

## 异源表达【FeFe】氢酶的基因工程大肠杆菌的构建

于瑞嵩<sup>1,2</sup>, 宗文明<sup>2,3</sup>, 周志华<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>上海市农业遗传育种重点实验室,上海市农业科学院畜牧兽医研究所,上海 201106

<sup>2</sup>中国科学院合成生物学重点实验室,中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所,上海 200032

<sup>3</sup>安徽农业大学工学院,合肥 230036

**摘要:**【目的】探讨一种构建异源表达【FeFe】氢酶的重组大肠杆菌的新方法。【方法】通过同源重组,依次将来源于丙酮丁醇梭菌中促进【FeFe】氢酶成熟的3个辅助基因 *hydE*、*hydF* 和 *hydG* 分别整合到大肠杆菌 BW 2513-10(缺失氢酶基因)的丙酮酸甲酸脱氢酶(*ybiW*)、乳酸脱氢酶(*ldh*)和乙醇脱氢酶(*adhE*)编码基因位点上。在此基础上进一步将含有来源于丁酸梭菌的氢酶基因的表达载体转化上述重组菌,并对转化子的氢酶活性进行分析。【结果】PCR和RT-PCR的检测结果表明,3个辅助基因都整合到BW 2513-10基因组相应位点并能够正常转录;丁酸梭菌【FeFe】氢酶的活性表达表明,组成型表达3个辅助因子能够促进【FeFe】氢酶的成熟,并获得了异源表达【FeFe】氢酶的重组大肠杆菌菌株 BW23113-15。【结论】利用同源重组整合至染色体特定部位的方法可以实现【FeFe】氢酶辅助基因的组成型表达,简化了【FeFe】氢酶在大肠杆菌中异源表达的程序。该系统也将为不同氢酶的活性筛选及在大肠杆菌中构建新的产氢代谢途径奠定基础。

**关键词:**【FeFe】氢酶,异源表达,重组大肠杆菌

中图分类号:Q814 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2011)11-1468-08

石油价格的持续上涨、化石能源储量的不断减少和大量化石能源使用带来的环境恶化以及温室效应,推动了科学家对可再生能源的研究<sup>[1]</sup>。在常温、常压等温和条件下进行的生物制氢,因可以利用废弃物为原料而被认为是理想的可再生能源生产技术之一。虽然对生物产氢进行了广泛的研究,特别是近年来,利用基因工程手段在提高氢气产率方面取得了一些新的进展<sup>[2-3]</sup>,然而某些最有潜力的产氢微生物,例如某些梭菌,仍缺乏有效的遗传操作技术,每摩尔底物的理论氢气产率仍有提高空间。

进一步提高微生物产氢能力的另一途径是,在本身产氢能力并不高但遗传操作体系成熟的模式微

生物中构建全新的产氢代谢途径,以实现较高的氢气产率。大肠杆菌,以其详细的遗传背景知识和基因组信息、成熟的遗传操作系统、对氧气不敏感及具有一定的产氢能力,是一个构建新产氢代谢途径的理想宿主。在厌氧发酵产氢微生物中,【FeFe】氢酶催化质子接受电子产生氢气,是产氢代谢途径中的关键步骤,其活性直接影响微生物的产氢效率,因此,对其异源表达受到广泛关注<sup>[4]</sup>。然而,在大肠杆菌中仅表达异源【FeFe】氢酶仍然不够,例如,梭菌【FeFe】氢酶 *HydA* 的活性,严格依赖于多个成熟因子(*HydF*、*HydE*和*HydG*)的共表达<sup>[5]</sup>。因此,在大肠杆菌中构建一条新的产氢代谢途径,需要同时

基金项目:国家自然科学基金(31070098;30770271);中国科学院方向性项目(KSCX2-EW-G-43-1)

\* 通信作者。Tel: +86-21-54924050; Fax: +86-21-54924049; E-mail: zhouzihua@sippe.ac.cn

作者简介:于瑞嵩(1974-),男,山东泰安人,副研究员,博士研究生,主要从事分子微生物学研究。E-mail: yursong@163.com

收稿日期:2011-06-20;修回日期:2011-07-21

表达大量的同源和异源基因。

最近,Novagen 公司开发出一系列可以同时表达多达 8 个基因的二元载体系统。King 等<sup>[6]</sup>利用这些商业化载体在大肠杆菌 BL 21 (DE3) 中合成了重组的【FeFe】氢酶。然而,利用这些新的基因工程工具能够共同表达的基因的数目仍然是有限的。为了克服需要利用多个质粒的困难和建立一个引入合成产氢途径的克隆方法,Kalim 等<sup>[7]</sup>将 *Clostridium acetobutylicum* 的各个 *hyd* 基因构建成为一个操纵子 (pCDOPEGA)。尽管几个基因可以在一个操纵子上表达,但随着插入基因数量的增多,质粒将变得越来越大。因此,能够表达的基因的数目仍受制于表达载体的容量。而且为了得到稳定高效产氢的商业化菌株,需要将一个或多个此类操纵子整合到宿主的基因组。为了实现此目的,需要确定基因组上理想的整合位点以保证整合于此的基因能够在厌氧条件下组成型表达,而不需要额外添加昂贵的诱导剂。

在本研究中,我们尝试将来源于 *C. acetobutylicum* 的【FeFe】氢酶的 3 个成熟辅助基因 *hydE*、*hydF* 和 *hydG* 整合至缺失氢酶基因的大肠杆菌 BW 25113-40 的基因组中,并以来源于丁酸梭菌的【FeFe】氢酶基因验证了所构建的重组大肠杆菌具有【FeFe】氢酶成熟功能,以期得到简化的【FeFe】氢酶异源表达宿主菌。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 引物、质粒、菌株及培养条件:**实验中使用的菌株和质粒列于表 1,引物列于表 2 中,除诱导氢酶表达外,大肠杆菌的培养均采为 LB 培养基。根据需要添加抗生素 (mg/L): 氨苄青霉素 (*Amp*) 50,卡那霉素 (*Km*) 50,氯霉素 (*Cm*) 25,壮观霉素 (*Sm*) 50。

表 1 试验中用到的菌种和质粒

Table 1 Strains, plasmids used in this study

Strains	Relevant characteristic	Reference
<i>E. coli</i> TOP 10	F <sup>-</sup> , $\Delta lacX74$ , $\Delta(ara-leu)$ , <i>rpsL</i> (StrR), $\lambda^{-}$	Invitrogen
<i>E. coli</i> BW 25113-40	<i>E. coli</i> BW2511 $\DeltahyaB \DeltahybC \DeltahycE$ 3, defective in large subunit of hydrogenase 1, hydrogenase 2, and hydrogenase 3	[3]
<i>E. coli</i> BW 25113-41	<i>E. coli</i> BW25113 $\DeltahyaB \DeltahybC \DeltahycE$ , with <i>hydG</i> of <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 intergrated on chromosome	This study
<i>E. coli</i> BW 25113-42	<i>E. coli</i> BW25113 $\DeltahyaB \DeltahybC \DeltahycE$ , with <i>hydF</i> and <i>hydG</i> of <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 intergrated on chromosome	This study
<i>E. coli</i> BW 25113-43	<i>E. coli</i> BW25113 $\DeltahyaB \DeltahybC \DeltahycE$ , with <i>hydE</i> , <i>hydF</i> and <i>hydG</i> of <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 intergrated on chromosome	This study
<i>E. coli</i> BW 25113-44	<i>E. coli</i> BW 25113-40 transformed with plasmid pQE30-But-hydA	
<i>E. coli</i> BW 25113-45	<i>E. coli</i> BW 25113-43 transformed with plasmid pQE30-But-hydA	
plasmids		
pMD18-T(or simple)	T-clone vector	TAKARA
pQE30	Expression vector	QIAGEN
pKD46	Gene disruptions assistant plasmid	CGSC
pKD3	Chloramphenicol resistance gene template plasmid	CGSC
pKD4	Kanamycin resistance gene template plasmid	CGSC
pIJ778	Spectinomycin resistance gene template plasmid	John Innes Centre

**1.1.2 主要试剂:**限制性核酸内切酶、T-载体、T4 连接酶等购于宝生物工程(大连)有限公司;高保真 DNA 聚合酶(KOD<sup>plus</sup>)、反转录试剂盒购自上海鼎国有限公司;质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒、DNA 提取试剂盒购自上海百赛生物科技有限公司;引物合成及测序由上海生物工程技

术服务有限公司完成。

### 1.2 3 个辅助基因整合至大肠杆菌 BW25113-40 的基因组

*Sm*、*Cm* 和 *Km* 抗性基因分别克隆自模板质粒 pIJ778、pKD3 和 pKD4。丙酮丁醇梭菌【FeFe】氢酶成熟辅助基因 *hydE* (CAC1631)、*hydF* (CAC1651) 和

表 2 试验中用到的引物  
Table 2 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')
Hyd E-F/ Hyd E-R	GGATCCATGGATAATATAATAAAGTTAATTA/GAGCTCTTAAACCAATAGATTCTTTGTAGCTT
Cm-F/Cm-R	GAGCTCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC/CCCGGGATGGGAATTAGCCATGGTCC
HydG-F/HydG-R	GGATCCATGTATAATGTTAAATCTAAAGTTG/GAGCTCTTAGAATCTAAAATCTCTTTGTCCC
Km-F/Km-R	GAGCTCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC/CCCGGGATGGGAATTAGCCATGGTCC
HydF-F/HydF-R	GGATCCATGAATGAACCTAACCAACACCC/GAGCTCTTAGTTCCTACTCGATTGATTAA
Sm-F/Sm-R	GGTACCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC/AAGCTTATTCCGGGATCCGTCGACC
Sm-hydF-F	ATGAAACTCGCCGTTTATAGCACAAAAACAGTACGACAAGAAGTACCTGCAGAAATTCATTAAGAGGAGAA
Sm-hydF-R	TTAAACCAGTTCGTTCCGGCAGGTTTCGCCTTTTTCCAGATTGCTTAAGTATTCCGGGATCCGTCGACC
Km-hydG-F	ATGGCTGTTACTAATGTCCGCTGAACCTAACGCACTCGTAGAGCGTGTAAAGAATTCATTAAGAGGAGAA
Km-hydG-R	TTAAGCGGATTTTTTCGCTTTTTTCTCAGCTTTAGCCGGAGCAGCTTCTTATGGAATTAGCCATGGTCC
Cm-hydE-F	ATGACCACACTGAAACTGGACACGCTCAGCGACCCGATTAAGCGCACAAGAATTCATTAAGAGGAGAA
Cm-hydE-R	TTACAGCATATGTTCACTACGGGCGATGATATCGTCTGAGCGTCTGGAGATGGGAATTAGCCATGGTCC
SF-F/SF-R	ATGAAACTCGCCGTTTATAG/TTAAACCAGTTCGTTCCGGC
KG-F/KG-R	ATGGCTGTTACTAATGTCCG/TTAAGCGGATTTTTTCGCTT
CE-F/CE-R	ATGACCACACTGAAACTGGA/TTACAGCATATGTTCACTAC
Ldh-F/Ldh-R	GATGATGACGCTGAACCG/TCCATACCCAACGAACCA
Ybiw-F/Ybiw-R	GTATCGTTTGGTCTGATGGA/TGAGGTTAGGCTGAGTGGA
AdhE-F/AdhE-R	TCAAACCTCGCACCTTCCC/GTTCGTACATAACCCACAT
HydE-F/HydE-R	GCCGATAGAGTACGTGAA/CAACTGTTGATACCCATAA
HydF-F/HydF-R	CACCACGAGCAAGTTCTA/ACTTCCTCAGCAGCAAAC
HydG-F/HydG-R	GGTCTCTCCAGCCTCTA/GTTTGTCTCTTTATCTTT
But-hydA-F/But-hydA-R	GGATCCATGATAAATTAATTATGAT/GGTACCTTATTTTTCAAACCTGCGGATGGC

*hydG* (CAC1356) 克隆自丙酮丁醇梭菌基因组。所有基因均测序验证。将 *Cm* 和 *hydE* 片段插入到 pQE30 载体构建成 pQE30-*hydE*-*Cm*; 将 *Sm* 和 *hydF* 片段插入到 pQE30 载体构建成 pQE30-*hydF*-*Sm*; 将 *Km* 和 *hydG* 片段分别插入到 pQE30 载体构建成 pQE30-*hydG*-*Km*。

为了使辅助基因 *hydE*、*hydF* 和 *hydG* 在厌氧条件下可以组成型表达,我们选择了丙酮酸甲酸脱氢酶 (*ybiW*)、乳酸脱氢酶 (*ldh*) 和乙醇脱氢酶 (*adhE*) 的编码基因分别为这 3 个辅助基因的同源重组位点。为了保证整合的辅助基因可以利用其对应的同源重组基因的原有启动子和上游调控元件,我们在扩增 3 个辅助基因的引物的 5' 端分别添加了基因 *ybiW*、*ldh* 和 *adhE* 编码序列首末端 50 bp 的序列 (表 2 中下划线部分),形成了引物 *Cm*-*hydE*-F/R、*Sm*-*hydF*-F/R 和 *Km*-*hydG*-F/R。分别以 *Cm*-*hydE*-F/R、*Sm*-*hydF*-F/R 和 *Km*-*hydG*-F/R 为引物,以 pQE30-*hydE*-*Cm*、pQE30-*hydF*-*Sm* 和 pQE30-*hydG*-*Km* 为模板,PCR 扩增 *hydE*-*Cm*、*hydF*-*Sm* 和 *hydG*-*Km* 并克隆至 pMD18-T 载体,并测序验证。

大肠杆菌的同源重组参照 Datsenko 方法执行<sup>[8]</sup>。*hydG*-*Km* 片段从 pMD18-T-*hydG*-*Km* 载体切

下,电转化至 BW 25113-10 大肠杆菌感受态,PCR 鉴定卡那霉素抗性克隆,其中一个克隆命名为 BW 25113-11。在此基础上,利用相同的方法将 *hydF*-*Sm* 片段转化 BW 25113-11 感受态,获得了命名为 BW 25113-12 的阳性克隆;*hydE*-*Cm* 片段进一步转化 BW 25113-12 感受态,获得命名为 BW 25113-13 的阳性克隆。

### 1.3 pQE30-*hydA* 表达载体的构建

根据 *C. butyricum* DSM 10702 的氢酶序列 (ABR 25256.1) 设计引物 *But*-*hydA*-F/R,以实验室分离到的一株丁酸梭菌的基因组为模板,PCR 扩增了丁酸梭菌氢酶基因,并克隆至 pMD18-T simple 载体,测序验证后将其克隆至 pQE30 表达载体,得到 pQE30-*But*-*hydA*。将 pQE30-*But*-*hydA* 分别转化 *E. coli* BW25113-10 和 *E. coli* BW25113-13 得到重组菌株 *E. coli* BW25113-14 和 *E. coli* BW25113-15。

### 1.4 RNA 提取及反转录 PCR (RT-PCR) 验证基因表达

取 1 mL 在含 5 g/L 葡萄糖的 LB 培养基中厌氧生长至对数生长后期的出发菌株 BW 25113-10 和重组菌株 BW 25113-13 的菌液用于提取细胞总 RNA。

细胞总 RNA 提取采用 Trizol 裂解法,并用 RNaseasy mini kit 纯化<sup>[9]</sup>。用 ReverTra Ace® 将纯化的 RNA 反转录成 cDNA,以此 cDNA 为模板,以基因特异性引物进行 PCR,分析目标基因的表达活性。

### 1.5 【FeFe】氢酶的诱导表达

从平板中挑取单克隆接种于 LB 液体培养基中,37 °C 振荡培养过夜作为厌氧培养的种子,将此种子接种至装有 5 mL 含 5 g/L 的葡萄糖的 LB 液体培养基的厌氧管中,加入 IPTG 至 0.5 mmol/L,30 °C 静止培养 16 h 诱导氢酶的表达。厌氧操作台收集菌体测定氢酶活性。

### 1.6 氢酶活性定性测定

【FeFe】氢酶活性测定参照 King 等的方法<sup>[6]</sup>,以菌体代替菌液。

**放氢活性:**在厌氧操作台中向 8 mL 小血清瓶中加入以 1.8 mL 磷酸缓冲液充分悬浮由 1 mL 菌液所得的菌体,加入 100 μL 100 mmol/L 的甲级紫精和 100 μL 400 mmol/L 连二亚硫酸钠,混匀后以丁基橡胶塞塞紧瓶口,抽充高纯氮气 2 轮,以去除血清瓶顶部气体中的氢气。37 °C 培养箱中静止 1 h,以气相色谱 GC 9700 测定顶部气体中的氢气含量。

**吸氢活性:**在厌氧操作台中向 8 mL 小血清瓶中加入以 1.9 mL 磷酸缓冲液充分悬浮由 1 mL 菌液所得的菌体,加入 100 μL 100 mmol/L 的甲级紫精,混匀后以丁基橡胶塞塞紧瓶口,抽充氢气 3 轮。37 °C 培养箱中静止 30 min,观察各测定瓶的颜色变化。

## 2 结果

### 2.1 3 个辅助基因整合至大肠杆菌 BW25113-40 基因组

分别以 KG-F/R、SF-F/R 和 CE-F/R 为引物 PCR 验证挑选的五株 BW 25113-43 克隆(图 1)。通过菌液 PCR 分析,5 个克隆以 CE-F/R 为引物 PCR 产物的长度为 2257 bp,与阳性对照的长度相同,而以出发菌株菌液为模板的 PCR 产物为 2436 bp,稍大于重组型。相似地,以 KG-F/R 和 SF-F/R 为引物的 PCR 片段的长度分别为 3083 bp 和 2822 bp,都与它们对应的以质粒为模板的阳性对照的 PCR 产物的长度相同,而它们对应的出发菌株的片段分别为 2676 bp 和 990 bp。PCR 产物的电泳图谱表明 3 个辅助基因 *hydE*、*hydF* 和 *hydG* 都正确插入到大肠杆

菌 BW 25113-43 的 *ybiW*、*ldh* 和 *adhE* 位点。

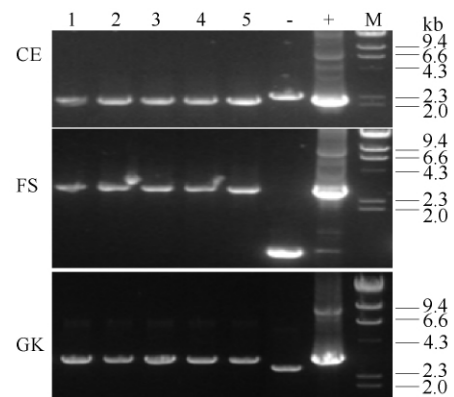


图 1 5 个重组克隆的 PCR 验证

Fig. 1 PCR confirmation of 5 recombinant clones. CE. PCR products with primers CE-F/R; FS. PCR products with primers SF-F/R; GK. PCR products with primers KG-F/R; M.  $\lambda$  Hind III DNA marker; +. Positive control with plasmid pMD18-T-hydE-Cm, pMD18-T-hydF-Sm, and pMD18-T-hydG-Km as template for CE, FS and GK respectively; -. Negative control with BW 25113-40 as template; 1-5. Using 5 clones of BW25113-43 strain as template.

### 2.2 RT-PCR 验证 3 个辅助基因 *hydE*、*hydF* 和 *hydG* 在 BW 25113-43 中的转录活性

我们首先分析了在厌氧条件下出发菌株 BW 25113-40 中 3 个辅助基因插入位置基因 *ybiW*、*ldh* 和 *adhE* 的表达活性(图 2-A)。虽然 3 个基因的表达活性不同,RT-PCR 都扩增出 *ybiW*、*ldh* 和 *adhE* 基因对应大小的 304、438 和 451 bp 的特异性条带,这表明 3 个基因 *ybiW*、*ldh* 和 *adhE* 在厌氧条件都具有转录活性。因而,可以将 3 个位点作为辅助基因的插入位点。同出发菌株 BW 25113-40 相似,重组菌株 BW 25113-43 的 RT-PCR 结果表明(图 2-B),可以扩增出 *hydE*、*hydF* 和 *hydG* 对应的 198、239 和 176 bp 的特异性条带,表明在重组菌株中 3 个辅助基因在厌氧条件下都具有转录活性,而且具有与它们插入位置基因相似的转录活性。

### 2.3 重组菌的生长特性

图 3 显示了出发菌株 BW 25113-40 和重组菌株 BW 25113-43 在含 5 g/L 葡萄糖的 LB 液体培养基中的厌氧和好氧生长情况。在好氧条件下,整个生长过程中重组菌株 BW 25113-43 生长速度比出发菌株稍慢,但两者的生长特性相似。接种后迅速进入对数生长期,出发菌株和重组菌株分别在第 7.5 h 和 8.5 h 小时进入稳定期,然后菌体密度缓慢下降。

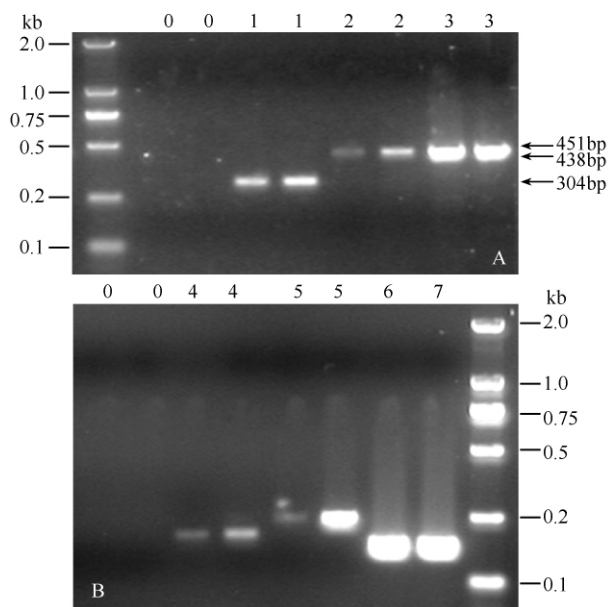


图2 RT-PCR 鉴定出发菌株插入位置基因(A)及其重组菌中3个辅助基因(B)的表达活性

Fig.2 Verification of the transcription activities of the genes to be interrupted in BW25113-40 (A) and 3 accessory genes of [FeFe]-hydrogenase in BW25113-43 (B). 0. Negative control (RNA sample); 1. *ybiW*; 2. *ldh*; 3. *adhE*; 4. *hydE*; 5. *hydF*; 6. *hydG*.

然而,在厌氧条件下,两株菌的生长速度和最终菌体密度都大大降低,二者的生长特性也显示出明显的差异,菌体密度分别在第7.5 h和22.5 h达到最大, $OD_{600}$ 分别为0.64和0.35。与出发菌株相比,重组菌株生长更加缓慢,最终菌体密度也只有出发菌株的50%左右,表明3个辅助基因的插入对重组菌株的生长产生了不利影响。

#### 2.4 丁酸梭菌【FeFe】氢酶表达载体的构建

以实验室分离到的一株产氢效率较高的丁酸梭菌的基因组为模板,通过PCR扩增得到1.7 kb左右单一条带(图4-A)。将其克隆至pMD18-T载体,酶切验证4个克隆皆为阳性克隆(图4-B)。序列分析表明,得到的氢酶核苷酸序列与丁酸梭菌FBR1株的【FeFe】氢酶的核苷酸序列相似性最高(99%),1725个碱基中仅在第1612位存在一个碱基差异。而与之氨基酸序列相似性最高的是来自丁酸梭菌5521株的【FeFe】氢酶,相似性达99%,仅在538位有一个氨基酸的替代(缬氨酸替代为异亮氨酸),表明得到一个丁酸梭菌【FeFe】氢酶基因。随后将其插入到pQE30表达载体的BamH I/Kpn I位点,用BamH I/Kpn I双酶切结果(图4-C)表明得到正确

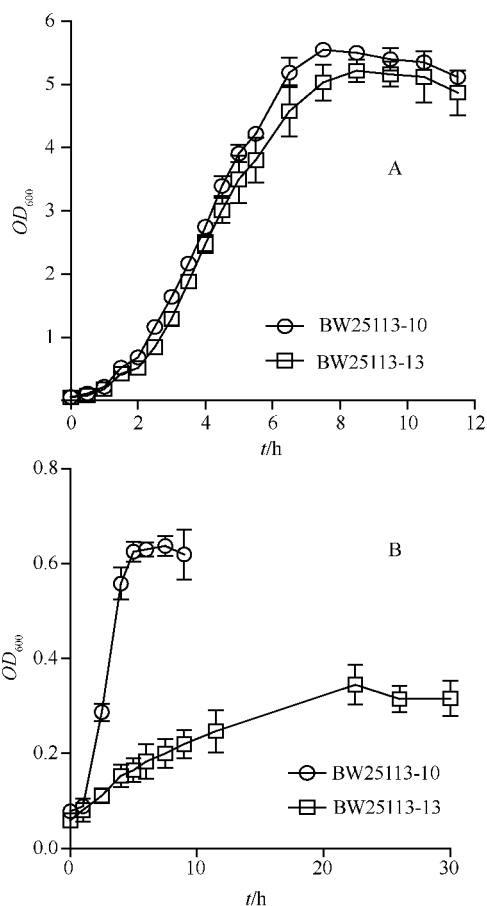


图3 BW25113-40和BW25113-43的好氧(A)与厌氧(B)生长曲线

Fig.3 Aerobic (A) and anaerobic (B) growth curves of strain BW25113-40 and strain BW25113-43.

的表达载体pQE30-But-hydA。

#### 2.5 丁酸梭菌【FeFe】氢酶基因在大肠杆菌BW25113-43中的活性表达

重组菌株BW25113-45的反应瓶的顶部气体中检测到明显的氢气峰,表明丁酸梭菌的氢酶基因*hydA*在构建的重组菌中得到活性表达,具有放氢活性。缓冲液对照、出发菌株BW25113-40、重组菌株BW25113-43和于BW25113-43中转化空质粒pQE30的重组菌株的反应瓶的顶部都检测不到氢气峰(图5-A),表明它们没有产氢活性。同样,菌株BW25113-44的反应瓶的顶部气体中检测不到氢气峰,表明*hydA*的活性表达需要辅助基因*hydE*、*hydF*和*hydG*的共表达。

重组菌株BW25113-45的吸氢活性分析结果表明(图5-B),在所构建的重组大肠杆菌中异源表达的丁酸梭菌【FeFe】氢酶具有吸氢活性(颜色变为深

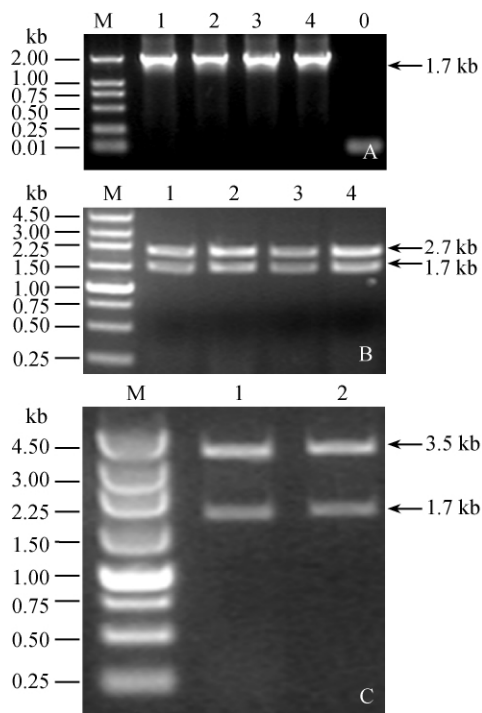


图4 丁酸梭菌【FeFe】氢酶表达载体的构建

Fig. 4 Construction of expression vector pQE30-But-hydA. A: PCR product of But-hydA; 0. Negative control; 1-4. Four samples. B: pMD18-T-But-hydA digested by *Bam*H I and *Kpn* I; 1-4. Plasmids from four clones. C: pQE30-But-hydA digested by *Bam*H I and *Kpn* I; 1-2. Plasmids from two clones.

紫色), 而缓冲液对照和空载体对照没有变色, 表明异源表达的丁酸梭菌氢酶催化了甲级紫精颜色的变化。

### 3 讨论

利用代谢工程改造微生物使之产生具有高附加值的产物或利用合成生物学的手段构建全新的代谢途径<sup>[10]</sup>, 往往需要同时表达多个基因。同样, 要构建一株比目前存在的野生型菌株更具优势的基因工程产氢菌株, 也需要引入具有合适底物特异性的重组氢酶、氧化还原酶和电子受体/供体对, 并尝试对宿主本身的代谢流进行调整, 使代谢流更多地流向产氢途径<sup>[11]</sup>。要实现上述过程, 需要将相关的基因构建成新的操纵子并整合至染色体的适当位置, 因为, 这种策略将减少对质粒和抗生素标记数量的需求, 实现多基因共同转化与表达。同时, 外源基因的组成型表达也避免了添加昂贵的外源诱导剂, 如 IPTG 等。

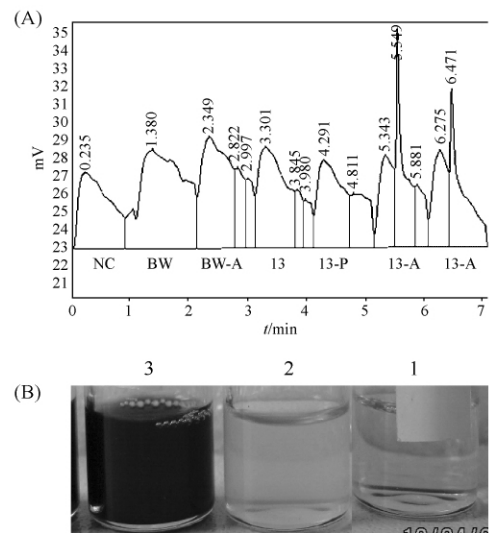


图5 【FeFe】氢酶活性测定

Fig. 5 [FeFe]-hydrogenase activity assay. A: hydrogen evolution activity; NC. Negative control; BW. BW 25113-40; BW-A, BW 25113-44; 13. BW 25113-43; 13-P. BW 25113-43 with plasmid pQE30; 13-A. BW 25113-45; B: hydrogen uptake activity; 1. Negative control; 2. BW 25113-43 with plasmid pQE30; 3. BW 25113-45.

本研究将丙酮丁醇梭菌的【FeFe】氢酶成熟的辅助基因 *hydE*、*hydF* 和 *hydG*, 分别整合至大肠杆菌 BW 25113-40 基因组中的丙酮酸甲酸脱氢酶 (*ybiW*)、乳酸脱氢酶 (*ldh*) 和乙醇脱氢酶 (*adhE*) 3 个位点上。重组菌株 BW 25113-45 的吸氢和放氢活性的分析结果都表明, 来自丁酸梭菌的【FeFe】氢酶不仅可以正常表达, 而且具有【FeFe】氢酶的催化活性。这些结果说明了 3 个辅助基因可以在重组大肠杆菌 BW 25113-43 中组成型表达, 并具有活化【FeFe】氢酶的功能。在重组大肠杆菌 BW 25113-43 中异源表达不同来源的【FeFe】氢酶, 有望从中筛选到产氢效率更高的重组大肠杆菌。

目前对于氢酶基因的筛选, 主要还是基于氢酶序列的同源性设计探针或 PCR 引物, 从基因组文库或元基因组文库找相应的同源序列。相对于序列筛选, 功能筛选将更有希望获得高活性、新型氢酶的编码基因。根据氢酶可以利用氢气将无色的氧化型甲级紫精还原紫色的还原型甲基紫精的原理, 有学者建立了筛选绿藻和根瘤菌等产氢微生物突变体的筛选系统<sup>[12-14]</sup>, 但是目前还没有将它们改造为其他外源氢酶基因的功能筛选宿主; 而最近建立的基于体外翻译系统和单分子 PCR 技术的【FeFe】氢酶功能筛选方法, 需要特殊的仪器、成本高且操作复

杂<sup>[15]</sup>。目前,缺乏简便、高效、高通量的氢酶表达克隆的功能筛选系统依然是困扰新型氢酶发掘和氢酶蛋白质工程的关键因素<sup>[15-16]</sup>。通过与上述显色方法相结合,本研究构建的重组大肠杆菌 BW 25113-13 系统,也为从环境中筛选不同氢酶提供了筛选模型。例如,只要将通过序列筛选从元基因组文库中获得的【FeFe】氢酶基因插入表达载体,一步转化至大肠杆菌 BW 25113-13 中,就可以通过活性分析进一步确认待检测氢酶基因的功能及其表达活性。

为了保证 3 个辅助基因 *hydE*、*hydF* 和 *hydG* 可以在厌氧条件下正常表达,我们选择了 3 个厌氧发酵相关的基因作为氢酶辅助基因的同源重组位点,即丙酮酸甲酸脱氢酶基因 (*ybiW*)、乳酸脱氢酶基因 (*ldh*) 和乙醇脱氢酶基因 (*adhE*)。氢酶辅助基因的插入导致 *ybiW*、*ldh* 和 *adhE* 失活,从而在厌氧条件下,减弱或阻断丙酮酸向乙酸、乳酸和乙醇的代谢流<sup>[17-18]</sup>。由于 *E. coli* 需要在葡萄糖转化为乙酸、乙醇、乳酸、甲酸和少量的琥珀酸的过程中获得能量<sup>[19-20]</sup>,因而 *ybiW*、*ldhA* 和 *adhE* 基因的失活会在一定程度上影响菌株在厌氧条件下能量供给,从而影响到菌株的生长。以上解释了同其出发菌株相比 *E. coli* BW 25113-13 在厌氧条件下生长速度大大降低的原因(图 3-B)。今后的研究中,有必要尝试采用不同的同源重组位点,或者将 3 个辅助基因串联并整合至 *E. coli* 基因组上,在不影响菌体生长的条件下实现【FeFe】氢酶成熟的 3 个辅助基因的组成型表达。当然,也可以尝试采用代谢进化的方法提高重组 *E. coli* BW 25113-13 的生长特性。以上这些方法,将有助于进一步改良 *E. coli* BW 25113-13 重组系统。

致谢 大肠杆菌 BW 25113-10 由 Texas A&M 大学的 Thomas. Wood 教授馈赠。

## 参考文献

- [1] Das D. Advances in biohydrogen production processes: An approach towards commercialization. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2009, 34 (17): 7349-7357.
- [2] Hallenbeck PC, Ghosh D, Skonieczny MT. Yargeau V. Microbiological and engineering aspects of biohydrogen production. *Indian Journal of Microbiology*, 2009, 49 (1): 48-59.
- [3] Maeda T, Sanchez-Torres V, Wood TK. Enhanced hydrogen production from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 77(4): 879-890.
- [4] English CM, Eckert C, Brown K, Seibert M, King PW. Recombinant and in vitro expression systems for hydrogenases: new frontiers in basic and applied studies for biological and synthetic H<sub>2</sub> production. *Dalton Transactions*, 2009, (45): 9970-9978.
- [5] Posewitz MC, King PW, Smolinski SL, Zhang LP, Seibert M, Ghirardi ML. Discovery of two novel radical S-adenosylmethionine proteins required for the assembly of an active [Fe] hydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(24): 25711-25720.
- [6] King PW, Posewitz MC, Ghirardi ML, Seibert M. Functional studies of [FeFe] hydrogenase maturation in an *Escherichia coli* biosynthetic system. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(6): 2163-2172.
- [7] Akhtar MK, Jones PR. Engineering of a synthetic *hydF*-*hydE*-*hydG*-*hydA* operon for biohydrogen production. *Analytical Biochemistry*, 2008, 373(1): 170-172.
- [8] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [9] Li XF, Liu T, Wu YQ, Zhao GP, Zhou ZH. Derepressive effect of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> on hydrogen production by deleting the *glnA1* gene in *Rhodobacter sphaeroides*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 106(4): 564-72.
- [10] Wilkinson B, Micklefield J. Mining and engineering natural-product biosynthetic pathways. *Nature Chemical Biology*, 2007, 3(7): 379-86.
- [11] Zhang YH. Renewable carbohydrates are a potential high-density hydrogen carrier. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, 35(19): 10334-10342.
- [12] Ruhle T, Hemschemeier A, Melis A, Happe T. A novel screening protocol for the isolation of hydrogen producing *Chlamydomonas reinhardtii* strains. *BMC Plant Biology*, 2008, 8: 107.
- [13] Seibert M, Flynn T, Benson D, Tracy E, Ghirardi M. Development of selection and screening procedures for rapid identification of H<sub>2</sub>-producing algal mutants with increased O<sub>2</sub> tolerance. *Biohydrogen*, 1998: 227-234, 552.
- [14] Tichy HV, Lotz W. Screening Method for the Detection of Uptake Hydrogenase Activity of Rhizobium-

- Leguminosarum Bacteroids. *FEMS Microbiology Letters*, 1985, 27(1): 107-109.
- [15] Stapleton JA, Swartz JR. A Cell-Free Microtiter Plate Screen for Improved [FeFe] Hydrogenases. *PLoS ONE*, 2010, 5(5).
- [16] Nagy LE, Meuser JE, Plummer S, Seibert M, Ghirardi ML, King PW, Ahmann D, Posewitz MC. Application of gene-shuffling for the rapid generation of novel [FeFe]-hydrogenase libraries. *Biotechnology Letters*, 2007, 29(3): 421-430.
- [17] Nnyepi MR, Peng Y, Broderick JB. Inactivation of *E. coli* pyruvate formate-lyase: role of AdhE and small molecules. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007, 459(1): 1-9.
- [18] Hasona A, Kim Y, Healy FG, Ingram LO, Shanmugam KT. Pyruvate formate lyase and acetate kinase are essential for anaerobic growth of *Escherichia coli* on xylose. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(22): 7593-600.
- [19] Clark DP. The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews*, 1989, 63: 223-234.
- [20] Diaz-Ricci JC, Hitzmann B, Rinas U, Bailey JE. Comparative Studies of Glucose Catabolism by *Escherichia coli* Grown in a Complex Medium under Aerobic and Anaerobic Conditions. *Biotechnology Progress*, 1990, 6: 326-332.

## Engineering of *Escherichia coli* for convenient expression of [FeFe]-hydrogenase

Ruisong Yu<sup>1,2</sup>, Wenming Zong<sup>2,3</sup>, Zhihua Zhou<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

<sup>2</sup>Key Laboratory of Synthetic Biology, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

<sup>3</sup>College of Engineering, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

**Abstract:** [Objective] A new method used to heterologously express [FeFe]-hydrogenase in *Escherichia coli* was investigated in our present study. [Methods] By homologous recombination, three assistant genes (*hydE*, *hydF* and *hydG*) for hydrogenase were integrated into the chromosome of *E. coli* BW 25113-10, in which all hydrogenase genes were inactivated. A hydrogenase structural gene *hydA* from *Clostridium butyricum* was used to test the hydrogenase maturation ability of the recombined *E. coli*. BW 25113-13 [Results] The corrected integration of the three assistant genes was confirmed by PCR, and RT-PCR results indicated that the three accessory genes were transcribed in the recombinant. The active expression of *hydA* indicated that the constitutively expressed accessory proteins could assist the maturation of the [FeFe]-hydrogenases. [Conclusions] A simplified [FeFe]-hydrogenase expression recombinant *E. coli* BW25113-13 was constructed. It would lay foundations for the functional screening of [FeFe]-hydrogenases and the construction of novel hydrogen producing pathways in *E. coli*.

**Keywords:** [FeFe]-hydrogenase, recombinant *Escherichia coli*, heterologous expression

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31070098; 30770271) and by the Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (KSCX2-EW-G-13-1)

\* Corresponding author. Tel: +86-21-54924050; Fax: +86-21-54924049; E-mail: zhouzhihua@sippe.ac.cn

Received: 20 June 2011/Revised: 21 July 2011