

文章编号:1673-1689(2006)04-0077-04

编码 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶基因 *yqhD* 的克隆与高效表达

张晓梅, 唐雪明*, 诸葛斌, 沈微, 饶志明, 方慧英, 诸葛健*
(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 利用 PCR 技术从大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中扩增出 1.16 kb 的编码 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶的基因 *yqhD*, 将其连接到温控表达载体 pHsh, 得到重组载体 pHsh-*yqhD*, 重组载体在大肠杆菌 JM109 中得到高效表达。SDS-PAGE 分析显示: 融合表达产物的相对分子质量均为 43 000, 同核酸序列测定所推导的值相符。对含有 *yqhD* 的基因工程菌进行表达研究表明: 42 °C 诱导 4 h, 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶的酶活力达到 100 IU/mg, 而对照菌株的酶活力仅为 0.5 IU/mg。

关键词: 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶; 克隆; 表达; 基因; 温控表达载体

中图分类号: Q 786

文献标识码: A

Cloning and Over Expression of Gene *yqhD* Encoding 1,3-Propanediol Oxidoreductase Isoenzyme in *Escherichia coli*

ZHANG Xiao-mei, TANG Xue-ming*, ZHUGE Bin, SHEN Wei, RAO Zhi-ming,
FANG Hui-ying, ZHUGE Jian*

(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The structure gene *yqhD* from *E. coli* encoding 1,3-propanediol oxidoreductase isoenzyme was amplified using PCR method. The temperature control expression vector pHsh harboring *yqhD* gene was transformed into *E. coli* JM109 to yield the recombinant expression vector pHsh-*yqhD*. The *yqhD* was over-expressed in *E. coli* JM109. SDS-PAGE analysis showed that the relative molecular weights of the expressed recombinant products were about 43 000, which was corresponding to the prediction by gene sequence. Compared with *E. coli* JM109 (pHsh), the 1,3-propanediol oxidoreductase isoenzyme activity with recombinant *E. coli* reached up to 100 U/mg protein when induced at 42 °C for 4 h, which was much higher than that with *E. coli* JM109 0.5 U/mg protein.

Key words: 1,3-propanediol oxidoreductase isoenzyme; cloning; expressing; gene; temperature control expression vector

1,3-丙二醇(1,3-Propanediol, 1,3-PD)是合成 新型聚酯 PTT 的单体^[1], 是一种重要的化工原料。

收稿日期: 2005-03-09; 修回日期: 2005-11-12.

作者简介: 方慧英(1969-), 女, 江苏无锡人, 发酵工程博士研究生, 工程师; * 通讯作者。

1,3-丙二醇的生产方法有化学合成法和微生物转化法^[2]。目前工业上主要采用化学法合成 1,3-丙二醇,包括丙烯醛水合法、环氧乙烷法、环氧丙烷法等,其中德国 Degussa 公司的丙烯醛水合法、Shell 公司的环氧乙烷法已投入工业法生产。化学合成法具有设备投资大、技术难度高、需要重金属催化剂、污染环境等缺点,微生物转化法以其利用可再生资源、清洁生产、对环境友好、有利于可持续发展等优点逐渐成为国内外研究的热点。通常情况下,发酵生产 1,3-丙二醇都是以甘油为底物,经过两步反应,甘油在以维生素 B₁₂ 为辅酶的甘油脱水酶作用下转化为中间产物——3-羟基丙醛;3-羟基丙醛在 1,3-丙二醇氧化还原酶的催化下生成 1,3-丙二醇^[3]。1,3-丙二醇氧化还原酶和甘油脱水酶是甘油转化为 1,3-丙二醇代谢途径中的关键酶,将编码这两个关键酶的基因 *dhaT* 及 *dhaB* 进行克隆与表达是构建产 1,3-丙二醇基因工程菌的基本途径,但是以此为基础构建的 1,3-丙二醇基因工程菌,以甘油为底物,1,3-丙二醇的产量仅为 6.3 g/L^[4]。而 1,3-丙二醇氧化还原酶的同工酶,在微生物体内可代替 1,3-丙二醇氧化还原酶催化 3-羟基丙醛生成 1,3-丙二醇,是微生物转化甘油生成 1,3-丙二醇的另一关键酶。据文献^[5]报道,由其同工酶代替 1,3-丙二醇氧化还原酶的催化效率明显提高,1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶 *yqhD* 的基因的克隆与表达在国内尚未见报道。作者将大肠杆菌 *yqhD* 基因引入温控表达载体 pHsh 中,并在大肠杆菌 JM109 中实现了 *yqhD* 基因的表达。

1 材料与方法

1.1 菌株和原料

大肠杆菌 JM109:由复旦大学遗传学教研室赠送;大肠杆菌:由作者所在实验室保藏;质粒载体 pHsh:由南京师范大学邵蔚蓝老师惠赠。

1.2 培养基

LB 培养基(蛋白胨 1 g/dL,酵母膏 0.5 g/dL,氯化钠 1 g/dL)用于细菌培养,固体培养基添加 1.5 g/dL 的琼脂,固体和液体培养基在需要时加入氨苄青霉素至 100 μg/mL。

1.3 工具酶和试剂

限制性内切酶 *Xho*I,碱性磷酸酶 CIAP 购自 TaKaRa 公司;*T*₄DNA 连接酶及 *Taq* DNA 聚合酶购自上海华美生物工程公司;Gel Extraction Mini Kit,PCR Purification Mini Kit 购自上海华舜生物工程有限公司。丙烯酰胺,甲叉双丙烯酰胺,广范

围蛋白质相对分子质量标准为 Promega 公司产品。除特别注明外,实验用各种试剂均为国产分析纯。

1.4 分子克隆技术

基因组 DNA 的提取,纯化质粒 DNA 的提取,DNA 酶切,连接和转化均参照文献^[6]。根据 NCBI 公布的大肠杆菌 ATCC 菌株 *yqhD* 基因序列设计合成 PCR 所需的引物:

上游:GGC CTC GAG CAG CAA AGG GAG CAA GTA ATG AAC

下游:GGC CTC GAG TGG ACG AAA TGC CCG AAA ACG AAA GT

引物两端都引入 *Xho*I 位点。以大肠杆菌相关基因组 DNA 为模板完成 PCR 反应:95 ℃变性 10 min,加入 TaKaRa *Taq* DNA 聚合酶,经 35 个循环,获得的 PCR 产物经电泳分析确认,经 PCR 产物纯化试剂盒纯化后,*Xho*I 酶切,回收其中 1.16 kb 的片段,连接载体 pHsh。

1.5 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶酶活力测定

1.5.1 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶粗酶液的制备 以大肠杆菌 JM109(pHsh)为对照,接种重组大肠杆菌 JM109(pHsh-*yqhD*)单菌落于 LB 培养基(含氨苄青霉素 100 μg/mL),30 ℃培养 24 h,取 500 μL 菌液接种于 50 mL 含有 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基,30 ℃培养至对数后期,42 ℃诱导培养 4 h,离心,将菌体重悬于 3 mL 0.035 mol/L 磷酸钾缓冲液(pH 8.0)中,超声波破碎细胞,离心除去碎片,上清液即为粗酶。

1.5.2 酶活力测定 按文献^[7]所述的方法测定 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶的酶活。酶活测定根据 25 ℃下 NADP⁺ 还原成 NADPH 的速率来定量。总反应体积 2 mL,含 0.6 mmol/L NADP,30 mmol/L (NH₄)₂SO₄,100 mmol/L 1,3-丙二醇,K₂CO₃-KHCO₃缓冲液(pH 9.0),加入粗酶液开始反应,340 nm 下测定 3 min 吸光值的变化。酶活单位定义为 1 国际单位(IU)为每分钟还原 1 μmol 底物或生成 1 μmol 产物的酶量。

1.6 SDS-PAGE

采用 5 g/dL 浓缩胶及 12 g/dL 分离胶的不连续垂直平板电泳,考马斯亮蓝 R-250 染色^[8]。以转化空载 pHsh 的大肠杆菌 JM109(pHsh)做对照。

1.7 重组大肠杆菌 JM109(pHsh-*yqhD*)质粒稳定性分析

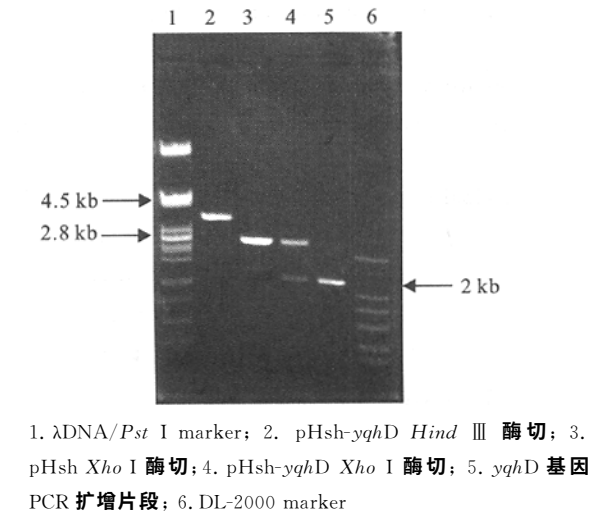
单细胞生物的生长,细胞呈几何级数 2ⁿ 增长,当 *n*=20 时,2²⁰=1.05×10⁶,将静止期的菌液稀释 10⁶,再将其培养到静止期,即可认为细胞已连续传

代 20 次。具体方法如下:从新鲜转化平板上挑取单菌落,接种至 2 mL 不含抗生素的 LB 培养基中,30 ℃ 培养 24 h,即得 20 代的菌液。以此类推,直至连续传代至 100 代。其中每隔 20 代统计一次质粒丢失情况,将上述菌液涂布于不含抗生素的 LB 平板上,从中挑选 100 个单菌落,分别点在添加和不添加抗生素的平板上,通过计数即可测得该代数的质粒稳定性。

2 结果分析

2.1 含 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶基因 *yqhD* 的重组质粒 pHsh-*yqhD* 的构建

以大肠杆菌基因组 DNA 为模板,利用合成引物进行 PCR 扩增,琼脂糖电泳检测扩增片段,扩增的 DNA 片段为 1.16 kb,片段插入载体 pHsh,转化大肠杆菌 JM109,转化子涂布含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 平板,提取阳性转化子质粒。重组质粒酶切电泳鉴定见图 1,重组质粒命名为 pHsh-*yqhD*。



1. λDNA/*Pst* I marker; 2. pHsh-*yqhD* *Hind* III 酶切; 3. pHsh *Xho* I 酶切; 4. pHsh-*yqhD* *Xho* I 酶切; 5. *yqhD* 基因 PCR 扩增片段; 6. DL-2000 marker

图 1 重组质粒 pHsh-*yqhD* 酶切鉴定

Fig. 1 The enzyme Identification of the Recombinant Plasmid pHsh-*yqhD*

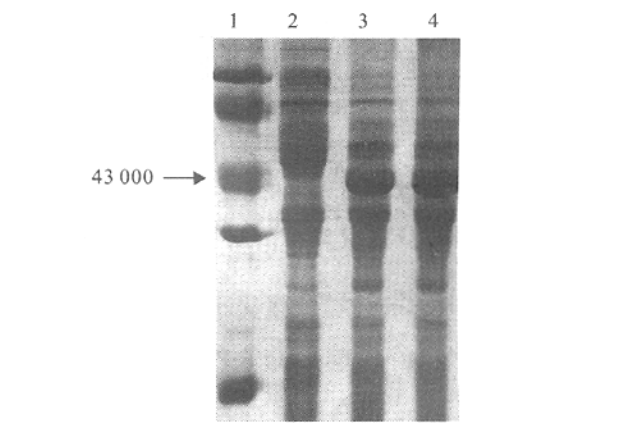
2.2 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶基因 *yqhD* 的核苷酸序列分析

将 pHsh-*yqhD* 重组质粒进行测序,得到全长 1 164 个碱基的 *yqhD* 基因,测序结果在 NCBI 进行 BALST 序列分析,表明克隆到的 *yqhD* 基因与公布的大肠杆菌的同源性在 99% 左右。

2.3 重组菌全细胞蛋白质 SDS-PAGE 电泳分析

挑取重组子大肠杆菌 JM109 (pHsh-*yqhD*),接种于含有氨苄青霉素 100 μg/mL 的 LB 培养基中,30 ℃ 培养至对数后期,42 ℃ 诱导培养 4 h,离心收集菌体,超速波破壁,加入到 1×SDS-PAGE 电泳加样缓冲液中悬浮,100 ℃ 水浴 5 min,进样量为 10

μL,SDS-PAGE 全细胞电泳分析见图 2。以空载体产物为对照,发现在 43 000 处出现蛋白质特征带,与目的蛋白质大小相符。



1. 蛋白质 Marker; 2. 对照大肠杆菌 JM109 (pHsh); 3~4. 诱导后的大肠杆菌转化子 JM109 (pHsh-*yqhD*)

图 2 重组菌全细胞蛋白 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 2 SDS-PAGE Analysis of Whole Cells

2.4 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶的酶活测定

取一株重组大肠杆菌 JM109 (pHsh-*yqhD*),接种于含氨苄青霉素的 LB 培养基中,42 ℃ 诱导表达,采用超声波破碎细胞。按文献[7]所述方法测定酶活,并以大肠杆菌 JM109 (pHsh) 作对照,结果测得重组大肠杆菌 JM109 (pHsh-*yqhD*) 的酶活力为 100 IU/mg,而对照菌株的酶活力为 0.5 IU/mg,是对照菌株酶活力的 200 倍。

2.5 重组菌质粒稳定性研究

重组大肠杆菌 JM109 (pHsh-*yqhD*) 在添加氨苄青霉素以及不添加氨苄青霉素的条件下,连续转种 5 次,统计重组大肠杆菌 JM109 (pHsh-*yqhD*) 的菌落数,结果表明,传 100 代后重组大肠杆菌 JM109 (pHsh-*yqhD*) 的质粒保持率为 91%。

表 1 重组菌大肠杆菌 JM109 (pHsh-*yqhD*) 连续转种后在不同抗生素平板上的菌落数

Tab. 1 The stability of *E. coli* JM109 (pHsh-*yqhD*) plasmid

传代次数	pHsh- <i>yqhD</i> Amp (+)	pHsh- <i>yqhD</i> Amp (-)
20	100	100
40	98	100
60	95	100
80	93	100
100	91	100

3 讨 论

甘油在产 1,3-丙二醇微生物体内合成途径是由甘油脱水酶和 1,3-丙二醇氧化还原酶所构成催

化链的还原途径来实现的,而 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶^[8],在微生物体内可代替 1,3-丙二醇氧化还原酶催化 3-羟基丙醛生成 1,3-丙二醇,是微生物转化甘油生成 1,3-丙二醇的另一关键酶。作者已经成功地构建了利用甘油转化为 1,3-丙二醇的重组大肠杆菌 JM109(pUCtac-dhaB-yqhD)。以 50 g/L 甘油为惟一碳源的发酵培养基,经 IPTG 诱导后 1,3-丙二醇产量为 38.0 g/L;考虑到工业化生产,利用 IPTG 诱导的方法成本较高,采用温控载体

pHsh 代替原来的 pUCtac 载体,温控载体 pHsh 通过温度诱导表达,降低了生产成本。另外温控载体 pHsh 整个质粒仅为 2.3 kb,有利于增加其拷贝数和容量,可以插入较大的外源基因片断,并且外源蛋白质在大肠杆菌中高效表达后不易形成包含体,利用温控载体 pHsh 可以使编码 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶基因 yqhD 得到高效表达,为构建适合工业化生产 1,3-丙二醇的新型基因工程菌打下了良好的基础。

参考文献:

[1] Biebl H, Menzel K, Zeng A P, et al. Microbial production of 1,3-propanedio [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1999, 52: 289—297.

[2] Cameron D C, Altaras N E, Hoffman M L, et al. Metabolic engineering of propanediol pathways [J]. **Biotechnol Prog**, 1998, 14: 116—125.

[3] Skraly F A, Lytle B L, Cameron D C. Construction and characterization of a 1,3-propanediol operon [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1998, 1: 98—105.

[4] Laffend L A, Nagarajan V, Nakamura CE, et al. Bioconversion of a fermentable carbon source to 1, 3-propanediol by a single microorganism[P]. 美国专利:USP 6025184, 2000-06-05.

[5] Nakamura C E, Whited G M. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol [J]. **Current Opinion in Biotechnology**, 2003, 14: 454—459.

[6] Joseph Sambrook, David W Russel. Molecular Cloning[M]. Washington: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

[7] Johnson E A, Lin E C. *Klebsiella pneumoniae* 1, 3-propanediol; NAD⁺ oxidoreductase[J]. **J Bacteriol**, 1987, 169: 2050—2054.

[8] Emptage M, Haynie S L, Laffend L A, et al. Process for the biological production with high titer[P]. USP:USP 6514733, 2003-02-04.

(责任编辑:李春丽)

(上接第 71 页)

参考文献:

[1] Cui Y Q, Van der Lans R G J M, Luyben K C A M. Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1998, 57: 745—790.

[2] Maria P. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes [J]. **Biotechnology Advances**, 2004, 22: 189—259.

[3] Feng Y Y, He Z M, Ong S L, et al. Optimization of agitation, aeration, and temperature conditions for maximum β -mannanase production [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2003, 32: 282—289.

[4] Kim D H, Yang B K, Jeong S C, et al. Production of a hypoglycemic, extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom, *Phellinus linteus*[J]. **Biotechnology Letters**, 2001, 23: 513—517.

[5] Shen Y C, Chou C J, Wang Y H, et al. Anti-inflammatory activity of the extracts from mycelia of *Antrodia camphorata* cultured with water-soluble fractions from five different *innamomum* species [J]. **FEMS Microiology Letters**, 2004, 231: 137—143.

[6] Liua J J, Huang T S, Hsu M L, et al. Antitumor effects of the partially purified polysaccharides from *Antrodia camphorata* and the mechanism of its action [J]. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2004, 201: 186—193.

[7] 余素萍,张劲松,杨焱,等. 灵芝胞内多糖高产菌株 G7 深层发酵工艺的研究[J]. **中国食用菌**, 2004, 6: 36—39.

[8] 杜巍, 华泽钊. 灰树花的深层培养工艺及其影响因素的研究[J]. **农业工程学报**, 2004, 20(2): 231—234.

[9] Andraea T B, Judith S S, Robert M H, et al. Mushrooms, tumors, and immunity [J]. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 1999, 221: 281—293.

[10] 孙克, 许正宏, 敖宗华, 等. 灰树花发酵条件的研究[J]. **药物生物技术**, 2002, 9 (2) : 91—93.