

# 克雷伯氏菌甘油脱水酶基因 在大肠杆菌中的克隆与表达

周文广, 韦宇拓, 黄 鲲, 陈发忠, 黄日波

(广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530005)

**摘 要** 利用 PCR 技术从克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae* ATCC49790) 总 DNA 中扩增得到甘油脱水酶 (glycerol dehydratase, DHAB) 基因的 DNA 片段, 并将其连接到表达质粒 pSE380, 携带有重组质粒 pSE-dhaB 的大肠杆菌 JM109 实现了 *dhaB* 基因的表达; 对含有 *dhaB* 工程菌进行表达研究, 表明工程菌在 37 °C, 以 1.0 mmol/L IPTG 诱导 5h 酶活力即达到 1164.14 U/L, 比野生菌酶活力 (168.69 U/L) 提高了 6.9 倍。

**关键词:** 甘油脱水酶; *Klebsiella pneumoniae*; 克隆与表达

甘油脱水酶 (glycerol dehydratase, EC 4.2.1.30, 简称 DHAB) 在微生物体内能催化水解甘油生成 3-羟基丙醛, 3-羟基丙醛进一步由 1,3-丙二醇氧化还原酶催化生成 1,3-PD, 因此 DHAB 是微生物生成 1,3-PD 的关键性酶, 在微生物发酵工业生产 1,3-PD 中起着重要作用。许多细菌含有 *dhaB* 基因, 如克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、产气克雷伯氏菌 (*Klebsiella aerogenes*)、产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*) 弗氏柠檬菌 (*Citrobacter freundii*)、梭菌属的丁酸梭状芽孢杆菌 (*Clotridia butyricum*) 和巴氏梭状芽孢杆菌 (*Clotridia pasteuianu*) 等<sup>[1-3]</sup>。这些 DHAB 都有着相似的蛋白结构, 核苷酸序列具有高度的同源性, 如弗氏柠檬菌 (*Citrobacter freundii*) 中编码甘油脱水酶的基因由三个亚单位构成, 分别为 *dhaB*, *dhaC* 和 *dhaE*。他们和克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 三个亚单位 *dhaB1*, *dhaB2* 和 *dhaB3* 分别具有 94%, 89% 和 86% 的同源性, 推测它们是由同一祖先衍变而来<sup>[4,5]</sup>。克雷伯氏菌 *dhaB* 基因的克隆及表达在国内尚未见有相关的报道。本研究将克雷伯氏菌的 *dhaB* 基因引入表达载体 pSE380 中, 尝试让 *dhaB* 基因在大肠杆菌中进行表达, 探索利用微生物发酵工业生产 1,3-丙二醇的新途径。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株和质粒

*K. pneumoniae* ATCC49790 购自中国普通工业微生物菌种保藏中心; 大肠杆菌表达质粒 pSE380 购自 Invitrogen 公司、大肠杆菌 JM109、克隆载体 pGEM-3zf+ 质粒均为本实验室保存。

### 1.2 培养基

种子培养基 (大豆胨 1.5%、葡萄糖 1%、牛肉膏 0.2%、蛋白胨 0.2%、酵母膏 0.5%) 用于克雷伯氏菌的培养, LB 培养基 (蛋白胨 1%、酵母膏 0.5%、NaCl 1%)。

### 1.3 酶和化学试剂

LA DNA polymerase、dNTP、T4 DNA Ligase、各种限制性内切酶购自大连宝生物公司。胶回收试剂盒及小量 PCR 产物纯化盒为碧云天产品, 其余试剂均为国产分析纯。

### 1.4 分子克隆技术

基因组 DNA 的提取纯化、质粒 DNA 的提取、DNA 酶切、连接和转化均参考文献<sup>[6]</sup>。

根据 Genebank 中查到的 *K. pneumoniae* (ATCC25955) *dhaB* 基因全序列设计扩增 *dhaB* 基因的 PCR 引物如下:

Primer B01 (sense Primer)

“863”国家高科技资助项目 (编号 2003AA001039)

作者简介: 周文广 (1978~), 男, 硕士研究生。E-mail: zhouwg97@sina.com.cn

5' - ATTGAATTCTTAAAGAGAGAGGCTGCCG - 3'

Primer B02 (antisense Primer)

5' - CTCGAA TTCA TGAAA GA TCAAAAC

GATTTGCA G TACTGGCCC - 3'

为了便于与克隆和表达载体的连接, Primer B01 引入 *EcoRI* 酶切位点; Primer B02 引入 *EcoRI* 和 *BspHI* 酶切位点。以 *Klebsiella pneumoniae* 总 DNA 为模板完成以下 PCR 程序: 94 2m; 94 30s, 56 30s, 72 5m 完成 10 循环; 再 94 30m, 60 30m, 72 5m 完成 25 循环; 最后延伸 10m。PCR 产物在 0.8% 的琼脂糖电泳检测, 回收目的片段用于酶切和连接。

### 1.5 DHAB 活力的测定

甘油脱水酶活性的测定方法采用 Tetsuo Toraya<sup>[7]</sup> 建立的 MBTH 法, 其基本原理是根据醛类与 MBTH 反应形成的复合物能用紫外分光光度法测定, 活力的定义为: 在 37 °C, pH 为 7.0 时, 每分钟催化形成 1 μmol 丙醛所需的酶量为 1U。

### 1.6 大肠杆菌细胞的破碎

将 1mL 诱导后菌液离心, 菌体用 50mmol/L 柠檬酸钾缓冲液 (pH 8.0) 洗涤, 离心, 再加入 300 μL 50mmol/L 柠檬酸钾缓冲液 (pH 8.0) 重悬菌体, 然后加入 36 μL 溶菌酶 (50mg/ml) 和 3 μL 的 TritonX - 100。37 °C 水浴 15min 后立即进行酶活力的测定。

### 1.7 DHAB 在 *E. coli* JM109 中表达及表达分析

以含质粒 pSE380 的菌株为对照, 将重组表达质粒转化大肠杆菌 JM109, 接种单菌落于 LB 培养液 (含氨苄青霉素 100 (g/mL)), 37 °C 培养过夜。取 2% 接种于新鲜的 LB 培养液中, 37 °C 培养至 A600 为 0.4 ~ 0.6。加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L 诱导表达 3 ~ 5h。取 1mL 菌液, 8000r/min 离心 5min, 收集菌体加入 200 μL 超纯水重悬, 然后取菌液 20 μL 并加入等量 2 × 上样缓冲液, 沸水浴加热 5min 立即进行 SDS-PAGE 分析。以 10% 的凝胶作分离胶, 电泳后用考马斯亮蓝 R250 进行染色。

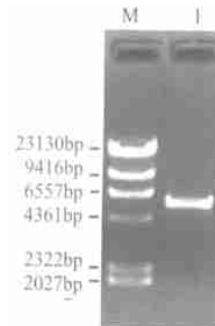
## 2 结果分析

### 2.1 重组表达质粒的构建

以 *K. pneumoniae* 总 DNA 为模板, 用合成引物进行 PCR 扩增, 扩增的 DNA 片段与预期的大小

一致, 约为 4.6kb, 如图 1 所示。

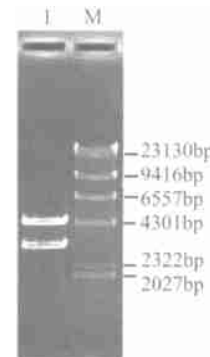
将获得的 DNA 片段连接到克隆质粒 PGEM-3zf, 经酶切验证 (图 2), 说明 *dhaB* 基因已连到克隆载体 3zf, 重组质粒命名为 PGEM-3zf-*dhaB*。将获得的 DNA 片段基因进行测序分析。



Lane I: PCR product

Lane M: DNA/ *Hind*III Marker

图 1 甘油脱水酶基因 (*dhaB*) PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析

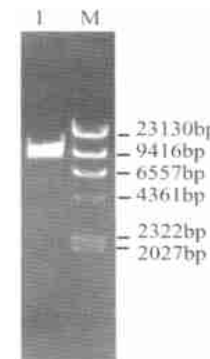


Lane I: pGEM-*dhaB*/ *Eco*RI

Lane M: DNA/ *Hind*III Marker

图 2 重组质粒 pGEM-*dhaB* 酶切验证

将测序正确的重组质粒 PGEM-3zf-*dhaB* 用 *Nco*I 的同尾酶 *Bsp*HI 和 *Eco*RI 双酶切, 回收 *dhaB*



Lane I: pSE-*dhaB*/ *Eco*RI

Lane M: DNA/ *Hind*III Marker

图 3 重组质粒 pSE-*adhB* *Eco*RI 单酶切验证

片断,与 *Nco*I 和 *Eco*RI 酶切的表达质粒 pSE380 进行连接,连接产物转化感受态细胞,筛选得到阳性克隆 pSE-*dhaB*。图 3 为甘油脱水酶的重组质粒单酶切电泳分析。

## 2.2 *K. pneumoniae* DHAB 核苷酸序列分析

重组质粒 PGEM-3 $\alpha$ -*dhaB* 委托上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序,得到的全长 DHAB 基因共有 4577 个碱基,在 gene bank 进行 blast 分析,本研究克隆到的 *dhaB* 基因与来源于 ATCC25955 的 *dhaB* 基因(Genebank U30903)同源率为 98%。

## 2.3 甘油脱水酶的酶活

由于甘油脱水酶活性强烈依赖于辅酶 B<sub>12</sub>,需要在辅酶 B<sub>12</sub> 作用下,与其活性中心结合才能产生活力,因此在测酶活时需加入辅酶 B<sub>12</sub>,在 37 °C 终浓度为 1mmol/L 的 IPTG 诱导 5h 时酶活达到最高。不同诱导时间的酶活力见表 1。

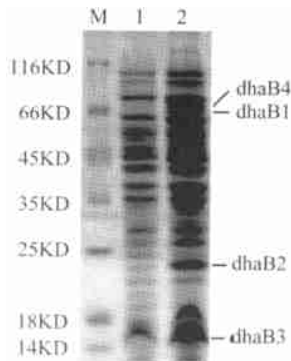
表 1 诱导时间与酶活力关系

| 菌种                      | 酶活力(U/L) |         |     |
|-------------------------|----------|---------|-----|
|                         | 2h       | 5h      | 10h |
| 重组菌株(pSE- <i>dhaB</i> ) | 187.67   | 1164.14 | 732 |
| 对照菌株(含 pSE380)          | 0        | 0       | 0   |

还比较了重组大肠杆菌和原始菌(*K. pneumoniae*)的酶活大小,重组菌的酶活力为 1164.14U/L, *K. pneumoniae* 为 168.69 U/L,故工程菌表达酶活力为原始菌的 6.9 倍。

## 2.4 SDS-PAGE 电泳分析

甘油脱水酶为复合酶,由 4 个亚基组成,4 个亚



LaneM: Protein Marker

Lane1: recombinant strain *E. coli* DH5(containing pSE380)

Lane2: recombinant strain *E. coli* DH5(containing pSE380-*dhaB*)

图 4 表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

基大小分别为 63kd,61kd,22kd,16kd<sup>[8]</sup>。本研究将重组质粒转到大肠杆菌中进行表达,对表达的产物进行 SDS-PAGE 电泳分析,与对照相比重组菌蛋白质电泳出现 4 条蛋白质特征带(图 4),与文献<sup>[9]</sup>报道的甘油脱水酶的组成相符,也表明 *dhaB* 基因在大肠杆菌中得到很好的表达。

## 3 讨论

通过对克雷伯氏菌 ATCC 25955 编码甘油脱水酶的基因 *dhaB* 的序列分析表明,它是由被 2~12 个碱基隔离开的四个独立的可读框(*dhaB1*, *dhaB2*, *dhaB3* 和 *dhaB4*) 组成。其中 *dhaB4* 对于甘油脱水酶的活性来说是非必需的。但美国专利<sup>[9]</sup>发现,含有 *dhaB1*, *dhaB2*, *dhaB3* 和 *dhaB4* 的基因工程菌比只含有 *dhaB1*, *dhaB2*, *dhaB3* 的重组菌能够显著得到更高产量的 1,3-PD。另外,DHAB 表达量高而酶活偏低的原因之一可能是在测酶活时需要额外添加辅酶 B<sub>12</sub>,已知自然界中一些细菌,如沙门氏菌或克雷伯氏菌,能够自身合成二羟脱水酶或甘油脱水酶所需的维生素 B<sub>12</sub>。而其他的细菌如大肠杆菌,必须从细胞外转运维生素 B<sub>12</sub>。因此在重组菌如大肠杆菌表达 DHAB 的过程中需在培养基中一般加入 10nM 的维生素 B<sub>12</sub>,但是,外源维生素 B<sub>12</sub> 转运进细菌内有两大困难:一、由于维生素 B<sub>12</sub> 分子过大难以通过细胞外膜的孔隙,因此需要特殊的外膜转运系统;二、由于环境中维生素浓度低,外膜转运系统必须具有对维生素 B<sub>12</sub> 高度亲和性的载体才能把它运进细胞周质内以便随后被另一系统转运至内膜。鉴于这样的考虑,美国专利<sup>[10]</sup>构建了一种重组菌,此重组菌含有编码甘油脱水酶的基因、编码 1,3-PD 氧化还原酶基因、编码维生素受体前体基因、编码维生素 B<sub>12</sub> 转运系统蛋白基因以及编码与 ATP 连接的维生素 B<sub>12</sub> 转运蛋白基因,发酵此重组菌能在最终产物中分离出 1,3-PD。Raynaud 等<sup>[11]</sup>报道了分离出一种新型菌种,命名为丁酸梭状芽孢杆菌 VPI1718 (*Clotridia butyricum*VPI1718),编码关键酶的基因为 *dhaB1*, *dhaB2* 和 *dhaT*。把此相关基因转化大肠杆菌构成重组菌没有维生素 B<sub>12</sub> 的培养基诱导表达时,能够产生 1,3-PD 并能检测出高

甘油脱水酶和 1,3-PD 氧化还原酶活力。证明此菌株中甘油脱水酶的活性不依赖于辅酶维生素 B<sub>12</sub>, 从而更方便 *dhaB* 基因导入各种基因工程菌来高效表达 DHAB。目前, 本课题组正在对该酶进行理性设计的研究, 期望能获得不依赖辅酶的 DHAB。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Streekstra H, Teixeira de Mattos MJ, Neijssel O-M, et al. Overflow metabolism during anaerobic growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC418 on glycerol and dihydroxyacetone in chemostat culture. *Arch. Microbiol.* 1987, 147:268 - 275
- [ 2 ] Barbirato F, Camarasa-Clares C, Bories A, et al. Description of the glycerol fermentation by a new 1,3 (propanediol producing microorganism: *Enterobacter agglomerans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1995, 43:786 - 796
- [ 3 ] Homann T, Tag C, Biebl H, et al. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains [ J ]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1990, 33:121 - 126.
- [ 4 ] Cameron D C, Altaras N E, Hoffman M L, et al. Metabolic engineering of propanediol pathways [ J ]. *Biotechnol. Progress*, 1998, 14:116 - 125.
- [ 5 ] Tobimatsu T, Azuma M, Matsubara H, et al. Cloning, sequencing, and high level expression of the genes encoding adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydrase of *Klebsiella pneumoniae* J. *Biol. Chem.* 1996, 271(37): 22352 - 22357
- [ 6 ] Joseph Sambrook, David W Russel, *Molecular Cloning* (Third Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [ 7 ] Taraya T, Ushio KFukui S, Hogenkamp H. Studies on the mechanism of the adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase reaction by the use of analogs of the coenzyme. *J. Biol. Chem.* 1977, 252:963 - 970
- [ 8 ] Tobimatsu T, Azuma M, Matsubara H, et al. Cloning, sequencing and high level expressing of the genes encoding adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydrase of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 1996, 271:22352 - 22357.
- [ 9 ] Diaz-Torres M, Dunin-Coleman N, Chase M, Trimbur D, Method for the production of 1,3-propanediol by recombinant organisms comprising genes for Vitamin B12 transport, US. Pat. No. 6136576, 1997 - 11 - 13
- [ 10 ] Bulthuis B, Whited G, Trimbur D, Gatenby A, Method for the production of 1,3-propanediol by recombinant organisms comprising genes for Vitamin B12 transport, US. Pat. No. 6432686, 2002 - 8 - 13
- [ 11 ] Raynaud C, Sarcabal P, Meynial-Salles I, Croux C, and Soucaille P. Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of *Clostridium butyricum*. *PNAS*. 2003, 100:5010 - 5015

## Cloning and expression of glycerol dehydratase gene from *Klebsiella pneumoniae* in *Escherichia coli*

ZHOU Weir-guang, WEI Yu-tuo, HUANG Kun, HUANG Ri-bo

(College of Life Science and Biotechnology, Guangxi University, Nanning 530005, China)

**Abstract** Genomic DNA of glycerol dehydratase (DHAB) was used as a template. A segment containing of glycerol dehydratase from *c*(ATCC49790) was obtained by PCR amplification and the pSE380 vector combined with the DHAB gene was transformed in JM109. The resulted recombinant *Escherichia coli* gave a high level expression of DHAB. Some factors were optimized for enzyme overproduction in this experiment. The optimization increased DHAB expression by 6.9-fold in compared to that of *K. pneumoniae* (168.69U/L). The enhanced expression of DHAB in recombinant *E. coli* reached up to 1164.14U/L under the induced condition of 1.0mM IPTG at 37 °C for 5 hours.

**Key words** glycerol dehydratase; *Klebsiella pneumoniae*; cloning and expression