

文章编号:1009-038X(2004)02-0027-04

Klebsiella pneumoniae 甘油脱水酶 α 亚基基因的 克隆与序列分析

邵敬伟, 刘长江

(沈阳农业大学 食品学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要: 甘油脱水酶是 1,3-丙二醇发酵过程中的重要限速酶,具有很好的工业应用前景. 其中 α 亚基为甘油脱水酶的主要组成部分,该基因的正确克隆与分析对甘油脱水酶的正确表达起重要作用. 作者采用 PCR 技术,从肺炎克雷伯氏杆菌 A. S. 1. 1736 基因组中扩增得到了编码甘油脱水酶 α 亚基的 *gldA* 基因,并将其克隆至 pMD18-T 载体中. 经核苷酸序列分析证实,*gldA* 基因开放阅读框架由 1 668 bp 组成. 经 GenBank 检索对照分析,*gldA* 基因序列与国外文献报道的同源性达 99.34%,表明所克隆的 *gldA* 基因即为克雷伯氏甘油脱水酶 α 亚基基因.

关键词: 肺炎克雷伯氏杆菌;甘油脱水酶 α 亚基;基因克隆

中图分类号:Q 78

文献标识码:A

Cloning and Sequencing of Gene Encoding α -subunit of Glycerol Dehydratase from *Klebsiella pneumoniae*

SHAO Jing-wei, LIU Chang-jiang

(Food Science College, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: The glycerol dehydratase catalyzes the rate-limiting step in the anaerobic conversion of glycerol to 1,3-propanediol and is comprised of three different subunits. The *gldA* gene coding glycerol dehydratase α subunit has an important role in the expression of glycerol dehydratase. In our study, the *gldA* gene was amplified by PCR using the genomic DNA of *Klebsiella pneumoniae* as the template, and then was cloned into vector pMD18-T. After sequencing, it was found that, the *gldA* gene consists of 1 668 bp encoding 555 amino acid residues. Through computer analysis, the gene was known to be consistent with the abroad reported *gldA* gene up to 99.34%.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; glycerol dehydratase α subunit; gene cloning

甘油脱水酶(glycerol dehydratase EC 4. 2. 1. 30)是控制甘油分解和产生 1,3-PD 的关键性限速

酶. 甘油脱水酶是由 α 、 β 、 γ 3 个亚基组成的复合物($\alpha_2\beta_2\gamma_2$),分别由 *gldA*, *gldB*, *gldC* 基因编码,研

收稿日期:2003-08-26; 修回日期:2003-11-23.

作者简介:邵敬伟(1975-),女,辽宁大连人,生物工程博士研究生.
万方数据

究^[1~3]认为,甘油脱水酶 α 亚基无论在甘油脱水酶的结构上还是功能上都起着重要的作用,但具体作用机制尚不明确。作者根据文献[4]报道的序列设计引物,从克氏杆菌菌株 A. S. 1. 1736 中扩增得到了甘油脱水酶^[4] α 亚基基因,并对其进行了测序和结构分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 质粒 pMD18-T, *E. coli* JM109, 购自 TaKaRa 公司; *Klebsiella pneumoniae* A. S. 1. 1736 购自中国微生物菌种保藏中心。

1.1.2 酶和试剂 Pyrobest DNA polymerase, LA Taq DNA polymerase, DNA Marker, X-gal, IPTG, T₄ 连接酶和限制性内切酶 *Xba* I, *Hind* III 购自 TaKaRa 公司; PCR 产物回收试剂盒, TaKaRa DNA Ligation Kit, 质粒提取试剂盒均购自 TaKaRa 公司。其余试剂为国产分析纯。

1.1.3 培养基和培养条件 大肠杆菌培养基为 LB 培养基, 培养温度为 37 ℃, 摇床转速为 200 r/min, 氨苄青霉素浓度为 0.01%。

1.1.4 引物设计与合成 引物由 TaKaRa 公司合成。根据文献[4]报道的 *gldA* 基因全长序列, 在其 5' 端和 3' 端分别设计了 18~26 bp 的寡核苷酸序列, 作为 PCR 反应的引物序列。P₁: 5'-AT-GAAAAGATCAAAACGATTTGCAG-3'; P₂: 5'-TTATTCAATGGTGTCGGGCTG-3'。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取、质粒的提取、大肠杆菌的感受态制备及转化 参照文献[5]进行。

1.2.2 PCR 扩增 *gldA* 基因 以基因组 DNA 为模板, 以 P₁ 和 P₂ 为引物扩增全长 *gldA* 开放阅读框。PCR 反应条件为: 94 ℃ 预变性 1 min, 进行 PCR 扩增(98 ℃ 10 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 1.5 min), 经 30 个循环后, 在 72 ℃ 延伸 10 min。取 8 μ L 反应液在 1 g/dL 琼脂糖凝胶上电泳, 检测扩增结果。

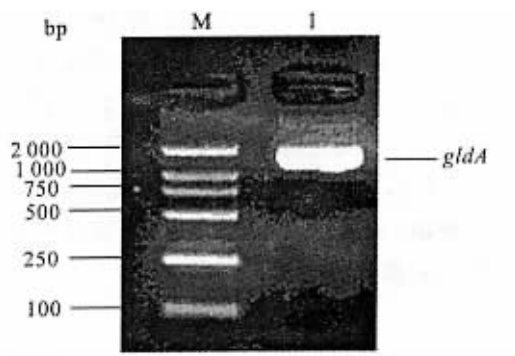
1.2.3 *gldA* 基因的克隆 PCR 扩增产物回收后直接与质粒 pMD18-T 连接, 得到质粒 pMD18-T-*gldA*, 转化大肠杆菌 JM109, 在含 Ampicilin, X-gal, IPTG 的 LB 平板上选择培养后, 随机挑取白色菌落, 提取质粒进行酶切鉴定, 并进行测序鉴定。 万方数据

1.2.4 DNA 序列测定与分析 以重组质粒为模板, 采用 Sanger 双脱氧终止法, 具体操作由 TaKaRa 公司完成。

2 结果与讨论

2.1 PCR 产物的扩增

以提取的肺炎克雷伯氏杆菌基因组 DNA 为模板, 用合成的引物 P₁, P₂ 进行 PCR 扩增, 琼脂糖电泳检测扩增片段(见图 1)。扩增的 DNA 片段与预期的大小一致, 约 1.7 kb。



M. DL2000 相对分子质量标准; 1. PCR 扩增产物

图 1 *gldA* 基因 PCR 扩增片段琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose electrophoresis of PCR amplification of *gldA* gene

2.2 *gldA* 基因片段的克隆

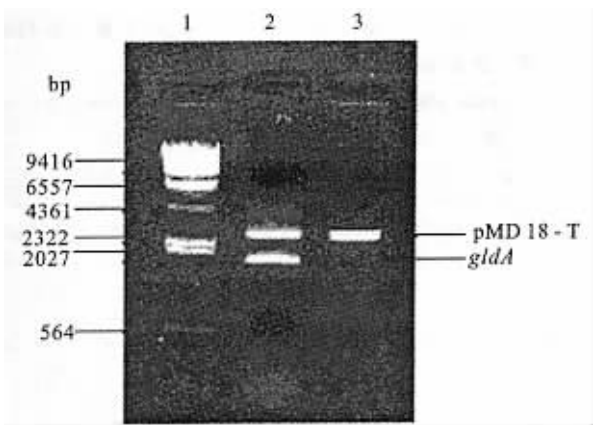
为提高扩增片段的保真性, 对所扩增的电泳条带进行凝胶回收。通过 PCR 产物回收试剂盒对 PCR 扩增产物进行纯化后, PCR 扩增产物回收后直接与质粒 pMD18-T 连接, 转化 *E. coli* JM109 感受态细胞。在选择性平板上挑选阳性转化子, 提取质粒进行双酶切鉴定。用 *Xba* I 和 *Hind* III 对质粒双酶切, 酶切产物做琼脂糖凝胶电泳分析, 分别在约 2.7 kb 和 1.7 kb 处呈现特异条带, 说明获得了含甘油脱水酶 α 亚基基因 *gldA* 的重组质粒。

2.3 *gldA* 基因序列分析

测序结果见图 2。序列分析表明: 阅读框架全长为 1 668 bp, 其中 G+C 含量为 60.55%。是以 ATG 起始密码子开始和 TAA 终止密码子结束, 共编码 555 个氨基酸的蛋白, 该蛋白质的计算相对分子质量为 60 569。该序列与文献[4]的 *K. pneumoniae* 中编码甘油脱水酶 α 亚基的 *gldA* 基因序列(GenBank Access No. U60992)大小一致, 但有 11 个碱基不同, 分别在 195, 270, 294, 468, 486, 537, 639,

687,717,1551,1653 位置(在图 3 中用阴影表示),由碱基 A,T,C,C,C,C,C,G,T,C 改换成 G,C,T,T,T,T,T,G,T,C,T,但这 11 个碱基的改变均没有引起氨基酸的改变,二者的基因同源性的 99.34%,氨基酸序列一致性为 100%。因此可认为 *gldA* 基因与编码甘油脱水酶 α 亚基的 *gldA* 基因为同一基因,所表达的蛋白质产物即为基因 *gldA* 所翻译的甘油脱水酶 α 亚基蛋白。

由该基因推导的氨基酸序列全长 555 个氨基酸,其中酸性氨基酸有 77 个,碱性氨基酸有 55 个,相对分子质量为 60 659。带负电荷的氨基酸(Asp+Glu)有 77 个,带正电荷的氨基酸(Arg+Lys)有 51 个,具体氨基酸组成见表 1。



1. λ /Hind III 相对分子质量标准; 2. *Xba*I 和 *Hind* III 双酶切;
3. pMD18-T 质粒对照

图 2 重组质粒 pMD18-T-*gldA* 酶切鉴定
Fig. 2 Digestion pattern of recombinant plasmid of pMD18-T-*gldA*

1	ATGAAAAGAT	CAAAACGATT	TGCAGTACTG	GCCCAGCGCC	CCGTCAATCA	GGACGGGCTG
61	ATTGGCGAGT	GGCCTGAAGA	GGGGCTGATC	GCCATGGACA	GCCCCTTTGA	CCCGTCTCT
121	TCAGTAAAG	TGGACAACGG	TCTGATCGTC	GAAGTGGACG	GCAAACGCCG	GGACCAGTTT
181	GACATGATCG	ACCG TTTAT	CGCCGATTAC	GCGATCAACG	TTGAGCGCAC	AGAGCAGGCA
241	ATGCGCCTGG	AGGCGGTGGA	AATAGCCCG C	ATGCTGGTGG	ATATTCACGT	CAG T CGGGAG
301	GAGATCATTG	CCATCACTAC	CGCCATCACG	CCGGCCAAAG	CGGTCGAGGT	GATGGCGCAG
361	ATGAACGTGG	TGGAGATGAT	GATGGCGCTG	CAGAAGATGC	GTGCCC GCCG	GACCCCTCC
421	AACCA GTGCC	ACGTCACCAA	TCTCAAAGAT	AATCCGGTGC	AGATTGC T GC	TGACGCCGCC
481	GAGGC T GGGA	TCCGCGGCTT	CTCAGAACAG	GAGACCACGG	TCGGTATCGC	GCGCTA T GCG
541	CCGTTTAACG	CCCTGGCGCT	GTTGGTCGGT	TCGCAGTGC	GCCGCCCCGG	CGTGTTGACG
601	CAGTGCTCGG	TGGAAGAGGC	CACCGAGCTG	GAGCTGGG T A	TGCGTGGCTT	AACCAGCTAC
661	GCCGAGACGG	TGTCGGTCTA	CGGCAC C GAA	GCGGTATTTA	CCGACGGCGA	TGATAC T CCG
721	TGGTCAAAGG	CGTTCCTCGC	CTCGGCCTAC	GCCTCCCGCG	GGTTGAAAAT	GCGCTACACC
781	TCCGGCACCG	GATCCGAAGC	GCTGATGGGC	TATTCGGAGA	GCAAGTCGAT	GCTCTACCTC
841	GAATCGCGCT	GCATCTTCAT	TACTAAAGGC	GCCGGGGTTC	AGGGACTGCA	AAACGGCGCG
901	GTGAGCTGTA	TCGGCATGAC	CGGCGCTGTG	CCGTCGGGCA	TTCGGGCGGT	GCTGGCGGAA
961	AACCTGATCG	CCTCTATGCT	CGACCTCGAA	GTGGCGTCCG	CCAACGACCA	GACTTTCTCC
1021	CACTCGGATA	TTCGCCGCAC	CGCGCGCACC	CTGATGCAGA	TGCTGCCGGG	CACCGACTTT
1081	ATTTTCTCCG	GCTACAGCGC	GGTGCCGAAC	TACGACAACA	TGTTCCGCCG	CTCGAACTTC
1141	GATGCGGAAG	ATTTTGATGA	TTACAACATC	CTGCAGCGTG	ACCTGATGGT	TGACGGCGGC
1201	CTGCGTCCGG	TGACCGAGGC	GGAAACCATT	GCCATTCGCC	AGAAAGCGGC	GCGGGCGATC
1261	CAGGCGGTTT	TCCGCGAGCT	GGGGCTGCCG	CCAATCGCCG	ACGAGGAGGT	GGAGGCCGCC
1321	ACCTACGCGC	ACGGCAGCAA	CGAGATGCCG	CCGCGTAACG	TGGTGGAGGA	TCTGAGTGCG
1381	GTGGAAGAGA	TGATGAAGCG	CAACATCACC	GGCCTCGATA	TTGTCGGCGC	GCTGAGCCGC
1441	AGCGGCTTTG	AGGATATCGC	CAGCAATATT	CTCAATATGC	TGCGCCAGCG	GGTCACCGGC
1501	GATTACCTGC	AGACCTCGGC	CATTCTCGAT	CGGCAGTTCG	AGGTGGTGAG	CGCGGTCAAC
1561	GACATCAATG	ACTATCAGGG	GCCGGGCACC	GGCTATCGCA	TCTTGCCGA	ACGCTGGGCG
1621	GAGATCAAAA	ATATTCCGGG	CGTGGTTCAG	CCTGACACCA	TTGAATAA	

图 3 *K. pneumoniae* 甘油脱水酶 α 亚基 *gldA* 基因核苷酸序列

Fig. 3 Nucleotide sequence of *gldA* gene encoding glycerol dehydratase α subunit from *K. pneumoniae*

表 1 *K. pneumoniae* 甘油脱水酶 α 亚基 *gldA* 基因编码的蛋白质氨基酸组成

Tab. 1 Amino acid compositions of *gldA* gene encoding glycerol dehydratase α subunit from *K. pneumoniae*

氨基酸	总数	含量/%	氨基酸	总数	含量/%
Ala(A)	61	10.99	Leu(L)	40	7.20
Arg(R)	37	6.66	Lys(K)	14	2.52
Asn(N)	23	4.14	Met(M)	25	4.50
Asp(D)	35	6.30	Phe(F)	18	3.24
Cys(C)	5	0.90	Pro(P)	21	3.78
Gln(Q)	23	4.14	Ser(S)	37	6.66
Glu(E)	42	7.56	Thr(T)	31	5.58
Gly(G)	41	7.38	Trp(W)	3	0.54
His(H)	4	0.72	Tyr(Y)	15	2.70
Ile(I)	37	6.66	Val(V)	43	7.74

文献报道甘油脱水酶基因可被大肠杆菌 RNA 聚合酶识别,故其可在大肠杆菌中表达^[3,4]. *gldA* 基因核苷酸序列及其结构分析表明,所克隆的是克雷伯氏杆菌菌株 AS1.1736 甘油脱水酶 α 亚基基因,从而为实现其在大肠杆菌中的高效表达提供了可靠的基因材料.

参考文献:

[1] Toraya T. Radical catalysis of B₁₂ enzymes: structure, mechanism, inactivation, and reactivation of diol and glycerol dehydratases[J]. **Cell Mol Life Sci**,2000, 57(10):106—127.

[2] Seyfried M, Daniel R, Gottschalk G. Cloning, sequencing, and overexpression of the genes encoding coenzyme B₁₂-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*[J]. **J Bacteriol**,1996,178(19): 5793—5796.

[3] Tong I T, Liao H, Cameron D C. 1,3-Propanediol production by *Escherichia coli* expressing genes from the *Klebsiella pneumoniae* dha regulon[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1991,57(12):3541—3546.

[4] 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]. **J Biol Chem**, 1996,271(37), 22352—22357.

[5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989.16—19.

(责任编辑:李春丽)