

粘质沙雷氏菌中乙酰偶姻合成途径 基因克隆、序列分析及表达

张燎原¹ 孙建安² 魏东芝^{2*} 沈亚领^{2*}

(1. 福建农林大学 生物农药与化学生物学教育部重点实验室 福建 福州 350002; 2. 华东理工大学 鲁华生物技术研究所, 上海 200237)

摘要: 运用生物信息学和 PCR 方法, 鉴定了粘质沙雷氏菌乙酰偶姻生物合成途径中编码 α -乙酰乳酸脱羧酶 (α -ALDC) 和 α -乙酰乳酸合成酶 (α -ALS) 的基因 (*aceA* 和 *aceB*) 序列。经测序和序列分析显示 *aceA* 和 *aceB* 基因的开放阅读框 (ORF) 长度为 780 bp 和 1 686 bp, 编码 259 和 561 个氨基酸, 编码蛋白分子量和等电点分别为 28.96 kD 和 5.48, 60.70 kD 和 5.88, 属酸性蛋白。将两基因分别克隆至 pET28a(+) 表达载体中, 并转化 *E. coli* BL21(DE3) 进行 IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 结果表明在大约 29 kD 和 60 kD 的位置出现特异性蛋白条带, 表明 *aceA* 和 *aceB* 基因在 *E. coli* BL21(DE3) 中获得了高效的表达。

关键词: 粘质沙雷氏菌; 乙酰偶姻; 克隆; 序列分析; 表达

中图分类号: Q785; Q786 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)05-0987-06

Cloning, Sequence Analysis and Heterogenous Expression of the Genes Involved in Acetoin Pathway from *Serratia marcescens* H₃₀

ZHANG Liao-yuan¹, SUN Jian-an², WEI Dong-zhi^{2*}, SHEN Ya-ling^{2*}

(1. Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology, Fujian Agriculture and Forestry University, Ministry of Education, Fuzhou 350002, China; 2. East China University of Science & Technology, New World Institute of Biotechnology, Shanghai 200237, China)

Abstract: The *aceA* and *aceB* genes coding for α -acetolactate decarboxylase (α -ALDC) and α -acetolactate synthase (α -ALS) in the acetoin biosynthetic pathway from *Serratia marcescens* were identified and amplified through sequence alignment and Polymerase Chain Reaction (PCR). The sequencing results showed that the ORF lengths of *aceA* and *aceB* genes were 780 bp and 1 686 bp, and encoded proteins of 259 and 561 residues respectively. Furthermore, their molecular weights and isoelectric points of 28.96 kD and 5.48, 60.70 kD and 5.88 were predicted, which were acidic proteins judging from the calculated pI values. Then both genes were ligated with the expression plasmid of pET28a(+) and transformed into *E. coli* BL₂₁(DE₃) for their induced expression with IPTG. SDS-PAGE analysis revealed that there were two clear induced protein bands with molecular weights of about 29 kD and 60 kD on expected position. These results indicated that both genes of *aceA* and *aceB* were efficiently expressed in *E. coli* BL21(DE3).

Key words: *Serratia marcescens*; acetoin; cloning; sequence analysis; heterogenous expression

收稿日期: 2011-07-03 修回日期: 2011-09-02

基金项目: 国家“十一五”863 专题 (2006AA02Z243) 和生物反应器国家重点实验室专项 (2060204)

作者简介: 张燎原 (1979—), 男, 讲师, 博士, 主要从事工业微生物代谢调控研究, E-mail: zliaoyuan@126.com。

乙偶姻,化学名为3-羟基丁酮,存在于乳品和某些水果中,是一种应用广泛的食用香料,我国GB2760-86规定其允许食用。乙偶姻作为香料应用范围极其广泛,可用于奶油、乳品、酸奶和草莓型等香料的生产^[1-3]。此外,乙偶姻还可以作为一种重要的平台化合物,广泛应用于化工、制药、IT等行业,被美国能源部列为30种优先开发利用的平台化合物之一^[4]。

乙偶姻的合成有微生物法和化学法,与化学法相比,微生物法因原料可再生、反应条件温和等优点而备受关注^[5-6]。在自然界中有许多微生物能够合成乙偶姻,主要包括克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)以及乳球菌属(*Lactococcus*)等^[7-10]。微生物合成乙偶姻途径需要经历两个酶的催化,分别为 α -乙酰乳酸合成酶和 α -乙酰乳酸脱羧酶,糖类物质经糖酵解途径合成丙酮酸,两分子丙酮酸在 α -乙酰乳酸合成酶的作用下生成乙酰乳酸和二氧化碳,随后乙酰乳酸经 α -乙酰乳酸脱羧酶脱羧作用合成乙偶姻,乙偶姻在2,3-丁二醇脱氢酶的作用下可进一步生成2,3-丁二醇^[11-12]。目前,肺炎克雷伯氏菌(*K. pneumonia*)、产气肠杆菌(*E. aerogenes*)和多粘芽孢杆菌(*B. polymyxa*)中乙偶姻和2,3-丁二醇的合成途径相关基因已被克隆和鉴定,其合成途径基因由一LysR型调控因子budR、结构基因budA(编码 α -乙酰乳酸脱羧酶)、budB(编码 α -乙酰乳酸合成酶)和budC(编码2,3-丁二醇脱氢酶)组成^[13]。然而,沙雷氏菌属中乙偶姻的生物合成途径相关基因未见相关报道。

近年来,我们的研究发现粘质沙雷氏菌作为乙偶姻和2,3-丁二醇的生产菌具有较高的产量,具有工业开发的潜力^[14-15]。因此,对粘质沙雷氏菌合成乙偶姻的代谢途径进行研究是非常有必要的。在本文中,我们通过生物信息学分析的方法对粘质沙雷氏菌中乙偶姻合成途径相关基因进行了鉴定,并对获得的基因进行了克隆、序列分析及表达。

1 材料与方 法

1.1 材 料

粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*) H₃₀菌株为实验室保藏菌种。原核表达载体pET-28a(+)为鲁华生物技术研究所提供。DNA聚合酶、T₄连接酶和限制性内切酶(*Bam*H I、*Hind* III和*Eco*R I)购自TaKaRa公司;DNA marker、蛋白质marker和大肠杆菌感受态细胞(*E. coli* DH_{5 α} 和*E. coli* BL₂₁(DE₃))购自天根生化科技有限公司;卡那霉素(Kan)和IPTG购自Sigma公司;胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒和基因组提取试剂盒购自北京博大泰克有限公司。其余试剂为国产分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 菌株培养 粘质沙雷氏菌H₃₀、*E. coli* DH_{5 α} 和*E. coli* BL₂₁(DE₃)均采用LB培养基培养。粘质沙雷氏菌液体培养条件为:30℃和200 r/min培养12 h;*E. coli* DH_{5 α} 和*E. coli* BL₂₁(DE₃)液体培养条件为:37℃和200 r/min培养12 h,平板培养在37℃条件下倒置培养16 h。卡那霉素终浓度为50 μ g/mL。

1.2.2 粘质沙雷氏菌H₃₀基因组DNA提取 按照北京博大泰克有限公司基因组提取试剂盒说明书对过夜培养的粘质沙雷氏菌H₃₀进行操作,提取的基因组DNA溶解在TE缓冲液中,-20℃保存待用。

1.2.3 基因序列获取与PCR扩增 将GenBank中已报道的编码 α -乙酰乳酸脱羧酶和 α -乙酰乳酸合成酶的核酸序列与已测序的粘质沙雷氏菌基因组进行比对,获取粘质沙雷氏菌中相应的两个基因的核酸序列,分别命名为aceA(α -乙酰乳酸脱羧酶)和aceB(α -乙酰乳酸合成酶)根据获得的序列设计2对引物,由上海赛百盛生物科技有限公司合成,引物序列为:

aceA₁: CGCGGATCCATGAACGAAAAACACGGGT,下划线为*Bam*H I酶切位点;aceA₂: CCCAAGCT-TAGCCCTCGGCGGAACGAAT,下划线为*Hind* III酶切位点;aceB₁: TCCGAATTCACCATGGCACAG-GAAAAACAG,下划线为*Eco*R I酶切位点;aceB₂: GACAAGCTTAAATCATCTGGCTGAAGTTCATC,下划线为*Hind* III酶切位点)。

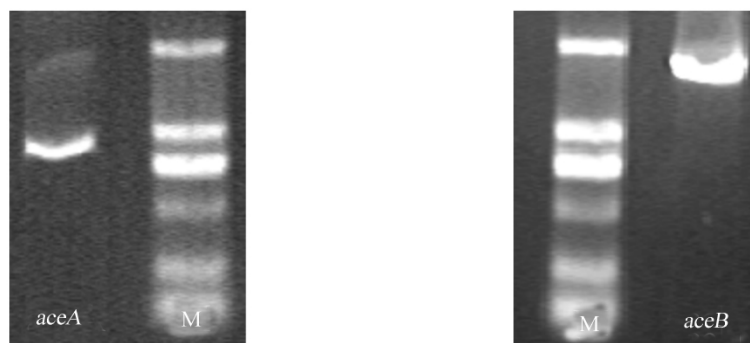
以提取的粘质沙雷氏菌H₃₀基因组DNA为模板,以aceA_{1/2}和aceB_{1/2}为引物分别进行PCR扩增反应,其反应体系:模板DNA 2.0 μ L,10 \times PCR buffer with MgCl₂(20 mmol/L) 5 μ L,DNA聚合酶(5 U/ μ L)

1.0 μL dNTPs(10 mmol/L) 1.0 μL 引物(10 mmol/L) 各 2 μL ddH₂O 37.0 μL 总体积为 50 μL 。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 循环参数为 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物在质量分数为 1% 琼脂糖凝胶上电泳 1 h, 紫外灯下观察条带并拍照。检测后将获得的特异性 DNA 条带用胶回收试剂盒回收, 进行商业测序。

1.2.4 序列分析 测序结果 ORF(开放阅读框)分析采用 GenBank 中的 ORFs finder 程序, 序列同源性和多序列比对分别采用 GenBank 中 BLASTp 比对程序和 clustal 1.83 软件, 编码蛋白的等电点和分子量计算采用 ExPASy Tools 中 Compute pI/Mw tool 在线分析程序。

1.2.5 *aceA* 和 *aceB* 基因表达载体的构建 采用 PCR 方法扩增 *aceA* 和 *aceB* 基因, 产物经切胶回收后用相应的限制性内切酶分别进行酶切(*aceA* 基因用 *Bam*H I 和 *Hind* III; *aceB* 基因用 *Eco*R I 和 *Hind* III), 所得酶切产物经回收后与预先酶切好的 pET28a(+) 表达载体在 T₄ DNA 连接酶的作用下进行连接, 转化至 *E. coli* DH_{5 α} 在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素抗性 LB 平板上进行筛选, 获得的阳性克隆进行小量质粒抽提、酶切和测序验证, 最终获得正确的重组表达载体(分别命名为 pET28a-*aceA* 和 pET28a-*aceB*)。

1.2.6 *aceA* 和 *aceB* 基因在大肠杆菌中的诱导表达 将构建好的表达载体 pET28a-*aceA* 和 pET28a-*aceB* 转化至 *E. coli* BL₂₁(DE₃) 中, 在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素抗性 LB 平板上进行筛选, 挑取阳性重组菌接种至含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜培养, 以质量分数为 1% 的接种量转接至 30 mL LB 液体培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 2 h(OD₆₀₀ 约为 0.6), 加入诱导剂 IPTG(终浓度为 0.5 mmol/L) 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行诱导表达 5 h。取 100 μL 培养液在 10 000 r/min 条件下进行离心收集菌体, 加入 100 μL ddH₂O 将菌体重悬, 置于沸水浴中加热 3 min, 选用质量分数为 12.5% 的分离胶进行 SDS-PAGE 蛋白电泳分析和考马斯亮蓝 R₂₅₀ 染色。



泳道 M: DNA marker DL 2 000 (2 kb, 1 kb, 0.75 kb, 0.5 kb, 0.25 kb, 0.1 kb)。

图 1 *aceA* 和 *aceB* 基因 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 PCR products analysis of *aceA* and *aceB* genes from *S. marcescens* H₃₀

2 结 果

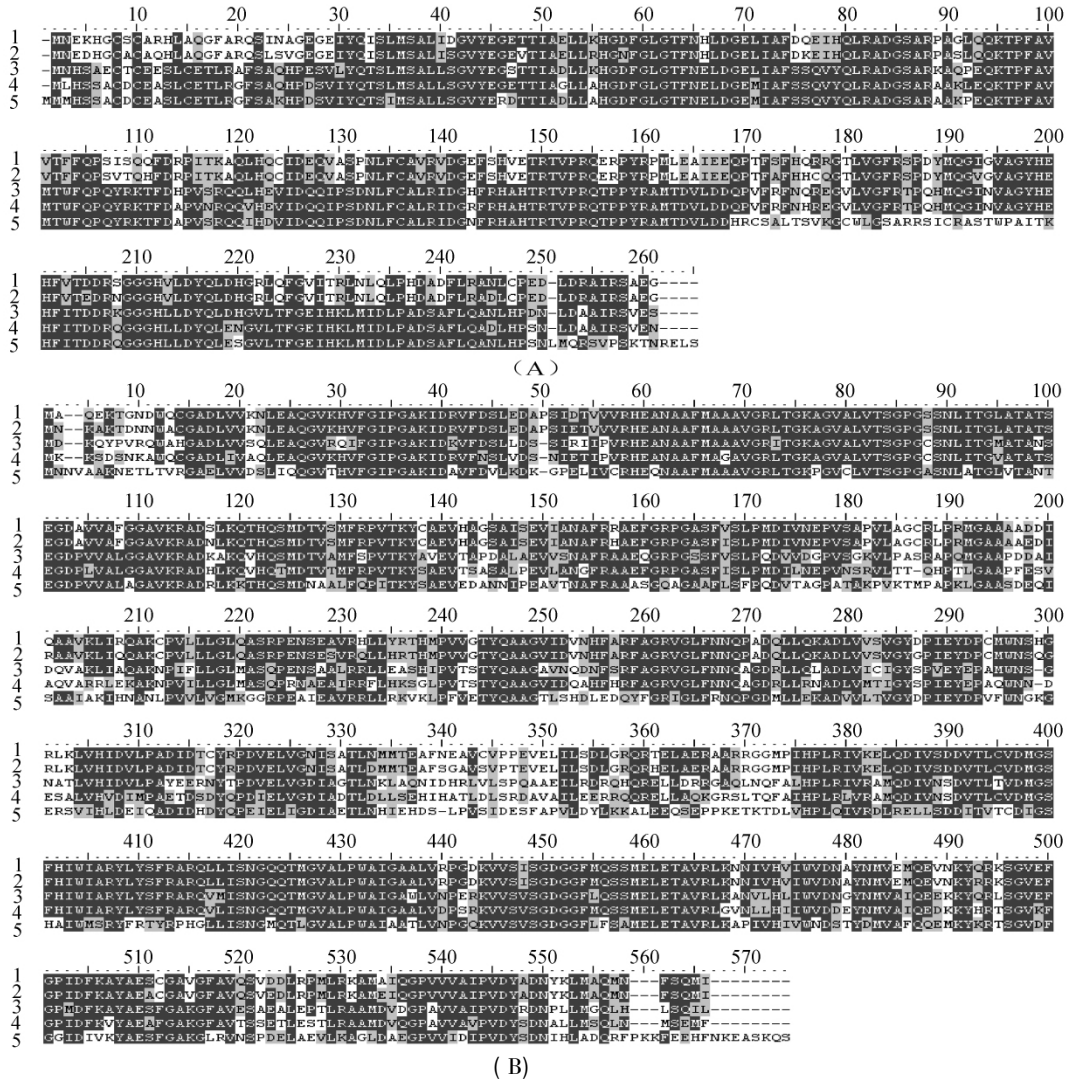
2.1 *aceA* 和 *aceB* 基因克隆

将 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析, 如图 1 所示, 以 *aceA*₁/*aceA*₂ 为引物扩增产物在约 800 bp 的位置获得了清晰的条带, 而以 *aceB*₁/*aceB*₂ 为引物扩增产物在约 1 700 bp 的位置也获得了清晰的条带, 两 PCR 扩增产物的大小与已报道的乙偶姻生产菌中编码 α -乙酰乳酸脱羧酶和 α -乙酰乳酸合成酶基因大小相符, 暗示获得的产物可能是 *aceA* 和 *aceB* 基因。进一步测序结果显示, *aceA*₁/*aceA*₂ 为引物扩增的产物大小为 798 bp, *aceB*₁/*aceB*₂ 为引物扩增的产物大小为 1 704 bp。

2.2 序列分析

GenBank 在线分析程序 ORFs finder 输出结果显示两 PCR 扩增产物各含有一个 ORF, 长度为 780 bp (*aceA*) 和 1 686 bp (*aceB*), 分别编码 259 和 561 个氨基酸。经 ExPASy Tools 中 Compute pI/Mw tool 在线程序预测两基因编码的蛋白分子量和等电点分别为 28.96 kD 和 5.48, 60.70 kD 和 5.88, 均为酸性蛋白。将两个基因编码的氨基酸序列提交 GenBank 在线比对程序 BLASTp 进行同源性分析, 结果表明两个编码蛋白的氨基酸序列与变形斑病沙雷氏菌 (*S. proteamaculans*) 中编码 α -乙酰乳酸脱羧酶和 α

- 乙酰乳酸合成酶的氨基酸序列同源性最高, 达 96% 和 95%, 而与已报道的肺炎克雷伯氏菌、产气肠杆菌和多粘芽孢杆菌同源性也分别达 75% 和 77%、73% 和 80%、64% 和 67% (图 2), 说明粘质沙雷氏菌中编码 α -乙酰乳酸脱羧酶和 α -乙酰乳酸合成酶的基因 *aceA* 和 *aceB* 成功被克隆 (*aceA* 和 *aceB* 基因已提交 NCBI 数据库, 登录号为 GU585939.1)。在编码蛋白氨基酸序列长度上, 粘质沙雷氏菌中 α -乙酰乳酸脱羧酶的氨基酸序列长度与肺炎克雷伯氏菌、产气肠杆菌的 α -乙酰乳酸脱羧酶均为 259 aa, 而多粘芽孢杆菌中序列长度为 265 aa, 较为特别的是 4 个菌中 α -乙酰乳酸合成酶的氨基酸序列长度均不同 (粘质沙雷氏菌为 561 aa、肺炎克雷伯氏菌为 559 aa、产气肠杆菌为 558 aa 和多粘芽孢杆菌为 572 aa), 显示出四菌属在进化过程中的差异性。



1, *S. marcescens* H30; 2, *S. proteamaculans*; 3, *K. pneumonia*; 4, *E. aerogenes*; 5, *B. polymyxa*。

图 2 *aceA* (A) 和 *aceB* (B) 基因编码蛋白同源性比对分析

Fig. 2 Alignment analysis of the deduced amino acid sequences encoded by *aceA* (A)

and *aceB* (B) gene from *S. marcescens* H₃₀ with the corresponding proteins from other acetoin producing strains

2.3 *aceA* 和 *aceB* 基因重组表达载体的构建

aceA 和 *aceB* 基因重组表达载体 (即 pET28a - *aceA* 和 pET28a - *aceB*) 的构建过程如图 3 所示。将卡那霉素平板上长出的阳性转化子进行过夜培养和抽提重组质粒, 用 *BamH* I/*Hind* III 对重组质粒 pET28a - *aceA* 及用 *BamH* I/*EcoR* I 对重组质粒 pET28a - *aceB* 进行双酶切, 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳分析, 如图 4 所示, 两个重组质粒经酶切之后均形成两个片段, 其中大的片段为线性 pET28a 片段, 对于重组载体 pET28a - *aceA* 小片段出现在 750 ~ 1 000 bp 的位置, 与 *aceA* 基因的大小相符, 而重组质粒 pET28a - *aceB* 经双酶切后的小片段出现在 1 700 bp 左右的位置, 与 *aceB* 基因的大小相符, 暗示 *aceA* 和

aceB 基因重组表达载体构建成功, 进一步将重组表达载体进行商业测序, 结果表明重组表达载体中插入的片段与 *aceA* 和 *aceB* 基因序列一致。

2.4 *aceA* 和 *aceB* 基因的表达

如图 5 所示, 含有重组表达载体 pET28a-*aceA* 和 pET28a-*aceB* 的 *E. coli* BL₂₁ (DE₃) 经 IPTG 诱导, 两基因均获得了高效的表达, 其中 *aceA* 基因的表达产物条带出现在约 29 kD 位置, *aceB* 基因表达产物在约 60 kD 位置, 与 2.2 中预测的两基因编码蛋白的分子量基本相一致, 而参照组在相应的位置未出现条带, 表明 *aceA* 和 *aceB* 基因在 *E. coli* BL₂₁ DE₃ 中均成功获得了高效表达。

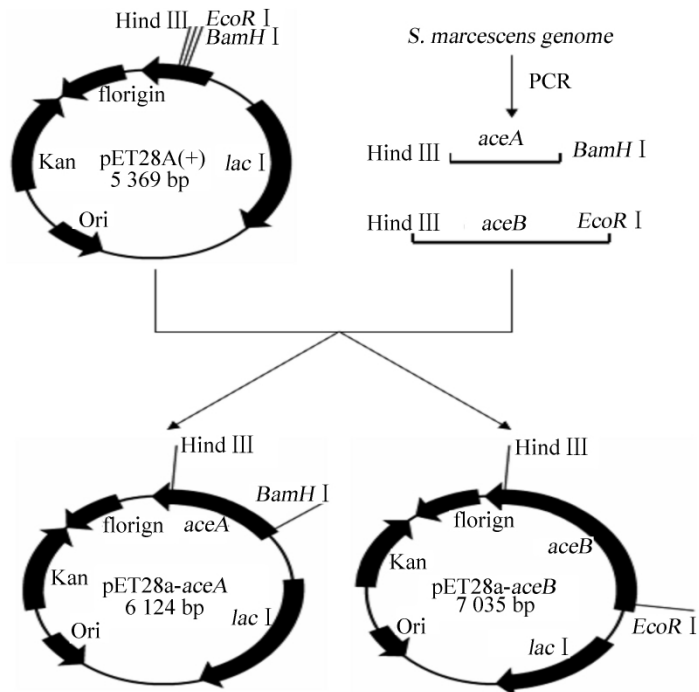
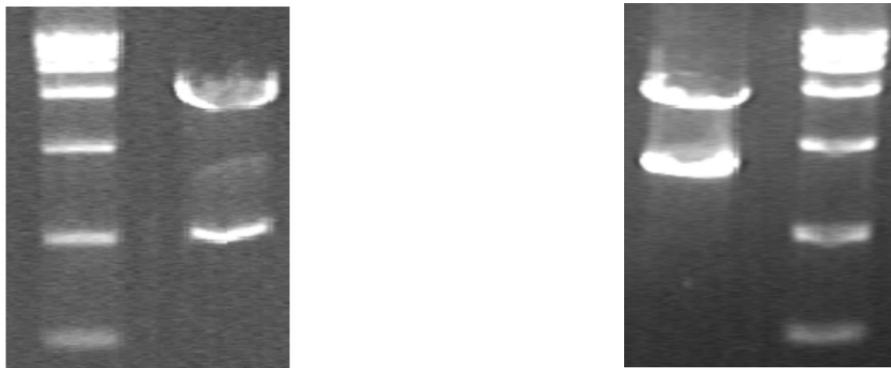


图 3 *aceA* 和 *aceB* 基因重组表达载体构建流程

Fig. 3 Construction of recombinant expression plasmids for *aceA* and *aceB* gene from *S. marcescens* H₃₀



泳道 M: DNA marker DL15 000 (15 kb, 10 kb, 7.5 kb, 5 kb, 2.5 kb, 1 kb, 0.25 kb)。

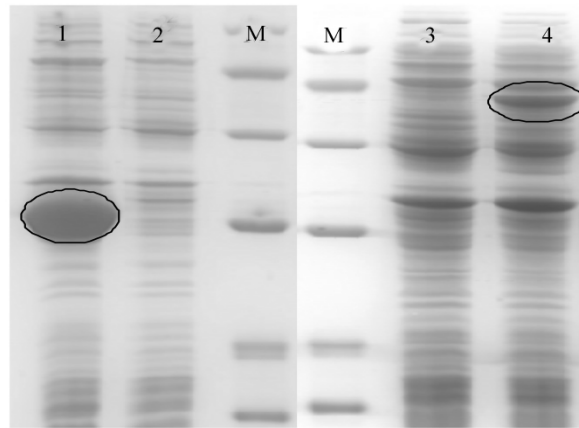
图 4 pET28a-*aceA* 和 pET28a-*aceB* 重组载体双酶切验证

Fig. 4 Identification of recombinant plasmids pET28a-*aceA* and pET28a-*aceB* with double digestion

3 讨论

粘质沙雷氏菌为革兰氏阴性兼性厌氧菌^[16], 因其产次级代谢产物灵菌红素 (prodigiosin) 而具有很强的抗污染能力, 同时该菌可利用多种底物, 如壳聚糖、葡萄糖、蔗糖、甘露糖、纤维二糖、柠檬酸甘油等, 被认为是几丁质酶、蛋白酶、脂肪酶、核酸酶、表面活性剂、2,3-丁二醇和乙偶姻等产品的潜力高产工业菌^[14-15]。在过去的研究中, 我们筛选到一株高产乙偶姻和 2,3-丁二醇的粘质沙雷氏菌 H₃₀, 为了进一步提升该菌株的生产能力, 对该菌合成乙偶姻和 2,3-丁二醇的代谢途径进行研究是非常重要的。在本文中, 我们采用序列比对和 PCR 方法, 成功鉴定了粘质沙雷氏菌中乙偶姻生物合成途径编码 α -乙酰乳酸脱羧酶和 α -乙酰乳酸合成酶的 *aceA* 和 *aceB* 基因, 两基因的 ORFs 长度分别为 780 bp 和 1 686 bp, 编码的蛋白氨基酸残基分别为 259 aa 和 561 aa。氨基酸序列同源性分析显示粘质沙雷氏菌中 α -乙酰乳酸脱羧酶和 α -乙酰乳酸合成酶序列与肺炎克雷伯氏菌和产气肠杆菌的相似性较高 (大于 70%), 表明粘质沙雷氏菌中编码 α -乙酰乳酸脱羧酶和 α -乙酰乳酸合成酶的基因成功被扩增。相

对而言,所获得的序列与多粘芽孢杆菌的相似性较低,这可能与多粘芽孢杆菌属于革兰氏阳性菌,而其他三株菌属于革兰氏阴性菌有关。较为特别的是四株菌的 α -乙酰乳酸合成酶在氨基酸序列长度上均不同,显示出四株菌在进化过程中的差异性。进一步我们通过 pET28a 表达体系实现了两基因在 *E. coli* BL₂₁(DE₃) 中的高效表达,重组蛋白 aceA 和 aceB 的分子量分别约为 29 kD 和 60 kD,与预测的结果一致。经文献检索,本文扩增获得的编码 α -乙酰乳酸脱羧酶和 α -乙酰乳酸合成酶的基因序列为粘质沙雷氏菌中首次报道。



泳道 1 和 4 分别为 aceA 和 aceB 基因表达产物蛋白电泳图,泳道 2 和 3 分别为未加 IPTG 对照, M 为蛋白标品 (97.4 kD, 66.2 kD, 43.31 kD, 20.1 kD, 14.4 kD)。

图 5 aceA 和 aceB 基因表达 SDS-PAGE 蛋白电泳分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of aceA and aceB gene expressed in *E. coli* BL₂₁(DE₃) induced with IPTG

参考文献:

[1] 纪晓俊, 黄和, 杜军, 等. 3-羟基丁酮的合成及应用进展[J]. 现代化工, 2008, 28(4): 18-22.

[2] Xiao Z J, Liu P H, Qin J Y, et al. Statistical optimization of medium components for enhanced acetoin production from molasses and soybean meal hydrolysate[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 74: 61-68.

[3] Liu Y F, Zhang S L, Yong Y C, et al. Efficient production of acetoin by the newly isolated *Bacillus licheniformis* strain[J]. Process Biochemistry, 2011, 46: 390-394.

[4] Werpy T, Petersen G. Top value added chemicals from biomass: Volume I[J/OL]. Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas [2004-08-06]. <http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/35523.pdf>.

[5] 任潇, 纪晓俊, 孙世闻, 等. 肌酸比色法快速测定发酵液中 3-羟基丁酮的含量[J]. 食品科技, 2009, 34(8): 260-263.

[6] Zhang X, Yang T W, Lin Q, et al. Isolation and identification of an acetoin high production bacterium that can reverse transform 2,3-butanediol to acetoin at the decline phase of fermentation[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2011: 1-6.

[7] Yu EKC, Saddler J N. Fed-batch approach to production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* grown on high substrate concentration[J]. Appl Environ Microbiol, 1983, 46: 630-635.

[8] Zeng A P, Biebl H, Deckwer W D. Production of 2,3-butanediol in a membrane bioreactor with cell recycle[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1991, 34: 463-468.

[9] Dettwiler B, Dunn I J, Heinzle E, et al. A simulation model for the continuous production of acetoin and butanediol using *Bacillus subtilis* with integrated pervaporation separation[J]. Biotechnol Bioeng, 1993, 41: 791-800.

[10] Bassit N, Boquien C Y, Picque D, et al. Effect of initial oxygen concentration on diacetyl and acetoin production by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar diacetylactis[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 1893-1897.

[11] Celinska E, Grajek W. Biotechnological production of 2,3-butanediol - current state and prospects[J]. Biotechnol Adv, 2009, 27(6): 715-725.

[12] Ji X J, Huang H, Li S, et al. Enhanced 2,3-butanediol production by altering the mixed acid fermentation pathway in *Klebsiella oxytoca* [J]. Biotechnol Lett, 2008, 30(4): 731-734.

[13] Xiao Z J, Xu P. Acetoin metabolism in bacteria[J]. Crit Rev Microbiol, 2007, 33: 127-140.

[14] Zhang L Y, Shen Y L, Wei D Z, et al. Microbial production of 2,3-butanediol by a mutagenized strain of *Serratia marcescens* H30 [J]. Bioresource Technol, 2010, 101: 1961-1967.

[15] Zhang L Y, Shen Y L, Wei D Z, et al. Microbial production of 2,3-butanediol by a surfactant serrawettin mutant of *Serratia marcescens* H30 [J]. J Ind Microbiol Biot, 2010, 37(8): 857-862.

[16] Grimont P A, Grimont F, De Rosnay H L. Taxonomy of the genus *Serratia* [J]. J Gen Microbiol, 1977, 98(1): 39-66.