

从甘油富集菌宏基因组中克隆甘油脱水酶基因*

吴杰群¹ 周文广¹ 杨登峰² 齐向辉¹ 韦宇拓¹ 黄日波^{1,2,*}

(广西大学生命科学与技术学院 南宁 530005)¹ (广西科学院 南宁 530022)²

摘要: 采用一种简便快速的方法从经甘油富集培养的土样中提取出质量较好宏基因组 DNA。然后以此 DNA 为模板, 以扩增肺炎克雷伯氏菌、弗氏柠檬酸菌和丁酸梭菌甘油脱水酶基因的引物进行 PCR, 分别扩增出目的条带, 并将其克隆至 T 载体中。进行测序分析显示, PCR 扩增出来的片段与其引物相应的甘油脱水酶序列同源性分别达到 99%, 90% 和 99%。这表明克隆出来的这 3 个基因为相应的甘油脱水酶基因。

关键词: 宏基因组, 甘油脱水酶, 基因克隆

中图分类号: Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 06-0052-05

Cloning the Genes Encoding Glycerol Dehydratase from Metagenomic DNA*

WU Jie-Qun¹ ZHOU Wen-Guang¹ YANG Deng-Feng² QI Xiang-Hui¹

WEI Yu-Tuo¹ HUANG Ri-Bo^{1,2,*}

(College of Life Science, Guangxi University, Nanning 530005)¹

(Guangxi Academy of Science, Nanning 530022)²

Abstract: A pure metagenomic DNA was extracted from the soil by a simple, rapid method. From the metagenomic DNA, three different DNA fragments were successfully amplified using the primers of different glycerol dehydratase genes. And those fragments were inserted into T vector. After being sequenced, it was found that they were highly homologous to the reported glycerol dehydratase genes from *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* and *Clostridium butyricum*. The sequences alignment showed that these DNA fragments had 99%, 90% and 99% identities to the strains above, respectively.

Key words: Metagenome, Glycerol dehydratase, Gene cloning

甘油脱水酶 (glycerol dehydratase, EC 4.2.1.30) 能催化甘油转化为 3-羟基丙醛 (3-HPA)^[1]。近来, 由于其作为生物转化法生产 1, 3-丙二醇 (工业上有重要用途的化工材料) 的限速酶而成为研究热点^[2-4]。在这些研究中, 人们都把精力集中在改造或者寻找新的具有更好催化性质的甘油脱水酶, 使之不成为限制 1, 3-丙二醇产量中的瓶颈。在寻找新的甘油脱水酶的过程中, 一个传统的方法就是在一个甘油富集的环境中取样, 然后对微生物进行分离培养, 筛选出能生产 1, 3-丙二醇的菌株, 提取总 DNA, 克隆甘油脱水酶并在大肠杆菌中表达。这些操作繁琐、费时, 并且还必须有一个很好的筛选方法, 在实际操作中, 机遇性很大, 成功率较低。在本研究中, 从一个甘油富集土壤里取土样, 经甘油富集培养两天后直接提取其宏基因组 DNA, 然后以扩增肺炎克雷伯氏菌、弗氏柠檬酸菌和丁酸梭菌甘油脱水酶基因的引物进行 PCR, 扩增出目的

* 国家高技术研究发展计划项目 (“863” 项目) (No. 2003AA001039)

** 通讯作者 Tel: 86-771-3235706, Fax: 86-771-3238107, E-mail: priboh@gxu.edu.cn

收稿日期: 2006-02-08, 修回日期: 2006-03-29

条带, 进行测序分析显示, 与其相应的甘油脱水酶序列同源性分别达到 99%, 90% 和 99%。这为探索微生物活性物质筛选的途径提供了实例。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 克隆载体 T 购自 TaKaRa 公司, *Escherichia. coli* JM109 为本实验室保存。

1.1.2 土样: 采自广西南宁市一废弃甘油厂下水道。

1.1.3 培养基: 发酵甘油菌富集培养基^[5] (每升含: K_2HPO_4 14.0g, KH_2PO_4 6.0g, $(NH_4)_2SO_4$ 3.0g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.0119g, 酵母提取物 0.2g, 半胱氨酸 0.2g, 甘油 100mmol/L, 调 pH7.5)。LB 培养基 (每升含: 蛋白胨 10g, 酵母粉 5g, NaCl 10g, 调 pH 7.0), 培养基氨苄青霉素终浓度为 100 μ g/mL。

1.1.4 酶和试剂: LA Taq DNA polymerase, DNA Ligation Kit, DNA Marker 购自大连 TaKaRa 公司; X-gal, IPTG, SDS 购自 Gibco 公司, 蛋白胨, 酵母粉购自 OXOID 公司。胶回收试剂盒、酵母菌基因组 DNA 快速抽提纯化试剂盒、质粒提取试剂盒均购自上海舜华生物工程有限公司。其余试剂为国产分析纯。

1.1.5 DNA 提取液: 每升提取液中含: 100mmol/L Tris-HCl, 100mmol/L EDTA-Na, 100mmol/L Na_3PO_4 , 1.5mol/L NaCl, 1% CTAB, 调 pH 8.0。

1.1.6 引物设计与合成: 根据文献[6~8], PCR 扩增克雷伯氏菌、弗氏柠檬酸菌和丁酸梭菌甘油脱水酶基因的 3 对引物分别为: P1s: 5'-ATTGAATTCTTAAAGAGAGAG-GCTGCCG-3', P1a: 5'-CTCGAATTCATGAAAAGATCAAAAACGATTTGCAG TACTGGCCC-3'; P2s: 5'-AAGCCATGGGAAGATCAAAAACGATTCGAAGTGCCTTGC-3', P2a: 5'-AAT-GTCGACATACAACCTCCGTCCTG-3'; P3s: 5'-ATACCATGCTAAGTAAAGCATTAG-TACCC-3', P3a: 5'-ATAGGATCCTATTACTCAGCTCCAATTCT-3'。

1.2 方法

1.2.1 发酵甘油菌的富集: 取 10 余克土样置于富集培养液 (500mL) 中, 在厌氧培养箱里培养 24h。然后补充 500mL 培养液, 再培养 24h。

1.2.2 宏基因组 DNA 的粗提: 参照文献 [9], 有所改动, 具体步骤如下: (1) 离心, 收集沉淀, 然后平均加入 27mL 的 DNA 提取液和 200 μ L 的蛋白酶 K (10mg/mL), 摇床 (225r/min, 37 $^{\circ}$ C) 振荡 30min。(2) 加入 3mL 20% 的 SDS, 放入 65 $^{\circ}$ C 水浴锅水浴 2h, 每隔 15~20min 倒置混匀。(3) 6,000 $\times$ g 离心 10min, 取上清。(4) 剩下沉淀重复步骤 (1)~(3), 然后把上清混在一起, 加等体积的氯仿抽提, 然后加入 0.6 倍体积异丙醇沉淀 1h。(5) 12,000 $\times$ g 离心 20min, 沉淀溶于 8mL TE 溶液中, 加入 10 μ L RNase 37 $^{\circ}$ C 作用 0.5h。(6) 等体积酚/氯仿抽提 1 次, 氯仿抽提 1 次。(7) 用 0.1 倍体积的醋酸钠和两倍体积乙醇沉淀 DNA, 再用 70% 乙醇洗涤沉淀两次。(8) 沉淀用 1mL TE 溶解, 即粗质量宏基因组 DNA。

1.2.3 宏基因总 DNA 的纯化: 宏基因总 DNA 的纯化采用两种方法, 第 1 种方法为取粗质量宏基因组 DNA 经 0.8% 的琼脂糖电泳分离后, 用胶回收试剂盒回收最亮部分。

第 2 种方法为采用上海华舜小量酵母菌基因组 DNA 抽提试剂盒, 对宏基因组 DNA 进行快速纯化。通过以上步骤, 即可获得高质量宏基因组 DNA。

1.2.4 PCR 扩增甘油脱水酶基因: 以宏基因组 DNA 为模板, 分别以扩增克雷伯氏菌甘油脱水酶基因的引物 P1s、P1a, 以扩增弗氏柠檬酸菌甘油脱水酶基因的引物 P2s、P2a, 以扩增丁酸梭菌甘油脱水酶基因引物 P3s、P3a 为引物进行 PCR。

1.2.5 甘油脱水酶基因的克隆: 将 PCR 产物直接与 T 载体连接, 分别转化到 *E. coli* JM109 中, 在含有 X-gal、IPTG、Amp 的 LA 平板培养基上培养后, 随机挑取白色菌落, PCR 确认载体中插入片段的大小, 并进行测序分析。得到的重组质粒分别命名为 T-1、T-2、T-3。

1.2.6 DNA 序列分析: 序列分析采用软件 Vector NTI 9.0 进行。

1.2.7 甘油脱水酶活力的检测: 把这 3 个甘油脱水酶基因分别亚克隆到表达载体 pSE380 上, 然后转化到 *E. coli* JM109 中, 分别命名为 GX-1sa, GX-2sa, GX-3sa, 经 IPTG 诱导表达后, 分别进行酶活的测定。活力测定参照 Toraya 等^[12] 的 MBTH 方法进行。

2 结果

2.1 宏基因组总 DNA 的提取

图 1 A 为用酚/氯仿抽提后得到粗提的宏基因组 DNA 电泳图。粗提的 DNA 溶液呈暗黄色, 可见常规提取 DNA 的方法并不能除去土壤里的色素及腐殖酸等物质。粗提的 DNA 经胶回收 (图 1 B) 或用酵母菌基因组 DNA 抽提试剂盒快速纯化后 (图 1 C), 颜色为无色。

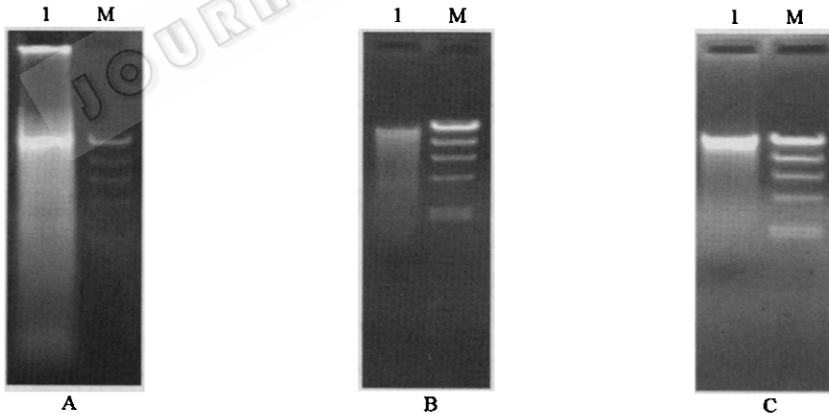


图 1 宏基因组总 DNA 电泳图

A Crude DNA, B Metagenomic DNA extracted by gel extraction mini kit, C Metagenomic DNA purified by yeast DNA mini kit, 1 Metagenomic DNA, M λ DNA/*Hind*III marker

2.2 PCR 产物的扩增

以宏基因组 DNA 为模板, 分别用引物 P1s 和 P1a、P2s 和 P2a、P3s 和 P3a 进行 PCR 扩增, 得到的 DNA 片段与预期的大小一致, 目的片段大小分别为 4.6kb (图 2 A)、2.7kb (图 2 B)、3.3kb (图 2 C)。

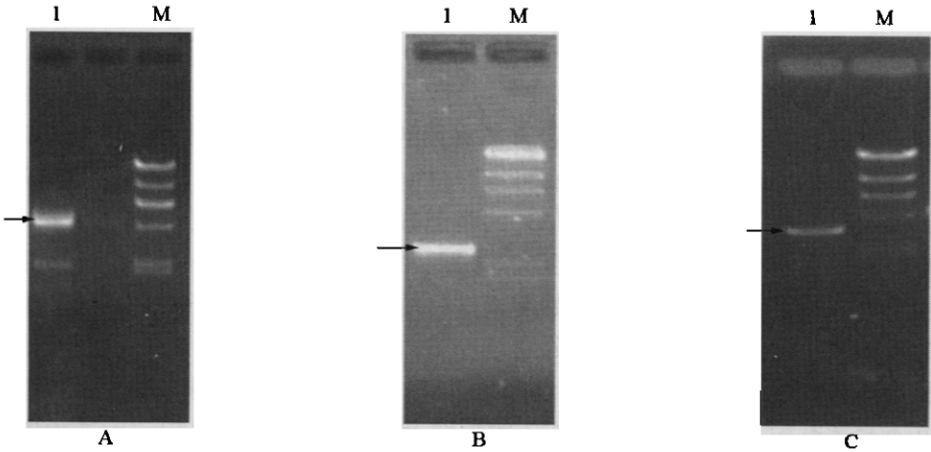


图 2 PCR 扩增产物琼脂糖电泳

A DNA fragments amplified by the primers of *K. pneumoniae*, B DNA fragments amplified by the primers of *C. freundii*,
C DNA fragments amplified by the primers of *C. butyricum*, 1 PCR product, M λ DNA/*Hind*III marker

2.3 3 个甘油脱水酶基因片段的克隆及其序列分析

将得到的重组质粒 T-1, T-2 , T-3 测序, 测序结果在 GenBank 上 Blastn 分析, 结果显示: 分别用肺炎克雷伯氏菌、弗氏柠檬酸菌和丁酸梭菌基因的引物从宏基因组中克隆出的片段与 GenBank 公布肺炎克雷伯氏菌 *K. pneumoniae* ATCC49790 (gb | U60992)、弗氏柠檬酸菌 *C. freundii* DSM30040 (gb | U09771) 和丁酸梭菌 *C. butyricum* VPI1718 (gb | AY112989) 甘油脱水酶核酸序列同源性为 99%, 90% 和 99%。

2.4 甘油脱水酶活性

将得到的重组菌株 GX - 1sa, GX - 2sa, GX - 3sa 分别诱导表达, 进行酶活的测定, 结果见表 1。从表中可知含以肺炎克雷伯氏菌引物扩增出目的基因的重组菌株 GX - 1sa 酶活力为 4. 14 U/mL, 但遗憾的是含分别以弗氏柠檬酸菌和丁酸梭菌引物扩增出目的基因的重组菌株 GX - 2sa 和 GX - 3sa 检测不出酶活力。

表 1 3 个重组菌株和空白对照菌株酶活力的比较

菌株	酶活力 (U/mL)
GX - 1sa	4. 14
GX - 2sa	0
GX - 3sa	0
control	0

3 讨论

一般环境中可培养的微生物所占比例少于微生物总数的 1%, 多达 99% 以上的微生物采用现有的手段是无法分离培养^[10]。这部分称作未培养或者不可培养微生物, 是一个极具利用潜力的种群, 它所含有的巨大基因组资源将为人们提供几乎是无穷无尽的新基因^[11]。在开发宏基因组资源中, 一个关键因素就是高质量宏基因组 DNA 的获得。作者偶然发现用普通的国产核酸纯化试剂盒纯化, 就可以获得高质量的宏基因组 DNA, 这在宏基因组资源的开发利用中, 具有一定的现实意义。本实验初期尝试直接以粗提的 DNA 为模板, 以扩增丁酸梭菌甘油脱水酶的引物进行 PCR, 虽然能扩增出较弱的目

的条带,但目的条带周围有大量拖尾条带形成,这说明没经甘油富集培养的土样含有此甘油脱水酶基因的拷贝数较少,PCR 扩增较为困难。目前,人们对宏基因组 DNA 的研究和利用都集中在构建宏基因组文库,然后寻找新的生物活性物质或基因。但是构建基因组文库,并不是对宏基因组 DNA 的利用的唯一途径。宏基因组 DNA 不仅仅含有未培养微生物的总 DNA,也包括所有可培养微生物的总 DNA。由于商业竞争或都其它原因,人们想从他人手里获得已知序列的基因或者其菌株,存在一定的困难;对于太长的基因,用化学法直接合成花费巨大。因此,一个便捷的方法就是从该菌可能存在的环境中取样提取宏基因组 DNA,然后根据目的基因序列,设计引物,直接 PCR 扩增出目的基因,从而绕开繁琐的菌种分离培养筛选过程。就如本文中扩增出的丁酸梭菌甘油脱水酶,其是不依赖辅酶 B_{12} ,在工业化生产 1,3-丙二醇中有巨大的现实意义。然而并不是所有的丁酸梭菌都含有不依赖辅酶 B_{12} 甘油脱水酶,已报道的文献中,能产不依赖辅酶 B_{12} 甘油脱水酶存在于专利菌株 *C. butyricum* VPI1718 中^[8]。要分离出与此类似的菌株,存在一定的困难和机遇,本实验绕过了传统微生物分离培养的方法,从土壤中直接提取宏基因组 DNA,PCR 扩增出专利公布序列的基因,为进一步对这个酶的研究,提供了物质基础。本实验克隆出的三个甘油脱水酶基因中,克雷伯氏菌的甘油脱水酶本实验室已经做过报道⁶,其它两个甘油脱水酶基因国内还没有相关的研究,虽然这两个甘油脱水酶基因没有酶活,但为本实验室进行理性改造甘油脱水酶基因及研究其酶学性质提供了丰富的基因资源。

参 考 文 献

- [1] Seyfried M, Daniel R, Gottschalk G. *J Bacteriol*, 1996, **178**: 5793 ~ 5796.
- [2] Abbad A S, Guedon E, Spiesser E, *et al.* *Letters in Applied Microbiology*, 1996, **22**: 311 ~ 314.
- [3] Boenigk R, Bowien S, Gottschalk G. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1993, **38**: 453 ~ 457.
- [4] Ahrens K, Menzel K, Zeng A, *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1998, **59**: 544 ~ 552.
- [5] Knietzsch A, Bowien S, Whited G, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 3048 ~ 3060.
- [6] 周文广, 韦宇拓, 黄日波, 等. *工业微生物*, 2004, **34** (2): 1 ~ 4.
- [7] 齐向辉, 朱绮霞, 黄日波, 等. *工业微生物*, 2005, **35** (3): 10 ~ 13.
- [8] Raynaud C, Sarcabal P, Meynial-Salles I, *et al.* *Proc Natl Acad Sci*, 2003, **100**: 5010 ~ 5015.
- [9] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 316 ~ 322.
- [10] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. *Microbiol Rev*, 1995, **59**: 143 ~ 169.
- [11] Knietzsch A, Waschkwitz T, Bowien S, *et al.* *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2003, **5**: 46 ~ 56.
- [12] Toraya T, Ushio K, Fukui S, *et al.* *J Bio Chem*, 1977, **252** (3): 963 ~ 970.