

文章编号: 1000-5013(2009)02-0166-05

重组 PDOR 基因的表达与纯化及部分酶学性质

罗菊香, 王晓霞, 方柏山, 夏启容

(华侨大学 工业生物技术福建省高等学校重点实验室, 福建 泉州 362021)

摘要: 将 *dhaT* 在 *E. coli* BL21(DE3) pLysS 中进行表达, 并对含有 His6 标记的 1,3-丙二醇氧化还原酶(PDOR)进行纯化. 重组 PDOR 反应的最适 pH 值为 10.0, 最适温度为 55 °C, 其以 1,3-丙二醇和 NAD^+ 为底物的表观米氏常数 K_m 值分别是 15.5, 0.23 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. 实验表明, Ca^{2+} , Mg^{2+} 和 Cu^{2+} 对酶活性有抑制作用, 而 Fe^{2+} , Na^+ , NH_4^+ 和 Mn^{2+} 对酶活性有促进作用; 1,3-丙二醇是 PDOR 适合的氧化底物.

关键词: 1,3-丙二醇氧化还原酶; 基因表达; 纯化; 酶学性质

中图分类号: Q 814; Q 786

文献标识码: A

1,3-丙二醇作为聚酯材料的单体, 在地毯和纺织材料领域应用前景非常广泛^[1]. 每年通过化学法合成的 1,3-PD 多达 10^5 t ^[2]. 然而, 化学法的生产工艺复杂、成本较高、产率低, 因此, 对环境友好的生物转化法逐渐成为国内外研究的热点. 由于微生物发酵过程中产生的一系列副产物, 严重影响 1,3-PD 浓度的提高, 而 1,3-PD 的理论最高得率也限制了微生物发酵法的进一步发展^[3]. 因此, 如何提高 1,3-丙二醇产率及其在发酵液中终浓度成为研究的重点^[4]. 通过传统的细胞发酵解决该问题的可能性不大, 较为可行的途径是使用纯化的酶^[2]. 在微生物代谢甘油生成 1,3-丙二醇的过程中, 1,3-丙二醇氧化还原酶(PDOR)是由 1,3-丙二醇操纵子上的 *dhaT* 基因编码的, PDOR 是将三羟丙醛转化为 1,3-丙二醇的关键酶, 但目前该酶仍然没有实现商品化^[5]. 本文对来源于 *K. pneumoniae* DSM 2026 编码 PDOR 的 *dhaT* 基因进行了表达, 并对 PDOR 进行纯化, 继而研究重组 PDOR 的部分酶学性质.

1 材料和方法

1.1 菌株

基因工程菌 *E. coli* DH5 α (pET-15b-*dhaT*), 由福建泉州华侨大学工业生物技术福建省高等学校重点实验室提供; 宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) pLysS.

1.2 培养基及菌种培养条件

种子培养基: LB(Lactose Broth)培养基, 氨苄青霉素为 $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 于 pH = 7.5, 37 °C 下培养过夜. 发酵培养基: 同种子培养基, 于 30 °C 下培养至对数生长期, 加入乳糖诱导, 诱导温度为 25 °C.

1.3 试剂和仪器

1.3.1 主要试剂 质粒回收试剂盒 E. Z. N. A. Plasmid Miniprep Kit(美国 OMEGA BIO-TEK 公司); 辅酶 NAD(美国 AMRESCO 公司); 氨苄青霉素(加拿大 BBI 公司); 蛋白质分子量标准# SM0431(美国 Fermentas 公司); 其他试剂为国产分析纯或生物试剂.

1.3.2 仪器 ÄKTA purifier 10/100 型纯化系统(美国 GE 医疗集团); WFZ756 型紫外可见分光光度计(上海光谱仪器公司); JY92-II 型超声细胞破碎仪(浙江宁波新芝仪器厂); 高度冷冻离心机(美国 Thermo 公司).

收稿日期: 2008-04-11

通信作者: 方柏山(1957-), 男, 教授, 主要从事生物反应工程和酶工程的研究. E-mail: fangbs@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家重点基础研究发展(973)计划项目(2007CB707804); 国家自然科学基金资助项目(20446004, 20676048); 福建省科技计划重点项目(2003J020)

1.4 方法

1.4.1 重组 PDOR 的表达 从培养的 *E. coli* DH5 α (pET-15b-dhaT) 中提取重组质粒 pET-15b-dhaT, 并转化至表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) pLysS. 挑取单菌落, 接入 5 mL 的 LB 培养基, 于摇瓶 (37 $^{\circ}$ C, 250 r \cdot min $^{-1}$) 中培养过夜. 然后, 按 1% 的接种量取 2 mL 活化的菌液接入 200 mL 的 LB 培养基中, 在 500 mL 摇瓶 (30 $^{\circ}$ C, 200 r \cdot min $^{-1}$) 中培养 2 h. 最后, 在培养物中加入乳糖, 其最终质量浓度为 2 g \cdot L $^{-1}$, 并于 25 $^{\circ}$ C, 200 r \cdot min $^{-1}$ 下继续培养 8 h.

1.4.2 重组 PDOR 的纯化 发酵液于 6 000 r \cdot min $^{-1}$, 4 $^{\circ}$ C 的离心机离心 10 min, 收集菌体. 用 20 mL 结合缓冲液(20 mmol \cdot L $^{-1}$ 磷酸钠, 0.5 mol \cdot L $^{-1}$ NaCl, 20 mmol \cdot L $^{-1}$ 咪唑, pH = 7.4) 和 2 mmol \cdot L $^{-1}$ 二硫苏糖醇(DTT) 重悬菌体, 菌悬液在 400 W 超声破碎 4 min. 破碎后的悬浮液于 8 000 r \cdot min $^{-1}$, 4 $^{\circ}$ C 下离心 20 min.

由于 PDOR 带有 His6 标记, 用 ÄKTA purifier 10/100 纯化系统和 HisTrap HP 柱对 PDOR 进行纯化. 样品上柱后用 5 个柱体积的结合缓冲液洗涤, 再用 5 个柱体积的洗脱液(20 mmol \cdot L $^{-1}$ 磷酸钠, 0.5 mol \cdot L $^{-1}$ NaCl, 500 mmol \cdot L $^{-1}$ 咪唑, pH = 7.4) 进行洗脱. 使用 HiPrep 26/10 Desalting 柱对洗脱液(50 mmol \cdot L $^{-1}$ 磷酸钠, 0.15 mol \cdot L $^{-1}$ NaCl, pH = 7.0) 进行脱盐.

1.5 分析方法

1.5.1 PDOR 酶活测定 采用初速度法测定 PDOR 的酶活力, 测定方法参见文[6]. 由于 3-HPA 不稳定且没有商品化, PDOR 酶活力测定使用逆反应. 在逆反应中, PDOR 氧化 1, 3-丙二醇生成 3-HPA. 因此, 定义一个酶活单位: 在 1 min 内催化 1 μ mol 底物 1, 3-丙二醇所需要的酶量. 逆反应的酶活乘以系数 3.95 即可转换为正反应的酶活^[7].

1.5.2 蛋白浓度测定及纯度检测 蛋白总浓度采用考马斯亮蓝法测定^[8], 蛋白纯度鉴定采用 SDS-PAGE^[9].

2 结果与分析

2.1 蛋白表达和纯化

提取 *E. coli* DH5 α 中的重组质粒 pET-15b-dhaT, 转化至表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) pLysS. 为了避免 PDOR 以包涵体形式表达, 诱导选择在 25 $^{\circ}$ C 的低温下进行.

将超声破碎离心得到的粗酶液上 Histrap HP 柱, 洗脱图谱如图 1 所示. 从图 1 可知, 含有 20 mmol \cdot L $^{-1}$ 咪唑的磷酸缓冲液可以将粗酶液中的杂蛋白(穿透蛋白)有效去除; 而经含 0.5 mmol \cdot L $^{-1}$ 咪唑的磷酸缓冲液洗脱后, 可以得到含 PDOR 的目标蛋白.

Histrap HP 柱对带有 His6 标记的重组 PDOR 的纯化结果, 如表 1 所示. 表 1 中, m 为总蛋白的质量, u 为总活力, ϵ 为比活力, k 为纯化倍数, η 为收率. 由表 1 可知, 纯化后酶的回收率是 50.0%, 纯化倍数是 2.42 倍, 纯化后酶的比活力高达 3.23 mkat \cdot g $^{-1}$.

通过 SDS-PAGE 电泳来检验得到的蛋白的纯度, 结果如图 2 所示. 图 2 中, M 为标准相对分子质量蛋白, 1 为粗酶液, 2 为洗脱的目标蛋白, 3 为样品过柱之后的穿透蛋白. 由图 2 可知, 泳道 1 样品中目

表 1 重组 PDOR 的纯化

Tab.1 Purification of recombinant PDOR					
纯化步骤	m/mg	$u/\mu\text{kat}$	$\epsilon/\text{mkat}\cdot\text{g}^{-1}$	k	$\eta/\%$
粗酶液	37.20	50	1.3	1.00	100.0
纯化的酶液	7.68	25	3.2	2.42	50.0

标蛋白含量较高, 而泳道 3 几乎没有目标蛋白. 因而, 目标蛋白基本上都与 HisTrapHP 柱上的镍结合

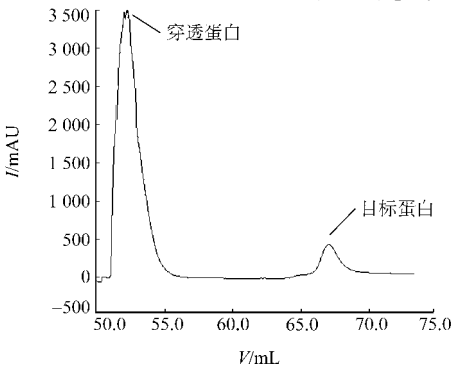


图 1 Histrap HP 的洗脱图谱
Fig.1 Elution graph of Histrap HP

了,泳道 2 除了目标蛋白,没有其他条带,得到了较纯的目标蛋白.

2.2 酶学性质

2.2.1 酶反应最适 pH 值 在不同 pH 值(7.0~ 12.0)和 45 ℃下,对经纯化的重组 PDOR 进行酶促反应以测定其最适 pH 值,结果如图 3 所示.所用缓冲液为 pH= 7.0~ 8.0 的 0.1 mol·L⁻¹磷酸钾缓冲液,pH= 9.0~ 12.0 的 0.1 mol·L⁻¹碳酸钾缓冲液.从图 3 可知,该酶的最适 pH 值约为 10.0.

2.2.2 酶反应最适温度 在 pH= 9.5,0.1 mol·L⁻¹的碳酸钾缓冲体系及不同温度(30~ 65 ℃)下进行酶促反应以测定其最适温度,如图 4 所示.由图 4 可知,PDOR 酶活力随温度升高逐渐增加,在温度约为 55 ℃时,PDOR 活力最大;当温度超过 60 ℃时,酶活力明显下降.

2.2.3 金属离子对酶相对活力的影响 在含有 10 mmol·L⁻¹的不同一价、二价金属离子的反应液中,考察金属离子对酶相对活力(*u_{rel}*)的影响,结果如表 2 所示.实验以不添加金属离子为对照(酶相对活力为 100%),反应液中还含有 0.1 mol·L⁻¹的 1,3-丙二醇,2 mmol·L⁻¹的 NAD⁺ 和 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH= 9.0).

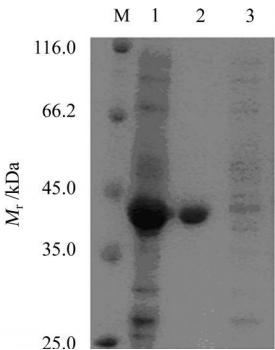


图 2 PDOR 纯化电泳图
Fig. 2 SDS-PAGE gel electrophoresis results of recombinant PDOR

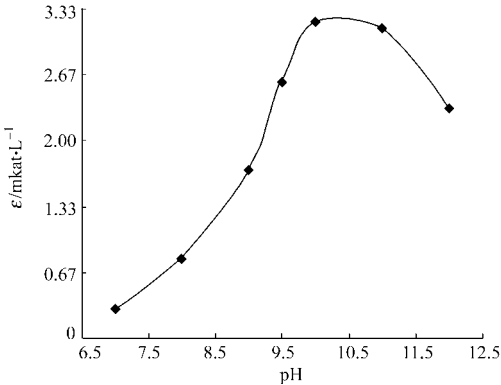


图 3 pH 值对重组 PDOR 活力的影响
Fig.3 Effect of pH on the activity of recombinant PDOR

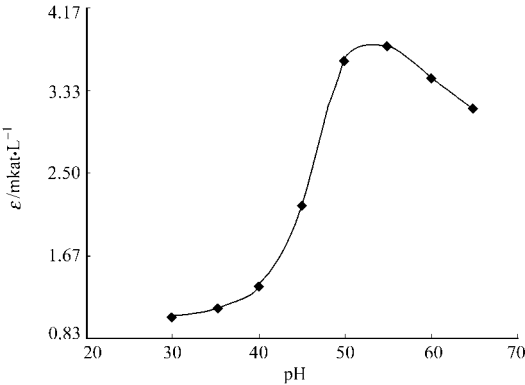


图 4 温度对重组 PDOR 活力的影响
Fig.4 Effect of temperature on the activity of recombinant PDOR

由表 2 可知,Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 对酶活力均有明显的抑制作用,Cu²⁺ 使酶的活性丧失,而 Fe²⁺, Na⁺, NH₄⁺ 和 Mn²⁺ 对酶的活性均有一定的促进作用.

表 2 阳离子对重组 PDOR 活力的影响

Tab.2 Effects of cations on the activity of recombinant PDOR

离子	对照	Fe ²⁺	Mn ²⁺	Li ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	NH ₄ ⁺	Cu ²⁺
<i>u_{rel}</i> / %	100	112	128	100	24	72	112	120	0

2.2.4 醇类物质对酶相对活力的影响 选择 0.1 mol·L⁻¹的甘油、1,2-丙二醇及其他结构相似的醇类作为底物,考察不同醇类物质对重组 PDOR 酶活的影响,结果如表 3 所示.实验以 1,3-丙二醇为对照(酶相对活力为 100%).由表 3 可知,PDOR 对氧化反应的底物 1,3-丙二醇的活性最大,其他依次是 1,4-丁二醇、正戊醇、正丙醇.

表 3 底物对重组 PDOR 活力的影响

Tab.3 Effects of substrates on the activity of recombinant PDOR

底物	<i>u_{rel}</i> / %	底物	<i>u_{rel}</i> / %	底物	<i>u_{rel}</i> / %
1,3-丙二醇	100.0	乙醇	0	正丙醇	3.7
甘油	0.9	甲醇	0	异丙醇	0
1,2-丙二醇	0	1,3-丁二醇	0	正戊醇	5.6
乙二醇	0	1,4-丁二醇	7.4	木糖醇	0

2.2.5 动力学参数的测定 在 pH 值为 9.5, 温度为 45 ℃的条件下, 按照米氏方程, 以初速度(v) 和底物的浓度(C)的倒数作 Lineweaver Burk 双倒数图, 结果如图 5 所示. 由图 5 可得到底物 1, 3 丙二醇、

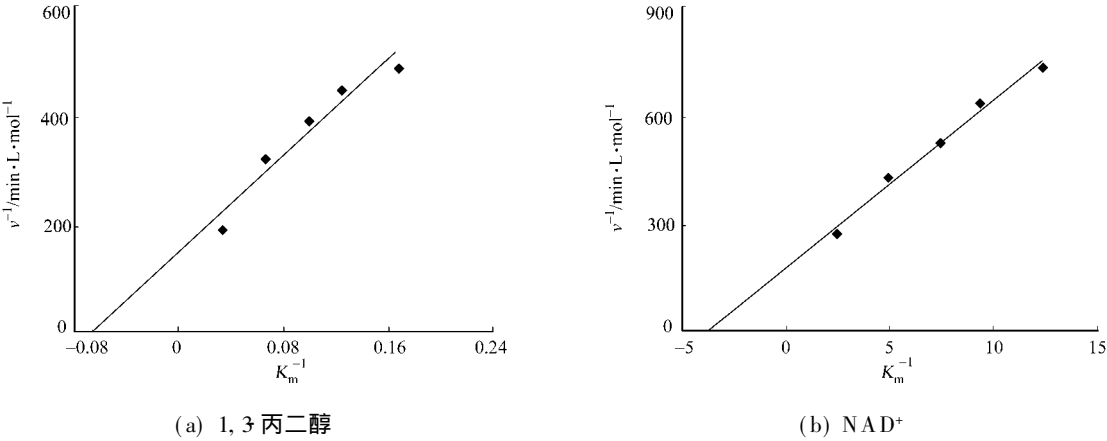


图 5 双倒数法测定 PDOR 的 K_m 值

Fig. 5 Lineweaver Bark plot for K_m of PDOR
NAD⁺ 的米氏常数 K_m 值, 分别为 15.5, 0.23 mmol · L⁻¹.

3 讨论

为目的基因提供稳定性保证的方法之一, 是在拥有兼容的氯霉素抗性、编码表达少量 T7 溶菌酶 (T7RNA 聚合酶天然抑制物) 的宿主菌中表达^[10-11]. T7 溶菌酶是一种双功能蛋白, 能够切割大肠杆菌细胞壁肽聚糖层^[12], 也可与 T7 RNA 聚合酶结合, 阻止转录^[13-14]. 所选用的表达宿主 BL21(DE3)pLysS 正是具有这种功能的噬菌体 DE3 的溶原菌, 且 pLysS 对细胞生长的影响很小, 积累溶菌酶的水平很低, 细胞不会裂解.

以 BL21(DE3)pLysS 为宿主菌, 在制备细胞抽提物时特别方便, 通过简单冻融, 细胞内的 T7 溶菌酶即可有效地裂解细胞. 在应用超声波破碎时, 不需要额外添加溶菌酶, 短时间的超声波就能达到较好的破碎效果. 同时, 质粒 pET-15b 带有 His6 标记, 使得表达所得到的 PDOR 带有 His6 标记, 这便于目的蛋白纯化.

采用乳糖代替 IPTG 作为诱导剂, 可延长低温诱导时间, 达到较好的诱导效果. 而且, 由于乳糖价格低廉、无毒, 对大规模发酵生产 PDOR 具有十分重要的意义.

实验结果表明, PDOR 基因在大肠杆菌中能高效地表达, 其表达量达到 1.3 mkat · g⁻¹, 是出发菌 *K. pneumoniae* DSM 2026(0.02 mkat · g⁻¹) 的 59.3 倍. 从酶的纯化效果来看, 纯化倍数不高, 这主要是因为 PDOR 过柱之后酶活力损失造成的, 今后将对纯化过程中减少酶活力的损失进一步研究.

从酶的酶学性质来看, 以 1, 3 丙二醇和 NAD⁺ 为底物的表观米氏常数 K_m 值分别是 15.5, 0.23 mmol · L⁻¹; 酶的最适 pH 值和温度分别是 10.0, 55 ℃; Fe²⁺, Na⁺, NH₄⁺ 和 Mn²⁺ 对酶的活性有促进作用, Ca²⁺, Mg²⁺ 和 Cu²⁺ 对酶的活性有抑制作用; PDOR 适合的氧化底物是 1, 3 丙二醇. 该基因工程菌所产 PDOR 与 *K. pneumoniae* DSM 2026 所产 PDOR 酶学性质接近^[6].

本研究应用乳糖作为诱导剂, 通过诱导表达重组菌, 获得了高表达量、高活性的 PDOR, 而且酶的分离纯化简单, 这将为体外生物合成 1, 3 丙二醇的研究发展产生重要的意义.

参考文献:

[1] WITT U, MULLER R J, AUGUSTA J, et al. Synthesis, properties and biodegradability of polyesters based on 1, 3 propanediol[J]. Makromol Chem Phys, 1994, 195: 793-802.
[2] NEMETH A, KUPCSULIK B, SEVELLA B. 1, 3 propanediol oxidoreductase production with *Klebsiella pneumoniae* DSM2026[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2003, 19: 659-663.
[3] BIEBL H, MENZEL K, ZENG A P, et al. Microbial production of 1, 3 propanediol[J]. Appl Microbiol Biotechnol

ol, 1999, 52: 289-297.

[4] BIEBL H, MARTEN S. Fermentation of glycerol to 1, 3-propanediol: Use of cosubstrates[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1995, 44: 15-19.

[5] SKRALY F A, LITTLE B L, CAMERON D C. Construction and characterization of a 1, 3-propanediol operon [J]. Environ Microbiol, 1998, 64: 98-105.

[6] 陈宏文. 生物法合成 1, 3-丙二醇的过程工程研究[D]. 天津: 天津大学, 2005.

[7] WANG W, SUN J B, HARTLEP M, et al. Combined use of proteomic analysis and enzyme activity assays for metabolic pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*[J]. Biotechnol Bioeng, 2003, 83: 525-536.

[8] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.

[9] 迟玉杰, 阎 丽. 实用蛋白质制备技术[M]. 哈尔滨: 哈尔滨大学出版社, 1998: 165-178.

[10] MOFFATT B A, STUDIER F W. T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase[J]. Cell, 1987, 49: 221-227.

[11] STUDIER F W. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system[J]. J Mol Biol, 1991, 219(1): 37-44.

[12] INOUE M, ARNHEIM N, STERNGLANZ R. Bacteriophage T7 lysozyme is an N-acetylmuramyl-L-alanine amidase[J]. J Biol Chem, 1973, 248(20): 7247-7252.

[13] ZHANG X, STUDIER F W. Mechanism of inhibition of bacteriophage T7 RNA polymerase by T7 lysozyme[J]. J Mol Biol, 1997, 269(1): 10-27.

[14] HUANG J, VILLEMAIN J, PADILLA R, et al. Mechanisms by which T7 lysozyme specifically regulates T7 RNA polymerase during different phases of transcription[J]. J Mol Biol, 1999, 293(3): 457-475.

Expression, Purification and Characterization of 1, 3-Propanediol
Oxidoreductase from *Klebsiella pneumoniae*

LUO Ju-xiang, WANG Xiao-xia,
FANG Ba-shan, XIA Qi-rong

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Fujian Province University, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: The dhaT gene was expressed with protein in *E. coli* BL21(DE3)pLysS and the His6 tagged 1, 3-propanediol oxidoreductase (PDOR) was purified. Optimal pH and temperature for purified enzyme were 10.0 and 55 °C, respectively. The apparent K_m values of the enzyme for 1, 3-propanediol and NAD^+ were 13.5 and 0.25 mmol • L⁻¹, respectively. The enzyme could be inhibited by metal ions including Ca²⁺, Mg²⁺ and Cu²⁺, while increased by Fe²⁺, Na⁺, NH⁴⁺ and Mn²⁺; PDOR showed high specificity for the alcohol substrate.

Keywords: 1, 3-propanediol oxidoreductase; expression; purification; characterisation

(责任编辑: 钱 筠 英文审校: 陈国华)