

# 克氏肺炎杆菌 NiFe-氢酶基因的克隆与序列分析

## Cloning and Sequence Analysis of the Gene Encoding NiFe-hydrogenase from *Klebsiella pneumoniae*

刘 飞, 方柏山\*

LIU Fei and FANG Bai-Shan\*

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

Province Key Laboratory of Industrial Biotechnology( Huaqiao University ), Quanzhou 362021, China

**摘 要** 采用 CLUSTAL-W 软件对 Swiss-Prot 蛋白数据库中已报道的 NiFe-氢酶大亚基氨基酸序列进行比对分析, 找到保守区并根据此设计兼并引物。利用其中一对引物进行 PCR 得到一条大小约为 1000bp 的 DNA 序列, 并根据此序列设计引物进行反向 PCR 得到整个 NiFe-氢酶的序列。再利用生物信息学软件对此氢酶的序列进行二、三级结构预测及大小亚基的对接( docking )。结果表明克氏肺炎杆菌的 NiFe-氢酶属于一类膜结合放氢酶( Ech 氢酶 )。

**关键词** 克氏肺炎杆菌, NiFe-氢酶, 序列分析, 结构预测, 分子对接

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)01-0133-05

**Abstract** Degenerate PCR primers were designed by multiple alignment of the protein sequences of known structural genes encoding the catalytic subunits of NiFe-hydrogenases obtained from Swiss-Prot Protein Sequence Database through CLUSTAL-W software and compared for conserved sequence motifs. An amplified PCR product 1 kb in size was obtained from the genomic DNA of *Klebsiella pneumoniae* using a set of degenerate primers, and then inverse PCR technique was used to obtain the full hydrogenase coding region. A predicted secondary structure and 3D structural model were constructed by homology modeling and docking. On the basis of these results, it was inferred that NiFe-hydrogenase from *Klebsiella pneumoniae* belongs to the membrane-bound H<sub>2</sub> evolving hydrogenase group ( Ech hydrogenase group ).

**Key words** *Klebsiella pneumoniae*, NiFe-hydrogenase, sequence analysis, structure prediction, docking

氢气是一种洁净能源, 目前各种制氢方法被广泛研究。生物制氢与其它方法相比具有污染少等优点, 其研究主要集中在光合微生物和发酵微生物<sup>[1, 2]</sup>。氢气的产生是产氢微生物在氢酶的作用下消耗掉多余电子的一种特殊机制。对氢酶表达的研究主要集中在好氧菌<sup>[3]</sup>、蓝细菌<sup>[4]</sup>、光合细菌<sup>[5]</sup>、根瘤菌<sup>[6]</sup>、硫酸盐还原菌<sup>[7]</sup>和厌氧发酵细菌<sup>[8]</sup>。氢酶

是一种复杂的酶, 它的合成需要很多基因的参与。氢酶主要包括两类: NiFe-氢酶和 Fe-氢酶。已经在很多肠细菌中发现 NiFe-氢酶, 但是对于克氏肺炎杆菌还没有 NiFe-氢酶的报道。克氏肺炎杆菌可以发酵生产氢气, 其速率和得率都较高<sup>[9]</sup>。据此可以推断该菌也可能含有 NiFe-氢酶。如果能得到该菌氢酶的基因序列, 将会在分子水平上推动对该菌氢气产

Received: August 29, 2006; Accepted: September 27, 2006.

This work was supported by the grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 20276026 and 20446004).

\* Corresponding author. Tel: +86-595-22691560; E-mail: fangbs@hqu.edu.cn

国家自然科学基金资助项目( No. 20276026, 20446004 )

生过程的研究,包括氢酶的作用机理、附属基因的作用和其它调控因素。利用氢酶的核苷酸序列信息,结合基因工程方法,可以提高该菌氢气的产量。

为了得到并提高克氏肺炎杆菌 NiFe-氢酶的活性,对该菌的氢酶基因进行了克隆,并用生物信息学方法对核苷酸序列进行了分析和高级结构预测。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种、培养基和培养方法

*K. pneumoniae* DSM 2026 来自德国微生物菌种保藏中心(由曾安平博士馈赠),保存于 LB 培养基中。首先将保存菌株接种于 MRS 培养基中<sup>[10]</sup>,于 37℃ 活化培养 24h,再转接于 50mL 发酵培养基中,37℃,120r/min 厌氧培养 24h。发酵培养基组成(g/L):甘油 30.0, KCl 1.7, NH<sub>4</sub>Cl 6.7, CaCl<sub>2</sub> 0.3, 酵母膏 2.8。初始 pH 用 1mol/L KOH 调为 7.0。收集对数生长中期的菌体来提取基因组 DNA。

### 1.2 兼并引物的设计,PCR 和克隆

首先在蛋白数据库中找到 20 条已报道的 NiFe-氢酶的氨基酸序列(序列号:O28891, O59656,

O67092, P12636, P12944, P13065, P16431, P18188, P21852, P77329, P94155, Q9PN32, Q9UWQ6, Q9UXP4, Q9V2X7, Q44216, Q46046, Q50226, Q50249, Q59114),并用 CLUSTAL-W 软件进行多序列比对,找到保守区<sup>[11]</sup>。其中有 3 个保守区(至少 6 个氨基酸)的一致性为 90% 以上。根据这三个保守区,再结合克氏肺炎杆菌对密码子的偏好(表 1)设计兼并引物。

基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法<sup>[12]</sup>。首先扩增保守区,PCR 反应体系(20 $\mu$ L)包括 1ng 模板 DNA, 200 $\mu$ mol/L dNTP, 20 $\mu$ mol/L 兼并引物(表 2), 2 $\mu$ mol/L Taq DNA 缓冲液和 1u Taq DNA 多聚酶(TaKaRa, Japan),PCR 仪为 DNA Engine thermal cycler(Bio-Rad, USA)。反应程序为:94℃, 5min,接着 30 个循环(94℃, 1min; 55℃, 0.5min; 72℃, 2min),然后 72℃ 延伸 5min。PCR 产物用 DNA 凝胶回收试剂盒(Roche, USA)回收,再与 pMD 18-T 载体(TaKaRa, Japan)连接,得到的重组质粒提交 Takara 公司(大连,中国)测序。

表 1 利用 DNAMAN 软件得到的克氏肺炎杆菌密码子偏好表

Table 1 Codon usage table for *Klebsiella pneumoniae* using the DNAMAN program

F( Phe )	S( Ser )	Y( Tyr )	C( Cys )	V( Val )	A( Ala )	I( Ile )	T( Thr )	H( His )
UUC( 56 )	UCG( 29 )	UAU( 59 )	UGC( 64 )	GU( 35 )	GCC( 29 )	AUC( 48 )	ACC( 35 )	CAU( 57 )
UUU( 44 )	AGU( 17 )	UAC( 41 )	UGU( 36 )	GU( 33 )	GCU( 28 )	AUU( 38 )	ACC( 30 )	CAC( 43 )
L( Leu )	R( Arg )	P( Pro )	G( Gly )	D( Asp )	E( Glu )	K( Lys )	Q( Gln )	
CU( 40 )	CGA( 28 )	CC( 36 )	GGA( 32 )	GAU( 62 )	GAA( 69 )	AAA( 63 )	CAA( 59 )	

The number within parentheses represents the % of usage of the codon in characterizing the genes which belong to *Klebsiella pneumoniae*.

表 2 兼并引物

Table 2 Designed degenerate primers

Name	Nucleic acid sequence	Length	Amino acid sequence
FP1	G[ G/C ]CA[ T/C ]CGAGGAATGGAA	18	VHRGME
FP2	CTGT[ C/T ]CGAGGACTGGAA	18	LFRGLE
FP3	CGAAT[ C/T ]T[ C/T ]GAG[ G/C ]TG	17	RICGVC
FP4	CGAG[ G/C ]T[ C/T ]GGAATCTG	17	RVCGIC
RP1	CA[ C/A ]GA[ A/G ]TA[ G/A ]CACGGATC	17	DPCYSC
RP2	CA[ G/A ]G[ C/G ]A[ A/T ]G/A ]CACGGATC	17	DPCTAC

FP1-4 are the forward primers, while RP1-2 are the reverse primers.

再利用反向 PCR 方法扩增保守区旁测序列。先用 *Nde* I 完全酶切基因组 DNA(15 $\mu$ g),然后自连作为模板。引物为 IP1 (5'-CGGTCGACAGGAA GGTAC-3') and IP2 (5'-TGATCATCGGCAGCCTCGA CC-3'),反应程序为:94℃, 5min,接着 30 个循环(94℃, 1min; 56℃, 2min; 72℃, 2min),然后 72℃ 延伸 5min。PCR 产物回收、克隆和测序方法同上。

为了验证得到的蛋白编码区,设计新的引物 FP5 (5'-GGTCAACACTACCTTGCG-3')和 RP5 (5'-

ACTGAACACCACCGTCTC-3')来扩增整个基因。PCR 方法同上。

### 1.3 序列分析和结构预测

首先确定扩增片段的 CDS,然后将编码的氨基酸序列提交蛋白数据库(包括 Swiss-Prot, PIR, PRF, PDB, GenBank 和 RefSeq)进行比对。

二级结构预测方法很多(<http://ca.expasy.org/tools/#secondary>),包括 APSSP, GOR, HNN, Jpred, JUFO, PredictProtein, Prof 和 SSpro,这些方法结合起

来使用效果更好。三级结构预测采用同源建模的方法,将序列提交 SWISS-MODEL 服务器,自动返回预测结果<sup>[13]</sup>。最后将预测的大小亚基三级结构利用 Hex 软件进行大分子对接,该软件依据球极傅立叶对接关联算法,根据能量最低原则,采用柔性对接方式<sup>[14,15]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 克隆与测序

首先利用引物 FP1 和 RP1(表 2)PCR 扩增得到氢酶的部分片段,再根据该片段设计引物 IP1 和 IP2 进行反向 PCR 得到旁测序列,然后根据旁测序列设计引物 FP5 和 RP5 扩增得到整个氢酶的序列(图 1)。

### 2.2 序列分析

利用引物 FP1 和 RP1 得到一条 3kb 左右的 DNA 片段,测序结果表明它含有 3 个方向一致的开放阅读框(ORF)。ORF1 编码 570 个氨基酸的蛋白,与 *E. coli* 氢酶 3 的大亚基 HycE 有 97% 的序列一致性;ORF3 编码 256 个氨基酸的蛋白,与 *E. coli* 氢酶 3 的小亚基 HycG 有 92% 的序列一致性;ORF2 编码 255 个氨基酸的蛋白,与 *E. coli* 甲酸氢解酶一个亚基 HycF 有 90% 的序列一致性<sup>[16]</sup>。结果表明 ORF1 和 ORF3 编码的蛋白可能属于 Ech 氢酶类,该类氢酶包括已报道的 *E. coli* 氢酶 3<sup>[17]</sup>和氢酶 4<sup>[18]</sup>,以及

*Rhodospirillum rubrum* 的 CO 还原氢酶<sup>[19]</sup>。

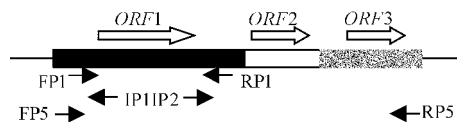


图 1 克隆所用引物相对位置图

Fig.1 Schematic representation of the relative positions of the primers used to obtain the clones

The coding regions for the large subunit and small subunit are represented by the black box and yellow box, respectively.

序列比对结果表明克氏肺炎杆菌氢酶的大亚基包括 4 个保守的半胱氨酸残基,分别位于 241, 244, 531 和 534,通过二硫键与活性位点 NiFe 连接。另外还发现 3 个保守区,一个是 VHRGMEKLAETR,位于 216-227,是呼吸链 NADH 脱氢酶 49kD 亚基的标记,这表明该氢酶可能与 NADH 脱氢酶有关;另外两个是膜结合放氢酶的标记 DPCYSC 和 DRVCGICGFAH,分别位于 529-534 和 238-248,这表明该氢酶属于膜结合放氢酶类<sup>[20]</sup>。以上结果暗示克隆片段所编码的酶在氢气产生过程中是不可或缺的,并且同时与呼吸链上的电子传递相关联。

### 2.3 二级结构预测和三维模型构建

二级预测结果表明克氏肺炎杆菌的氢酶主要由  $\alpha$  螺旋、无规则卷、 $\beta$  折叠和  $\beta$  转角组成(图 2)。大亚基  $\alpha$  螺旋主要位于肽链中部,小亚基  $\alpha$  螺旋主要位于肽链两端,这种分布与其它 NiFe-氢酶很相似。

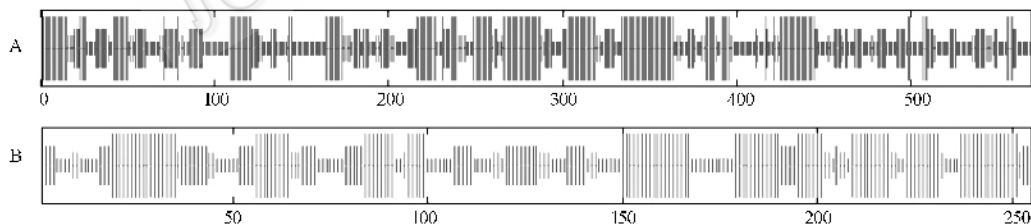


图 2 二级预测结果

Fig.2 Secondary structure prediction result

Alpha-helices are depicted in blue, random-coils are depicted in purple, beta-strands are depicted in red, and beta-turns are depicted in green. (A) large subunit; (B) small subunit.

根据同源建模得到的大小亚基的三维结构与二级结构预测结果相符,建模所用的模板(表 3)与所预测序列的一致性均大于 30%。再利用 Hex 软件对大小亚基进行对接,得到的能量最低的三维结构与已报道的 *D. gigas* NiFe-氢酶晶体结构非常相似(图 3)。活性位点处的 4 个保守半胱氨酸残基深深的包藏于大亚基螺旋区内部。小亚基包含 3 个 [Fe-S] 簇,根据距离活性位点的远近分别命名为近簇、中簇和远簇(分别位于 Cys<sup>115</sup>、Cys<sup>145</sup> 和 Cys<sup>50</sup>,这 3 个

表 3 同源建模所用模板

Table3 PDB ID of the template for homology modeling

Large subunit		Small subunit	
PDB ID	Identity/%	PDB ID	Identity/%
2fugM	30.83	2fugO	44.25
1uboL	37	2fugF	44.25
1frvB	32.1	2fug6	44.25
1yrqK	34	2fugX	44.25
1wuhL	37.87		

The structure of the template was determined by X-ray diffraction method.  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

Cys 非常保守),共同作用将电子从酶的表面传递到活性位点<sup>[21]</sup>。另外通过对接还可以得到大小亚基之间的氢键分布(表4),从而可知大小亚基是如何互相作用的。利用整个氢酶序列作模板进行同源建

模得到的结构与对接得到的结构非常相似,这表明大分子对接的可靠性是很高的,另外通过对接能使我们更清晰地了解蛋白与蛋白之间的相互作用。

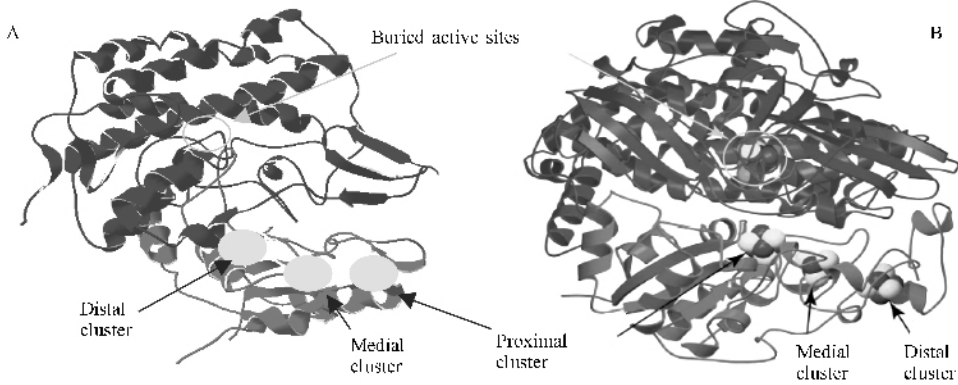


图3 氢酶三维结构图

Fig.3 Construction of 3D model

Large subunits are depicted in blue, small subunits in red. (A) the predicted structure of *K. pneumoniae* NiFe-hydrogenase. (B) crystal structure of *D. gigas* NiFe-hydrogenase<sup>[21]</sup>.

表4 大小亚基之间的氢键

Table 4 The hydrogen bonds between the two subunits

donor				acceptor				D...A distance	D-H...A distance
subunit	A.A	position	group	subunit	A.A	position	group	/nm	/nm
large	ARG	212	NH	small	ASN	124	CO	0.3029	0.2154
large	THR	250	OH	small	TYR	168	OH	0.2350	0.1428
large	THR	254	OH	small	GLN	166	CO	0.2939	0.2182
large	SER	283	OH	small	ARG	171	O	0.2184	0.1395
large	ASN	389	NH2	small	ARG	174	O	0.3164	0.2548
small	ARG	21	NH2	large	HIS	399	O	0.3222	0.2404
small	TYR	154	OH	large	GLU	225	OH	0.3402	0.2507
small	ARG	164	NH	large	SER	255	OH	0.2140	0.1300
small	GLN	166	NH2	large	ASP	406	OH	0.3197	0.2228

D represents donor. A represents acceptor. A.A represents amino acid.

### 3 结论

利用已知 NiFe-氢酶的序列成功克隆了克氏肺炎杆菌的 NiFe-氢酶基因,并进行了分析,其核苷酸序列已提交 GenBank(登录号: DQ480718)。该氢酶的氨基酸序列与其它 NiFe-氢酶比对,发现与膜结合放氢酶(Ech 氢酶)类的序列一致性很高,故推测该氢酶属于膜结合放氢酶类,并与呼吸链上电子传递有关。另外,对接得到的氢酶结构与已报道的 *D. gigas* NiFe-氢酶晶体结构非常相似,这表明利用 Hex 软件进行大分子对接的可靠性较高。该软件也可以用来筛选某种蛋白的大分子受体、抑制蛋白或激活蛋白,还可以用来研究酶的催化机理。

### REFERENCES(参考文献)

[1] Ike A, Murakawa T, Kawaguchi H, et al. Photoproduction of

hydrogen from raw starch using a halophilic bacterial community. *J Biosci Bioeng*, 1999, **88**: 72-77.

[2] Oh YK, Seol EH, Kim JR, et al. Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19. *Int J Hydrogen Energy*, 2003, **28**: 1353-1359.

[3] Bowien B, Schlegel HG. Physiology and biochemistry of aerobic hydrogen-oxidizing bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 1981, **350**: 405-452.

[4] Houchins JP. The physiology and biochemistry of hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Biochim Biophys Acta*, 1984, **768**: 227-255.

[5] Vignais PM, Colbeau A, Willison JC, et al. Hydrogenase, nitrogenase and hydrogen metabolism in the photosynthetic bacteria. *Adv Microb Physiol*, 1985, **26**: 155-234.

[6] Van Soom C, Rumjanek N, Vanderleyden J, et al. Hydrogenase in *Bradyrhizobium japonicum*: genetics, regulation and effect on plant growth. *World J Microbiol Biotechnol*, 1993, **9**: 615-624.

[7] Fauque G, Peck Jr HD, Moura JJC, et al. The three classes of hydrogenases from iron-sulfur-binding bacteria of the genus

- Desulfovibrio*. *FEMS Microbiol Rev*, 1988, **54**: 299 – 344.
- [ 8 ] Meyer J. Clostridial iron-sulphur proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2000, **2**: 9 – 14.
- [ 9 ] Chen X, Sun YQ, Xiu ZL, *et al.* Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria. *Int J Hydrogen Energy*, 2005, **1**: 1 – 11.
- [ 10 ] Zeng AP, Biebl H, Schlieker H, *et al.* Pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: regulation of reducing equivalent balance and product formation. *Enzyme Microbiol. Technol*, 1993, **15**: 770 – 779.
- [ 11 ] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res*, 1994, **22**: 4673 – 4680.
- [ 12 ] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
- [ 13 ] Schwede T, Kopp J, Guex N, *et al.* SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucl Acids Res*, 2003, **31**: 3381 – 3385.
- [ 14 ] Ritchie DW. Evaluation of protein docking predictions using Hex 3.1 in CAPRI rounds 1 and 2. *PROTEINS: Struct Funct Genet*, 2003, **52**(1): 98 – 106.
- [ 15 ] Mustard D, Ritchie DW. Docking essential dynamics eigen structures. *PROTEINS: Struct Funct Bioinf*, 2005, **60**(2): 269 – 274.
- [ 16 ] Bagramyan K, Mnatsakanyan N, Poladian A, *et al.* The roles of hydrogenases 3 and 4, and the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase, in H<sub>2</sub> production by *Escherichia coli* at alkaline and acidic pH. *FEBS Lett*, 2002, **516**: 172 – 178.
- [ 17 ] Sauter M, Bohm R, Bock A. Mutational analysis of the operon (*hyc*) determining hydrogenase 3 formation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 1992, **6**: 1523 – 1532.
- [ 18 ] Andrews SC, Berks BC, McClay J, *et al.* A 12-cistron *Escherichia coli* operon (*hyf*) encoding a putative proton-translocating formate hydrogenlyase system. *Microbiology*, 1997, **143**: 3633 – 3647.
- [ 19 ] Fox JD, He Y, Shelver D, *et al.* Characterization of the region encoding the CO-induced hydrogenase of *Rhodospirillum rubrum*. *J Bacteriol*, 1996, **178**: 6200 – 6208.
- [ 20 ] Vignais MV, Billoud B, Meyer J. Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol Rev*, 2001, **25**: 455 – 501.
- [ 21 ] Nicolet Y, Cavazza C, Fontecilla-Camps JC. Fe-only hydrogenases: structure, function and evolution. *J Inorg Biochem*, 2002, **91**: 1 – 8.