

菌 B49 乙醛乙醇脱氢酶基因克隆中的引物设计

林海龙,任南琪,郑国香,张 坤,段志洁

(哈尔滨工业大学 市政环境工程学院,哈尔滨 150090, E-mail: linhai234@126.com)

摘 要: 为研究乙醛乙醇脱氢酶基因及其在乙醇发酵生物制氢中的重要作用,采用 clustalw 对 12 个菌种的乙醛乙醇脱氢酶蛋白质序列进行多重比对分析,共得到 6 个保守区,以这 6 个保守区设计引物,共选用 9 对简并引物,命名为 ADHJ1、ADHJ2、ADHJ3、ADHJ4、ADHJ5、ADHJ6、ADHJ7、ADHJ8、ADHJ9。用这 9 对引物对 B49 总 DNA 进行简并 PCR,共有两对引物的扩增得到预期的结果。其 PCR 产物经 pMD18-T 克隆转化至大肠杆菌 DH5 α 中,经筛选后测序。结果表明,这两段 DNA 推导的氨基酸序列与 *Bacillus cereus* 的乙醛乙醇脱氢酶基因的相似性最高为 69%,证实所克隆的序列为乙醛乙醇脱氢酶基因 DNA 片段。尽管采用 clustalw 软件设计 ADHJ5 简并引物的简并度分别达 1048576 倍和 98304 倍,引物长度分别为 30 bp 和 26 bp,但扩增结果特异性强。说明采用 clustalw 软件设计的简并引物可信度高,同时,也说明简并度不是合理评判简并引物质量的标准。

关键词: 乙醛乙醇脱氢酶基因; clustalw; 生物制氢细菌; 简并引物

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0367-6234(2008)06-0865-05

Primers' design of cloning aldehyde-alcohol dehydrogenase fragment for bacteria B49

L IN Hai-long, REN Nan-qi, ZHENG Guo-xiang, ZHANG Kun, DUAN Zhi-jie

(School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: In order to clone the aldehyde-alcohol dehydrogenase gene and study its important role in the ethanol fermentation bio-hydrogen, multiple alignment analyses were conducted on twelve aldehyde-alcohol dehydrogenase protein sequences of different bacteria using clustalw software, and six blocks were obtained. Then degenerate primers were designed according the six blocks, and nine degenerate primers of the aldehyde-alcohol dehydrogenase gene were acquired, named ADHJ1, ADHJ2, ADHJ3, ADHJ4, ADHJ5, ADHJ6, ADHJ7, ADHJ8 and ADHJ9. The high-biohydrogen bacteria B49 genome DNA as the template and nine degenerate primers as primers were used to degenerate PCR, two of them achieved anticipative results. Their PCR products were transformed into *E. coli* DH5 α through being linked with pMD18-T vector and sequenced after filtration. Similarity alignment showed that the products were the most similar to the aldehyde-alcohol dehydrogenase gene of *Bacillus cereus*, and the identities was 69%. The results indicate that these degenerate primers designed by the clustalw software can be used to obtain the specific gene fragment. Although the degeneracy of ADHJ5 primers are 1048576 and 98304 respectively, the length of ADHJ5 primers are 30 bp and 26 bp, the PCR result is very good. The results show that these degenerate primers designed by this software can be used to obtain specific PCR products.

Key words: aldehyde-alcohol dehydrogenase; clustalw; biohydrogen bacteria; degenerate primers

收稿日期: 2005-08-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30470054)。

作者简介: 林海龙 (1977—), 男, 博士研究生;

任南琪 (1959—), 男, 特聘教授, 博士生导师。

近年来,生物制氢技术因其可以克服常规制氢方法的诸多缺陷而倍受关注^[1]。为了实现生物制氢产业化,国内外研究者进行了大量的菌种分离工作,获得了许多的产氢发酵细菌^[2-7]。其中产氢菌

Ethanoligenens harbinense B49是本实验室从生物制氢反应器的乙醇型发酵活性污泥中分离出一株高产氢乙醇型发酵菌株,其酵解葡萄糖的主要发酵产物为乙醇、乙酸、H₂、CO₂和少量乳酸^[7],其中乙醇在末端产物中占较大比重.该菌株是新发现的哈尔滨产乙醇杆菌属^[4]的典型代表菌株之一.

根据现有丙酮酸脱氢产氢途径^[8]和 NADH 产氢途径^[9],乙醇末端代谢产物的生成会大量消耗 NADH,从而减少 NADH途径的产氢量.而目前在 *E. harbinense* B49的静态实验中却发现末端产物中乙醇的含量与产氢量在一定范围内是成正相关的.这一现象与产氢理论是存在矛盾的.为了研究乙醇代谢途径与产氢代谢途径的关系,合理解释 *E. harbinense* B49末端产物中乙醇的含量与产氢量在一定范围内是成正相关的现象^[10],通过基因敲除和过量表达技术从分子水平研究乙醛乙醇脱氢酶 (*AdhE*, 即乙醇生成的关键酶基因)在产氢代谢中的作用是非常必要和急需解决的工作.本文采用 clustaw1软件进行保守区分析,以获得的保守区设计简并引物来同源克隆菌 *E. harbinense* B49的乙醛乙醇脱氢酶基因.

1 实 验

1.1 试验材料

1.1.1 产氢菌 B49

林明^[7]从产氢反应器的厌氧活性污泥中分离到高效产氢菌 B49,其 16S rDNA 序列在 EMBL 核酸数据库中注册号为 AF481148,在中国微生物菌种保藏中心的保藏号为 CGMCC1153 采用文献 [7] 提出的产氢菌富集培养方法,获得 B49的纯培养物.

1.1.2 仪器与试剂

低温冷冻离心机、PCR 扩增仪、电泳仪、凝胶成像分析系统. 实验所用 Ex Taq 酶、dNTP、pMD18 - T载体、感受态细胞 (*Escherichia coli*

JM109)、IPTG、X - Gal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 简并引物的设计

以 B49菌株的 16S rDNA 序列为递交序列,用 blast2.0进行 16S rDNA 同源性比对,获得与 B49相似性较高菌种的 ADH蛋白质序列共 12个 (表 1).

这 12个乙醇脱氢酶序列经 clustalw 多序列比对分析,找出 10块无间隙高度保守的氨基酸序列区 (Blocks). 把这十个保守区域的蛋白质序列转换为简并核苷酸序列,并计算简并度. 选用了 6个比较保守的区域 (图 1). 然后用 Primer premier5.0软件将 6个保守的区域翻译成简并引物. 这 6个保守区的位置、蛋白质序列、翻译的 DNA 简并序列和简并度见表 2 依据简并引物简并度尽可能小、上下游引物之距离尽可能大的原则,选取这 6个保守区简并引物组合成引物对,共得到 9对简并引物 (表 3).

表 1 用于对比分析的 12个菌种 adhE 蛋白

所用菌种代号	选用 adhE 菌种	所用菌种代号	选用 AdhE 菌种
C1	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	E7	<i>Erwinia carotovora</i>
C2	<i>Clostridium perfringens</i> str 13	E8	<i>Escherichia coli</i> K - 12 W3110
C3	<i>Clostridium tetani</i> E88	E9	<i>Escherichia coli</i> K - 12 MG1655
B4	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	E10	<i>Escherichia coli</i> O157 EDL933
B5	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10987	P11	<i>Photorhabdus lum inescens</i>
B6	<i>Bacillus anthracis</i> str <i>Ames Ancestor</i>	S12	<i>Shigella flexneri</i> 301

表 2 6个保守区的位置、蛋白质和核苷酸序列

保守区	保守区位置	保守区蛋白质序列和翻译的核苷酸序列	简并度
1	72 - 79	蛋白质 E D K I (V, C) I K N H (I, M) 核苷酸 5 'G A R G A Y A A R D K N A T H A A R A A Y M W 3 '	9216
2	123 - 132	蛋白质 T N P T S T A (T) I (M) F K 核苷酸 5 'A C N A A Y C C N A C N W S N A C N R C N A I N T T Y A A R 3 '	1048576
3	426 - 433	蛋白质 P S L (F) T L G C G 核苷酸 5 'C C N W S N Y I N A C N Y I N G G N T G Y G G 3 '	131072
4	585 - 592	蛋白质 K (R, N) F M (L) D I R K R 核苷酸 5 M R N T T Y H T I N G A Y A T H M G N A A R M G 3 '	73728
5	725 - 733	蛋白质 M (I) A F A (S) N A F L G 核苷酸 5 'A T I N G C N T T Y D S N A A Y G C N T T Y Y I N G G 3 '	98304
6	852 - 860	蛋白质 D Q C T G (V, T) A N P R (K) 核苷酸 5 'G A Y C A R T G Y A C N R V N G C N A A Y C C N M R 3 '	98304

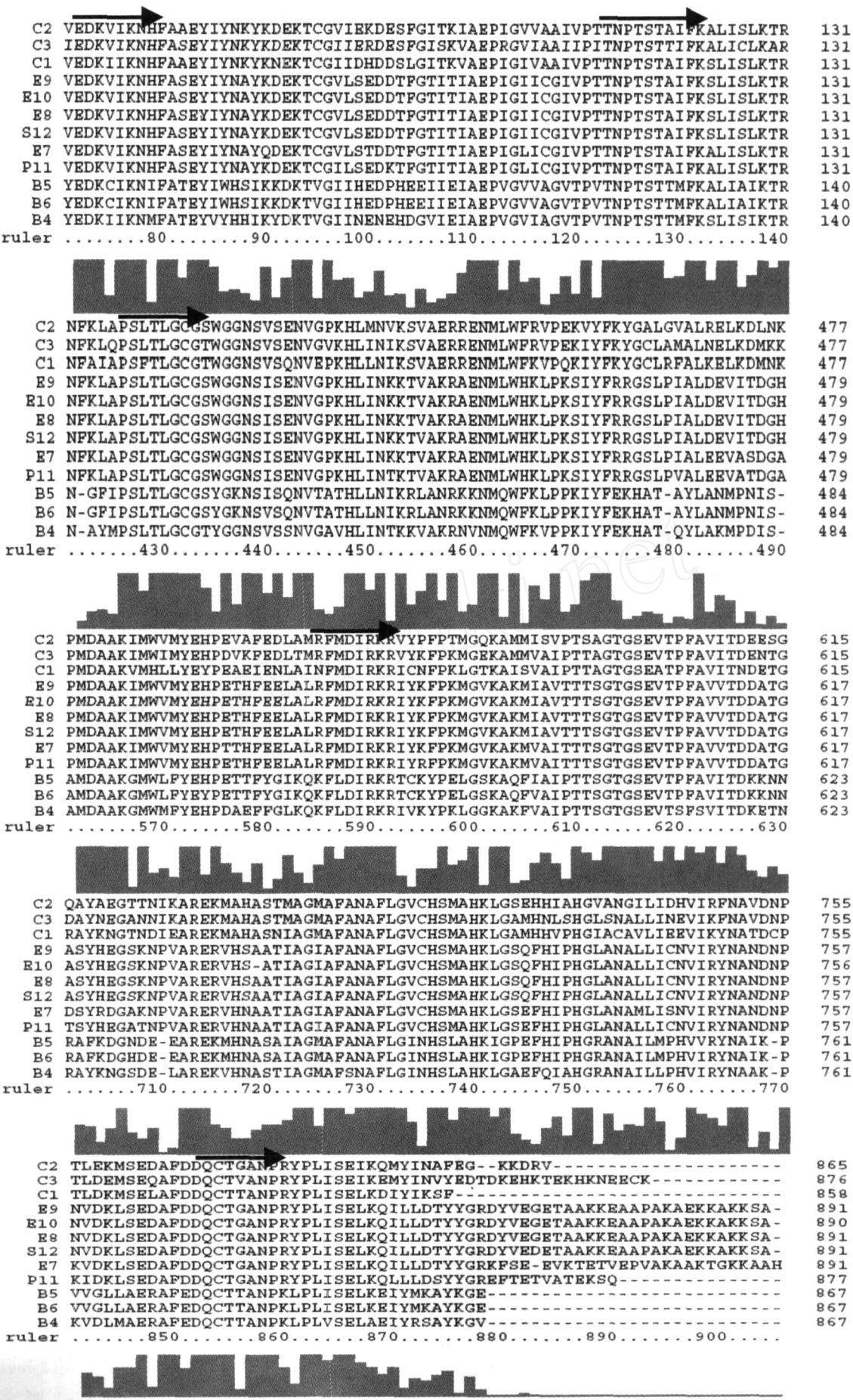


图 1 12 个菌株比对后获得的 6 个保守区

表 3 设计的简并引物

引物 名称	引物序列		简并度	扩增 长度
	位置			
ADHJ1	Forward	72 5 'GARGA YAARDKNA THAARAA YMW3 '	9216	2364
	Reverse	860 5 'YKN GGR TIN GCNB YN GIRCA YTGR TC3 '	98304	
ADHJ2	Forward	72 5 'GARGA YAARDKNA THAARAA YMW3 '	9216	1983
	Reverse	733 5 'CCNARRAANGCR TIN SHRAANGCNA T3 '	98304	
ADHJ3	Forward	72 5 'GARGA YAARDKNA THAARAA YMW3 '	9216	1560
	Reverse	592 5 'CKYTINCKDA IR TCNADRAANYK3 '	73728	
ADHJ4	Forward	72 5 'GARGA YAARDKNA THAARAA YMW3 '	9216	1086
	Reverse	434 5 'CCRCANCCNARNGINARN SWNGG3 '	131072	
ADHJ5	Forward	123 5 'ACNAA YCCNACNW SNACNRCNA IN TTYAAR3 '	1048576	2211
	Reverse	860 5 'YKN GGR TIN GCNB YN GIRCA YTGR TC3 '	98304	
ADHJ6	Forward	123 5 'ACNAA YCCNACNW SNACNRCNA IN TTYAAR3 '	1048576	1830
	Reverse	733 5 'CCNARRAANGCR TIN SHRAANGCNA T3 '	98304	
ADHJ7	Forward	123 5 'ACNAA YCCNACNW SNACNRCNA IN TTYAAR3 '	1048576	1407
	Reverse	592 5 'CKYTINCKDA IR TCNADRAANYK3 '	73728	
ADHJ8	Forward	426 5 'CCNW SN YTNACN YIN GGN TGYGG3 '	131072	1302
	Reverse	860 5 'YKN GGR TIN GCNB YN GIRCA YTGR TC3 '	98304	
ADHJ9	Forward	426 5 'CCNW SN YTNACN YIN GGN TGYGG3 '	131072	921
	Reverse	733 5 'CCNARRAANGCR TIN SHRAANGCNA T3 '	98304	

1. 2. 2 基因组 DNA 提取

取少量 - 70 保存的 B49 菌液接种于 100 mL 厌氧培养基中 37 过夜培养. 用华舜基因组小量提取试剂盒提取 B49 基因组 DNA, 具体方法见说明书.

1. 2. 3 简并扩增 B49 乙醛乙醇脱氢酶

用设计的简并引物 ADHJ1, ADHJ2, ADHJ3, ADHJ4, ADHJ5, ADHJ6, ADHJ7, ADHJ8, ADHJ9 共 9 对对基因组 DNA 进行降落 PCR 扩增. PCR 反应条件选用降落 PCR 法: 预变性 94 5 min; 然后 94 30 s, 从 55 降到 35 40 s, 每个循环降 1 , 72 2 min 30 s, 共 20 个循环; 接着按 94 30 s, 35 40 s, 72 2 min 30 s, 共进行 15 个循环; 最后在 72 延伸 10 min

1. 2. 4 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, 转化至大肠杆菌 DH5 α . 转化产物经蓝白斑筛选, 挑选白色菌落, 进行菌落 PCR 验证得到阳性克隆, 并取两个阳性克隆送交上海生物工程技术有限公司测序.

1. 2. 5 测序及序列比对

每个样品取 2 个阳性克隆送交上海生物工程技术有限公司测序. 测序的克隆片段碱基序列经 NCBI 上去除载体序列后, 输入 GeneBank 的 blastx2. 0 中进行同源性比较.

2 结果与讨论

2. 1 简并 PCR 电泳结果

简并 PCR 扩增结果见图 2 从图 2 可见, 只有 ADHJ5 和 ADHJ8 得到高度特异性的 PCR 产物, 其他的引物均没有扩增出条带来. 这有两种原因:

一是用氨基酸序列的保守区设计简并引物克隆基因时, 比对出来的保守区是假设在这种蛋白中都存在的, 同样也假设它在要克隆的蛋白中也存在, 这样设计出来的简并引物既存在简并性的问题, 也存在其假设性的问题, 即不确定性. 如果假设的保守区存在, 它就有被扩增出来. 还有一种原因是简并引物是引物的大集合, 每个引物的退火温度是不同的, 简并引物退火温度的范围也是很大的, 最适退火温度是需要摸索的, 所以, 简并 PCR 一般选用降落 PCR 法扩增, 而且要对降落 PCR 的最低退火温度进行摸索.

ADHJ5 的 PCR 产物有两条带, 其中最大的带大小为 2200 bp 左右, 与预测产物大小一致, 而最小的带大小为 1100 bp 左右, 为非特异性扩增结果. ADHJ8 的 PCR 产物大小为 1300 bp 左右, 与预测产物大小一致.

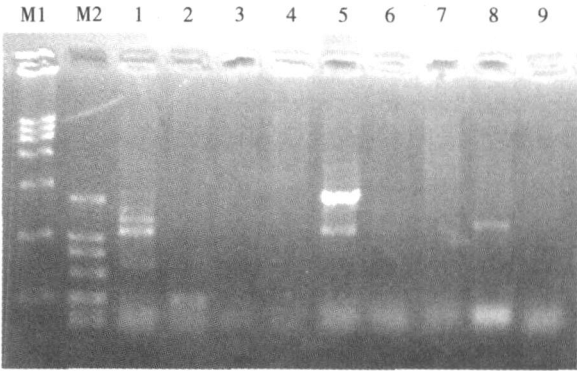


图 2 9 对简并引物扩增 B49 基因 DNA 的结果

2. 2 PCR 产物分析

引物 ADHJ5 和 ADHJ8 的 PCR 产物经 pMD18 - T 载体克隆后测序. 测序结果以 blastx 检索 GeneBank 进行相似性比较. 其 DNA 所编码的氨基酸序列与 AdhE 有高度相似性, 而且 ADHJ5 的 PCR 产物序列包含 ADHJ8 的 PCR 产物序列,

ADHJ5的 PCR 产物核酸序列在 NCB I上注册号
为 DQ179103.

由表 4可知,用引物 ADHJ5克隆的 B49菌株
DNA所编码的氨基酸序列与 *AdhE* 有高度相似

性. 其中与 *Bacillus cereus* G9241和 *Bacillus cereus*
E33L 的 *AdhE* 序列 同 源 性 最 高 为 69%, 与
Clostridium perfringens str 13 的 *AdhE* 序列同源
性也达到 52%,而证明这段 DNA 为 *AdhE*序列.

表 4 同源检索 GeneBank数据库结果

序列相似性比较		得分 /bits	期望值	同源率 /%
蛋白质名称	菌种			
alcohol dehydrogenase	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	641	0. 0	313/464 = 67
aldehyde-alcohol dehydrogenase	<i>Bacillus cereus</i> G9241	631	3e - 179	319/461 = 69
aldehyde-alcohol dehydrogenase	<i>Bacillus cereus</i> E33L	631	4e - 179	319/461 = 69
aldehyde-alcohol dehydrogenase	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10987	629	1e - 178	316/461 = 68
aldehyde-alcohol dehydrogenase	<i>Bacillus anthracis</i> str A2012	625	1e - 177	316/461 = 68
aldehyde-alcohol dehydrogenase	<i>Bacillus anthracis</i> str Ames	625	1e - 177	316/461 = 68
aldehyde-alcohol dehydrogenase	<i>Clostridium perfringens</i> str 13	487	8e - 136	246/466 = 52

本实验选用的两对引物 ADHJ5和 ADHJ8的
简并度都在 10000倍以上 (见表 3),其中最小的
为 98304倍,最大的为 1048576倍,均远大于史兆
兴等^[11]认为的最佳简并度 (1000 ~ 10000 倍)和
王洪振等^[12]认为的最佳简并度 (小于 516倍). 而
引物对 ADHJ5和 ADHJ8都成功地克隆到了目的
基因. 这说明简并度在简并引物设计中并不占有
非常重要的地位,最重要的是引物所在保守区的
保守性和引物的长度.

3 结 论

1)通过对 B49乙醛乙醇脱氢酶基因的同源
蛋白质序列,得到高度保守的蛋白质保守区域,把
蛋白质保守区域翻译成简并核苷酸序列,共设计
了 9对简并引物. 其中 ADHJ5和 ADHJ8成功地
从高效产氢菌 B49总 DNA 中克隆出了 *adhE* 基
因部分片段. ADHJ5 具有克隆产乙醇杆菌属
*adhE*家族基因的潜力.

2)该 *adhE*片段的成功克隆,不但为分离 B49
的 *adhE*全基因提供了可能,同时也为验证 Tan-
isho的 NADH + H⁺途径产氢理论和产氢机理奠
定了基础. 实验结果表明,用此策略设计简并引物
进行基因克隆是成功的. 证明了用 clustalw软件
结合 Primer premier5. 0 软件设计简并引物是可
靠的.

参考文献:

[1] 樊耀亭,李晨林,侯红卫,等. 天然厌氧微生物氢发酵
生产生物氢气的研究 [J]. 中国环境科学, 2002, 22
(4): 370 - 374
[2] OH Y K, SEOL E H, KM J R, *et al* Fermentative bio-
hydrogen production by a new chemoheterotrophic bacte-

rium *Citrobacter* sp. Y19 [J]. *Int J Hydrogen Energy*,
2003, 28: 1353 - 1359
[3] KUMAR N, DAS D. Enhancement of hydrogen produc-
tion by enterobacter cloacae III - BT08 [J]. *Proc Bio-
chem*, 2000, 35: 589 - 593
[4] XNG D F, REN N Q, LI Q B, *et al* *Ethanoligenes*
harbinense gen nov, sp. nov, isolated from molasses
wastewater [J]. *Int J System Evolut Microbiol*, 2006,
56: 755 - 760
[5] YOKO IH, TOKUSHIGE T, HIROSE J, *et al* Hydro-
gen production by immobilized cells of enterobacter aer-
ogenes strain HO - 39 [J]. *J Fement Bioeng*, 1997, 83
(5): 481 - 484
[6] TAGUCHI F, MIZUKAMIN, SAITO - TAKI T, *et al*
Isolation of a hydrogen - producing bacterium *clostridium*
beijerinckii strain AM21B, from termites [J]. *Can J Mi-
crobiol*, 1993, 39: 726 - 730
[7] 林明. 高效产氢发酵新菌种的产氢机理及生态学研究
[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学, 2002
[8] GRAY C T, GEST H. Biological formation of molecular
hydrogen production [J]. *Science*, 1965, 148: 186 -
192
[9] TAN ISHO S, ISHIWATA Y. Continuous hydrogen produc-
tion from molasses by fermentation using urethane foam as
a support of flocks [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 1995,
20 (7): 541 - 545
[10] 郑国香. 产乙醇杆菌属突变菌株 YR - 3的产氢行为
及其突变机制 [D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学, 2008
[11] 史兆兴,王恒,苏国富,等. 简并 PCR 及其应用
[J]. *生物技术通讯*, 2004, 15 (2): 172 - 175
[12] 王洪振,周晓馥,宋朝霞,等. 简并 PCR 技术及其在基
因克隆中的应用 [J]. *遗传*, 2003, 25 (2): 201 - 204

(编辑 刘 彤)