

甘油脱水酶再激活酶的克隆表达及活性鉴定

Cloning and Expression of the Genes Encoding Glycerol Dehydratase Reactivase and Identification of its Biological Activity

李雯君, 方柏山*, 洪 燕, 王晓霞, 林锦霞, 刘桂兰

LI Wen-Jun, FANG Bai-Shan*, HONG Yan, WANG Xiao-Xia, LIN Jin-Xia and LIU Gui-Lan

工业生物技术福建省高等学校重点实验室(华侨大学), 泉州 362021

Key Laboratory of Industrial Biotechnology Fujian Province(Hua Qiao University), Quanzhou 362021, China

摘 要 运用 PCR 技术从克雷伯氏菌的基因组中分别扩增得到了编码甘油脱水酶再激活酶 α 、 β 两个亚基的基因 *gdrA*、*gdrB*。将 *gdrA*、*gdrB* 克隆至 pMD-18T 载体上 构建克隆载体 pMD-*gdrAB*。经测序正确后 将 *gdrAB* 亚克隆至表达载体 pET-28a(+) 上 构建表达质粒 pET-28*gdrAB*。利用双抗生素筛选法 将 pET-28*gdrAB* 与连有甘油脱水酶基因的表达式载体 pET-32*gldABC* 在大肠杆菌菌株 BL21(DE3) 中共表达 鉴定了甘油脱水酶再激活酶的活性。

关键词 甘油脱水酶, 甘油脱水酶再激活酶, 共表达, 不相容双质粒, 分子伴侣

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)06-0950-06

Abstract The *gdrA*, *gdrB* gene coding glycerol dehydratase reactivase factor were amplified by using the genomic DNA of *Klebsiella pneumoniae* as the template. The *gdrA* and *gdrB* were inserted in pMD-18T to yield the recombinant cloning vector pMD-*gdrAB*. After the DNA sequence was determined, the *gdrAB* gene was subcloned into expression vector pET-28a(+) to yield the recombinant expression vector pET-28*gdrAB*. Under screening pressure by ampicillin and kanamycin simultaneously, the activity of glycerol dehydratase reactivase was characterized by coexpression of pET-32*gldABC*, which carry the *gldABC* gene encoding glycerol dehydratase, and pET-28*gdrAB* in *E. coli* BL21(DE3).

Key words glycerol dehydratase, glycerol dehydratase reactivase, coexpression, incompatible plasmids, molecular chaperone

3-羟基丙醛(3-HPA)是一种重要的化工原料。不仅用作抗菌剂,而且是许多工业有机化合物的前体,如:丙烯酸、丙烯醛、1,3-丙二醇(1,3-PD)等^[1,2]。目前工业上主要运用化学合成法如:环氧乙烷羰基合成^[3]或丙烯醛水合法^[4]生产 3-HPA,但存在许多不足,加上所用的最初原料都是石油。因此,采用微

生物发酵的方法生产 3-HPA 受到人们的关注。

甘油脱水酶(GDHt; EC 4.2.1.30)是微生物发酵法生产 3-HPA 进而生产 1,3-PD 过程中的关键限速酶。它在依赖辅酶 B_{12} 催化甘油脱水生成 3-HPA 的反应过程中,底物甘油或氧气都会使辅酶 B_{12} 的 Co-C 键不可逆断裂,产生的无活性 5'-脱氧腺苷和钴胺

Received: June 27, 2006; Accepted: July 19, 2006.

This work was supported by the grants from the National Natural Science Foundation of China(No. 20276026, 20446004), the Science and Technology Foundation of Fujian Province, China(No. 20031020), and the Natural Science Foundation of Huaqiao University(No. 03HZR2).

* Corresponding author. Tel: 86-595-2691560, E-mail: fangbs@hqu.edu.cn

国家自然科学基金资助项目(No. 20276026, 20446004), 福建省科技计划项目重点项目基金(No. 20031020), 华侨大学自然科学基金(No. 03HZR2)资助。

素紧紧地与 GDHt 分子的活性中心结合 ,导致 GDHt 丧失催化活力 ,这将直接影响到 3-HPA 的形成^[5]。近年来的研究表明 :克雷伯氏杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)基因组中 ,编码 GDHt 基因的两侧存在两个开放阅读框 *gdrA* 和 *gdrB* 共同编码一个双组分的甘油脱水酶再激活酶(glycerol dehydratase reactivase)。在 Mg^{2+} 、ATP 以及辅酶 B_{12} 存在的条件下 ,甘油脱水酶再激活酶可恢复因甘油或氧气失活的 GDHt 活性^[6-9]。Der-Ing Liao 等通过对甘油脱水酶再激活酶晶体结构的分析 ,提出“亚基互换”的再激活反应模型假说^[10]。GDHt 的再激活对 3-HPA 及 1,3-PD 的生成速率起至关重要的作用。因此 ,近年来甘油脱水酶再激活酶成为研究生物法生产 1,3-PD 的热点。

双质粒系统包括相容性双质粒和不相容性双质粒。传统理论认为 ,在大肠杆菌中 ,两不相容质粒在复制及子细胞分配过程中彼此竞争 ,导致质粒丢失 ,因而无法用于重组蛋白的共表达^[11]。本研究一方面从 *K. pneumoniae* 基因组中分别克隆得到编码甘油脱水酶再激活酶的 *gdrA*、*gdrB* 基因 ,构建了甘油脱水酶再激活酶的表达载体 ;另一方面利用双抗生素筛选法^[12,13] ,通过不相容双质粒在大肠杆菌 BL21(DE3)中共表达 GDHt 及其再激活酶 ,实现了 GDHt 的再激活 ,鉴定了甘油脱水酶再激活酶的活性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒载体及菌株 pET-32gldABC 为本实验室构建。克隆载体 pMD18-T、表达载体 pET-32a(+)、pET-28a(+) 大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21(DE3)均为本实验室保存。 *Klebsiella pneumoniae* DSM2026 由德国生物技术研究 中心曾安平博士惠赠。**1.1.2 酶及主要试剂** :T4DNA 连接酶、限制酶、rTaq 酶购自大连 TaKaRa 公司。胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、三磷酸腺苷(ATP)均购自厦门泰京生物技术有限公司。辅酶 B_{12} 、盐酸 3-甲基-2 苯并咪唑酮脲(MBTH)为 SIGMA 公司产品 ,其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基及培养条件 :LB 培养基 ,培养温度 37℃ ,摇床转速 250r/min ,氨苄青霉素浓度为 100mg/L ,卡那霉素浓度为 50mg/L ,IPTG 浓度 1mmol/L。

1.1.4 引物 由北京奥科生物技术有限公司合成 :根据 GenBank 中查到的 *K. pneumoniae* (ATCC25955) *dhaB₄*、*orf2b* 基因全序列(U30903)设计。PCR 扩增

gdrA 的引物设计(不含酶切位点 ,含核糖体结合位点序列)

Primer I :5'-ATGCGGAGGTCAGCATGCCGTTAATAG-3' ;

Primer II :5'-AGATTAGCCTGACCAGCCAGTAGCAGC-3' ;

PCR 扩增 *gdrB* 的引物设计

Primer III :5'-CCGGAATTCTCGCTTTACCGCCA-3' 引物中含有 *EcoR* I 酶切位点 ;

Primer IV :5'-TCCCCCGGCTCAATTTCTCTCACT-3' 引物中含有 *Sma* I 酶切位点。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增 *gdrA* 及 *gdrB* 基因 :以 Primer I、Primer II 为引物 ,*K. pneumoniae* 总 DNA 为模板 ,通过 PCR 扩增 *gdrA* ,扩增条件为 94℃ 预变性 5min ,然后在 94℃ 50s ,57℃ 45s ,72℃ 2min 的扩增条件下 ,进行 30 个循环的扩增 ,最后再在 72℃ 下延伸 10min。以 Primer III、Primer IV 为引物 ,*K. pneumoniae* 总 DNA 为模板 ,通过 PCR 扩增 *gdrB* ,扩增条件为 94℃ 预变性 5min ,然后按 94℃ 50s ,55℃ 45s ,72℃ 50s 进行 30 个循环 ,最后也在 72℃ 下延伸 10min。

1.2.2 克隆载体 pMD-*gdrAB* 的构建 :将 *gdrA* 基因 TA 克隆至 pMD-18T 载体上构建克隆载体 pMD-*gdrA*。pMD-*gdrA* 及 *gdrB* 用 *EcoR* I 和 *Sma* I 进行双酶切 ,上述二者的酶切产物经 T4DNA 连接酶连接后即得到克隆载体 pMD-*gdrAB* ,转化到大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 中 ,小量提取质粒 ,经酶切鉴定后寄往北京奥科生物技术有限公司进行序列测定。

1.2.3 表达载体 pET-28*gdrAB* 的构建 :将 pMD-*gdrAB* 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 进行双酶切后 ,切胶回收 *gdrAB* ,所得产物与经同样酶切的 pET-28a(+)运用 T4DNA 连接酶连接即得到表达载体 pET-28*gdrAB* ,转化到大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 中 ,小量提取质粒 ,经酶切鉴定正确后 ,转化至表达宿主 *E. coli* BL21(DE3)诱导表达。

1.2.4 SDS-PAGE 采用 15% 分离胶的不连续垂直平板电泳 ,考马斯亮蓝 R-250 染色。分别以大肠杆菌 *E. coli* BL21(pET-28AB)、*E. coli* BL21(pET-32gldABC)及 *E. coli* BL21(pET-28*gdrAB* , pET-32gldABC)未经 IPTG 诱导的为做对照。

1.2.5 两种重组质粒共转化大肠杆菌 BL21(DE3)及其诱导表达 :将等量 pET-28*gdrAB* 和 pET-32gldABC 共转化大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)感受态 ,在同时含有 100mg/L 氨苄青霉素和 50mg/L 卡那

霉素的双抗性 LB 平板上筛选单菌落。从双抗性 LB 平板上挑取单菌落于含有 100mg/L 氨苄青霉素和 50mg/L 卡那霉素的双抗性 LB 液体培养基中 ,37℃ 培养至 A₆₀₀ 约 0.4 时 ,加入 IPTG 至终浓度 1mmol/L , 25℃ 继续培养 5h 后离心收集菌体。

1.2.6 改变细胞通透性 :收集的菌体用 0.05mol/L 磷酸钾缓冲液洗涤两次 ,并用同种缓冲液悬浮菌体至浓度为 0.1g/mL。向细胞悬浮液中加入乙醚至终浓度 0.5%(V/V) ,并于室温振荡 1min。离心收集菌体 ,用 0.05mol/L 磷酸钾缓冲液洗涤 2 次后用同样的缓冲液悬浮菌体至浓度为 0.05g/mL。

1.2.7 GDHt 及其再激活酶的活力测定 :GDHt 活性的测定方法采用 Tetsuo Toraya 等建立的 MBTH 法。其基本原理是 :GDHt 催化甘油脱水生成的醛类与 MBTH 反应形成的复合物能用紫外分光光度法测定。反应体系包括 :适量的改变了通透性的重组菌 , 0.2mol/L 甘油 ,0.05mol/L KCl ,0.035mol/L 磷酸钾缓冲液 ,以及 15μmol/L 辅酶 B₁₂ ,总体积为 1.0mL。在 37℃ 下反应一定时间后 ,加入 1mL 0.1mol/L 柠檬酸钾缓冲液(pH3.6)终止反应 ,然后加入 0.5mL 0.1% MBTH ,37℃ 保温 15min 后 ,加入 1mL 水 ,于 305nm 下测定吸光值。

甘油脱水酶再激活因子的活力测定方法及原理与甘油脱水酶基本相同 ,但反应体系略有差异。其反应体系为 :适量的改变了通透性的重组菌 , 0.2mol/L 甘油 ,0.05mol/L KCl ,0.035mol/L 磷酸钾缓冲液 ,以及 15μmol/L 辅酶 B₁₂ ,3mmol/L ATP ,3mmol/L MgCl₂ ,总体积为 1.0mL。

2 结果

2.1 *gdrA* 及 *gdrB* 基因的 PCR 扩增

PCR 扩增的 *gdrA* 基因包含其核糖体结合位点 ,大小约为 1840bp。PCR 扩增的 *gdrB* 基因含终止密码子 ,大小约为 370bp。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 ,分别在 1500 ~ 2000bp(图 1)和 300 ~ 400bp(图 2)的位置出现一特异性条带 ,与理论值大小相符。

2.2 克隆载体 pMD-*gdrAB* 的构建及鉴定

构建好的克隆载体 pMD-*gdrAB* 如图 3 所示。pMD-*gdrAB* 用 *EcoR* I 进行单酶切鉴定时应出现约 4900bp 大小的一条带 ;用 *EcoR* I 和 *Hind* III 进行双酶切鉴定时应出现两条带 ,约为 2700bp 和 2200bp。酶切鉴定结果表明连接正确(图 4)。进一步测序结

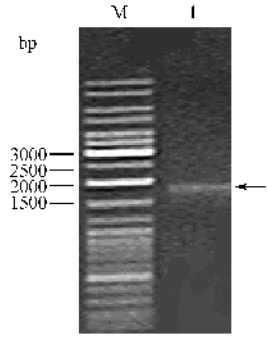


图 1 *gdrA* 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 Electrophoresis of PCR products of *gdrA*
M :DNA marker ;I :PCR products .

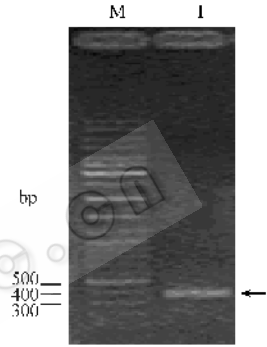


图 2 *gdrB* 基因的 PCR 扩增

Fig. 2 Electrophoresis of PCR products of *gdrB*
M :DNA marker ;I :PCR products .

果表明所构建的载体完全正确(测序数据略)。

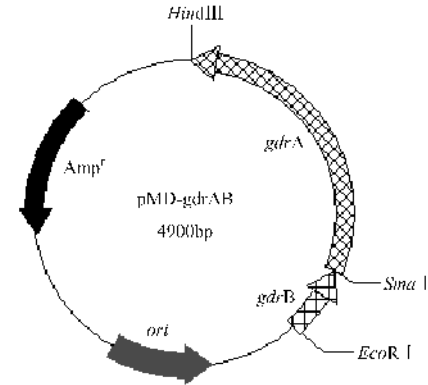


图 3 克隆载体 pMD-*gdrAB* 的构建

Fig. 3 Construction of recombinant cloning vector pMD-*gdrAB*

2.3 表达载体 pET-28*gdrAB* 的构建及鉴定

构建好的表达载体 pET-28*gdrAB* 如图 5 所示。pET-28*gdrAB* 用 *EcoR* I 进行单酶切鉴定时应出现约 7600bp 大小的一条带 ;用 *Sma* I 进行单酶切鉴定时应分别在约 3100bp 和 4500bp 处有两条带 ;用 *EcoR* I 和 *Hind* III 进行双酶切鉴定时应出现两条带 ,分别约为 5400bp 和 2200bp。酶切鉴定结果表明连

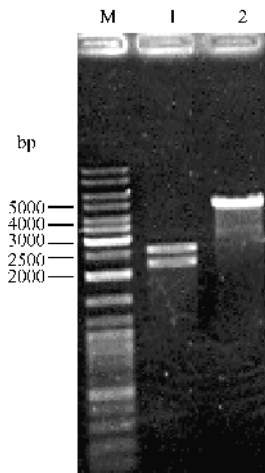


图 4 克隆载体 pMD-*gdrAB* 的酶切鉴定

Fig.4 Characterization of pMD-*gdrAB* digested by *EcoR* I and *Hind* III / *EcoR* I

M DNA marker ;1 :pMD-*gdrAB* digested by *EcoR* I and *Hind* III ;2 : pMD-*gdrAB* digested by *EcoR* I .

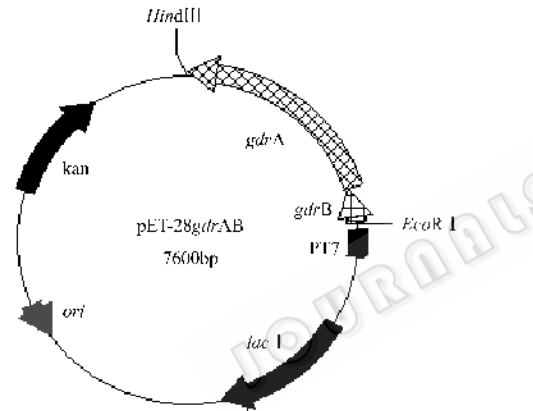


图 5 表达载体 pET-28*gdrAB* 的构建

Fig.5 Construction of recombinant expression vector

pET-28*gdrAB*

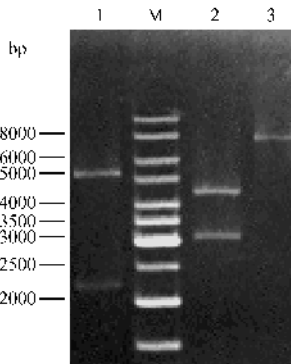


图 6 表达载体 pET-28*gdrAB* 的酶切鉴定

Fig.6 Characterization of pET-28*gdrAB* digested by *EcoR* I and *Hind* III / *Sma* I / *EcoR* I

M DNA marker ;1 pET-28*gdrAB* digested by *EcoR* I and *Hind* III ;2 pET-28*gdrAB* digested by *Sma* I ;3 pET-28*gdrAB* digested by *EcoR* I .

2.4 重组质粒共转化大肠杆菌 *E. coli* BL21

用等量的表达质粒转化大肠杆菌 *E. coli* BL21 感受态细胞 ,在同时含有 100mg/L 氨苄青霉素和 50mg/L 卡那霉素的双抗性 LB 平板上筛选单菌落。将单菌落接种于含有相同双抗性 LB 液体培养基中 37℃ 培养过夜 ,提质粒酶切鉴定如图 7 所示。pET-28*gdrAB* 和 pET-32*gldABC* 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 进行双酶切鉴定时应出现 4 条带 ,大小约为 2200bp、2700bp、5369bp 和 5900bp。pET-28*gdrAB* 和 pET-32*gldABC* 进行单酶切鉴定时应分别在约 7600bp 和 8600bp 处有两条带。由图谱可知 pET-28*gdrAB* 和 pET-32*gldABC* 确实能在宿主菌中共存。

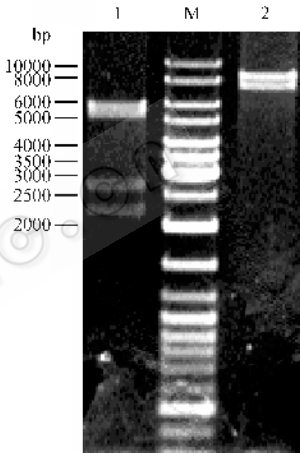


图 7 共转化子重组质粒的酶切鉴定

Fig.7 Restriction analysis of the plasmids in *E. coli* BL21 cotransformants

M DNA marker ;1 pET-28*gdrAB* and pET-32*gldABC* digested by *EcoR* I and *Hind* III ;2 pET-28*gdrAB* and pET-32*gldABC* digested by *EcoR* I .

2.5 重组菌全细胞蛋白 SDS-PAGE 分析

挑取重组子大肠杆菌 *E. coli* BL21(pET-28*gdrAB*) *E. coli* BL21(pET-32*gldABC*)以及 *E. coli* BL21(pET-28*gdrAB* ,pET-32*gldABC*)分别接种于含有硫酸卡那霉素 50mg/L ,100mg/L 氨苄青霉素及含有氨苄青霉素浓度为 100mg/L ,卡那霉素浓度为 50 mg/L 的 LB 培养基中 ,37℃ 培养至 OD_{600} 约 0.4 时 , 1mmol/L IPTG ,25℃ 诱导培养 5h 后离心收集菌体 , 15% SDS-PAGE 分析鉴定表达产物如图 8 所示。以大肠杆菌 *E. coli* BL21(pET-28AB) *E. coli* BL21(pET-32*gldABC*) *E. coli* BL21(pET-28*gdrAB* ,pET-32*gldABC*)未经 IPTG 诱导的为对照 ,图 8 所示的图谱显示 ,甘油脱水酶再激活酶在分子量约 66kD、16kD 处出现蛋白特征带 ,与目的蛋白大小相符。

量约 66kD、21kD、16kD 处分别出现蛋白特征带与目的蛋白大小相符(21kD 为 GDHt 中亚基大小,由于 GDHt 的大亚基及其小亚基与再激活酶的两个亚基大小基本一致,因而难以区分)。

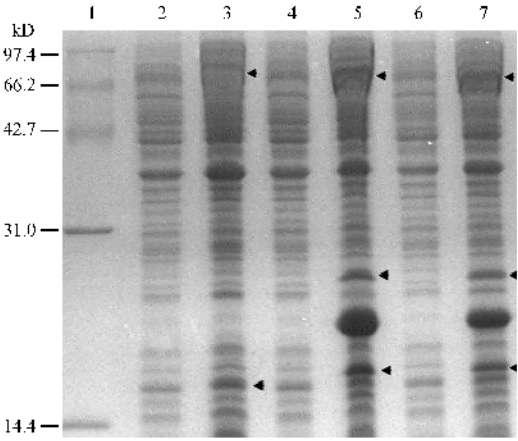


图 8 重组菌全细胞蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig.8 SDS-PAGE analysis of proteins in whole cells

1:protein markers(kD) 2:*E. coli* BL21(pET-28AB) absence of IPTG; 3:*E. coli* BL21(pET-28AB) after IPTG induction for 5h, The positions of the products of *gdrA*, *gdrB* are indicated with arrowheads 4:*E. coli* BL21(pET-32*gldABC*) absence of IPTG; 5:*E. coli* BL21(pET-32*gldABC*) after IPTG induction for 5h, The positions of the products of *gldA*, *gldB*, *gldC* are indicated with arrowheads 6:*E. coli* BL21(pET-28*gdrAB* pET-32*gldABC*) absence of IPTG; 7:*E. coli* BL21(pET-28*gdrAB* pET-32*gldABC*) after IPTG induction for 5h. The positions of the products of *gdrA*, *gdrB*, *gldA*, *gldB*, *gldC* are indicated with arrowheads.

2.6 甘油脱水酶再激活因子的活性测定

取一株重组大肠杆菌 BL21(pET-28*gdrAB*, pET-32*gldABC*)接种于含氨苄青霉素及卡那霉素的 LB 培养基中,经 IPTG 诱导表达,采用改变细胞通透性的方法。按文献所述方法测定酶活,并以重组菌未经诱导时作对照,结果如图 9 所示,反应体系中未加入 ATP、Mg²⁺ 时,不发生激活反应,反应进行到 10min 后体系中的 3-羟基丙醛为 0.35μmol,即每克湿细胞产生 1.45mmol 的 3-HPA,并趋于定值;当反应体系中加入 ATP、Mg²⁺ 时,启动了再激活反应,反应进行到 10min 后体系中的 3-HPA 为 0.42μmol,然后不断攀升,反应进行到 30min 时体系中的 3-HPA 为 0.80μmol,即每克湿细胞产生 3.20mmol 的 3-HPA,且仍有上升趋势。

3 讨论

甘油脱水酶再激活酶是甘油脱水酶的分子伴侣。在 ATP、Mg²⁺、辅酶 B₁₂ 存在的条件下,再激活酶

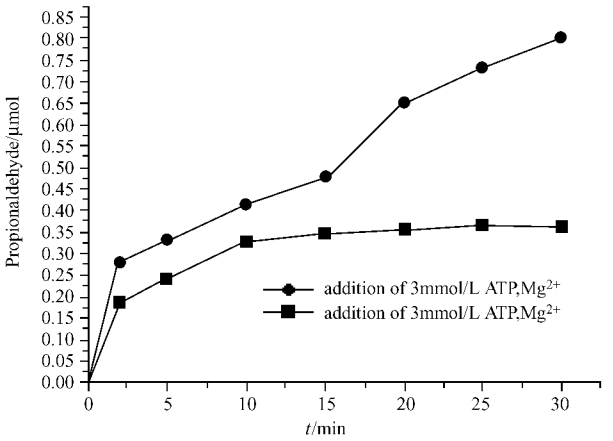


图 9 甘油脱水酶再激活因子的活性测定

Fig.9 Characterization of glycerol dehydratase reactivase

可将因 Co-C 键断裂而受损的辅酶 B₁₂ 从 GDHt 的活性中心移去从而恢复 GDHt 活性。Corinna 等从 *C. freundii* 基因组中克隆并在 *E. coli* JM109 中表达了编码 GDHt 再激活酶 α、β 亚基的两段基因 *dhaF* 及 *dhaG*, 利用目的蛋白的组氨酸标记运用 Ni 柱分离出再激活酶,并与纯化了的 GDHt 在胞外实现了再激活反应^[15]。Takamasa 等从 *K. pneumoniae* 基因组中克隆并表达了编码甘油脱水酶再激活酶的 *gdrA*、*gdrB* 基因,采用相容性质粒与 GDHt 在大肠杆菌中的共表达在胞内实现了再激活反应^[7]。而在本研究中,运用同为 pMB1 复制子的两不相容质粒即:pET-32*gldABC* 和 pET-28*gdrAB*,利用双抗生素筛选法,在大肠杆菌 BL21(DE3)中实现了 GDHt 及其再激活酶的共表达,鉴定了甘油脱水酶再激活酶的活性。由此说明,在一定条件下,两不相容双质粒也可在大肠杆菌中共存,并能实现不同蛋白质在大肠杆菌中的共表达。

本研究运用 PCR 技术从克雷伯氏菌的基因组中分别扩增得到了编码甘油脱水酶再激活酶 α、β 两个亚基的基因 *gdrA*、*gdrB*,构建了克隆载体 pMD-*gdrAB*。经测序正确后,将 *gdrAB* 亚克隆至表达载体 pET-28a(+)上构建表达质粒 pET-28*gdrAB*。利用双抗生素筛选法,将 pET-28*gdrAB* 与连有 GDHt 基因的表达载体 pET-32*gldABC* 共转化大肠杆菌菌株 BL21(DE3),经 IPTG 诱导实现了共表达。在 ATP、Mg²⁺、辅酶 B₁₂ 的共同参与下,实现了 GDHt 的胞内再激活。经驱动复活后,GDHt 催化甘油生成 3-HPA 的量提高了近 2.2 倍,且随时间的延长仍有提高的趋势。

本研究一方面证实了在两种抗生素筛选压力同时存在的条件下,两不相容双质粒不仅能在大肠杆

菌中共存,而且可以实现不同蛋白质在大肠杆菌中的共表达;另一方面,证实了甘油脱水酶再激活酶对已失活 GDH_t 的再激活作用。通过构建有活性的基因工程菌株,为基因工程法制备 3-HPA 创造了条件,同时也为再激活反应体系的深入研究奠定了基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] El-Ziney MG, van-den-Tempel T, Debevere J. Application of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* 12002 for meat decontamination and preservation. *Food Prot*, 1999, **62**: 257 – 261
- [2] Chen CC, Chen JY, Lee SR. Growth inhibition of glycerol metabolites of *Lactobacillus reuteri* on microorganisms and human cancer cell lines. *Chin Agric Chem Soc*, 1999, **37**: 117 – 125
- [3] Murphy MA, Smith BL, Aguilo A. 1,3-Propanediol manufacture by epoxide hydro carbonylation, US 4935554, 1990
- [4] Xu ZH(徐泽辉), Guo SZ(郭世卓), Wang PL(王佩琳). Preparation of 1,3-propanediol based on hydration of acrolein with subsequent hydrogenation. *Petroleum Processing and Petrochemicals* (石油炼制与化工) 2001, **32**(12): 21 – 24
- [5] Tetsuo. Toraya. Radical catalysis of B₁₂ enzymes: structure, mechanism, inactivation, and reactivation of diol and glycerol dehydratases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2000, **57**: 106 – 127
- [6] Susumu Honda, Tetsuo Toraya, Saburo Fukui. In situ reactivation of glycerol-inactivated coenzyme B₁₂-dependent enzymes, glycerol dehydratase and diol dehydratase. *Journal of Bacteriology*, 1980, **143**(3): 1458 – 1465
- [7] Takamasa Tobimatsu, Hideki Kajiura, Michio Yunoki *et al.* Identification and expression of the genes encoding a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *Journal of Bacteriology*, 1999, **181**(13): 4110 – 4113
- [8] Takamasa Tobimatsu, Hideki Kajiura, Tetsuo Toraya. Specificities of reactivating factors for adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase. *Arch Microbial*, 2000, **174**: 81 – 88
- [9] Hideki Kajiura, Koichi Mori, Takamasa Tobimatsu *et al.* Characterization and Mechanism of Action of a Reactivating Factor for Adenosylcobalamin-dependent Glycerol Dehydratase. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**(39): 36514 – 36519
- [10] Der-Ing Liao, Lisa Reiss, Ivan Turner *et al.* Structure of Glycerol Dehydratase Reactivase: A New Type of Molecular Chaperone. *Structure*, 2003, **11**: 109 – 119
- [11] Yang W(杨巍), Zhang L(张岚), Lu ZG(卢智刚) *et al.* Coexpression of DNA Fragmentation Factor Subunits in *E. coli* by Two Incompatible Plasmids. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* (生物化学与生物物理学报) 2001, **33**(2): 238 – 242
- [12] Fan LQ(范立强), Yuan QS(袁勤生), Wu XF(吴祥甫). Coexpression of *caiB* and *caiE* with Incompatible Plasmids in *E. coli*. *Chinese Journal of Pharmaceuticals* (中国医药工业杂志), 2002, **33**(3): 113 – 116
- [13] Pang YQ(庞永奇), Jia HG(贾洪革), Fang RX(方荣祥). A simple and visible assay for *cre* recombinase activity in *Escherichia coli* by using two incompatible plasmids. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报) 2005, **45**(1): 125 – 128
- [14] Tetsuo Toraya, Kazutoshi Ushio, Saburo Fukui *et al.* Studies on the mechanism of the adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase reaction by the use of analogs of the coenzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 1977, **253**(3): 963 – 970
- [15] Corinna Seifert, Susanne Bowien, Gerhard Gottschalk *et al.* Identification and expression of the genes and purification and characterization of the gene products involved in reactivation of coenzyme B₁₂-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*. *J Biochem*, 2001, **268**: 2369 – 2378