

甘油脱氢酶基因在大肠杆菌中的密码子优化表达

唐龙盘¹, 余劲聪¹, 戴丹凤¹, 方柏山^{1,2*}

¹福建省高校工业生物技术重点实验室(华侨大学), 厦门 361021

²厦门大学化学化工学院化学工程与生物工程系, 厦门 361005

摘要:【目的】利用密码子优化技术,提高甘油脱氢酶基因 *gldA* 在大肠杆菌中的表达水平。【方法】针对 *gldA* 起始密码子下游区域,优先选择 AT 含量最高的同义密码子,从而在不改变氨基酸序列的前提下,提高该区域的 AT 含量。利用大引物 PCR 的方法对野生型 *gldA*-WT 进行定点突变,获得优化型基因 *gldA*-4,与 pET-32a(+)连接后,构建表达质粒 pET-*gldA*-4,转入 *E. coli* BL21(DE3),得到工程菌 *E. coli*-4。同时,设定包含 *gldA*-WT 的工程菌 *E. coli*-WT 作为对照,摇瓶发酵后,以甘油为底物检测比较表达产物的酶活力。【结果】*gldA*-4 相对 *gldA*-WT 而言,改变了第 2、5、6 位密码子中的 4 个碱基,AT 含量从 53.3% 提高到 80.0%。相应地,*E. coli*-4 的粗酶液的酶活力为 191.3 U/mL,比 *E. coli*-WT 的 48.3 U/mL 提高了 3 倍多。【结论】本优化方案简便、快捷,但可明显提高甘油脱氢酶的酶活力,有望成为改善目的基因异源表达水平的一种通用方法。

关键词: 甘油脱氢酶, AT 含量, 异源表达, 密码子优化, 大肠杆菌

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 04-0504-06

甘油脱氢酶 (glycerol dehydrogenase, GDH, EC 1.1.1.6) 是参与甘油代谢反应的一种氧化还原酶,主要存在于能够利用甘油作为碳源的微生物中,如克雷伯杆菌属 (*Klebsiella*)、柠檬菌属 (*Citrobacters*) 以及梭状芽孢杆菌属 (*Clostridia*) 等^[1]。其主要作用机理是在 NAD⁺ 的参与下,催化甘油转化为二羟基丙酮 (dihydroxyacetone, DHA)。该反应一方面可以分解甘油,再生 NADH,参与以废甘油为底物微生物发酵生产一些重要的化工原料的研究,如 1,3-丙二醇^[2]、1,2-丙二醇^[3] 和乙醇^[4] 等;另一方面,反应产物 DHA 也是一种重要的化学中间体,可以作为一些医药和农药的中间原料^[5]。因此,甘油脱氢酶的研究和开发越发受到人们关注。其早期研究主要集中

在分离纯化、酶学性质和发酵工艺等方面^[6-9]。近年来,有关构建工程菌异源表达甘油脱氢酶基因 *gldA* 的研究较多,但多是与其他氧化还原酶一起构建多酶偶联催化体系,来进行甘油的发酵生产研究^[10-12],而无有关提高甘油脱氢酶异源表达效率的探索。研究^[13-14]表明,编码序列的起始密码子下游区域称之为 Downstream Box (DB),是一种类似于 SD 序列的顺式作用元件,能够有效影响原核生物的翻译效率。优化 DB 中的腺嘌呤 (A) 和胸腺嘧啶 (T) 含量,能够提高目的基因的表达水平。应用 DB 中 AT 含量优化这一手段,来提高宿主细胞中甘油脱氢酶的产酶效率,目前国内外尚未有所报道。

本实验室^[15]利用基因工程的手段,从克雷伯杆

基金项目:国家自然科学基金(21076172,30770059);福建省高校产学研合作科技重大项目(2010H6023)

* 通信作者。Tel: +86-592-2185869; E-mail: fbs@xmu.edu.cn

作者简介:唐龙盘(1986-),硕士研究生,主要从事密码子优化方面研究。E-mail: tang3433@sina.com

收稿日期:2010-11-04;修回日期:2011-01-07

菌(*Klebsiella pneumoniae*)中扩增出甘油脱氢酶基因 *gldA*, 转化至大肠杆菌(*Escherichia coli*)中, 获得工程菌 *E. coli*-WT, 实现了 *gldA* 的有效表达。在此基础上, 本研究首次将密码子优化的策略应用于 *gldA* 的异源表达, 对 *gldA* 的 DB 进行 AT 含量的优化, 改变第 2、5、6 位密码子中的 4 个碱基, 再通过引入突变位点的大引物进行 PCR 获得目的基因 *gldA-4*, 构建工程菌 *E. coli-4*, 以期得到 *gldA* 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中的更高效表达, 为该酶以后的大规模生产制备奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒: *E. coli* DH5 α 由厦门大学生命科学学院彭宣宪教授惠赠; *E. coli* BL21 (DE3) 由我院林毅博士惠赠; pET-32a(+) 购自 Novagen. Inc; *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*gldA* 由同实验室张婷婷硕士构建; pMD18-T 购自大连宝生物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂和仪器: *ExTaq* DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、 T_4 连接酶、DNA marker、蛋白 marker 均购自大连宝生物技术有限公司; 提取质粒, 凝胶回收的试剂盒均购自广州东盛生物科技有限公司。主要仪器有 PCR 仪(Thermo 公司)、凝胶成像系统(上海天能公司)、紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司)、超声细胞破碎仪(宁波新芝生物技术股份有限公司)。

1.2 目的基因 *gldA-4* 的获取

根据氨基酸的遗传密码和 *gldA* 基因的序列信息, 确定优化方案。根据对应于同一个氨基酸的多个同义密码子中, 优先选择 AT 含量最高的密码子的原则, 改变了第 2、5、6 位密码子中的 4 个碱基, 命名为 *gldA-4*。*gldA* 的第 1-6 位密码子碱基序列: 5'-ATGCGCACTTATTTGAGG-3'; *gldA-4* 的第 1-6 位密码子碱基序列: 5'-ATGAGAAGCTTATTTAAGA-3'(下划线部分是改变了的碱基)。根据 *gldA-4* 的序列信息, 利用软件 primer premier 5 设计引物, 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。Primer 1: 5'-CGTCCGATCCTACATGAGAAGCTTATTTAAGAGTGAAAGGAAT-3'(划线部分是引入的 *Bam*H I 内切酶的酶切位点); Primer 2: 5'-AATGCTCGAGCGAATTAACGCGCCAGCCAC-3'(划线部分是引入的 *Xho* I 内切酶的酶切位点)。以 primer1 和 primer2 为引

物, 本实验室已构建的 pET-*gldA* 质粒为模板, 进行 PCR 进行突变扩增, 以得到 *gldA-4*。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 63 $^{\circ}$ C 1.5 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 进行 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 15 min。

1.3 克隆载体 pMD-*gldA-4* 的构建

将 *gldA-4* 克隆至 pMD-18T 载体上, 转化感受态的 *E. coli* DH5 α 细胞, 经过蓝白斑筛选, 挑取阳性克隆子白色菌落扩增培养。提取质粒, *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.4 表达载体 pET-*gldA-4* 的构建

将双酶切后胶回收的 *gldA-4* 与同样处理过的 pET-32a(+), 在 T_4 连接酶的作用下进行连接, 即得到表达载体 pET-*gldA-4*, 转化感受态的 *E. coli* DH5 α 细胞。小量提取质粒, 酶切鉴定正确后, 转化至表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3), 得到工程菌, 命名为 *E. coli-4*。将 *E. coli-4* 送至南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

1.5 工程菌的表达

将 *E. coli-4* 过夜培养活化后, 接种至含 75 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中。2 h 后, 在培养物中加入诱导剂乳糖至终浓度 2 mg/mL, 继续培养。5 h 后, 离心收集菌体。再按每 1 g 细胞沉淀悬于 5 mL、pH 7.4 结合缓冲液的比例处理细胞, 得到菌悬液。

1.6 GDH 的酶活力测定

将菌悬液冰浴中对细胞进行超声波破碎。破碎后, 4 $^{\circ}$ C 离心以去除不溶性细胞碎片。上清液即为粗酶液。稀释一定倍数测定其中甘油脱氢酶的酶活力。参考 Ahrens K^[9] 的方法并适当修改^[10], 甘油脱氢酶的活性测定反应体系包括: 30 mmol/L (NH₄)₂SO₄、0.2 mol/L 甘油、2 mmol/L NAD⁺、1 μ mol/L Fe(NH₄)₂(SO₄)₂、0.1 mol/LK₂CO₃ 缓冲溶液(pH 12.0), 反应液的总体积为 3 mL。在温度保持在 45 $^{\circ}$ C 的情况下, 迅速加入适量待测粗酶液启动反应, 开始测定。用紫外分光光度计在 340 nm 波长下测定吸光度, 连续测 1 min, 每隔 6 s 读取数据。根据式(1)计算酶活力($\epsilon_{340\text{nmNADH}} = 6.3 \text{ L/m NADH/cm}$)。甘油脱氢酶的酶活力定义为: 在上述条件下, 每分钟还原 1 μ mol 甘油的酶量为 1 个 U。

$$EA = \frac{VT \times \Delta A / \Delta t}{\epsilon \times V_s} \quad (1)$$

其中, E_A 表示酶活力, 单位为 U/mL; V_T 表示反

应液总体积, V_s 表示抽提液样品体积, V_T 和 V_s 单位均为 mL; $\Delta A/\Delta t$ 表示每分钟吸光度变化值。

1.7 蛋白质质量分数的测定

以牛血清蛋白为标准蛋白, 采用 Bradford 法^[16] 测定粗酶液的蛋白质含量。

1.8 聚丙烯酰胺凝胶电泳

对 *E. coli* BL21(DE3)、*E. coli*-WT 和 *E. coli*-4 三者的粗酶液, 采用 10% 分离胶不连续垂直平板电泳, 考马斯亮蓝 R-250 染色, 观察结果并拍照。

1.9 产酶速率的比较

相同培养发酵条件下, 对 *E. coli*-WT 和 *E. coli*-4 的产酶速率进行比较。加入诱导剂后的 1.5 h、3 h、4 h、5 h、6 h 分别取样, 测其粗酶液的酶活力。统计数据, 绘制坐标图。

2 结果

2.1 目的基因 *gldA-4* 的获取和构建载体的酶切鉴定

通过拉长引物引入 4 个突变位点扩增的 *gldA-4* 基因长为 1133 bp, PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 目的条带在 1000 - 2000 bp 之间, 与预期相符。经过双酶切后的克隆载体 pMD-*gldA-4* 和表达载体 pET-*gldA-4* 分别进行琼脂糖凝胶电泳。电泳结果所显示的条带数量和位置均正确无误。同时, 测序结果表明目的片段的密码子改造成功, 构建的优化型基因 *gldA-4* 的表达载体正确。

2.2 的蛋白活性的测定和 SDS-PAGE 结果

对 *E. coli*-WT 和 *E. coli*-4 进行摇瓶培养, 乳糖诱导后的粗酶液分别进行酶活力和蛋白含量的测定, 算出比活力, 结果如表 1 所示。

表 1 *gldA* 与 *gldA-4* 的表达产物酶活力与比活力的比较

Table 1 Comparison of the expression product of *E. coli*-WT and *E. coli*-4

Type	Enzyme activity / (U/mL)	Protein concentration / (mg/mL)	Specific activity / (U/mg)
<i>E. coli</i> -WT	48.3	2.21	21.9
<i>E. coli</i> -4	191.3	2.971	67.4

甘油脱氢酶的分子量约为 34 kDa, 加上所含的融合蛋白分子量约 20.4 kDa, 则表达的融合蛋白的分子量理论上应该为 54 kDa。如图 1 所示, SDS-PAGE 蛋白电泳结果表明, 相比于 *gldA*, *gldA-4* 表达

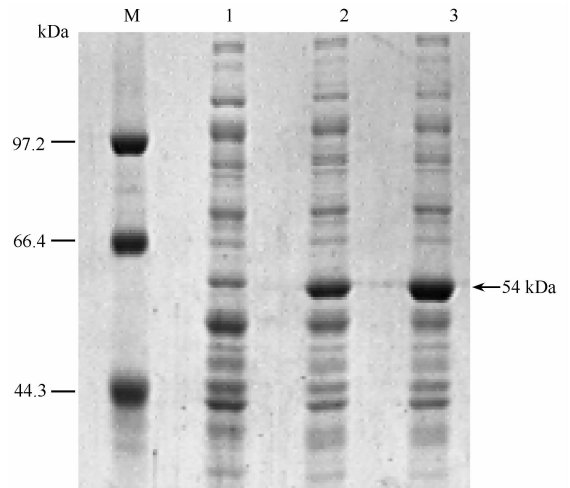


图 1 粗酶液的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the crude extracts. M: protein marker; 1: product of *E. coli* BL21(DE3); 2: product of *E. coli*-WT with *gldA*; 3: product of *E. coli*-4.

的目的条带更浓更粗, 即表达量明显提高。

2.3 产酶速率的对比

在 *E. coli*-WT 和 *E. coli*-4 的培养物中, 加入诱导剂后的 1.5 h、3 h、4 h、5 h 和 6 h 分别进行酶活力的测定, 结果比较如图 2。在诱导反应开始的 1.5 h 内, 两者的酶活力几乎都不存在, 这说明, 两者都是在加入诱导剂 1.5 h 后开始表达, 表达开始的时间应该是一样的。同时开始表达后, 短短的 1.5 h 之内, *gldA-4* 表达的甘油脱氢酶的酶活力就比 *gldA* 在诱导 6 个小时后的酶活力高。细胞单位时间内产酶量的增加, 或许是因为优化后的 *gldA-4* 翻译效率的提高。

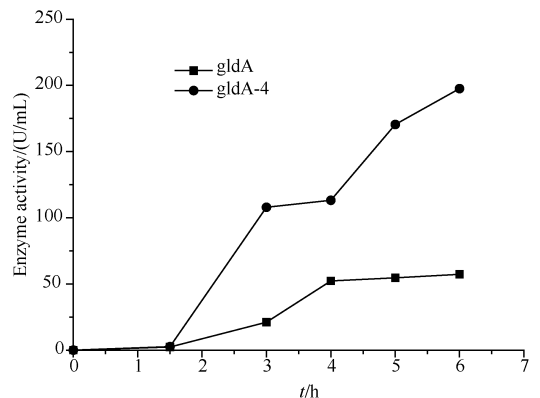


图 2 *E. coli*-WT 和 *E. coli*-4 产酶速率的比较

Fig. 2 Comparison of the speed of producing the GDH of *E. coli*-WT and *E. coli*-4.

3 讨论

影响外源基因表达水平的因素很多,除了旁侧的调控元件外,基因自身的编码序列中也含有与该基因表达水平有关的关键信息。密码子的选择是影响表达的参数之一。这其中,包括起始密码子下游区域(DB)的序列。例如,Stenström 等^[17]发现,在 *E. coli* 中,高表达基因的第 2 位密码子中会普遍含有腺嘌呤(A)。在 *E. coli* 中,编码序列的 DB 中第 1 至第 6 位密码子与核糖体的 16S rRNA 的 1469 - 1483 位的核苷酸区域高度互补^[13]。富含 AT 的 DB 使 mRNA 与 16S rRNA 的亲合力更强,从而与核糖体结合,形成翻译起始复合物的效率更高。这样,就在翻译的起始阶段提高了翻译效率,使得目的基因高水平表达^[18]。

在不改变氨基酸序列的情况下,本研究对甘油脱氢酶基因 *gldA* 的第 2 至 6 位密码子的 AT 含量进行了优化,通过大引物 PCR 法对野生型 *gldA* 进行定点突变,获得了优化型基因 *gldA-4*,实现其异源高效表达。经过乳糖诱导后摇瓶发酵,测得的酶活力为 191.3 U/mL。同等条件下,本实验室已构建 *E. coli*-WT 诱导表达后,粗酶液酶活力为 48.3 U/mL^[15]。相比之下,酶活力提高了 3 倍多。1995 年, Daniel^[7] 等人报道的 *gldA* 在 *E. coli* ECL707 中表达的粗酶液的酶比活力为 6.67 U/mg; 2006 年, Yamada-Onodera^[19] 等人在 *E. coli* HB101 中表达的甘油脱氢酶在纯化前比活为 0.55 U/mg。而本次研究 *gldA-4* 的表达产物粗酶液的比活力为 67.4 U/mg,比前两者的表达水平分别高出 10 倍和 100 多倍。本次研究结果表明,对 *gldA* 的 DB 中 AT 含量进行优化,能够有效提高甘油脱氢酶在 *E. coli* 中的表达量。Nishikubo^[20] 等人对来源于 *Thermus thermophilus* 的 Nudix 水解酶的基因 *ndx3* 的第 3 至 6 位密码子的 AT 含量与表达水平的研究,发现 AT 含量从 8.3% 上升至 41.7% 后, *ndx3* 在 *E. coli* 中的表达水平能够提高近 10 倍。本次研究, DB 中的 AT 含量从 53.3% 上升到了 80.0%, 同样能够有效提高目的基因的表达水平,进一步说明,高 AT 含量的

DB 对目的基因的表达有着重要影响。

另外,通过 *E. coli*-WT 和 *E. coli-4* 的产酶速率进行的比较分析。或许,是因为 DB 的 AT 含量优化,提高了翻译效率,表观现象就是同等时间内,粗酶液酶活力的提高。产酶速率的提高,也可以适当的缩短发酵时间,节约成本,这对未来工业上规模化生产甘油脱氢酶来说,有着潜在的经济意义。

参考文献

- [1] Zhao L, Zheng Y, Ma X, Wei DZ. Effects of over-expression of glycerol dehydrogenase and 1, 3-propanediol oxidoreductase on bioconversion of glycerol into 1, 3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2009, 32(3): 313-320.
- [2] Menzel K, Ahrens K, Zeng AP, Deckwer W. Kinetic, dynamic and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic Continuous Culture; IV. Enzymes and fluxes of pyruvate metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, 60(5): 617-626.
- [3] Lee W, Dasilva NA. Application of sequential integration for metabolic engineering of 1, 2-propanediol production in yeast. *Metabolic Engineering*, 2006, 8(1): 58-65.
- [4] Shams Yazdani S, Gonzalez R. Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products. *Metabolic Engineering*, 2008, 10(6): 340-351.
- [5] Kawashima K, Itoh H, Chgate J. Nonenzymatic browning reactions of dihydroxyacetone with amino acids or their esters. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1980, 44(7): 1595-1599.
- [6] 陈宏文, 吴雅红, 吴振华, 方柏山, 胡宗定. 克雷伯杆菌甘油脱氢酶的分离纯化及性质. 无锡轻工大学学报 (*Journal of Wuxi University of Light Industry*), 2005, 24(1): 1-5.
- [7] Daniel R, Stuert K, Gottschalk G. Biochemical and molecular characterization of the oxidative branch of glycerol utilization by *Citrobacter freundii*. *Journal of bacteriology*, 1995, 177(15): 4392-4401.

- [8] Ruzheinikov SN, Burke J, Sedelnikova S, Baker PJ, Taylor R, Bullough PA, Muir NM, Gore MG, Rice DW. Glycerol Dehydrogenase; Structure, Specificity, and Mechanism of a Family III Polyol Dehydrogenase. *Structure*, 2001, 9 (9):789-802.
- [9] Malaoui H, Marczak R. Separation and characterization of the 1, 3-propanediol and glycerol dehydrogenase activities from *Clostridium butyricum* E5 wild-type and mutant D. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 90 (6):1006-1014.
- [10] Katrlík J, Mastihuba V, Voštiar I, Šefčovičová J, Štefuca V, Gemeiner P. Amperometric biosensors based on two different enzyme systems and their use for glycerol determination in samples from biotechnological fermentation process. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 516 (1):11-18.
- [11] Gonzalez R, Murarka A, Dharmadi Y, Yazdani SS. A new model for the anaerobic fermentation of glycerol in enteric bacteria; trunk and auxiliary pathways in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 2008, 10(8):234-245.
- [12] Zhao L, Zheng Y, Ma X, Zhang J, Wei GD, Wei DZ. Over-expression of glycerol dehydrogenase and 1, 3-propanediol oxidoreductase in *Klebsiella pneumoniae* and their effects on conversion of glycerol into 1, 3-propanediol in resting cell system. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2009, 84(4):626-632.
- [13] Sprengart ML, Fuchs E, Porter AG. . The downstream box: an efficient and independent translation initiation signal in *E. coli*. *The EMBO Journal*. 1996, 15 (3): 665-674.
- [14] Etchegaray JP, Inouye M. Translational enhancement by an element downstream of the initiation codon in *Escherichia coli*. *The Journal of Biologic Chemistry*, 1999, 274(15):10079-10085.
- [15] 张婷婷, 方柏山, 王耿, 王飞飞. 克雷伯杆菌甘油脱氢酶基因的克隆表达与纯化. *生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)*, 2008, 24(3):495-499.
- [16] 汪家政, 汪明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000:42-47.
- [17] Gonzalez EI, Isaksson LA. A codon window in mRNA downstream of the initiation codon where NGG codons give strongly reduced gene expression in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(17):5198-5205.
- [18] Qing G, Xia B, Inouye M. Enhancement of translation initiation by A/T-rich sequences downstream of the initiation codon in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2003, 6(3-4):133-144.
- [19] Yamada-Onodera K, Nakajima A, Tani Y. Purification, characterization, and gene cloning of glycerol dehydrogenase from *Hansenula ofunaensis*, and its expression for production of optically active diol. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, 102 (6): 545-551.
- [20] Nishikubo T, Nakagawa N, Kuramitsu S, Masui R. Improved heterologous gene expression in *Escherichia coli* by optimization of the AT-content of codons immediately downstream of the initiation codon. *Journal of Biotechnology*, 2005, 120(4):341-346.

Expression of glycerol dehydrogenase gene in *Escherichia coli* by codon optimization

Longpan Tang¹, Jincong Yu¹, Danfeng Dai¹, Baishan Fang^{1,2*}

¹Key Laboratory for Industrial Biotechnology of Fujian Higher Education (Huaqiao University), Xiamen 361021, China

²Department of Chemical and Biochemical Engineering, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract: [**Objective**] To improve expression level of glycerol dehydrogenase gene *gldA* in *Escherichia coli* by means of codon optimization. [**Methods**] For immediately downstream region of initiation codon in *gldA*, we designed optimized sequence by choosing higher AT-content synonymous, in order that this region's AT-content was increased without changing the corresponding amino acids. Then we had wild gene *gldA*-WT site-directed mutagenesis depending on mega-primers PCR, so that physically optimized gene *gldA*-4 was acquired. We cloned *gldA*-4 into pET-32a(+) to construct expression plasmid pET-*gldA*-4, which was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) for gaining engineering bacteria *E. coli*-4, by contrast engineering bacteria involved *gldA*-WT named *E. coli*-WT. After *E. coli*-4 and *E. coli*-WT were fermented in shake flasks, we measured enzyme activities of expression products with glycerol as substrate. [**Results**] Four *gldA*-4's bases in the second, fifth and sixth codon were different with *gldA*-WT, so AT-content of the optimized gene was up to 80.0% higher than the wild gene's 53.3%. Furthermore, enzyme activity of *E. coli*-4's crude extract was 191.3 U/mL more three times than *E. coli*-WT's 48.3 U/mL. [**Conclusion**] This optimization scheme was quick and easy, but indeed increased dehydrogenase's activity. It possible becomes a universal method to improve heterogenous expression level of target genes.

Keywords: glycerol dehydrogenase (GDH), AT-content, heterologous expression, codon optimization, *Escherichia coli*

(本文责编:王晋芳)