

文章编号: 1673-1689(2006)05-0015-05

嗜热厌氧乙醇杆菌组氨酸融合双活性乙醇脱氢酶的克隆、表达和酶学性质

蒋宇¹, 邵蔚蓝^{1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 210046; 2. 南京师范大学 生命科学学院, 江苏 南京 210097)

摘要: 乙醛脱氢酶和乙醇脱氢酶是嗜热厌氧乙醇菌 *Thermoanaerobacter ethanolicus* 乙醇代谢途径中的关键酶。根据高同源性的 NAD(P)⁺ 依赖型 II 型乙醇脱氢酶 (S-ADH) 的序列设计引物, 从 *T. ethanolicus* JW200 基因组中 PCR 扩增出编码 S-ADH 的基因, 插入带组氨酸标签的 pET-20(b), 测序获得基因大小为 1 059 bp, 并在大肠杆菌 JM109 (DE3) 中表达。表达产物经 Ni 亲和柱提纯达电泳纯。带组氨酸标签的重组 NAD(P)⁺ 依赖型乙醇脱氢酶具乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶双活性, 能将乙酰辅酶 A 转化成乙醇。带组氨酸标签的重组酶酶学性质为乙醛脱氢酶活性最适值为 pH 8.4, 最适温度 70 °C; 乙醇脱氢酶活性正、逆反应分别最适 pH 8.0, 最适 T 55 °C; 最适 pH 8.9, 最适为 T 60 °C。以乙酰辅酶 A (Acetyl-CoA) 为底物, 该酶的 K_m 为 3.32 mmol/L, V_{max} 为 12.5 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 。 *T. ethanolicus* JW200 中双活性 S-ADH 的首次发现, 建立了该菌乙醇代谢途径中从乙酰辅酶 A 到的乙醇的另一条通路。

关键词: 嗜热厌氧乙醇菌; 双活性; 乙醛脱氢酶; 乙醇脱氢酶

中图分类号: Q 814

文献标识码: A

Cloning, Expression and Characterization of Histag Fusion Biofunctional Alcohol Dehydrogenase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200

JIANG Yu¹, SHAO Wei-lan^{1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. School of Life Science, Nanjing Normal School, Nanjing 210097, China)

Abstract: *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200, ethanol and carbon dioxide, production microorganism which is regulated by several key enzymes involved in ethanol formation, including aldehyde dehydrogenase and alcohol dehydrogenases. The 1059bp *adhB* encoding S-ADH was amplified by PCR by primers based on high conserved sequences, and the recombinant S-ADH was expressed in *E. coli* with histag. The fusion protein was purified by affinity chromatography and characterized as a bifunctional aldehyde-alcohol dehydrogenase. The temperature for the maximum initial activity in a 10-min assay of the purified histag fusion S-ADH, was observed around 70 °C, 55 °C and 60 °C, with acetyl-CoA, aldehyde and ethanol as substrate respectively. The pH optimum was 8.0 and 8.9 with aldehyde and ethanol as substrate respectively, and 8.4 with acetyl-CoA as substrate. The histag fusion S-ADH has K_m

收稿日期 2005-09-28; 修回日期 2005-12-13.

基金项目: 国家“973”计划子项目(2004CB719600); 国家自然科学基金项目(30170511).

作者简介: 蒋宇(1978-), 女, 浙江宁波人, 发酵工程博士研究生。

of 3.32 mM, and V_{\max} of 12.5 mol/(min · mg) towards acetyl-CoA. The results suggested that a new pathway in ethanol formation in *T. ethanolicus* JW200.

Key words: *Thermoanaerobacter ethanolicus*; bifunctional; alcohol dehydrogenase; aldehyde dehydrogenase

迄今为止,在嗜热细菌中已发现 I 型和 II 型两种乙醇代谢途径,分别以 *Clostridium thermocellum* 和 *Thermoanaerobacter brockii* 之类的细菌为代表,前者只含 NAD/NADH 依赖 I 型乙醇脱氢酶 (Primary alcohol dehydrogenase, P-ADH; 1°ADH), 而后者同时含 P-ADH 和 NADP/NADPH 依赖 II 型乙醇脱氢酶 (Secondary alcohol dehydrogenase, S-ADH; 2°ADH)^[1], P-ADH 和 S-ADH 以分别对正醇类和异醇类的强亲和力和为区别。

Thermoanaerobacter ethanolicus JW200 是能广泛利用五碳糖和六碳糖的嗜热厌氧细菌。底物质量浓度小于 1 mg/dL 时,以乙醇和 CO₂ 为主要发酵产物,乙醇产量高达 1.95 mol/mol 葡萄糖和 1.45 mol/mol 木糖。底物质量浓度大于 1 mg/dL,主要发酵产物转向乙酸和乳酸^[2]。乙醛脱氢酶和乙醇脱氢酶是该菌乙醇代谢系统中的关键酶,Bryant 等人 20 世纪 80 年代初开始研究这些关键酶以及它们在乙醇代谢中的调控作用,已从天然菌株中提纯并分析了 P-ADH 和 S-ADH,但未克隆^[2-3],也未发现 S-ADH 具双活性。据报道,S-ADH 的活性贯穿该菌的整个生长过程,而 P-ADH 只以低水平维持在对数生长后期到平衡期^[4]。

Zeikus 等人最先在 *Thermoanaerobacter* sp. 39E 中发现 S-ADH 具有乙醛脱氢酶和乙醇脱氢酶的双活性,并已克隆 (accession: U49975)^[5-6]。研究利用 GeneBank 中高同源性的 S-ADH 序列克隆并纯化了重组 S-ADH,分析其酶学性质,初步研究了该菌的乙醇代谢途径。

1 材料与方法

1.1 实验材料

嗜热产乙醇细菌 *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200 (ATCC 31550) 由美国佐治亚大学微生物系 Wiegel 教授分离并赠送;大肠杆菌 JM109 和 JM109 (DE3) 购于 Promega,质粒 pET-20b(+) 购于 Novagen 公司。

限制性内切酶 Sma I, Xho I, T₄ DNA 连接酶、DNA 相对分子质量标准 和 Pyrobest DNA 聚合酶均

购自宝生物工程公司 (TaKaRa), Rapid Affinity Purification Kit 购自 Novagen 公司;溶菌酶、IPTG、氨苄青霉素 (Amp)、乙酰辅酶 A 购自 Sigma 公司;NAD、NADH、NADPH、NADP、DTT 购自罗氏公司;SDS-PAGE 相对分子质量标准购自 Promega;QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit 和 QIAquick Gel Extraction Kit 购自 Qiagen 公司。

1.2 培养基和培养条件

T. ethanolicus 培养基配方及培养条件见参考文献 [7]。

1.3 基因操作以及乙醇脱氢酶的克隆

离心收集细胞培养液 200 mL,基因组 DNA 提取、DNA 限制性内切酶水解、电转化感受态细胞制备和高效电转化方法参考文献 [8]。质粒制备、PCR 产物纯化、凝胶回收 DNA 等按照 Qiagen 试剂盒说明书操作。

根据 GeneBank 中高同源性的 S-ADH 的序列设计 PCR 引物,N 端引物 5'-GGGAATTCATGA AAGGTTTTGCAATGCTC-3',起始密码子 ATG 前加 EcoR I 位点,C 端引物 5'-TTTCTAGATTA CTCGAGTATTACAACAGGTTTGATTAGGT-3',将终止密码子前 6 个改成 Xho I 位点,便于融合组氨酸标签,终止密码子后另加 Xba I 位点,为不融合组氨酸标签克隆备用。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。以 *T. ethanolicus* 基因组为模板,热启动 PCR 扩增:95 °C 变性 5 min,加 Pyrobest DNA 聚合酶和矿物油,94 °C 变性 50 s,54 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 2 min,循环 35 次,72 °C 延伸 10 min,4 °C 保温。PCR 产物纯化后 Xho I 37 °C 消化,pET-20b(+) 用 EcoR V 和 Xho I 37 °C 双酶切,割胶回收上述两个酶切产物,乙醇浓缩,以适当比例混合 16 °C 连接过夜。电转化大肠杆菌 JM109, Xho I 单酶切和 Nco I, Xho I 双酶切分析转化子,获重组表达载体 pET-20b-adhB,由上海基康生物有限公司测序。

1.4 组氨酸融合 adhB 基因在大肠杆菌 JM109 (DE3) 中的表达和纯化

重组质粒 pET-20b-adhB 转化大肠杆菌 JM109 (DE3),挑取单菌落至含 50 μg/mL Amp 的 LB 试

管 37 °C 培养至 OD_{600} 0.6 ~ 1.0, 按 1% 转接 200 mL 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp 的 LB 培养液培养至 OD_{600} 0.4 ~ 1.0, 加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 30 °C 诱导 2 ~ 3 h, 冰浴 5 min. 5 000 g , 离心 5 min 收集细胞。用 TE 缓冲(10 mmol/L Tris, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA), ddH_2O 各洗涤 1 次。20 mL 1 \times Binding buffer (40 mmol/L 咪唑, 4 mol/L NaCl, 160 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9) 重悬, 1 mg/mL 溶菌酶室温下保温 30 min. 14 000 g , 4 °C 离心 30 min, 收集上清液。

准备 Ni^{2+} 亲和柱 1 mL, 按 pET System Manual (Novagen) 纯化目标蛋白。目标蛋白用 buffer A (20 mmol/L Tris HCl, pH 8.5, 10% 甘油, 0.02% NaN_3 , 1 mmol/L DTT) 透析。-20 °C 保存。

聚丙烯酰胺凝胶电泳(10 mg/dL 分离胶, 3 mg/dL 堆积胶) 检测重组 *E. coli* JM109 (DE3) (pET-20b-*adhB*) 诱导粗酶液、重组 *E. coli* JM109 (DE3) (pET-20b-*adhB*) 未诱导粗酶液、*E. coli* JM109 (DE3) (pET-20b) 粗酶液、S-ADH。

利用核酸蛋白检测仪(GENEQUANT) 测定蛋白浓度。

1.5 酶活测定

乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶活性测定见参考文献 [5]。

1.6 重组酶酶学性质分析

1.6.1 最适反应 pH 测定 在 pH 7 ~ 9 范围内, 测定不同 pH 下的酶活力。Tris 缓冲在反应温度下校正 pH。以不加底物的反应体系作为对照。以最高酶活为 100%, 计算相对酶活力。

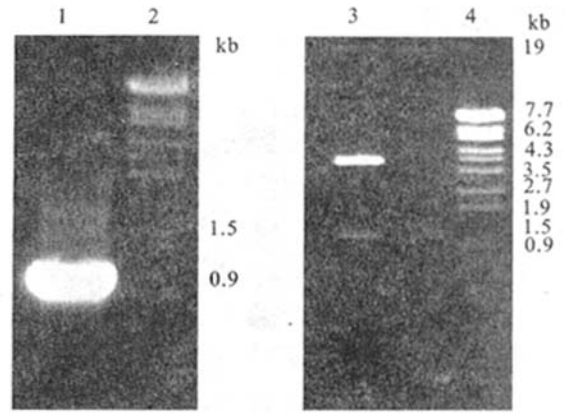
1.6.2 最适反应温度测定 在 50 ~ 80 °C 范围内, 每隔 5 °C 测定酶活。以不加底物的反应体系作为对照。以最高酶活为 100%, 计算相对酶活力。

1.6.3 酶动力学参数测定 以乙酰辅酶 A 为底物。双倒数作图法, 计算 K_m 和 V_{max} 。

2 结果与分析

2.1 乙醇脱氢酶的克隆和序列分析

PCR 扩增产物用 1 mg/dL 琼脂糖凝胶电泳检测到 1 kb 左右片段如图 1。阳性转化子 *Nco* I, *Xho* I 双酶切产物用 1 mg/dL 琼脂糖凝胶电泳检测, 可见 3.7 kb 和 1 kb 左右两条片段, 分别与线性 pET-20b (+) 和 PCR 产物 *adhB* 大小一致如图 1, 可见插入片段正确。



1. *adhB* 的 PCR 产物; 2. DNA 相对分子质量标准 (λ -EcoT14 digest); 3. pET-20b-*adhB* 重组质粒 *Nco* I, *Xho* I 双酶切产物; 4. 标准 DNA 相对分子质量 (λ -EcoT14 digest)

图 1 1 mg/dL 琼脂糖电泳检测 DNA

Fig. 1 1 mg/dL agarose gel electrophoresis of DNA

测序获得基因大小为 1 059 bp, 序列测定结果表明该基因与 *T. tengcongensis* 基因组中的一个基因(Threonine dehydrogenase and related Zn-dependent dehydrogenase) 的同源性为 97.7%, 与 *T. brockii* 的 S-ADH 的同源性为 97.2%, 与 *T. sp.* 39E 的 *adhB* 的同源性为 96.9%, 因此确定为 *T. ethanolicus* 基因 *adhB*。

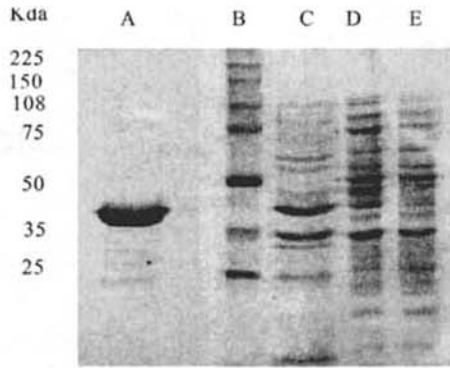
2.2 组氨酸融合 S-ADH 在大肠杆菌中的表达和纯化

pET-20b(+) 带 *T7* 强启动子, 多克隆位点前后分别带大肠杆菌识别的信号肽和 6 个组氨酸标签, 可根据需要表达融合蛋白。为提高表达量, *adhB* 未融合信号肽。

200 mL 培养液获得 360 mg 菌体(湿重), 总蛋白 262.8 mg。根据亲和柱说明书要求, Ni^{2+} 亲和柱缓冲液不能含 EDTA 和 DTT, 而 EDTA 能螯合有助于细胞壁稳定的 Mg^{2+} , 便于溶菌酶作用, 还原剂 DTT 有助于稳定对氧敏感的多数的脱氢酶。所以在洗涤菌体时最后用水洗去残留 TE, 酶从亲和柱洗脱后立即用对酶保护能力强的 buffer A 透析。未透析酶液 -20 °C 冻存过夜发生了不可逆变性。若透析采用 pH 8.5 以下的缓冲均发生絮凝, 补加 10% 甘油、辅酶 NADP, 或在厌氧状态下透析均未好转, 与天然提纯的该酶有偏差 [2], 提示 Histag 可能改变该酶的部分性质。

SDS/PAGE 检测结果如图 2, S-ADH-Histag 经 Ni^{2+} 亲和柱纯化电泳纯, 40 000 左右, 与文献报道一致 [2]。IPTG 诱导 *adhB* 在大肠杆菌 JM109(DE3) 中表达效果明显, 与未诱导相比, 与纯 S-ADH-Histag 平齐处可见异常条带。未诱导粗酶液较空载质粒

粗酶液也有浅带,表明 30 °C 诱导 *adhB* 仍有本底表达。



1. S-ADH-Histag 纯酶; 2. 蛋白质相对分子质量标准; 3. 含 pET-20b-*adhB* 的重组菌 *E. coli* JM109(DE3) 诱导后全细胞蛋白; 4. 含 pET-20b-*adhB* 的重组菌 *E. coli* JM109(DE3) 未诱导全细胞蛋白; 5. 空载 *E. coli* JM109(DE3) 全细胞蛋白

图2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

ig.2 SDS-PAGE of recombinant S-ADH-Histag

2.3 温度和 pH 对 S-ADH-Histag 酶活性的影响

乙醇脱氢酶对氧气敏感, 5 mmol/L DTT 的存在有助于提高酶活. NADPH 很不稳定, 在不同的 pH 和温度下的氧化速度不一致, 故每个 pH 和温度均设对照. 该酶以 NADP/NADPH 为专一辅酶, 不能以 NAD/NADH 为辅酶。

由图 3 和图 4, 乙醛脱氢酶正反应最适反应 pH 为 8.4, 最适反应温度 70 °C; 乙醇脱氢酶正、逆反应最适条件分别为 pH 8.0, 55 °C; pH 8.9, 60 °C。图 3 中以乙酰辅酶 A、乙醛和乙醇为底物时的 100% 酶活分别为 16.2 U/mg (pH 8.5), 47.1 U/mg (pH 8.0), 8.5 U/mg (pH 8.9)。图 4 中上述底物的 100% 酶活分别为 4.2 U/mg (60 °C), 45.5 U/mg (60 °C) 8.3 U/mg (60 °C)。

S-ADH-Histag 重组蛋白很不稳定, 用 buffer A 在冰水中保存 2 d 无法检测到酶活, 与天然酶性质相差很大^[2], 可能是 Histag 造成的影响. 故该重组酶的温度稳定性和 pH 稳定性不具有参考价值, 数据未列出。

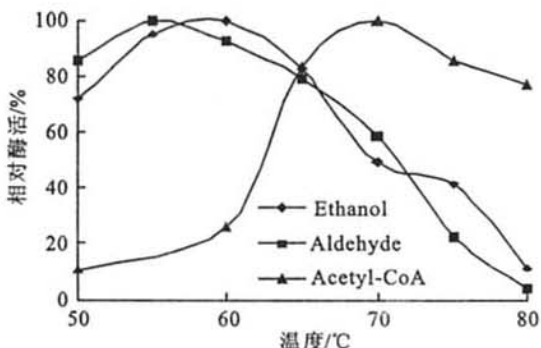


图3 温度对酶活力的影响

Fig.3 Effect of temperature on S-ADH-Histag activity

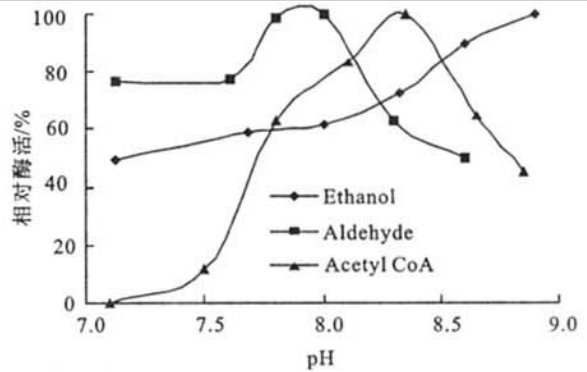


图4 pH 对酶活力的影响

Fig.4 Effect of pH on S-ADH-Histag activity

2.4 重组酶的动力学参数

由于这是个双活性酶, 两种活性的测定都依赖于 NADP 的生成或降低, 要单独分析某一种活性的动力学参数, 就必须排除另一种活性的干扰. 该重组酶乙醇脱氢酶正反应在 80 °C 下基本无活性, 乙醛脱氢酶正反应动力学常数在 80 °C 下测定, 故可排除反应产物乙醛被乙醇脱氢酶进一步利用造成 NADPH 继续下降的影响. 我们测得对乙酰辅酶 A 的 K_m 为 3.32 mmol/L, V_{max} 为 12.5 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 。

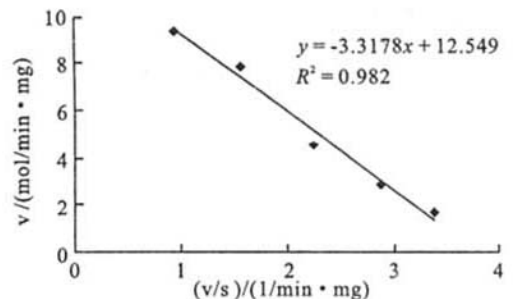


图5 酶的动力学参数

Fig.5 Kinetic properties of recombinant S-ADH-Histag from *T. ethanolicus* JW200

3 结果与讨论

T. ethanolicus JW200 是由佐治亚大学 Wiegel 教授分离的经典菌株^[9]. 当底物浓度小于 1 mg/dL 时, 以乙醇为主要有机产物^[2]. 该菌的 S-ADH 和 P-ADH 菌已被提纯^[2], 但未克隆, 且未发现 S-ADH 的双活性。

S-ADH 是来源于嗜热菌的胞内酶, 实验结果显示, 在 *T7* 强启动子下, 该嗜热菌的 S-ADH 在大肠杆菌表达量较高。

该酶对氧气敏感, 加 DTT 能提高酶活, 区别于对氧不敏感的 *T. sp.* 39E 的 S-ADH^[5]. 考虑到 Histag 的影响, 这种敏感是否是该酶的天然性质, 有待进一步证实. S-ADH-Histag 很不稳定, 在 pH 8.5 以下易发生絮凝, 只能通过提高 pH 逆转这种变性, 加 10% 甘油, 辅酶和 DTT 均不可逆转, 提示这种絮凝可能由 Histag 改变了该酶的等电点引起. 重组

酶极不稳定,甚至无法测定该酶的温度稳定性和 pH 稳定性,而该酶来源于嗜热菌,故推测重组酶的不稳定也是由于在 C 端融合了 Histag 造成的。Histag 对重组酶的影响受到酶本身高级结构的影响,故因酶而异。一般来说,在 C 端融合 Histag 的影响小于在蛋白的 N 端融合,因为 N 端对蛋白质的折叠以及高级结构的形成至关重要,也有利用这个原理开发的提高重组蛋白可溶性的融合表达系统,一般用于真菌或人来源的蛋白在 *E. coli* 中的表达,如 NusTag, TrxTag, GSTTag。对于该 S-ADH, Histag 的存在可能严重改变了该酶的天然高级结构,故影响了重组融合蛋白的稳定性。由于选用的 pET20b 载体没有切除 Histag 的蛋白酶位点,要进一步提高重组酶的稳定性,可考虑重新克隆到不带有 Histag 的载体中,通过热处理等纯化方式纯化,或改用有蛋白酶切除位点的 pET 载体表达重组酶,用蛋白酶切除 Histag。

重组酶对乙酰辅酶 A 的 K_m 为 3.32 mmol/L, V_{max} 为 12.5 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$, 而从天然菌提纯的酶对乙醛 K_m 为 44.8 mmol/L, V_{max} 为 26 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$; 对乙醇 K_m 为 49 mmol/L, V_{max} 为 13 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ [2]。表明该酶对乙酰辅酶 A 有很强的亲和力。

乙醇菌最适生长条件是 69 $^{\circ}\text{C}$, pH 5.8 ~ 8.5 [9]。以葡萄糖为底物, pH 在 5 ~ 8 范围内产乙醇 [4] 而该酶是碱性酶,合成乙醇方向最适 pH 分别在 8.0 (乙醇脱氢酶活性) 和 8.4 (乙醛脱氢酶活性) 提示乙醇合成从整体来看是多种关键酶联合作用,或受代谢网络调控。

本实验室也在该菌中检测到乙醛脱氢酶的活性,未检测到丙酮酸脱羧酶活性 [7]。该酶对乙酰辅酶 A 有强亲和力,与乙醛脱氢酶共同作用,将增强乙醇合成方向的反应。这种双活性 S-ADH 目前只在嗜热产乙醇细菌中发现,如 *T. sp.* 39E, *T. ethanolicus* JW200, *T. brockii*, 建立了该类菌乙醇代谢途径的另一条通路 (见图 5)。

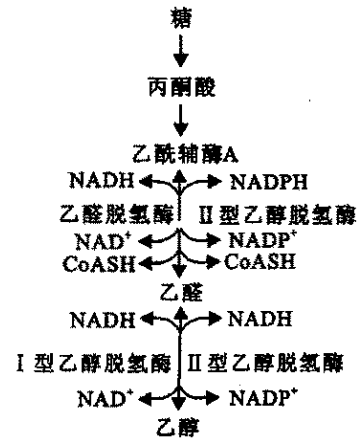


图 6 *T. ethanolicus* 乙醇代谢途径

Fig. 6 Ethanol pathway in *T. ethanolicus*

参考文献:

- [1] Zeikus J G, Ben-Bassat A, Ng T K, et al. *Thermobacteroides acetoethylicus* gen. nov. and spec. nov., a new chemoorganotrophic, anaerobic, thermophilic bacterium [J]. *Arch Microbiol*, 1981, 128: 365 - 370.
- [2] Bryant F, Weigel J, Ljungdahl L G. Purification and properties of primary and secondary alcohol dehydrogenases from *Thermoanaerobacter ethanolicus* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54: 460 - 465.
- [3] Bryant F, Ljungdahl L G. Characterization of an alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* active with ethanol and secondary alcohol [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1981, 100: 793 - 799.
- [4] Carreira L H, Weigel J, Ljungdahl L G. Production of ethanol from biopolymers by anaerobic, thermophilic, and extreme thermophilic bacteria. I. regulation of carbohydrate utilization in mutants of *Thermoanaerobacter ethanolicus* [J]. *Biotechnol Bioeng Symp*, 1983, 13: 183 - 191.
- [5] Burdette D, Zeikus J G. Purification of acetaldehyde dehydrogenase and alcohol dehydrogenases from *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E and characterization of the secondary-alcohol dehydrogenase (2° ADH) as a bifunctional alcohol dehydrogenase-acetyl-CoA reductive thioesterase [J]. *Biochem J*, 1994, 302: 163 - 170.
- [6] Burdette D, Vieille C, Zeikus J G. Cloning and expression of the gene encoding the *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E secondary-alcohol dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme [J]. *Biochem J*, 1996, 316: 115 - 122.
- [7] 蒋宇, 邵蔚蓝. 嗜热厌氧产乙醇杆菌乙醇代谢途径的初步研究 [J]. *南京师范大学学报: 自然科学版*, 2005, 28(3): 69 - 73.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] Weigel J, Ljungdahl L G. *Thermoanaerobacter ethanolicus* gen. nov., extreme thermophilic, anaerobic bacterium [J]. *Arch Microbiol*, 1981, 128: 343 - 348.