

肺炎克雷伯氏杆菌二羟丙酮激酶基因(*dhaKL*)克隆与表达郑 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 的基因组为模板, 通过 PCR 技术成功地扩增了 *dhaKL* 基因, 并构建了 pET-28a(+)/*dhaKL* 表达载体。DNA 序列分析的结果表明: *dhaKL* 基因由 2 个开放阅读框架组成: ORF1 全长为 1017bp, 编码 356 个氨基酸; ORF2 全长 633bp, 编码 210 个氨基酸。SDS-PAGE 电泳结果表明: *dhaKL* 基因获得了有效表达, 上清液中的酶活性为 15.6U/mL。

关键词 *dhaKL*, 克隆, 表达

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, 1998 年被美国评为六大石化新产品之一^[1]。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 1,3-PD 主要是微生物以甘油为底物发酵得到的, 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通过一步发酵生产 1,3-PD 成为可能^[2]。

微生物发酵甘油形成 1,3-丙二醇的厌氧代谢包括氧化途径和还原途径, 这 2 个途径的协调主要由 *dha* 调节子来调控^[3]。研究表明, *dha* 调节子共有 15 个开放阅读框构成, 它们分别编码二羟丙酮激酶 I 和 II(由 *dhaKI*、II 编码)、甘油脱氢酶(由 *dhaD* 编码)、甘油脱水酶(由 *gldABC* 编码)、1,3-丙二醇氧化还原酶(由 *dhaT* 编码)、1 个调节蛋白(*dhaR*)、1 个甘油脱水酶激活因子、1 个运载促进因子和两个功能尚未明确的蛋白。其中 *gldABC* 和 *dhaT* 基因的克隆和表达国内外研究的较多^[4~8], 而 *dhaKL* 基因研究的较少, 且多集中在非发酵菌株^[9~14]。

本文在成功实现 *gldABC* 和 *dhaT* 基因共表达的基础上^[15], 以肺炎克雷伯氏杆菌的基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 技术实现了 *dhaKL* 基因的克隆与表达, 从而为基因工程菌的构建奠定技术基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

第一作者: 博士研究生, 讲师(刘长江教授为通讯作者)。
收稿日期: 2008-03-05, 改回日期: 2008-10-06

1.1.1 菌株与载体

肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) As1.1736 购自中科院微生物研究所; 大肠杆菌 BL21(DE3)、pET-28a(+) 购自 Novagen 公司。

1.1.2 主要试剂

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

1.1.3 培养基

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

1.2 *dhaKL* 基因的扩增

根据 NCBI 中发表的二羟丙酮激酶的氨基酸序列(NP_415718)设计一对引物:

dhaK-F1 5'-TCTAGAGAATTTCGCACAATG-GATTCATCGGCA-3'(含 *Xba*I 酶切位点),

DhaL-R2 5'-GAGCTCCCTTACTCTTTTGGC-GCTAAC-3'(含 *Sac*I 酶切位点);

反应参数为: 94℃ 预变性 10min。循环参数为: 98℃ 10 s, 55℃ 30 s, 72℃ 90 s, 30 个循环。

1.3 *dhaKL* 基因的克隆及鉴定

使用 TaKaRa DNA 连接试剂盒, 将回收后的 *dhaD* 基因和 *dhaKL* 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, 并用 *Xba*I、*Sac*I 作酶切鉴定。

测序鉴定(由宝生物工程大连有限公司完成)。

1.4 pET-28a(+)/*dhaKL* 表达载体的构建(图 1)

1.5 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^[16]。

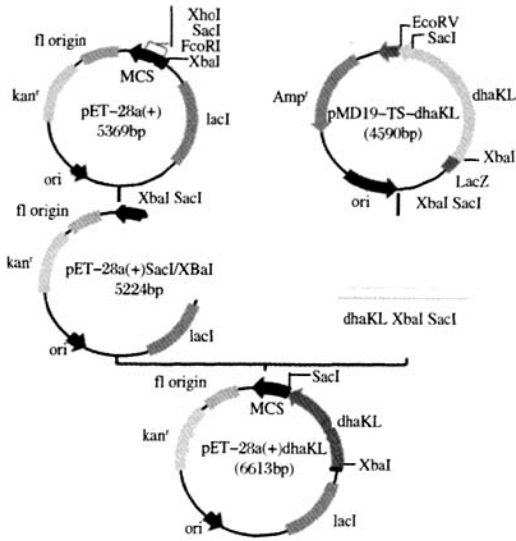


图1 pET-28a(+)-dhaKL 构建示意图

1.6 质粒稳定性试验

将 37℃ 振荡培养过夜的菌体接种于 100 mL 含 Kan 30 μg/mL 的 LB 液体培养基中, 12h 后转接至 LB 液体培养基中, 继续培养 12 h。取 0.1 mL 稀释液涂种于普通 LB 琼脂平板, 过夜培养后, 采用影印法接种于含 Kan 的 LB 琼脂平板上, 37℃ 过夜培养并进行菌落计数。

1.7 dhaKL 基因的表达

将含有重组表达载体的 *E. coli* BL21(DE3) 细胞接种至 50 mL LB/kan 培养基中, 37℃、190r/min 振荡培养至培养液的 OD₆₀₀ 达到 0.6~1.0。加入 IPTG (终浓度为 1 mmol/L) 诱导表达 2h, 表达产物进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.8 酶活测定^[17]

2 结果与分析

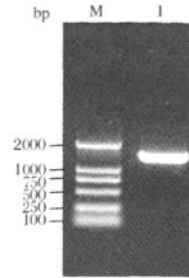
2.1 dhaKL 基因克隆(图 2)

将 PCR 扩增得到了长度约为 1.7kb 的 DNA 片段进行克隆, XbaI、SacI 酶切鉴定的结果表明成功的克隆了 dhaKL 基因(见图 3), DNA 测序的结果表明, dhaKL 基因由 2 个开放阅读框架组成: ORF1 全长为 1017bp, 编码由 356 个氨基酸残基组成的多肽链; ORF2 全长为 633bp, 编码由 210 个氨基酸残基组成的多肽链。

2.2 pET-28a(+)-dhaKL 表达载体的构建

将构建的重组质粒热转化至大肠杆菌 JM109

中, 随机挑选菌落提取质粒, 用 XbaI、SacI 做酶切鉴定(见图 4)。酶切鉴定和 DNA 测序的结果表明已成功构建了 dhaKL 基因的表达载体。



M-DNA marker DL2000; I-dhaKL 基因 PCR 产物

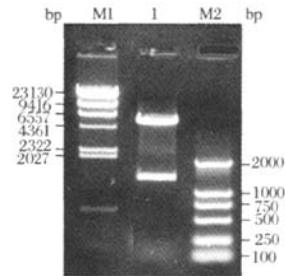
图2 dhaKL 基因 PCR 扩增产物电泳图谱



M1-DNA marker λ Hind III; I-Plasmid

图3 PMD19-TS-dhaKL 重组质粒 Xba I / Sac I

酶切鉴定的琼脂糖凝胶电泳



M1-DNA marker λ Hind III; M2-DNA

Marker DL2000; I-Plasmid

图4 pET-28a(+)-dhaKL 重组质粒 Xba I / Sac I

酶切鉴定的琼脂糖凝胶电泳

2.3 重组质粒的稳定性

重组质粒 pET-28a(+)-dhaKL 在受体菌 BL21(DE3) 中能稳定传代; 在无选择压力下, 连续传代 15 次后, 菌体含质粒率为 100%, 说明该重组质粒具有良好的遗传稳定性。

2.4 dhaKL 基因的表达

重组细胞经诱导表达后分别在分子质量相对应的 39 KUa、23 KUa 的位置上出现了特异性条带(图

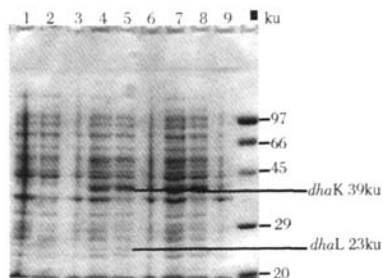


图5 表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

5), 上清液中的酶活性分别为 15.6 U/mL。

3 讨论

微生物发酵形成 1,3-丙二醇的代谢途径中,甘油作为唯一的碳源和能源物质沿着氧化和还原 2 个平行路径代谢。氧化途径,甘油在甘油脱氢酶(*dhaD* 基因编码)的作用下生成二羟丙酮,并在二羟丙酮激酶(*dhaKL* 基因编码)的作用下进一步代谢生成丙酮酸。它主要为微生物生长提供 ATP 和还原当量 NADH₂;还原途径,甘油脱水酶(由 *gldABC* 基因编码)将甘油脱水生成 3-羟基丙醛(3-HPA),再由 1,3-PD 氧化还原酶(由 *dhaT* 基因编码)将 3-HPA 还原为 1,3-PD,同时消耗了氧化途径中生成的过量的还原当量 NADH₂,维持了代谢过程的平衡^[18,19]。

目前国内外在 1,3-丙二醇基因工程菌构建方面的研究主要集中在将还原途径中的酶基因转移至大肠杆菌中,而氧化途径则鲜少有相关报道^[20]。*dhaKL* 基因的成功克隆与表达,为以廉价碳源为底物通过一步发酵生产 1,3-PD 的早日实现奠定了理论和技术基础。

参考文献

- Witt U, Muller R T, Widdenck H, et al. Syntheses properties and biodegradability of polyesters base on 1,3-propanediol [J]. Markromol Chem Phys, 1994, 195: 793~802
- 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, 18(4): 305~308
- Forage R. G, Lin E C C. dha System mediating aerobic and anaerobic dissimilation of glycerol in *Klebsiella pneumoniae* NCIB[J]. Journal of Bacteriology. 1982, 8: 591~599
- Daniel Rolf, Gottschalk G. Growth temperature-dependent activity of glycerol dehydratase in *Escherichia coli* expressing the *Citrobacter freundii* dha regulon[J]. FEMS

Microbiology Letters, 1992, 100(5): 281~286

- Daniel R, Boenigk R, Gottschalk G. Purification of 1,3-propanediol dehydratase from *Citrobacter freundii* and cloning sequencing and overexpression of corresponding gene in *E. coli*[J]. Journal Bacteriol, 1995, 177(2): 151~2 156
- Daniel R, Bobik T A, Gottschalk G. Biochemistry of coenzyme B12-dependent glycerol and diol dehydratase and organization of the encoding genes[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1999, 22: 553~566
- Lacis L, Daniel R, Gottschalk G. Properties and sequencing of coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase of *Clostridium pasteurianum* [J]. FEMS Microbiol Lett, 1998, 164(5): 21~28
- prenger G. A, Hammer A, Johnson E. A, et al. Anaerobic growth of *Escherichia coli* on glycerol by importing genes of the dha regulon from *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of General Microbiology, 1989, 135: 1 255~1 262
- Gutknecht R, Beutler R, Garcia-Alles L F, et al. The dihydroxyacetone kinases of *Escherichia coli* utilizes a phosphoprotein instead of ATP as phosphoryl donor[J]. The EMBO Journal, 2001, 20(2): 2 480~2 486
- Bachler C, Schneider P, Bachler P, et al. *Escherichia coli* dihydroxyacetone kinase controls gene expression by binding to transcription factor *DhaR*[J]. The EMBO Journal, 2005, 24: 283~293
- Ahrens K, Menzel K, Zeng A P, 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[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1998, 59: 544~552
- Kimura T, Takahashi M, Yoshihara K, et al. Cloning and characterization of two genes encoding dihydroxyacetone kinase from *Schizosaccharomyces pombe* IFO0354 [J]. FEMS Microbiol Lett, 1998, 5: 50~56
- Molin M, Norbeck J, Blonberg A. Dihydroxyacetone kinase in *Saccharomyces cerevisiae* are involved in detoxification of dihydroxyacetone[J]. The Journal of Biology Chemistry, 2003, 278: 1 416~1 423
- Siebold C, Garcia-Alles LF, Erni B, et al. A mechanism of covalent substrate binding in the X-ray structure of subunit K of the *Escherichia coli* dihydroxyacetone kinase [J]. PNAS, 2003, 100(8): 188~8 192
- 郑艳, 管艺飞, 刘长江. 甘油脱水酶基因与 1,3-丙二醇氧化还原酶基因的共表达[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(3): 12~14

- 16 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 17 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, 10:55~60
- 18 E I du Pont de Nemours and Company. Production of 1,3-propanediol from glycerol by recombinant bacteria expressing recombinant diol dehydratase[P]. US 5821092, 1998-10-13. 6136576, 2000-10-24
- 19 Genecor International Inc. Method for the recombinant production of 1,3-propanediol[P]. US6136576, 2000-10-24

dhaKL Gene Clone and Expression of *Klebsiella pneumoniae*

Zheng Yan¹, Guan Yifei¹, Liu Changjiang²

1(Food Science College of Shenyang Agricultural University & Food Biotechnology Lab, Shenyang, 110161, China)

2(The government of Liaoning Province, Shenyang, 110000, China)

ABSTRACT The gene of *dhaKL* encoding Dihydroxyacetone kinase was amplified by PCR from the genomic DNA of *Klebsiella pneumoniae* As1. 1736 and the expression vector pET-28a(+)/*dhaKL* was constructed. Sequence analysis showed that it is consisted of two ORFs, the length of ORF1 is 1017bp and encode 356 amino acid residues; the length ORF2 is 633bp and encode 210 amino acid residues. SDS-PAGE showed that the *dhaKL* gene had been expressed and the enzyme activity was 15.6U/ml in the supernatant.

Key words *dhaKL*, gene clone, expression

行业动态

金融危机下的中国茶产业

此次世界金融危机中给我国的茶叶出口带来了不小的影响。然而危机乃危险中的机会,面对眼下的金融危机,我国的茶业如何在本次危机中杀出重围,力挽狂澜。同时又如何从此次危机寻求发展机会,是眼下我国茶业企业必须思考的问题。

金融危机之下我国的茶业现状是:一方面茶叶出口下降,另一方面是国内需求仍处在不温不火的状态。另外是茶叶企业的规模,技术,设备参差不齐,缺乏知名品牌,从而造成我国茶叶的良莠不齐,甚至是鱼龙混杂。造成了所谓中国茶“一一三四”的现状,即种植面积世界第一,产量世界第一,出口量第三,创汇额第四。

第一,茶叶出口下降,一方面受金融危机影响,然而更多的是要思考我国茶业自身的问题。为什么会出现茶叶出口下降的问题,是否还存在农药残留问题,茶叶品质是否真的达到进口国的产品要求,如果这些问题解决不了,即便是金融危机过后,我国的茶叶出口同样还是会遇到此类问题,而这些问题才是从最根本上制约我国茶叶出口的重要问题。

第二,国内需求的平淡状态,有金融危机影响的成分,但是金融危机影响不大,而影响茶叶内需的主要因素是我国的饮茶之风的限制,目前国人对茶的认识与消费量还比不上发达国家,中国人均茶叶消费比不上欧洲。调查显示,中国人茶叶消费人均才 500g,英国人却是我们的 4 倍多。

第三,缺乏知名品牌的茶叶企业。据统计资料显示,中字头下属 12 家省级茶叶公司中,只有 4 家有注册商标的。全国生产加工茶叶企业有 6.7 万家,只有近千家茶叶有注册商标的,能称得上品牌的几乎没有。品牌的形成是多方面原因造成的,给金融危机关系不大,但是目前也是制约我国茶叶发展的重要问题。

解决我国茶业以上问题,应从以下几个方面着手。(1)修炼内功,提高茶叶品质,对品质的要求,至少要确保茶叶的绿色食品,不能有对人体有害的农药残留,同时形成统一的标准。在保证茶叶品质的基础上还要加强同国外茶叶消费大国的茶文化的沟通交流,不仅让其了解我国的茶叶的辉煌历史,更让其了解我国现代茶叶的发展。(2)打造品牌,树立龙头企业。目前我国茶企有一些上规模的企业虽然也注重自身形象,然而所谓的品牌战略,其实只是为了多销售一些产品而已。我国茶叶企业应具有树立大品牌的理念和高度。从精神、文化和情感诉求方向深度挖掘茶叶品牌的文化内涵及经济价值、社会价值。