

# 荧光假单胞菌香兰素脱氢酶基因的克隆及表达

赵建芬<sup>1</sup>, 张广<sup>2\*</sup>

(1. 肇庆学院 轻工化学系, 广东 肇庆 526061; 2. 清华大学 深圳研究生院, 广东 深圳 518055)

**摘要** 对荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens* ATCC13525) 香兰素脱氢酶基因 *vdh* 进行了克隆、序列分析及表达。PCR 扩增获得了长度为 1 449 bp 的核苷酸序列, 该序列编码含 438 个氨基酸, 分子量约为 50 ku 的多肽。序列分析表明该基因与 GenBank 提供的部分已知 *vdh* 基因具有高度的同源性。该基因在大肠杆菌 DH5 中能高效表达, 而在野生型 *P. fluorescens* ATCC13525 中本身并不表达出功能。*Vdh* 基因表达产物香兰素脱氢酶 (*Vdh*) 在细胞中主要以可溶性蛋白的形式存在。同时研究表明诱导剂 IPTG 对 *vdh* 基因在大肠杆菌中的表达并不起作用。

**关键词** 荧光假单胞菌; 香兰素脱氢酶; 基因克隆; 表达

中图分类号 Q939.11<sup>+</sup>2 文献标识码 A 文章编号 1005-7021(2007)06-0051-04

## Cloning and Expression of Vanillin Dehydrogenase Gene of *Pseudomonas fluorescens*

ZHAO Jian-fen<sup>1</sup>, ZHANG Guang<sup>2</sup>

(1. Department of Light Industry and Chemistry, Zhaoqing University, Zhaoqing 526061, China;

2. Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen 518055, China; )

**Abstract** In this paper the vanillin dehydrogenase gene (*vdh*) of *P. fluorescens* ATCC13525 was cloned, sequenced and expressed. The *vdh* gene was obtained by polymerase chain reaction and was 1 449 bp, encoding a peptide of 438 amino acids with a calculated molecular weight of 50 ku. Nucleotide sequence and amino acid sequence analysis showed the high homology with some of *vdh* genes in GenBank. The *vdh* gene was successfully expressed in the recombinant *E. coli* DH5 and the expression product was mainly soluble protein. But there was no detectable *Vdh* enzyme activity in wild type *P. fluorescens* ATCC13525. And it was confirmed that inducer IPTG didn't effect the expression of the *vdh* gene in the recombinant *E. coli* strain.

**Keywords** *P. fluorescens* ATCC13525; vanillin dehydrogenase (*Vdh*); gene cloning; expression

在以阿魏酸为底物采用生物转化法生产香兰素时遇到的最大问题就是香兰素对微生物具有较大的毒性, 会抑制微生物的生长, 导致目标产物香兰素的得率很低。目前大多数的研究者主要是通过降低香兰素酸的产量来提高香兰素的得率, 但目前效果不理想或进展不大<sup>[1]</sup>。而香兰素脱氢酶 (vanillin dehydrogenase, *Vdh*) 能将香兰素转化为毒性相对较低的香草酸, 并使转化产物中有大量香兰素酸积累。根据这一点可制定二步法生产香

兰素的方案: 阿魏酸 → 香兰素酸 → 香兰素。在第一步由阿魏酸转化为香兰素酸过程中, 一旦出现的香兰素除很少的一部分转化为香兰素醇外, 绝大部分将在重组菌分泌的香兰素脱氢酶 (*Vdh*) 作用下迅速转化为毒性相对较低的香草酸, 使香兰素在第一步中成为一个过渡产物, 很少会积累下来。这样就不会损害微生物的生长, 又能提高香兰素酸的得率, 为第二步反应大量积累底物, 这样有利于终产物香兰素产率的提高。在第二步中,

收稿日期: 2006-09-25

作者简介: 赵建芬, 女, 硕士研究生。研究方向为食品分析及食品生化。

\* 通讯作者

可以通过酶促反应把香兰素酸转化成香兰素。本文克隆了荧光假单胞菌 (*P. fluorescens* ATCC13525)的香兰素脱氢酶基因,并对该基因进行了序列分析并研究了其在大肠杆菌中的表达。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 见表1所示。

1.1.2 主要试剂 酶:限制性内切酶 *Bam*H、*Hind* III, T4 DNA连接酶, *Taq* DNA聚合酶及其缓冲溶液、dNTP,大连宝生物公司; 试剂盒:

H. Q. & Q 凝胶回收试剂盒、H. Q. & Q PCR及酶反应产物纯化试剂盒,安徽优晶生物工程有限公司; 抗生素:氨苄青霉素 (Amp)使用浓度为 100  $\mu$ g/mL; LB培养基:参考文献[2]。其他化学和生物学试剂为进口或国产分析纯试剂。

1.1.3 仪器 V s-1300-V型超静工作台,苏静集团泰安公司; TECHGENE 基因扩增仪,英国 TECHN 公司; Omega 12ic 凝胶成像系统,Media Cubemetics公司; Jenway6065 紫外可见分光光度计,英国 Jenway有限公司; JY92-2D 超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司。

表1 菌株与质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

菌株与质粒	相关性质	来源
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC13525	Wild type, ferulate positive, vanillin positive, vanillate positive	本实验室保存
<i>Escherichia coli</i> DH5	F <sup>+</sup> , 80 <i>dlacZ</i> M15, ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), <i>proA</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	本实验室保存
JM109	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyr96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , ( <i>lac-proAB</i> ) / F [ <i>tniD36</i> , <i>proAB</i> <sup>+</sup> , <i>lac</i> <sup>f</sup> , <i>lacZ</i> M15]	本实验室保存
XL1-blue 质粒	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyr96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> <sup>-</sup>	本实验室保存
pMD18-T	Ap <sup>r</sup> , <i>P<sub>lac</sub> lacZ</i> , broad host rang	购自宝生物工程有限公司
pUC18	Ap <sup>r</sup> , <i>P<sub>lac</sub> lacZ</i>	购自宝生物工程有限公司
pZIF	pUC18 with a 2.4 kb PCR fragment containing the <i>vdh</i> gene from <i>P. fluorescens</i> ATCC13525	本实验室保存
pZIF1	pUC18 harboring the <i>vdh</i> gene in the <i>Bam</i> H / <i>Hind</i> III site	本实验室保存

### 1.2 方法

1.2.1 菌株的培养 大肠杆菌用 LB培养基于 37℃ 培养;荧光假单胞菌于 26℃ 培养。在适当时候添加 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素 (Amp), 1 mmol/L IPTG诱导剂。

1.2.2 感受态细胞的制备 氯化钙法,参考文献[2]。

1.2.3 PCR扩增 *vdh*基因 根据已知的含有荧光假单胞菌 (*P. fluorescens* ATCC13525) *vdh*基因的 pZIF质粒序列,设计了以下引物: *vdh*-F2: 5' TTA GGA TCCAA TGCTGGACGTGCCCTG 3'; *vdh*-R2: 5' GTC AAGCTT TCA GA TCGGGTAA TGCCGTG 3',下划线部分分别为 *Bam*H、*Hind* III 识别位点,送上海博亚生物技术有限公司合成。PCR体系 (50  $\mu$ L):模板 重组质粒 pZIF (40 ng/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, 10  $\times$ PCR Buffer (plus Mg<sup>2+</sup>) 5  $\mu$ L, dNTP (2.5

mmol/L each) 5  $\mu$ L, *vdh*-F2 (10  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ L, *vdh*-R2 (10  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ L, *rTaq* (5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 35  $\mu$ L。PCR反应条件为 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 2 min, 30个循环; 72℃ 10 min。

1.2.4 pZIF1质粒的构建、重组质粒的转化和检测均按参考文献[3]和[4]。

1.2.5 *vdh*基因序列测定和分析 DNA序列测定由上海博亚生物技术有限公司完成。

1.2.6 *vdh*基因的表达 分别从平板上挑选含 pZIF1、pUC18的阳性克隆进行小量摇培,作为种子液。然后按 1%的比例接种扩大培养,光密度 (OD<sub>600</sub>)值 0.4~0.6时,添加 IPTG至终浓度为 1 mmol/L, 37℃ 继续振荡 (220 r/min)培养 4~5 h。同时做一不加 IPTG的对照组。收集菌体,加入 SDS-PAGE Loading Buffer,重悬菌液, 100

煮 5 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液进行 SDS-PAGE 检测。同时取含 pZJF1 重组菌体按文献 [5] 的方法进行超声裂解, 然后用 SDS-PAGE 检测所收集的上清和沉淀。

## 2 结果

### 2.1 vdh 基因的克隆

以重组质粒 pZJF 为模板进行 PCR 扩增, PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果如图 1(a) 所示: 有一条约 1.5 kb 的清晰条带, 这与 vdh 基因长度非常接近, 初步认为已扩增获得 vdh 基因。PCR 产物电泳回收纯化并经 *Bam*H、*Hind* 酶切后连接到经同样酶切后的 pUC18 载体, 从而构建了重组质粒 pZJF1, 然后把 pZJF1 转化到宿主菌 *E. coli* DH5。挑选转化子, 小量提取质粒, 用 *Bam*H、*Hind* 进行双酶切, 释放出约 2.7 kb 和 1.5 kb 的两条清晰的条带, 如酶切图谱图 1(b) 中箭头所示。这正符合载体 pUC18 DNA (2.686 kb) 的长度与已知 vdh 基因 (1.449 kb) 的长度, 从而初步肯定了已经成功地构建了含有 vdh 基因的表达载体 pZJF1。

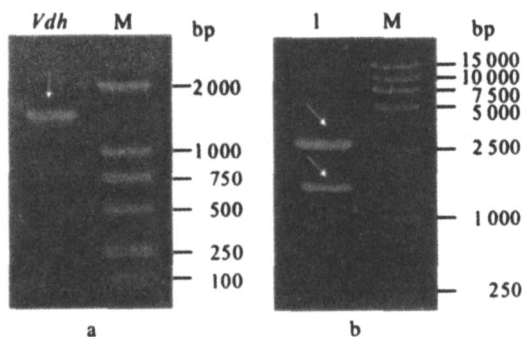


图 1 PCR 扩增 vdh 基因的电泳图谱 (a) 和重组质粒 pZJF1 的酶切鉴定 (b)

Fig 1 Electrophoresis map of PCR amplification vdh gene (a) and identification of enzyme digestion of recombinant plasmid (b)

### 2.2 vdh 基因序列分析

阳性克隆测序结果与已知重组质粒 pZJF 中 vdh 基因的序列完全一样。这进一步肯定了已经成功地构建了含有 vdh 基因的表达载体 pZJF1。该基因长度为 1 449 bp, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TGA。推测该基因编码 1 条含有 483

个氨基酸的多肽, 分子量约为 50 ku。该 DNA 序列与 GenBank 中已经公布的序列号为 AJ536325、Y13067、AE016786、AE016866 的 vdh 基因序列同源性分别为 88%、85%、79%、82%。推测它们编码的氨基酸序列同源性分别为 96.5%、96%、92%、94%, 这些数据显示它们具有高度的同源关系。该核苷酸序列已提交给 GenBank, 检索号码: DQ119298。

### 2.3 vdh 基因的表达

重组菌经 IPTG 诱导后, 用 10% SDS-PAGE 检测 vdh 基因的表达产物, 结果显示 (图 2), 加 IPTG 不加 IPTG 的重组菌与转入空载体 pUC18 的 *E. coli* DH5、荧光假单胞菌 (*P. fluorescens* ATCC13525) 相比, 重组菌在约 50 ku 处明显增加了一条表达量很高的蛋白条带, 其相对分子质量大小与重组蛋白 Vdh 推测的相对分子质量非常接近, 说明了克隆基因 vdh 在 *E. coli* DH5 中得到了表达。而 *P. fluorescens* ATCC13525 本身并不表达 Vdh 蛋白。

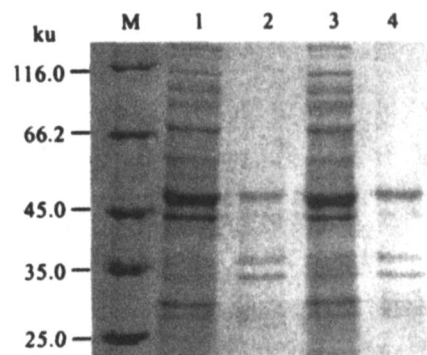


图 2 不同菌株中的蛋白表达

Fig 2 Comparison of protein expression in different bacteria  
M: 蛋白相对分子量标记; 1: 不加 IPTG 诱导的重组菌总蛋白; 2: 加 IPTG 诱导的重组菌总蛋白  
3: 转入空载体 pUC18 的 *E. coli* DH5 总蛋白;  
4: 荧光假单胞菌 ATCC13525 总蛋白

为了确定重组蛋白在细胞中的存在形式, 本实验采用超声裂解重组菌液, 用 SDS-PAGE 检测所收集的上清液和沉淀, 以确定重组蛋白在大肠杆菌细胞中是以可溶性蛋白还是以包涵体的形式存在。结果如图 3 所示。Vdh 主要分布在菌体裂解物的上清液中, 沉淀所含 Vdh 很少。这说明了

Vdh主要以可溶性蛋白的形式存在,这对后面进行的实验十分有利,它避免了处理包涵体的繁琐。

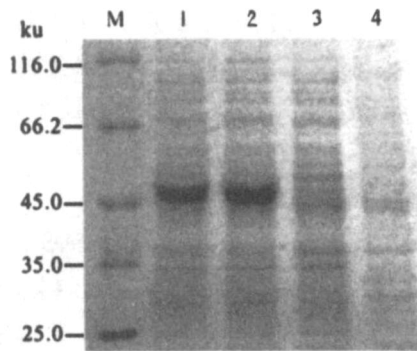


图3 Vdh重组蛋白在 *E. coli* DH5 中的存在形式

Fig 3 Existent form of recombinant protein Vdh in *E. coli* DH5

M:蛋白相对分子量标记; 1:不加 IPTG诱导的重组菌超声裂解上清液; 2:不加 IPTG诱导的重组菌超声裂解沉淀; 3:加 IPTG诱导的重组菌超声裂解上清液; 4:加 IPTG诱导的重组菌超声裂解沉淀

### 3 讨论

将克隆得到的香兰素脱氢酶基因 *vdh* 与 GenBank提供的部分已知 *vdh* 基因进行同源性分析,其比较结果显示荧光假单胞菌 ATCC13525 香兰素脱氢酶基因 *vdh* 与它们具有很高的同源性。同时将 *vdh* 基因翻译过来的氨基酸序列进行了比较。之所以对氨基酸序列也进行比较,是因为对氨基酸序列的分析更能够表现出不同菌种的同源酶的相互关系。

把有待验证的基因克隆到表达载体的合适位点上,让其处于某一启动子的控制下,以保证其能顺利表达,这跟正常的基因表达程序一样,也包括 DNA 分子的有效转录和 mRNA 分子的有效翻译这两个主要步骤。此外,还有表达条件的选择,包括培养液成分、温度、诱导和培养时间的长短等。

一般来说,要合适的时间来诱导表达,细菌在对数生长期,即  $A_{600}$  约为 0.6 时,生长状态良好,易于诱导合成外源蛋白<sup>[5]</sup>。但从图 2 和图 3 中可以看出,重组蛋白在加 IPTG 诱导和不经 IPTG 诱导的重组菌里所表达的量基本上没有什么不同。本研究尝试改用 *E. coli* JM109、XL1-blue 为宿主,但结果都是一样的,即 IPTG 对 *vdh* 基因在大肠杆菌中的表达没有明显的影响。这可能与大肠杆菌乳糖操纵子 *Lac* 有关,其机理还有待进一步研究和探讨。这种渗漏表达既有缺点又有优点,缺点是无法控制蛋白的表达,优点是可避免使用 IPTG 等化学诱导剂,降低生产成本。

对重组蛋白 Vdh 进行活性测定和对重组菌进行发酵试验,以便证明荧光假单胞菌 ATCC13525 *vdh* 基因的表达产物 Vdh 具有把香兰素转化为香兰素酸的功能。这方面的工作正在进行中。

### 参考文献:

- [1] 欧仕益,李爱军,包惠燕,等. 生物法生产香兰素研究进展[J]. 广州食品工业科技, 2004, 20(2): 119-121.
- [2] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔著, 黄培堂, 等译. 分子克隆实验指南 (第 3 版) [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [3] J. Owerhage, H. Priefert, J. Rabenhorst, et al. Biotransformation of eugenol to vanillin by a mutant of *Pseudomonas* sp. strain HR199 constructed by disruption of the vanillin dehydrogenase (*vdh*) gene [J]. Appl microbial Biotechnol, 1999, 52: 820-828.
- [4] Mar ídel Camen Mar ínez-Cuesta, John Payne, Sean B. Hanniffy, Michael J. Gasson, Arjan Narbad. Functional analysis of the vanillin pathway in a *vdh*-negative mutant strain of *Pseudomonas fluorescens* AN103 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 37: 131-138.
- [5] 刘进元, 等. 分子生物学实验指导 [M]. 北京: 清华大学出版社, 2002, 112-127.

# 欢迎投稿

# 欢迎订阅