

甘油脱水酶结构基因(gldABC)克隆及序列分析

郑 艳¹, 管艺飞¹, 刘长江²

(1. 沈阳农业大学食品学院食品生物技术实验室, 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 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增得到了目的基因(gldABC)并将该基因克隆到 pMD19-T Simple 载体。通过对该基因的序列分析, 甘油脱水酶(gldABC)结构基因的全长为 2816bp, 由三个独立的开放阅读框架组成, 三个独立的读码框分别由 1668、585、426bp 组成, 分别编码 556、195、142 个氨基酸。通过 BLAST 同源性分析, 该基因与 GenBank 中已发表的 gldABC 基因(U60992)的核苷酸序列同源性为 99.39%。氨基酸的同源性为 100%。

关键词: 肺炎克雷伯氏菌; 1, 3- 丙二醇; 甘油脱水酶; 克隆

Gene Clone and Sequence Analysis of Glycerol Dehydratase

ZHENG Yan¹, GUAN Yi-fei¹, LIU Chang-jiang²

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

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

Abstract: The gene of gldABC encoding glycerol dehydratase was amplified by PCR and cloned into the vector of pMD19-T Simple marker. Sequence analysis showed that the gene of gldABC is 2816bp including three open reading frames encoded polypeptides of 556, 194 and 142 amino acids respectively. The deduced amino acid sequences homologized with *Klebsiella pneumoniae* ATCC25955 is 100%.

收稿日期: 2006-02-05

基金项目: 辽宁省科技厅重大攻关课题(99205002)

作者简介: 郑艳(1973-), 女, 讲师, 博士, 主要从事食品生物技术、酶工程方面的研究。

-
- [6] SARDAR M, AGARWAL R, KUMAR A, et al. Noncovalent immobilization of enzymes on an enteric polymer Eudragit S-100[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, 20: 361-367.
- [7] KUMAR A, GUPTA M N. Immobilization of trypsin on an enteric polymer Eudragit S-100 for the biocatalysis of macromolecular substrate[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1998(5): 289-294.
- [8] ARASARATNAM V, GALAEV I Y, MATTIASSEN B. Reversibly soluble biocatalyst: optimization of trypsin coupling to Eudragit S-100 and biocatalyst activity in soluble and precipitated forms[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 27: 254-263.
- [9] RODRIGUES A R, CABRAL J M S, TAIPA M A. Immobilization of chromobacterium viscosum lipase on Eudragit S-100: coupling, characterization and kinetic application in organic and biphasic media[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 31: 133-141.
- [10] CHARUSHEELA A, ARVIND L. Enzyme catalyzed hydrolysis of esters using reversibly soluble polymer conjugated lipases[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 30: 19-25.
- [11] GAWANDE P V, KAMAT M Y. Preparation, characterization and application of *Aspergillus* sp. xylanase immobilized on Eudragit S-100[J]. *Journal of Biotechnology*, 1998, 66: 165-175.
- [12] AI Z, JIANG Z, LI L, et al. Immobilization of streptomyces olivaceoviridis E-86 xylanase on Eudragit S-100 for xylo-oligosaccharide production[J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40: 2707-2714.
- [13] CONG L, KAUL R, DISSING U, et al. A model study on eudragit and polyethyleneimine as soluble carriers of α -amylase for repeated hydrolysis of starch[J]. *Journal of Biotechnology*, 1995, 42: 75-78.
- [14] DOURADO F, BASTOS M, MOTA M, et al. Studies on the properties of cellulast/Eudragit L-100 conjugate[J]. *Journal of Biotechnology*, 2002, 99: 121-131.
- [15] SARDAR M, ROY I, GUPTA M N. Simultaneous purification and immobilization of *Aspergillus niger* xylanase on the reversibly soluble polymer EudragitTM L-100[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 27: 672-679.
- [16] SUNNA A, ANTRANI K G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1997, 17(1): 39-67.
- [17] ROY I, GUPTA A, KHARE S K, et al. Immobilization of xylan-degrading enzymes from *Melanocarpus albomyces* IIS 68 on the smart polymer Eudragit L-100[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 61: 309-313.
- [18] 何成新, 张厚瑞, 曾健智, 等. 气巴蓝着色蔗渣木聚糖检测木聚糖酶活性[J]. *微生物学通报*, 2003, 30(1): 45-48.
- [19] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.

Key words *K. pneumoniae*; 1,3-propanediol; glycerol dehydratase; clone

中图分类号: Q785

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)03-0203-03

1,3-丙二醇(1,3-propanediol,简称为1,3-PD)是生产多聚纤维及制造多氨基甲酸乙酯及环状化合物的单体。利用1,3-PD生产的新型聚酯纤维具有优良的回弹性、染色性、抗污性和生物降解性等优良品质,在食品、服装、工程塑料、地毯、化工等领域应用潜力巨大^[1]。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^[2]。微生物发酵法生产1,3-PD因成本低、副产物少、绿色环保等特点而成为国内外研究的热点。在自然界中,1,3-PD是由甘油为底物发酵得到的。在微生物形成1,3-PD的过程中主要包括两步反应:首先由甘油脱水酶将甘油脱水生成3-羟基丙醛(3-HPA),再由1,3-PDO氧化还原酶将3-HPA还原为1,3-PDO,产生的1,3-PDO是细胞代谢终产物^[3]。在这个代谢途径中,甘油脱水酶是整个代谢途径中的限速酶^[4],它是由三个亚基 α 、 β 、 γ 构成的二聚体酶,三个亚基分别由gldA、gldB、gldC基因编码^[5]。该酶的催化活性直接影响1,3-PD的产量,因而它的克隆与高效表达将有助于1,3-PD产量的提高。本文通过对1,3-PD合成有关的甘油脱水酶结构基因的克隆、测序及序列分析,为基因工程菌的构建奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)As1.1736 中科院微生物研究所; *Escherichia coli* JM109、pMD19-T Simple质粒 宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 试剂

*Xba*I、*Sac*I、*LA*Tag DNA聚合酶、DNA凝胶回收试剂盒、质粒纯化试剂盒 宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 培养基

大肠杆菌培养基:胰蛋白胨10g,酵母膏5g,NaCl 10g,琼脂15g,蒸馏水1000ml,pH7.0,肺炎克雷伯氏培养基:同大肠杆菌培养基;含重组质粒的大肠杆菌培养基:胰蛋白胨10g,酵母膏5g,NaCl 10g,Ampicillin 0.1g,IPTG 0.024g,X-Gal 0.01g,琼脂15g,蒸馏水1000ml,pH7.0。

1.4 基因组DNA的提取

基因组DNA的提取按参考文献[6]进行。

1.5 甘油脱水酶基因的PCR扩增

1.5.1 引物设计

根据NCBI上发表的gldABC基因序列,设计已对引物。上游引物gldABC-F5'-TCTAGATTTTCACCTT

TTGAGCCGATGA-3'(含*Xba*I酶切位点);下游引物gldABC-R 5'-GAGCTCTTGTCCTCCGCGTCCCTTTCAT-3'(含*Sac*I酶切位点)。

1.5.2 PCR扩增

以肺炎克雷伯氏菌基因组为模板,以gldABC-F和gldABC-R为引物进行PCR扩增。PCR反应体系为:dNTPs(2.5mmol/L)8 μ l,10 \times PCRTM Buffer II(含Mg²⁺)5 μ l,*LA*Tag DNA聚合酶(5U/ μ l)0.5 μ l,gldABC-F(20pmol/L)0.5 μ l,gldABC-R(20pmol/L)0.5 μ l,DNA模板1.5 μ l,dH₂O 34.5 μ l,总体积为50 μ l。反应参数为:94℃变性10min。循环参数为:98℃ 10s、55℃ 30s、72℃ 3min。30个循环。

1.6 PCR产物的纯化与克隆

用DNA凝胶回收试剂盒回收PCR扩增片断,与pMD19-T Simple载体连接,连接产物转化至大肠杆菌JM109中,蓝白斑筛选转化子。

1.7 重组质粒鉴定

1.7.1 PCR鉴定与酶切鉴定

PCR鉴定的反应体系为:Premix Taq 25 μ l,模板DNA(重组质粒)1.5 μ l,gldABC-F(20pmol/L)0.5 μ l,gldABC-R(20pmol/L)0.5 μ l,dH₂O 22.5 μ l。反应参数为:94℃变性10min。循环参数为:98℃ 10s、55℃ 30s、72℃ 3min,30个循环。

用*Xba*I、*Sac*I分别对重组质粒进行酶切反应,酶解产物以1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7.2 gldABC基因核苷酸序列的测定

序列测定由宝生物工程(大连)有限公司完成。

2 结果与分析

2.1 肺炎克雷伯氏菌基因组DNA

肺炎克雷伯氏菌的基因组DNA的提取结果见图1。由图1可知,该菌的基因组DNA约为23kb,电泳条带清晰完整。

2.2 gldABC基因的PCR扩增

以gldABC-F和gldABC-R为引物,肺炎克雷伯氏菌基因组DNA为模板扩增gldABC基因,PCR产物通过1%琼脂糖凝胶电泳分析,结果见图2。从电泳图谱可知扩增出的DNA片段长度与预期一致,约为3kb。

2.3 gldABC基因的克隆

将扩增出的目的基因片段克隆至克隆载体pMD19-T Simple上,重组质粒命名为pMD19-T Simple/gldABC,并将获得的重组质粒进行测序(图3)。

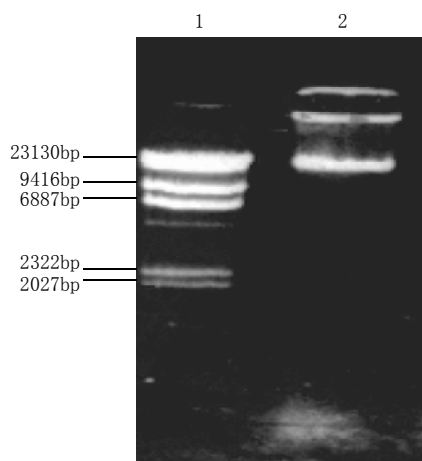
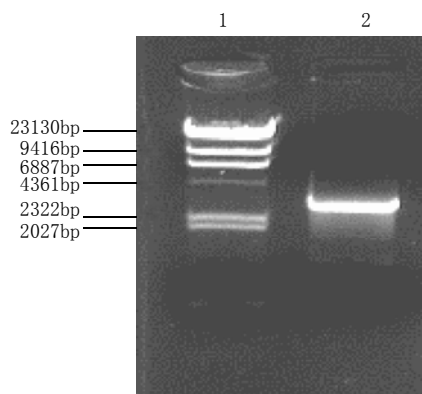
1. DNA Marker λ /HindIII; 2. 基因组 DNA。图1 *K.pneumoniae* As1.1736 菌株基因组 DNAFig.1 Agarose electrophoresis genomic DNA of *K.pneumoniae*1. DNA Marker λ /HindIII; 2. *K.pneumoniae* As1.1736菌株PCR扩增产物。图2 *K.pneumoniae* As1.1736 菌株 gldABC 基因 PCR 扩增图谱

Fig.2 Agarose electrophoresis of PCR amplification of gldABC gene

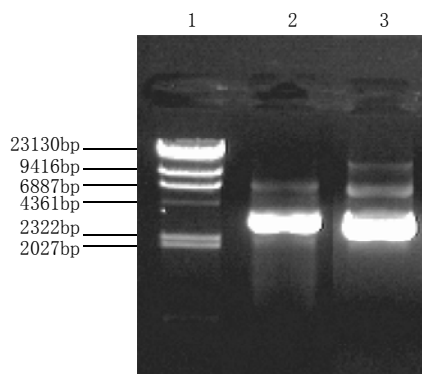
1. DNA Marker λ /HindIII; 2. 重组质粒; 3. 质粒 pUC19。

图3 重组质粒电泳图谱

Fig.3 Agarose electrophoresis of pMD19-T simple/gldABC

2.4 gldABC 基因测序及序列分析

通过对肺炎克雷伯氏菌(As1.1736)编码甘油脱水酶结构基因的序列分析表明:该基因全长为2816bp,由2~12个核苷酸间隔开的三个独立阅读框组成,三个独立的读码框分别由1668、585、426bp组成,分别编码556(α)、195(β)、142(γ)个氨基酸,单个亚基分子量分别为61、22、16kDa。经DNASTar/Protean程序分析,该酶的等电点为7.59,为水溶性蛋白质,其中酸性氨基酸为118个,碱性氨基酸为109个。氨基酸序列中含有10个N-豆蔻酰化位点,9个蛋白激酶C的磷酸化位点,19个酪蛋白激酶II磷酸化位点,2个N-糖基化位点。通过BLAST同源性分析,该基因与GenBank中已发表的gldABC基因(U60992)的核苷酸序列同源性为99.39%。氨基酸的同源性为100%。

3 讨论

以葡萄糖为底物直接生产1,3-PD总共需要6个基因,其中甘油脱水酶基因是由甘油生成1,3-PD途径中的关键酶,它在1,3-PD的生产中起着至关重要的作用,对它的研究进展必将影响1,3-PD的产业化进程。由于目前从肺炎克雷伯氏菌、弗氏柠檬杆菌等属中发现的甘油脱水酶都是以VB₁₂为辅酶,环境中VB₁₂的有无对于甘油脱水酶的催化活性有很大的影响,而外周环境中的VB₁₂很难穿透微生物细胞的细胞壁,所以如何降低或改变甘油脱水酶对于VB₁₂依赖是我们今后工作的重点。

参考文献:

- [1] WITT U, MULLER R T, WIDDENCK H, et al. Syntheses properties and biodegradability of polyesters base on 1,3-propanediol [J]. Makromol Chem Phys, 1994, 195: 793-802.
- [2] HOMANN T, TAG C, BIEBL H, et al. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1990, 33: 121-126.
- [3] BIEBL H, MARTEN S, HIPPE H, et al. Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated *Clostridia* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1992, 36: 592-597.
- [4] CAMERON D C, ALTARAS N E, HOFFMAN M L, et al. Metabolic engineering of propanediol pathways [J]. Biotechnol Progress, 1998, 14: 116-125.
- [5] Genecor International Inc. Method for the recombinant production of 1,3-propanediol: US, 6136576[P]. 2000-10-24.
- [6] SAMBROOK J, FITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.