

嗜碱耐盐芽孢杆菌乙醛脱氢酶基因 *aldC* 的克隆及组氨酸融合酶蛋白的表达

郑雪妮¹,高秀峰¹,李永生²

(1.四川大学华西基础医学与法医学院,四川 成都 610041;2.四川大学化学工程学院,四川 成都 610041)

摘要: 应用 PCR 扩增嗜碱耐盐芽孢杆菌乙醛脱氢酶基因 *aldC*,重组至原核表达载体 pET30b(+),转化大肠杆菌 BL21(DE3),诱导表达的重组乙醛脱氢酶在碳端含有一个组氨酸标签。SDS-PAGE 考察蛋白的表达量和亚基分子量,并对 K_m 值进行了考察。成功构建了 pET30b-*aldC* 原核表达质粒,诱导表达了亚基分子量约为 56 kDa 的组氨酸融合蛋白。乙醛脱氢酶活性比对照菌增加了约 3.5 倍, K_m 值为 2.874 mmol/L。成功克隆并诱导表达了含组氨酸标签的嗜碱耐盐芽孢杆菌乙醛脱氢酶基因 *aldC*。

关键词: 微生物;嗜碱耐盐芽孢杆菌 XJU-1;乙醛脱氢酶;基因重组;组氨酸标签;酶蛋白

中图分类号:Q93-3;Q78;Q75;Q813

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2012)03-0043-03

Cloning of Aldehyde Dehydrogenase Gene *aldC* and Expression of *Bacillus halodurans* XJU -1

ZHENG Xueni¹, GAO Xiufeng¹ and LI Yongsheng²

(1. Base Medicine & Forensic Medicine College of Sichuan University; 2. Chemical Engineering College of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: To clone aldehyde dehydrogenase gene *aldC* from *Bacillus halodurans* XJU -1 and express *aldC* fusion proteins with a His6-tag, *aldC* gene without terminator was amplified by PCR and cloned into plasmid pET30b (+). The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The transformant colony was then induced with IPTG and expressed a fusion proteins with 6× His at C terminus. The target protein was analysed by SDS-PAGE and K_m values was investigated. The gene *aldC* was amplified and cloned into plasmid pET30b (+) successfully. The molecular weight of the fusion enzyme as estimated by SDS-PAGE was approximately 56,000. The enzyme activity was 3.5 times than the contrast bacteria. The K_m values of the enzyme were 2.874mM for acetaldehyde. The recombinant plasmid was successfully constructed and the aldehyde dehydrogenase gene was expressed with His6 tag in *E. coli* BL21(DE3).

Key words: microbe; *Bacillus halodurans* XJU-1; aldehyde dehydrogenase; gene recombination; His-tag; enzyme proteins

乙醛是饮酒后乙醇在体内的初级代谢产物,而后会在乙醛脱氢酶的参与下生成次级代谢产物乙酸。50%的亚洲人缺乏有活性的 ALDH^[1],造成乙醛的累积而引起一系列健康问题^[2]。ALDH 可促进乙醛的代谢,降低饮酒对身体的危害。ALDH 无论是从动物肝脏还是微生物中提取,都面临着产量低、成本高的难题。因此,本课题利用大肠杆菌表达系统对嗜碱耐盐芽孢杆菌 XJU-1 *aldC* 基因的组氨酸融合蛋白进行表达和初步研究,以求找到解决问题的关键所在。

1 材料与方法

1.1 材料

嗜碱耐盐芽孢杆菌(*Bacillus halodurans* XJU-1),购自新疆大学生命科学院;大肠杆菌(*E.coli*)DH5 α 、BL21(DE3)和质粒 pET30b(+)为本实验室保存;LB 培养基(1%胰蛋白胨,0.5%酵母提取物,1%NaCl,pH 7.0)用于大肠杆菌培养;基因工程相关试剂均为 TaKaRa 公司产品。

1.2 嗜碱耐盐芽孢杆菌 *aldC* 基因的克隆

乙醛脱氢酶基因 *aldC* 的 PCR 引物见表 1。

PCR 体系:25 μ L PrimeSTAR^{HS} DNA 聚合酶,4 μ L 上下游引物(10 μ mol/L),30 ng 模板,补充灭菌超纯水至 50 μ L。第一轮 PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,52 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。第二轮 PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,

收稿日期:2012-01-04

作者简介:郑雪妮(1986-),女,陕西西安人,在读硕士研究生,研究方向:蛋白基因工程。

通讯作者:高秀峰,xiufengg@163.com;李永生,lysgxf2005@yahoo.com.cn。

表1 套式PCR引物

引物名称	序列(5'-3')
第一轮套式PCR引物	
引物 F1	GAAAGAATGGCAAACGGAAA
引物 R1	TAGCTCCCTCCTTCGTCA
第二轮套式PCR引物	
引物 F2	GGAATTCCATATGCAAAAAATCTCAACAAACGATA
引物 R2	CCCAAgCTTTAATCCATATTACCCAAACACTT

59 °C 40 s, 72 °C 2 min, 进行 4 个循环; 94 °C 1 min, 57 °C 40 s, 72 °C 2 min, 进行 4 个循环; 94 °C 1 min, 55 °C 40 s, 72 °C 2 min, 进行 4 个循环; 94 °C 1 min, 53 °C 40 s, 72 °C 2 min, 进行 25 个循环; 72 °C 10 min。

1 % 琼脂糖凝胶电泳分离, 回收后以 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切过夜。纯化后, 将其连接到同样酶切处理过的 pET30b 片段上。然后将连接产物转化 DH5 α , 卡那霉素筛选后经 PCR、酶切, 最后测序鉴定。

1.3 重组大肠杆菌 BL21-aldC 的诱导表达

将 pET30b-aldC 质粒转化 BL21(DE3), 构建工程菌 BL21-aldC。将该菌过夜培养后, 加入 IPTG (终浓度为 1 mmol/L) 诱导表达 6 h。4 °C、6000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 0.1 mol/L pH7.5 的磷酸缓冲液洗涤沉淀 2~3 次, 称湿菌重量, 每 1 g 菌加入 10 mL 细菌裂解缓冲液和 50 μ L 裂解酶 (终浓度为 100 μ g/mL), 4 °C 搅拌 20 min, 悬浮细菌。超声破碎菌液后 4 °C 离心 15 min, 收集上清液, 获得粗酶液。对照 BL21(DE3)、pET30b 转化菌同上处理, 备用。

1.4 组氨酸融合乙醛脱氢酶活性的测定

在合适的 pH 值范围内, ALDH 催化乙醛生成乙酸, 伴随 NAD⁺ 转换成 (340 nm)。在一定范围内, 340 nm 处的吸光度值和生成 NADH 的浓度成正比, 通过测定 NADH 的生成量, 计算出 ALDH 的活性。

测定体系: 1 mol/L Tris-HCl (pH7.0) 缓冲液 0.6 mL、0.5 mol/L ZnCl₂ 0.6 mL、0.005 mol/L β -NAD⁺ 0.4 mL、4 mol/L 乙醛 0.05 mL、1 mol/L β -巯基乙醇 (2-Me) 0.05 mL、酶液 0.2 mL。

1.5 组氨酸融合乙醛脱氢酶的 K_m 值

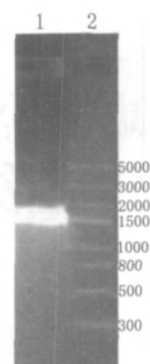
在最适反应条件下, 分别测定乙醛脱氢酶在 13.158 mmol/L、26.316 mmol/L、52.632 mmol/L、78.947 mmol/L、105.263 mmol/L 的乙醛浓度 [S] 下的反应速度 V。以 1/[S] 为横坐标, 1/V 为纵坐标作图, 计算 K_m 值。

2 结果与分析

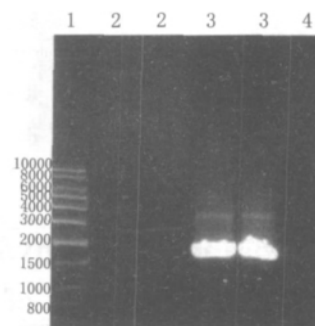
2.1 *Bacillus halodurans* XJU-1 *aldC* 基因的扩增

PCR 产物为 1500 bp 左右的 DNA 片段 (图 1)。

2.2 *Bacillus halodurans* XJU-1 *aldC* 基因的克隆鉴定



1. 内扩增产物; 2. Marker III

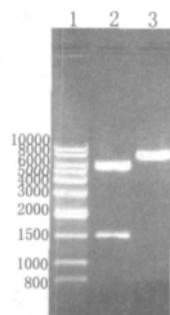
图1 *aldC* 基因套式 PCR 内扩增电泳图

1. 1kb plus Marker; 2. 以 pET30b-aldA 为模板的 PCR 产物;
3. 以 pET30b-dhaS 为模板的 PCR 产物; 4. 阴性对照

图2 PCR 鉴定

通过 PCR 鉴定 (图 2) 和双酶切鉴定 (图 3) 后, 确定目的片段已克隆入 pET30b(+) 载体, 测序证实重组成功。该基因与 *Bacillus halodurans* C-125 的 *dhaS* 基因同源性高达 99.46 %, 编码的氨基酸中有两个残基不同。

2.3 重组大肠杆菌 BL21-aldC 的诱导表达



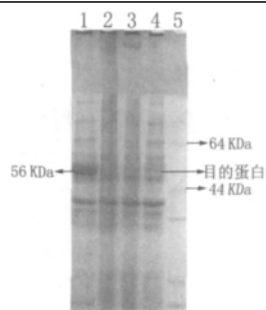
1. 1kb plus Marker; 2. 重组质粒双酶切

图3 酶切鉴定

SDS-PAGE 检测结果见图 4, 重组表达的乙醛脱氢酶亚基分子量约为 56 kD, 与预期符合, 且重组菌的目的蛋白条带较对照组深。

2.4 组氨酸融合乙醛脱氢酶活性的测定

工程菌 BL21-aldC、pET30b 转化菌、BL21 (DE3) 活性依次为 1413 U/L、448 U/L 和 422 U/L。工程菌 ALDH 活性分别为 pET30b 转化菌和 BL21(DE3) 的 3.2 倍和 3.3



1,5.Marker;2.BL21(DE3);3.pET30b 转化菌;4.重组菌

图4 重组蛋白 SDS-PAGE 电泳图

倍。

2.5 组氨酸融合乙醛脱氢酶的 K_m 值

最适反应条件下,组氨酸融合乙醛脱氢酶在 V1、V2、V3、V4 及 V5 下的 K_m 值分别为 3.059 mmol/L、3.201 mmol/L、2.702 mmol/L、3.164 mmol/L 和 2.244 mmol/L,平均值为 2.874 mmol/L。

3 讨论

本研究应用套式 PCR 扩增获得了与预期大小一致的 *aldC* 基因。测序后证明产物是在碳端带有组氨酸

标签的 *aldC* 基因,全长为 1536bp,编码 511 个氨基酸,并表达了与预期理论值相符的约为 56kDa 的融合蛋白。该酶蛋白活性是对照菌的 3 倍左右,对底物乙醛的 K_m 为 2.874 mmol/L,比法尔凯干酵母的 ALDH ($K_m=6.9$ mmol/L)^[3],酿酒酵母胞浆中的 ALDH ($K_m=59.3$ mmol/L)^[4]均低。说明不同来源的 ALDH 在结构和功能上有着相当差异,尤其是活性中心有显著差异。

本研究成功表达了含组氨酸标签的 *Bacillus halodurans* XJU-1 *aldC* 基因,为重组乙醛脱氢酶的进一步利用和纯化奠定了基础。

参考文献:

- [1] 罗怀荣,张亚平.乙醛脱氢酶 2(ALDH2)基因研究进展及其与饮酒行为的关系[J].遗传,2004,26(2):263-266.
- [2] Wojciech Jelski, Maciej Szmikowski. Alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) in the cancer diseases[J]. Clinica Chimica Acta, 2008,395:1-5.
- [3] 杨伟伟,高秀峰,包海生,等.法尔凯干酵母乙醛脱氢酶的提取和纯化研究[J].酿酒科技,2010(6):32-34.
- [4] 周百灵,高秀峰,吴晓婷,等.酿酒酵母胞浆中乙醛脱氢酶的提取和研究[J].酿酒科技,2009(6):28-30.

著名白酒专家高月明先生从事酿酒 60 周年 暨八十寿诞庆典在哈尔滨举行

本刊讯:全国著名白酒专家高月明先生从事酿酒 60 周年暨八十寿诞庆典于 2012 年 2 月 9 日在哈尔滨隆重举行。全国白酒界精英代表高景炎等,名优酒企业贵州茅台酒股份有限公司、泸州老窖股份有限公司等及黑龙江重点酒业企业的代表、业内主流媒体《酿酒科技》、《酿酒》、《华夏酒报》等代表、黑龙江酒业协会及有关部门的领导等和高月明先生的挚友和亲朋参加了庆典仪式。庆典仪式隆重而热烈,部分企业向高月明先生献上厚礼,以表达对老先生从业 60 周年的热烈祝贺和八十寿辰的衷心祝福。黑龙江酒业协会会长栗永清发表热情洋溢的讲话,高度评价和肯定了高月明先生对全国酒业和黑龙江酒业做出的巨大贡献,并向高月明先生表达了崇高的敬意。全国白酒专家高景炎代表

全国白酒界的老朋友向高月明先生表达了祝贺和祝福,全国白酒著名专家季克良等向高月明先生发去了贺电贺信。庆典呈现出隆重祥和的氛围。(小雨)



庆典仪式会场