含甘油脱水酶激活因子编码基因的产 1 3-丙二醇新型重组菌的构建 Construction of Novel Recombinant Strain Harboring Glycerol Dehydratase Reactivating Factor Capable of Producing 1 3-propanediol

张晓梅 诸葛健*

ZHANG Xiao-Mei and ZHUGE Jian*

江南大学生物工程学院,工业生物技术教育部重点实验室,无锡 214036

School of Biotechnology, Southern Yangtze University, The Key Laboratory of Industrial Biotechnology Ministry of Education, Wuxi 214036, China

摘 要 利用 PCR 技术扩增来源于弗氏柠檬杆菌(Citrobacter freundii)的甘油脱水酶编码基因 dhaB 以及甘油脱水酶激活因子编码基因 dhaG dhaF 将其与 1 3-丙二醇氧化还原酶同工酶的编码基因 yqhD 串联在温控表达载体 pHsh 上 构建重组菌 E. coli JM10X pHsh- dhaB- dhaG- dhaF- yqhD)。SDS-PAGE 分析显示 融合表达产物的分子量同核酸序列测定的推导值相符。与未串联甘油脱水酶激活因子编码基因的重组菌 E. coli JM10X pHsh- dhaB- yqhD)相比,1 3-丙二醇的产量提高了 28%。

关键词 甘油脱水酶激活因子 重组大肠杆菌 1.3-丙二醇

中图分类号 078 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)05-0841-05

Abstract The dhaB gene encoding glycerol dehydratase and dhaG dhaF gene encoding glycerol dehydratase reactivating factor from Citrobacter freundii were amplified by PCR. The temperature control expression vector pHsh harboring yqhD, dhaB, dhaG and dhaF gene was transformed into E. coli JM109 to yield the recombinant strain E. coli JM109 (pHsh-dhaB-dhaG-dhaF-yqhD). The results from SDS-PAGE analysis show that the recombinant product was consistent with the molecular weight predicted from gene sequence. The fermentation result show that the yield of 1 β -propanediol was increased by 28% compared with E. coli JM109 (pHsh-dhaB-yqhD).

Key words Glycerol dehydratase reactivating factor, recombinant Escherichia coli, 1, 3-propanediol

1 3-丙二醇(1 3-Propanedial,简称1 3-PD)是一种重要的溶剂和化工原料,以1 3-PD与对苯二甲酸合成的聚酯 PTI(聚对苯二甲酸丙二醇酯)在合成纤维材料、聚酯膜、工程塑料和纺织服装材料领域应用前景非常广泛[1] 随着 PTT 商业化 生物法合成1 3-PD 因其环境友好性越来越受重视[2]。

生物法合成 1 3-PD 通常都是以甘油做底物 经

甘油脱水酶(编码基因 dha B)及 1 β -丙二醇氧化还原酶(编码基因 dha T)催化完成 3 。甘油脱水酶在催化甘油转化为 3-羟基丙醛的同时,会出现甘油导致的自杀性失活现象。失活的主要原因是甘油导致辅酶 B_{12} 的 C—Co 键发生不可逆断裂,形成 5'-脱氧腺苷和烷基钴氨素类似物(即被修饰的辅酶 3),同时烷基钴氨素与脱水酶紧密结合,致使甘油脱水酶

发生不可逆性失活。如何使失活的甘油脱水酶再复 活提高其催化效率显得尤为重要。Toraya 等⁵1将产 酸克雷伯氏菌(Klebsiella oxytoca)中二醇脱水酶编码 基因与其两侧的两段读码框编码的基因在大肠杆菌 (Escherichia coli)中共同表达后,其感受态细胞能使 失活的甘油脱水酶恢复其催化活性,也能激活甘油 脱水酶-氰钴氨素的复合体。因此,认为这两段读码 框可能编码二醇脱水酶复活蛋白(简称激活因子), 分别命名为 ddrA 和 ddrB基因[6];后来的研究者发 现并证实了存在于肺炎克雷伯杆菌(Klebsiella pneumoniae)甘油脱水酶激活因子(编码基因 orfX 和 orfZ)和来源于弗氏柠檬菌(Citrobacter freundii)的激 活因子(编码基因 dhaF 和 dhaG) 78]。来源于不同 菌种中的激活因子及其编码基因略有差异,但交叉 活化(Cross-activatation)研究表明,来源于弗氏柠檬 菌的激活因子 DHAF-DHAG 复合体,还可以有效地 激活肺炎克雷伯杆菌中失活的甘油脱水酶及脱水 酶-氰钴氨素的复合体[6]。杜邦公司克隆出 orfX orfZ并与甘油脱水酶编码基因 dhaB及13-丙二醇 氧化还原酶同工酶编码基因 γqh D 串联表达 ,所构 建的重组菌 1 3-丙二醇产量明显提高 9 1 国外的研究 者虽已克隆出 dhaG及 dhaF^[8] 但尚未见其与甘油脱 水酶编码基因 dhaB 及 1 3-丙二醇氧化还原酶同工酶 编码基因 yah D 串联表达构建重组菌的报道。

本研究利用 PCR 技术扩增来源于弗氏柠檬菌甘油脱水酶 2 个激活因子的编码基因 dhaG 及 dhaF,尝试将 dhaG、dhaF、甘油脱水酶编码基因 dhaB 及 1 ,3-丙二醇氧化还原酶同工酶编码基因 yqhD 在温控载体 pHsh 上串联表达,构建含甘油脱水酶激活因子编码基因的新型产 1 gaggedragh Jan 大两二醇重组菌 eaggedragh eaggedra

1 材料与方法

1.1 菌株和载体

弗氏柠檬菌(Citrobacter freundii AS1.1732)购自中国微生物菌种保藏中心,大肠杆菌(Escherichia coli) JM109 ,pHsh-yqh D¹⁰¹ ,pHsh-dha B-yqh D¹¹¹由本实验室保藏。温控载体 pHsh 由本校邵蔚蓝教授惠赠。重组大肠杆菌 JM109(pHsh-dha B-dha G-dha F-yqh D)为本研究中构建。

1.2 培养基和培养条件

LB 培养基(g/L):蛋白胨 10,酵母膏 5,氯化钠 10,固体培养基添加 1.5%的琼脂,固体和液体培养

基在需要时加入氨苄青霉素至 100μg/mL。 种子培养基 :采用 LB 培养基。

发酵培养基^{12]}(g/L):甘油 50,酵母膏 5.0, KH₂PO₄ 7.5,维生素 B₁₂ 0.05(NH₄)₂SO₄ 2,MgSO₄· 7H₂O 0.2,FeSO₄·7H₂O 0.005,CaCl₂ 0.1,用 2mol/L KOH 调 pH 值 7.0。接种前加入氨苄青霉素至 100µg/mL。

种子培养:从新鲜的 LB 培养基斜面上挑取一环菌株接入 50mL 摇瓶(装液量为 15mL)中,于旋转式摇床中 30° \mathbb{C} 、120r/min 培养 24h 得到种子液。

摇瓶发酵:按5%接种量将新鲜种子液接入500mL摇瓶(装液量50mL)中,在120r/min 旋转式摇床中,先于30%培养至对数中后期,再于42%诱导发酵一定时间。

发酵罐发酵:按 5% 的接种量将培养好的种子液接入 5 L 发酵罐(韩国 Co. Ltd ,KF-5L),发酵培养基装量为 3L ,转速为 250r/min ,通空气量为 0.3 L/min ,自然 pH 值 ,先于 30 C 培养至对数中后期 ,再于 42 C 诱导发酵一定时间。

1.3 工具酶和试剂

实验用各种限制酶 Xba I, Not I, Xho I, Nco I 及碱性磷酸酶 CIAP 购自 TaKaRa 公司;T4 DNA 连接酶及 Taq DNA 聚合酶购自上海华美生物工程公司;Gel Extraction Mini Kit, PCR Purification Mini Kit 购自上海华舜生物工程有限公司。丙烯酰胺,甲叉双丙烯酰胺,广范围蛋白质分子量标准为Promega 公司产品。除特别注明外,实验用各种试剂均为国产分析纯。

1.4 分子克隆技术

1.4.1 PCR 扩增 :基因组 DNA 提取 ,纯化载体 DNA 提取 ,DNA 酶切 ,连接和转化均参考文献[13]。根据 NCBI 公布的弗氏柠檬菌 dhaG dhaF dhaB 基因序列设计合成 PCR 所需引物:

P1:5'-TACCTCTAGATAAGGAGGCCATAACTATGTCAC TTTCATCACCGGGCGTACATCTGTTTTATCACTCACGCT GG-3'

P2: 5'-TAGCGCGGCCGCTTATTTTATCTCGCTGAAGGG AAGAACTT-3'

P3:5'-AAGCGCGGCCGCCTAAGGAGGTTGTATGCCATT
AATTGCAGGGATTGATATC-3'

P4:5'-AAGCGCGGCCGCCTTAATTCGCTATCCCAGCCA AAACCAGCCC-3'

P5 5'-GCCGCCATGGCTAAGGAGGCCATAACTATGAGA

CAGATCAAAAGGATTGGAACTGGTTGGCCAGGGGGCC-3'.cn

P6: 5'-ATCCTCTAGACGTCACTGGCTCCCTTTACGCAG CTTATTTC-3'

并分别引入 Xba I 及 Not I ,Not I ,Nco I 及 Xba I 酶切位点 ,PCR 扩增 dha G、dha F 及 dha B。

- **1.4.2** PCR 产物的 TA 克隆 将 PCR 产物采用上海 华舜科技公司 PCR 产物纯化试剂盒纯化(操作见试剂盒说明书) 纯化后连接 pMD18-T 载体 ;分别构建 克隆载体 pMD18-T-dha G 及 pMD18-T-dha F。
- 1.4.3 重组大肠杆菌 JM109(pHsh-yqh D-dha G-dha F-dha B)的构建:将 pMD18-T-dha G 利用 Xba I 及 Not I 双酶切,回收其中 0.4kb 的片段 连接 pHsh-yqh D 得到 pHsh-yqh D-dha G;将 pMD18-T-dha F Not I 酶切,回收其中 1.8kb 的片段,连接 pHsh-yqh D-dha G 提取阳性转化子质粒 Xho I 酶切验证正反接 得到 pHsh-yqh D-dha G-dha F,将 Nco I 及 Xba I 双酶切的 dha B 片段 连接 pHsh-yqh D-dha G-dha F, 转化 E. coli JM109。

1.5 SDS-PAGE

以 E. coli JM109(pHsh)做对照。采用 5 %浓缩胶及 12 %分离胶的不连续垂直平板电泳 ,考马斯亮蓝 R-250 染色 $^{[13]}$ 。

1.6 重组菌 E. coli JM109(pHsh-yqhD-dhaG-dhaF-dhaB)质粒稳定性分析

除培养温度为 30℃外 ,具体操作方法参考文献 [14]。

1.7 测定方法

1 3-PD 及甘油含量的检测:参考文献[14],采用气相色谱法。

生物量的测定:取适量发酵液用无菌生理盐水稀释至一定浓度后,于600nm测定吸光度(OD值)。

2 结果

2.1 重组载体 pHsh-yqh D-dha G-dha F-dha B 的构建

将 Hsh 启动子位于甘油脱水酶编码基因 dha B 的上游,下游依次是甘油脱水酶激活因子编码基因 dha G、dha F、1、3-丙二醇氧化还原酶同工酶的编码 基因 yqh D 以及温控载体自身所带 Hsh 终止子构建了重组载体,并将其命名为 pHsh-yqh D-dha G-dha F-dha K 图 1 。甘油脱水酶 2 个激活因子编码基因 dha G 和 dha F 只有与甘油脱水酶编码基因 dha B 串联才能表达其活性 并研究的实验也证实了这一点。重组载体 pHsh-yqh D-dha G-dha F-dha B 酶切电

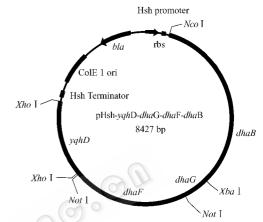


图 1 重组载体 pHsh-yqh D-dha G-dha F-dha B 的结构示意图 Fig. 1 Construction of expression plasmid pHsh-yqh D-dha G-dha F-dha B

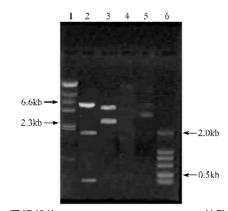


图 2 重组载体 pHsh-yqh D-dhaG-dhaF-dhaB 的酶切验证 Fig. 2 The enzyme identification of the recombinant plasmid pHsh-yqh D-dhaG-dhaF-dhaB

2.2 甘油脱水酶激活因子编码基因 dhaG 与 dhaF 的核苷酸序列分析

将 PMD18-T-dhaG 与 PMD18-T-dhaF 重组载体分别经上海华诺生物工程技术服务有限公司进行测序 测序结果表明 ,dhaG 基因全长 400bp ,dhaF 基因全长 1800bp ,运用 BLAST 进行序列分析 ,表明本研究克隆得到的 dhaG 基因与公布的弗氏柠檬杆菌的 dhaG 同源性为 99.5% ,dhaF 基因与公布的弗氏柠© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

檬杆菌的 dhaF 同源性为 99%。而由所测序列推导出的蛋白氨基酸序列与公开的氨基酸序列完全一致。

2.3 重组菌全细胞蛋白 SDS-PAGE 电泳分析

以 E. coli JM109(pHsh)为对照 重组菌 E. coli JM109(pHsh-dhaB-dhaG-dhaF-yqhD)全细胞 SDS-PAGE 电泳分析如图 3 所示,从图 3 可以看出,在67、61、43、21、17 和 16kD 处出现蛋白质特征带,其中61、21 和 16kD 三条蛋白条带正好对应甘油脱水酶DHAB三个亚基分子量的位置[16],而67 和 17kD 的蛋白条带正好对应甘油脱水酶激活因子 DHAG 及DHAF 分子量的位置[7];说明已经存在表达产物。另外43kD与1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶 YQHD蛋白大小相符[9],说明表达产物中已经存在1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶蛋白。

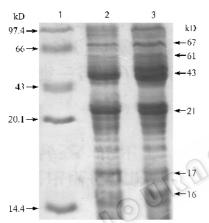


图 3 重组菌全细胞蛋白 SDS-PAGE 电泳分析 Fig. 3 SDS-PAGE analysis of proteins in whole cells 1 :protein markers(kD);2:E. coli JM109(pHsh X control);3:E. coli JM109(pHsh-dhaB-dhaG-dhaF-yqhD) after 42°C induction for 4h.

2.4 重组菌质粒稳定性分析

2.5 重组菌发酵特性

以 50g/L 甘油为唯一碳源的发酵培养基 在 5L 发酵罐上有氧发酵的实验结果见图 4。从图 4 可以看出 ,与重组菌 E . coli JM109(pHsh-dhaB-yqhD)相比 ,E . coli JM109(pHsh-dhaB-dhaG-dhaF-yqhD)以温度诱导发酵至第 24h 后 1 ,3-PD 产量提高了

28% ,1 3-PD 的产量、转化率和生产能力分别达到 36.5 g/L、72.6% 和 1.30g/L/h。 由图 4 还表明 ,重组 菌 E . coli JM10% pHsh-dha B-dha G-dha F-yqh D)的甘油消耗速率也有较大程度的提高 ,但细胞生长情况与重组菌 E . coli JM10% (pHsh-dha B-yqh D)基本一致。

表 1 重组菌连续转种后在不含抗生素平板上的菌落数 Table 1 The recombinant strain colonies in plate

Generations	pHsh- <i>dha</i> B- <i>dha</i> G- <i>dha</i> F- <i>yqh</i> D Amp (–)	pHsh- <i>dha</i> B- <i>yqh</i> D Amp (–)
20	100	100
40	96	98
60	93	94
80	90	92
100	87	90

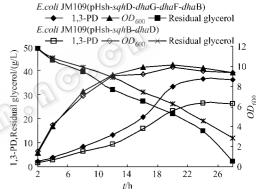


图 4 重组菌 E. coli JM109(pHsh-pqh D-dha G-dha F-dha B) 及 E. coli JM109(pHsh-dha B-yqh D)的发酵过程

Fig. 4 Time profile of batch fermentation in 5L fermentor using $E.\ coli$ JM109(pHsh-yqhD-dhaG-dhaF-dhaB) or $E.\ coli$ JM109 (pHsh-dhaB-yqhD)

3 讨论

来源于弗氏柠檬菌的 DHAF-DHAG 复合体与 Toraya 等人发现的二醇脱水酶复活蛋白。DDRA- DDRB 复合体一样具有二亚基四聚体结构,分子量同样在 150kD 左右。但不同的是,DHAF-DHAG 复合体的两个亚基并非在同一个转录单元,而是分别随甘油脱水酶基因及 1 3-丙二醇氧化还原酶基因表达,并且转录方向相反。DHAF-DHAG 复合体还可以有效地激活肺炎克雷伯杆菌中失活的甘油脱水酶及脱水酶-氰钴氨素的复合体^{78]},而 DDRA-DDRB 复合体只激活产酸克雷伯氏菌中失活的甘油脱水酶及脱水酶-氰钴氨素的复合体^{6]}。

美国杜邦公司将酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)中3-磷酸甘油脱氢酶编码基因 Dar1、1,3-磷酸甘油脂酶编码基因 Gpp2、肺炎克雷伯杆菌中的甘油脱水酶编码基因 dhaB、甘油脱水酶激活因子编码基因 orfX orfZ 以及大肠杆菌中非特异性的氧化还原酶编码基因 yqhD 在大肠杆菌中共同表达,该重组菌在甘油脱水酶辅酶 B_{12} 存在时能转化葡萄糖为 1,3-丙二醇,其产量高达 129g/L,转化率为 $34\%^{[9]}$ 。本研究构建的重组菌 $E.\ coli\ JM109(pHshyqhD-dhaG-dhaF-dhaB)$ 转化甘油为 1,3-丙二醇的产量虽只有 36.5g/L,但其转化率已达到 72.6%,并可以利用更加廉价的维生素 B_{12} 代替辅酶 B_{12} 完成催化甘油转化为 3-羟基丙醛的反应,而且不需要 IPTG 为诱导物,不需要厌氧环境,为微生物法合成 1 3-丙二醇的研究提供新的有现实意义的思路。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Biebl H, Menzel K, Zeng AP, et al. Microbial production of 1 3-propanediol. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 52 289 297.
- [2] Zeng AP, Biebl H. Bulk chemicals from biotechnology: The case of 1 3-propanediol production and the new trends. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2002, 74:239-259.
- [3] Skraly FA, Lytle BL, Cameron DC, et al. Construction and characterization of 1 3-propanediol operon. Appl Environ Microbiol, 1998, 1:98-105.
- [4] Yamanishil M, Yunokil M, Tobimatsul T, et al. The crystal structure of coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase in complex with cobalamin and propane-1, 2-diol. Eur J Biochem, 2002, 269: 4484 – 4494.

- [5] Toraya T. Radical catalysis of B₁₂ enzymes: structure, mechanism, inactivation, and reactivation of diol and glycerol dehydratases. *Cell Mole Life Sci.*, 2000, 57:106-127.
- [6] Toraya T , Mori K. A reactivating factor for coenzyme B₁₂-denpendent diol dehydratases. J Biol Chem , 1999 , 274: 3372 3377
- [7] Seifert C, Bowien S, Gottschalk G, et al. Identification and expression of the genes and purification and characterization of the gene products involved in reactivation of coenzyme B₁₂-dependent glycerol dehydratase of Citrobacter freundii. Eur J Biochem, 2001, 268: 2369 2378.
- [8] Tobimatsu T, Kajiura H, Yunoki M, et al. Identification and expression of the genes encoding a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. J Bacteriol, 1999, 181:4110 – 4113.
- [9] Emptage M , Haynie SL , Laffend LA , et al . Process for biological of 1 3-propanediol with high titer. US 6514733 , 2003.
- [10] Zhang XM(张晓梅), Tang XM(唐雪明), Zhuge B(诸葛斌), et al. Cloning and over expressing of gene yqhD encoding 1,3-propenedial oxidoreductase isoenzyme in Escherichia coli. Journal of Food Science and Biotechnology(食品与生物技术),2006,4:83-86.
- [11] Zhang XM, Li Y, Zhuge B, et al. Construction of novel recombinant Escherichia coli capable of producing 1,3-propanediol and optimization of fermentation parameters by statistical design.

 World J Microbiol Biotechnol, 2006, 22:945-952
- [12] Nagaraja CE, Gatenby AA, Hsu AK, et al. Method for the production of 1,3-propanediol by recombinant microorganism. US 6013494, 2000.
- [13] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. Current Protocols in Molecular Biology (颜子颜,王海林,译). Beijing: Science Press, 1998.
- [14] Zhang XM(张晓梅), Tang XM(唐雪明), Zhuge B(诸葛斌), et al. Construction of novel recombinant Escherichia coli capable of producing 1 3-propanediol. Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报), 2005, 21:743-748.
- [15] Kajiur H , Mori K , Tobimatsu T , et al . Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. J Biol Chem , 2001 , 276: 36514 36519
- [16] Daniel R, Bobik TA, Gottschalk G, et al. Biochemistry of coenzyme B12-dependent glycerol and diol dehydratases and organization of the encoding genes. FEMS Microbiol Reviews, 1999, 22:553-566