

嗜热厌氧乙醇杆菌调控因子 P_{adhE-1} 的分离、重组表达及其与 $adhE$ 基因启动子的结合

裴建军^{1Δ} 周庆^{2Δ} 曲威² 邵蔚蓝^{1,2*}

(1. 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122)

(2. 南京师范大学生命科学学院 江苏 南京 210046)

摘要: 嗜热厌氧乙醇杆菌发酵是生产纤维素乙醇的有效途径, 而嗜热厌氧乙醇杆菌醛/醇脱氢酶(AdhE)是其乙醇代谢途径中的关键酶。以 $adhE$ 启动子区域的 DNA 序列(TRR_{adhE})作为诱饵, 通过制备核酸亲和层析柱, 利用调控因子与 DNA 特异性结合的特点, 得到调控因子 P_{adhE-1} 。经过蛋白测序和 NCBI 数据库的比对, 发现其 N 端序列与 *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* 39E 的 LacI 家族转录调控因子 (GenBank accession No. YP_001665770)有 90%的同源性。根据同源性设计引物, 从嗜热厌氧乙醇杆菌 JW200 基因组中通过 PCR 扩增得到调控因子 P_{adhE-1} 的基因, 并克隆到表达载体 pET-28a 得到重组质粒 pET- P_{adhE} 。转化大肠杆菌 JM109 (DE3), 经 IPTG 诱导表达, Ni^{2+} 亲和柱纯化, 得到重组表达的调控因子 P_{adhE-1} 。体外凝胶阻滞实验证实 P_{adhE-1} 能与 TRR_{adhE} 特异性结合。这将有助于我们了解嗜热厌氧乙醇杆菌的乙醇代谢调控机理。

关键词: 嗜热乙醇杆菌 JW200, 亲和层析, 调控因子, 凝胶阻滞

Expression and Identification of the P_{adhE-1} from *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200 and Its Binding with $adhE$ Promoter *in vitro*

PEI Jian-Jun^{1Δ} ZHOU Qing^{2Δ} QU Wei² SHAO Wei-Lan^{1,2*}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing, Jiangsu 210046, China)

Abstract: *Thermoanaerobacter ethanolicus* produces ethanol from biomass derived substrates at temperatures above 70°C. AdhE, which exhibited bifunctional acetaldehyde/ethanol dehydrogenase activities, play a key role in producing ethanol. Proteins interacting with the transcriptional regulatory region (TRR) of $adhE$ were for the first time isolated and identified by affinity chromatography. One of the proteins, P_{adhE-1} , a homolog of LacI family, was cloned and expressed in *Escherichia coli*. Through electromobility shift assays, it was determined that the interaction between P_{adhE-1} and TRR_{adhE} was specific. The research would be helpful to construct the bacteria with the extremely thermophilic and

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30900008); 江苏省高校自然科学重点项目(No. 09KJA180003)

* 通讯作者: Tel/Fax: 86-25-85891836; ✉: weilanshao@gmail.com; wshao@jssmail.com.cn

Δ 并列第一作者

收稿日期: 2010-04-12; 接受日期: 2010-06-08

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

high ethanol-producing characteristics.

Keywords: *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200, Regulator, Affinity chromatography, Electrophoretic mobility shift assay

嗜热厌氧乙醇杆菌 *Thermoanaerobacter ethanolicus* 是既能缓慢降解生物质, 又能高效利用戊糖和己糖产生乙醇的一类细菌, 但是由于嗜热厌氧乙醇杆菌发酵生产乙醇的最终浓度一直低于3%, 因此人们对嗜热厌氧乙醇杆菌的兴趣曾经很低^[1-2]。但是随着能源和环境问题的越来越严峻, 人们意识到必须探索出一条能够同步进行生物质降解、乙醇发酵和乙醇蒸馏的纤维素乙醇的新技术, 从而最大限度地降低生产成本, 因此, 同时具有生物质降解能力和乙醇发酵能力的嗜热厌氧乙醇杆菌再次成为研究热点^[3]。目前, 国际国内已经有三个研究小组先后完成了对嗜热厌氧杆菌属 *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* 39E (GenBank accession No: NC_010321), *Thermoanaerobacter ethanolicus* X514 (GenBank accession No: NC_010320) 和 *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4 (GenBank accession No: NC_003869)的全基因组测序。嗜热厌氧杆菌全基因组序列解析的完成, 为大家从基因水平研究乙醇代谢和调控提供了基础。

醛/醇脱氢酶(AdhE)是嗜热厌氧乙醇杆菌(*T. ethanolicus* JW200)乙醇代谢途径中有利于乙醇生产的关键酶, 对它的调控因子展开研究对提高嗜热厌氧乙醇杆菌的乙醇产量具有重要意义。目前对 *adhE* 转录调控研究仅限于 *E. coli* 和 *Clostridium acetobutylicum*^[4]。在 *E. coli* 中, *adhE* 的转录受调控因子 RpoS、NarL、NarP 和 Cra 的抑制, 也受 Fis 和 FNR 的激活^[5-8]。而对嗜热乙醇杆菌乙醇代谢途径中的关键酶 AdhE 的调控研究还很少, 还没有相关的调控因子被报道。本文将对嗜热乙醇杆菌 JW200 来源的调控因子 P_{adhE}-1 进行分离、克隆、重组表达及体外阻滞实验。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 嗜热厌氧乙醇杆菌 *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200 (ATCC 31550)由美国佐治亚大学微生物系 J. Wiegel 实验室惠赠。

1.1.2 酶和化学试剂: *Sau3A* I、*Ex-Taq* DNA 聚合酶、DNA 分子量 Marker 均购自大连 TaKaRa 生物公

司, T4 DNA ligase 购自 NEB 公司, 实验所使用的酵母粉(Yeast extract)购自 Oxoid 公司, 变性标准蛋白购自 Promega 公司, HEPES、CAPS 购自 Amersico 公司, 鲑鱼精担体 DNA 和溴化氰活化的 Sepharose 4B 购自 Sigma, 琼脂糖购自 BBST 公司, 一次性层析柱和 PVDF 膜、40%丙烯酰胺(Acr)/N, N'-亚甲基双丙烯酰胺(Bis)溶液和四甲基乙二胺(Temed)购自 Bio-Rad 公司, 尼龙膜、地高辛标记和检测试剂盒, 购自 Roche 公司。其它常规试剂均为国产分析纯, 购自金庆祥生物试剂有限公司。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。蛋白 N 端测序由上海基康生物技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 基因操作: 基因组的提取, DNA 片段的分离, 感受态细胞的制备等均按照分子克隆技术^[9]。

1.2.2 粗蛋白的提取与初步纯化: 将-80°C保存的待用嗜热厌氧乙醇杆菌 JW200细胞重悬于HEPES缓冲液中 [1 mmol/L EDTA, 100 mmol/L HEPES (K⁺), pH 7.6]。细胞用高压细胞破碎仪在1500 Pa压力下破壁, 4°C下20000 × g离心30 min以去除细胞碎片, 然后将上清液进行85%的硫酸铵沉淀, 去除基因组DNA。静置15 min后, 10000 × g离心30 min, 收集沉淀物, 得到总可溶蛋白。将总可溶蛋白重悬于含有0.1 mol/L KCl的缓冲液Z中, 再以30倍体积的同样缓冲液透析, 每3 h更换一次缓冲液, 重复3次。缓冲液Z包含12.5 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L dithiothreitol (DTT), 20% (V/V) glycerol, 0.1% (V/V) Nonidet P-40, 25 mmol/L HEPES (K⁺), pH 7.6。将超声波处理的鲑鱼精担体DNA加入透析好的可溶蛋白中, 每毫克蛋白添加100 μg的担体DNA, 在冰上孵育30 min。4°C下20000 × g离心30 min以除去与担体DNA非特异性结合的蛋白, 得到的上清液直接用于柱层析。

1.2.3 TRR_{adhE}与亲和柱填料 Sepharose 4B 的偶联^[10]: 根据调控片段 TRR_{adhE} (GenBank accession No. GU586297)的序列设计引物如下: *adhE*-F: 5'-CCCGATCTTTTTTGAGTAATCGTTTCATAT C-3', *adhE*-R: 5'-CCCGATCTTCTTCTTTCTTGT AATA-3', 粗体表示的是 *Sau3A* I 的限制性酶切位

点。以嗜热厌氧乙醇杆菌 JW200 基因组 DNA 为模板,用 Ex-Taq DNA polymerase 扩增 *adhE* 基因上游的调控片段 TRR_{adhE}, 割胶回收, *Sau*3A I 酶切后,用乙醇沉淀浓缩,重悬于连接酶缓冲液中(总核酸量约 900 μg)。在 200 μL 反应体系中加入 T4 DNA ligase (200 U), 16°C 下连接 4 h, 这样得到的核酸寡聚体,再进一步酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提一次,乙醇沉淀后,重悬于 ddH₂O 中备用。亲和柱的制备是将 TRR_{adhE} 的寡聚体与 CNBr 活化的 Sepharose 4B (Sigma)偶联,最终每毫升凝胶要偶联约 2 nmol 的核酸。

1.2.4 亲和层析:亲和凝胶各 2 mL 分别装入 Bio-Rad 公司的一次性柱中,用 10 倍体积的含有 0.1 mol/L KCl 的缓冲液 Z 平衡,将初步纯化后的粗蛋白,以 20 mL/h 的流速过柱,然后以 10 倍体积的含有 0.1 mol/L KCl 的缓冲液 Z 洗涤,每次 2 mL,洗 10 次。然后再用含有 0.2、0.4、0.6、0.8 mol/L KCl 的缓冲液 Z,依次分段洗脱,收集相应浓度下的组分,准备蛋白转膜。

1.2.5 蛋白转膜与 N 端测序:蛋白转膜参照文献 [11], 蛋白测序由上海基康完成。

1.2.6 调控因子的重组表达和纯化:根据 GenBank 上已经测序的嗜热杆菌 LacI 家族的转录调控因子 (GenBank accession No. YP_001665770) 的序列设计引物如下: P_{adhE}-N: 5'-CCCCCATGGAGAGTGCAACGATAAAAGATG-3', P_{adhE}-C: 5'-CCCCTCGAGTCGGCTATTTTTTCTTCTC-3', 斜体分别表示的是 *Nco* I 和 *Xho* I 的限制性酶切位点。以嗜热乙醇杆菌 JW200 的基因组为模板进行 PCR 扩增, PCR 产物割胶回收后用 *Nco* I/*Xho* I 双酶切克隆到 pET-28a, 得到重组质粒 pET-P_{adhE}。将 pET-P_{adhE} 转化 JM109 (DE3)感受态细胞,挑单菌落至 50 mg/L 卡纳霉素 (Kan) 的 LB 试管中, 30°C 培养至对数期,按 1% 转接到 200 mL 50 mg/L Kan 的 LB 培养液中培养菌 OD₆₀₀ 至 0.5, 加终浓度 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导, 30°C 培养 4 h 后回收细胞,破碎细胞后用 Ni²⁺ 亲和柱纯化,纯化方法按照 pET System Manual 进行 (Novagen)。

1.2.7 凝胶阻滞 EMSA^[12]:反应体系 10 μL, 含有 200 mmol/L NaCl, 0.1 g/L BSA, 10% (V/V) 甘油, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA 和 1 μg 鲑鱼精担体 DNA; 缓冲液为 Tris 缓冲 20 mmol/L (pH 7.5)。取 4.5 fmol 地高辛标记的调控片段 TRR_{adhE} (用地高

辛标记试剂盒进行末端标记,具体步骤参考 Roche 试剂盒说明书),加入适量的调控因子 P_{adhE}-1, 60°C 反应 20 min。电泳条件为 5% 的非变性聚丙烯酰胺, 0.5 × TBE, 50 V 跑 2 h。然后转移到 N⁺ 尼龙膜,条件为 0.5 × TBE, 50 V, 4°C 下转移 2 h。按照 Roche 试剂盒说明书进行地高辛标记的显色。

2 结果

2.1 调控因子的分离和测序

以 *adhE* 的启动子片段 (TRR_{adhE}) 为诱饵, 通过核酸亲和层析, 对不同盐浓度下的洗脱组分进行分析。特异性的 DNA-蛋白质复合物常常可以在高盐浓度中稳定存在。因此低、中盐洗脱掉了大部分杂蛋白, 高盐洗脱组分中得到特异结合的调控因子。在包含 0.8 mol/L KCl 洗脱组分中, 发现了一个量比较多的蛋白, 并把该蛋白命名为 P_{adhE}-1 (图 1)。氨基酸测序发现其 N 端序列为 SAEIKDVARE, 通过比对发现其与 *T. pseudethanolicus* 39E 的 LacI 家族转录调控因子 (GenBank accession No. YP_001665770) 有 90% 的同源性。根据同源性设计引物, 以嗜热乙醇杆菌 JW200 的基因组为模板进行 PCR 扩增得到调控因子 P_{adhE}-1 基因的全序列。对调控因子 P_{adhE}-1 氨基酸全序列比对发现其具有 H-T-H LacI 和 Periplasmic binding fold 两个超家族结构域。与其同源性最高, 且确定功能的调控蛋白是 *Paenibacillus* sp. JDR-2 的 CcpA 蛋白 (GenBank accession No. YP_003012516.1), 具有 53% 同源性。

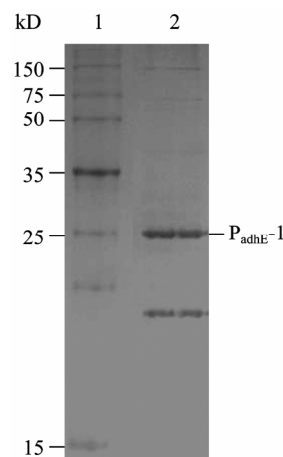


图 1 *adhE* 调控蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the potential regulator for *adhE*

Note: 1: Protein marker; 2: Proteins eluted with buffer Z containing 0.8 mol/L KCl.

2.2 重组质粒的构建及调控因子的重组表达和纯化

琼脂糖电泳检测结果表明, 扩增的调控因子 P_{adhE-1} 的基因大小在 0.9 kb 左右(图 2A), 用限制性内切酶 *Nco* I/*Xho* I 对重组质粒 pET- P_{adhE} 进行双酶切验证。结果如图 2B 所示, 该重组质粒得到 1 条 5.3 kb 的片段和 0.9 kb 的片段, 符合重组质粒的特性, 因此初步证实调控因子 P_{adhE-1} 的基因已插入 pET-28a 中。

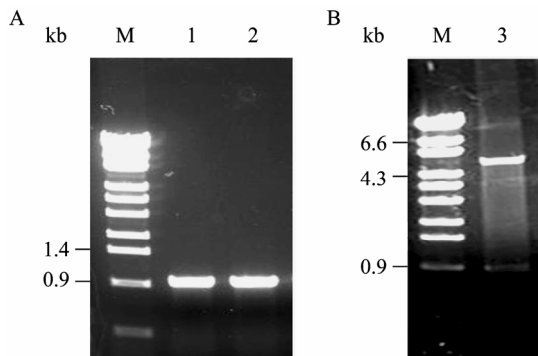


图 2 PCR 片段及重组质粒 pET- P_{adhE} 的酶切鉴定
Fig. 2 PCR amplification of gene P_{adhE-1} and enzyme identification of recombinant plasmid

Note: M: Marker; 1, 2: PCR amplification of gene P_{adhE-1} ; 3: Double enzyme digestion of pET- P_{adhE} .

重组质粒 pET- P_{adhE} 转化大肠杆菌 JM109 (DE3), 表达后取全细胞进行 SDS-PAGE(分离胶的浓度为 10%)分析, 考马斯亮蓝染色的结果见图 3。以 pET-28a 为空白对照, 从电泳图谱上可以看出, 含有重组质粒 pET- P_{adhE} 的大肠杆菌在分子量 35 kD 处有明显的蛋白表达条带, 与预期的蛋白相对分子量大小一致, 由此可知调控因子 P_{adhE-1} 在大肠杆菌中实现了表达。

2.3 调控因子 P_{adhE-1} 与 TRR_{adhE} 的结合

嗜热厌氧乙醇杆菌 JW200 的生长温度为 37°C-78°C, 较适宜的生长温度为 60°C-70°C。为了模拟生理条件, 凝胶阻滞的结合温度为 60°C, 为了减少非特异性结合, 每个反应体系中加入 1 μ g 鲑鱼精担体 DNA。凝胶阻滞实验显示地高辛标记的 TRR_{adhE} 作为游离片段出现在电泳的底部, 而调控因子 P_{adhE-1} 与地高辛标记的 TRR_{adhE} 形成高相对分子量复合物, 泳动速度明显减慢, 在胶上部出现结合带, 而且阻滞的强度与调控因子 P_{adhE-1} 的量密切相关, 这充分证实了调控因子 P_{adhE-1} 与 TRR_{adhE} 的特异性结合(图 4)。

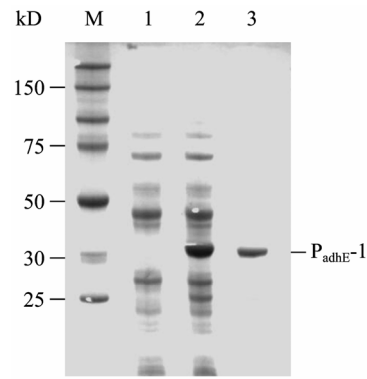


图 3 调控因子 P_{adhE-1} 的重组表达及纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expression and purification of P_{adhE-1}

Note: M: Protein marker; 1: Crude extract of *E. coli* JM109 (DE3)/pET-28a; 2: Crude extract of *E. coli* JM109 (DE3)/pET- P_{adhE} ; 3: The purified recombinant P_{adhE-1} .

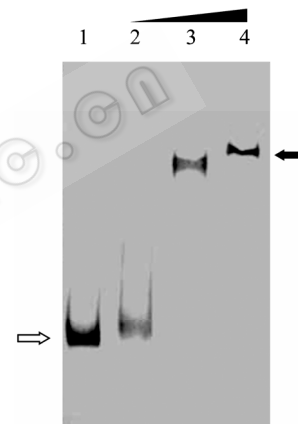


图 4 调控因子 P_{adhE-1} 与 TRR_{adhE} 的凝胶阻滞分析

Fig. 4 The interaction between P_{adhE-1} and TRR_{adhE} by the gel retardation assays

Note: 1: TRR_{adhE} (4.5 fmol); 2-4: TRR_{adhE} (4.5 fmol) incubated with increasing amount of P_{adhE-1} (10, 40, and 60 pmol). Open arrows indicate unbound probe, and closed arrows indicate protein-probe complexes.

3 讨论

嗜热厌氧杆菌从被人们发现开始就因其既能缓慢降解生物质, 又能高效利用戊糖和己糖产生乙醇而受到关注, 但是长期以来, 人们一直认为嗜热厌氧杆菌发酵产生乙醇的最终浓度不高的原因是细胞对乙醇的耐受力不够高。我们通过对嗜热厌氧杆菌中醛/醇脱氢酶的克隆表达^[13-14], 发现实际的情况并不是这样, 而是嗜热厌氧杆菌能通过其醛/醇双功能脱氢酶 AdhE 和 AdhB 对其产生的乙醇浓度进行调控, 我们研究室通过生理条件模拟分析发现 *adhE* 编码的醛/醇双功能脱氢酶 AdhE 才是产生乙醇的主

要酶,而醛/醇双功能脱氢酶 AdhB 在乙醇浓度达到 1% 时主要介导乙醇的消耗,从而证明嗜热厌氧杆菌对所产生的乙醇的最终浓度能够进行调控^[15]。嗜热厌氧乙醇杆菌 *adhE* 结构基因上游的启动子区域已经被我们克隆并测序(GenBank accession No. GU586297),位于 *adhE* 结构基因上游的启动子结构复杂,存在串联重复序列,富含许多类似转录调控元件的对称结构。且 *adhE* 还具有双启动子的特点,包含 2 个 -35 区和 -10 区。这种复杂的启动子结构揭示了它们转录调控的复杂性。

本实验中发现的调控因子 P_{adhE-1} 具有与 TRR_{adhE} 特异性结合的能力,能对 *adhE* 基因的转录进行调控。通过对调控因子 P_{adhE-1} 与 NCBI 数据库比对,发现与其同源性最高的确定功能的蛋白是 *Paenibacillus* sp. JDR-2 的 CcpA 蛋白。CcpA 是介导细菌碳源分解代谢阻遏(CCR)的全局调控因子^[16-18], CcpA 是通过与目的基因相关区域的 DNA 结合,而影响该基因转录,从而影响糖代谢。目前对于 CcpA 与 DNA 的结合区域碱基序列结构研究较多,其一致序列为 TG(A/T)AA(A/T/C/G)CG(A/T/C/G)T(A/T/C/G)(A/T)CA,对于 CcpA 影响基因转录的研究也有相关文献的报道,但目前对于 CcpA 是通过什么方式来影响基因转录的研究还没有明确的说法。有人提出一种假设,即结合区域位于启动子的何处,决定 CcpA 是激活还是抑制基因转录^[19]。P_{adhE-1} 作为调控因子能与 *adhE* 基因的上游启动子特异性结合首次被报道。而 *adhE* 基因表达的 AdhE 双功能醇醛脱氢酶是嗜热厌氧乙醇杆菌生成乙醇的关键酶,对 *adhE* 转录调控因子的研究将有利于对乙醇代谢调控进行改造,解除负调节效应,增加正调节效应,促进 *T. ethanolicus* 向人为可控的高产乙醇方向发展。

参 考 文 献

- [1] Wiegel J. Ethanol from cellulose. *Experientia*, 1982(38): 151-156.
- [2] Wiegel J, Ljungdahl LG. *Thermoanaerobacter ethanolicus* gen. nov., spec. nov., a new, extreme, thermophilic, anaerobic bacterium. *Arch Microbiol*, 1981, **128**(4): 343-348.
- [3] Shaw AJ, Podkanvner KK, Desai SG, et al. Metabolic engineering of a thermophilic bacterium to produce ethanol at high yield. *PNAS*, 2008, **105**(37): 13769-13774.
- [4] Thormann K, Feustel L, Lorenz K, et al. Control of butanol formation in *Clostridium acetobutylicum* by transcriptional activation. *J Bacteriol*, 2002, **184**(7): 7129-7134.
- [5] Jorge MH, Kwon O, Wulf PD, et al. Regulation of *adhE* (encoding ethanol oxidoreductase) by the fis protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1999, **181**(23): 7390-7393.
- [6] Chen YM, Lin ECC. Regulation of the *adhE* gene, which encodes ethanol dehydrogenase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1991, **173**(24): 8009-8013.
- [7] Browning DF, Lee DJ, Wolfe AJ, et al. The *Escherichia coli* K-12 NarL and NarP proteins insulate the *nrf* promoter from the effects of integration host factor. *J Bacteriol*, 2006, **188**(21): 7449-7456.
- [8] Mikulskis A, Aristarkhov A, Lin ECC. Regulation of expression of the ethanol dehydrogenase gene (*adhE*) in *Escherichia coli* by catabolite repressor activator protein Cra. *J Bacteriol*, 1997, **179**(22): 7129-7134.
- [9] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [10] Kadonaga JT, Tjian R. Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986(83): 5889-5892.
- [11] Moos MJ, Nguyen NY, Liu TY. Reproducible high yield sequencing of proteins electrophoretically separated and transferred to an inert support. *J Biol Chem*, 1988, **263**(13): 6005-6008.
- [12] Brekasis D, Paget MSB. A novel sensor of NADH/NAD⁺ redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *EMBO J*, 2003, **22**(18): 4856-4865.
- [13] 彭惠, 毛忠贵, 武国干, 等. 嗜热乙醇杆菌中醛/醇脱氢酶的双启动子分析. *微生物学通报*, 2007, **34**(4): 727-730.
- [14] 彭惠, 毛忠贵, 武国干, 等. 嗜热厌氧乙醇杆菌 JW200 中醛脱氢酶的纯化. *南京师大学报*, 2007, **30**(1): 78-81.
- [15] Zhou Q, Le Y, Jiang Y, et al. *Thermoanaerobacter* spp. control ethanol formation via transcriptional regulation and versatility of key enzymes. The 10th International Conference on Thermophiles, P51, Beijing, China, 2009.
- [16] Puri-Taneja A, Paul S, Chen Y, et al. CcpA causes repression of the *phoPR* promoter through a novel transcription start site, P_{A6}. *J Bacteriol*, 2006, **188**(4): 1266-1278.
- [17] Warner JB, Lolkema JS. Ccp-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rec*, 2003, **67**(4): 475-490.
- [18] Ujiie H, Matsutani T, Tomatsu H, et al. Trans-translation is involved in the CcpA-dependent Tagging and degradation of TreP in *Bacillus subtilis*. *J Biochem*, 2009, **145**(1): 59-66.
- [19] Kaufman GE, Yother J. CcpA-dependent and -independent control of beta-galactosidase expression in *Streptococcus pneumoniae* occurs via regulation of an upstream phosphotransferase system-encoding operon. *J Bacteriol*, 2007, **189**(14): 5183-5192.