

阴沟肠杆菌 *flavocytochrome C* 基因克隆及序列分析

林海龙^{1,2}, 付 畅¹, 郑福帅¹, 任南琪²

(¹哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 哈尔滨 150025;

²哈尔滨工业大学城市水资源与水环境国家重点实验室, 哈尔滨 150090)

摘要:为了克隆 *flavocytochrome C*, 研究其在阴沟肠杆菌产氢代谢中的作用和机制, 利用 CODEHOP 设计阴沟肠杆菌 NRRL B-414 的 *flavocytochrome C* 简并引物, 选用引物 FlacJ 扩增基因组 DNA, 分别得到约 1800 bp 左右的 PCR 产物, 该产物连接 pMD18-T 载体, 并克隆转化至 *E.coli* DH5 α 感受态细胞中, 经筛选后测序。该基因片段长 1740 bp, 编码 579 个氨基酸, G+C 含量为 58.51%, A+T 含量为 41.49%, 其在 GenBank 注册号为 GU565952。推导的 FlacJ 扩增产物氨基酸序列与 *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* ATCC 13047 的 *flavocytochrome C* 蛋白一致性最高达到 95%, 573 个氨基酸编码序列中仅相差 28 个氨基酸, 表明其为阴沟肠杆菌的 *flavocytochrome C* 基因。实验结果表明, 试验已成功克隆到阴沟肠杆菌的 *flavocytochrome C* 的部分基因, 不但增加了该基因的资源, 也可为其产氢代谢工程研究提供科学依据和工作基础, 同时也再次证明采用 CODEHOP 设计简并引物进行同源家族基因克隆成功率高。

关键词: CODEHOP; *flavocytochrome C*; 阴沟肠杆菌 NRRL B-414

中图分类号: X172

文献标志码: A

论文编号: 2011-1345

Cloning and Sequence Analysis of *flavocytochrome C* from *Enterobacter cloacae* NRRL B-414

Lin Hailong^{1,2}, Fu Chang¹, Zheng Fushuai¹, Ren Nanqi²

(¹College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025;

²State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090)

Abstract: In order to study the function of *flavocytochrome C* (*flac*) in the producing-hydrogen metabolism, the authors used CODEHOP to design the degenerate primers of *flavocytochrome C*, chose one pair of degenerate primers named FlacJ, then used *Enterobacter cloacae* NRRL B-414 genome DNA as template to make degenerate PCR, got about 1800 bp PCR product, they were transformed into the *E.coli* DH5 α through being linked with pMD18-T vector and sequenced after filtration. The fragment was 1740 bp long, the G+C content was 58.51%, the A + T content was 41.49%, and its NCBI accepted number was GU565952. Similarity alignment showed that the 1740 bp products were very similar to the *flavocytochrome C* genes, and shared 95% identity to the large subunit of *flavocytochrome C* from *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* ATCC 13047, and only had the difference of twenty-eight amino acids. Cloning this fragment would not only enrich the gene resources of *flavocytochrome C* genes, but also give the scientific warrant for the metabolic engineering research. And it was proved once again that using CODEHOP to design degenerate primers for cloning homologous family genes had a high success rate.

Key words: CODEHOP; *flavocytochrome C*; *Enterobacter cloacae* NRRL B-414

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金(20102329120002); 中国博士后科学基金项目(20090450983); 黑龙江省博士后基金项目(LBH-Z08197); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(11551141)。

第一作者简介: 林海龙, 男, 1977 年出生, 山东梁山人, 讲师, 博士, 研究方向为环境生物技术。通信地址: 150025 黑龙江省哈尔滨市利民开发区师大南路 1 号 哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, Tel: 0451-88060576, E-mail: linhail1234@126.com。

收稿日期: 2011-05-09, **修回日期:** 2011-06-13。

0 引言

氢具有能量密度高, 热转化效率高, 输送成本低, 无污染等诸多优点, 所以利用生物技术制氢已成为全球科学家们研究的热点之一^[1-3]。

为了提高氢产量, 科学家们已经分离得到很多产氢菌种。其中, 兼氧的肠杆菌属的 *Enterobacter cloacae*^[4] 产氢能力较好。例如, Kumar 分离到一株阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae* IIT-BT08), 在 36℃ 和 pH 6.0 的条件下产氢, 得到最大产氢速率为 29.63 mmol H₂/(g dry cell/h)^[4]。

虽然, 目前已获得了一部分高效产氢菌, 但其实际产氢能力与理论产氢能力还有一定的差距, 这已成为限制生物制氢产业化的瓶颈之一。而利用代谢工程的理论和技术提高现有菌种的产氢能力已经成为科学家们的共识。例如: 在产气肠杆菌异源过量表达甲酸脱氢酶^[5]; 构建失活甲酸氢酶抑制因子, 过量表达其激活因子^[6]; 构建失活甲酸氢酶抑制因子和吸氢酶小亚基的产气肠杆菌突变子^[7], 并且都取得了较好的效果。显而易见, 对现有高效产氢菌的代谢工程改造能够大幅提高其产氢能力。而在 *E. cloacae* 上的产氢代谢工程研究却鲜有报道。虽然已克隆了氢化酶 3 大亚基和甲酸氢酶抑制因子部分基因(待发表), 但还有相当部分与产氢代谢相关基因需要克隆。黄素蛋白 (flavocytochrome C) 是阴沟肠杆菌延胡索酸还原酶 (fumarate reductase) 的一个重要亚基, 而延胡索酸还原酶是阴沟肠杆菌厌氧呼吸的重要酶类之一, 是催化从 NADH 中接受 H, 把延胡索酸还原成琥珀酸反应的关键酶^[8]。延胡索酸还原酶对产氢是不利的^[9-10], 而且还是产氢代谢竞争副产物琥珀酸生成的关键酶^[10-11]。因此, flavocytochrome C 对阴沟肠杆菌的产氢代谢工程研究是非常重要的。

笔者采用已被广泛用来扩增家族基因^[12-18]的 CODEHOP^[12]法程序化设计简并引物, 探索同源扩增 *flavocytochrome C* 的通用引物, 获得阴沟肠杆菌 *flavocytochrome C* 序列, 进而为 *E. cloacae* NRRL B-414 的产氢代谢工程及其菌种改良研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 阴沟肠杆菌 NRRL B-414 (*Enterobacter cloacae* NRRL B-414) 阴沟肠杆菌 NRRL B-414 由美国农业研究菌种保藏中心 (Agricultural Research Service Culture Collection, NRRL) 惠赠。

1.1.2 仪器与试剂 PCR 扩增仪, 电泳仪, 凝胶成像分析系统, 离心机, 超净工作台等。实验所用 *Ex Taq* 酶、dNTP、pMD-18T 载体、感受态细胞 (*E. coli* DH5 α)、

IPTG、X-Gal 均购于 TaKaRa 公司。细菌基因组 DNA 提取纯化试剂盒、小量胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司, 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 简并引物设计 以 *E. cloacae* NRRL B-414 的 16S rDNA 序列为递交序列, 用 blast2.0 进行 16S rDNA 同源性比对, 获得与 NRRL B-414 相似性较高且在 NCBI 蛋白质数据库中存在其 flavocytochrome C 蛋白质序列的菌种。收集到 flavocytochrome C 的蛋白质序列, 并提交到 CODEHOP 在线软件设计引物。

1.2.2 *Flavocytochrome C* 部分基因克隆 用华舜基因组小量提取试剂盒提取其基因组 DNA, 具体方法见说明书, 获得的总 DNA 保存在 -20℃ 冰箱中。FlacJ 的 PCR 扩增反应条件为: 预变性 94℃, 5 min; 按 94℃→30 s; 61.5℃ 降到 58℃, 每次降 0.1℃→30 s; 72℃→2 min, 共 35 个循环; 最后在 72℃ 延伸 10 min。胶回收参照华舜小量胶回收试剂盒说明书进行。克隆过程参照宝生物工程(大连)有限公司 pMD18-T 载体说明书进行。PCR 产物与 pMD18-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 。经筛选和验证后送交上海生物工程技术服务有限公司测序。

1.2.3 统计分析 采用的数据库与软件主要有 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、Blockmaker (http://bioinformatics.weizmann.ac.il/blocks/blockmkr/www/make_blocks.html)、Bioedit、Primer Premier 5.0、CodeHop (<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/blocks/codehop.html>)。

2 结果与分析

2.1 引物设计结果

将收集到 flavocytochrome C 的蛋白质序列输入到 CODEHOP 在线软件中运行后获得多条引物, 选择得分高、temp 值接近的相距较远的正反向引物进行组合, 经过筛选后选用 1 对引物命名为 FlacJ (见表 1)。由表 1 可知, 采用 CODEHOP 软件设计的简并引物 5' 端大约 12~17 个左右的碱基全部是特异性的, 而 3' 端 11 个左右的碱基是包含简并碱基的, 而且每个引物的简并度都较小, FlacJF 的简并度仅为 128, FlacJR 的简并度仅为 16。

表 1 实验中选用的简并引物

引物名称	引物序列	简并度
FlacJF	TGACCAACGTGGCCGAGytnaaygcnyt	128
FlacJR	TGGCGCCGGTGC Aytgtrtctcraa	16

2.2 *Flavocytochrome C* 简并 PCR 的电泳结果及其序列分析

采用 CODEHOP 软件设计的引物进行简并 PCR, PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测的结果, 见图 1。由图 1 可知, 共得到 1 个特异 DNA 条带, 其中处于 1500~2000 bp 之间的 DNA 条带最亮, 并与目标条带大小相符(约 1800 bp), 没有出现非特异性条带, 表明此引物扩增特异性强。目标条带经回收、克隆、测序后, 获得长 1740 bp 的 DNA 序列, 编码 579 个氨基酸, G+C 含量为 58.51, A+T 含量为 41.49。该序列在 GenBank 注册号为 GU565952。其开放读码框及推倒的氨基酸序列, 见图 2。

E. cloacae NRRL B-414 的 *flavocytochrome C* 基因片段以 blastx 检索 GenBank 进行相似性比对结果, 见表 2。由表 2 可知, 其所编码的氨基酸序列与 *Enterobacter*、*Klebsiella*、*Erwinia* 属的某些菌种的 *flavocytochrome C* 有高度相似性, 其中与 *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* ATCC 13047 的 *flavocytochrome C* 的相似度最高为 95%, 得分也最高为 998, 相差 28 个氨基酸, 推测为 *Enterobacter cloacae* NRRL B-414 的 *flavocytochrome C* 基因片段。

对该基因进行了进化树分析, 结果见图 3。从图中可以看出, 同为肠杆菌科 *Enterobacter* 属、

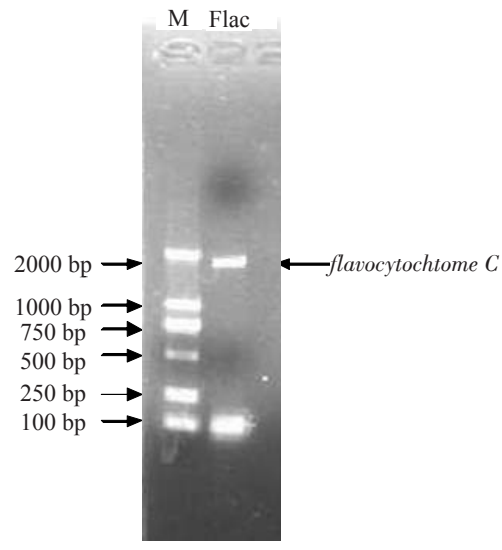


图 1 简并引物扩增 *flavocytochrome C* 基因片段电泳图

Klebsiella 属的 *flavocytochrome C* 处于分支 I, 它们之间的亲缘关系最近; 同为肠杆菌科的 *Dickeya* 属、*Rahnella* 属与气单胞菌科 *Tolumonas* 属的 *flavocytochrome C* 同为分支 II; 而同为肠杆菌科的 *Erwinia* 属的 *flavocytochrome C* 却分布在分支 III。这说明 *flavocytochrome C* 的进化起源不同, I 和 II 亲缘关系更近, 与 III 的亲缘关系较远, 而且 I 中的菌种基本为能够产氢的兼性细菌。

表 2 *E. cloacae* NRRL B-414 的 *flavocytochrome C* 部分基因 DNA 序列检索 NCBI 的同源性结果

Strain	序列一致性/%	位点一致性/%	得分	注册号
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> ATCC 13047	95	97	998	YP_003613734
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> NCTC 9394	94	97	994	CBK87360
<i>Enterobacter cancerogenus</i> ATCC 35316	92	96	976	ZP_05968290
<i>Enterobacter</i> sp. 638	90	95	965	YP_001177278
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> MGH 78578	84	90	887	YP_001335209
<i>Erwinia tasmaniensis</i> Et1/99	68	82	744	YP_001907858

3 结论

(1) 成功采用 CODEHOP 软件设计简并引物 FlacJ 同源克隆了阴沟肠杆菌 NRRL B-414 的 *flavocytochrome C* 基因片段, *flavocytochrome C* 基因片段长 1740 bp 的 DNA 序列, 编码 579 个氨基酸, G+C 含量为 58.51, A+T 含量为 41.49。该序列在 GenBank 注册号为 GU565952。

(2) 对 *flavocytochrome C* 进行了同源性分析, 该基因与 *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* ATCC 13047 的 *flavocytochrome C* 的相似度最高为 95%, 得

分也最高为 998, 573 个氨基酸编码序列中仅相差 28 个氨基酸。

(3) 这一基因片段的克隆可以为以后阴沟肠杆菌 NRRL B-414 的基因全长克隆奠定基础, 不但增加了该基因的资源, 也可为其基因敲除等代谢工程研究提供科学依据和工作基础。

4 讨论

本试验选用 CODEHOP 设计的引物进行扩增, 仅扩增出 1 条带, 且是目的条带。也在此说明 CODEHOP 设计的简并引物扩增特异性很高, 同时也


```

1   ATTTGGCGCGGTGCACTGGTCGTCGAAGAAGTAGAAGGAATGATCGGCAAGTTTGGGAAGCTGTGCGTCGCGCCATTCAGGCG
1   F G A G A L V V E E V E G M I G K F G E A V R R A I Q A
86  GGTTCGACGGCGTGGAAATCACGGGGCCAACACCTACCTGATTACGAGTTCTACTACCGAACTCTAACCGCGCGATGAC
29  G F D G V E I H G A N T Y L I Q Q F Y S P N S N Q R D D
170 GAGTGGGCGGCGACCGCGACAACCGCGAAGTTCCGCTGGCAGTGCTGGACATTACGCACAAAATGGTGCGCCAGTACGCG
57  E W G G S R D N R A K F P L A V L D I T H K M V R Q Y A
254 GATGATGCTTCATCATTTGGTTACCGCTTCTCCCTGAAGAGCTGGAAGTCCCGGCATCCGTTTGAAGACCATGTACCTG
85  D D A F I I G Y R F S P E E L E V P G I R F E D T M Y L
338 CTGGAGAACTGGCGCGCGCGGTGATTACCTGCACTTCTCCGTCGGTGCAACCTGCGTCTTCGATTGTGACACCCAG
113 L E K L A A R G V D Y L H F S V G A T L R P S I V D T Q
422 GACCCGACCCGCTCATCGAAAACTACGCGCATGCGTTTCAGAAACGCTGGCGCAGGTTCCGGTCATGGCGGTGGCGCGGTG
141 D P T P L I E K Y C A M R S E T L A Q V P V M G V G G V
506 GTGAATGCTTCAGACGTGAATGACGCGTGGACACCGTTACGACCTGATTGCCGTTGGCGCGCCACCATCGCTTATCGGAC
169 V N A S D V N D A L D H G Y D L I A V G R A T I A Y P D
590 TGGACAGACGCATCGCGGTGGCGAAAGCCTTGAGCTGTTTATGGACAGCACCAACCGGAGAACTGAACATCCAGAACCGG
197 W T D R I A A G E S L E L F M D S T K R E E L N I P E P
674 CTGTGGCGCTTCTCGCTGGTGAAAGCGATGATCGCGACATGAGCATGGCCGAGTCTAAATTCAAACCGGCACTTCGTCGAG
225 L W R F S L V E A M I R D M S M A E S K F K P G T F V E
758 AAAGTCAGGACGACGCTAACGAGCTGGTGATTAACGTCAGCCTGGAACCGACTGCATTGCGGACATCGCGCTGGCTCCGGC
253 K V Q D D A N E L V I N V S L E T D C I A D I A L A S G
842 CCAAGCGAAGACGTTGAGTTGTGACGCTTCGAAGAGATCCGTACCCGCATTCGATGCCAACCCCGCAGCTAGATGCC
281 P S E D V E F V T S F E E I R T R I L D A N T P H V D A
926 ATCACCGCGCAACCGCAGAGTGAAGCGGTGAAAAAGCGGTTTCTAAAGCGATGCTGAAATCAGTAAAGCGCTGGCGGCA
309 I T G A T S Q S E A V K K A V S K A M L K S S K A L A A
1010 GAGGAGGCGTTGACCGAACGAAACCCGACGCTGACGTGGTTGTCGTGGGACGCGCGTGCCGGTCTGGCGCGCGGATTT
337 E E G V D P N E T R S V D V V V V G S G G A G L A A A I
1094 CAGGCGACGACGAAAGCGCAAGCGTGCTGATTGTGCGAGAAATGCCAACCATCGGCGGTAAACCATCAAAGCGTCTGCCGGG
365 Q A H D E G A S V L I V E K M P T I G G N T I K A S A G
1178 ATGAACGCGCTGAAACTCGCTTCCAGCGCTGAAGGGTATTTCAGGACAGCAAGAACTGTTCTACCGAGAAAGCTGAAAGGC
393 M N A A E T R F Q R V K G I Q D S K E L F Y Q E S L K G
1262 GCGGTAACAAGAACACCCGAACTGCTGCGTCTTTGTCGAGAACGACCGGAAGCAATTGAGTGGCTGGCAACCCGCGGC
421 G G N K N N P E L L R R F V E N A P E A I E W L A T R G
1346 ATTATGCTAACGACATCACCAACCGCGGGGATGAGCATGACCGTACTACCGTCCAAAAGACGTTCTCGAGTAGCGGC
449 I M L N D I T T T G G M S I D R T H R P K D G S A V G G
1430 TATCTGATCAGCGTCTGGTGCTAACGTCACAAACGCAACATCGAGGTGATGCTGGATACCTCCGTCAGTGACATTATTTTC
477 Y L I S G L V R N V N K R N I E V M L D T S V S D I I F
1514 GAAACGCGCAAGTGACCGCGTGGCGCTGACGACGAGAGATGAAACCGTCATCGTGCAACCAAGCGTGATTGTGGCG
505 E N G E V T G V R L T T E E N E T V I V A T K S V I V A
1598 ACCGGCGCTTACGCCAACACCGAGATGGTGGTAAATACCGTCCGACCTGGAAGGATTCGTACCAACCAACATAAAGGG
533 T G G F S A N S Q M V V K Y R P D L E G F V T T N H K G
1682 GCCACGCGCGCGGTATCGCACTGCTGGAGGGCGTTCAGCTCGGCCACGTTGGTCAAT
561 A T G G G I A L L E G V Q L G H V G Q

```

图2 *E.colocae* NRRL B-414 的 *flavocytochrome C* 部分基因 DNA 序列和对应的氨基酸序列

证明 CODEHOP 设计简并引物的原理是成功的^[5]。从进化树分析来看,产氢肠杆菌的 *flavocytochrome C* 基因相似性较高,聚为一类,这说明这些高度相似性基因在产氢代谢中具有相同的功能。

在产氢肠杆菌代谢过程中, *flavocytochrome C* 是延胡索酸还原酶的重要亚基,而延胡索酸还原酶能催化从 NADH 中接受 H,把延胡索酸还原成琥珀酸的反应。这一反应的存在不但会把磷酸烯醇丙酮酸最终转

换为琥珀酸,降低用于产氢的丙酮酸数量,而且消耗用于乙醇生产的 NADH,降低乙醇的产量^[10]。同时,也是维持细胞体内氧化还原平衡的重要酶之一^[10-11]。所以, *flavocytochrome C* 在产氢代谢中有比较重要的作用。但研究也表明^[11],因为产氢代谢是较复杂的代谢网络工程,除 *flavocytochrome C* 比较重要外,还存在其他的一些酶对肠杆菌产氢细菌的产氢代谢调节起到重要的作用。

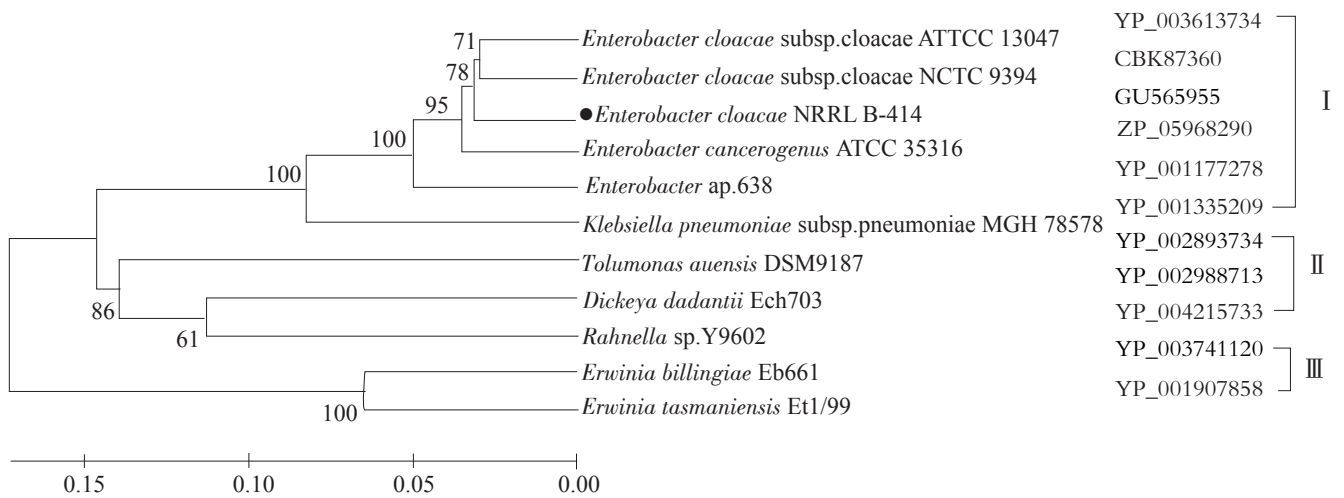


图3 *E. cloacae* NRRL B-414的flavocytochrome C与部分菌种flavocytochrome C的进化树分析

参考文献

- [1] 任南琪, 李建政. 生物制氢技术[J]. 太阳能, 2003, 2: 4-6.
- [2] 王海滨, 贾万利, 柳耀辉. 生物制氢的现状与发展趋势[J]. 生物技术, 2005, 15(4): 90-93.
- [3] 蒋志城. 生物发酵制氢技术的研究及进展[J]. 浙江化工, 2008, 39(2): 14-17.
- [4] Kumar N, Das D. Enhancement of Hydrogen Production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT08[J]. Process Biochemistry, 2000, 35: 589-593.
- [5] Lu Y, Zhao H X, Zhang C, et al. Alteration of hydrogen metabolism of ldh-deleted *Enterobacter aerogenes* by over-expression of NAD (+)-dependent formate dehydrogenase[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2010, 86: 255-262.
- [6] Yoshida A, Nishimura T, Kawaguchi H, et al. Enhanced Hydrogen Production from Formic Acid by Formate Hydrogen Lyase-Overexpressing *Escherichia coli* Strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 6762-6768.
- [7] Zhao H X, Ma K, Lu Y, et al. Cloning and knockout of formate hydrogen lyase and H₂-uptake hydrogenase genes in *Enterobacter aerogenes* for enhanced hydrogen production[J]. International Journal Hydrogen Energy, 2009, 34: 186-194.
- [8] Butler J E, Glaven R H, Esteve-Núñez A, et al. Genetic Characterization of a Single Bifunctional Enzyme for Fumarate Reduction and Succinate Oxidation in *Geobacter sulfurreducens* and Engineering of Fumarate Reduction in *Geobacter metallireducens*[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(2): 450-455.
- [9] Murarka A, Dharmadi Y, Yazdani S S, et al. Fermentative utilization of glycerol by *Escherichia coli* and its implications for the production of fuels and chemicals[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74: 1124-1135.
- [10] Hu H B, Wood T K. An evolved *Escherichia coli* strain for producing hydrogen and ethanol from glycerol[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, 391: 1033-1038.
- [11] Clark D P. The fermentation pathways of *Escherichia coli*, FEMS Microbiology Letter, 1989, 63: 223-234.
- [12] Rose T M, Schultz E R, Henikoff J G, et al. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences[J]. Nucleic Acids Research, 1998, 26(7): 1628-1635.
- [13] 任南琪, 林海龙, 李建政, 等. 用 CODEHOP 设计简并引物克隆 B49 乙酸激酶基因片段[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2007, 39(8): 1225-1229.
- [14] 余朝文, 蒋向辉, 许栋, 等. CODEHOP 在线简并引物设计与杉木 4CL 基因片段克隆[J]. 湖南林业科技, 2009, 36(6): 26-29.
- [15] 于寒松, 张继星, 马兰青, 等. 利用 CODEHOP 方法克隆高山红景天葡萄糖基转移酶基因 cDNA 片段[J]. 吉林农业大学学报, 2008, 30(2): 150-153.
- [16] 逢晓阳, 刑鑫, 刘国文, 等. 用 CODEHOP 设计简并引物克隆反刍月形单胞菌 K6 乙酸激酶基因片段[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(1): 102-106.
- [17] 孙辉, 祝建波. 利用简并引物克隆天山雪莲 *sikPIP* 基因片段及 RNAi 载体的构建[J]. 生物技术通报, 2010, 6: 107-112.
- [18] 陈彩芳, 温海深, 何峰, 等. 程序化设计的简并引物克隆半滑舌鳎 *CYP17* 基因[J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39(6): 1213-121.