

克雷伯杆菌甘油脱氢酶基因的克隆表达与纯化

张婷婷, 方柏山, 王耿, 王飞飞

华侨大学工业生物技术福建省高等学校重点实验室, 泉州 362021

摘要: 以克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)基因组 DNA 为模板, 运用 PCR 扩增得到编码甘油脱氢酶(GDH)的基因(*gldA*), 并克隆到 pMD-18T 载体上, 构建克隆载体 pMD-*gldA*。经测序正确后, 将 *gldA* 亚克隆至表达载体 pET-32a(+) 上构建表达质粒 pET-32*gldA*。在乳糖诱导下, 携带 pET-32*gldA* 的 *E. coli* BL21 (DE3) 高效表达分子量约为 54 kD 的可溶性蛋白。表达产物带有 His6-tag 标记, 选用 Ni 柱对表达产物进行纯化, 纯化后酶液的比活为 188 u/mg, 纯化倍数和回收率分别为 3 倍和 67.5%。

关键词: 甘油脱氢酶(GDH), 克雷伯杆菌, 蛋白纯化

Cloning Expression and Purification of Glycerol Dehydrogenase from *Klebsiella pneumoniae*

Tingting Zhang, Baishan Fang, Geng Wang, and Feifei Wang

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

Abstract: The *gldA* gene coding glycerol dehydrogenase (GDH) was amplified by PCR with the genomic DNA of *Klebsiella pneumoniae* as the template. The *gldA* were inserted in pMD-18T to construct the recombinant cloning vector pMD-*gldA*. After the DNA sequence was determined, the *gldA* was subcloned into expression vector pET-32a (+) to construct the recombinant expression vector pET-32*gldA*. Upon lactose induction, soluble GDH was over-produced by *E. coli* BL21 (DE3) harboring the expression construct. Recombinant GDH purified by Ni-NTA affinity chromatography showed a single band about 54 kD on SDS-PAGE gel, and the specified activity was about 188 u/mg, the purification fold is 3 times and the activity recovery is 67.5%.

Keywords: glycerol dehydrogenase, *Klebsiella pneumoniae*, protein purification

1,3-丙二醇(1,3-PD)是一种重要的化工原料, 它可直接作为抗冻剂、多种增塑剂、洗涤剂、防腐剂和乳化剂的合成原料, 它也用于食品、化妆品和制药等行业。其最主要的用途是作为聚酯、聚醚和聚氨酯等高分子材料的单体^[1]。目前 1,3-丙二醇的合成方法分为化学法和生物法两类。由于化学法所用的催化剂体系复杂, 制作工艺苛刻, 有些配位体剧毒,

合成工艺需高压, 对设备要求高, 回收率又不高, 加上所用的最初原料是石油, 在石油资源愈来愈贫乏, 清洁生产呼声愈来愈响的今天, 研究以可再生资源为原料、污染程度低的生物技术法生产 1,3-丙二醇更引起人们的高度重视。

在甘油转化为 1,3-PD 的厌氧代谢途径中, 甘油沿着氧化和还原两条平行途径代谢(图 1)^[2]。在氧化

Received: July 20, 2007; Accepted: September 25, 2007

Supported by: the National High Technology Research and Development Program of China(No. 2006AA020103), the National Natural Science Foundation of China(No. 20676048).

Corresponding author: Baishan Fang. Tel: +86-2691560; E-mail: fangbs@hqu.edu.cn

国家高技术研究发展计划“863 计划”项目资助 (No. 2006AA020103)、国家自然科学基金项目(No. 20676048)资助。

途径中,甘油在依赖于 NAD^+ 的甘油脱氢酶(glycerol dehydrogenase, GDH, EC 1.1.1.6)的作用下形成二羟基丙酮(DHA),这一代谢过程是以甘油为底物生长的微生物的共同代谢途径,为微生物生长提供 ATP 和 NADH 。在还原途径中,甘油在以维生素 B_{12} 为辅酶的甘油脱水酶(glycerol dehydratase, GDHt, EC 4.2.1.30)的作用下生成三羟基丙醛(3-HPA),然后在

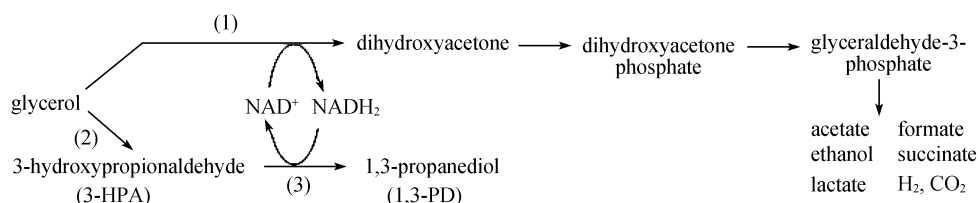


图1 微生物甘油厌氧代谢途径^[2]

Fig.1 Pathway of glycerol anaerobic fermentation

(1) glycerol dehydrogenase; (2) glycerol dehydratase; (3) 1,3-propanediol dehydrogenase

现已发现的几种能以甘油为底物发酵生产 1,3-PD 的菌种中,克雷伯杆菌(*K. pneumoniae*)、丁酸梭状芽孢杆菌(*C. butyricum*)和弗氏柠檬菌(*C. freundii*)具有较高的 1,3-PD 转化率及生产能力,*C. butyricum* 具有良好的 1,3-PD 耐受力,但是该菌属于严格厌氧菌,培养条件苛刻,*K. pneumoniae* 和 *C. butyricum* 属兼性厌氧菌^[3]。虽然大多数用于获得 GDH 的细菌是严格厌氧的,但是本课题组研究发现在克雷伯杆菌中 GDH 却对氧气有一定耐受力,可以在有氧条件下纯化^[4],因此在本研究中以克雷伯杆菌为出发菌。

另一方面,在甘油转化为 1,3-PD 过程中的中间产物 DHA 化学性质活泼,它广泛参与诸如聚合,缩合等化学反应,是一个重要的化学中间体。同时 DHA 也是一个多功能试剂,目前国内有关 DHA 的报道很少,但在国外 DHA 已得到了广泛的实际应用,它可广泛用做医药、农药的中间原料,也可以用于化妆品和食品添加剂等^[5]。DHA 的合成方法目前有化学法和生物法两种,化学法产率和转化率都比较低;微生物法较化学法有反应条件温和,原料利用率高,产品纯度高及工艺简单,易于控制等优点,从长远发展及环境保护角度来看,生物法也显得更具有生命力,但是目前报道的利用 *Gluconobacter oxydans*^[6,7] 等原始菌发酵生产 DHA 同时也存在生产周期长,易染菌等问题,目前本实验室试图通过酶法来直接生产 DHA。

依赖于 NADH 的 1,3-丙二醇氧化还原酶(1,3-propanediol dehydrogenase, PDOR, EC 1.1.1.202)的作用下形成 1,3-PD。还原途径所需的 NADH 由氧化途径提供,整个过程伴随着辅酶 I 的再生。在甘油转化成 1,3-PD 的过程中, GDH、GDHt 和 PDOR 是关键酶,它们的活力与 1,3-PD 的产率密切相关。

目前国内外对于 GDH 的克隆表达的研究还比较少。最近,Keiko 等人在由二级醇转化生产具有光学活性二醇过程的研究中以 pSE420D 为表达载体在 *E. coli* HB101 中表达了 *Hansenula ofunensis* 中的 GDH,并用 DEAE-cellulose、Butyl-Toyopea 和 Superdex200 对其进行纯化,最终酶的比活为 51 u/mg^[8]。

我们试图通过基因工程手段将克雷伯杆菌中的 GDH 基因 *gldA* 在大肠杆菌 BL21 (DE3)中进行克隆表达,并利用镍柱对其进行纯化。本实验室已经克隆表达了克雷伯杆菌中的 PDOR^[9]、GDHt 及其再激活因子^[10],本工作期望能为利用酶法生产 1,3-PD 及二羟基丙酮奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒载体及菌株

克隆载体 pMD18-T、表达载体 pET-32a(+),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、辅酶 I 均购自厦门泰京生物技术有限公司,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 30 °C, 摇床转速 200 r/min, 氨苄青霉素浓度为 75 μg/mL, 乳糖浓度 2 mg/mL。

1.1.4 引物(由北京奥科生物技术有限公司合成)

将在 GenBank 中查到的 *Escherichia blattae* (AY737718) 和 *Citrobacter freundii*(CFU09771) 中 GDH 基因与克雷伯杆菌全基因组的 *dha* 操纵子中各段基因序列进行比对, 得到克雷伯杆菌中 GDH 的基因序列作为模板设计引物。

Primer I: 5'-CGTCGGATCCTACATGCGCACTTATTTGAG-3

Primer II: 5'-AATGCTCGAGCGAATTAACGC GCCAGCCAC-3

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增 *gldA* 基因

以 Primer I、Primer II 为引物, 克雷伯杆菌总 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增 *gldA*, 扩增条件为 94°C 预变性 5 min, 然后在 94°C 1 min, 60°C 1.5 min, 72°C 1.5 min 的扩增条件下, 进行 30 个循环的扩增, 最后在 72°C 下延伸 15 min。

1.2.2 克隆载体 pMD-*gldA* 的构建

将 *gldA* 基因 TA 克隆至 pMD-18T 载体上构建克隆载体 pMD-*gldA* 转化到大肠杆菌 *E. coli* DH5α 中, 小量提取质粒, 经酶切鉴定后由北京奥科生物技术有限公司测序。

1.2.3 表达载体 pET-32*gldA* 的构建

将 pMD-*gldA* 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后, 切胶回收 *gldA*, 所得产物与经同样酶切的 pET-32a(+) 用 T4 DNA 连接酶连接即得到表达载体 pET-32*gldA*, 转化到大肠杆菌 *E. coli* DH5α 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 重组大肠杆菌的诱导表达

挑取重组子大肠杆菌 *E. coli* BL21 (pET-32*gldA*) 接种于含有 75 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 30°C 培养至 OD_{600} 约 0.4 时, 加入乳糖至终浓度为 2 mg/mL, 30 °C 诱导培养 5 h 后离心收集菌体。

1.2.5 GDH 粗酶液的制备

采用超声波细胞破碎法。发酵液于 6500 r/min、4°C 下离心 15 min, 收集菌体, 用 0.05 mol/L、pH 7.4

的磷酸钾缓冲溶液洗涤两次, 取 1 g 湿菌体悬浮于 5 mL 上述磷酸钾缓冲溶液中(含有 2 mmol/L 二硫苏糖醇, 用于保护酶蛋白的二硫键)。将装有菌悬液的 15 mL 离心管置于冰浴中, 细胞破碎仪探头置于液面下 1 cm, 功率 300 W, 超声 2 s, 间隔 2 s, 超声时间 4 min, 4 °C 12 000 r/min 离心 15 min, 去除不溶性细胞碎片, 上清即为粗酶液。

1.2.6 GDH 的纯化

按照常规方法进行镍柱亲和层析纯化。镍柱先用含有 20 mmol/L 咪唑缓冲液 A (20 mmol/L 磷酸钠, 500 mmol/L 氯化钠, 20 mmol/L 咪唑, pH 7.4) 平衡, 上样后再用含 20 mmol/L 咪唑的缓冲液 A 洗杂蛋白, 再用含 500 mmol/L 咪唑的缓冲液 B (20 mmol/L 磷酸钠, 500 mmol/L 氯化钠, 500 mmol/L 咪唑, pH 7.4) 洗脱目的蛋白并收集。

1.2.7 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。

1.2.8 GDH 活力测定

参考 Ahrens K^[11] 的方法并适当修改^[4]。GDH 使甘油脱氢生成二羟基丙酮, 同时辅酶 INAD⁺ 被还原为 NADH。NADH 在 340 nm 的紫外光下有最大吸收, 根据吸光度的增加情况, 用初速度法可测定 GDH 的活力。取含有 30 mmol/L (NH₄)₂SO₄、0.2 mol/L 甘油、2 mmol/L NAD、1 μmol/L Fe(NH₄)₂(SO₄)₂、0.1 mol/L 碳酸钾缓冲溶液 (pH 12.0) 反应液 1.5 mL, 45°C 下恒温后, 加入适量酶液启动反应, 于 340 nm 波长下连续测定酶反应过程中的吸光值(每隔 6 s 记录一个数据, 时间 1 min), 再用式(1)计算即可得到 GDH 的酶活。其定义为: 在上述条件下, 每分钟还原 1 μmol 甘油的酶量为 1 个酶活力单位。酶的比活力为每毫克蛋白质所含酶的单位数(u/mg)。

酶活计算公式如下:

$$\text{酶活力单位(u/mL)} = (V_T \times \Delta A \times K) / (\epsilon \times V_S) \quad (1)$$

其中, V_T : 反应液总体积; V_S : 抽提液样品体积; ΔA : 每分钟吸光度变化值; K : 样品稀释倍数; ϵ : 摩尔吸光系数($\epsilon = 6.3 \text{ L/mmole/cm}$)。

1.2.9 蛋白质质量分数测定

采用 Bradford 法测定^[12], 以牛血清白蛋白为标准蛋白质。

2 结果

2.1 *gldA* 基因的 PCR 扩增

PCR 扩增的 *gldA* 基因大小约为 1133 bp。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在 1000~1200 bp 之间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-*gldA* 的构建及鉴定

gldA 上存在一个 *Hind* III 酶切位点, 构建好的克隆载体 pMD-*gldA* 用 *Hind* III 进行单酶切鉴定时应出现约 3800 bp 大小的一条带。酶切鉴定结果表明连接正确(图 2)。进一步测序结果表明所构建的载体完全正确。

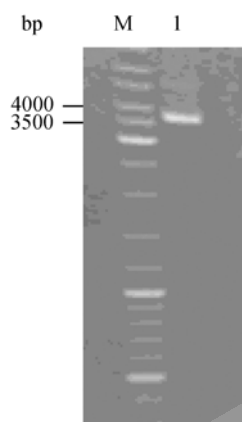


图 2 克隆载体 pMD-*gldA* 的酶切鉴定

Fig. 2 Characterization of pMD-*gldA* digested by *Hind* III

M: DNA marker; 1: pMD-*gldA* digested by *Hind* III

2.3 表达载体 pET-32*gldA* 的构建及鉴定

构建好的表达载体 pET-32*gldA* 用 *Hind* III 进行单酶切鉴定时应出现约 6987 bp 大小的一条带; 用 *Hind* III 和 *Pst* I 进行双酶切鉴定时, 由于 pET-32a(+) 存在两个 *Pst* I 酶切位点, 应得到 2 条 DNA 条带分别在 4808 bp 和 1584 bp 左右。酶切鉴定结果表明连接正确(图 3)。

2.4 GDH 的纯化、SDS-PAGE 分析及比活测定

当以 pET-32a(+) 为表达载体时, 表达的目标蛋白所含的融合基因分子量约为 20.4 kD, 本研究中 GDH 的分子量约为 34 kD^[4], 因此重组质粒所表达的融合蛋白的分子量应为 54 kD(图 4), 与目标蛋白大小一致。此外, 本研究选用的表达载体 pET-32a(+) 中含有表达 His6-tagged 的基因序列, 重组酶含有该融合标签可以用镍柱纯化; 另外在该重组酶的 N 端还含有一个 Rrx-TagTM, 该融合标签有利于提高目的蛋白的可溶部分比例及活性。本研究中重组酶经镍柱亲和层析纯化后可见单一条带, 而穿透液几乎不含该条带, 基本上可以认为得到比较纯的蛋白。纯化结果如表 1, 从表 1 中我们可以看到纯化后酶的回收率是 67.5%, 纯化倍数是 3 倍, 比活达 188 u/mg。

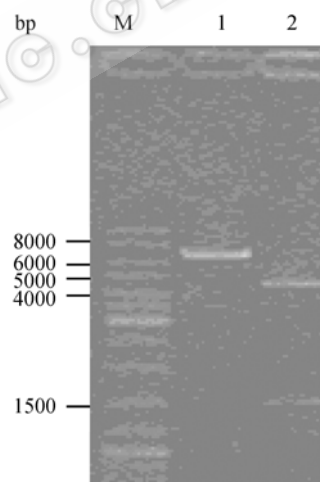


图 3 表达载体 pET-32*gldA* 的酶切鉴定

Fig. 3 Characterization of pET-32*gldA* digested by *Hind* III and *Hind* III/*Pst* I

M: DNA marker; 1: pET-32*gldA* digested by *Hind* III; 2: pET-32*gldA* digested by *Hind* III/*Pst* I

表 1 重组融合蛋白 GDH 纯化
Table 1 Purification of recombinant GDH

Purification step	Total protein/mg	Total activity/u	Protein concentration/(mg/mL)	Specific activity/(u/mg)	Activity recovery/%	Purification fold
Cell extract	18.8	1160	0.78	61.8	100	1
Histrap TM HP	4.2	782	0.12	188	67.5	3.0

3 讨论

本研究运用 PCR 技术从克雷伯杆菌的基因组中扩增得到了编码 GDH 的基因 *gldA*, 构建了克隆载体 pMD-*gldA*。经测序正确后, 将 pMD-*gldA* 亚克隆至表达载体 pET-32a(+)上构建表达质粒 pET-32*gldA*, 转化到大肠杆菌菌株 BL21(DE3)中, 经乳糖诱导实现表达后, 测得重组酶抽提液的酶活为 48.3 u/mL (破碎细胞时条件为 1 g 湿菌体悬浮于 5 mL 磷酸缓冲液), 重组酶用镍柱进行纯化, 纯化倍数和回收率分别为 3 倍和 67.5%, 比活为 188 u/mg。本课题组陈宏文等由克雷伯杆菌培养基和培养条件优化后测得的无细胞抽提液的酶活为 3700 u/L^[13], 本研究中通过构建工程菌得到的重组酶抽提液在相同的酶活测定条件下测得的酶活为 2.42×10^5 u/L, 酶活提高了 65 倍。据文献报道, Keiko 等人以 pSE420D 为表达载体在 *E. coli* HB101 中表达了 *Hansenula ofunaensis* 中的 GDH, 经 DEAE-cellulose、Butyl-Toyopea 和 Superdex200 纯化后, 在其酶活测定体系中测得 GDH 的比活力为 51 u/mg, 回收率为 4.2%^[8]。另外, 本课题组陈宏文等由克雷伯杆菌抽提液经 Q Sepharose Fast Flow 和 Blue Sepharose CL-6B 直接纯化得到的 GDH 的比活力为 36 u/mg, 回收率为 5.83%^[4], 而本研究中重组酶抽提液经镍柱纯化, 在相同的酶活测定体系中测得的比活力就高达 188 u/mg, 回收率为 67.5%, 分别是陈宏文等所得相应结果的 5 倍和 11.6 倍。而且, 本研究中所用表达载体 pET-32a(+)上所带的 His6-tag, 使得目的基因可以方便地用镍柱进行纯化, 简化了纯化工艺。这为进一步研究酶法生产 1,3-丙二醇和二羟基丙酮奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Witt U, Müller RJ, Augusta J, *et al.* Properties and biodegradability of polyesters based on 1,3-propanediol. *Macromol Chem Phys*, 1994, **195**: 793–802.
- [2] <http://wwwuser.gwdg.de/~genmibio/lab201.html>.
- [3] Biebl H, Menzel K, Zeng AP, Deckwer WD. Microbial production of 1, 3-propanediol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **52**: 289–297.
- [4] Chen HW, Wu YH, Wu ZH, *et al.* Purification and characterization of glycerol dehydrogenase from *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2005, **24** (1): 1–5.
陈宏文, 吴雅红, 吴振华, 等. 克雷伯杆菌甘油脱氢酶的分离纯化及性质. 无锡轻工大学学报, 2005, **24** (1): 1–5.
- [5] Kawashima K, Itoh H, Chgate J. Nonenzymatic browning reactions of dihydroxyacetone with amino acids or their esters. *Agri Biol Chem*, 1980, **44**(7): 1595–1599.
- [6] Yamada S, Nabe K, Izuo N. Fermentation production of dihydroxyacetone by *Acetobacter suboxydans* ATCC621. *Ferment Technol*, 1979, **57**(3): 215–220.
- [7] Overchnko MB, Yanson, VA, Dobrolinskaya GM. Effect of some ingredients of the nutrient medium on glycerol oxidation to dihydroxyacetone by *Acetobacter suboxydans*. *Prikl Biokhim Mikrobiol*. 1981, **17**(1): 81–84.
- [8] Keiko YO, Akira N, Yoshiki T. Purification, characterization, and gene cloning of glycerol dehydrogenase from *Hansenula ofunaensis*, and its expression for production of optically active diol. *The Society for Biotechnology*, 2006, **102**(6): 545–551.
- [9] Zheng YY; Cao Y; Fang BS. Cloning and sequence analysis of the *dhaT* gene of the 1,3-propanediol regulon from *klebsiella pneumoniae*. *Biotechnol Lett*, 2004, **26**(3): 251–255.
- [10] Li WJ, Fang BS, Hong Y, *et al.* Cloning and expression of the genes encoding glycerol dehydratase reactivase and identification of its biological activity. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2006, **22**(6): 950–955.
李雯君, 方柏山, 洪燕, 等. 甘油脱水酶再激活酶的克隆表达及活性鉴定. 生物工程学报, 2006, **22**(6): 950–955.
- [11] Ahrens K, Menzel K, Zeng AP, *et al.* Kinetic, dynamic and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella Pneumoniae* in anaerobic continuous culture: III. Enzymes and fluxes of glycerol dissimilation and 1,3-propanediol formation. *Biotech Bioeng*, 1998, **59** (5): 544–552.
- [12] Wang JZ, Wang M. Protein Technology Manual. Beijing: Science Press, 2000, 42–47.
汪家政, 汪明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000, 42–47.
- [13] Chen HW. Studies on process engineering of 1,3-propanediol syntheses by bioconversion [Doctoral thesis]. Tianjin University, 2005.
陈宏文, 生物法合成 1,3-丙二醇的过程工程研究[博士学位文]. 天津大学, 2005.