

编码 1,3-丙二醇氧化还原酶基因的克隆和表达

迟乃玉^{1,4} 刘长江^{2*} 刘英昊³ 张庆芳¹ 郑学仿^{1,4}

(¹ 大连大学生物工程学院 大连 116622)(² 沈阳农业大学食品学院 沈阳 110161)

(³ 中国科学院微生物研究所 北京 100080)(⁴ 大连大学生命科学工作室 大连 116622)

摘 要 采用 PCR 法克隆了巴氏梭菌(*Clostridium pasteurianum*) CpN-86 菌株编码 1,3-丙二醇氧化还原酶基因(*dhaT* 基因),完成了 *dhaT* 基因测序、表达载体构建和在大肠杆菌中表达,分离和纯化了 *dhaT* 基因表达的重组蛋白。实验结果(1)PCR 法克隆的 *dhaT* 基因和肺炎克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae* 菌株 *dhaT* 基因的序列同源性为 82.9%(2)*dhaT* 基因表达蛋白的酶活为 108U/mg(3)*dhaT* 基因表达的蛋白分子量为 43kD(4)Western blot 确定了 *dhaT* 基因表达的蛋白和 CpN-86 菌株天然蛋白有相同的抗原反应。

关键词 1,3-丙二醇,1,3-丙二醇氧化还原酶,基因,克隆,表达

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2003)06-0717-05

1,3-丙二醇(1,3-propanediol,简称为 1,3-PD)是生产多聚纤维及制造多氨基甲酸乙酯及环状化合物的单体。利用 1,3-PD 生产的新型聚酯纤维具有优良的回弹性、染色性、抗污性和生物降解性等优良品质,在服装、工程塑料、地毯等领域应用潜力巨大,是目前合成纤维新产品开发的研究热点^[1,2]。由于化学合成法存在 4000 美元/吨的高成本、工艺条件苛刻、设备投资大和产生严重环境污染等问题,限制了 1,3-PD 在多聚纤维等领域应用的开发。为降低生产成本,避免环境污染等问题,微生物发酵法生产 1,3-PD 的研究成为一个热点^[3,4]。通常情况下,微生物发酵法生产 1,3-PD 是以甘油作为唯一碳源和能源,进行厌氧 1,3-丙二醇发酵。其中包括两步反应,由甘油脱水酶将甘油脱水生成 3-羟基丙酮醛(3-HPA),再由 1,3-PD 氧化还原酶将 3-HPA 还原为 1,3-PD,产生的 1,3-PD 是细胞代谢终产物,可在发酵液中高度聚集;在甘油歧化为 1,3-PD 的同时,还伴有另一条甘油代谢途径,即甘油脱氢酶将甘油转化为二羟丙酮(DHA),而后二羟丙酮激酶将 DHA 磷酸化为磷酸二羟丙酮(DHAP),此过程中产生的 NADH 供给甘油歧化为 1,3-PD 路径,形成的 DHAP 则进入糖酵解途径^[5-7]。由糖发酵生产 1,3-PD(二步法),需要甘油高产酵母菌将玉米糖转化为甘油,再由 1,3-PD 高产菌株将甘油转化为 1,3-PD。虽然生产成本要比化学合成法低很多(大约为化学合成法成本的 1/5),但从整个发酵过程来看,仍然存在工艺繁琐,生产成本高等问题。如能实现一步法生产 1,3-PD——即由糖直接经一种微生物发酵生产 1,3-PD,那将使 1,3-PD 生产成本大大降低。为此克隆 1,3-PD 氧化还原酶基因和甘油脱水酶基因^[8-10],构建同时表达该两基因的重组酵母,就有可能实现糖直接转化为 1,3-PD 产品的一步法生产^[11]。本文即报道编码 CpN-86 菌株 1,3-PD 氧化还原酶基因的克隆、测

基金项目 国家自然科学基金(30370042)

* 通讯作者。Tel 86-24-88421017;Fax 86-24-88417416;E-mail liuchangjiang@163.com

作者简介 迟乃玉(1965-)男,辽宁人,博士,副教授,主要研究微生物工程和酶工程。E-mail cny@dalianu.com

收稿日期 2003-01-17,修回日期 2003-09-08

序和表达的初步研究。

1 材料和方法

1.1 菌种、质粒和培养基

巴氏梭菌(*Clostridium pasteurianum*) CpN-86 菌种由沈阳农业大学食品学院食品生物技术专业诱变选育。*Escherichia coli* JM109(*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, Δ (*lac-proAB*) Δ F[*traD36*, *proAB*⁺, *lacI*^q, *lacZ* Δ M15]) pMD18-T 质粒、LA Taq DNA 聚合酶、Pyrobest Taq DNA 聚合酶等购于 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司。表达载体 pMAL-c2X 购自 New England Biolabs。质粒纯化试剂盒(Easy prepTM plasmid clean up)购于 Pharmacia。DNA 测序试剂盒(DNA sequencing Kit Bigdye Terminator Cycle sequencing Ready Reaction)购于 Perkin Elmer。大肠杆菌培养基为 LB, 含质粒的大肠杆菌保存于含氨苄青霉素(100 μ g/mL)的 LB 平板。

1.2 PCR 法克隆 *dhaT* 基因

根据肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*, K. pne)菌株 *dhaT* 基因序列,设计扩增 CpN-86*dhaT* 基因的一对引物, *dhaT* F 5'-CCCAAGCTTATGAGCTATCGTATGTTTGATTATCTG-3'(36nt), *dhaT* R 5'-CCGAATTCTCAGAATGCCTGGCGGAAAAT-3'(29nt), 在上游引物的 5'端设计了 HindⅢ 酶切位点, 下游引物的 5'端设计了 EcoRⅠ 酶切位点。用 TaKaRa 的 LA Taq, pyrobest Taq DNA 聚合酶试剂盒, 以 CpN-86 菌株基因组 DNA 为模板, 进行 PCR: 94℃ 1min, 98℃ 10s, 50℃ 45s, 72℃ 1min, 共计 30 个循环。纯化后的 DNA 片段与酶切 HindⅢ/EcoRⅠ 精制后的 pMD18-T 载体连接, 采用 PCR 方法并以 pMD18-T 载体上引物 RV-M 和 PCR 引物 *dhaT*_R 进行检验。

1.3 *dhaT* 基因表达载体构建及 *dhaT* 基因表达

根据 pMAL-c2X 载体特点, *dhaT* 基因亚克隆至 pMAL-c2X 构建表达载体时, 以 *dhaT*_F for pMAL(5'-ATGAGCTATCGTATGTTT...3') 和 *dhaT*_R(带 EcoRⅠ 酶切位点)为引物, PCR 克隆的 *dhaT* 基因片段 5'端为 ATG 开始的平末端, 3'端为带有 EcoRⅠ 酶切位点的粘性末端, 连到经酶切(XmnⅠ 和 EcoRⅠ)的 pMAL-c2X 载体时, 正好和 pMAL-c2X 的 *malE* 基因相连, *malE* 和 *dhaT* 基因就构成了融合基因, 这样保证 *dhaT* 基因片段和 *malE* 基因连接后, 构建 *dhaT* 基因融合表达载体表达时无移码现象, 将构建的表达载体电击转化 *E. coli* JM109, 28℃ 120 r/min 摇瓶培养 JM109 至 $OD_{650} \approx 0.5$ 时, 加 IPTG 终浓度达到 0.6 mmol/L, 诱导 *dhaT* 基因表达。*dhaT* 蛋白分离与纯化按 New England Biolabs pMAL-c2X 融合表达蛋白分离与纯化操作流程进行。

1.4 1,3-PD 氧化还原酶活测定

25℃, 1,3-PD 氧化还原酶将三羟基丙烯醛转化为 1,3-PD 时, 在 365nm 处测定起始 NADH 的消耗量, 酶活定义为每分钟 NADH 消耗微摩尔数。具体测定方法参考文献 [6, 11]。

1.5 SDS-PAGE

用 12% 聚丙烯酰胺凝胶, 150ng 样品变性上样, 其它按参考文献 [12] 进行。

1.6 抗体制备

将融合蛋白约 100 μ g 与弗氏完全佐剂等体积混合, 肌肉注射及皮下注射兔子 [第 15

天加倍剂量 ,直接肌肉注射 ;第 30 天以相同剂量再次加强免疫 ;第 37 天于耳脉取血获融合蛋白免疫血清。

1.7 Western blot

以辣根过氧化物酶为酶标的羊抗兔血清为第二抗体 ,具体测定方法参考文献 [12]。

2 结果和分析

2.1 PCR 产物测序

PCR 产物直接测序结果表明(图 1) ,编码 CpN-86 菌株 1,3-PD 氧化还原酶的 *dhaT* 基因全长为 1164 bp ,和 GenBank 登录的 *K. pneumoniae* 菌株的 *dhaT* 基因同源性的 82.9% ;而且均以 ATG 起始密码子开始和 TGA 终止密码子结束 ;且由 387 个氨基酸组成。

<i>K. pneumoniae</i>	1	ATGAGCTATC	GTATGTTTGA	TTATCTGGTG	CCAAACGTTA	ACTTTTTTGG	CCCCAACGCC	ATTTCCGTAG	70
CpN-86		ATGAGCTATC	GTATGTTTGA	TTATCTGGTG	CCAAATGTGA	ACTTTTTTGG	CCCGAATGCT	ATTTCCGTIG	
<i>K. pneumoniae</i>	71	TCGGCGAACG	CTGCCAGCTG	CTGGGCGGGA	AAAAAGCCCT	GCTGGTCACC	GACAAAGGCC	TGCGGGCAAT	140
CpN-86		TCGGCGAACG	CTGCAAACTG	TTGGGCGGTA	AAAAAGCCCT	GCTGGTGACT	GATAAAGGTC	TGCGAGCCAT	
<i>K. pneumoniae</i>	141	TAAAGATGGC	GCGGTTGATA	AAACCTTGCA	TTATCTGCGG	GAGGCCGGGA	TCGAGGTGGC	GATCTTTGAC	210
CpN-86		TAAAGAGGGC	GCGGTTGATA	AAACCTCGA	ACATCTGCGT	GAAGCGGTA	TTGACGTGGT	GGTGTTTGAC	
<i>K. pneumoniae</i>	211	GGGTCGAGC	CGAACCCGAA	AGACACCAAC	GTGCGCGACG	GCCTCGCCGT	GTTTCGCCGC	GAACAGTGGC	280
CpN-86		GGGTCGAGC	CAAACCCTA	AGACACCAAC	GTGCGCGACG	GCCTGGACGT	TTTTCGTAAA	GAGCAATGCG	
<i>K. pneumoniae</i>	281	ACATCATCGT	CACCGTGGGC	GCGCGCAGCC	CGCACGATTG	CGGCAAGGCG	ATCGGCATCG	CCGCCACCCA	350
CpN-86		ATATCATCGT	TACCGTGGGC	GGTGGTAGCC	CGCATGACTG	CGGTAAAGGC	ATCGGTATCG	CGGCGACGCA	
<i>K. pneumoniae</i>	351	TGAGGGCGAT	CTGTACCAAT	ATGCCGGAAT	CGAGACCCTG	ACCAACCCGC	TGCCGCCTAT	CGTCGCGGTC	420
CpN-86		CGAAGGGCGAT	CTCTATAGCT	ATGCCGGGAT	TGAACCCCTG	ACCAATCCGC	TGCCGCCGAT	CGTCGCGGTC	
<i>K. pneumoniae</i>	421	AATACCAACG	CCGGCACC GC	CAGCGAGGTC	ACCCGCCACT	GCGTCCTGAC	CAACACCGAA	ACCAAAGTGA	490
CpN-86		AATACCAACG	CCGGTACC GC	CAGCGAAGTC	ACCCGTCACT	GCGTCTGAC	CAATACCAAA	ACCAAAGTGA	
<i>K. pneumoniae</i>	491	AGTTTGTGAT	CGTCAGCTGG	CGCAACCTGC	CGTCGGTCTC	TATCAACGAT	CCAATGCTGA	TGATCGGTAA	560
CpN-86		AGTTTGTGAT	TGTCACTTGG	CGCAACCTGC	CGTCGGTTTC	CATTAAATGAC	CCTCTGCTGA	TGCTCGGCAA	
<i>K. pneumoniae</i>	561	ACCGGCCGCC	CTGACCGCGG	CGACCGGGAT	GGATGCCCTG	ACCCACGCCG	TAGAGGCCTA	TATCTCCAAA	630
CpN-86		ACCTGCGCCA	CTGACTGCGG	CAACAGGAAT	GGACGCCCTG	ACCCACGCCG	TTGAGGCCTA	TATTTCAAAA	
<i>K. pneumoniae</i>	631	GACGCTAACC	CGGTGACGGA	CGCCGCCGCC	ATGCAGGCGA	TCCGCCTCAT	CGCCCGCAAC	CTGCGCCAGG	700
CpN-86		GATGCCAACC	CGGTTACCGA	CGCCGCCGCT	ATGCAGGCAA	TTGCTCTGAT	CGCCCGCAAC	TTACGCCAGG	
<i>K. pneumoniae</i>	701	CCGTGGCCCT	CGGCAGCAAT	CTGCAGGCGC	GGGAAAACAT	GBCCTATGCT	TCTCTGCTGG	CCGGGATGGC	770
CpN-86		CCGTAGCACT	GGGCAGCAAC	CTGAAAGCTC	GCGAGAATAT	GGCCTATGCC	TCTTGTCTGG	CGGGTATGGC	
<i>K. pneumoniae</i>	771	TTTCAATAAC	GCCAACTCTG	GCTACGTGCA	CGCCATGGCG	CACCAGCTGG	GCGGCCTGTA	CGACATGCCG	840
CpN-86		CTTCAACAAC	GCCAACTTGG	GCTACGTICA	CGCGATGGCG	CATCAGCTTG	GCGGTCTGTA	CGACATGCCG	
<i>K. pneumoniae</i>	841	CACGGCGTGG	CCAACGCTGT	CCTGCTGCCG	CATGTGGCGC	GCTACAACCT	GATCGCCAAC	CCGGAGAAAT	910
CpN-86		CACGGCGTGG	CAAAATGCCGT	CCTGCTGCCG	CAGTGCGCGC	GCTATAACCT	GATCGCTAAT	CCGGAGAAAT	
<i>K. pneumoniae</i>	911	TCGCCGATAT	CGCTGAAC TG	ATGGGCGAAA	ATATCACCGG	ACTGTCCACT	CTGCAGCGCG	CGGAAAAAGC	980
CpN-86		TTGCCGACAT	CGCGGAGTTT	ATGGGTGAGA	ACACTGACGG	TCTGTCCACC	ATGGATGCTG	CCGAGCTGGC	

<i>K. pneu</i>	981	CATCGCGCT ATCACGCGTC TGTCGATGGA TATCGGTATT CCGCAGCATC TGC GCGATCT GGGGGTAAAA	1050
CpN-86		<u>GATT</u> <u>CGCGCC</u> <u>ATCGCTCGCC</u> TGTC <u>AGCCGA</u> TATCGGTATT CCGCAGCATC TGC GCGA <u>GCT</u> GGG <u>CGT</u> <u>CAAA</u>	
<i>K. pneu</i>	1051	GAGGCGGACT TCCCCTACAT GGGCGAGATG GCTCTAAAAG ACGGCAATGC GTTCTCGAAC CCGCGTAAAG	1120
CpN-86		<u>GAA</u> <u>GCCGAT</u> TCCC <u>GATAT</u> GGGCGAAATG GCGCT <u>GAAAG</u> ACGGCAATGC <u>CTTCTCGAAC</u> CCGCG <u>CAAA</u> G	
<i>K. pneu</i>	1121	GCAACGAGCA GGAGATTGCC GCGATTTTCC GCCAGGCATT CTGA	1164
CpN-86		<u>GG</u> <u>AACGAGAA</u> <u>AGAA</u> ATTGCC <u>GAG</u> ATTTTCC GCCAGGCATT CTGA	

图1 CpN-86 与 *K. pneu* 菌株 *dhaT* 基因比较

Fig.1 Comparison of *dhaT* gene in *K. pneu* and CpN-86

2.2 *dhaT* 基因表达载体构建和 *dhaT* 基因表达

将 pMAL-c2X 用 *Xmn* I 和 *Eco*R I 酶切后,再将调整后的 *dhaT* 基因片段(5'端起始为 ATG 3'端为 *Eco*R I)连到 pMAL-c2X 载体 *malE* 基因之后,即构建成融合基因表达载体 pMC26。IPTG 诱导 *dhaT* 基因表达结果表明(图 2-B),*dhaT* 基因和 *MalE* 基因构成的融合基因得到了表达,融合蛋白、*dhaT* 基因表达的重组蛋白分子量分别为 85kD、43kD,和我们预测的结果是一致的。

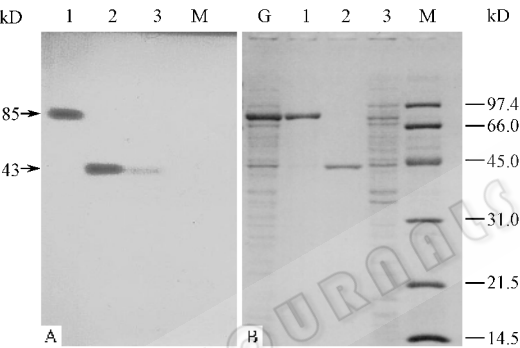


图2 CpN-86 *dhaT* 蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

Fig.2 SDS-PAGE and Western blot analysis of *dhaT* protein of CpN-86

A : Western blot ;B SDS-PAGE.

M. Protein marker ; G. Induced cell ;1. Purified fusion protein ;
2. Purified *dhaT* protein 3. CpN-86 cell native protein.

2.3 1-β-D 氧化还原酶活性测定

dhaT 基因表达的重组蛋白经分离、纯化,以三羟基丙烯醛底物转化为 1-β-D 时,在波长 365nm 处测定酶活为 108U/mg,说明已得到具有 1-β-D 氧化还原酶活性的表达产物。

2.4 Western blot

融合蛋白等样品经 SDS-PAGE 电泳转硝酸纤维素膜后,纤维素膜经酶联抗体生色反应,出现了特异性抗原、抗体结合酶促显色反应带——1、2、3 带(图 2-A),而且融合蛋白、*dhaT* 基因表达的重组蛋白和 CpN-86 菌株天然蛋白,都出现了相同的抗原显色反应,实验结果进一步证明了 PCR 法克隆编码 CpN-86 菌株 1-β-D 氧化还原酶的基因在大肠杆菌中得到了表达。

3 讨论

K. pneu 和 *C. but* 是微生物二步发酵法生产 1-β-D 研究最多的菌株,*K. pneu* 在分批培养中 1-β-D 最大产量是 50~60 g/L,在常规连续培养中,*C. but* 只能获得 *K. pneu* 菌株 1-β-D 最大产量(48.75 g/L)的一半,但由于 *K. pneu* 是病原菌而逐渐被淘汰,鉴于 *C. but* 菌株的安全性,在国外它是最具工业使用潜力的菌株^[4,5]。1-β-D 高产菌株 CpN-86 是 *Clostridium pasteurinum* 的突变株,其 1-β-D 生产能力(57.58 g/L)达到 *K. pneu* 菌株,且无致病性;CpN-86 菌株 1-β-D 生产能力比世界上最具应用潜力的 *C. but* 高了近一倍。

因此为了实现微生物一步发酵法生产 1,3-PD,需要克隆 CpN-86 *dhaT* 基因和 *dhaB* 基因并使其重组,并构建于一个表达载体中,进而构建一种重组酵母,就有可能利用这种重组酵母将玉米糖直接转化为 1,3-PD。

参 考 文 献

- [1] Biebl H. Glycerol fermentation to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*, measurement of product inhibition by use of a pH-auxostat. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1991 **35** :701 ~ 705.
- [2] Homann T, Tag C, Biebl H, *et al.* Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1990 **33** :121 ~ 126.
- [3] Biebl H, Marten S, Hippe H, *et al.* Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated clostridia. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992 **36** :592 ~ 597.
- [4] Boenigk R, Bowien S, Gottschalk G. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol in continuous cultures of *Citrobacter freundii*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1993 **38** :453 ~ 457.
- [5] Zeng A N, Ross A, Biebl H, *et al.* Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation. *Biotechnol Bioeng*, 1994 **44** :902 ~ 911.
- [6] Fischer R J, Helms J, Durre P. Cloning, sequencing, and molecular analysis of the *sol* operon of *Clostridium acetobutylicum*, a chromosomal locus involved in solventogenesis. *J Bacteriol*, 1993 **175** :6659 ~ 6669.
- [7] Forage R G, Lin E C C. *dha* system mediating aerobic and anaerobic dissimilation of glycerol in *Klebsiella pneumoniae* NCIB 418. *J Bacteriol*, 1982 **151** :591 ~ 599.
- [8] Goodlove P E, Cunningham P R, Parker J, *et al.* Cloning and sequence analysis of the fermentative alcohol-dehydrogenase-encoding gene of *Escherichia coli*. *Gene*, 1989 **85** :209 ~ 214.
- [9] Johnson E A, Lin E C C. *Klebsiella pneumoniae* 1,3-Propanediol : NAD⁺-oxidoreductase. *J Bacteriol*, 1987 **169** :2050 ~ 2054.
- [10] Conway T, Sewell G W, Osman Y A, *et al.* Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. *J Bacteriol*, 1987 **169** :2591 ~ 2597.
- [11] Fischer R J, Helms J, Durre P. Cloning, sequencing, and molecular analysis of the *sol* operon of *Clostridium acetobutylicum*, a chromosomal locus involved in solventogenesis. *J Bacteriol*, 1993 **175** :6659 ~ 6669.
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Cloning and Expressing of 1,3-propanediol Oxidoreductase-encoding Gene

Chi Naiyu^{1,4} Liu Changjiang^{2*} Liu Yinghao³ Zhang Qingfang¹ Zheng Xuefang^{1,4}

(¹ College of Bioengineering, Dalian University, Dalian 116622, China)

(² Work Room of Life Science, Dalian University, Dalian 116622, China)

(³ Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080, China)

(⁴ College of Food, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: Based on what mentioned above, the gene encoding 1,3-propanediol Oxidoreductase (*dhaT*) in *Clostridium pasteurianum* CpN-86 was cloned by using PCR method. The sequence, expressing vector construction and its expression of *dhaT* in *E. coli* were accomplished respectively. The recombination protein expressed by *dhaT* was also isolated and purified. The experimental results showed that: (1) The homogeneity of *dhaT* cloned by PCR and that in *klebsiella pneumoniae* strain was 82.9%; (2) The enzymatic activity of the protein expressed by cloned *dhaT* was 108 μM/mg; (3) The molecular weight of the protein was 43 kD; (4) The protein expressed by *dhaT* has the same antigenicity as the natural protein of CpN-86 through Western blotting.

Key words: 1,3-propanediol, 1,3-propanediol oxidoreductase, Gene, Clone, Expression

Foundation item: Chinese National Natural Science Foundation(30370042)

* Corresponding author. Tel: 86-24-88421017; Fax: 86-24-88417416; E-mail: liuchangjiang@163.com

Received date: 01-17-2003