

文章编号:1673-1689(2007)05-0075-04

枯草芽孢杆菌葡萄糖脱氢酶基因的克隆及高效表达

徐 娴, 谢承佳, 何冰芳

(南京工业大学 制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009)

摘 要: 扩增了枯草芽孢杆菌中的葡萄糖脱氢酶基因(*gdh*), 构建了诱导型表达载体 pET-*gdh*, 导入 *E. coli* BL21(DE3) 后获得了高效表达葡萄糖脱氢酶基因的重组菌 BL21/pET-*gdh*。经过诱导时间、诱导温度参数的优化, IPTG 诱导后重组菌 BL21/pET-*gdh* 的葡萄糖脱氢酶比酶活高达 9.65 U/mg 蛋白, SDS-PAGE 电泳分析表明, 重组蛋白质表达量占全菌胞内可溶性蛋白的 53%, 实现了葡萄糖脱氢酶基因的高效表达, 为氧化还原酶催化系统提供高效率的 NADP⁺ 与 NADPH 循环奠定了基础。

关键词: 葡萄糖脱氢酶; 葡萄糖脱氢酶基因; 高效表达; 辅酶再生

中图分类号: Q 815

文献标识码: A

Cloning and Effective Expression of Glucose Dehydrogenase Gene from *Bacillus subtilis* in *E. coli*

XU Xian, XIE Cheng-jia, HE Bing-fang

(College of Life Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract: Glucose dehydrogenase gene(*gdh*) was amplified from genome DNA of *Bacillus subtilis* by PCR, and inserted into pET22b to construct recombinant plasmid pET-*gdh* which was then transformed into *E. coli* BL21(DE3). The highest specific activity of GDH in *E. coli* was 9.65 U/mg protein by the optimization of induction conditions, including time and temperature parameters. SDS-PAGE showed that the expressed GDH accounted for 53% of total soluble protein in *E. coli*. The recombinant BL21/pET-*gdh* could serve as an NADP⁺-NADPH regeneration in biotransformation with a high efficiency of cofactor regeneration.

Key words: glucose dehydrogenase; *gdh*; effective expression; coenzyme regeneration

氧化还原酶广泛应用于催化制备手性醇、羧酸、氨基酸等方面, 大多数的氧化还原酶催化反应一般都需要辅酶 NAD(P)H 的参与, 这些辅酶价格昂贵, 限制了氧化还原酶的应用。利用酶法再生还原态辅酶是氧化还原酶应用的关键, 目前研究最广

泛的酶是甲酸脱氢酶和葡萄糖脱氢酶。葡萄糖脱氢酶与甲酸脱氢酶相比, 具有比较高的特异性和稳定性, 不仅适用于 NADH 再生, 还可再生更为昂贵的 NADPH, 具有更广泛的应用前景^[1-2]。美国施贵宝公司在利用白地霉脱氢酶不对称还原 4-氯-3-

收稿日期: 2006-04-18.

基金项目: 国家 973 计划项目(2003CB716004); 江苏省自然基金项目(BK2006178).

作者简介: 徐娴(1983-), 女, 江苏南京人, 生物化工专业硕士研究生, Email: 11f0127@sina.com

通讯作者: 何冰芳(1962-), 女, 浙江黄岩人, 教授, 理学博士, 主要从事应用微生物方面的研究.

Email: bingfanghe@njut.edu.cn

羧基丁酸甲酯合成(s)-4-氯-3-羟基丁酸甲酯的规模化生产中,有效地利用了葡萄糖脱氢酶进行辅酶 NADP⁺-NADPH 的循环,该反应的产率高达 95%,产品为降胆固醇药物的手性原料^[3]。

葡萄糖脱氢酶(glucose dehydrogenase, GDH, EC1.1.1.47)主要来自于芽孢杆菌属,对 NAD⁺ 或 NADP⁺ 都有很高的比活性。它特异地催化 β -D-葡萄糖生成葡萄糖酸(D-葡萄糖- δ -内酯),并以 NAD(P)⁺ 作为辅基,广泛应用于 NADPH 再生体系中。但是一般野生菌中葡萄糖脱氢酶的酶活低,因此采用基因工程技术对葡萄糖脱氢酶进行克隆和高表达是解决氧化还原酶辅酶再生的关键^[3]。

作者扩增了枯草芽孢杆菌中的葡萄糖脱氢酶基因(*gdh*),构建了诱导型表达载体并在大肠杆菌中进行了高效表达,进行了诱导时间、诱导温度等参数的研究及优化,为构建辅酶 NAD(P)H 再生体系奠定了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 表达载体 pET22b(+),枯草芽孢杆菌 NA、宿主大肠杆菌 BL21(DE3)均由作者所在实验室保存。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶 *Nde*I、*Hind*Ⅲ、*T₄* DNA 连接酶、小量胶回收试剂盒、DNA Marker;购自宝生物(大连)生物工程有限公司(TaKaRa);异丙基硫代 β -D-半乳糖苷(IPTG):购自上海生物工程公司;PCR 引物:上海英峻生物技术有限公司合成;其余试剂和药品均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 培养基及培养条件 LB 培养基^[4]用于细菌培养,培养温度 37℃。氨苄青霉素质量浓度为 100 μ g/mL。

1.2.2 枯草芽孢杆菌基因组 DNA 的提取 提取方法按文献[4-5]进行操作。

1.2.3 表达载体 pET-*gdh* 的构建 根据 GENBANK 中登记号为 M12276 的葡萄糖脱氢酶基因设计引物: *gdh* F: 5'-GCGCATATGTATCCG-GATTTAAAAGG-3'带有 *Nde*I 酶切位点; *gdh* R: 5'-ATAAAGCTTTTAACCGCGGCCTGC-3'带有 *Hind*Ⅲ酶切位点。PCR 扩增条件:95℃预变性 3 min;再按下列参数进行循环反应,95℃变性 30 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,30 个循环;72℃延伸 5 min,冷却至 4℃,结束反应。琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

以枯草芽孢杆菌 NA 基因组作为模板,PCR 扩增出葡萄糖脱氢酶基因。经 *Nde*I 和 *Hind*Ⅲ酶切后与进行相同酶切的 pET22b 相连(去除了 pET22b 的信号肽 pB1 序列),构建了重组质粒 pET-*gdh*。重组质粒经热休克法^[4]转化入 *E. coli* BL21(DE3)。以载体所带氨苄青霉素抗性筛选阳性转化子。阳性重组子采用菌落 PCR^[6]和提取质粒双酶切进行鉴定。质粒 DNA 的分离纯化、感受态细胞的制备等参考文献[4]及试剂盒说明书进行。

1.2.4 葡萄糖脱氢酶活力测定

1) 重组细胞粗酶液制备:重组质粒 pET-*gdh* 接种至含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基,37℃,180 r/min 培养过夜后,以体积分数 1% 接种量接种至新鲜 LB 培养基中(100 μ g/mL 氨苄青霉素),37℃,200 r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.9 时,加入诱导剂 IPTG(终浓度为 1 mmol/L),诱导一定时间后测定葡萄糖脱氢酶活力。取经诱导的菌液离心(4℃,5 000 r/min 离心 15 min),菌泥用 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.0)重悬,超声破碎细胞(功率 300 W,超声 5 s,间歇 5 s,共 5 min),4℃,11 000 r/min 离心 15 min),测定上清液中葡萄糖脱氢酶的酶活。

2) 葡萄糖脱氢酶活力测定:酶反应体系包括 75 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),2.0 mmol/L NADP⁺,0.1 mol/L D-葡萄糖,340 nm 处测定吸光值。由标准曲线计算反应生成 NADPH 的量。每分钟生成 1 μ mol NADPH 所需要的酶量定义为一个酶活单位 U。蛋白质含量测定采用 Bradford 法^[7],以牛血清白蛋白 BSA 为标准品。

3) NADPH 标准曲线的测定:配制不同浓度的 NADPH 标准溶液(0~1 mmol/L),在 340 nm 处测定吸光值,绘制标准曲线,回归方程为:NADPH 浓度(mmol/L)Y=0.005 87+0.336 54X(OD₃₄₀ 吸光值),R=0.999 72。

1.2.5 SDS-PAGE 检测目的蛋白质 取诱导后的菌液超声破碎,离心取上清液进行 SDS-PAGE 分析。采用 4 g/dL 的浓缩胶,12.5 g/dL 的分离胶,电泳后凝胶用考马斯亮蓝 R250 染色。

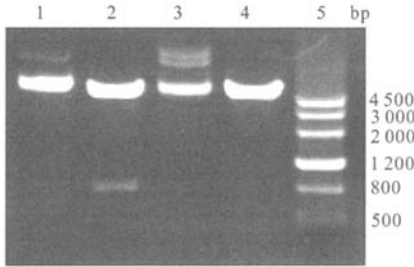
2 结果与讨论

2.1 表达载体 pET-*gdh* 的构建

按照方法 1.2.3 扩增 *gdh* 基因,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测在 780 bp 左右有一明显条带,与已报道的 *gdh* 序列大小一致^[9],经测序之后与 GENBANK 中登记号 M12276 的 GDH 的基因序列

相似性为 97%,氨基酸序列与模式菌枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*168 (GENBANK 登记号 NP_388275)中的氨基酸序列相似性 100%。

根据方法 1.2.3 构建重组载体,提取重组子质粒分别用 *Nde*I 和 *Hind* III 进行双酶切鉴定。图 1 显示 pET-*gdh* 在 780 bp 左右比空载体多出一条带,与插入的外源基因 *gdh* 大小一致,表明外源基因已成功地插入到载体 pET22b 中。



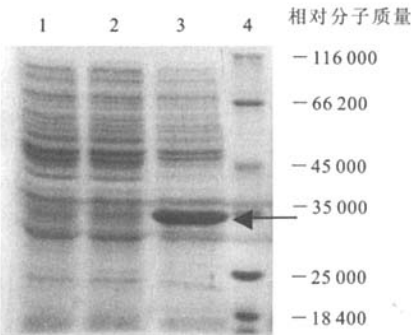
1: pET-*gdh*; 2: pET-*gdh*/*Nde*I + *Hind* III; 3: pET22b; 4: pET22b/*Nde*I + *Hind* III; 5: Marker III

图 1 pET-*gdh* 重组质粒的双酶切电泳图

Fig. 1 Digestion of recombinant plasmid pET-*gdh*

2.2 葡萄糖脱氢酶基因的诱导表达

重组菌 BL21/pET-*gdh* 经 IPTG 诱导表达之后的葡萄糖脱氢酶酶活为 7.07 U/mg 蛋白质,而空宿主基本不存在葡萄糖脱氢酶酶活,未经诱导的重组菌本底表达也较低(分别为 0.084 U/mg 和 0.415 U/mg 蛋白质)。SDS-PAGE 电泳结果见图 2, BL21/pET-*gdh* 经 IPTG 诱导表达之后在 30 000 左右处有明显的葡萄糖脱氢酶表达条带,重组蛋白质表达量占全菌可溶性蛋白质的 53%。根据比酶活和 SDS-PAGE 的结果,表明 GDH 在重组菌 BL21/pET-*gdh* 中得到了高效表达。



1: pET22b; 2: pET-*gdh*; 3: pET-*gdh* + IPTG; 4: 蛋白质 Marker

图 2 pET-*gdh* 的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant plasmid pET-*gdh* expression in *E. coli*

2.3 诱导条件的优化

2.3.1 诱导时间的优化 按方法 1.2.4 接种重组

菌,加入 IPTG 诱导分别表达 2,4,6,8,10 h。图 3 表明,在加入 IPTG 后诱导 4 h 时酶活达到最高,6 h 后酶活快速下降。在诱导后期可能由于蛋白质聚集形成包涵体或者细胞内蛋白酶降解重组蛋白质等原因导致了酶活的下降。

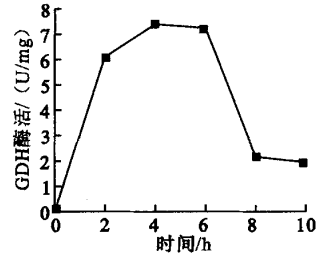


图 3 诱导时间对酶活的影响

Fig. 3 Effect of IPTG inducing time on enzyme activity

2.3.2 诱导温度的优化 按 1.2.4 方法接种重组菌,加入 IPTG 后分别在 20,25,30,37,40 °C 下诱导 4 h,测定 GDH 酶活。图 4 显示,25 °C 诱导 GDH 的酶活最高(9.65 U/mg)。这可能是因为低温诱导可以降低蛋白质合成速率,使蛋白质正确折叠以减少包涵体的产生,增加了目的蛋白质的可溶性。

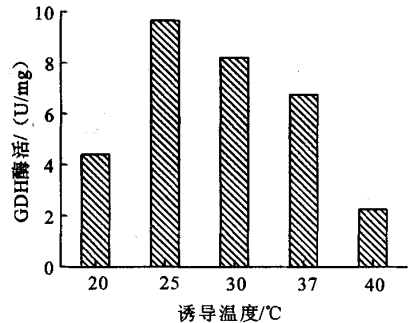


图 4 诱导温度对酶活的影响

Fig. 4 Effect of IPTG inducing temperature on enzyme activity

Vasanth 和 Lampel^[9-10] 分别构建了带有 *Bacillus subtilis* 葡萄糖脱氢酶基因的重组质粒 pEF1 和 pEF60,在大肠杆菌中表达 GDH 比酶活为 1.06 U/mg 和 0.69 U/mg 蛋白质。Zhinan Xu 等^[7] 将巨大芽孢杆菌的 *gdh* 基因(pQE30-*gdh*223)在 *E. coli* M15 中进行表达,比酶活为 2.16 U/mg 蛋白质。Ying Liu 等^[11] 构建了另一重组菌 *E. coli* M15 (pQE-*gdh*0310),该 *gdh* 基因来自 *B. megaterium* ZJU0310,重组菌酶活为 2.06 U/mg 蛋白质。本研究中 GDH 比酶活为上述报道中的重组菌酶活的 4 倍以上。乔建军等报道的在大肠杆菌中高效表达的葡萄糖脱氢酶,酶活达 7.8 U/mg 蛋白质,而作者构建的重组菌 BL21/pET-*gdh* 的表达酶活为 9.65 U/mg 蛋白质,比其还要高出近 24%,并且表达的

重组蛋白质占全菌可溶性蛋白质的一半以上,酶活和蛋白质表达量均高于现有报道中的表达 *gdh* 基因的工程菌。

考虑到不同基因在不同载体及宿主中的匹配性的差异,作者在重组菌构建过程中同时选用了 pUC 和 pET 载体,宿主也选用了 DH5 α 和 BL21 两种(pET 因启动子原因,仅采用了 BL21 为宿主)。重组菌 DH5 α /pUC-*gdh*, BL21/pUC-*gdh* 均显示了较低酶活,此两菌本底表达较高,且诱导前后酶活相近,这可能是本底表达较高造成对细胞的毒性而导致质粒不稳定所致。pET 质粒拷贝数较 pUC 低,低拷贝使得目的基因稳定,减少了本底转录水平,提

高了质粒稳定性,目的基因得到了高效表达。

3 结 语

实现了枯草芽孢杆菌的葡萄糖脱氢酶基因在大肠杆菌中的高效表达。在此基础上可进一步进行高密度发酵以实现葡萄糖脱氢酶的大量制备,并将其与合适的氧化还原酶如乙醛还原酶(ALR)、亮氨酸脱氢酶(LeuDH)、丙氨酸脱氢酶(AlaDH)等进行偶联^[14-16],构建双酶偶联反应体系,促进氧化还原酶在生物催化工业中的实际应用。

参考文献(References):

- [1] 张 翀,邢新会.辅酶再生体系的研究进展[J]. 生物工程学报, 2004, 20(6): 811-816.
ZHANG Chong, XING Xin-hui. Research progress in cofactor regeneration systems[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2004, 20(6): 811-816. (in Chinese)
- [2] Zhao H, Wilfred A van der Donk. Recent developments in pyridine nucleotide regeneration[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, 14:421-426.
- [3] 许建和,杨立荣,孙志浩,等.迅速发展中的不对称生物催化技术[J]. 生物加工过程, 2005, 3(3):1-6.
XU Jian-he, YANG Li-rong, SUN Zhi-hao, et al. Rapid advancement of asymmetric biocatalysis technology[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2005, 3(3):1-6. (in Chinese)
- [4] Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [5] 傅晓燕,陈卫,夏雨,等.带自身启动子的 *bgaB* 基因在枯草芽孢杆菌中的表达[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(3): 44-51.
FU Xiao-yan, CHEN Wei, XIA Yu, et al. The expression of *bgaB* gene with its promoter in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005, 24(3):44-51. (in Chinese)
- [6] 陈书霞,王晓武,房玉林.单菌落 PCR 法直接快速鉴定重组克隆[J]. 微生物学通报, 2006, 33(3):52-56.
CHEN Shu-xia, WANG Xiao-wu, FANG Yu-lin. Rapid characterization of recombination clone by PCR screening of individual bacterial colonies[J]. *Microbiology*, 2006, 33(3):52-56. (in Chinese)
- [7] Xu Z N, Jing K J, Liu Y, et al. High-level expression of recombinant glucose dehydrogenase and its application in NADPH regeneration[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2007, 34(1):83-90.
- [8] Bradford M. A rapid and Sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein Clee bineling[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72:248-255.
- [9] Lampel K A, Uratani B, Chaudhry G R, et al. Characterization of the developmentally regulated *Bacillus subtilis* glucose dehydrogenase gene[J]. *Journal of Bacteriology*, 1986, 166 (1):238-243.
- [10] Vasantha N, Uratani B, Ramaley R, et al. Isolation of a developmental gene of *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1983, 80:785-789.
- [11] Liu Y, Xu Z N, Jing K J, et al. Asymmetric reduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate to ethyl(R)-4-chloro-3-hydroxybutanoate with two co-existing, recombinant *Escherichia coli* strains[J]. *Biotechnology Letters*, 2005, 27:119-125.
- [12] Endo T, Koizumi S. Microbial conversion with cofactor regeneration using genetically engineered bacteria[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2001, 343: 521-526.
- [13] Kataoka M, Kita K, Wada M, et al. Novel bioreduction system for the production of chiral alcohols[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 62:437-445.
- [14] Lu Y, Mei L H. Co-expression of P450 BM3 and glucose dehydrogenase by recombinant *Escherichia coli* and its application in an NADPH-dependent indigo production system[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2007, 34(3):247-253.

(责任编辑:李春丽)