克隆表达的了二氨基丁酸-2-酮戊二酸转氨酶基因,通过构建基因工程菌,利用基因工程菌发酵生产 L-2,4-二氨基丁酸,开辟了一条新的 L-2,4-二氨基丁酸获取途径。



1. 一种二氨基丁酸-2-酮戊二酸转氨酶,其特征在于它是如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列。

2. 一种权利要求 1 所示二氨基丁酸-2-酮戊二酸转氨酶的编码基因,其特征在于它具有如 SEQ IDNO:1 所示的核苷酸序列。

3. 一种表达载体,其特征在于包含权利要求 2 所述的二氨基丁酸-2-酮戊二酸转氨酶基因。

4. 根据权利要求 3 所述的表达载体,其特征在于所述的表达载体为 pET-28a (+)。

5. 一种基因工程菌,其特征在于它包含权利要求 3 所述的表达载体。

6. 根据权利要求 5 所述的基因工程菌,其特征在于所述的基因工程菌为包含有重组质粒 pET-dabat 的 E. coli BL21 (DE3)。

7. 权利要求 6 所述的基因工程菌的构建方法,其特征在于它包含如下步骤:

(1) 二氨基丁酸-2-酮戊二酸转氨酶的基因 *dabat* 扩增:

根据 GeneBank 公布的 *Streptomyces coelicolor* A3(2) 的基因组序列,设计如下一对引物:

引物 1 :5' -CCGGAATTCATGACCATCACCCAGCCCGA-3'

引物 2 :5' -CCCAAGCTTTCAGGCGCAGTCGCGCACCG-3'

在上述引物的 5' 端的下划线部分分别引入 EcoR I 和 Hind III 酶切位点,以小白链霉菌(*Streptomyces albulus*) PD-1 CCTCC NO:M2011043 总 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,PCR 反应物组成如下:25 μ l 体系,2.5 μ l 10 \times Ex Taq Buffer,2 μ l dNTP,2.5 μ l MgCl₂,2 μ l DMSO,2 μ l 模板,引物 1 和引物 2 各 2 μ l,0.5 μ l Ex Taq,9.5 μ l ddH₂O,PCR 反应程序为:95 $^{\circ}$ C 变性 5min,然后 94 $^{\circ}$ C 30s,58 $^{\circ}$ C 60s,72 $^{\circ}$ C 90s,共 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 延续 10min;将 PCR 产物克隆测序;

(2) 重组表达质粒 pET-dabat 的构建:

将步骤(1)得到 PCR 产物纯化后用限制性内切酶 EcoR I 和 Hind III 酶切,与经过同样双酶切的质粒 pET-28a(+),在 T4 连接酶的作用下进行连接,得到重组质粒 pET-dabat;

(3) 将该重组质粒 pET-dabat 转化至宿主细胞中:

将重组质粒 pET-dabat 转化至感受态大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,涂布含有 25 μ g/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基上,37 $^{\circ}$ C 培养 18 ~ 24h 得到初步阳性克隆;

(4) 经抗性培养基筛选得到阳性克隆:

分别挑取初步阳性克隆于 5mL 含有 25 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C,200rpm 培养过夜,提取质粒,经限制性内切酶 EcoRI 和 Hind III 酶切质粒,根据电泳结果判断具有序列 SEQ ID NO:1 的 DNA 片段的质粒为重组质粒 pET-dabat,具有该质粒的菌落为阳性克隆,即为基因工程菌。

8. 权利要求 6 所述的基因工程菌在发酵生产 L-2,4 二氨基丁酸中的应用。

9. 根据权利要求 8 所述的应用,其特征在于将基因工程菌在含有 25 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中 30 ~ 40 $^{\circ}$ C 液体培养 8-20h,按 2 ~ 10%(v/v) 的接种量转接至发酵培养基培养 5 ~ 7h 后,加入终浓度为 0.2 ~ 1mmol/L 的乳糖诱导,降温至 25 ~ 30 $^{\circ}$ C 再诱导培养 12 ~ 20h。

10. 根据权利要求 9 所述的应用,其特征在于所述的发酵培养基包含如下组分:葡萄糖

10 ~ 50g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 ~ 10g/L, NaCl 5 ~ 10g/L, KH_2PO_4 1 ~ 3g/L, MgSO_4 0.1 ~ 1 g/L, 溶剂为水。

一种二氨基丁酸-2-酮戊二酸转氨酶及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程技术领域,具体涉及涉及一种二氨基丁酸-2-酮戊二酸转氨酶及其应用。

背景技术

[0002] L-2,4-二氨基丁酸(L-2,4-diaminobutyric acid,英文缩写DABA),也称2,4-丁二氨酸,是一种次生非蛋白质氨基酸,属于四碳化合物,其结构式为 $(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$,属于碱性氨基酸。它广泛存在于动物、植物和微生物体内,具有独特的生理功能,目前其研究处于起步阶段,尚未大规模应用。二氨基丁酸在农业和医药行业中具有良好的应用前景。在农业方面,研究发现在高等植物中,尤其是山豆属(Lathyrus)中,游离的二氨基丁酸含量较高,当外界环境恶劣时,二氨基丁酸含量上升,环境改善时,二氨基丁酸含量又下降,这可能与这种植物抗旱、耐瘠薄、耐盐碱、抗虫的特性有关,实验室研究表明如果外界提供氮源,固氮植物以硝酸盐的形式提供无机氮,则该植物体内二氨基丁酸含量上升,以储存多余的氮素,消除氨态氮对植物的毒害作用。美国农业部将植物抗逆性的研究作为一个研究方向,专门拨款研究林生山豆和其体内的二氨基丁酸。在我国,中国农业大学也在进行该方面的研究。除了水土保持,研究发现对于体内没有发现二氨基丁酸的植物来说,二氨基丁酸是一种竞争性的代谢抑制剂,国外研究者证实二氨基丁酸对莴苣、蚕豆的生长有抑制作用,对一些蝗虫的生长也有抑制作用。含有二氨基丁酸的植物在植物群落中生存力强,具有竞争力,可能就是由于释放出的二氨基丁酸对其他动植物的生长起到了抑制作用。除了抑制作用,二氨基丁酸能促进豌豆根瘤菌的生长,对土壤杆菌和其他的根瘤菌的生长也有刺激作用。在医学方面,过量的二氨基丁酸对人体有毒性,但在适当的剂量下又是一种药物,研究发现二氨基丁酸能引起高渗透压,对小鼠纤维瘤细胞有毒害性,对人体恶性神经胶质瘤细胞有溶解作用,因此,二氨基丁酸能用于脑肿瘤的防治。把抗癌药物道诺霉素制成二氨基丁酸衍生物,用它治疗白血病疗效更好,更为安全。

[0003] 本课题组在筛选具有聚赖氨酸能力的菌株时发现一株能同时生产聚赖氨酸及聚二氨基丁酸的菌株 *Streptomyces albulus* PD-1 (CCTCC NO:M2011043)。目前该菌株保藏于武汉中国典型培养物保藏中心(简称CCTCC),地址:武汉武汉大学,邮编:430072,登记入册的编号是CCTCC NO:M2011043,保藏日期是:2011年2月21日,详见中国专利2011100499868。

[0004] 二氨基丁酸-2-酮戊二酸转氨酶(diaminobutyrate-2-oxoglutarate transaminase,简称DABAT,EC 2.6.1.76)在L-2,4-二氨基丁酸的合成中起重要作用,天冬氨酸的衍生物天冬氨酸-β-半醛和谷氨酸在该酶催化下生成L-2,4-二氨基丁酸和α-酮戊二酸。目前L-2,4-二氨基丁酸尚未大规模生产,作为精细化工品,只能通过有机合成的方法得到,价格昂贵,价格达900元/克。山豆属的植物中,L-2,4-二氨基丁酸占种子干重的1%-3%,含量低,直接从种子中提取在技术角度、经济角度上都不可行。因此,本发明从微生物合成的角度研究如何发酵生产L-2,4-二氨基丁酸,为L-2,4-二氨基丁酸高产基

因工程菌的构建及 L-2,4- 二氨基丁酸的生产开辟了一条新的途径。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种二氨基丁酸 -2- 酮戊二酸转氨酶。

[0006] 本发明还要解决的技术问题是提供编码上述二氨基丁酸 -2- 酮戊二酸转氨酶的基因序列。

[0007] 本发明还要解决的技术问题是提供包含上述二氨基丁酸 -2- 酮戊二酸转氨酶基因的表达载体及基因工程菌。

[0008] 本发明还要解决的另一个技术问题是提供上述基因工程菌的构建方法。

[0009] 本发明最后要解决的技术问题是提供上述基因工程菌在制备 L-2,4- 二氨基丁酸的应用。

[0010] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案如下:

[0011] 一种二氨基丁酸 -2- 酮戊二酸转氨酶,它具有如 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列。包含 422 个氨基酸。其来源于小白链霉菌 (*Streptomyces albulus*)PD-1(菌种保藏号: CCTCC NO :M2011043,关于上述小白链霉菌具体见中国专利 2011100499868)。

[0012] 一种权利要求 1 所示二氨基丁酸 -2- 酮戊二酸转氨酶的编码基因,它具有如 SEQ IDNO :1 所示的核苷酸序列,其含有 1269bp 碱基。。

[0013] 一种表达载体,包含权利要求 2 所述的二氨基丁酸 -2- 酮戊二酸转氨酶基因。

[0014] 其中,所述的表达载体为 pET28a(+)

[0015] 一种基因工程菌,它包含权利要求 3 所述的表达载体。

[0016] 上述基因工程菌优选为包含有重组质粒 pET-dabat 的 *E. coli* BL21 (DE3)。

[0017] 上述基因工程菌的构建方法,包含如下步骤:

[0018] (1) 二氨基丁酸 -2- 酮戊二酸转氨酶的基因 *dabat* 扩增:

[0019] 根据 GeneBank 公布的 *Streptomyces coelicolor* A3(2) 的基因组序列,设计如下 一对引物:

[0020] 引物 1 :5' -CCGGAATTCATGACCATCACCCAGCCCGA-3'

[0021] 引物 2 :5' -CCCAAGCTTTCAGGCGCAGTCGCGCACCG-3'

[0022] 在上述引物的 5' 端的下划线部分分别引入 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点,以小白链霉菌 PD-1 (*Streptomyces albulus* PD-1, CCTCC NO :M2011043) 总 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,PCR 反应物组成如下 (25 μ l 体系): 2.5 μ l 10 \times Ex Taq Buffer, 2 μ l dNTP, 2.5 μ l MgCl₂, 2 μ l DMSO, 2 μ l 模板,引物 1 和引物 2 各 2 μ l, 0.5 μ l Ex Taq, 9.5 μ l ddH₂O, PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 变性 5min, 然后 94 $^{\circ}$ C 30s, 58 $^{\circ}$ C 60s, 72 $^{\circ}$ C 90s, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延续 10min。将 PCR 产物克隆测序。

[0023] (2) 重组表达质粒 pET-dabat 的构建:

[0024] 将步骤 (1) 得到的 PCR 产物纯化后用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切, 与经过同样双酶切的质粒 pET-28a(+), 在 T4 连接酶的作用下进行连接, 得到重组质粒 pET-dabat ;

[0025] (3) 将该重组质粒 pET-dabat 转化至宿主细胞中:

[0026] 将重组质粒 pET-dabat 转化至感受态大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 涂布含有 25 μ g/mL

卡那霉素的 LB 固体培养基上,37°C 培养 18 ~ 24h 得到初步阳性克隆;

[0027] (4) 经抗性培养基筛选得到阳性克隆:

[0028] 分别挑取初步阳性克隆于 5mL 含有 25 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中,37°C,200rpm 培养过夜,提取质粒,经限制性内切酶 EcoRI 和 Hind III 酶切质粒,根据电泳结果判断具有序列 SEQ ID NO:1 的 DNA 片段的质粒为重组质粒 pET-dabat,具有该质粒的菌落为阳性克隆,即为基因工程菌。对重组质粒 pET-dabat 进行测序,结果表明插入片段为一个含有 1269bp,编码 422 个氨基酸组成的蛋白质。

[0029] 上述二氨基丁酸-2-酮戊二酸转氨酶的表达方法:将包含如 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列的基因工程菌接种于添加了 25 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中,37°C 摇床培养过夜;再以 2 ~ 10% (v/v) 的接种量转接到含 25 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中培养 5-7h 后,加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 进行诱导,IPTG 的终浓度为 0.2 ~ 1mmol/L,降温至 25 ~ 30°C,继续表达 12 ~ 20h 后,离心收集菌体。

[0030] 上述基因工程菌在发酵生产 L-2,4 二氨基丁酸中的应用。

[0031] 具体方法为:将基因工程菌在含有 25 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中 30 ~ 40°C 液体培养 8-20h,按 2 ~ 10% (v/v) 的接种量转接至发酵培养基培养 5 ~ 7h 后,加入终浓度为 0.2 ~ 1mmol/L 的乳糖诱导,降温至 25 ~ 30°C 再诱导培养 12 ~ 20h。其中,所述的发酵培养基包含如下组分:葡萄糖 10 ~ 50g/L, (NH₄)₂SO₄ 5 ~ 10g/L, NaCl 5 ~ 10g/L, KH₂PO₄ 1 ~ 3g/L, MgSO₄ 0.1 ~ 1g/L, 溶剂为水。

[0032] 有益效果:本发明首次从小白链霉菌 (*Streptomyces albulus*) 中提取、测序、克隆表达的二氨基丁酸-2-酮戊二酸转氨酶基因,将该基因上传至 NCBI 上进行同源性比对,其与 *Streptomyces coelicolor* A3(2) 中的 Aminotransferase 基因具有最高同源性 86%,通过构建基因工程菌,利用基因工程菌发酵生产 L-2,4-二氨基丁酸,开辟了一条新的 L-2,4-二氨基丁酸获取途径。

附图说明

[0033] 图 1:是本发明的产 L-2,4-二氨基丁酸的大肠杆菌基因工程菌的构建示意图。

[0034] 图 2:是本发明重组表达质粒 pET-dabat 的构建示意图。

[0035] 图 3:是重组的 DABAT 酶 SDS-PAGE 图谱,最左边泳道为标准蛋白分子量,自上向下的条带分别为 (kDa):116,66,45,35,25。其中,第 1、2 泳道是工程菌,3、4 泳道是对照菌。

具体实施方式

[0036] 根据下述实施例,可以更好地理解本发明。然而,本领域的技术人员容易理解,实施例所描述的内容仅用于说明本发明,而不应当也不会限制权利要求书中所详细描述的本发明。

[0037] 实施例 1:小白链霉菌 (*Streptomyces albulus*) PD-1 基因组 DNA 的提取。

[0038] 按照生产商提供的使用说明书,用 Genomic DNA Purification Kit (Takara, 大连) 抽提处于对数生长期的小白链霉菌 PD-1 (*Streptomyces albulus* PD-1, CCTCC NO: M2011043) 的基因组 DNA,并用 8g/L 琼脂糖凝胶电泳对获得的细菌基因组进行检测。

[0039] 实施例 2,二氨基丁酸-2-酮戊二酸转氨酶的基因 (dabat) 的克隆和重组菌构建。

[0040] 2.1dabat 的 PCR 扩增：

[0041] 根据 GeneBank 公布的 *Streptomyces coelicolor* A3(2) 的基因组序列，设计如下
一对引物：

[0042] 引物 1 :5' -CCGGAATTCATGACCATCACCCAGCCCGA-3'

[0043] 引物 2 :5' -CCCAAGCTTTCAGGCGCAGTCGCGCACCG-3'

[0044] 在上述引物的 5' 端的下划线部分分别引入 EcoR I 和 Hind III 酶切位点，以小白链霉菌 PD-1 (*Streptomyces albulus* PD-1, CCTCC NO :M2011043) 总 DNA 为模板，进行 PCR 扩增，PCR 反应物组成如下 (25 μ l 体系) :2.5 μ l 10 \times Ex Taq Buffer, 2 μ l dNTP, 2.5 μ l MgCl₂, 2 μ l DMSO, 2 μ l 模板，引物 1 和引物 2 各 2 μ l, 0.5 μ l Ex Taq, 9.5 μ l ddH₂O, PCR 反应程序为 :95 $^{\circ}$ C 变性 5min, 然后 94 $^{\circ}$ C 30s, 58 $^{\circ}$ C 60s, 72 $^{\circ}$ C 90s, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延续 10min。将扩增条带切胶后用 Axygen 公司柱式割胶回收试剂盒纯化回收，连接于 Takara 公司 pMD18-T 载体上并转化大肠杆菌 JM109。通过在氨苄青霉素 LB 平板上结合质粒单双酶切验证，鉴定出阳性克隆，并在南京金斯瑞生物科技公司进行序列测定。

[0045] 2.2dabat 基因的表达

[0046] 利用 pET-28a(+) 质粒 (Novagen)，构建表达载体，表达目的基因，进一步确认基因克隆的正确性。

[0047] 2.2.1 限制性酶切反应，纯化及连接反应

[0048] 将 PCR 产物纯化，用预先设计在引物序列中酶切位点所对应的内切酶进行酶切反应，同时，将 pET-28a(+) 质粒 (Novagen) 进行酶切反应。本实验中，所用的酶是 EcoRI 和 Hind III。酶切体系为 :PCR 产物或 pET-28a(+) 质粒溶液 50 μ L, EcoRI 3 μ L, Hind III 3 μ L, 10 \times 缓冲液 10 μ L, ddH₂O 34 μ L, 总体积 100 μ L。

[0049] 由于所选用的两个酶切位点在 pET-28a(+) 空质粒上相距很近 (约 20bp)，因此，酶切之后的 PCR 产物和质粒载体只需要经过 PCR 清洁试剂盒即可达到纯化的目的。

[0050] 经酶切纯化后的 PCR 产物和质粒载体，可以用于连接反应。连接反应体系为 :酶切纯化的 PCR 产物 4 μ L, 酶切纯化的质粒 4 μ L, T4 连接酶 1 μ L, 10 \times 连接酶缓冲液 1 μ L。连接后获得重组质粒 pET-dabat，其主要结构如图 2 所示。

[0051] 2.2.2 质粒制备与转化

[0052] 质粒抽提采用 Axyprep plasmid miniprep Kit (Axygen, 杭州)，参照生产商的说明书进行操作。质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 细胞使用热激法。

[0053] 2.2.3 重组质粒 pET-dabat 的转化

[0054] (1) 取 0.1-1 μ g 重组质粒 pET-dabat DNA 于 200 μ L 大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中，冰浴 30 分钟。

[0055] (2) 42 $^{\circ}$ C 水浴热激 90 秒，快速置于冰上 1-3 分钟。

[0056] (3) 加入新鲜 LB 液体培养基 800 μ L, 于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 45 分钟。

[0057] (4) 取 200 μ L 菌体涂布于含有 25 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板表面。37 $^{\circ}$ C 培养 12-16 个小时至单菌落出现。

[0058] 2.2.4 重组子的鉴定

[0059] 将阳性菌落接种于含有卡那霉素 (25 μ g/mL) 的 LB 液体培养基中进行培养并提取质粒，按照实施例 2.2.1 中的酶切体系和条件分别用 EcoRI 和 Hind III 对重组质粒进行

单-双酶切鉴定,酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。经电泳结果证实,该阳性克隆菌落含有 DNA 片段插入质粒 pET-dabat,含此重组质粒 pET-dabat 的重组大肠杆菌,即为转化的重组工程菌 *E. coli* BL21-pET-dabat。测序结果显示插入片段含有一个长 1269bp 的开放阅读框架。

[0060] 实施例 3:二氨基丁酸-2-酮戊二酸转氨酶的诱导表达。

[0061] 将重组大肠杆菌 BL21-pET-dabat 接种于 5mL 添加了 25 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 摇床培养过夜;再以 5% (v/v) 的接种量转接到装有 100mL LB 培养基(含 25 μ g/mL 卡那霉素)的 500mL 摇瓶中,37 $^{\circ}$ C 摇床培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6 时加入 IPTG 进行诱导(IPTG 终浓度 1mmol/L),降温至 25 ~ 30 $^{\circ}$ C,继续表达 12 小时后,离心收集菌体。

[0062] 实施例 4、工程菌 *E. coli* BL21-pET-dabat 中二氨基丁酸-2-酮戊二酸转氨酶的表达分析。

[0063] 1、SDS-PAGE 分析

[0064] 如实施例 2.2-2.2.4 所述步骤,将没有经过酶切的空质粒 pET-28a(+) 转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞,筛选得到包含 pET-28a(+) 的大肠杆菌 BL21(DE3),将该菌作为对照菌,命名为 *E. coli* BL21-pET。

[0065] 将重组大肠杆菌 BL21-pET-dabat 和对照菌 *E. coli* BL21-pET 接种于 5mL 添加了 25 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 摇床培养过夜;再以 5% (v/v) 的接种量转接到装有 100mL LB 培养基(含 25 μ g/mL 卡那霉素)的 500mL 摇瓶中,37 $^{\circ}$ C 摇床培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6 时加入 IPTG 进行诱导(IPTG 终浓度 1mmol/L),降温至 25 ~ 30 $^{\circ}$ C,继续表达 12 小时后,各取样 1.5mL,离心,TE 溶液(Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM)洗涤两次,再加入 100 μ l TE 溶液和 20 μ l 10mg/ml 的溶菌酶(购自华美生物工程公司)处理 1 个小时,煮沸 3min,离心,取上清即可使用。SDS-PAGE 凝胶制备好后点样,每个点 5-15 μ l,然后电泳、染色及脱色,SDS-PAGE 结果表明:二氨基丁酸-2-酮戊二酸转氨酶在工程菌 *E. coli* BL21-pET-dabat 中获得了可溶性表达,而对照菌 *E. coli* BL21-pET 则没有。

[0066] 2,二氨基丁酸-2-酮戊二酸转氨酶的酶活测定

[0067] 将重组大肠杆菌 BL21-pET-dabat 接种于 5mL 添加了 25 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 摇床培养过夜;再以 5% (v/v) 的接种量转接到装有 100mL LB 培养基(含 25 μ g/mL 卡那霉素)的 500mL 摇瓶中,37 $^{\circ}$ C 摇床培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6 时加入 IPTG 进行诱导(IPTG 终浓度 1mmol/L),降温至 25 ~ 30 $^{\circ}$ C,继续表达 12 小时后,各取样 1.5mL,离心,TE 溶液(Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM)洗涤两次,再加入 100 μ l TE 溶液和 20 μ l 10mg/ml 的溶菌酶(购自华美生物工程公司)处理 1 个小时,离心后去上清液作为酶液,参照 Hisato Ikai 等报道的方法进行二氨基丁酸-2-酮戊二酸转氨酶酶活测定(Ikai, H, and S.Yamamoto. Identification and analysis of a gene encoding L-2,4-diaminobutyrate:2-ketoglutarate 4-aminotransferase involved in the 1,3-diaminopropane production pathway in *Acinetobacter baumannii*. J. Bacteriol. 1997(179):5118-5125.),重复测定酶活三次。结果显示,本发明克隆的基因工程菌的酶活为 5.6U/mg,而对照菌 *E. coli* BL21-pET 几乎检测不到酶活,说明本发明克隆的二氨基丁酸-2-酮戊二酸转氨酶基因在大肠杆菌中得到了活性表达。

[0068] 3,本发明的基因工程菌 BL21-pET-dabat 的发酵性能测试

[0069] 将活化好的工程菌 BL21-pET-dabat 接种到装有 100mL LB 培养基（含 25 μ g/mL 卡那霉素）的 500mL 摇瓶中，37°C 摇床培养过夜，按 5%（v/v）的接种量转接至装有 100mL 发酵培养基的 500mL 摇瓶中（葡萄糖 50g/L， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 8g/L，NaCl 10g/L， KH_2PO_4 2g/L， MgSO_4 0.5g/L，溶剂为水。）培养 5-7h 后，加入终浓度为 1mmol/L 的乳糖诱导，降温至 25 ~ 30°C，继续培养 12h。离心弃去菌体，收集培养液。参照沈黎明等改进的方法测定培养液中 L-2,4-二氨基丁酸含量（沈黎明，吴显荣，林生山 豇豆体内的一种特异游离氨基酸 - 丁二氨酸，北京农业大学学报，1992，18(4) :347-351），结果表明，摇瓶培养液中 L-2,4-二氨基丁酸含量达 5.6g/L，相信经过发酵条件优化，有望实现二氨基丁酸的工业化发酵生产。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 南京工业大学

<120> 一种二氨基丁酸-2-酮戊二酸转氨酶及其应用

<130> njut110306

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1269

<212> DNA

<213> 小白链霉菌 (Streptomyces albulus)

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1269)

<400> 1

gtg acc atc acc cag ccc gat ctg agc gtc ttc gaa acc gtc gag tcg 48

Val Thr Ile Thr Gln Pro Asp Leu Ser Val Phe Glu Thr Val Glu Ser

1 5 10 15

gag gtg cgc agc tac tgc cgt ggc tgg ccc acc gtc ttt gac cgc gcg 96

Glu Val Arg Ser Tyr Cys Arg Gly Trp Pro Thr Val Phe Asp Arg Ala

[0002]

	20	25	30	
	cag ggc agc cgc ctg acc gac gag gac ggc cac acc tac ctg gac ttc			144
	Gln Gly Ser Arg Leu Thr Asp Glu Asp Gly His Thr Tyr Leu Asp Phe			
	35	40	45	
	ttc gcc ggc gcc ggc tcg ctc aac tac ggg cac aac aac ccg gtc ctc			192
	Phe Ala Gly Ala Gly Ser Leu Asn Tyr Gly His Asn Asn Pro Val Leu			
	50	55	60	
	aaa cgc gcc ctg atc gac tac atc gag cgg gac ggc atc acc cac ggg			240
	Lys Arg Ala Leu Ile Asp Tyr Ile Glu Arg Asp Gly Ile Thr His Gly			
	65	70	75	80
	ctg gac atg tcc acc acg gcc aaa cgg gcc ttc ctg gag tcg ttc cag			288
	Leu Asp Met Ser Thr Thr Ala Lys Arg Ala Phe Leu Glu Ser Phe Gln			
		85	90	95
	aac atc atc ctg cgg ccg cgc gac ctg ccg tac aag gtc atg ttc ccg			336
	Asn Ile Ile Leu Arg Pro Arg Asp Leu Pro Tyr Lys Val Met Phe Pro			
	100	105	110	
	ggc ccg acg ggc gcc aac tcg gtc gag gcc gcg ctc aaa ctg gcc cgc			384
	Gly Pro Thr Gly Ala Asn Ser Val Glu Ala Ala Leu Lys Leu Ala Arg			
	115	120	125	
	aag gtc aag ggg cgg gag tcg atc gcc tcc ttc acc aac gcc ttc cac			432
	Lys Val Lys Gly Arg Glu Ser Ile Ala Ser Phe Thr Asn Ala Phe His			
	130	135	140	

[0003]

ttc gag gag gcg ggc atc gtg ccg gac atc gtc acc gtc tcc aag tcc	816
Phe Glu Glu Ala Gly Ile Val Pro Asp Ile Val Thr Val Ser Lys Ser	
260 265 270	
atc agc ggc tac gga ctc ccg ctg gcc ctg acc ctg ttc aag ccg gag	864
Ile Ser Gly Tyr Gly Leu Pro Leu Ala Leu Thr Leu Phe Lys Pro Glu	
275 280 285	
ctg gac atc tgg gag ccc ggc gag cac aac ggc acc ttc cgc ggc aac	912
Leu Asp Ile Trp Glu Pro Gly Glu His Asn Gly Thr Phe Arg Gly Asn	
290 295 300	
aac ccg gcc ttc gtc acc gcg gcc gcc gcc ctg gac acc tac tgg gcc	960
Asn Pro Ala Phe Val Thr Ala Ala Ala Ala Leu Asp Thr Tyr Trp Ala	
305 310 315 320	
gac ggc cag atg gag aag cag acg ctg ggc cgc ggc gag atc gtc gag	1008
Asp Gly Gln Met Glu Lys Gln Thr Leu Gly Arg Gly Glu Ile Val Glu	
325 330 335	
ggg cac ctg aag gcc atc gtc gcc gag cac ccg ggc gcc ttc gcc gag	1056
Gly His Leu Lys Ala Ile Val Ala Glu His Pro Gly Ala Phe Ala Glu	
340 345 350	
tac cgc ggc cgc ggt ctg gtc tgg ggc ctg gag tgc acc gac aag gag	1104
Tyr Arg Gly Arg Gly Leu Val Trp Gly Leu Glu Cys Thr Asp Lys Glu	
355 360 365	
ctc gcc aac aag atc gcc aag cgc gcc ttc gag ctg ggg ctc ctc atc	1152
[0005]	

Leu Ala Asn Lys Ile Ala Lys Arg Ala Phe Glu Leu Gly Leu Leu Ile

370

375

380

gag acc tcc ggc ccg cag agc gag gtc gtc aaa ctg ctg ccc gca ctg 1200

Glu Thr Ser Gly Pro Gln Ser Glu Val Val Lys Leu Leu Pro Ala Leu

385

390

395

400

acg acc acc ccc gag gaa ctg gac gag ggc ctg cgg atc ctc gcc cgc 1248

Thr Thr Thr Pro Glu Glu Leu Asp Glu Gly Leu Arg Ile Leu Ala Arg

405

410

415

gcg gtg cgc gac tgc gcc tga 1269

Ala Val Arg Asp Cys Ala

420

<210> 2

<211> 422

<212> PRT

<213> 小白链霉菌 (Streptomyces albulus)

<400> 2

Val Thr Ile Thr Gln Pro Asp Leu Ser Val Phe Glu Thr Val Glu Ser

1

5

10

15

Glu Val Arg Ser Tyr Cys Arg Gly Trp Pro Thr Val Phe Asp Arg Ala

20

25

30

[0006]

Gln Gly Ser Arg Leu Thr Asp Glu Asp Gly His Thr Tyr Leu Asp Phe
 35 40 45

Phe Ala Gly Ala Gly Ser Leu Asn Tyr Gly His Asn Asn Pro Val Leu
 50 55 60

Lys Arg Ala Leu Ile Asp Tyr Ile Glu Arg Asp Gly Ile Thr His Gly
 65 70 75 80

Leu Asp Met Ser Thr Thr Ala Lys Arg Ala Phe Leu Glu Ser Phe Gln
 85 90 95

Asn Ile Ile Leu Arg Pro Arg Asp Leu Pro Tyr Lys Val Met Phe Pro
 100 105 110

Gly Pro Thr Gly Ala Asn Ser Val Glu Ala Ala Leu Lys Leu Ala Arg
 115 120 125

Lys Val Lys Gly Arg Glu Ser Ile Ala Ser Phe Thr Asn Ala Phe His
 130 135 140

[0007]

Gly Met Ser Leu Gly Ala Leu Ala Val Thr Gly Asn Ser Met Lys Arg
 145 150 155 160

Ala Gly Ala Gly Ile Pro Leu Val His Gly Thr Pro Met Pro Phe Asp
 165 170 175

Asn Tyr Leu Asp Gly Gln Thr Pro Asp Phe Leu Trp Phe Glu Arg Leu
 180 185 190

Leu Glu Asp Gln Gly Ser Gly Leu Asn Lys Pro Ala Ala Val Ile Val
 195 200 205

Glu Thr Val Gln Gly Glu Gly Gly Ile Asn Val Ala Arg Ala Asp Trp
 210 215 220

Leu Arg Ala Leu Ala Ala Leu Cys Glu Arg Gln Asp Met Leu Leu Ile
 225 230 235 240

Val Asp Asp Ile Gln Met Gly Cys Gly Arg Thr Gly Ala Phe Phe Ser
 245 250 255

[0008]

Phe Glu Glu Ala Gly Ile Val Pro Asp Ile Val Thr Val Ser Lys Ser

260

265

270

Ile Ser Gly Tyr Gly Leu Pro Leu Ala Leu Thr Leu Phe Lys Pro Glu

275

280

285

Leu Asp Ile Trp Glu Pro Gly Glu His Asn Gly Thr Phe Arg Gly Asn

290

295

300

Asn Pro Ala Phe Val Thr Ala Ala Ala Ala Leu Asp Thr Tyr Trp Ala

305

310

315

320

Asp Gly Gln Met Glu Lys Gln Thr Leu Gly Arg Gly Glu Ile Val Glu

325

330

335

Gly His Leu Lys Ala Ile Val Ala Glu His Pro Gly Ala Phe Ala Glu

340

345

350

Tyr Arg Gly Arg Gly Leu Val Trp Gly Leu Glu Cys Thr Asp Lys Glu

355

360

365

Leu Ala Asn Lys Ile Ala Lys Arg Ala Phe Glu Leu Gly Leu Leu Ile

[0009]

370

375

380

Glu Thr Ser Gly Pro Gln Ser Glu Val Val Lys Leu Leu Pro Ala Leu

385

390

395

400

Thr Thr Thr Pro Glu Glu Leu Asp Glu Gly Leu Arg Ile Leu Ala Arg

405

410

415

Ala Val Arg Asp Cys Ala

420

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 引物 1

<400> 3

ccggaattca tgaccatcac ccagcccga

29

<210> 4

<211> 29

[0010]

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 引物 2

<400> 4

ccaagcttt caggcgagt cgcgaccg

29

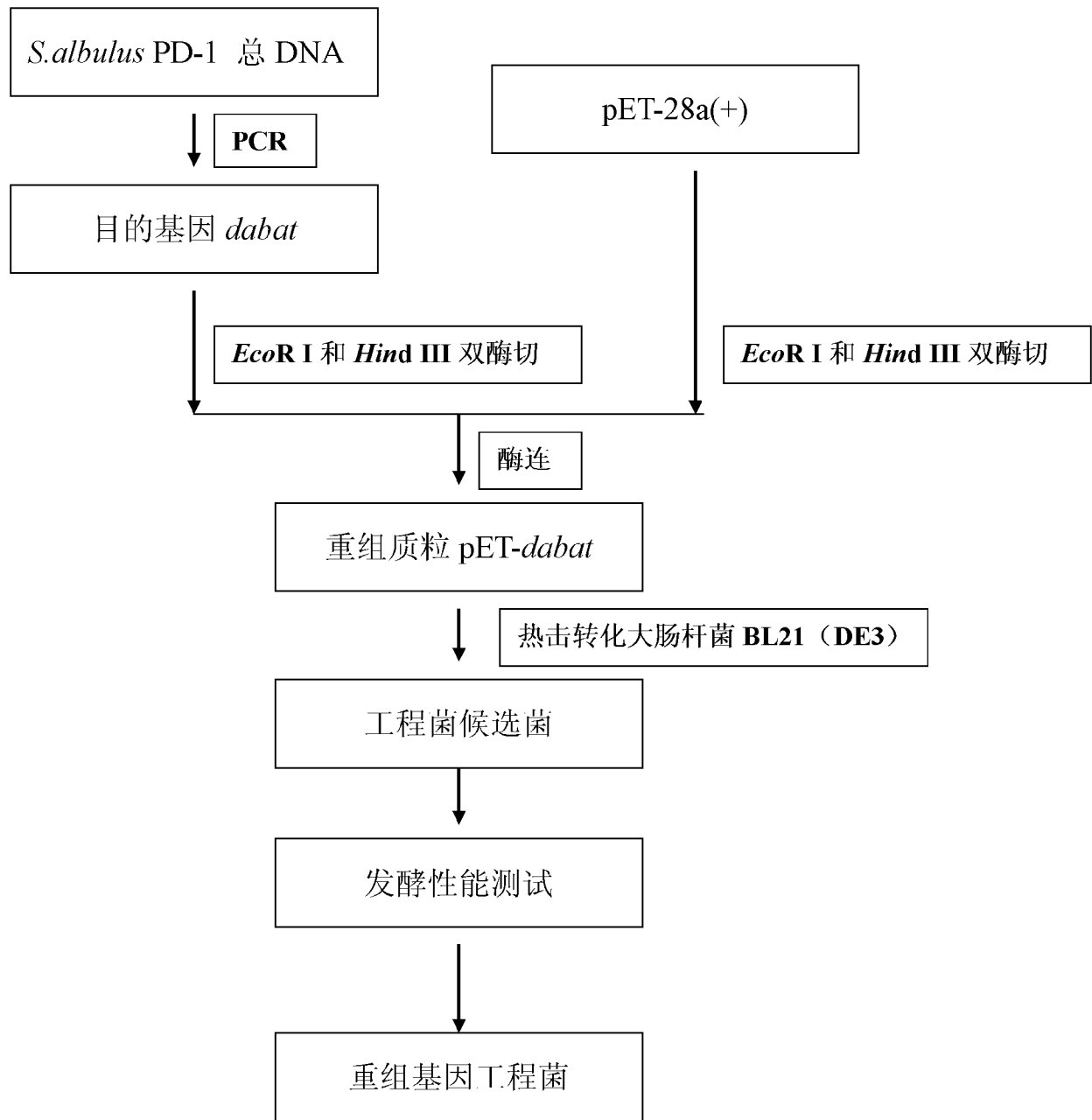


图 1

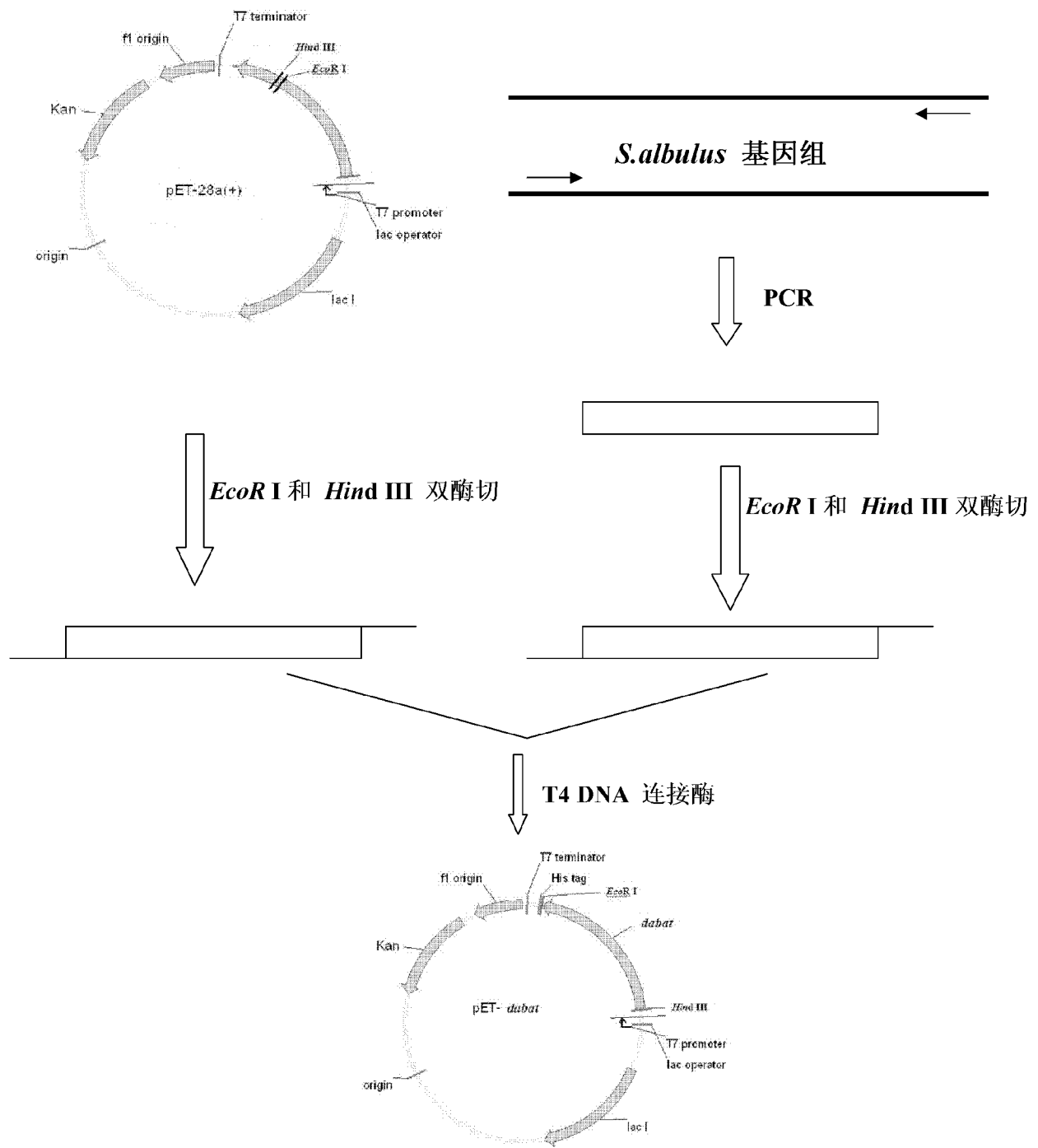


图 2

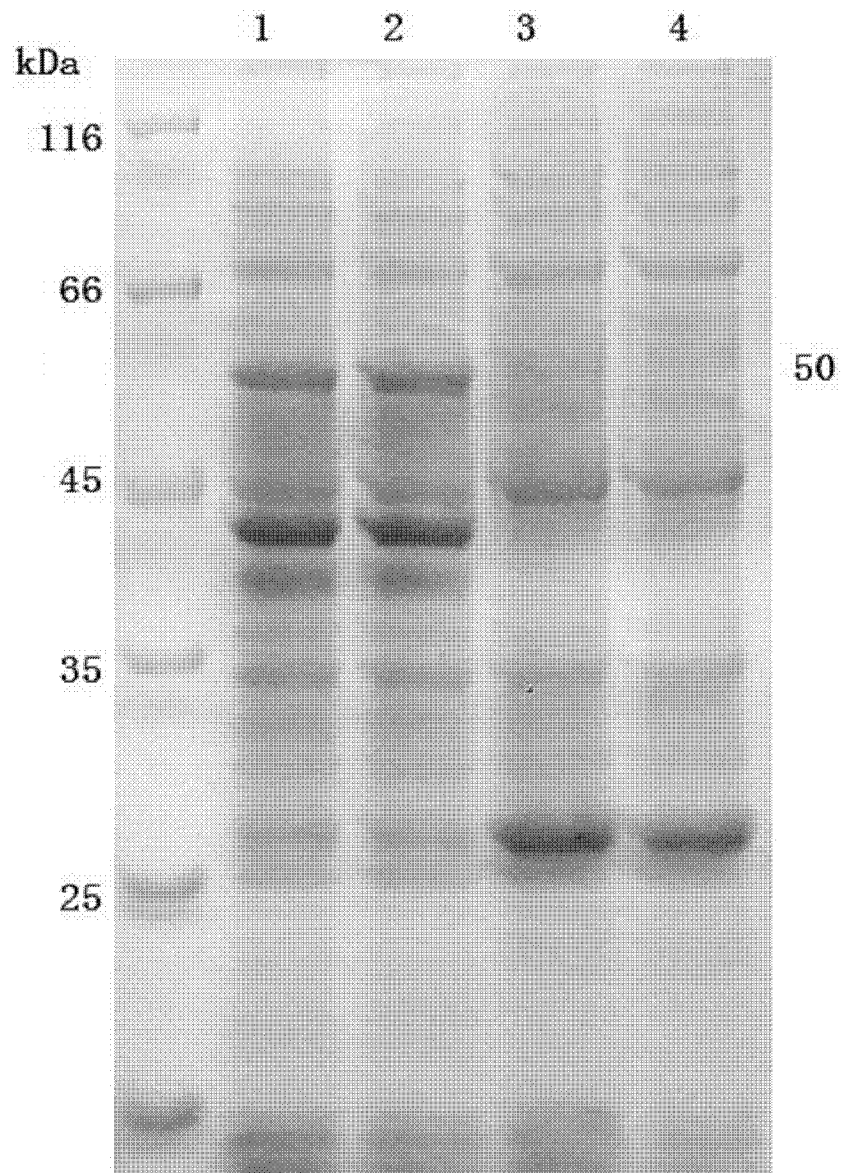


图 3