

Klebsiella oxytoca HP1 *adhE* 基因插入失活法 构建产氢重组菌

朱俊波 龙敏南 徐方成* 邬小兵 徐惠娟

(厦门大学化学化工学院化学工程与生物工程系, 厦门 361005; 厦大学生命科学学院, 厦大学生物能源中心, 厦门 361005.

* 联系人, E-mail: fexu@xmu.edu.cn)

摘要 乙醇是产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*) HP1 厌氧发酵产 H₂ 的主要副产物, 每生成 1.0 mol 的乙醇需要消耗 2.0 mol NAD(P)H, 从而降低了 H₂ 的产量. 本研究以编码乙醇脱氢酶系(含乙醛脱氢酶和乙醇脱氢酶活性)的 *adhE* 基因为改造目标, 利用同源重组技术获得了以提高产氢为目标的 *K. oxytoca* 重组菌. 构建工作包括: 根据 *adhE* 基因保守序列框克隆 *K. oxytoca* HP1 *adhE* 基因片段, 以质粒 pMHE6 为模板进行链霉素抗性基因表达盒的扩增, 表达链霉素抗性的 *aadA* 基因片段和 *adhE* 基因片段分别与载体 pMD18-T 相连构建重组质粒, 同源整合质粒 pTA-Str 的构建, 以链霉素作为筛选标记筛选重组菌. 菌落 PCR 鉴定结果表明, *aadA* 基因表达盒通过质粒 pTA-Str 的介导已定点插入 *K. oxytoca* HP1 基因组中, 成功地构建了 *adhE* 基因部分片段缺失的重组菌. 葡萄糖发酵实验结果表明, 相同发酵条件下, 重组菌比野生菌的产氢量提高了 16.07%, 乙醇产量下降了 70.47%. 利用基因工程技术提高产氢初步获得成功.

关键词 *Klebsiella oxytoca* HP1 *adhE* 基因 发酵产氢 基因插入失活

随着国际石油价格的一路飙升, 化石燃料日趋枯竭的问题已成为人们关注的焦点. 而且这类燃料燃烧产生的 CO₂, SO₂ 等有害物质又会给地球带来温室效应和酸雨等不良后果, 引起严重的环境污染问题^[1]. 因此, 寻找替代能源、开发洁净的新能源和可再生能源是社会发展的必然趋势. 在诸多新型替代能源中, 氢能被认为是最有吸引力的替代能源之一^[2].

在产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*) HP1 厌氧发酵产氢过程中, 乙醇的生成消耗了大量的 NAD(P)H, 这可能是导致了氢气得率降低的原因之一^[3,4]. 细菌厌氧发酵产乙醇的过程是一个两步酶促反应: 第一步, 由与 CoA 偶联的乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, ALDH)催化乙酰 CoA 生成乙醛; 第二步, 由 Fe²⁺ 依赖的乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)催化乙醛生成乙醇^[5]. 这两个酶的活性都是来源于 *adhE* 基因表达的乙醇脱氢酶系, 即这两个酶实际上是由同一个基因 *adhE* 编码的(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NP_415757.1). 因此, 通过插入失活的方法阻断 *adhE* 基因的表达, 可阻断乙醇代谢途径, 使 *K. oxytoca* HP1 代谢过程中

产生的过量 NAD(P)H 流向产氢途径, 从而提高产氢量. 本研究首先通过 *adhE* 基因的保守序列框设计引物克隆得到 *K. oxytoca* HP1 *adhE* 基因的部分片段, 然后在 *adhE* 基因中插入氨基葡萄糖苷腺苷转移酶基因(*aadA*), 利用同源重组技术构建 *adhE* 基因失活的重组菌.

1 材料与方法

() 材料. *Klebsiella oxytoca* HP1^[6], 大肠杆菌 DH5 α 及质粒 pMHE6 由厦大学生命科学学院生物能源中心保存, 载体 pMD18-T 购自大连宝生物有限公司. 限制性内切酶 *BssH*, *Mlu*, *Dra*, *BamH*, T4 连接酶, *Taq* DNA 聚合酶, dNTPs, DNA Mark 购自大连宝生物有限公司. 链霉素购自华美生物公司. 质粒小量提取试剂盒和 DNA 回收试剂盒购自上海申能博彩生物公司. 产氢培养基: 葡萄糖, 10 g; Na₂HPO₄·12H₂O, 14.33 g; KH₂PO₄, 3.63 g; MgSO₄·7H₂O, 0.37 g; 加自来水至 1 L. 引物合成由上海英骏生物公司完成. 测序工作由大连宝生物有限公司完成.

() *aadA* 基因表达盒的 PCR 扩增. 根据质粒

2006-10-30 收稿, 2006-12-07 接受

国家自然科学基金(批准号: 30470395)和福建省重点科技项目(批准号: 20051106)资助

pMHE6 全序列设计引物(上游引物, 5'-TCAACGCGT-GAAGTCCAGCGCCAGA-3'; 下游引物 5'-CTAACG-CGTGCAGATCCGTGCACAG-3'), 并在引物两端添加 *Mlu* 酶切位点(下画线处). 以质粒 pMHE6 为模板进行链霉素抗性基因表达盒的 PCR 扩增. PCR 反应条件: 95 预变性 5 min; 94 , 30 s, 58 , 30 s, 72 , 80 s, 30 个循环; 72 , 7 min.

() 重组质粒 pMD-Str 的构建及重组子的鉴定. PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒回收后, 与 pMD18-T 载体连接, CaCl_2 法转化 DH5 α 感受态细胞, 用含 Str (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 平板筛选克隆子. 碱变性法提取克隆子的质粒, 经 PCR 鉴定和 *Bam*H 酶切验证. 阳性克隆子命名为 pMD-Str.

() *K. oxytoca* HP1 *adhE* 片段的 PCR 扩增. 采用 Primer Premier 5.0 软件, 参照 GenBank 中的 *adhE* 基因(登录号: U00096)设计引物(上游引物, 5'-ATC-AAGCTTGGCATGGGCATCGTTGA-3'; 下游引物, 5'-CGAGGATCCGGCAATTTATGCCATA-3'), 并在上、下游引物上分别添加 *Hind* 和 *Bam*H 酶切位点(下画线). 提取 *K. oxytoca* HP1 的总 DNA 为模板进行 *adhE* 基因片段的 PCR 扩增. PCR 反应条件: 95 预变性 5 min; 94 , 30 s, 55 , 30 s, 72 , 60 s, 30 个循环; 72 , 7 min.

() 重组质粒 pTA 的构建及重组子的鉴定. PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒回收后, 与 pMD18-T 载体连接, CaCl_2 法转化 DH5 α 感受态细胞, 用含 Amp (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 平板筛选克隆子. 碱变性法提取克隆子的质粒, 经 PCR 鉴定和测序验证. 将阳性克隆子命名为 pTA.

() 同源整合质粒 pTA-Str 的构建及重组子的鉴定. 经验证无误的 pMD-Str 用 *Mlu* 酶切, pTA 用 *Bss*H 酶切, 用琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒回收 pMD-Str 1.8 kb 片段和 pTA 3.9 kb 片段, 其中 pTA 3.9 kb 片段用 SAP 去磷酸化处理, 两片段在 T4 连接酶作用下 16 过夜反应. 连接产物用 CaCl_2 法转化 DH5 α 感受态细胞, 用含 Amp (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 Str (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 平板筛选转化子. 碱变性法提取转化子质粒, 用 *Sac* , *Dra* 酶切和 PCR 鉴定, 结果通过测序进一步证实. 阳性重组子命名为 pTA-Str.

() 重组菌的转化筛选和 PCR 鉴定. 分别以 5'-CGAGGATCCCACTAACCAGACTTCA-3'和 5'-CGAGGATCCGGCAATTTATGCCATA-3' (下画线为

*Bam*H 酶切位点)为上下游引物, 以 pTA-Str 为模板扩增得长度约 3.0 kb 的 DNA 片段 5'-*adhE*-*aadA*-*adhE*-3'. 参照文献[7]的方法, 将得到的 DNA 片段纯化后转化 *K. oxytoca* HP1 感受态细胞, 并涂布于含 Str (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 平板, 筛选同源双交换的抗性菌株.

取 *adhE* (+174 ~ +191, *adhE* 基因起始编码框为 +1) 为上游引物 5'-ATCAAGCTTGGCATGGGCATC-GTTGA-3', 依据外源 *aadA* 表达盒序列-540 ~ +1240 序列(*aadA* 基因起始编码框为 +1)设计下游引物 5'-ACCAAGGTAGTCGGCAAAT-3', 以转化菌总 DNA 为模板扩增得 1.3 kb 产物, 回收片段并测序鉴定.

2 结果

2.1 PCR 扩增链霉素抗性基因表达盒

以 pMHE6 为模板, 通过 PCR 扩增得到的产物, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在 1.8 kb 处有一条特异性扩增条带, 与实验预计相符(图 1).

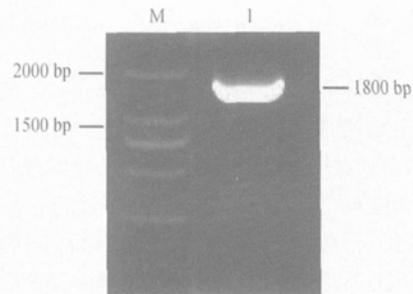


图 1 链霉素抗性基因表达盒 PCR 扩增结果
M, D2000L DNA 分子量标准; 1, 链霉素抗性基因表达盒 PCR 产物

2.2 重组质粒 pTA 的构建及重组子的鉴定

将 *adhE* 的 PCR 扩增产物与 pMD18-T 载体连接, 转化, 挑取 6 个白色菌落, 提取质粒后以 M13 引物进行 PCR 扩增, PCR 产物为 1.2 kb 左右的特异条带(图 2), 符合实验预计.

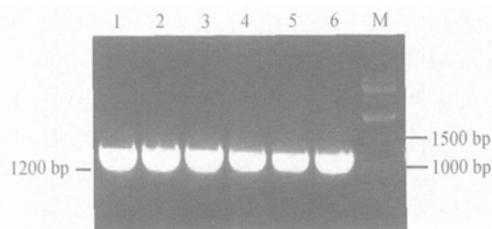


图 2 重组质粒 pTA 的 PCR 鉴定
M, 1 kb DNA 分子量标准; 1-6, 随机挑选的 6 个转化子 PCR 产物

2.3 同源整合质粒 pTA-Str 的构建及重组子的鉴定

将 pMD-Str 经 *Mlu* 酶切和 pTA 经 *Bss*H 酶切的产物连接转化, 用含 Amp (100 μ g/mL) 和 Str (50 μ g/mL) 的 LB 平板筛选得到转化子提取质粒, 经 *Sac* 和 *Dra* 酶切鉴定, 琼脂糖凝胶电泳显示的条带大小与理论设计相符, 证实为阳性克隆(图 3 和 4). 测序结果进一步确定引入的外源 *aadA* 序列已定点插入 pTA 中.

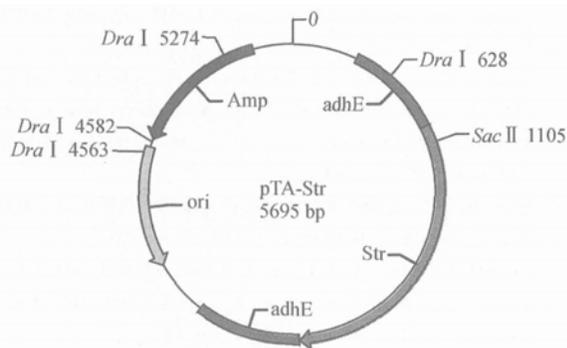


图 3 质粒 pTA-Str 的基本结构

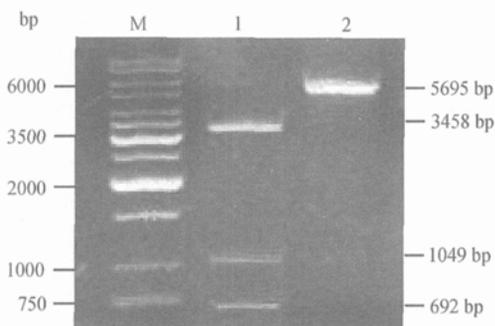


图 4 质粒 pTA-Str 的酶切验证

M, 1 kb DNA 分子量标准; 1, pTA-Str/*Sac* 及 *Dra* 双酶切; 2, pTA-Str/*Sac* 单酶切

2.4 *K. oxytoca* HP1 对链霉素抗性的测定

参照文献[7]进行. 将对数生长期后期的菌液 ($A_{600} = 0.6$) 经无菌水稀释后, 取 100 μ L 涂布于链霉素含量不同的 LB 系列平板上, 以不含链霉素的平板作对照, 观察各处理样品菌落的生长情况. 结果表明, 在链霉素浓度为 15 和 30 μ g/mL 的平板上出现几个小的单菌落, 而链霉素浓度为 45, 60 和 75 μ g/mL 的平板上无菌落生长. 依此确定转化菌的链霉素筛选浓度为 50 μ g/mL.

2.5 重组菌的 PCR 鉴定

以转化子总 DNA 为模板, 经 PCR 得到扩增产物,

1% 琼脂糖凝胶电泳显示在 1.3 kb 处有一条特异性扩增条带, 与实验预计相符(图 5). PCR 产物经测序鉴定为实验预计的目的片段: *K. oxytoca* HP1 *adhE* 基因 +174 ~ +868 区域片段(*adhE* 起始编码框为 +1) 和外源 *aadA* 表达盒 -540 ~ +21 序列(*aadA* 基因起始编码框为 +1). 依此确定引入的 *aadA* 外源序列已成功地点插入受体菌细胞染色体基因组中.

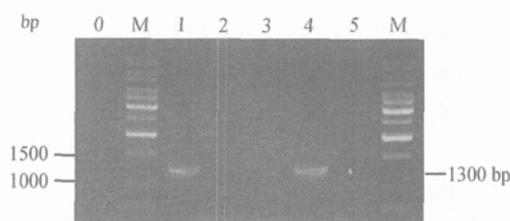


图 5 突变株的 PCR 鉴定

M, 1 kb DNA Mark; 0, 阴性对照; 1~5, 随机挑选的 5 个转化子 PCR 产物

2.6 野生菌和重组菌的产氢、产乙醇特性比较

将 *K. oxytoca* HP1 野生菌和重组菌分别接种于 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h 至对数后期, 低速离心(4000 \times)收集菌体细胞, 然后重新悬浮于放氢培养基. 放氢培养采用 140 mL 血清瓶, 装液量 20 mL, 用反口橡胶塞封口后抽真空充高纯氩气以保证无氧状态. 每个实验设 3 次重复. 血清瓶置于摇床振荡培养, 培养温度 37 $^{\circ}$ C, 摇床转速 120 r/min. 每隔 12 h 取样分析 H_2 和乙醇. H_2 用 102G 气相层析仪(5A 分子筛柱, 上海分析仪器厂)测量; 乙醇用 GC950 气相层析仪(DB-5 毛细管柱, 上海海欣色谱仪器有限公司)测量, 测量结果如图 6 所示. 结果表明, 重组菌的产氢量比野生株提高了 16.07%, 而乙醇浓度下降了 77.47%.

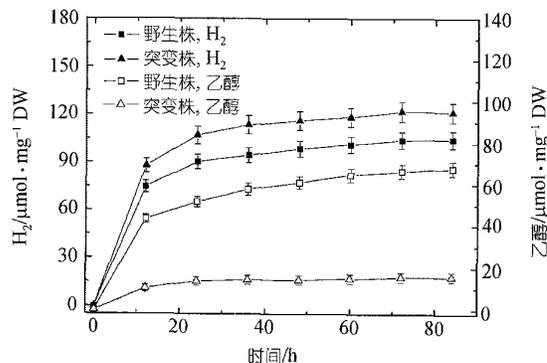


图 6 重组菌、野生菌的产氢、产乙醇比较

3 讨论

K. oxytoca HP1 兼性厌氧, 能利用葡萄糖、淀粉、木质素、纤维二糖等多种碳源放氢, 并且在气相含氧量高达 10% 条件下仍然能放氢. *K. oxytoca* HP1 培养条件简单, 不需要有机氮源, 是一株有较高开发价值的高效放氢菌. 代谢产物分析表明, *K. oxytoca* HP1 呈混合酸发酵特性, 在底物限制的条件下, 乙醇是产氢发酵的主要副产物. Ohta 等人^[8]用同源重组技术阻断大肠杆菌 K12 菌株的琥珀酸途径, 得到了高产乙醇的重组菌 KO11. Koji 等人^[9]构建了 LDH 失活的 *E. coli* 突变株, 其产氢能力提高了 17%. 张延平等^[10]敲除了 *K. pneumoniae* M5aL 的醛脱氢酶基因, 重组菌的 1,3-丙二醇合成浓度提高了 27%~42%.

本研究应用类似的基因操作策略改造本课题组筛选得到的产氢菌株 *K. oxytoca* HP1 的产氢能力. 构建的同源重组质粒 pTA-Str 含有 *K. oxytoca* HP1 *adhE* 基因+174 ~ +1360 区的同源整合片段, 并在+694 ~ +695 处引入 *aadA* 基因表达盒. 以质粒 pTA-Str 为模板 PCR 扩增得长度约 3.1 kb 的 5'-*adhE*-*aadA*-*adhE*-3' DNA 片段, 该片段通过转化导入宿主细胞 *K. oxytoca* HP1 后, 能介导外源的 *aadA* 基因定点插入宿主细胞基因组的 *adhE* 基因中, 造成 *adhE* 基因的插入失活. 同时由于 *aadA* 基因的引入表达使转化菌具有链霉素抗性, 因此可以作为突变株的筛选标记. 厌氧摇瓶发酵结果表明, *adhE* 缺失菌株的产氢量比野生菌株提高了 16.07%, 而乙醇浓度下降了 70.47%. 这说明通过同源重组技术乙醇途径已经基本被阻断, 原用于产乙醇的还原力, 部分已经被氢酶获得用来产氢,

从而提高了总产氢量.

参 考 文 献

- 1 Gross R, Leach M, Bauen A. Progress in renewable energy. *Environ Int*, 2003, 29: 105—122
- 2 Das D, Veziroglu T N. Hydrogen production by biological processes: A survey of literature. *Int J Hydrogen Energ*, 2001, 26: 13—28
- 3 Tolan J S, Finn R K. Fermentation of D-xylose to ethanol by genetically modified *Klebsiella planticola*. *Appl Environ Microb*, 1987, 53: 2039—2044
- 4 Tsai P S, Rao G, Bailey J E. Improvement of *Escherichia coli* microaerobic metabolism by vitreoscilla hemoglobin: New insights from NAD(P)H fluorescence and culture redox potential. *Biotechnol Bioeng*, 1995, 47: 347—354
- 5 蒋宇, 邵蔚蓝. 嗜热厌氧产乙醇杆菌乙醇代谢途径的初步研究. *南京师范大学学报(自然科学版)*, 2005, 28: 69—73
- 6 Long M N, Huang J L, Wu X B, et al. Isolation and characterization of a high H₂-producing strain *Klebsiella oxytoca* HP1 from a hot spring. *Res Microbiol*, 2005, 156: 76—81
- 7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 等著. 金冬雁, 等译. 分子克隆实验指南(第 2 版). 北京: 科学出版社, 1992
- 8 Ohta K, Beall D S, Mejia, J P, et al. Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase. *Appl Environ Microb*, 1991, 57: 893—900
- 9 Koji S, Mika W, Hiroshi M, et al. Construction and characterization of fermentative lactate dehydrogenase *Escherichia coli* mutant and its potential for bacterial hydrogen production. *Appl Biochem Biotech*, 1999, 77-79: 317—323
- 10 张延平, 刘铭, 曹竹安. 醛脱氢酶基因敲除的 *K. pneumoniae* 重组菌的构建. *中国生物工程杂志*, 2005, 25: 34—38