

文章编号:1673-1689(2005)05-0086-03

GDHt- β 亚基基因的套式 PCR 扩增及其 DNA 测序

邵敬伟¹, 吴志香², 郭养浩¹, 刘长江^{*3}

(1. 福州大学 药物生物技术与工程研究所, 福建 福州 350002; 2. 辽宁中医学院 西医诊断系, 辽宁 沈阳 110032; 3. 沈阳农业大学 食品学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 采用套式 PCR 技术, 从肺炎克氏杆菌 A. S. 1. 1736 基因组中扩增编码 GDHt- β 亚基基因, 对目的基因进行测序并应用生物信息学进行序列分析, 结果扩增出约 585 bp 的目的 DNA 片段, 经 GenBank 检索对照分析, 该基因序列与国外文献报道的同源性达 99.34%, 表明成功地获得编码 GDHt- β 亚基的基因, 为进一步研究该亚基的结构与生物学功能奠定了基础。

关键词: 肺炎克氏杆菌; 甘油脱水酶 β 亚基; 基因克隆

中图分类号: Q 78

文献标识码: A

Booster-PCR Amplification and Sequencing of Gene Encoding β -Subunit of Glycerol Dehydratase

SHAO Jing-wei¹, WU Zhi-xiang², GUO Yang-hao¹, LIU Chang-jiang^{*3}

(1. Institute of Pharmaceutical Biotechnology and Bioengineering, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China; 2. Liaoning College of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China; 3. Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161, China)

Abstract: The gene encoding glycerol dehydratase β subunit was amplified by booster PCR using the genomic DNA of *Klebsiella pneumoniae* as the template. By sequence analysis, the gene was identified to be consisted of 585 bp encoding 194 amino acid residues. In addition, by computer analysis, the gene was identified to be consistent with the gene reported by foreign literatures up to 99.34%. The results showed that the gene encoding GDHt- β subunit was obtained and this would lay the basis for further studying biological functions and potential utility of the gene.

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

甘油脱水酶(glycerol dehydratase, GDHt, EC 4.2.1.30)能参与一些小分子的厌氧利用,能催化分子重组从而把醇还原为醛(如甘油发酵),但反应需要辅酶 B₁₂ 作为必需辅助因子来完成^[1]。在甘油分解生物合成 1,3-丙二醇的途径中,甘油脱水酶能催化甘油、1,2-丙二醇和乙醇分别生成三羟丙醛、

丙醛和乙醛,是控制甘油分解和产生 1,3-丙二醇的关键性限速酶。

天然存在的甘油脱水酶是由 α 、 β 、 γ 三个亚基组成的异型六聚体 $\alpha_2\beta_2\gamma_2$,三个亚基之间以非共价键相连。其中 β 亚基由 194 个氨基酸组成,该亚基单独没有活性,但可以维持 GDHt 构象的正确折叠

收稿日期:2005-03-28; 修回日期:2004-05-28.

作者简介:邵敬伟(1975-),女,辽宁大连人,农学博士,讲师;*通讯作者。

万方数据

并能跟辅酶 B₁₂ 之间有特异性结合作用,但相互作用方式尚不清楚。Raynaud C 等^[2] 最近研究表明,β 亚基是维持甘油脱水酶构象的稳定性及该酶活性的决定因素。因此研究 GDHt-β 亚基的功能对于深入研究 GDHt 具有十分重要的意义。作者对 GDHt 3 个亚基基因进行了克隆和表达的研究,现将 GDHt-β 亚基基因的克隆及序列分析报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种和酶 肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 购于中国微生物菌种保藏中心,菌号 A. S. 1. 1736; Pyrobest DNA polymerase 购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 引物设计与合成 在 GenBank 中获得肺炎克氏杆菌 GDHt-β 亚基基因序列(序列号为 GI: 1778021)。用 DNA Star 生物学软件设计引物,在其 5' 端和 3' 端分别设计了两对 18~26 bp 的外套 PCR 引物(P1、P2)和内套 PCR 引物(P3、P4)如下:

P1: 5'-GTGGAAGAGATGATGAAGCG-3' (20 bp);

P2: 5'-ATGCGGTGGCGCGCAATTT -3' (19 bp);

P3: 5'-GTGCAACAGACAACCCAAATTC-3' (22 bp);

P4: 5'-TCACTCCCTTACTAAGTCGATG-3' (22 bp)。

1.2 实验方法

1.2.1 肺炎克氏杆菌基因组 DNA 提取 将肺炎克氏杆菌接种于厌氧培养基中,37 ℃ 培养,待细菌生长到对数生长期时,提取细菌基因组的总 DNA^[3]。取 5 μL 反应液用 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测。

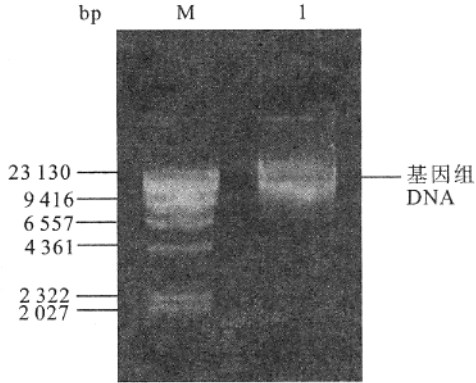
1.2.2 套式 PCR 法扩增目的基因 以提取的 *K. p* AS1. 1736 菌株基因组 DNA 为模板,用合成的引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增,再以一次 PCR 产物为模板,P3 和 P4 为内引物,采用 Pyrobest DNA 聚合酶体系,进行套式 PCR 扩增目的基因片段。PCR 反应条件为:94 ℃ 预变性 1 min,进行 PCR 扩增(98 ℃ 10 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s),经 30 个循环后,72 ℃ 延伸 10 min。取 8 μL 反应液在 1 g/dL 琼脂糖凝胶上电泳,检测扩增结果。

1.2.3 序列测定及分析 采用 Sanger 双脱氧终止法,对 PCR 产物直接进行测序,具体操作由 TaKaRa 公司完成;用 NCBI 服务器提供的程序进行分析:ORF Finder (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ORF_Finder) 对 GDHt-β 亚基基因的 DNA 序列进行开放阅读框(ORF) 识别;用 DNA Club 分子生物学软件进行氨基酸组成分析;用 MegAlign 分子生物学软件与原序列进行同源性比较分析。

2 结果与分析

2.1 肺炎克氏杆菌 GDHt-β 亚基基因的 PCR 克隆

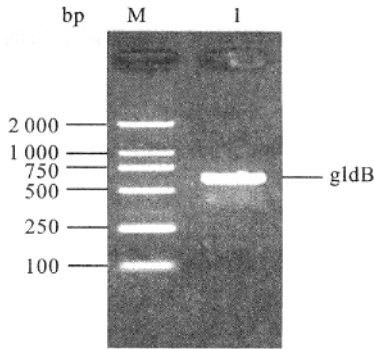
肺炎克氏杆菌基因组 DNA 在核酸相对分子质量 marker 的 9 416~23 130 bp,大小约为 20 000 bp,见图 1。GDHt-β 亚基基因的套式 PCR 产物在约 585 bp 处可见一白色清晰条带,与文献^[4]报道的大小相符,见图 2。



M: λ-Hind III; 1: 肺炎克氏杆菌基因组 DNA

图 1 *K. pneumoniae* 菌株基因组 DNA

Fig. 1 Genomic DNA of *K. pneumoniae*



M: DL2000 DNA marker; 1: GDHt-β 亚基基因的套式 PCR 扩增产物

图 2 GDHt-β 亚基基因的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR product of GDHt-β gene

2.2 PCR 测序结果及分析

测序结果见图 3。由测序结果和生物信息学分析结果表明,扩增片段开放阅读框为 585 bp,是以 GTG 起始密码子开始,TGA 终止密码子结束。其中 G+C 含量为 59.82%,共编码 194 个氨基酸,具体氨基酸组成见表 1。该蛋白质的计算相对分子质

量为 21 322。其中酸性氨基酸(Asp+Glu)有 23 个,碱性氨基酸(Arg+Lys+His)有 30 个;带负电荷的氨基酸(Asp+Glu)有 23 个,带正电荷的氨基酸(Arg+Lys)有 21 个。

经 Genebank 序列相似性对比分析,该序列与

文献[4]报道的 GDHt- β 亚基基因序列大小一致,仅有 3 个碱基不同,但这 3 个碱基的改变均没有引起氨基酸的改变,二者的基因同源性为 99.49%,氨基酸序列一致性为 100%。说明编码 GDHt- β 亚基的 *gldB* 基因已经正确获得。

			GTG	CAA	CAG	ACA	ACC	CAA	ATT	CAG	24
CCC	TCT	TTT	ACC	CTG	AAA	ACC	CGC	GAG	GGC	54	
GGG	GTA	GCT	TCT	GCC	GAT	GAA	CGC	GCC	GAT	84	
GAA	GTG	GTG	ATC	GGC	GTC	GGC	CCT	GCC	TTC	114	
GAT	AAA	CAC	CAG	CAT	CAC	ACT	CTG	ATC	GAT	144	
ATG	CCC	CAT	GGC	GCG	ATC	CTC	AAA	GAG	CTG	174	
ATT	GCC	GGG	GTG	GAA	GAA	GAG	GGG	CTT	CAC	204	
GCC	CGG	GTG	GTG	CGC	ATT	CTG	CGC	ACG	TCC	234	
GAC	GTC	TCC	TTT	ATG	GCC	TGG	GAT	GCT	GCC	264	
AAC	CTG	AGC	GGC	TCG	GGG	ATC	GGC	ATC	GGT	294	
ATC	CAG	TCG	AAG	GGG	ACC	ACG	GTC	ATC	CAT	324	
CAG	CGC	GAT	CTG	CTG	CCG	CTC	AGC	AAC	CTG	354	
GAG	CTG	TTC	TCC	CAG	GCG	CCG	CTG	CTG	ACG	384	
CTG	GAG	ACC	TAC	CGG	CAG	ATT	GGC	AAA	AAC	414	
GCC	GCG	CGC	TAT	GCG	CGC	AAA	GAG	TCA	CCT	444	
TCG	CCG	GTG	CCG	GTG	GTG	AAC	GAT	CAG	ATG	474	
GTG	CGG	CCG	AAA	TTT	ATG	GCC	AAA	GCC	GCG	504	
CTA	TTT	CAT	ATC	AAA	GAG	ACC	AAG	CAT	GTG	534	
GTG	CAG	GAC	GCC	GAG	CCC	GTC	ACC	CTG	CAC	564	
ATC	GAC	TTA	GTA	AGG	GAG	TGA				585	

图 3 *K. pneumoniae* GDHt- β 亚基基因核苷酸序列

Fig. 3 Nucleotide sequence of *gldB* gene encoding glycerol dehydratase β subunit from *K. pneumoniae*

表 1 *K. pneumoniae* GDHt- β 亚基基因编码的蛋白质氨基酸组成

Tab. 1 Amino acid composing of GDHt- β gene encoding glycerol dehydratase β subunit from *K. pneumoniae*

氨基酸	总数	含量/%	氨基酸	总数	含量/%
Ala(A)	18	9.23	Leu(L)	18	2.05
Arg(R)	11	5.64	Lys(K)	10	5.12
Asn(N)	4	2.05	Met(M)	4	2.05
Asp(D)	10	5.12	Phe(F)	6	3.07
Cys(C)	0	0	Pro(P)	10	5.12
Gln(Q)	11	5.64	Ser(S)	11	5.64
Glu(E)	13	6.66	Thr(T)	12	6.15
Gly(G)	13	6.66	Trp(W)	1	0.51
His(H)	9	4.61	Tyr(Y)	2	1.02
Ile(I)	13	6.66	Val(V)	18	9.23
Asx(B)	0	9.23	* * * (*)	1	0.51
Glx(Z)	0	5.12	Xxx(X)	0	0.00
Total	195	99.92			

3 讨 论

PCR 扩增是进行基因克隆和基因表达等分子生物学研究的基础。本研究在试验初始曾尝试以基因组 DNA 为模板,直接以 P3 和 P4 为引物进行 PCR 扩增目的基因,但无特异性扩增。首先考虑对 PCR 体系中的反应参数进行了调整:包括重新提取基因组 DNA 模板;调整退火温度、设置退火温度梯度进行梯度扩增;改变延伸时间;改变引物和 dNTP 浓度;更换 Taq 酶的种类等;但效果不明显。分析可能是由于 GDHt- β 亚基基因 GC 含量高或重复序列过多或该基因位于 DNA 空间结构复杂处造成。最后根据参考序列在目的基因外侧设计引物 P1 和 P2,以 P1 和 P2 为引物进行的 PCR 扩增产物为模板,再以 P3 和 P4 为引物,进行套式 PCR 扩增,最后取得较强的特异性条带。可见对于模板量较少或结构特殊的 DNA 基因片段,通过套式 PCR 的方法,可取得较好的扩增效果。(下转第 93 页)

由表 3 可见,冷冻干燥银鱼的产品质量要远远好于热风干燥.

3 讨 论

1) 本研究在国内率先将冷冻干燥技术用于银鱼的保藏加工,并在该加工过程引入了加热板程序升温的加热方式.

2)传统的冷冻干燥工艺通常采用单一的加热方式,像 Sablani 在 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下干燥沙丁鱼到 4% 含水率(干基)需要 72 h^[9],也有的采用较高的加热板温度,虽然降低了干燥时间,但保证不了产品质量.而我们采用加热板程序升温的加热方式,既保证了产品质量又在一定程度减少了干燥的时间.

参考文献:

[1] 伍汉霖,邵广昭,赖春福.拉汉世界鱼类名典[M].基隆:台湾水产出版社,1999.79—80.

[2] 刘惠生.银鱼的开发利用和外贸[J].水产学杂志,1998,(1)85—88.

[3] 全国农产品干燥技术情报网.农产品干燥技术学术会论文集[C].(1989—1991 年),1993,134.

[4] 赵鹤皋,林秀城.冷冻干燥技术[M].北京,中国轻工业出版社,1990.10—11.

[5] 蒋予箭,周雁.肉类弹性测定方法的研究[J].食品科学,2002,(4):99—102.

[6] Taner Baysal,Filliz Icier, Seda ersus. Effect of microwave and infrared drying on the quality of carrot and garlic[J]. **Europe Food Research Technology**, 2003, 218:68—73.

[7] F Shishegarha, J Makhlof, C Ratti. Freeze-drying characteristics of strawberries[J]. **Drying Technology**,2002, 20 (1): 131—145.

[8] S Litvin,C H Manheim,J Miltz. Dehydration of carrots by a combination of freeze drying, microwave heating and air or vacuum drying[J]. **Journal of Food Engineering**,1998,36,103—111.

[9] Sablani S S, Myhara R M M. Water sorption isotherm of freeze fish sardines[J]. **Drying Technology**,2001,19(4):673—680.

(责任编辑:杨 萌)

(上接第 88 页)

作者成功地克隆出 GDHt- β 亚基的基因序列并进行了核苷酸序列分析,为重组 GDHt 的表达提供了可靠的基因材料,并为进一步研究 GDHt- β 亚基的

结构、生物学功能及与辅酶 B12 之间的作用方式奠定基础.

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, 57:106—127.

[2] Raynaud C, Sarcabal P, Meynial Salles I, *et al.* Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of *Clostridium butyricum*[J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2003,100(9):5010—5015.

[3] 邵敬伟,刘长江. *Klebsiella pneumoniae* 甘油脱水酶 α 亚基基因的克隆与序列分析[J]. **食品与生物技术学报**, 2004, 23 (2):27—30.

[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: 22352—22357.

(责任编辑:李春丽)