

张传丽,高明侠,董玉玮,等. 乙醛脱氢酶基因表达载体的构建及表达条件筛选[J]. 江苏农业科学,2018,46(7):40-42.
doi:10. 15889/j. issn. 1002-1302. 2018. 07. 009

乙醛脱氢酶基因表达载体的构建及表达条件筛选

张传丽^{1,2},高明侠^{1,2},董玉玮^{1,2},王 陶^{1,2},李同祥^{1,2},高兆建^{1,2}
(1. 徐州工程学院江苏省食品资源开发与质量安全重点建设实验室,江苏徐州 221008;
2. 徐州工程学院江苏省食品安全生物芯片检测技术工程实验室,江苏徐州 221008)

摘要:通过 PCR 扩增得到酿酒酵母乙醛脱氢酶基因 *ALDH* 长约 1.6 kb 的开放阅读框(open reading frame,ORF)序列,并将该序列与 pET30a(+)载体相连,得到 pET30a-*ALDH* 重组质粒,使其在大肠杆菌 BL21(DE3)中高效表达;对含有 pET30a-*ALDH* 重组质粒的工程菌进行表达条件分析,发现当异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)浓度为 1.0 mmol/L、诱导温度为 28 ℃、诱导表达时间为 6 h 时,*ALDH* 酶相对活性达到最高,为 30.2 U/mL。
关键词:酿酒酵母; pET30a-*ALDH*; 诱导表达; 表达条件;*ALDH*
中图分类号: Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)07-0040-03

3-羟基丙酸(3-hydroxypropionic acid,3-HP)是一种具有 3 个碳原子的非手性液态有机酸,是一种重要的化学中间体,是很多光学活性物质的合成前体,具有重大的开发价值^[1-2]。传统的化学合成法生产 3-HP 常具有能耗高、污染大、副产物多、分离困难等缺点,而生物方法生产 3-HP 则可以有效地避免这些不利因素,因此采用生物方法制备 3-HP 成为现在国际上最瞩目的研究热点之一^[3]。

乙醛脱氢酶(acetaldehyde dehydrogenase,ALDH)是一种广泛存在于原核生物和真核生物中的氧化还原酶,可将多种脂肪酸醛和芳香族醛氧化生成相应的脂肪酸和芳香族酸^[4-5]。ALDH 是微生物发酵生产 3-HP 过程中的关键酶之一,具有重要的研究意义。

本研究以酿酒酵母中的 *ALDH* 为对象,将从酿酒酵母中克隆到的 *ALDH* 基因连接到 pET30a(+)表达载体中,构建 *ALDH* 基因的原核表达载体,得到含有 pET30a-*ALDH* 重组质粒的转基因菌株,并分析不同培养条件下 *ALDH* 催化反应的活性差异。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 *E. coli* DH5α 和 BL21(DE3)感受态细胞购买自上海迈其生物科技有限公司;酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) W303-1A 来源于山东大学鲍晓明教授实验室; pMD18-T 克隆载体购买自宝生物工程(大连)有限公司; pET30a(+)表达载体来源于江苏沿海地区农业科学研究所。

收稿日期:2016-11-08
基金项目:江苏省产学研联合创新资金-前瞻性联合研究(编号:BY2014031);江苏省重点研发计划(编号:BE2016316);江苏省徐州市科技计划(编号:KC14SM094, XF13C027);徐州工程学院重点培育课题(编号:XKY2015104)。
作者简介:张传丽(1983—),女,山东枣庄人,博士,讲师,主要从事基因工程菌构建方面的研究。Tel:(0516) 83105383; E-mail: zhang0708@126.com。

1.2 酶和试剂

*Bam*H I、*Sac* I、T₄ DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、高保真 DNA 聚合酶、DL2000 DNA Marker 等购买自宝生物工程(大连)有限公司;琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒购买自北京艾德莱生物科技有限公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.3 培养基

YPD 培养基:酵母膏 1%(质量浓度),蛋白胨 2%(质量浓度),葡萄糖 2%(质量浓度);LB 培养基:酵母膏 0.5%(质量浓度),蛋白胨 1%(质量浓度),NaCl 1%(质量浓度)。

1.4 重组质粒 pET30a-*ALDH* 构建

酿酒酵母基因组提取采用溶菌酶法^[6];根据已知的酿酒酵母的 *ALDH* 基因序列^[5,7],设计合成 PCR 引物:Primer-F: 5'-ACCGGGATCC[ATG]TTCAGTAGATCTACGC-3';Primer-R: 5'-ACCGGAGCTC[TTA]CTCGTCCAATTTGGCACG-3'。Primer-F 中 *Bam*H I 识别位点用下划线表示,起始密码子用方框标出;Primer-R 中 *Sac* I 识别位点用下划线表示,终止密码子用方框标出。

以酿酒酵母基因组 DNA 为模板、以 Primer-F 和 Primer-R 为引物进行酿酒酵母 *ALDH* 基因克隆。其 PCR 反应体系见表 1。

表 1 酿酒酵母 <i>ALDH</i> 基因 PCR 反应体系	
添加物	添加量(μL)
基因组 DNA	2.0
Primer-F(5 mmol/L)	4.0
Primer-R(5 mmol/L)	4.0
5×PrimeSTAR Buffer(Mg ²⁺ plus)	10.0
dNTPs(2.5 mmol/L)	4.0
PrimeSTAR HS Polymerase(2.5 U/μL)	0.5
去离子水	25.5
总体积	50.0

PCR 反应程序为 98 ℃ 3 min;98 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 2 min,30 个循环;72 ℃ 10 min。

PCR 反应产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测后回收,与 pMD18-T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,菌落

PCR 筛选转化成功的 pMD18 - T - *ALDH* 重组质粒。其菌落 PCR 反应体系见表 2。

表 2 pMD18 - T - <i>ALDH</i> 重组质粒菌落 PCR 反应体系	
添加物	添加量(μL)
Primer - F(5 mmol/L)	2.0
Primer - R(5 mmol/L)	2.0
10 × PCR Buffer(Mg ²⁺ Free)	2.5
MgCl ₂ (25 mmol/L)	2.0
dNTPs(2.5 mmol/L)	2.0
TAKARA <i>Taq</i>	0.2
去离子水	14.3
总体积	25.0

PCR 反应程序为 94 ℃ 5 min;94 ℃ 45 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 2 min,28 个循环;72 ℃ 1 s。

pMD18 - T - *ALDH* 重组质粒回收后,进行 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切;酶切产物回收、纯化之后连接到同样双酶切、纯化后的 pET30a(+)载体上,连接产物转化宿主菌 DH5α 和 BL21(DE3),经 PCR 检测、酶切和测序验证 ORF 正确的克隆用于 *ALDH* 蛋白表达。

1.5 乙醛脱氢酶活力测定

ALDH 酶催化反应液成分见表 3。

表 3 <i>ALDH</i> 酶催化反应液成分	
添加物	添加量(mmol/L)
Tris - HCl(pH 值为 8.0)	100
巯基乙醇	1
KCl	100
NAD ⁺	100
乙醛	100

将 0.5 mL 酶液与 1 mL 上述反应液混合,反应体系在 25 ℃ 下保温 5 min,在 340 nm 波长下测其吸光度^[8-11]。

酶活单位定义:标准反应条件下,1 min 催化生成 1 mmol NADH 所需要的酶量被定义为 1 个活力单位(U)。

1.6 *ALDH* 在 *Escherichia coli* BL21(DE3)中的表达

将含重组质粒的大肠杆菌菌株接种单菌落于 LB 液体培养基(含卡那霉素 30 μg/L)中,37 ℃、180 r/min 培养 10 ~ 12 h 至菌液 *D*_{600 nm} 值达到 0.6 ~ 0.9 后,分别加入终浓度为 0.3、0.5、0.8、1.0 mmol/L 的异丙基 - β - *D* - 硫代吡喃半乳糖苷(IPTG),于 150 r/min 条件下进行 *ALDH* 酶蛋白诱导培养。诱导培养的温度分别为 28 ℃ 和 37 ℃,培养时间分别为 0、2、4、6、8 h。离心收集菌体,称量菌体湿质量。

1.7 大肠杆菌细胞的破碎

取 0.5 g 湿菌体,悬浮于含 2 mmol/L 的二硫苏糖醇的 10 mL 磷酸缓冲液中,冰上超声波破碎菌体(功率 400 W,工作 2 s,间隔 3 s,40 次),8 000 r/min、4 ℃ 离心 10 min,收集上清液,即为 *ALDH* 粗酶液^[9]。

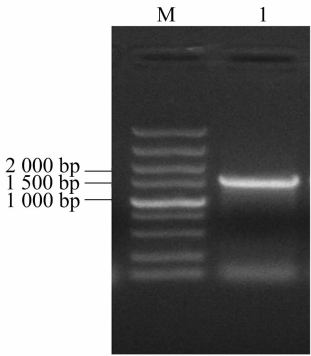
2 结果与分析

2.1 重组表达质粒的构建

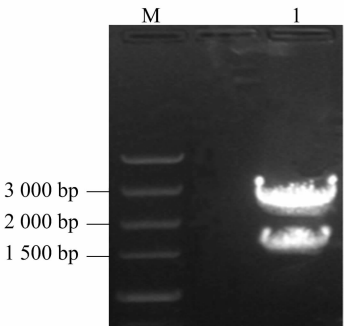
以酿酒酵母 W303 - 1A 基因组 DNA 为模板、以 Primer - F 和 Primer - R 为引物,进行酿酒酵母 *ALDH* 基因的 PCR 克隆,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,发现本试验中克隆得到的条带大小与预期的基因片段大小一致,约 1.6 kb,如

图 1 所示。

将上述 PCR 产物经琼脂糖凝胶回收后,连接到 pMD18 - T 克隆载体上,转化,并将得到的 pMD18 - T - *ALDH* 重组质粒进行 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切验证(图 2)。

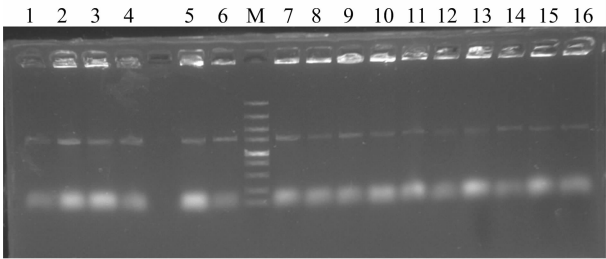


M—DL5000 DNA marker; 1—PCR 产物
图1 酿酒酵母 *ALDH* 基因 PCR 产物电泳图示



M—DL5000 DNA marker; 1—双酶切产物
图2 重组质粒 pMD18-T-*ALDH* 双酶切产物电泳图示

将测序正确的 pMD18 - T - *ALDH* 重组质粒用 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切,回收酶切产物,将回收产物与经 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切的 pET30a(+)表达载体相连,连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态和 BL21(DE3)感受态细胞,经菌落 PCR 筛选(图 3)后,将筛选得到的阳性单菌落送样测序,得到含有与文献报道的 *ALDH* 基因大小一致的 *E. coli* BL21(pET30a - *ALDH*) 重组菌株。



M—DL5000 DNA marker; 1~6—*E. coli* DH5α (pET30a-*ALDH*) 菌株; 7~16—*E. coli* BL21 (pET30a-*ALDH*) 菌株
图3 菌落 PCR 电泳图示

2.2 不同 IPTG 诱导培养浓度对乙醛脱氢酶活性的影响

挑取转化成功的 *E. coli* BL21(pET30a - *ALDH*) 菌株的少量菌体于 LB 液体培养基(含 30 μg/L 卡那霉素)中 37 ℃、180 r/min 培养 10 ~ 12 h 至菌液 *D*_{600 nm} 值达到 0.6 ~ 0.9 后,分别加入终浓度为 0、0.3、0.5、0.8、1.0 mmol/L 的 IPTG,然后于 28 ℃ 150 r/min 条件下诱导培养 6 h 后,测定诱导产生的 *ALDH* 酶蛋白的催化活性,结果如图 4 所示。以相同条件

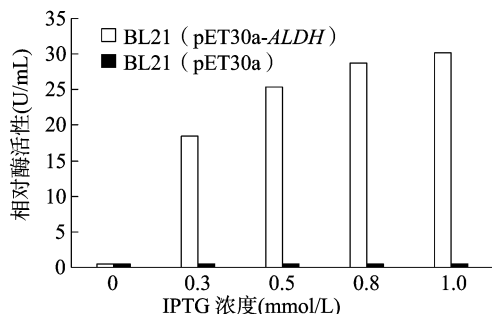


图4 不同 IPTG 诱导浓度对 ALDH 酶活性的影响

下培养的 *E. coli* BL21 (pET30a) 为对照。

从图 4 中可明显看出, *E. coli* BL21 (pET30a-ALDH) 菌株在 IPTG 诱导浓度增加时, ALDH 酶催化的相对活性也在逐步增大, 当 IPTG 诱导浓度为 1.0 mmol/L 时, ALDH 酶催化的相对活性是最高的, 可达 30.2 U/mL。

本试验中的对照菌株 *E. coli* BL21 (pET30a) 也检测到了一定的乙醛脱氢酶催化反应活性, 说明 *E. coli* BL21 (DE3) 细胞中是携带有醛脱氢酶基因的, 这与其他研究者的研究结果^[8,10]是一致的。

2.3 不同诱导时间对乙醛脱氢酶活性的影响

E. coli BL21 (pET30a-ALDH) 菌株于 37 ℃、180 r/min 条件下培养至 $D_{600\text{nm}}$ 值为 0.6~0.9 后, 加入终浓度 1.0 mmol/L 的 IPTG, 然后于 28 ℃、150 r/min 条件下分别诱导培养 0、2、4、6、8 h 后, 测定诱导产生的 ALDH 酶蛋白的催化活性, 测定结果如图 5 所示。以相同条件下培养的 *E. coli* BL21 (pET30a) 为对照。

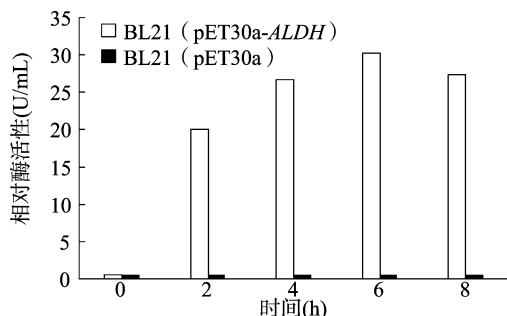


图5 不同诱导培养时间对 ALDH 酶活性的影响

从图 5 中可明显看出, 28 ℃、150 r/min 条件下诱导培养时间越长, ALDH 酶催化的相对活性越高, 诱导培养 6 h 时, ALDH 的相对酶活性达到最高, 高达 30.2 U/mL, 其中, 诱导培养 2 h 之内, ALDH 的相对酶活性增长最快; 6 h 后, 随着诱导时间的延长, ALDH 的相对酶活性反而有所下降, 其原因可能是 ALDH 酶活性半衰期较短, 当诱导时间较长时, 诱导表达的 ALDH 酶蛋白部分被降解或失活。

2.4 不同诱导温度对乙醛脱氢酶活性的影响

E. coli BL21 (pET30a-ALDH) 菌株于 37 ℃、180 r/min 条件下培养至 $D_{600\text{nm}}$ 值为 0.6~0.9 后, 加入终浓度 1.0 mmol/L 的 IPTG, 分别于 28 ℃、150 r/min 和 37 ℃、150 r/min 条件下诱导培养 6 h 后测定诱导产生的 ALDH 的酶催化活性。分析发现, 当诱导温度为 28 ℃时, ALDH 酶的相对活性明显高于诱导温度为 37 ℃时的相对活性(图 6), 其原因可能是诱导温度升高时, 产生的包涵体增多, 使得可溶性的 ALDH 浓度降低,

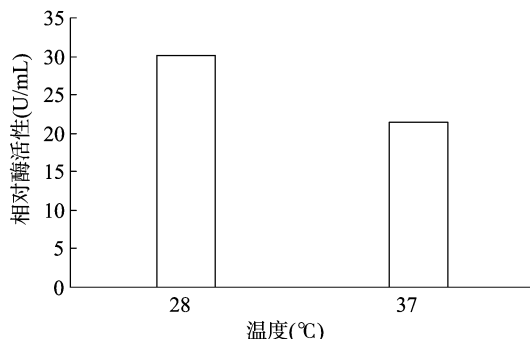


图6 不同诱导培养温度对 ALDH 酶活性的影响

或者 ALDH 酶对温度很敏感, 高温使部分酶失活或钝化了。

3 结论

本试验首先通过 PCR 技术从酿酒酵母基因组 DNA 中克隆得到长度约 1.6 kb 的乙醛脱氢酶基因的 ORF 序列, 并将其连入 pET30a(+) 表达载体中, 成功构建了酿酒酵母乙醛脱氢酶基因的原核表达载体; 同时对构建的酿酒酵母乙醛脱氢酶基因的原核表达载体在宿主细胞大肠杆菌 BL21 (DE3) 中的诱导表达条件进行筛选, 发现诱导表达的乙醛脱氢酶催化活性受到诱导物 IPTG 浓度、诱导表达时间和诱导温度的影响, 当 IPTG 浓度为 1.0 mmol/L、诱导时间为 6 h、诱导温度为 28 ℃时, 诱导表达出的乙醛脱氢酶相对酶活性最高, 可达 30.2 U/mL。目前本课题组正在对酿酒酵母 ALDH 基因进行突变试验, 期望能得到活性更高、耐适性更好的 ALDH 酶, 以提高微生物发酵生产 3-HP 的效率。

参考文献:

- [1] Gregory G L, López-Vidal E M, Buchard A. Polymers from sugars: cyclic monomer synthesis, ring-opening polymerisation, material properties and applications[J]. Chemical Communications, 2017, 53 (14): 2198-2217.
- [2] 张鸿达, 刘成, 高卫华, 等. 微生物发酵法生产 3-羟基丙酸的研究进展[J]. 化工进展, 2007, 26(1): 33-36.
- [3] 楼坚, 裘娟萍. 生物法合成 3-羟基丙酸的研究进展[J]. 工业微生物, 2006, 36(4): 56-60.
- [4] 李鑫, 毛跟年. 乙醛脱氢酶提取工艺与活性研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2011.
- [5] 黄瑞, 王璐, 沈微, 等. 酿酒酵母乙醛脱氢酶的克隆与表达[J]. 工业微生物, 2009, 39(1): 22-27.
- [6] 邢福国, 张培军, 谭训刚, 等. 酵母基因组的提取[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 210-212.
- [7] Lucas S, Copeland A, Lapidus A, et al. Direct Submission[DB]. Walnut Creek: US DOE Joint Genome Institute, 2009.
- [8] 胡南, 缪鑫听, 谈曙明, 等. 重组大肠杆菌生物转化甘油生产 3-羟基丙酸[J]. 生物技术, 2012, 22(1): 72-75.
- [9] 张传丽, 陈鹏. 银杏类黄酮生物合成关键酶基因 *GbUGT* 和 *GbFOMT* 的克隆、表达与功能分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2012.
- [10] 丁月, 朱建国, 李霜. 大肠杆菌醛脱氢酶基因在 *Klebsiella pneumoniae* 中的克隆及表达优化[C]//第六届全国化学工程与生物化工年会论文集. 北京: 中国化工学会, 2010.
- [11] 赵玉凤, 吴元欣. 乙醛脱氢酶基因克隆及酶功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.