

# 甘油脱氢酶基因(*dhaD*)与二羟丙酮激酶基因(*dhaKL*)共表达

郑 艳<sup>1</sup>, 管艺飞<sup>1</sup>, 刘长江<sup>2</sup>

(1.沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110161; 2.辽宁省人民政府, 辽宁 沈阳 110000)

**摘 要:** 以肺炎克雷伯氏菌 As1.1736 的基因组为模板, 通过 PCR 技术成功地扩增了 *dhaD* 基因, 并构建了 *dhaD* 和 *dhaKL* 基因的共表达载体。序列分析结果表明: *dhaD* 基因全长 1104bp, 编码 367 个氨基酸残基。SDS-PAGE 电泳结果表明: *dhaD* 和 *dhaKL* 基因均获得了有效表达; 上清液中酶活性分别为甘油脱氢酶 23.2U/ml, 二羟丙酮激酶 25.6U/ml。

**关键词:** *dhaD*; 克隆; *dhaKL*; 共表达

## Coexpression of Glycerol Dehydrogenase Gene (*dhaD*) and Dihydroxyacetone Kinase Gene (*dhaKL*)

ZHENG Yan<sup>1</sup>, GUAN Yi-fei<sup>1</sup>, LIU Chang-jiang<sup>2</sup>

(1.College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China;

2.Government of Liaoning Province, Shenyang 110000, China)

**Abstract:** The gene of *dhaD* encoding glycerol dehydrogenase was amplified by PCR from the genomic DNA of *Klebsiella pneumoniae* As1.1736 and the expression vector pET-28a(+)/*dhaKL-dhaD* was constructed. Sequence analysis showed that *dhaD* gene is 1104 bp length and encodes 367 amino acid residues; SDS-PAGE showed that the *dhaKL* gene and *dhaD* are expressed, and the enzyme activities of glycerol dehydrogenase and dihydroxyacetone kinase are 23.2 U/ml 25.6 U/ml respectively in supernatant.

**Key words:** *dhaD* gene; clone; *dhaKL* gene; coexpression

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)06-0222-04

1,3- 丙二醇与对苯二甲酸合成的聚酯 PTT 纤维因具有等多种优良特性, 而广泛的被应用于食品、化妆品、纺织、印染、医药、涂料等行业<sup>[1]</sup>。因此, 作为原料的 1,3- 丙二醇的生产就成为 PTT 行业发展的支点。

目前, 1,3-PD 的生产方法主要有化学合成法和微生物发酵法。由于化学合成法成本高、能量消耗大, 且会产生严重的环境污染, 极大地限制了 1,3-PD 的应用<sup>[2]</sup>。甘油厌氧发酵形成 1,3- 丙二醇的代谢途径中, 甘油作为唯一的碳素来源和能源物质, 除了一部分形成生物量外, 其余沿着氧化和还原两个平行路径代谢。通过氧化途径, 甘油在甘油脱氢酶(由 *dhaD* 编码)的作用下生成二羟丙酮, 并由二羟丙酮激酶(由 *dhaKL* 编码)进一步催化生成丙酮酸, 同时为微生物提供 ATP 和 NADH<sub>2</sub>; 通过还原途径, 甘油在甘油脱水酶(由 *gldABC* 编码)的作用下生成 3- 羟基丙醛, 然后在 1,3- 丙二醇氧化还原酶

(由 *dhaT* 编码)的作用下生成 1,3- 丙二醇, 同时消耗了氧化途径中生成的过量的还原当量 NADH<sub>2</sub>, 维持了代谢过程的平衡。由于只能以甘油为底物发酵生产 1,3-PD, 因此在经济上与化学合成法相比不占优势。

随着生物技术的发展, 通过构建基因工程菌使得以廉价碳源为底物一步法生产 1,3-PD 成为可能<sup>[3-5]</sup>。目前, 国内外对 1,3- 丙二醇基因工程菌构建的研究主要集中在将还原途径中的酶基因(*gldABC*、*dhaT*)转移至大肠杆菌中, 而氧化途径酶基因的克隆与表达则鲜少有相关报道<sup>[6]</sup>。本实验在克隆 1,3- 丙二醇代谢途径中的 *dhaD* 基因的基础上, 构建 *dhaD* 与 *dhaKL* 基因的表达载体, 以期 1,3- 丙二醇基因工程菌的构建奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

收稿日期: 2007-08-15

作者简介: 郑艳(1973-), 讲师, 博士研究生, 研究方向为食品生物技术、酶工程。E-mail: helon\_z@126.com

### 1.1.1 菌株与载体

肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)As1.1736 中科院微生物研究所; *Escherichia coli* competent BL21 (DE3)pET28a(+) Novagen 公司。

### 1.1.2 试剂

*Xba*I、*Sac*I、*Xho*I、LTag、Ligation Mix、DNA 聚合酶 DNA 凝胶回收试剂盒、DNA 纯化试剂盒等 宝生物工程(大连)有限公司; X-gal、IPTG Promega 公司。

### 1.1.3 培养基

大肠杆菌培养基为 LB 培养基; 含重组表达载体的大肠杆菌培养基为 LB/Kan(100mg/L)。

### 1.2 *dhaD* 基因的扩增

根据 NCBI 中发表的甘油脱氢酶的氨基酸序列 (NP418380) 设计一对引物: *dhaD*-F1 5'-GAGCTCAACACCCCTGCGGTAGAGTC-3'(含 *Sac*I 酶切位点); *dhaD*-R1 5'-CTCGAGGACAAGXXGGGAGTTTGGAG-3'(含 *Xho*I 酶切位点)。

反应参数为: 94℃ 预变性 10min。循环参数为: 98℃ 10s, 55℃ 30s, 72℃ 70s, 30 个循环。

### 1.3 目的基因的克隆及鉴定

使用 TaKaRa DNA 连接试剂盒, 将回收后的 *dhaD* 基因 3 的 PCR 扩增产物分别与 pMD19-T Simple 载体在 16℃ 下连接 3h, 连接产物热转化至 *E. coli* JM109 中, 通过蓝白斑筛选阳性克隆, 并作酶切鉴定。

### 1.4 *dhaD* 基因与 *dhaKL* 基因共表达载体的构建

构建过程见图 1。

### 1.5 重组质粒的鉴定

用 *Xho*I 和 *Sac*I 对 pET-28a(+)/*dhaKL*-*dhaD* 进行酶切鉴定; 测序鉴定由宝生物工程大连有限公司完成。

### 1.6 基因组 DNA 提取、质粒提取及转化

基因组 DNA 提取、质粒提取、转化等实验操作参照参考文献[7]。

### 1.7 *dhaKL* 基因的表达

将重组细胞接种至 50ml LB/kan 培养基中, 37℃、190r/min 振荡培养至培养液的 A<sub>600</sub> 达到 0.6~1.0。加入 IPTG(终浓度为 1mmol/L)诱导表达 2h, 表达产物进行 SDS-PAGE 电泳分析。

### 1.8 酶活测定

酶活测定参见参考文献[8]。

## 2 结果与分析

### 2.1 *dhaD* 基因克隆与序列分析

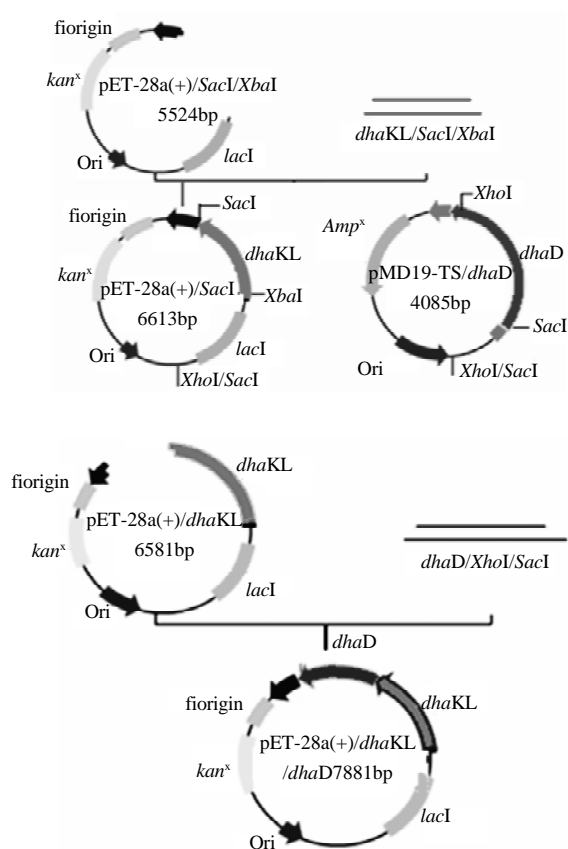
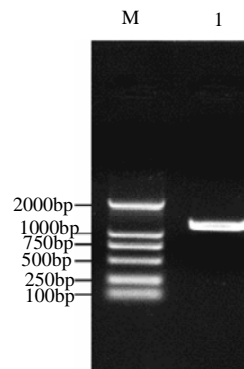


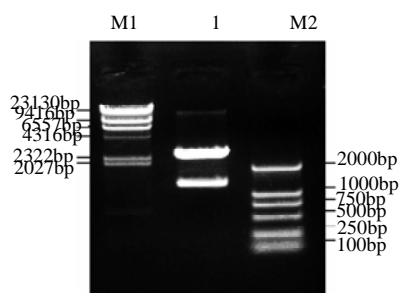
图1 pET-28a(+)/*dhaKL*-*dhaD* 构件示意图  
Fig.1 Construction of pET-28a(+)/*dhaKL*-*dhaD*



M. DNA Maker DL 2000; 1. *dhaD* 基因 PCR 产物。

图2 *dhaD* 基因 PCR 扩增产物电泳图谱  
Fig.2 Agarose electrophoresis of PCR amplification of *dhaD* genes

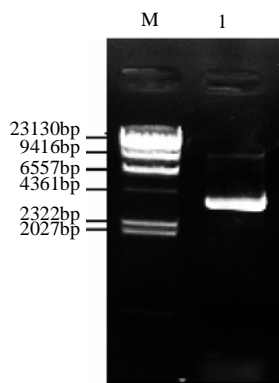
以肺炎克雷伯氏杆菌基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增出长度约为 1.1kb 的 *dhaD* 基因片段(图 2)。将该基因与 pMD19-T Simple 载体的连接产物热转化至 *E. coli* JM109 中, 通过蓝白斑筛选阳性克隆, 提取质粒, 并用 *Xho*I、*Sac*I 进行酶切鉴定(图 3)。DNA 序列分析的结果表明: *dhaD* 基因的全长为 1104bp, 编码 367 个氨基酸残基组成的多肽链, 与 GenBank 上已发表的 AL627279.1 的核苷酸序列的同源性达 83%。



M1.DNA Marker  $\lambda$ Hind III; 1.4<sup>#</sup> 克隆质粒; M2.DNA Marker DL 2000。

图3 重组质粒 *Xho*I、*Sac*I 酶切鉴定的琼脂糖凝胶电泳图谱

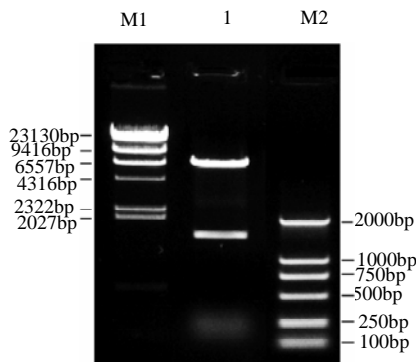
Fig.3 Identification of combined plasmid with *Xho*I and *Sac*I



M.DNA Marker  $\lambda$ Hind III; 1.1<sup>#</sup> 克隆质粒。

图4 重组质粒的琼脂糖凝胶电泳

Fig.4 Agarose electrophoresis of combined plasmid



M. DNA Marker  $\lambda$ HindIII; 1.PET28a(+)/*dhaD*/*Xho*I/*Sac*I 表达片断。

图5 pET28a (+) / *dhaD* / *Xho*I / *Sac*I 表达载体片断的琼脂糖凝胶电泳

Fig.5 Agarose electrophoresis of pET28a(+)/*dhaD*/*Xho*I/*Sac*I

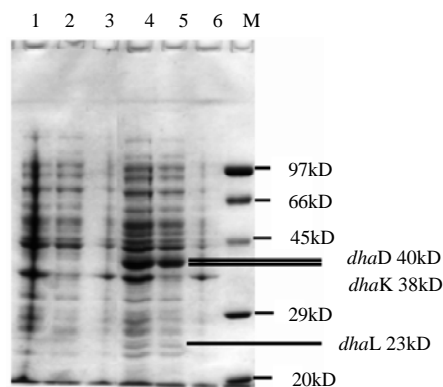
## 2.2 *dhaD* 基因与 *dhaKL* 基因共表达载体的构建

将构建的共表达载体热转化至 *E. coli* BL21(DE3)中, 筛选阳性克隆提取质粒(图4), 并作酶切鉴定(图5)。结果表明: 已经成功地构建了 pET28a(+)/*dhaKL*-*dhaD* 共

表达载体, 序列测定也进一步证实了此结果。

## 2.3 *dhaD* 基因与 *dhaKL* 基因的共表达

重组细胞经诱导表达后分别在甘油脱氢酶分子量相对应的 40kD 和二羟丙酮激酶亚基分子量相对应的 39、23kD 的位置上出现了特异性条带(图6), 上清液中的酶活性分别为甘油脱氢酶 23.2U/ml, 二羟丙酮激酶 25.6U/ml。



1. pET-28a(+)菌体总蛋白; 2.上清液中 pET-28a(+)菌体蛋白; 3.沉淀中 pET-28a(+)菌体蛋白; 4.菌体总诱导蛋白; 5.上清液诱导蛋白; 6.沉淀诱导蛋白; M. 蛋白分子量标准。

图6 表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.6 SDS-PAGE electrophoresis of *dhaKL* and *dhaD* genes coexpressin

## 3 讨论

肺炎克雷伯氏菌对甘油的厌氧代谢包括氧化途径和还原途径, 两个代谢途径的协调主要是由一个调节子来完成, 这个调节子被 Lin 等人称为 *dha* 调节子<sup>[9]</sup>。*dha* 调节子只存在于少数几种微生物中, 除肺炎克雷伯氏杆菌外还有巴氏梭菌(*Clostridium pasteurianum*)、丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)、弗氏柠檬酸菌(*Citrobacter freundii*)、梭菌(*Clostridium perfringens*)。研究表明, *dha* 调节子共有 15 个开放阅读框构成, 它们分别编码 *dhaKL* 基因、*dhaD* 基因、*gldABC* 基因、*dhaT* 基因、一个调节蛋白(DhaR)、一个甘油脱水酶激活因子、一个运载促进因子和两个功能尚未明确的蛋白<sup>[10]</sup>。

本实验将 *dha* 调节子中的 *dhaKL* 和 *dhaD* 基因以串联的形式成功的亚克隆至 pET-28a(+)表达载体上, 为葡萄糖直接转化为 1, 3- 丙二醇基因工程菌的构建奠定了理论基础。

## 参考文献:

- [1] ZENG A P, BIEBL H. Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends[J]. Adv Biochem Eng

- Biotechnol, 2002, 74: 239-259.
- [2] 修志龙. 微生物发酵法生产 1,3- 丙二醇的研究进展[J]. 微生物学通报, 2000, 27(4): 300-302.
- [3] NAGARAJAN V, NAKAMURA C E. Production of 1,3-propanediol from glycerol by recombinant bacteria expressing recombinant diol dehydratase: US, 5821092[P]. 1998-10-13.
- [4] DUNN-COLEMAN N, DIAZ-TORRES M, CHASE M W, et al. Method for the recombinant production of 1,3-propanediol: US, 6136576[P]. 2005-10-11.
- [5] FRERES R. Process for the production of 1,3-propanediol by fermentation: US, 6406895B1[P]. 2002-06-18.
- [6] 周文广, 黄日波. 构建基因工程菌生产 1,3- 丙二醇的研究进展[J]. 广西大学学报: 自然科学版, 2003, 8(4): 305-308.
- [7] SAMBROOK J, FITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual.[M]. 3<sup>rd</sup> Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989.
- [8] JOHNSON E A, BURKE S K, FORAGE R G, et al. Purification and properties of dihydroxyacetone kinase from *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of Bacteriology, 1984, 160(1): 55-60.
- [9] FORAGE R G, LIN E C C. DHA system mediating aerobic and anaerobic dissimilation of glycerol in *Klebsiella pneumoniae* NCIB 418[J]. Journal of Bacteriology, 1982, 151(2): 591-599.
- [10] BIEBL H, MENZEL K, ZENG A P, et al. Microbial production of 1,3-propanediol[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1999,52:289-297.