

假坚强芽胞杆菌中乙醇降解相关酶的克隆、表达及酶学特性

鞠建松^{1#}, 马宁^{1#}, 赵冉冉¹, 刘景伟³, 徐书景^{2*}, 赵宝华^{1*}

河北师范大学,¹生命科学学院,²旅游学院,石家庄 050024

³邢台医学高等专科学校,邢台 054000

摘要:【目的】研究假坚强芽胞杆菌 OF4 中乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶的酶学特性。【方法】通过引物设计,采用 PCR 技术从嗜碱芽胞杆菌 OF4 的基因组 DNA 中扩增获得乙醇脱氢酶 (*adh*) 基因和乙醛脱氢酶 (*aldh*) 基因,构建表达载体,通过异源原核表达, Ni-NTA 柱层析纯化酶蛋白,分析其酶学特性。【结果】乙醛脱氢酶的最适反应温度为 35℃,最适反应 pH 值为 8.0,酶蛋白的活力为 979.6 U/mg,其稳定性在 25℃ 和 35℃ 下比 45℃ 稍好;尽管由于乙醇脱氢酶的表达量低而未能纯化获得酶蛋白,但通过双基因共表达及乙醇耐受性实验发现乙醇脱氢酶也具备较高的催化活性。【结论】成功地从假坚强芽胞杆菌 OF4 中克隆获得了乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶基因,二者共同作用能够较大提高宿主对乙醇的耐受性。

关键词:假坚强芽胞杆菌,乙醛脱氢酶,乙醇脱氢酶,乙醇耐受性,共表达

中图分类号:Q814 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2013)04-0363-09

乙醇脱氢酶 [Alcohol dehydrogenase (ADH), EC 1.1.1.1] 是乙醇代谢的重要限速酶之一,通常以 NAD⁺, NADP⁺ 或 PQQ 为辅酶的含锌金属酶,具有广泛的底物特异性,是许多有机体中的主要短链醇代谢的关键酶,能够可逆催化氧化短链醇、芳香醇等为相应的羧基化合物;乙醛脱氢酶 [Aldehyde dehydrogenase (ALDH), EC. 1.2.1.3] 是生物体内用于降解乙醛的重要酶类,以 NAD(P)⁺ 为辅酶的含锌类酶,催化包括乙醇在内的某些以及或二级醇、醛和酮的脱氢反应。乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶参与催化乙醇的分解代谢,乙醇通过 ADH 氧化成为乙醛,乙醛通过 ALDH 氧化成为乙酸,乙酸进入三羧

酸循环最终氧化成二氧化碳和水^[1]。乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶的代谢活性直接影响生物体内乙醇的代谢,从而对生物体的生理状态产生直接影响。在人和哺乳动物体内,乙醇脱氢酶与乙醛脱氢酶构成了乙醇脱氢酶系,参与体内乙醇代谢,将摄入的乙醇快速分解,减少乙醇对神经系统的危害^[2],避免乙醛的致癌作用^[3],减小饮酒对身体的危害。

ADH 和 ALDH 广泛存在于微生物、植物和动物体内^[1],然而目前有关 ADH 和 ALDH 的研究大都来自人类、动物或酵母等真菌,原核生物中相关酶蛋白的研究报道还较少。嗜碱假坚强芽胞杆菌 (*Alkaliphilic Bacillus pseudofirmus*) OF4 是严格需氧

基金项目:河北省自然科学基金(C2011205045);河北省科技支撑项目(10205521D);河北省留学回国人员资助项目(20100705);河北省高等学校科学技术研究青年基金项目(20111102);河北师范大学博士启动基金项目(L2009B13)

* 通信作者。Tel: +86-311-80787573; E-mail: jpsyokei@163.com, zhaobaohua86178@sohu.com

作者简介:[#]同等贡献者。鞠建松(1970-),男,江苏靖江人,博士,教授,主要从事微生物酶学的研究, E-mail: jujiansong@126.com; 马宁(1986-),女,河北石家庄人,硕士研究生,主要从事生物制药学的研究, E-mail: 554735818@qq.com

收稿日期:2012-11-07;修回日期:2012-12-21

型、产孢子、革兰氏阳性、运动型杆状细菌,其最适生长温度是 30℃,最适生长 pH 值为 10.5^[4],该菌株的全基因组序列中存在 7 个乙醇脱氢酶编码基因和 10 个乙醛脱氢酶编码基因,这株嗜碱菌为什么存在这么多乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶基因,这些基因是否真正具有催化功能,这些问题引起我们极大的兴趣。本研究从假坚强芽胞杆菌 OF4 中分别克隆获得 1 个乙醇脱氢酶基因和乙醛脱氢酶基因,基因长 1197bp 和 1359bp,分别编码 399aa 和 453aa,通过表达载体构建,蛋白表达、优化,表征酶学特性。

1 材料和方法

1.1 菌株、载体和试剂

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH12S 用于基因克隆,大肠杆菌 BL21 (DE3) 用于蛋白表达,假坚强芽胞杆菌 OF4 由中科院微生物所马延和研究员惠赠;表达载体 pET-22b(+) 购自 Novagen (Germany),TA 克隆载体 pMD-18T 购自大连宝生物工程公司。

Taq DNA polymerase, *ExTaq* DNA polymerase, dNTP, T4 DNA ligase 和限制内切酶等购自大连宝生物工程公司;DNA 凝胶回收和质粒提取试剂盒购自 Omega 公司;NADH 购自 Sigma 公司(美国),其他试剂均为分析纯。希夫试剂参考 Conway 等发表的文献配制^[5]。

1.2 实验所用引物

根据 NCBI 公布的假坚强芽胞杆菌 OF4 中乙醇脱氢酶基因 (Accession no. YP_003426466) 和乙醛脱氢酶基因 (Accession no. YP_003427049) 的核苷酸序列设计引物(表 1),表中以下划线、斜体和灰色背景表示的字母为限制内切酶 *Nco*I, *Xho*I 和 *Nde*I 的识别位点;通用引物 Rv-M 和 M13-47 用于目的基因检测。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

表 1. 本实验所用引物

Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequence (5'→3')	Description
Adh-F01	<u>GCCATGGATGCGTATATGCTATTC</u>	<i>adh</i> cloning
Adh-R01	<u>GCTCGAGCTCTTTAATTAATGATA</u>	<i>adh</i> cloning
Aldh-F01	<u>G</u> <u>CATATG</u> TTTACGCTTTACGAG	<i>aldh</i> cloning
Aldh-R01	<u>GCTCGAGATTAATAATTTACGCAG</u>	<i>aldh</i> cloning
Rv-M	GAGCGGATAACAATTTACACACAGG	Universal primer ^[6]
M13-47	CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC	Universal primer ^[6]

The underlined, italic and grey background stands for restriction enzyme recognition sequences of *Nco*I, *Xho*I and *Nde*I, respectively.

1.3 目的基因的克隆和表达载体构建

以假坚强芽胞杆菌 OF4 的基因组 DNA 为模板,分别以 Adh-F01 和 Adh-R01, Aldh-F01 和 Aldh-R01 为引物对进行梯度 PCR 筛选最适退火温度,反应条件为:94℃ 4 min;94℃ 45 s, 50 ± 10℃ 1 min, 72℃ 2 min, 25 个循环;72℃ 10 min。PCR 产物由 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测并确定最适退火温度。在最适退火温度下 PCR 扩增目的 DNA。

扩增所得 DNA 片段由 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离、纯化,与 TA 克隆载体 pMD-18T 连接,构建 pMD-Adh 和 pMD-Aldh 质粒。对测序正确的质粒分别用限制性内切酶 *Nco*I 和 *Xho*I, *Nde*I 和 *Xho*I 进行双酶切获得目的 DNA 片段,与经相同酶切处理的载体 pET-22b(+) 连接构建表达质粒 pET-Adh 和 pET-Aldh。

1.4 ADH 和 ALDH 蛋白的提取和纯化

将表达载体 pET-Adh 和 pET-Aldh 分别转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,经过预培养,加入 0.8 mmol/L IPTG 诱导培养 6h,收集菌体,将菌体重新悬浮于细胞裂解液,利用超声破碎法裂解菌体,离心分离获得细胞上清。

将细胞上清液与 50% Ni-NTA resins (Qiagen) 在 4℃ 充分结合 (1 h);以洗涤液 (含咪唑 50 mmol/L) 洗涤 3 次,洗去未吸附的杂蛋白;目的蛋白质由洗脱液 (含咪唑 250 mmol/L) 洗提 4 次。所得蛋白经透析法除去高浓度的咪唑,保存于 -80℃ 待用,透析液为 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 8.0)。

由 SDS-PAGE 法检测蛋白质的纯度,以 Bio-Rad 蛋白测定试剂盒 II (Bio-Rad Protein Assay) 测定蛋白质浓度,BSA (2.0 mg/mL) 为蛋白标准品。

1.5 乙醇脱氢酶活性鉴定

采用乙醛指示平板法定性鉴定乙醇脱氢酶 ADH 的活性^[7],乙醇脱氢酶能将乙醇转化为乙醛,乙醛与希夫试剂反应,显紫红色。将重组菌株和空载体菌株接种到乙醛指示平板 (含 100 μg/mL Amp, 0.1 mmol/L IPTG, 200 μL 无水酒精及 150 μL 无菌希夫试剂的 LB 固体培养基),37℃ 倒置培养过夜。

1.6 乙醛脱氢酶活性鉴定

采用分光光度计法测定 ALDH 酶蛋白活性^[8],依次取 0.1 mL 20 mmol/L β-NAD, 0.02 mL 酶液, Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲溶液 (终浓度为 50 mmol/L, pH 8.0),加蒸馏水补至 0.9 mL 并充分混匀,加入反

应底物乙醛0.1 mL(40%)开始反应,在340 nm波长下检测吸光度的变化(每个点做3组平行计算平均值)。酶活性定义为每分钟340 nm下吸光度变化0.01所需的酶量定义为1个活力单位(U)^[8]。

1.6.1 ALDH 最适 pH 测定:选用伯瑞坦-罗宾森(Britton-Robinson, pH 6.5 - 10.5, 终浓度20 mmol/L)缓冲溶液作为反应液^[9],于恒定温度下测定酶蛋白的活性,筛选其最适反应 pH 值。

1.6.2 ALDH 最适温度测定:在最适 pH 值下,于20 mmol/L伯瑞坦-罗宾森缓冲液中测定不同反应温度(10℃, 15℃, 20℃, 25℃, 30℃, 35℃, 40℃, 45℃, 50℃, 55℃, 60℃和 65℃)下的酶蛋白活性,筛选其最适反应温度。

1.6.3 ALDH 温度稳定性测定:在最适 pH 下,20 mmol/L伯瑞坦-罗宾森缓冲液中,将酶蛋白分别于25℃, 35℃和 45℃下温浴,测定不同温度下温浴后酶蛋白的残余活性,分析其热稳定性。

1.7 酒精耐受性实验

利用化学转化法将表达载体 pET-Adh 转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,挑取单一菌落培养于含相应抗生素的液体培养基中,采用 CaCl₂ 法制感受态细胞;随后将 pET-Aldh 转入上述感受态细胞中,构建双基因共表达体系。挑取菌落(含 2 个表达载体)于液体培养基中 37℃ 预培养至 OD₆₀₀ 约 0.5 时,加入诱导剂 IPTG (终浓度 1mmol/L) 及无水酒精(终浓度分别为 0%, 1%, 5%, 10%, 15%),继续培养并检测菌体的生长情况。以含单一载体 pET-22b (+)、pET-Adh 及 pET-Aldh 的菌株作为对照。

1.8 核酸序列测定和分析

核酸序列分析所用引物为通用引物 M13 - 47 和 Rv-M^[5],核酸序列由华大基因公司(北京)测定。序列同源性分析采用 BLAST 程序进行 DNA 和氨基酸序列同源搜索。

2 结果和分析

2.1 目的基因的克隆和表达载体构建

以 *B. pseudofirmus* OF4 的基因组 DNA 为模板,利用设计的 2 对引物,通过梯度 PCR 筛选确定基因

adh 和 *aldh* 的最佳退火温度分别为 49.2℃ 和 50.4℃。在最佳退火温度下通过 PCR 扩增成功获得了目的基因,扩增产物片段约为 1.2 kb (*adh*) 和 1.4 kb (*aldh*),与预期大小相符。

PCR 产物与 TA 克隆载体 pMD-18T 连接产物经蓝白斑筛选和菌落 PCR 筛选分别获得了含目的基因的阳性菌落,序列测定发现克隆所得基因 *adh* 和 *aldh* 与 GenBank 中假坚强芽胞杆菌 OF4 乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶基因序列完全一致(100%),说明目的基因克隆成功。

经过 BlastX 检索发现假坚强芽胞杆菌 (*B. pseudofirmus*) OF4 中乙醇脱氢酶 (ADH) 与来自 *Desulfosporosinus orientis* DSM 765 中乙醇脱氢酶的氨基酸同源性最高为 63% (NCBI accession no. YP_004970899),与来自 *Zymomonas mobilis* ZM4 的乙醇脱氢酶的同源性为 38% (PDB no. 3OWO)^[10],与来自 *Thermotoga maritima* 的乙醇脱氢酶的同源性为 34% (PDB no. 1NHD)^[11]。来自假坚强芽胞杆菌的乙醇脱氢酶的金属离子结合位点是 Asp-210、His-214、His-279、和 His-293,其活性中心则由 Asp-54, Gly-112, Ser-114, Asp-117, Lys-120, Phe-154, Thr-155, Gly-157, Lys-176, Tyr-177, Leu-195, Ile-203, Asp-210, His-214, His-279, His-283, His-293 等构成,与来自 *D. orientis* DSM 765 的乙醇脱氢酶基本一致。

B. pseudofirmus OF4 中乙醛脱氢酶 (ALDH) 与来自耐盐嗜碱芽胞杆菌 (*Bacillus halodurans*) C-125 中乙醛脱氢酶氨基酸同源性最高为 65% (NCBI accession no. NP_241731.1),与来自挪威大鼠 (Norway rat) 乙醛脱氢酶的同源性为 44% (PDB no. 1AD3)^[12],与来自 *Pseudomonas aeruginosa* 的乙醛脱氢酶的同源性为 32% (PDB no. 2WOX)^[13]。来自假坚强芽胞杆菌的乙醛脱氢酶可能的 NAD 结合位点是 Pro-111、Asn-113, Glu-139, Val-168, Gly-186, Ser-284, Arg-286, His-287, Arg-290, Val-331 和 Phe-333,活性中心由 Asn-113、Glu-208、Gly-239 和 Cys-242 组成 (NCBI accession no. YP_003427049.1),与来自 *B. halodurans* C-125 的乙醛脱氢酶基本一致。

通过限制内切酶酶切处理从所构建的质粒 pMD-Adh 和 pMD-Aldh 中获得目的 DNA 片段,并与

经相应酶切处理的表达载体 pET22b(+) 连接后转入大肠杆菌 DH12S 中,通过菌落 PCR 筛选获得阳性菌落,提取所得的质粒经进一步双酶切验证,从图 1-A 可以看出,除了在 6kb 附近有 DNA 条带外,在 1.2kb 附近有清晰的目的 DNA 条带,说明表达载体 pET-Adh 构建成功。同样从图 1-B 中可以看到在 6kb 及 1.4kb 附近均有清晰的目的 DNA 条带,说明表达载体 pET-Aldh 构建成功。

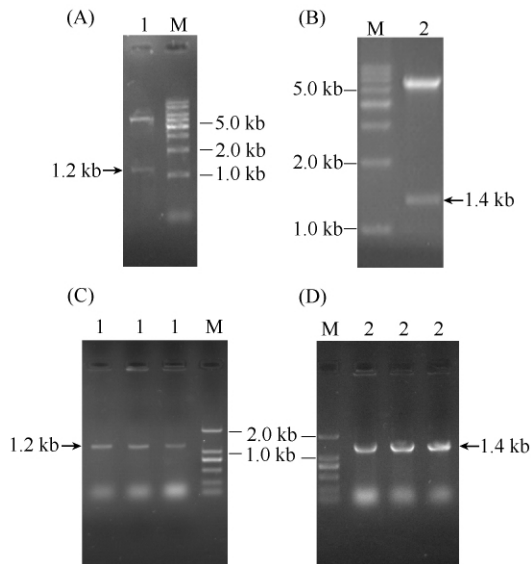


图 1. 表达载体酶切鉴定及菌落 PCR 鉴定图

Figure 1. Restriction enzyme analysis of expression vectors and colony-PCR analysis of co-expression recombinant. A: expression vector pET-Adh; B: expression vector pET-Aldh; C and D: recombinant with co-expression vectors pET-Adh and pET-Aldh; Lane 1 stands for gene *Adh*, Lane 2 stands for gene *aldh*, Lane M stands for DNA marker.

2.2 酶蛋白的表达和纯化

表达载体 pET-Adh 和 pET-Aldh 分别转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,通过预培养及诱导剂 IPTG 诱导 6h,收集的菌体经过超声破碎、离心分离,细胞裂解液上清通过 Ni-NTA 亲和层析法纯化蛋白。从图 2 第 1、2 泳道看出,在 44kDa 附近,细胞裂解液的上清及沉淀中仅有较弱的蛋白条带,裂解液上清通过 Ni-NTA 亲和层析柱纯化时并没有得到目的蛋白,说明乙醇脱氢酶表达不成功;从图 2 第 3 泳道可以看出,在 44kDa 上方有明显且单一的蛋白条带,与乙醛脱氢酶的理论分子量 50879Da 接近,说明乙醛脱氢酶成功表达,且表达量较大,蛋白纯化效果较好。

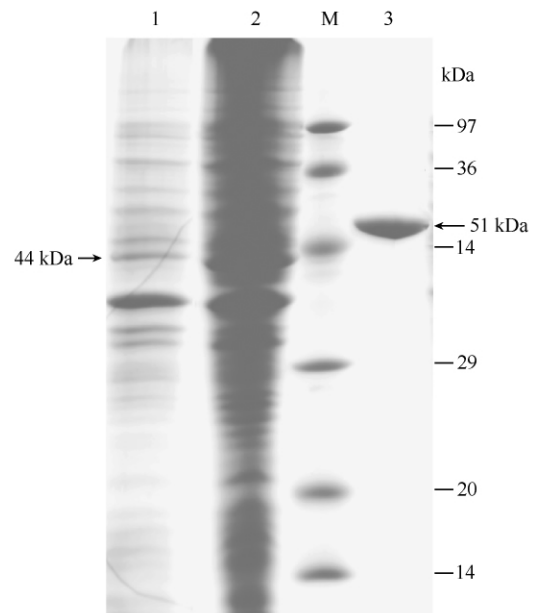


图 2. 乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶蛋白纯化的 SDS-PAGE 分析

Figure 2. SDS-PAGE analysis for alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase. Lane 1, cell lysis of recombinant with plasmid pET-Adh; lane 2, precipitate of recombinant with plasmid pET-Adh; M, marker; lane 3, purified protein ALDH.

2.3 乙醇脱氢酶的活性鉴定

将含质粒 pET-Adh 及 pET-22b(+) 的重组子划线培养于乙醛指示平板,实验结果发现重组菌株和对照菌株显色差异不明显,或许是由于乙醛指示平板存在较强的背景色^[7,14],导致通过这种方法难以判断含质粒 pET-Adh 重组子是否具有乙醇脱氢酶催化活性。

2.4 乙醛脱氢酶活性分析

根据 340 nm 波长下吸光度的变化量测定 ALDH 酶蛋白的活性^[8]。

2.4.1 ALDH 最适 pH: 测定酶蛋白在不同 pH 缓冲液中的相对活性发现其最适反应 pH 为 8.0 (图 3-B),当 pH 值高于或低于 8.0 时,随着 pH 值偏离 8.0,酶蛋白的相对活性急剧下降;当 pH 小于 6.5 或大于 10.5 时,ALDH 的相对活性接近于零。

2.4.2 ALDH 最适反应温度: 在最适 pH 8.0 下,测定不同温度下酶蛋白 ALDH 的相对活性,结果见图 3-A,随着温度的升高,酶活性逐渐升高,当温度达到

35℃时, ALDH 活性达到最高, 超过 35℃后, 随着温度继续升高, 酶蛋白相对活性迅速降低, 当温度达到 65℃时酶活完全丧失。

在最适反应温度 35℃及最适 pH8.0 下, 测得每毫克 ALDH 蛋白的活力为 979.6 ± 13.8 U。

2.4.3 ALDH 温度稳定性: 在 20 mmol/L 伯瑞坦-罗宾森缓冲液 (pH 8.0) 中, 分别于 25℃、35℃ 和 45℃ 下考察酶蛋白的温度热稳定性, 结果见图 3-C。在最初 1h 内, 酶蛋白 ALDH 在最适温度 35℃

下保持较高活性; 随着温度处理时间的延长 (超过 1h), 在 3 个温度下酶蛋白的残余活性均随之呈现下降趋势, 25℃ 和 35℃ 下酶活性下降缓慢, 35℃ 下酶蛋白的残余活性渐渐低于 25℃ 下的残余活性, 在 45℃ 下酶蛋白的活性下降最显著, 在 45℃ 保温处理 5h 后, 其催化活性几乎完全丧失, 这些说明了酶蛋白在常温状态是比较稳定, 且随着温浴时间的延长, 温度越低, 酶蛋白的热稳定性相对较好。

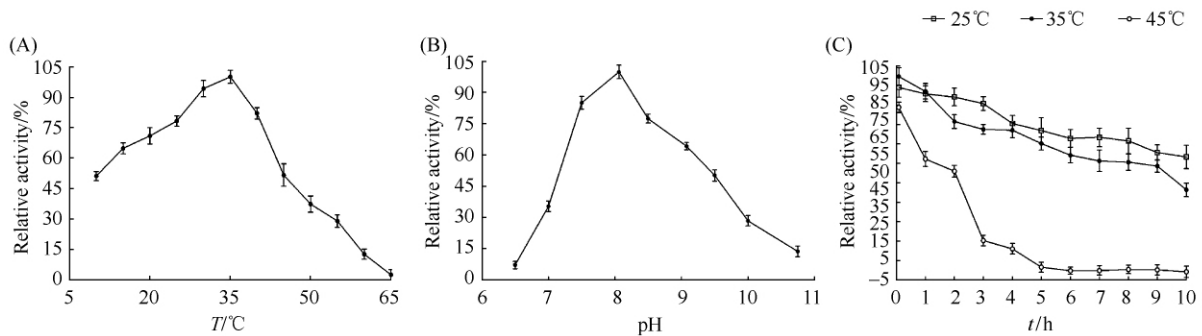


图 3. 乙醛脱氢酶酶学特性

Figure 3. Characterization of ALDH. A: Optimal temperature; B: Optimal pH; C: Thermostability.

2.5 双基因共同作用下酒精耐性的分析

将质粒 pET-Adh 和 pET-Aldh 相继转入宿主 BL21 (DE3) 中, 重组子通过菌落 PCR 验证发现在 1.2kb (图 1-C) 和 1.4kb (图 1-D) 处均有明亮的 DNA 条带, 说明双基因共表达体系构建成功。

重组子经过预培养至 OD_{600} 达到 0.4 左右时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的诱导剂 IPTG, 观察菌株在不同酒精浓度下的生长情况。在没有任何酒精抑制条件下, 所有菌体均生长正常, 含空载体 pET-22b (+) 的菌株与其它菌株相比长势较好 (图 4-A); 当酒精浓度为 1% 时, 含双质粒 pET-Aldh、pET-Adh 的菌株长势超过了含空载体 pET-22b 的重组子, 在 4 个菌中长的最快, 但是整体看来所有菌体生长都没有明显受到抑制 (图 4-B); 当酒精浓度达到 5% 时, 尽管所有菌体生长都受到一定程度的影响, 不过相对而言, 含有双基因 *adh* 和 *aldh* 的共表达菌株长势最好, 一直处于增长期, 而其他菌株长势缓慢, 甚至在培养 13h 后即相继进入了衰亡期 (图 4-C); 当酒精浓度达到 10%, 所有菌体的生长都受到了很大的影响并相继进入了衰亡期, 但是含有双基因 *adh* 和

aldh 的菌株仍然表现出一定的酒精耐受能力, 进入衰亡期也比其他菌株稍晚一些 (图 4-D)。这些现象说明了酶蛋白 ADH 和 ALDH 均成功表达, 双基因共表达有效地提高了重组子降解酒精的能力, 从而使该菌表现出较好的乙醇耐受性; 而含 pET-Adh 的重组子即使能够成功表达获得乙醇脱氢酶, 但是乙醇的降解产物乙醛对菌体的毒性抑制了菌体的正常生长; 同样, 仅含 pET-Aldh 的重组子则受高浓度乙醇的抑制而不能正常生长。

此外, 当酒精浓度为 15% 时, 所有菌株几乎没有明显的生长现象 (结果未显示), 这个结果可能由两方面原因导致, 一、由于乙醇浓度过高, 菌体的生长受到抑制, 进而导致基因无法正常表达; 二、由于乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶无法正常表达, 也就无法降低高浓度的乙醇或其代谢产物给菌体带来的毒害。因此, 即使是含有双基因的重组子, 在高浓度的乙醇下, 最终也和其他重组子一样无法正常生长。

3 讨论

乙醇在体内代谢的中间产物乙醛能与 DNA 形

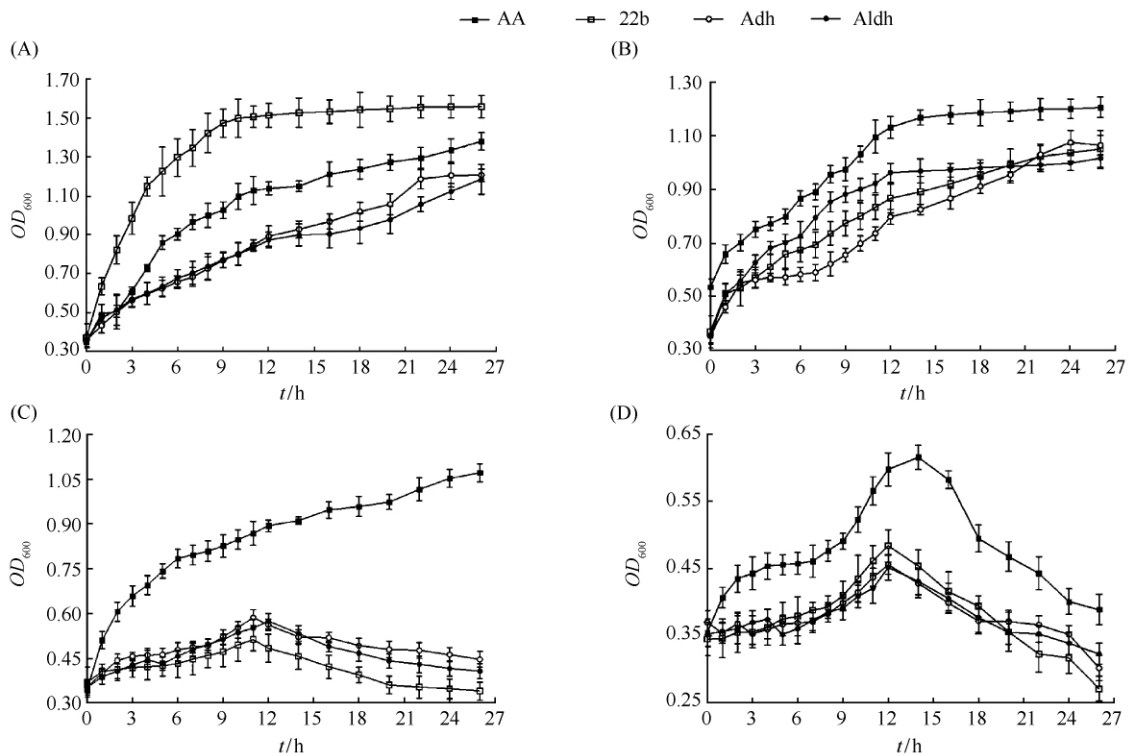


图 4. 重组子酒精耐受性

Figure 4. Viability of recombinant in different ethanol concentration. (A) Alcohol, 0%; (B) Alcohol, 1%; (C) Alcohol, 5%; (D) Alcohol, 10%. AA, with plasmid pET-Ahd&pET-Aldh; 22b, with pET-22b(+); Adh, with plasmid pET-Ahd; Aldh, with plasmid pET-Aldh.

成加合物,降低 DNA 的修复能力,造成 DNA 损伤和基因突变。在人和哺乳动物体内乙醇脱氢酶 (ADH) 和乙醛脱氢酶 (ALDH) 共同构成乙醇脱氢酶系,参与体内乙醇代谢。然而,人类种族或个体的差异,一些人体内缺少乙醇脱氢酶,饮酒后酒在体内代谢缓慢,聚集体内大量的乙醇就会影响中枢神经系统正常工作;当体内缺少乙醛脱氢酶时,则由于血液中乙醛代谢缓慢而蓄积,使人在酒后产生恶心、昏迷等症状,严重甚至会引起组织癌变^[15]。此外,根据新闻报道,酒驾肇事是我国当前交通事故三大主要原因之一,2012 年 1-7 月因酒驾所致的道路交通事故中,我国平均每天有 5 人死亡。如果在解酒药中添加适量 ADH 和 ALDH,可以迅速使乙醇最终转变为乙酸,减小饮酒对身体的危害,减少酒驾肇事案例的发生。因此,乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶在预防和治疗酒精性疾病等方面具有较大的开发潜力^[3,16-17]。在环境保护方面,则可以利用乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶处理乙醇废液,减少因为乙醇废液

的大量排放而造成的环境污染以及生态破坏^[18]。但是由于从动、植物体内提取这些酶的成本非常高,制约了这些酶的生产,而乙醇、乙醛脱氢酶在微生物中分布广泛,易于培养,成本低廉,因此从微生物中克隆获得相关酶蛋白基因,深入研究其酶学特性,为预防、治疗各种酒精性疾病以及相关产品的开发具有重要意义^[1,19]。

本文从原核生物假坚强芽胞杆菌中分别克隆获得了 1 个乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶基因,并成功表达获得了乙醛脱氢酶,该酶蛋白的最适反应温度为 35℃,最适反应 pH 值为 8.0,每毫克蛋白的活力为 979.6 U,酶蛋白在常温下能保持较好的稳定性,超过 45℃ 则容易受温度和作用时间的影响而很快失去活性。本文没有成功表达获得乙醇脱氢酶,对其基因进行密码子偏好性分析发现,基因中含有较多的非偏爱密码子 ATA, AGG, AGA 和 CGA,且在起始密码子 +2 位存在非偏爱密码子 ATA,在 +6 位存在非偏爱密码子 AGG,陈明杰等指出,大肠杆菌非

偏爱密码子位于起始密码子的 +2 到 +5 位, 将会明显降低外源蛋白的表达^[20-21], 这或许是本研究未能获得可溶性酶蛋白 ADH 的原因所在。尽管如此, 本研究通过构建乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶双基因共表达体系, 重组子在 10% 乙醇浓度下依然表现出较好的乙醇降解能力, 说明所克隆的两个基因均具有较好的催化活性, 重组子的乙醇耐受性接近于目前已知最高的嗜热细菌厌氧芽胞杆菌 *Anoxybacillus* sp. WP06, 该菌在 60℃ 15% 的乙醇胁迫下仍能够生长^[22]。通过优化乙醇脱氢酶密码子, 进一步探索酶蛋白的最佳表达条件, 纯化获得乙醇脱氢酶, 利用乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶共同作用, 将能更好地发挥其乙醇降解能力, 从而减少过度饮酒给人体带来的伤害。

参考文献

- [1] Li Z, Cai A. Extracting alcohol dehydrogenase from cells of microbes. *Journal of Huaqiao University-Natural Science*, 1997, 18 (2) : 189-192. (in Chinese)
李夏兰, 蔡婀娜. 从微生物细胞提取 ADH 的探讨. 华侨大学学报 (自然科学版), 1997, 18 (2) : 189-192.
- [2] 裘丽珍. 人乙醛脱氢酶 2 基因的克隆及表达. 浙江大学硕士论文, 2005.
- [3] Hasituya, Bi L, Su X. Progress on aldehyde dehydrogenase 2 (Aldh2) gene. *Chinese Journal of Birth Health & Heredity*, 2007, 15 (5) : 3-4. (in Chinese)
哈斯图雅, 毕立夫, 苏秀兰. 乙醛脱氢酶 2 (ALDH2) 基因研究进展. 中国优生与遗传杂志, 2007, 15 (5) : 3-4.
- [4] Takami H, Krulwich TA. Reidentification of facultatively alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4 as *Bacillus pseudofirmus* OF4. *Extremophiles*, 2000, 4:19-22.
- [5] Conway T, Sewell GW, Osman YA, Ingram LO. Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169 (6) : 2591-2597.
- [6] Ju J, Yokoigawa K, Misono H, Ohnishi K. Cloning of alanine racemase genes from *Pseudomonas fluorescens* strains and oligomerization states of gene products expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 100 (4) : 409-417.
- [7] Lu J, Wei Y, Huang K, Huang R. Cloning of alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis* and expression in *Escherichia coli*. *Industrial Microbiology*, 2004, 34 (1) : 17-20. (in Chinese)
陆坚, 韦宇拓, 黄鲲, 黄日波. 运动发酵单胞菌乙醇脱氢酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达. 工业微生物, 2004, 34 (1) : 17-20.
- [8] Zhao Y, Lei M, Wu Y, Wang C. Optimization on activity detection system of acetaldehyde dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *China Brewing*, 2008, 9: 23-26. (in Chinese)
赵玉凤, 雷明科, 吴元欣, 王存文. 酿酒酵母乙醛脱氢酶活性检测反应体系优化. 中国酿造, 2008, 9: 23-26.
- [9] Fotouhi L, Ganjavi M, Nematollahi D. Electrochemical study of iodide in the presence of phenol and o-cresol: application to the catalytic determination of phenol and o-cresol. *Sensors*, 2004, 4: 170-180.
- [10] Moon JH, Lee HJ, Park SY, Song JM, Park MY, Park HM, Sun J, Park JH, Kim BY, Kim JS. Structures of iron-dependent alcohol dehydrogenase 2 from *Zymomonas mobilis* ZM4 with and without NAD⁺ cofactor. *Journal Molecular Biology*, 2011, 407 (3) : 413-424.
- [11] Badger J, Sauder JM, Adams JM, Antonysamy S, Bain K, Bergseid MG, Buchanan SG, Buchanan MD, Batiyenko Y, Christopher JA, Emtage S, Eroshkina A, Feil I, Furlong EB, Gajiwala KS, Gao X, He D, Hendle J, Huber A, Hoda K, Kearins P, Kissinger C, Laubert B, Lewis HA, Lin J, Loomis K, Lorimer D, Louie G, Maletic M, Marsh CD, Miller I, Molinari J, Muller-Dieckmann HJ, Newman JM, Noland BW, Pagarigan B, Park F, Peat TS, Post KW, Radojicic S, Ramos A, Romero R, Rutter ME, Sanderson WE, Schwinn KD, Tresser J, Winhoven J, Wright TA, Wu L, Xu J, Harris TJ. Structural analysis of a set of proteins resulting from a bacterial genomics project. *Proteins*, 2005, 60 (4) : 787-796.
- [12] Liu ZJ, Sun YJ, Rose J, Chung YJ, Hsiao CD, Chang WR, Kuo I, Perozich J, Lindahl R, Hempel J, Wang BC. The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. *Natural Structural Biology*, 1997, 4 (4) : 317-326.

- [13] Díaz-Sánchez AG, González-Segura L, Rudiño-Piñera E, Lira-Rocha A, Torres-Larios A, Muñoz-Clares RA. Novel NADPH-cysteine covalent adduct found in the active site of an aldehyde dehydrogenase. *Biochemical Journal*, 2011, 439 (3) : 443-452.
- [14] Conway T, Sewell GW, Osman YA, Ingram LO. Cloning and sequencing of the Alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169 (6) : 2591-2597.
- [15] Zhu K, Yan M. Association between ADH /ALDH genetic polymorphism and alcoholic hepatitis. *Chinese Journal of Clinical Hepatology*, 2003, 19 (5) : 273-275. (in Chinese)
朱孔锡, 阎明. 乙醇脱氢酶乙醛脱氢酶基因多态性与酒精性肝病关系的研究现状. *临床肝胆病杂志*, 2003, 19 (5) : 273-275.
- [16] Zhang X, Mao G, Zhang Y. Current research and applications of alcohol dehydrogenase. *Progress in Veterinary Medicine*, 2007, 28 (12) : 92-95. (in Chinese)
张晓霞, 毛跟年, 张云丽. 乙醇脱氢酶应用研究现状. *动物医学进展*, 2007, 28 (12) : 92-95.
- [17] Zhou L, Yu P, Wang J, Song K, Jiang K, Xu H, Li K. Expression of aldehyde dehydrogenase 1 in breast cancer and its clinical significance. *Tumor*, 2009, 29 (7) : 663-667. (in Chinese)
周凌, 虞佩, 王建丰, 宋科瑛, 江爱芳, 徐红, 李克. 乙醛脱氢酶 1 蛋白在乳腺癌中的表达及临床意义, *肿瘤*, 2009, 29 (7) : 663-667
- [18] Lu C, Li Z, Li Y, Liu H, Jin H. Screening & identification of a strain with potentiality in ethanol detoxification and optimization of its culture conditions. *Liquor-Making Science & Technology*, 2011, 6 : 17-20. (in Chinese)
陆晨晨, 李宗亮, 李盈靓, 刘欢, 金海如. 一株乙醇降解菌株的筛选、鉴定及其培养条件的优化. *酿酒科技*, 2011, 6 : 17-20.
- [19] Evnas WE, Johnson JA. Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2001, 2 : 9-39.
- [20] Chen M, Gao M, Yao W, Gao X. Influence on the expression of heterologous proteins in *Escherichia coli* of non-optimal codon quantities and location. *Journal of China Pharmaceutical University*, 2008, 39 (6) : 553-556. (in Chinese)
陈明杰, 高明明, 姚文兵, 高向东. 大肠杆菌非偏爱密码子的数量及位置对外源蛋白表达的影响. *中国药科大学学报*, 2008, 39 (6) : 553-556.
- [21] Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology*, 2004, 22 (7) : 346-353.
- [22] Peng H, Gao Y, Xiao Y. The high ethanol tolerance in a thermophilic bacterium *Anoxybacillus* sp. WP06. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, 24 (6) : 1117-1120. (in Chinese)
彭惠, 高毅, 肖亚中. 一株高乙醇耐受的嗜热细菌 *Anoxybacillus* sp. WP06 的性质研究. *生物工程学报*, 2008, 24 (6) : 1117-1120.

Cloning, expression and characterization of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase from *Bacillus pseudofirmus* OF4

Jiansong Ju^{1#}, Ning Ma^{1#}, Ranran Zhao¹, Jingwei Liu³, Shujing Xu^{2*}, Baohua Zhao^{1*}

¹ College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, China

² College of Tourism, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, China

³ Xingtai Medical College, Xingtai 054000, China

Abstract: [Objective] To clone and characterize the alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) from *Bacillus pseudofirmus* OF4. [Methods] Genes of *adh* and *aldh* were cloned by PCR; expression vectors pET-Ahd and pET-Aldh were constructed and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). After Ni-NTA column chromatography purification, the protein was characterized. [Results] The optimal temperature and pH of ALDH was 35°C and 8.0, the specific activities of ALDH was 979.6 U/mg protein, the thermostability at 25°C and 35°C was better than at 45°C. Although the expression level of ADH was too low to purify, but it was found that ADH had high catalytic activities by experiments of co-expression and ethanol tolerance. [Conclusion] *Adh* and *aldh* from *B. pseudofirmus* OF4 were cloned successfully. Co-expression of double genes could greatly increase the host strain on ethanol tolerance.

Keywords: *Bacillus pseudofirmus* OF4, alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, ethanol tolerance, co-expression

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2011205045), by the Hebei Science and Technology Development Foundation (10205521D), by the Hebei Foundation for Returnees (20100705), by the Youth Foundation of Hebei Educational Committee (2011102) and by the Research Funding for the Doctoral Program of Hebei Normal University (L2009B13)

* Corresponding authors. Tel: +86-311-80787573; E-mail: josyokei@163.com, zhaobaohua86178@sohu.com

#These authors contributed equally to this study.

Received: 7 November 2012/Revised: 21 December 2012

《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效!此项规定早已公布在本刊的网页上、并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内、“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。