

## 阴沟肠杆菌的Hy3AL和hycA部分基因 克隆及序列分析

林海龙<sup>1,2</sup>, 李伟光<sup>1</sup>, 任南琪<sup>1</sup>

<sup>1</sup>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;

<sup>2</sup>哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 哈尔滨 150025)

**摘要:**为了克隆氢化酶3大亚基(HyA3L)和甲酸氢酶抑制因子(hycA),研究其在阴沟肠杆菌产氢代谢中的作用和机制,笔者利用CODEHOP设计阴沟肠杆菌NRRL B-414的HyA3L和hycA简并引物,选用引物HyA3J和HycAJ扩增基因组DNA,分别得到约1500、150 bp的PCR产物,该产物连接pMD18-T载体,并克隆转化至*E.coli* DH5 $\alpha$ 感受态细胞中,经筛选后测序。推导的HyA3J扩增产物氨基酸序列与*Enterobacter cancerogenus* ATCC 35316的HyA3L蛋白一致性最高达到99%,仅有3个氨基酸的差异,表明其为阴沟肠杆菌的HyA3L;推导的HycAJ扩增产物氨基酸序列与*Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* ATCC 13047的HycA蛋白一致性最高达到92%,仅有4个氨基酸的差异,表明其为阴沟肠杆菌的hycA。通过以上分析可得出,采用CODEHOP程序设计的简并引物可信性强,阳性率高。阴沟肠杆菌NRRL B-414的氢化酶3大亚基和甲酸氢酶抑制因子部分基因的成功克隆,为获得氢化酶3大亚基和甲酸氢酶抑制因子的基因全长克隆奠定基础,不但可以增加这2个基因的资源,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。

**关键词:**CODEHOP;甲酸氢酶抑制因子;氢化酶3大亚基;阴沟肠杆菌NRRL B-414

中图分类号:X172 文献标志码:A 论文编号:2011-0431

### Cloning and Sequence Analysis of Large Subunit of Hydrogenase 3 and Formate Hydrogen Lyase Repressor of *Enterobacter cloacae*

Lin Hailong<sup>1,2</sup>, Li Weiguang<sup>1</sup>, Ren Nanqi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090;

<sup>2</sup>College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025)

**Abstract:** In order to study the function of formate hydrogen lyase repressor (hycA) and large subunit of hydrogenase 3 (HyA3) in the producing-hydrogen metabolism, the authors used CODEHOP to design the degenerate primers of hycA and HyA3L, and chose two pairs of degenerate primers named HyA3J and HycAJ respectively, then used *Enterobacter cloacae* NRRL B-414 genome DNA as template to make degenerate PCR, got about 1500 bp and 150 bp PCR product respectively, they were transformed into the *E.coli* DH5 $\alpha$  through being linked with pMD18-T vector and sequenced after filtration. Similarity alignment showed that the 1500 bp products were very similar to the large subunit of hydrogenase 3 genes, and shared 99% identity to the large subunit of hydrogenase 3 from *Enterobacter cancerogenus* ATCC 35316, and only had the difference of

**基金项目:**国家自然科学基金项目(30870037);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);哈尔滨师范大学青年学术骨干基金项目。

**第一作者简介:**林海龙,男,1977年出生,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。

**通讯作者:**任南琪,男,教授,博导,研究方向为环境生物技术。通信地址:150090 哈尔滨工业大学市政环境工程学院2614信箱, Tel: 0451-86282008, E-mail: rnq@hit.edu.cn。

**收稿日期:**2011-02-23, **修回日期:**2011-03-16。

three amino acids; the 150 bp products were very similar to the *hycA* genes, and shared 92% identity to the *hycA* from *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* ATCC 13047, and only had the difference of four amino acids. Cloning these two fragments would not only enrich the gene resources of *hycA* and large subunit of hydrogenase 3 genes, but also give the scientific warrant for the metabolic engineering research.

**Key words:** CODEHOP; formate hydrogen lyase repressor; large subunit of hydrogenase 3; *Enterobacter cloacae* NRRL B-414

## 0 引言

随着石油和煤炭等不可再生资源的日益消耗,寻找新能源的问题摆到了人们面前。而氢能具有能量密度高,热转化效率高,输送成本低,无污染等诸多优点,越来越受到人们的重视<sup>[1-5]</sup>。为了实现生物制氢技术的产业化和获得更高效的产氢菌,科学家们进行了大量的产氢菌分离工作,获得了大量的产氢发酵细菌。其中,产氢能力较高的基本上属于厌氧的梭菌属和兼氧的肠杆菌属。肠杆菌属中,*Enterobacter aerogenes*<sup>[6-7]</sup>和*Enterobacter cloacae*<sup>[8]</sup>产氢能力比较好。例如,Kumar等<sup>[8]</sup>从树叶榨出物中分离到1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 H<sub>2</sub>/(g dry cell/h)。

虽然,目前已获得了一部分高效产氢菌,但是其产氢能力不高,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:Lu等<sup>[9]</sup>在缺失乳酸脱氢酶的产气肠杆菌异源过量表达*Candida boidinii*的NAD依赖型甲酸脱氢酶(*fdh1*),研究结果表明:对乳酸脱氢酶基因的敲除使突变型氢产量增加了11.4%;而过量表达*fdh1*,重组子每摩尔葡萄糖的产氢量增加了86.8%。Yoshida等<sup>[10]</sup>失活甲酸氢酶抑制因子(*hycA*),过量表达其激活因子(*fhfA*),从而构建了过量表达甲酸氢酶的*E.coli* SR13菌株,该菌株的产氢率是野生型的2.8倍。Zhao等<sup>[11]</sup>构建了同时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,提升了其产氢效率。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*的产氢代谢工程研究中却鲜有报道。要进行相应的研究工作,必须要获得*E.cloacae*产氢代谢相关基因的序列信息。因此,相关基因的克隆工作是最基础和最重要的工作。

自Henikoff等<sup>[12]</sup>于1998年首次提出CODEHOP法程序化设计简并引物以来,该方法已被广泛用来扩增家族基因的研究工作<sup>[13-18]</sup>。而文献中尚未有采用此软件设计简并引物克隆氢化酶3大亚基和甲酸氢酶抑制因子基因的报道,而这2个基因在*E.cloacae*的产氢代

谢工程中非常重要。因此,笔者采用CODEHOP软件,探索设计简并引物克隆氢化酶3大亚基和甲酸氢酶抑制因子基因的方法,以期对*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

阴沟肠杆菌 NRRL B-414 (*Enterobacter cloacae* NRRL B-414) 获得于美国农业研究菌种保藏中心 (Agricultural Research Service Culture Collection, NRRL), 其保藏号为 NRRL B-414, 从奶品废水中分离得到。

### 1.2 试验方法

1.2.1 简并引物设计 以阴沟肠杆菌 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氢化酶 3 大亚基 (HyA3L) 蛋白质序列的菌种。氢化酶 3 大亚基的简并引物是根据 *Enterobacter aerogenes*、*Enterobacter sakazakii* ATCC BAA-894、*Enterobacter* sp. 638、*Escherichia coli* W3110、*Yersinia mollaretii* ATCC 43969 共 5 个菌种的 HyA3 蛋白质序列进行设计的。甲酸氢酶抑制因子 (*hycA*) 简并引物是根据 *Enterobacter aerogenes*、*Citrobacter koseri* ATCC BAA-895、*Enterobacter* sp. 638、*Enterobacter sakazakii* ATCC BAA-894、*Escherichia coli* CFT073、*Klebsiella pneumoniae*、*Salmonella enterica* 共 7 个菌种的蛋白质序列进行设计的。

1.2.2 基因组 DNA 提取及基因片段的 PCR 扩增 取少量 -70℃ 保存的菌液接种于 100 mL 的 LB 培养基中 37℃ 培养过夜。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。HyA3J 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。HycAJ 的 PCR 扩增反应条件为: 预变性 94℃, 5 min; 按 94℃→30 s; 61℃ 降到 54℃, 每次降 0.2℃→30 s; 72℃→2 min, 共 35 个循环; 最后在 72℃ 延

伸 10 min。

1.2.3 PCR 产物的纯化、克隆和检测 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 $\alpha$ 。转化产物 37°C 过夜, 经蓝白斑筛选, 挑选白色菌落, 进行菌落 PCR 验证得到阳性克隆, 并取 2 个阳性克隆送交上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.2.4 仪器与试剂 试验所用仪器有低温冷冻离心机, PCR 扩增仪, 电泳仪, 凝胶成像分析系统。试验所用 Ex Taq 酶、dNTP、pMD-18T 载体、感受态细胞 (*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ )、IPTG、X-Gal 以及 Marker DL2000 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技术有限公司, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.5 统计分析 本研究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](http://bioinformatics.weizmann.ac.il/blocks/blockmkr/www/make_blocks.html))、CodeHop (<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/blocks/codehop.html>)、Bioedit、Primer Premier 5.0。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物设计结果

将上述 5 个 HyA3 蛋白质序列和 7 个 hycA 蛋白质序列分别输入到 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, 经过筛选后各选用 1 对引物, 分别命名为 HyA3J、HycAJ (见表 1)。由表 1 可知, 采用 CODEHOP 软件设计的简并引物 5' 端大约 18 个左右的碱基全部是特异性的, 而 3' 端 10 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比较小, 如 HyA3JF 的简并度仅为 32, HyA3JR 和 HycAJR 为 64, HycAJF 最高为 128。

表 1 试验中所选用的简并引物

引物名称	引物序列	简并度
HyA3JF	CGTGAAGGTGAACCTACCTGCCNGARGTNGT	32
HyA3JR	TGTATCTCAGGGTGGGCCARTTNGCRTANGT	64
HycAJF	GGACCAGTGGCACATCTACTGYAAAYWSNYT	128
HycAJR	GGCCAGGGTCACGTAGATCATRAARTGNYCRAA	64

### 2.2 氯化酶 3 大亚基简并 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 1000~2000 bp 之间的 DNA 条带最亮, 并与目标条带大小相符 (约 1500 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,

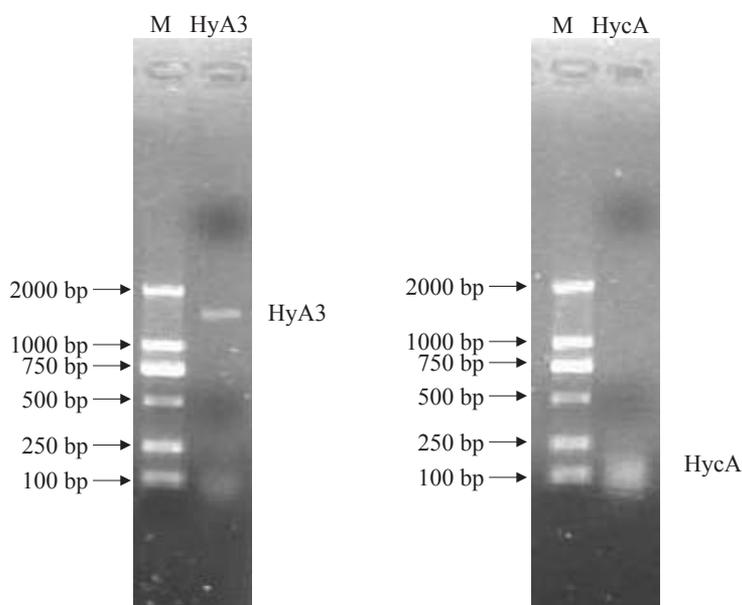


图 1 简并引物扩增氯化酶 3 大亚基和甲酸氢酶抑制因子基因片段电泳图

获得长1441 bp的DNA序列,编码481个氨基酸,G+C含量为61.68,A+T含量为38.32。该序列在GenBank注册号为GU565954。其开放读码框及推倒的氨基酸序列,见图2。

*Enterobacter cloacae* NRRL B-414的氢化酶3大亚基基因片段以blastx检索GeneBank进行相似性比对结果,见表2。由表2可知,克隆的菌株NRRL B-414所编码的氨基酸序列与*Enterobacter*、*Salmonella*、

```

1 ATTCGTGAAGGTGAACTACCTGCCAGAAGTGGTGGAGTTTCTTTACTACCAGCAGGGCGGCTGGCTGTCGGTGCTGTTC
1 F V K V N Y L P E V V E F L Y Y Q Q G G W L S V L F
80 GGTAACGACGAGCGCCAGCTGTGCGGCAATTACGCCGTGTACTACGTGATGTCGATGGAGCAGGGCGAGAAGTGCTGG
27 G N D E R Q L C G N Y A V Y Y V M S M E Q G E K C W
158 CTGACCGTGC GCGTCGAAGTCGATCCGAATAAGCCGGAATATCCGTCGGTTACGCCGCGGGTGCCTGCTGCCGTCTGG
53 L T V R V E V D P N K P E Y P S V T P R V P A A V W
236 GGCGAACGCGAAGTGC GCGACATGTACGGCCTGGTGCCGGTTCGGCCTGCCGGACGAGCGCCGCTGGTACTGCCGGAC
79 G E R E V R D M Y G L V P V G L P D E R R L V L P D
314 GACTGGCCGGATGAACTCTATCCGCTGCGTAAAGACAGCATGGACTACCGCCAGCGCCCGGCGCCGACCACCGACAGC
105 D W P D E L Y P L R K D S M D Y R Q R P A P T T D S
392 GAAACCTACGAGTTCATTAACGAGCTGGGCAGTAAAAAGAACAACGTGGTGCCGATTGGCCCGCTGCACGTCACCTCC
131 E T Y E F I N E L G S K K N N V V P I G P L H V T S
470 GACGAACCGGGCCATTTTCGCTGTTTCGTCGACGGCGAAAACATTATCGACGCCGACTACCGCCTTCTTACGTCCAT
157 D E P G H F R L F V D G E N I I D A D Y R L F Y V H
548 CGCGGCATGAAAAGCTGGCGGAAACCCGCATGGGCTACAACGAAGTGACGTTCCTTTCTGACCGCGTGTGCGGCATC
183 R G M E K L A E T R M G Y N E V T F L S D R V C G I
626 TGCGGCTTTGCCACAGCACCGCTTACACCACGTCGGTAGAAAACGGTATGGGGATCGTGGTGCCGGAACGTGCGCAG
209 C G F A H S T A Y T T S V E N G M G I V V P E R A Q
704 ATGATCCGCGCCATTCTGCTGGAGGTGGAACGTCTGCACTCGCACCTGCTAAACCTTGGCCTGGCCTGCCACTTCGTC
235 M I R A I L L E V E R L H S H L L N L G L A C H F V
782 GGTTTTGACTCCGGGTTTATGCAGTTCTTCCGCGTGCGTGAAGCCTCGATGAAGATGGCGGAGATCCTCACCGGGGCG
261 G F D S G F M Q F F R V R E A S M K M A E I L T G A
860 CGTAAACCTACGGGCTGAACCTGATCGGCGGGATCCGCCGCGACCTGCTGAAAGATGACATGATCCAGACCCGTCAG
287 R K T Y G L N L I G G I R R D L L K D D M I Q T R Q
938 CTGGCGCAGCAGATGCGCCGGGACGTGCAGGAGCTGGTGGATATGCTGCTCAGCACGCCAAACATCGAGCAGCGCACC
313 L A Q Q M R R D V Q E L V D M L L S T P N I E Q R T
1016 GTAGGGATTGGCCGCTTGTATCCGGAATTGCCCGCGACTTCAGCAACGTCGGCCCGATGGTGC GCGCCAGCGGCCAC
339 V G I G R L D P E I A R D F S N V G P M V R A S G H
1094 GCCCGCGACACCCGCGCCGATCACCCGTTTCGTCGGCTACGGCCTGCTGCCCATGACCGTGCACAGCGAGCAGGGCTGC
365 A R D T R A D H P F V G Y G L L P M T V H S E Q G C
1172 GACGTCATCTCACGTCTGAAAGTCCGCATTAACGAGGTGTTCACTGCCCTGAACATGATCGACTTCGGCCTCGATAAC
391 D V I S R L K V R I N E V F T A L N M I D F G L D N
1250 CTGCCGGGCGGTCCGCTGATGGTAGAGGGCTTACCTACATCCCGAACCGCTTCGCGCTCGGCTTTGCAGAAGCGCCC
417 L P G G P L M V E G F T Y I P N R F A L G F A E A P
1328 CGCGGGGACGATATCCACTGGAGCATGACTGGCGACAACCAGAAGCTCTACCGCTGGCGCTGCCGTGCGGCGACGTAC
443 R G D D I H W S M T G D N Q K L Y R W R C R A A T Y
1406 GCAAACCTGGCCACCCCTGAGATACAAATCGTCGACC
469 A N W P T L R Y K S S T
1 ATTGGACCAGTGGCACATCTACTGTAACCTCTCTGGTTCAGGGGATCACCTGTCAAAGCGCGTCTGCATCATGCGATG
1 L D Q W H I Y C N S L V Q G I T L S K A R L H H A M
80 AGTTGTGCGGCGCAAGGCGATATGCGCTTTGTCTCTTCGAACACTTCATGATCTACGTGACCCTGGCCAAT
27 S C A A Q G D M R F V L F E H F M I Y V T L A N

```

图2 氢化酶3大亚基和甲酸氢酶抑制因子部分基因DNA序列和对应的氨基酸序列

表2 氢化酶3大亚基部分基因DNA序列检索NCBI的同源性结果

菌株	序列一致性/%	位点一致性/%	得分	注册号
<i>Enterobacter cancerogenus</i> ATCC 35316	99	99	976	ZP_05970021
<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	96	99	952	YP_003366594
<i>Enterobacter cloacae</i> SCF1	97	99	948	ADO47258
<i>Klebsiella oxytoca</i>	96	99	947	ABR12482

*Citrobacter*、*Klebsiella*、*Escherichia* 属的某些菌种的氢化酶3大亚基有高度相似性, 其中与 *Enterobacter cancerogenus* ATCC 35316 氢化酶3大亚基的相似度最高为99%, 得分也最高为976, 仅相差3个氨基酸, 推测为 *Enterobacter cloacae* NRRL B-414 的氢化酶3大亚基基因片段。这也说明 *Enterobacter cloacae* NRRL B-414 的 HyA3L 与 *Enterobacter cancerogenus* ATCC 35316 的 HyA3L 相似性最高, 亲缘关系最近。

### 2.3 甲酸氢酶抑制因子简并PCR的电泳结果及其序列分析

采用 CODEHOP 软件设计的引物 HycAJ 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 DNA 条带, 其中处于 100~250 bp 之间的 DNA 条带, 并与目标条带大小相符 (约 150 bp), 没有出现非特异性条带, 同样也表明此引物扩增特异性较强。目标条带经回收、克隆、测序后,

获得长 151 bp 的 DNA 序列, 编码 50 个氨基酸, G+C 含量为 51.64, A+T 含量为 48.36。该序列在 GenBank 注册号为 GU565953。其开放读码框及推倒的氨基酸序列见图 2。

*Enterobacter cloacae* NRRL B-414 的甲酸氢酶抑制因子基因片段以 blastx 检索 GeneBank 进行相似性比对结果, 见表 3。由表 3 可知, 其氨基酸序列与 *Enterobacter*、*Citrobacter*、*Escherichia*、*Salmonella*、*Klebsiella* 属的某些菌种的甲酸氢酶抑制因子有高度相似性, 其中与 *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* ATCC 13047 甲酸氢酶抑制因子的相似度最高, 为 92%, 得分也最高为 99, 仅相差 4 个氨基酸, 推测为 *Enterobacter cloacae* NRRL B-414 的甲酸氢酶抑制因子基因片段。这也说明 *Enterobacter cloacae* NRRL B-414 的 HycA 与 *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* ATCC 13047 的甲酸氢酶抑制因子相似性最高, 亲缘关系最近。

表3 甲酸氢酶抑制因子部分基因检索NCBI的同源性结果

菌株	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	92	96	99	YP_003614547
<i>Enterobacter cancerogenus</i> ATCC 35316	88	94	95.5	ZP_05970025
<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	86	90	91.3	YP_003366590
<i>Escherichia coli</i> KO11	84	90	89.7	ADX49684

## 3 结论

(1) 笔者成功地采用 CODEHOP 软件设计简并引物 HyA3J 和 HycAJ, 分别同源克隆了阴沟肠杆菌 NRRL B-414 的氢化酶3大亚基和甲酸氢酶抑制因子基因片段, 氢化酶3大亚基长 1441 bp, 编码 481 个氨基酸, G+C 含量为 61.68, A+T 含量为 38.32, 其在 GenBank 注册号为 GU565954; 甲酸氢酶抑制因子基因片段长 151 bp, 编码 50 个氨基酸, G+C 含量为 51.64, A+T 含量为 48.36, 其在 GenBank 注册号为 GU565953。

(2) 对氢化酶3大亚基进行同源性分析, 该基因与 *Enterobacter cancerogenus* ATCC 35316 氢化酶3大亚基的相似度最高, 为 99%; 对甲酸氢酶抑制因子进行了同源性分析, 该基因与 *Enterobacter cloacae*

subsp. *cloacae* ATCC 13047 甲酸氢酶抑制因子的相似度最高, 为 92%。这 2 个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, 不但可以增加这 2 个基因的资源, 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

试验选用 CODEHOP 设计的引物进行扩增, 每个样品仅扩增出 1 条带, 且是目的条带, 并未出现非目标条带。这表明 CODEHOP 设计的简并引物扩增特异性很高, 这与 CODEHOP 简并引物设计的原理是密切相关的。CODEHOP 引物是由 3' 端核心简并区 (9~12 bp) 和 5' 端非简并夹板区 2 部分组成。3' 端核心简并区是由 3~4 个高保守氨基酸设计而成, 其与最相似

的目标模板结合并扩增;5'端非简并夹板区序列稍长(通常为20~30 bp,其长度与试验所需的退火温度相关,它最大程度地预测了保守氨基酸的编码序列),这段特异性序列起到减少简并度,增强特异性的作用,是CODEHOP方法优于传统简并PCR法的关键所在<sup>[12,16,18]</sup>。

氢化酶3大亚基基因家族比较保守,用BlockMaker分析了5种细菌氢化酶3大亚基基因,共获得13个保守区域,而CODEHOP软件也设计出大量的引物,这给引物筛选造成了一定的难度。本试验在选用引物时,采取选择得分高、temp值接近的、引物长度相等的、正反向引物相距较远的指导思想,各选取了1对引物进行简并扩增,且取得了较好的结果。这表明这一指导思想非常有效。研究表明,用CODEHOP软件设计简并引物进行基因的同源克隆准确率高,且方便、有效。

### 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] 王海宾,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] 傅秀梅,王亚楠,王长云,等.生物制氢-能源、资源、环境与经济可持续发展策略[J].中国生物工程杂志,2007,27(2):119-125.
- [5] 王亚楠,傅秀梅,刘海燕,等.生物制氢最新研究进展与发展趋势[J].应用与环境生物学报,2007,13(6):895-900.
- [6] Yokoi H, Tokushige T, Hirose J, et al. Hydrogen Production by Immobilized Cells of *Enterobacter aerogenes* Strain HO-39[J]. J. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1997,83(5):481-484.
- [7] Tanisho S, Suzuki Y, Wakao N. Fermentative Hydrogen Evolution by *Enterobacter aerogenes* Strain E82005[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 1987,12(9):623-627.
- [8] Kumar N, Das D. Enhancement of Hydrogen Production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT08[J]. Process Biochemistry, 2000,35:589-593.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Zhao H X, Ma K, Lu Y, et al. Cloning and knockout of formate hydrogen lyase and H<sub>2</sub>-uptake hydrogenase genes in *Enterobacter aerogenes* for enhanced hydrogen production[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2009,34:186-194.
- [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.