

## 摘要

1,4-丁二醇 (1,4-BDO) 作为一种大宗性的商品化学品, 主要用作溶剂以及增湿剂, 其衍生物可应用于化工合成、医药和化妆品等领域。而目前还未在生物体发现天然合成 1,4-丁二醇的途径。本论文基于多酶级联催化方法, 构建了一条以  $\gamma$ -丁内酯 (GBL) 为底物生产 1,4-丁二醇的路径。 $\gamma$ -丁内酯作为底物虽然不具有直接的经济性, 但是该路径的实施主要是为后续以葡萄糖为底物构建 1,4-丁二醇及其高附加值衍生物合成路径提供基础支撑。该路径首先利用己内酯水解酶 (ChnC) 将  $\gamma$ -丁内酯水解开环生成 4-羟基丁酸 (GHB), 接着在羧酸还原酶 (Car)、醇脱氢酶 (YqhD) 的作用下, 将 4-羟基丁酸两步还原成生成 1,4-丁二醇; 同时引入甲酸脱氢酶 (FDH) 构建了 NADH/NAD<sup>+</sup> 辅酶循环再生系统。最终在上述 4 种酶的共同催化作用下实现了利用酶法高效生产 1,4-丁二醇。主要研究结果如下:

(1) 将来源于红球菌 (*Rhodococcus* sp.TK6) 的 *Rschnc*、来源于海洋分枝杆菌 (*Mycobacterium marinum*) 的 *Mmcar* 以及来源于大肠杆菌 (*Escherichia coli* K12 MG1655) 的 *Ecyqhd* 三种关键酶基因分别在 *E. coli* BL21 中成功克隆表达。酶学性质分析表明: ChnC 的比酶活为 0.95 U·mg<sup>-1</sup>, 最适反应温度范围在 35-40°C, 在 pH 7.0-9.0 范围内具有较高的催化活性; Car 的比酶活为 0.28 U·mg<sup>-1</sup>, 最适反应温度在 30°C 附近, 在 pH 7.0-8.0 附近具有较高的催化活性; YqhD 的比酶活为 0.43 U·mg<sup>-1</sup>, 最适反应温度范围 30-37°C, 在 pH 7.0 附近具有较高的催化活性。

(2) 利用半理性设计的方法对 ChnC 酶蛋白进行稳定性改造, 通过引入二硫键得到一株半衰期显著延长的突变体 S1, 有益突变点为 K166C 和 A197C。该突变体在 30-37°C 条件下, 半衰期由 20 h 左右变成 35 h 左右, 提升 1.75 倍; 在 pH 7 和 8 处相较于野生型半衰期也提升了 20 h 左右。其次针对转化过程中关键限速酶 Car 进行了设计改造, 分别使用 RBS 序列优化和分子对接手段, 最终得到突变体 N1, 其催化能力显著提高, 在相同条件下的转化效率是野生型 Car 的 2 倍左右, 有益突变点为 A882H。

(3) 优化了多酶级联反应的生产工艺。在 30°C、pH 7.0、关键酶酶活力 (U·mL<sup>-1</sup>) 添加量比例为 1: 3: 2 (ChnC: Car: YqhD),  $\gamma$ -丁内酯添加量为 5 g·L<sup>-1</sup>, 反应时间 60 h, 1,4-丁二醇产量达到 2.41 g·L<sup>-1</sup>, 摩尔转化率为 46.1%, 产量与最初优化前相比提高至 375.4%。在使用突变体 S1 以及 N1 后, 反应 60 h, 1,4-丁二醇产量达到 3.22 g·L<sup>-1</sup>, 摩尔转化率为 60.1%, 产量相较于野生型提升至 133.6%。

(4) 为了增加 1,4-丁二醇的产量, 采用底物流加策略。在不进行底物补加的情况下, 使用突变体 S1 以及 N1 时, 最终获得 4.36 g·L<sup>-1</sup> 的 1,4-丁二醇, 产量为野生型的 123.9%, 摩尔转化率达到 80.6%; 在有底物流加时, 1,4-丁二醇产量最高达到 9.16 g·L<sup>-1</sup>, 提升至野生型的 145.2%, 但是摩尔转化率仅为 56.5%。在此基础上, 继续延长反应的时间, 最终 1,4-丁二醇的积累量达到了 12.97 g·L<sup>-1</sup>, 产量相较于延长反应之前提升 41.6%, 摩尔转化率也提升至 61.9%。

**关键词:** 1,4-丁二醇;  $\gamma$ -丁内酯; 多酶级联催化; 辅酶循环再生; 分子改造

## Abstract

As a bulk commodity chemical, 1,4-butanediol (1,4-BDO) is mainly used as a solvent and a humidifier, and its derivatives are used in chemical synthesis, pharmaceutical and cosmetic applications. No natural synthesis of 1,4-butanediol has been found in living organisms. In this study, a pathway was constructed for the production of 1,4-butanediol using  $\gamma$ -butyrolactone (GBL) as a substrate based on a multi-enzyme cascade catalytic approach. Although  $\gamma$ -butyrolactone is not directly economical as a substrate, the construction of this pathway can provide a strong technical support for subsequent studies on the synthesis of 1,4-butanediol and its high value-added derivatives from glucose. The pathway firstly uses caprolactone hydrolase (ChnC) to hydrolyze  $\gamma$ -butyrolactone to open the ring to generate 4-hydroxybutyric acid (GHB), followed by a two-step reduction of 4-hydroxybutyric acid to generate 1,4-butanediol in the presence of carboxylic acid reductase (Car) and alcohol dehydrogenase (YqhD); meanwhile, a NADH/NAD<sup>+</sup> coenzyme cycle regeneration system was constructed by introducing formate dehydrogenase (FDH). Finally, the enzymatic production of 1,4-butanediol was realized with the combined catalytic effect of the above four enzymes. The main results of the study are as follows:

(1) The three key enzyme genes of caprolactone hydrolase from *Rhodococcus sp.* TK6, carboxylic acid reductase from *Mycobacterium marinum* and alcohol dehydrogenase from *Escherichia coli* K12 MG1655 were successfully cloned and expressed in *Escherichia coli* BL21. And their enzymatic properties were preliminarily analyzed, the specific enzyme activity of caprolactone hydrolase ChnC was  $0.95 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , with the optimum reaction temperature range of 35-40 °C and high catalytic activity in the pH 7.0-9.0 range; the specific enzyme activity of carboxylic acid reductase Car was  $0.28 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , with the optimum reaction temperature near 30 °C and high catalytic activity near pH 7.0-8.0; the alcohol dehydrogenase The specific enzyme activity of alcohol dehydrogenase YqhD was  $0.43 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , with an optimum reaction temperature range of 30-37 °C and a high catalytic activity near pH 7.0.

(2) Stability modification of the ChnC enzyme protein using a semi-rational design approach to obtain a mutant S1 with a significantly longer half-life by introducing a disulfide bond, with beneficial mutation sites K166C and A197C. The half-life of this mutant was changed from about 20 h to 35 h at 30-37 °C, which is a 1.75-fold increase, and the half-life at pH 7 and 8 was also increased by about 20 h compared with that of the wild type. Next, we designed and modified the key rate-limiting enzyme Car in the transformation process. Firstly, its protein expression was optimally regulated by RBS sequence. Then, we used molecular docking to simulate the docking of the Car protein model with the substrate 4-hydroxybutyric acid and coenzyme. Predicted modification of key residues near its substrate binding site. The final mutant N1 was obtained. The catalytic capacity was significantly improved, and the conversion efficiency was about twice that of wild-type Car under the same conditions, and the beneficial mutation site was A882H.

(3) A multi-enzyme cascade reaction was optimized for the production of 1,4-butanediol catalyzed by  $\gamma$ -butyrolactone. The results of the optimization were as follows: the yield of 1,4-

butanediol reached  $2.41 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  with a molar conversion of 46.1% at 30 °C, pH 7.0, and 1:3:2 ratio of enzyme activity addition of key enzymes, using  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\gamma$ -butyrolactone as substrate for 60 h. The yield was increased by 375.4% compared with that before the initial optimization. After using mutants S1 and N1, the yield of 1,4-butanediol reached  $3.22 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  for 60 h, with a molar conversion rate of 60.1% and a yield increase of 133.6% compared to the wild type.

(4) To increase the yield of 1,4-butanediol, a substrate addition strategy was used. In the absence of substrate addition, a final yield of  $4.36 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  of 1,4-butanediol was obtained when using mutant S1 as well as N1, with a yield of 123.9% of the wild type and a molar conversion rate of 80.6%; in the presence of substrate addition, the yield of 1,4-butanediol reached up to  $9.16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , which The yield of 1,4-butanediol was increased to 145.2% of the wild type, but the molar conversion was only 56.5%. On this basis, the reaction time was extended and the final accumulation of 1,4-butanediol reached  $12.97 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , with a 41.6% increase in yield and 61.9 % molar conversion compared with that before the extended reaction.

**Keywords:** 1,4-butanediol;  $\gamma$ -butyrolactone; Multi-enzyme cascade transformation; Coenzyme cycle regeneration; Molecular alterations

# 目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 1,4-丁二醇的概述 .....	1
1.1.1 1,4-丁二醇简介和应用 .....	1
1.1.2 1,4-丁二醇合成及国内外研究现状 .....	2
1.1.3 $\gamma$ -丁内酯的简介.....	2
1.2 多酶级联系统的概述.....	3
1.2.1 多酶级联系统的简介.....	3
1.2.2 多酶级联系统的调控策略.....	3
1.3 酶分子的半理性设计策略 .....	4
1.3.1 半理性设计的简介 .....	4
1.3.2 半理性设计的策略.....	5
1.4 辅酶循环再生系统.....	5
1.5 本论文的立题以及研究内容 .....	6
1.5.1 本论文的立题依据.....	6
1.5.2 本论文的主要研究内容.....	7
第二章 材料与方法 .....	9
2.1 主要材料.....	9
2.1.1 菌株,质粒及引物.....	9
2.1.2 主要试剂.....	10
2.1.3 主要仪器 .....	10
2.1.4 主要培养基.....	11
2.1.5 主要实验溶液.....	11
2.2 实验方法.....	12
2.2.1 基因扩增以及质粒提取.....	12
2.2.2 <i>E. coli</i> BL21(DE3)感受态细胞以及质粒转化 .....	12
2.2.3 关键酶的酶活以及酶学性质测定.....	13
2.2.4 关键酶分子的半理性设计改造.....	14
2.2.5 全质粒 PCR 构建突变株 .....	15
2.2.6 重组菌株的诱导表达分析.....	15
2.2.7 关键酶蛋白的纯化以及浓度测定.....	15
2.2.8 基于 RBS 序列优化增强关键酶蛋白表达量 .....	16
2.2.9 多酶级联制备 1,4-丁二醇的条件优化 .....	16
2.2.10 基于底物流加策略进行多酶级联制备 1,4-丁二醇 .....	16
2.2.11 1,4-丁二醇气相色谱分析测定方法 .....	17

第三章 结果与讨论 .....	18
3.1 关键酶基因的克隆表达.....	18
3.1.1 重组质粒的构建.....	18
3.1.2 重组酶的表达情况分析.....	19
3.2 关键酶的酶学性质分析.....	21
3.2.1 己内酯水解酶的酶活及酶学性质分析 .....	21
3.2.2 羧酸还原酶的酶活及酶学性质分析.....	22
3.2.3 醇脱氢酶的酶活及酶学性质分析.....	24
3.2.4 关键酶的酶学性质比较.....	26
3.3 高稳定性 ChnC 突变体及高催化活性 Car 突变体的构建 .....	26
3.3.1 ChnC 突变体的设计构建 .....	26
3.3.2 Car 突变体的设计构建及分析.....	28
3.4 基于 RBS 序列优化增强 Car 表达量 .....	31
3.5 多酶级联制备 1,4-丁二醇的条件优化.....	32
3.5.1 不同酶活力添加量比例对多酶级联制备 1,4-丁二醇的影响 .....	32
3.5.2 底物浓度对多酶级联制备 1,4-丁二醇的影响 .....	32
3.5.3 温度、pH 值对多酶级联制备 1,4-丁二醇的影响 .....	33
3.5.4 辅酶循环再生系统的构建.....	34
3.6 利用底物流加策略多酶级联制备 1,4-丁二醇.....	36
主要结论与展望 .....	39
主要结论.....	39
展望.....	39
参考文献.....	41

# 第一章 绪论

## 1.1 1,4-丁二醇的概述

### 1.1.1 1,4-丁二醇简介和应用

1,4-丁二醇 (1,4-butanediol, 1,4-BDO) 是一种非天然存在的有机化合物, 分子式为  $C_4H_{10}O_2$ , 相对分子量 90.12, CAS 号是 110-63-4。在工业生产中作为一种常见的石化产品, 用于合成重要材料 (如氨纶) 和工业产品 (如四氢呋喃)<sup>[1]</sup>; 此外, 其衍生物还可用于制造一系列必需化合物, 包括聚酯、聚氨酯、氨纶、药品、聚丁二酸丁酯和可降解塑料<sup>[2]</sup>。目前工业生产中 1,4-丁二醇的传统制造路线主要依赖于不可持续再生的化石资源 (乙炔或正丁烷) 和能源密集型的化学工艺, 这就导致了化石能源稀缺以及环境污染等问题的出现<sup>[3]</sup>。因此, 探索 1,4-丁二醇合成的完整生化途径, 通过引入能够将内源性前体物质或外源廉价的可再生原料转化为 1,4-丁二醇的人工代谢途径, 实现高效、可持续发展的 1,4-丁二醇生物合成过程是 21 世纪一个重要的挑战<sup>[4]</sup>。

1,4-丁二醇作为一种重要的商品化学品, 主要是用来生产一些重要的有机精细化工原料, 包括聚对苯二甲酸丁二醇酯纤维、工程塑料和四氢呋喃等<sup>[2]</sup>。聚对苯二甲酸丁二醇酯 (PBT) 具有良好的耐热、阻燃和电绝缘等综合性能和良好的后续加工性能, 可广泛用于电器、汽车和飞机制造、通讯、家电、交通运输工具等工业; 四氢呋喃 (THF) 是一种常见的分析试剂, 可用作有机色谱溶剂。它聚合得到的聚四亚甲基醚二醇 (PTMEG) 又是生产高弹性氨纶的基本原料, 后者又被用来进行运动装、游泳衣、瑜伽服等高弹性服装的生产<sup>[5]</sup>。此外, 1,4-丁二醇还可用作一些反应中的溶剂和增湿剂<sup>[2]</sup>。1,4-丁二醇的衍生物更可用于制造一系列具有高附加价值的重要化合物<sup>[6]</sup>, 包括聚酯、聚氨酯、氨纶、医药品、化妆品、聚丁二酸丁二醇酯和可以生物降解的塑料等<sup>[7]</sup>。由于 1,4-丁二醇有着广泛的应用前景, 被列入 NICNAS 高价值量工业化学品清单 (HVICL)<sup>[8]</sup>, 发展市场广阔。随着全球化工行业的高速发展, 1,4-丁二醇的年需求和消费量也在逐年增长, 2023 年预计全球表观消费量将达到 200 万吨<sup>[9]</sup>。据报道, 1,4-丁二醇目前每年的全球市场规模为 61.9 亿美元, 预计到 2025 年将达到 126 亿美元<sup>[10]</sup>。这些数据说明, 1,4-丁二醇的使用量和使用范围越来越大, 已经成为了一种十分重要的基础性化工合成原料。

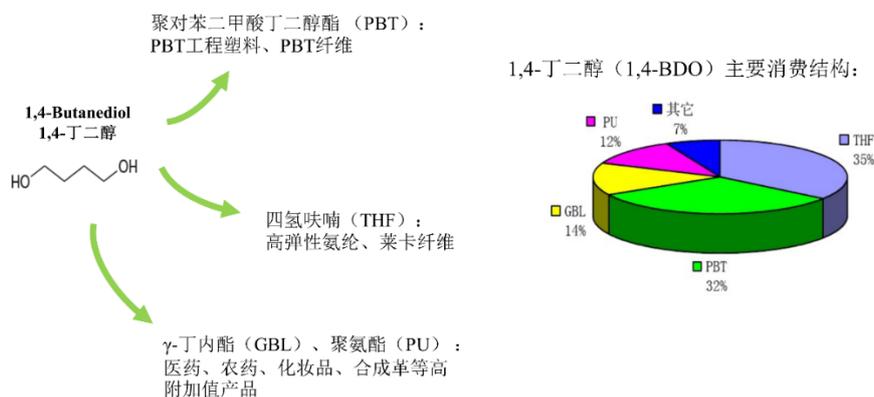


图 1-1 1,4-丁二醇的应用

Fig. 1-1 Application of 1,4-butanediol

### 1.1.2 1,4-丁二醇合成及国内外研究现状

目前, 全球范围内 1,4-丁二醇在工业上的生产方法主要为化学合成法, 包括丁二烯法、醛炔法 (Reppe 法)、环氧丙烷法和顺酐法<sup>[11]</sup>。其中, 顺酐法由于其原料来源广, 工艺不复杂, 投资较低, 成本优势大等特点, 逐渐成为目前主流的化学生产法。

因为在微生物体内还没有发现天然生产 1,4-丁二醇的代谢途径, 所以现在主要利用合成生物学技术在微生物细胞内引入人工设计的途径<sup>[12]</sup>, 进而通过实验发酵法合成 1,4-丁二醇。2011 年, Yim 等首次通过工程大肠杆菌实现了 1,4-丁二醇的生物合成<sup>[13]</sup>。他们通过分析代谢路径, 创造了从琥珀酸开始合成 1,4-丁二醇的代谢途径, 该途径需要六个步骤将 TCA 循环中间产物琥珀酸转化为 1,4-丁二醇, 并涉及六种酶的异源表达, 最终产量达到  $0.36 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。2016 年, Burgard 等通过对此路径进行计算模拟优化和途径工程改造, 以葡萄糖为底物, 使 1,4-丁二醇产量达到  $140 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 并且成功用于商业化生产<sup>[14]</sup>。

之后, 人们的研究兴趣开始转向广泛的底物种类选择中。2016 年, Ildikó Miklóssy 等利用甘油作为唯一碳源, 通过基因导入、基因敲除和启动子微调等手段, 实现了从甘油向 1,4-丁二醇的合成<sup>[8]</sup>, 产量只有  $0.89 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。2017 年, Yi 等通过非磷酸化代谢途径将木质纤维素生物质转化为 1,4-丁二醇, 包括从 D-木糖、L-阿拉伯糖和 D-半乳糖醛酸盐生产三羧酸 (TCA) 循环衍生物的非传统代谢工程<sup>[15]</sup>, 设计了一个基于生长的选择平台来识别大肠杆菌中的几个功能基因簇, 通过将半纤维素木聚糖非磷酸化代谢途径同化到 TCA 循环中构建了 1,4-丁二醇的人工生物合成途径。经过筛选和改造下游途径酶、 $\alpha$ -酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶, 构建了能够从 D-木糖、L-阿拉伯糖和 D-半乳糖醛酸盐中产生 1,4-丁二醇的大肠杆菌菌株, 产量分别为  $12.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $15.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $16.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 这项工作证明了非磷酸化代谢途径在提高生物合成效率的生物制造中的潜力。2019 年, Dai 等利用赤藓糖醇通过全细胞催化生产 1,4-丁二醇<sup>[16]</sup>。在研究了几个变量 (包括细胞密度、温度、底物浓度和 pH 值) 对 1,4-丁二醇产生的影响之后, 发现高温和酸性 pH 不利于 1,4-丁二醇的生产。在最佳条件:  $80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  赤藓糖醇为底物, 细胞密度 ( $\text{OD}_{600}$ ) 为 30 时, 1,4-丁二醇生产的最高浓度达到  $34.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 优化后产量增加了 5.8 倍。2020 年, Wang 等通过设计一个新的代谢平台, 能够从氨基酸中生产工业上重要的 C3-C5 二醇<sup>[17]</sup>。平台能够将带电氨基酸的自然分解代谢与催化效率高且热力学上有利的二醇形成途径结合起来, 同时将羧酸还原酶的底物范围扩大到非共轭  $\omega$ -羟基酸。基于这两点创建了生产平台。利用建立的平台作为网关, 可将氨基酸转化为七种不同的二醇, 包括 1,3-丙二醇、1,4-丁二醇和 1,5-戊二醇等, 特别优化了 1,4-丁二醇的生产, 最终产量可以达到  $1.41 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### 1.1.3 $\gamma$ -丁内酯的简介

$\gamma$ -丁内酯 (1,4-butyrolactone, GBL), 又名 1,4-丁内酯, 是一种有机化合物。分子式为  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$ , 相对分子量为 86.089, 为无色透明液体, 用于生产环丙胺、吡咯烷酮等药品, 也用作工业的溶剂、稀释剂、固化剂等。目前工业上的主要是通过脱氢氧化或者选择性加氢进行制备, 价格相较于葡萄糖等常见的原料来说比较昂贵。而且对人体会有轻微的危害性和毒性, 是三类致癌物, 被列为第三类易制毒化学品进行管控。

## 1.2 多酶级联系统的概述

### 1.2.1 多酶级联系统的简介

由特定生物催化剂催化的各种生化反应经过级联和相互作用形成的系统称为多酶级联催化系统<sup>[18]</sup>。最为常见的是细胞外的多酶级联催化系统<sup>[19]</sup>，级联反应通常是采用各种类型的酶制剂在体外进行设计和组合，以实现底物至产物的转换，如图 1-2 所示。它具有方法简单、副产物少且催化过程易控制的优点<sup>[20]</sup>。辅酶循环再生系统是最常见的细胞外多酶级联系统。因为辅酶具有不稳定性和较高的购买成本，所以需要一些酶（例如甲酸脱氢酶<sup>[21]</sup>、葡萄糖脱氢酶等）的辅助来实现高效、经济的辅酶循环再生。在本研究中，通过和来源于博伊丁假丝酵母（*Candida boidinii*）的甲酸脱氢酶 FDH 进行偶联反应借此实现了辅酶 NADH 的再生利用。与其他几种方法相比，多酶级联系统具有的优点如下所述：

（1）和传统的发酵法相比，转化液的成分比发酵液的成分简单，并且多酶级联催化系统的反应周期显著缩短，因此，其方法所制产品的摩尔转化率高、纯度高、分离方法简单、生产成本低且制备效率高<sup>[22]</sup>。

（2）相比于化学法，多酶级联系统能以单一的酶催化反应替换多步骤的复杂化学反应，具有底物特异性高、步骤简单、污染少的优点。在促进环境的可持续发展的同时，还有利于降低工业生产成本<sup>[23]</sup>。

多酶级联催化系统虽然具有以上优点，但仍存在一些未解决的问题。例如，由于特定酶活性不同或者各种酶的表达水平具有高低差异，导致催化效率不均衡，最终会影响总反应的转化率。此外，由于系统中最低反应速率的限制，导致了中间代谢产物的积累，使得级联反应的总速率下降，进而抑制总反应的继续，最终导致产量下降等<sup>[24]</sup>。这些问题限制了多酶级联催化系统拥有更广泛的应用，需要使用一些特定的改造手段对其中的限速酶进行优化来解决该技术目前存在的问题<sup>[18]</sup>。

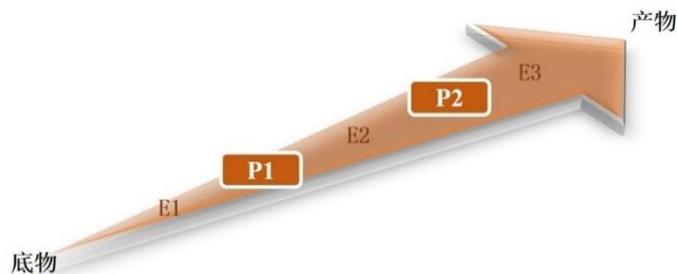


图 1-2 多酶级联系统的催化过程

Fig. 1-2 The catalytic process of a multi-enzyme cascade system

注：E1、E2 和 E3 为酶；P1、P2 为中间代谢产物

### 1.2.2 多酶级联系统的调控策略

通常情况下，由于多酶级联系统中各个酶的酶活性存在差异，反应速度最低的酶会造成中间代谢产物的积累，而过量的积累又会抑制系统内其他酶的酶活性，使总反应无法继续，所以需要控制每个酶在总反应过程中的反应速度，让它们处在一个相对平衡的

条件下<sup>[25]</sup>。优化核糖体结合位点（Ribosome binding sequence, RBS）的翻译强度<sup>[26]</sup>，增加基因拷贝数<sup>[27]</sup>，更换不同类型的启动子和终止子，使用不同拷贝数的兼容质粒，替换同义密码子<sup>[28]</sup>等方法是目前常用的调控方法。

（1）RBS 序列翻译强度的优化：目标基因的上游 RBS 序列会影响到蛋白质翻译的水平和速度，因此目的蛋白的表达可以通过基因上游 RBS 序列的插入，突变或替换来进行调控和优化。

（2）基因拷贝数的增加：通常来讲，酶蛋白的表达量会受到其基因拷贝数的影响，这就可以通过增加限速酶基因的拷贝数来提高多酶级联系统中限速酶的反应速度。然而宿主细胞中重组蛋白的表达不单单只受到拷贝数的影响，还和其他许多因素以及蛋白本身特性相关。

（3）更换不同类型的启动子和终止子：多酶共表达的常见策略是在同一个载体上表达多个基因。并由单个强大的启动子进行控制。但是连接到载体的基因数量增加时，基因的表达水平会出现降低的现象。目前常用的解决办法是在每个基因前都添加一个单独的启动子，让每个基因都在一个独立启动子的控制下进行表达。

（4）使用不同拷贝数的兼容质粒：虽说多个基因共表达常见于同一载体上，但还可以使用多载体系统进行共表达。这些基因首先与具有不同抗性和不同复制起源的质粒进行连接，再在同一个宿主细胞中进行表达。但是有时候其中一个质粒的存在可能会影响另一个质粒的拷贝数，导致另一质粒上蛋白表达水平的降低。同时，承载的质粒越多，宿主细胞要承受的能量负担也就越大，有时还会影响到细胞生长的速度。

（5）替换同义密码子：一般来说，密码子偏好性会对宿主细胞的外源基因表达水平造成影响。例如一些高频密码子和罕见密码子。因此使用一些同义密码子对某些特定基因序列进行修饰会提高外源基因在宿主细胞中的表达水平。

## 1.3 酶分子的半理性设计策略

### 1.3.1 半理性设计的简介

作为一种用途广泛、特异性强、催化效率高的生物催化剂。酶可以几何倍数的提升反应速率，同时还具有底物特异性，精致的对映体选择性和立体选择性<sup>[29]</sup>。不过，酶在自然界中的功能与研究人员所设想的具体要求和应用之间通常会存在显著差异。定向进化酶工程已成为定制目标蛋白的催化、生物物化和分子特性的首选策略<sup>[30]</sup>。但是研究人员渐渐地发现，这种方法可能会存在一些问题，因为即使是拥有着数百万成员的蛋白质文库，仍然只能够对平均蛋白质的巨大序列空间进行采样。实验方法的偏差以及遗传密码子的简并性进一步限制了文库的设计。许多研究人员便开始寻找新方法，他们并不是通过建立更大的文库或更多的筛选步骤来解决问题，而是超越了传统意义上的定向进化，提倡设计一种更小、质量更高的文库来解决上述问题。这些方法通常被称为半理性设计。

酶分子的半理性设计主要是指在对蛋白的理化性质、三维结构、构效关系、催化机理等信息有一定理解的基础上，加以计算机的辅助，对活性中心或者活性口袋的热点氨基酸进行定点突变、饱和突变、组合突变<sup>[31]</sup>。该方法介于非理性设计和理性设计之间，

克服了两者的缺点，降低了技术需求。只需要构建一定规模的突变体，利用合理的筛选方法，就能快速获得目标突变体。半理性设计既不同于定向进化以随机突变、片段重组的方式在体外改造目的基因，构建庞大的突变体文库并从中筛选阳性突变体的非理性设计<sup>[32]</sup>；又区别于单纯依靠于分子对接、分子动力学模拟、量子力学等计算技术对蛋白质从头设计的理性设计<sup>[33]</sup>。它结合了两者的优点，是现在应用最广泛，获得有益突变成功案例最多的主流技术。

### 1.3.2 半理性设计的策略

酶的半理性设计主要是将理性设计和蛋白质的随机设计结合起来用于酶活性的修饰改造<sup>[34]</sup>。它的主要策略方法有以下三点：

(1) 基于对蛋白质结构理解的基础上对于特定残基的目标随机化，如 Santoro 和 Schultz 使用靶向随机化修改了噬菌体 P1 中 Cre DNA 重组酶的底物特异性<sup>[35]</sup>，这种靶向文库方法，只对活性重要的关键活性碱基对接触。通过创建更少的文库和随机化的残基来寻找分离突变体。不仅预计成功的可能性会更高，同时与整个基因的随机诱变相比，需要更少的选择性扩增和诱变。

(2) 随机突变后再针对于特定残基位点的饱和突变，如 Geddie 和 Matsumura 利用从 DNA shuffling 技术中获得的信息，通过对几个“热点”进行组合位点饱和突变，修改了大肠杆菌  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶的底物特异性，使其活性有了 70 倍的增长<sup>[36]</sup>，Zou 等使用了饱和诱变和合理设计的组合来拓宽环氧化物水解酶的底物范围<sup>[37]</sup>。

(3) 基于计算机辅助的组合设计，如 Hayes 等开发了一种名为蛋白质设计自动化 (PDA) 的大型文库计算筛选策略<sup>[38]</sup>，用于预测可以采用所需折叠的最佳序列；Dwyer 等设计一种新的计算机辅助方法用于酶的活性位点设计等等<sup>[39]</sup>。

半理性设计方法已成为酶工程的首选方法。它有效利用了理性设计和定向进化的方法，通过结构信息对特定位置进行随机突变，限制了筛选文库的大小，为研究人员操纵生物催化剂提供了强大而有效的策略<sup>[40]</sup>。

## 1.4 辅酶循环再生系统

作为一种在实际工业生产应用中占比很高的一类酶，氧化还原酶在工业生物催化领域具有着重要的应用价值<sup>[41]</sup>。但是这一催化过程大部分都会需要辅酶 NADPH/NADP<sup>+</sup>、NADH/NAD<sup>+</sup>的参与，但是辅酶本身昂贵的价格以及不稳定性决定了在催化反应体系中添加大量辅酶是不切合实际生产的，而这也是氧化还原酶类在工业生产应用中进一步使用受到限制的原因。因此，构建一套低成本、高效环保的辅酶循环再生系统是很有必要的。

辅酶的循环再生基本原理是使辅酶在氧化态和还原态之间相互转化<sup>[42]</sup>。在实际生产应用当中，只要初始添加少量的辅酶，保证在反应体系中辅酶可以以一定催化浓度水平循环使用，就达到了辅酶循环利用的目的。目前辅酶循环再生<sup>[43]</sup>的主要方法包括：化学法、光化学法、电化学法和酶法。其中酶法又在生物催化领域中受到了广泛的应用。其优点是效率较高、选择性高、产物生成和辅酶再生相兼容等；但缺点是成本较高。

酶法催化辅酶循环又主要有酶偶联法和底物偶联法两种，其中酶偶联法使用较为广泛<sup>[44]</sup>，该方法所构造的循环再生系统区别于底物偶联法，该系统在一个催化体系中同时使用两种氧化还原酶催化不同方向的反应，一个酶催化底物获得产物，而另一个酶则通过催化另一方向的反应实现辅酶的循环再生。这种酶偶联辅酶循环再生法具有再生效率高、循环稳定性好、共底物廉价易得和反应条件容易控制等特点。

甲酸脱氢酶（Formate dehydrogenase, FDH, EC 号：1.2.1.2）可用于甲酸向二氧化碳方向的转化，同时伴随着  $\text{NAD}^+$  向  $\text{NADH}$  的还原，所以在工业上常见为辅酶  $\text{NADH}$  的再生酶。其中最常用的是来源于博伊丁假丝酵母（*Candida boidinii*）的甲酸脱氢酶，它目前已经被用来和其他氧化还原酶偶联，用于氨基酸、羧基酸以及手性醇等光学活性化合物的微生物转化生产当中，而这些产品又广泛应用于食品、医药及各种添加剂中，用途十分广泛<sup>[45]</sup>。然而野生型的 FDH 存在的问题是酶活较低，在组合生产的过程中容易出现的问题是辅酶  $\text{NADH}$  供应不足导致最终产品的转化率不高<sup>[46]</sup>。因此郑俊贤等通过利用不同来源的甲酸脱氢酶序列进行比对，获得了关键保守位置的差异点，再对其进行疏水性的改造分析，对获得的突变体进行酶学性质研究及酶动力学参数研究，最终获得了酶活、比酶活和催化效率上均有所提高的有益突变体<sup>[21]</sup>。

## 1.5 本论文的立题以及研究内容

### 1.5.1 本论文的立题依据

1,4-丁二醇是一种重要的商品化学品，广泛用于塑料、聚酯和氨纶纤维的生产。其年需求量约为几百万公吨。然而，1,4-丁二醇不能在任何已知微生物中自然产生。它仅由乙炔、丁烷或丁二烯等不可再生的石油化石原料通过化学法制造，不仅环境污染十分严重，而且还造成了化石能源稀缺等问题。鉴于人们对环境和化石能源成本的日益担忧，迫切需要开发一种高效清洁，利用可再生原料生产 1,4-丁二醇的完整生化途径。微生物法制备 1,4-丁二醇是近十多年来研究人员们的广泛关注的热点问题，从 2011 第一次成功报道利用工程大肠杆菌实现了 1,4-丁二醇的生物合成以来，已经有越来越多的人工合成 1,4-丁二醇的例子出现。研究前期设计了一条利用葡萄糖生产 1,4-丁二醇的合成路径（图 1-3），该路径相对于目前已报道的利用葡萄糖合成 1,4-丁二醇途径具有发酵生产路线短等特点。然而，该路径成功实施的关键是实现 4-羟基丁酸（GHB）到 1,4-丁二醇的高效催化反应。因此，本论文拟重点就如何提高 4-羟基丁酸到 1,4-丁二醇合成效率开展相关研究。但是由于 4-羟基丁酸为管制药品，很难获得且价格昂贵，因此，本论文在比较了 4-羟基丁酸的前体物质琥珀酸半醛（700 元/mg）以及  $\gamma$ -丁内酯（0.02 元/mg）价格之后决定使用较为廉价的  $\gamma$ -丁内酯作为底物进行研究，本论文的相关成果将为后续以葡萄糖为底物发酵合成 1,4-丁二醇及酶法催化合成 1,4-丁二醇高值衍生物（比如氨基丁酸、氨基丁醇）提供基础支撑。此外，1,4-丁二醇生产的化学法之一是通过催化  $\gamma$ -丁内酯生产 1,4-丁二醇，该工艺主要采用重金属催化剂钌（Ru）与酰胺基、TsDPEN、MsDPEN 在氧的作用下形成氧系钌酰胺复合物，该复合物在被 HCl 处理之后，还需要在含有 20%叔丁醇钾（t-BuOK）的 2-丙醇溶液中促进  $\gamma$ -丁内酯与加压  $\text{H}_2$ （5.0 MPa、60°C）

反应 48 h 后定量生成 1,4-丁二醇。具有操作涉及到高温高压操作，还需要昂贵的金属催化剂，整个过程要求较高、条件复杂、费用高、实验试剂对人体以及环境危害较大等劣势，本论文提出的多酶级联催化丁内酯合成 1,4-丁二醇具有环境优化等特点，有望对该化学法进行替代。

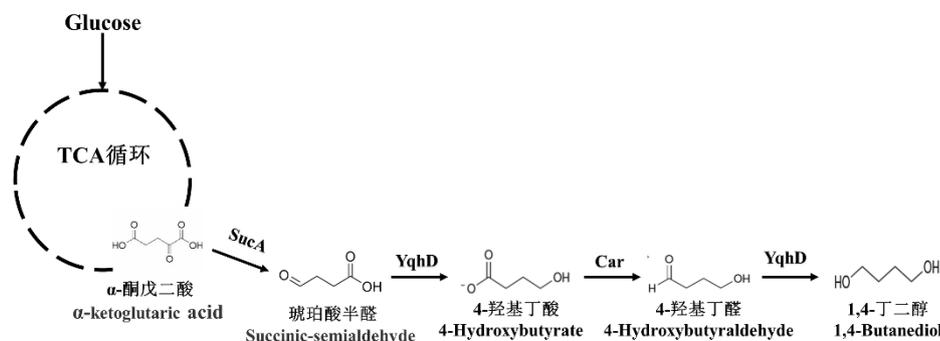


图 1-3 利用葡萄糖生产 1,4-丁二醇的路线设计

Fig. 1-3 Route design of 1,4-butanediol production from glucose

## 1.5.2 本论文的主要研究内容

本论文主要通过来源于红球菌 (*Rhodococcus* sp.TK6) 的己内酯水解酶基因、来源于海洋分枝杆菌 (*Mycobacterium marinum*) 的羧酸还原酶基因以及来源于大肠杆菌 (*Escherichia coli* K12 MG1655) 的醇脱氢酶基因分别在大肠杆菌 BL21 中进行表达，完整构建出以  $\gamma$ -丁内酯为底物合成 1,4-丁二醇的催化反应路径 (图 1-4)，该途径首先通过己内酯水解酶 ChnC 将  $\gamma$ -丁内酯水解为 4-羟基丁酸，接着在羧酸还原酶 Car 的作用下，将 4-羟基丁酸还原成 4-羟基丁醛 (4HB)，随后利用醇脱氢酶 YqhD 将 4-羟基丁醛进一步还原生成 1,4-丁二醇，同时通过引入甲酸脱氢酶 FDH 构建了 NADH/NAD<sup>+</sup> 辅酶循环再生系统；后续利用半理性分子设计对其中关键酶蛋白分子进行改造，以期建立一种更加高效、经济的酶法制备 1,4-丁二醇的多酶级联催化体系。研究内容主要包括以下几个方面：

(1) 在大肠杆菌 BL21 中分别克隆表达催化路径中的三种关键酶：己内酯水解酶 ChnC、羧酸还原酶 Car、醇脱氢酶 YqhD，之后通过诱导培养和蛋白纯化，进行酶活，比酶活以及酶学性质的分析；

(2) 利用构建好的关键酶重组菌株进行发酵诱导培养，获得关键酶的酶液，尝试进行多酶级联反应，并且通过对反应过程中底物、中间代谢产物以及终产物的检测分析找到转化途径中的关键限速酶；

(3) 针对于 ChnC 的酶学性质分析：发现该酶分子的温度稳定性较差，因此利用 SWISS-MODEL 软件和 UniProt 数据库对其三维的蛋白结构进行预测，之后通过 Disulfide by Design2 (网站：<http://cptweb.cpt.wayne.edu/DbD2/>) 进行二硫键的突变位点的预测，一共预测出十组突变位点；最后利用 FOLDX 进行突变计算和实验的验证，先通过计算排除掉  $\Delta G > 0$  的突变位点，然后实验验证剩余突变位点，最终找到一组半衰期时间显著延长的突变位点，借以提高催化能力；

(4) 针对于转化过程中中间代谢产物的分析：发现 Car 酶分子可能为此代谢路径

中的关键限速酶，因此利用 AutoDock 软件对其三维的蛋白结构进行建模，之后通过分子对接的手段模拟配体 4-羟基丁酸、辅酶和受体生物大分子蛋白 Car 的结合，预测其结合模式和亲和力，然后寻找出底物结合口袋位点中不优秀的点进行突变预测，最后在这些预测点中进行实验验证。一共预测出八个突变位点；最后利用转化实验验证野生型和突变体的催化能力强弱，找到一个转化效率相较于野生型有明显提升的突变位点。除此之外，基于 RBS 序列优化策略对 Car 酶蛋白的表达量进行了进一步的优化，以此提高催化效率；

(5) 优化多酶级联的转化条件，对催化过程中最适温度、pH、底物浓度以及酶活力添加量比例分别进行了优化；同时引入甲酸脱氢酶 FDH 构建了辅酶循环再生系统。

(6) 为了在低底物浓度条件下获得更高的产量，将底物流加策略运用于多酶级联催化合成 1,4-丁二醇的生产之中。

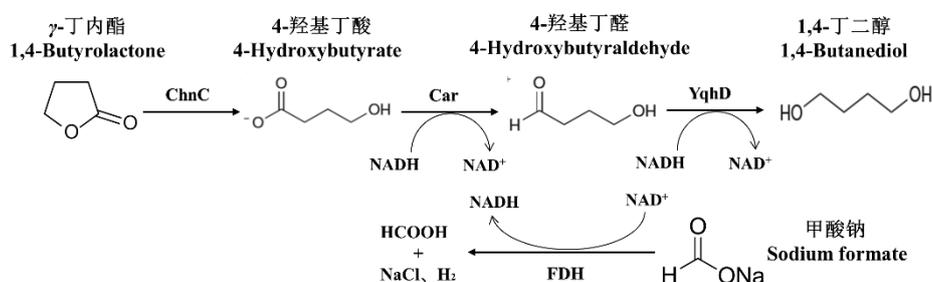


图 1-4 本论文中设计的 1,4-丁二醇的制备过程

Fig. 1-4 The preparation process of 1,4-butanediol designed in this study

## 第二章 材料与方法

## 2.1 主要材料

## 2.1.1 菌株, 质粒及引物

本论文中使用和构建的菌株和质粒见表 2-1。

表 2-1 本论文中使用和构建的菌株和质粒

Table 2-1 Strains and plasmids used and constructed in this study

质粒与菌株	基因型和特性	来源
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	表达宿主	研究室保藏
<i>E. coli</i> BL21/pET28a- <i>Cbfdh</i> <sub>A10C</sub>	含质粒 pET28a- <i>Cbfdh</i> <sub>A10C</sub> 的重组大肠杆菌	研究室保藏
pET28a	表达质粒, T7 启动子, 卡那霉素抗性	研究室保藏
pETDuet1	表达质粒, T7 启动子, 氨苄青霉素抗性	研究室保藏
<i>E. coli</i> BL21/pET28a- <i>Rschnc</i>	含质粒 pET28a- <i>Rschnc</i> 的重组大肠杆菌	本研究
<i>E. coli</i> BL21/pET28a- <i>Mmcar</i>	含质粒 pET28a- <i>Mmcar</i> 的重组大肠杆菌	本研究
<i>E. coli</i> BL21/pET28a- <i>Bssfp</i>	含质粒 pET28a- <i>Bssfp</i> 的重组大肠杆菌	本研究
<i>E. coli</i> BL21/pET28a- <i>Ecyqhd</i>	含质粒 pET28a- <i>Ecyqhd</i> 的重组大肠杆菌	本研究
<i>E. coli</i> BL21/pETDuet1- <i>Mmcar</i>	含质粒 pETDuet1- <i>Mmcar</i> 的重组大肠杆菌	本研究
<i>E. coli</i> BL21/pETDuet1- <i>Rschnc</i>	含质粒 pETDuet1- <i>Rschnc</i> 的重组大肠杆菌	本研究
<i>E. coli</i> BL21/pETDuet1- <i>Mmcar-Bssfp</i>	含质粒 pETDuet1- <i>Mmcar-Bssfp</i> 的重组大肠杆菌	本研究
<i>E. coli</i> BL21/pETDuet1- <i>Rschnc</i> <sub>K166C</sub>	含质粒 <i>E. coli</i> BL21/pETDuet1- <i>Rschnc</i> <sub>K166C</sub> 的重组大肠杆菌	本研究
<i>E. coli</i> BL21/pETDuet1- <i>Rschnc</i> <sub>A197C</sub>	含质粒 <i>E. coli</i> BL21/pETDuet1- <i>Rschnc</i> <sub>A197C</sub> 的重组大肠杆菌	本研究
<i>E. coli</i> BL21/pETDuet1- <i>Rschnc</i> <sub>K166C+A197C</sub>	含质粒 <i>E. coli</i> BL21/pETDuet1- <i>Rschnc</i> <sub>K166C+A197C</sub> 的重组大肠杆菌	本研究
<i>E. coli</i> BL21/pET28a- <i>Mmcar</i> <sub>A882H</sub>	含质粒 <i>E. coli</i> BL21/pET28a- <i>Mmcar</i> <sub>A882H</sub> 的重组大肠杆菌	本研究
<i>E. coli</i> BL21/pET28a-R1- <i>Mmcar</i>	含质粒 <i>E. coli</i> BL21/pET28a-R1- <i>Mmcar</i> 的重组大肠杆菌	本研究
<i>E. coli</i> BL21/pET28a-R5- <i>Mmcar</i>	含质粒 <i>E. coli</i> BL21/pET28a-R5- <i>Mmcar</i> 的重组大肠杆菌	本研究
<i>E. coli</i> BL21/pET28a-R10- <i>Mmcar</i>	含质粒 <i>E. coli</i> BL21/pET28a-R10- <i>Mmcar</i> 的重组大肠杆菌	本研究
<i>E. coli</i> BL21/pET28a-R10- <i>Mmcar</i> <sub>A882H</sub>	含质粒 <i>E. coli</i> BL21/pET28a-R10- <i>Mmcar</i> <sub>A882H</sub> 的重组大肠杆菌	本研究
<i>E. coli</i> BL21/pETDuet1-R1- <i>Mmcar-Bssfp</i>	含质粒 <i>E. coli</i> BL21/pETDuet1-R1- <i>Mmcar-Bssfp</i> 的重组大肠杆菌	本研究
<i>E. coli</i> BL21/pETDuet1-R5- <i>Mmcar-Bssfp</i>	含质粒 <i>E. coli</i> BL21/pETDuet1-R5- <i>Mmcar-Bssfp</i> 的重组大肠杆菌	本研究
<i>E. coli</i> BL21/pETDuet1-R10- <i>Mmcar-Bssfp</i>	含质粒 <i>E. coli</i> BL21/pETDuet1-R10- <i>Mmcar-Bssfp</i> 的重组大肠杆菌	本研究
<i>E. coli</i> BL21/pETDuet1-R10- <i>Mmcar</i> <sub>A882H-Bssfp</sub>	含质粒 <i>E. coli</i> BL21/pETDuet1-R10- <i>Mmcar</i> <sub>A882H-Bssfp</sub> 的重组大肠杆菌	本研究

本论文中所使用和构建的引物见表 2-2。

表 2-2 本论文中所使用和构建的引物

Table 2-2 Primers used and constructed in this study

引物	引物序列 (5'-3')
ChnCa-F	AGCAAATGGGTCGCGGATCCCATGACCAACAGCGTTCGTAG
ChnCa-R	TGTCGACGGAGCTCGAATTCCTATTTCTGATACCACGCCGCC
ChnCd-F	CATCACCACAGCCAGGATCCCATGACCAACAGCGTTCGTAG
ChnCd-R	GGCGCGCCGAGCTCGAATTCCTACTTCTGGTACCAGGCGGC
Cara-F	GCGGCAGCCATATGGCTAGCATGAGCCCGATCACCCG
Cara-R	TGGTGGTGGTGGTGTCTCGAGTTACAGCAGGCCAGCAGC
Card-F	ATAAGAAGGAGATATACATATGAGCCCGATCACCCG
Card-R	GTTTCTTTACCAGACTCGAGTTACAGCAGGCCAGCAGAC
YqhD-F	TGGGTCGCGGATCCGAATTCATGAACAACCTTAACTCTGCACACC
YqhD-R	TCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTTAGCGGGCGGCTTCG
Sfp-F	TGGGTCGCGGATCCGAATTCATGAAGATTTACGGAATTTATATGGACCG
Sfp-R	GGTGGTGGTGGTGTCTCGAGTTATAAAAGCTCTTCGTACGAGACCATTG
S-C-F	CTGCTGGGCCTGCTGTAAATGAAGATTTACGGAATTTATATGGACCG
C-S-R	CGGTCCATATAAATCCGTAATCTTCATTTACAGCAGGCCAGCAG
K166C-F	AGGGCGCTGATGAATCTUGUGTTCTGCTGTACACCCACGG
K166C-R	TGGGTGTACAGCAGAACAAGATTCATCAGCGCCCTGCGG
A197C-F	TGGCTAAAGCTCTGGGTU <sup><b>G</b></sup> CGTTTCTTTTCGTTCTGGATTACCGCC
A197C-R	TCCAGAACGAAAGAAACGCAACCCAGAGCTTTAGCCACG
A882H-F	TGATTGTTCGATCCGGCGCACCTCGTTAACCACGTTCTGCCG
A882H-R	AGAACGTGGTTAACGAGGTGCGCCGGATCGACAATCAGG
R1-F	AGAAAGAGGAGAAATACTAGCCATGGGCAGCAGCCAT
R1-R	CTAGTATTTCTCCTCTTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGGGAA
R5-F	TAAGCTTATCGGAAACTTCTACTAGCCATGGGCAGCAGC
R5-R	AGTAGAAGTTTTCCGATAAGCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGA GGGGAATTGT
R10-F	GCTTCGTAAAGGAGTTTCTACTAGCCATGGGCAGCAGC
R10-R	TAGGAAACCTCCTTAACGAAGCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAG AGGGGAATTGT

注：下划线为限制性酶切位点，加粗碱基为突变位点

### 2.1.2 主要试剂

Primer STAR<sup>®</sup> Max DNA 聚合酶、限制性内切酶、2×Taq DNA 聚合酶：均购于 TaKaRa 公司（大连）；ClonExpress II One Step Cloning Kit 试剂盒、胶回收试剂盒、质粒快速提取试剂盒和 2×Phanta<sup>®</sup> Max Master Mix 聚合酶：均购于南京诺唯赞公司；Bradford 法蛋白质浓度测定试剂盒、硫酸卡那霉素（Kan）和氨苄青霉素（Amp）：购于生工（上海）生物工程有限公司；酵母提取物、胰蛋白胨：购于 OXOID（英国）； $\gamma$ -丁内酯、1,4-丁二醇：购于上海麦克林生化科技有限公司；其他试剂均为国产分析纯。

### 2.1.3 主要仪器

本论文中所用到的仪器以及生产厂家见表 2-3。

表 2-3 本论文中所用到的仪器及生产厂家

Table 2-3 Instruments used in this study

仪器名称	生产厂家
超净工作台 BBS	济南来宝医疗器械有限公司
凝胶成像分析仪	上海天能生命科学有限公司
PCR 扩增仪	西安天隆科技有限公司
核酸电泳仪	南京麦高德生物科技有限公司
蛋白电泳仪	南京麦高德生物科技有限公司
UVP 凝胶成像分析仪	上海天能生命科学有限公司
恒温培养箱	青岛海尔生物医疗股份有限公司
分析天平	苏州赛恩斯仪器有限公司
恒温水浴锅	上海贝茵生物有限公司
往复式摇床	苏州赛恩斯仪器有限公司
立式蒸汽压力灭菌锅	上海尔迪仪器科技有限公司
酶标仪	南京德铁 DeTie 实验设备有限公司
紫外分光光度计	上海元析仪器有限公司
pH 计	上海博取仪器有限公司
细胞超声波破碎仪	上海之信仪器有限公司
AKTA 蛋白纯化仪	格来赛生命科技（上海）有限公司
低温冷冻离心机	日本 HITACHI 公司

#### 2.1.4 主要培养基

LB 液体培养基：称取 5 g 酵母提取物，10 g 胰蛋白胨，10 g 氯化钠（NaCl），加去离子水溶解然后定容至 1 L，115℃灭菌 20 min。

LB 固体培养基为在 LB 液体培养基的基础上添加 1.6%-1.8%的固体琼脂粉。

TB 培养基：称取 24 g 酵母提取物，12 g 胰蛋白胨，4 mL 甘油，然后加去离子水溶解定容至 900 mL，115℃灭菌 20 min；当溶液冷却至 60℃以下时，再加入 100 mL 灭菌的 17 mmol·L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 0.72 mol·L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 的溶液（该溶液的配置方法是 2.31 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 12.54 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶在足量的水中，使终体积为 100mL。高压灭菌或用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌）。

#### 2.1.5 主要实验溶液

抗生素母液：称取定量的卡那霉素粉末溶于去离子水中配制为终浓度 100 mg·mL<sup>-1</sup> 的卡那霉素、称取一定量的氨苄青霉素粉末溶于去离子水中配制为终浓度 50 mg·mL<sup>-1</sup> 的氨苄青霉素，使用无菌注射器和 0.22 μm 的滤膜在无菌环境中过滤除菌，在无菌干燥离心管中进行分装，置于-40℃冰箱中冷冻保藏。

异丙基硫代半乳糖苷（IPTG）母液：称取 IPTG 粉末配制为终浓度 1 mol·L<sup>-1</sup> 的母液，使用无菌注射器和 0.22 μm 的滤膜在无菌环境中过滤除菌，在无菌干燥离心管中进行分装，置于-40℃冰箱中冷冻保藏。

DNA 核酸胶及缓冲液：将购买的 50×TAE 母液使用去离子水稀释 50 倍，即稀释成

1×TAE 溶液, 1×TAE 溶液用做电泳缓冲液。然后以  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的浓度将琼脂糖溶解在 1×TAE 溶液中。再以每 10 mL 琼脂糖溶液加 2  $\mu\text{L}$  的核酸染色剂的比例制备成核酸胶溶液, 待凝固后方可使用。

**SDS-PAGE 电泳缓冲液:** 在 500 mL 左右的去离子水中加入 94 g 甘氨酸、15.1 g Tris 和 5 g 十二烷基硫酸钠 (SDS) 在常温下充分搅拌至溶解, 使用去离子水定容至 1 L, 常温放置保存。使用时用去离子水稀释 5 倍。

**蛋白纯化试剂:**  $M_0$  试剂: 用 800 mL 左右去离子水溶解 2.422 g Tris 和 29.22 g 氯化钠, 稀盐酸调 pH 至 7.4 左右, 最后去离子水定容至 1 L;  $M_{500}$  试剂: 在 800 mL 左右去离子水中溶解 2.422 g Tris、29.22 g 氯化钠及 34.04 g 咪唑, 浓盐酸调 pH 至 7.4 左右, 最后用去离子水定容至 1 L;  $M_{700}$  试剂: 用 800 mL 去离子水溶解 2.422 g Tris、29.22 g 氯化钠及 47.88 g 咪唑, 同样用浓盐酸调 pH 至 7.4 左右, 最后去离子水定容至 1 L; 三种溶液均需要经过在 0.22  $\mu\text{m}$  的水相滤膜抽滤、超声后进行使用。

**考马斯亮蓝 G-250 试剂:** 0.1 g G-250、85% 100 mL 磷酸溶液、90% 50 mL 乙醇溶液, 加去离子水溶解然后定容至 1 L, 室温保存使用。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 基因扩增以及质粒提取

根据相对应的编码或者 NCBI 号在 NCBI 网站中检索对应的基因序列, 然后选择酶切位点, 设计引物将该基因连接到表达质粒上, 引物序列见表 2-2, 以实验室保藏的大肠杆菌 *E. coli* K12 MG1655 的基因组或者生工 (上海) 生物工程有限公司合成质粒为模板对目的基因进行克隆扩增。相关 PCR 反应体系及程序, 均按照 PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA 聚合酶的说明书中设定。待 PCR 程序结束后, 回收 PCR 产物得到相应的目的基因。PCR 产物回收按照试剂盒相关说明进行操作。

首先将含有目的质粒的菌株在 LB 固体平板上进行划线, 活化菌种, 然后挑取单菌落接种于对应抗生素的培养基中进行培养, 按照说明书中的操作使用质粒提取试剂盒进行质粒的提取, 测定浓度, 将提取好的质粒保藏于  $-20^\circ\text{C}$  备用。

### 2.2.2 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞以及质粒转化

**感受态细胞:** 吸取少量 *E. coli* BL21 (DE3) 野生型菌株菌液, 在 LB 无抗板上划线活化, 然后接于培养基中进行培养, 再按照 1% 的接种量转接至 50 mL 培养基中, 菌液 OD<sub>600</sub> 为 0.4-0.6 时停止培养, 低温孵育 20-30 min, 使用感受态细胞制备试剂盒进行感受态细胞的制备。

**质粒转化:** 将制备好的连接产物或目的质粒加入到 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中, 冰浴 30 min 然后立马  $42^\circ\text{C}$  热激 90 s, 热激完毕之后再次放于冰浴中 10 min, 冰浴结束后加 800  $\mu\text{L}$  LB 液体培养基进行恢复培养, 培养条件:  $37^\circ\text{C}$ , 180  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 1 h。最后收集菌体进行平板涂布,  $37^\circ\text{C}$  倒置过夜培养。

### 2.2.3 关键酶的酶活以及酶学性质测定

己内酯水解酶的酶活利用气相色谱法进行测定。酶活反应的预混液中含有浓度为  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\gamma$ -丁内酯溶液（由浓度为  $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7.4 的磷酸盐缓冲液配制）。加入  $50 \text{ }\mu\text{L}$  适量稀释的待测样品，计时并开始反应，每隔一小时取一次样。以不同浓度的  $\gamma$ -丁内酯做标准曲线，计算每小时消耗的底物量。酶活定义为：每小时消耗  $1 \text{ }\mu\text{mol}$   $\gamma$ -丁内酯所需的酶量为 1 个酶活力单位（U）。

羧酸还原酶的酶活测定采用紫外分光光度法测定。反应体系包括： $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  R-3-氨基丁酸溶液（由于催化的底物 4-羟基丁酸属于管制药品，选取 R-3-氨基丁酸作为底物进行酶活测试）、 $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7.4 的磷酸盐（PBS）缓冲液、 $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NADH、 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  4-磷酸泛酰巯基乙胺（pantetheine 4'-phosphate）和  $50 \text{ }\mu\text{L}$  适量稀释的酶液，其中 Sfp 表达为磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶，负责通过将磷酸泛酰巯基乙胺基转移到酶蛋白的保守残基上，从而激发羧酸还原酶的活性。在  $340 \text{ nm}$  下，以不同浓度的 NADH 作标准曲线，计算每分钟所消耗的 NADH 的量。酶活定义为：每分钟消耗  $1 \text{ }\mu\text{mol}$  NADH 所需的酶量为 1 个酶活力单位（U）。

醇脱氢酶的酶活测定同样使用紫外分光光度法测定。反应的预混液中含有浓度为  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  4-羟基丁醛溶液、 $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7.4 的磷酸盐缓冲液以及  $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NADH。加入  $50 \text{ }\mu\text{L}$  适量稀释的待测酶液，在  $340 \text{ nm}$  下每一分钟记录一次吸光值。以不同浓度的 NADH 做标准曲线，计算每分钟消耗 NADH 的量。酶活定义为：每分钟消耗  $1 \text{ }\mu\text{mol}$  NADH 所需的酶量为 1 个酶活力单位（U）。

不同种类金属离子的影响：分别向酶活测定体系中加入  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的不同种类金属离子溶液，其他条件不变，观察不同种类金属离子体系中酶活的变化情况。

酶活力测定方法中标准曲线的绘制：准确配制  $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  NADH 溶液，稀释至  $0.02$ 、 $0.04$ 、 $0.06$ 、 $0.08$ 、 $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，在  $A_{340\text{nm}}$  下使用酶标仪进行吸光值的测定。以  $340 \text{ nm}$  处的吸光值为纵坐标，NADH 的浓度（ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ）为横坐标，绘制出图 2-1 中的 NADH 浓度的标准曲线。

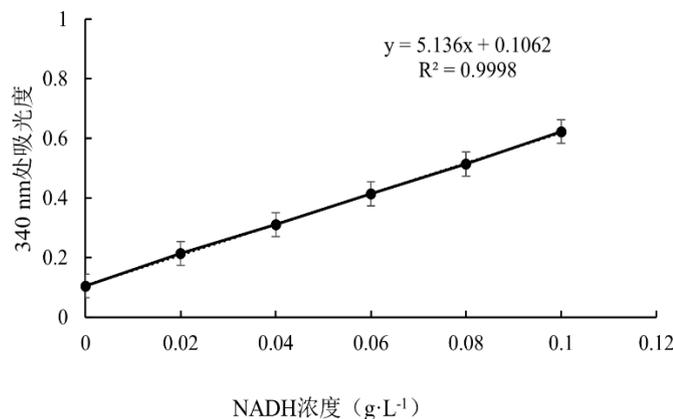


图 2-1 NADH 标准曲线

Fig. 2-1 The standard curve of NADH

最适温度：在一定 pH 条件下，将适量的纯酶液添加到反应液中，然后将反应体系

分别置于 25、30、37、40、50、60 °C 下进行反应，分别按照 2.2.3 中方法测定对应的酶活，每个都做三组平行实验。设定测量得到的最高酶活为 100% 对照，最高酶活所处温度即为该酶的最适温度，同时计算不同温度下的相对酶活力。

**最适 pH:** 将适量纯酶液分别添加到不同 pH 值的缓冲溶液中 (pH 4.0-6.0, 浓度为 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 的醋酸缓冲液; pH 6.0-7.4, 浓度为 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 的磷酸盐缓冲液; pH 7.4-9.0, 浓度为 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 的 Tris-HCl 缓冲液; pH 9.0-10.0, 浓度为 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液), 于最适温度下反应, 每个都做三组平行实验。设定测量得到的最高酶活为 100% 对照, 最高酶活所处 pH 值即为该酶的最适反应 pH, 同时计算不同 pH 值下的相对酶活力。

**温度稳定性:** 将适量的纯酶液分别于 25、30、37、40、50、60 °C 下孵育, 每隔一定的时间进行取样。在最适条件下测定酶活, 每个都做三组平行实验, 以初始酶活为 100% 对照, 计算放置不同时间后各个样品的相对酶活力, 考察不同温度下的稳定性。

**pH 稳定性:** 将适量的纯酶液加入到 pH 4-10 的缓冲溶液中 (其中 pH 4.0-6.0, 浓度为 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 的醋酸缓冲液; pH 6.0-7.4, 浓度为 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 的磷酸盐缓冲液; pH 7.4-9.0, 浓度为 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 的 Tris-HCl 缓冲液; pH 9.0-10.0, 浓度为 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液) 于 4°C 下孵育, 定时取样。然后在最适条件下测定各样品的剩余酶活。以初始酶活为 100%, 考察各酶在不同 pH 值下的 pH 稳定性。

## 2.2.4 关键酶分子的半理性设计改造

三维结构上相邻的两个半胱氨酸在一定条件下会形成二硫键, 一些研究表明, 通过在蛋白结构中引入一对彼此在空间结构中较为靠近的半胱氨酸 (Cys) 残基以形成分子内二硫键, 可以有效提高蛋白热稳定性以及耐热性。因为二硫键能够通过降低蛋白质的解折叠构象熵值从而提高蛋白质的稳定性。所以, 在合适的位置构建二硫键能够提高酶的耐热性。Disulfide by Design2 软件专门用于对蛋白模型进行二硫键的预测改造计算, 通过查找二硫键中各原子之间距离及键角等信息得知, 蛋白质的二硫键中, C<sub>β</sub>-S<sub>γ</sub>-S<sub>γ</sub> 之间的键角大约为 104.15 度。而二硫键设计软件 (Disulfide by Design2) 可以利用该信息分析蛋白质的结构中哪些氨基酸之间可能会形成二硫键, 进而通过在某些特定的位置引入二硫键以提高蛋白质的热稳定性。经过该软件的预测模拟之后, 再次使用 FOLDX 软件进行突变自由能  $\Delta G$  的计算, 排除掉突变之后自由能上升的一些位点, 剩下的再通过实验去进行验证, 最终利用计算机模拟手段和实验的实践验证得到优秀的热稳定性突变体。

SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 可用于蛋白的预测建模, 成功建模之后用软件 Pymol 对目标蛋白的三维模型进行结构分析。蛋白结构模型成功分析预测出来之后, 利用 AutoDock 对得到的蛋白质模型进行加氢、去水以及电荷处理, 底物配体结构则通过 Chem3D 绘制并生成三维结构。用 AutoDock 处理后, 将蛋白大分子和配体小分子进行模拟对接, 然后就可以利用计算手段分析出底物结合口袋部位关键残基以及一些可以突变改造的点位, 针对这些预测出的位点改造, 加以实验辅助验证, 就可以筛选出优秀的突变体。

### 2.2.5 全质粒 PCR 构建突变株

反向 PCR 方法常用于目的基因的定点突变。重组质粒按照表 2-2 的突变引物进行 PCR 扩增后，提取一部分 PCR 产物用于 DNA 凝胶电泳检测。条带大小验证正确之后，在 37°C 下加入 *Dpn* I 酶进行模板的消化，消化时间 30 min。消化完成之后按照质粒转化的方法进行突变株的构建培养。培养完成之后进行质粒的提取并测序验证是否突变成功。

### 2.2.6 重组菌株的诱导表达分析

重组菌和突变菌株首先进行划线活化，然后挑取单菌落接种于 10 mL 含氨苄青霉素或卡那霉素抗性的 LB 培养基中培养 12 h。之后再以 1% 接种量接种至 50 mL TB 培养基中继续进行培养，37°C、180 r·min<sup>-1</sup> 条件下培养 2 h 之后；加入终浓度为 0.8 mmol·L<sup>-1</sup> 的 IPTG 进行诱导，诱导条件为 16°C、160 r·min<sup>-1</sup>，诱导时间为 16 h。离心收集细胞，用 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 的磷酸盐缓冲液洗涤 2 次后悬浮。然后使用细胞超声波破碎仪对细胞进行破碎，温度控制在 4°C。将破碎液在 4°C、12000 r·min<sup>-1</sup> 条件下离心 30 min 去除细胞破碎杂质，用于蛋白纯化。

### 2.2.7 关键酶蛋白的纯化以及浓度测定

由于亲和镍离子柱可以与组氨酸 (His) 标签进行结合，根据这一特性可以对细胞破碎上清液进行纯化，得到关键酶蛋白的纯酶液。使用 AKTA 蛋白纯化仪和 1 mL 的亲和镍离子柱 (His Trap FF) 进行纯化，蛋白纯化步骤如下所述：

首先细胞破碎上清液用 0.22 μm 的滤膜进行过滤，除去较大的杂质，然后用 M<sub>0</sub> 试剂冲洗仪器基线，大约需要冲洗 10-15 mL。待基线平稳之后将上清液注入到上样环之中，利用镍柱的特性吸附关键蛋白。最后使用 M<sub>500</sub> 或 M<sub>700</sub> 试剂进行梯度洗脱，根据吸收峰的面积大小判断目的蛋白的出峰位置，并进行收集。收集完毕之后用 SDS-PAGE 进行验证，若蛋白条带大小正确，那么证明纯化收集成功，加入 10% 甘油并放置于 -40°C 冰箱中进行保存。

蛋白含量的测定步骤如下：

蛋白浓度标准曲线：由稀释得到不同浓度 (0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 mg·mL<sup>-1</sup>) 的 BSA 标准蛋白溶液。吸取 50 μL 不同浓度的稀释液加入到酶标板中，加入 250 μL 考马斯亮蓝 G-250 试剂，在室温下反应 5 min，使用酶标仪在 595 nm 下进行吸光值的测定。以 BSA 蛋白质含量 (mg·mL<sup>-1</sup>) 为横坐标，A<sub>595nm</sub> 吸光度值为纵坐标，绘制的蛋白浓度标准曲线如图 2-2。

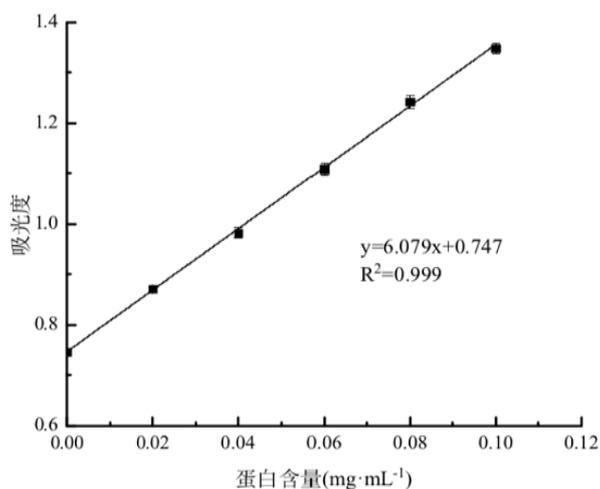


图 2-2 蛋白浓度标准曲线

Fig. 2-2 Standard curve of protein concentration

蛋白样品浓度的测定：同样吸取 50  $\mu\text{L}$  的蛋白样品加入 250  $\mu\text{L}$  的考马斯亮蓝 G-250 试剂，反应 5 min，使用酶标仪在 595 nm 下进行吸光度的测定。以标准曲线为标准，计算蛋白样品的浓度。若蛋白样品浓度过高可进行适当稀释。

### 2.2.8 基于 RBS 序列优化增强关键酶蛋白表达量

RBS 序列的强度大小会影响酶的表达水平，而酶的表达水平高低也会间接影响到酶活力。所以可以使用 RBS 优化的策略来提高某些蛋白的酶活。首先利用在线计算器计算出 Car 的初始 RBS 强度，然后根据这个初始的 RBS 强度数值进行不同强度 RBS 序列的计算器预测。利用预测出来的 RBS 序列进行引物的设计，具体引物序列见表 2-2。然后将替换 RBS 序列之后的突变株进行诱导表达，进行蛋白表达量的比较。

### 2.2.9 多酶级联制备 1,4-丁二醇的条件优化

发酵培养关键酶的重组菌株，离心、收集菌体、破碎细胞并纯化之后用于多酶级联转化条件优化。转化体系为 100 mL，包括  $\gamma$ -丁内酯、NADH、甲酸钠、关键酶酶液及磷酸盐缓冲液（pH 7.0，100  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ）。

最适 pH：控制反应温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ ， $\gamma$ -丁内酯 10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，相同酶活力添加量的关键酶酶液进行多酶级联催化反应。而 pH 条件分别设置为 6.0、7.0、8.0、9.0，采用气相色谱法检测转化液中 1,4-丁二醇、4-羟基丁醛以及  $\gamma$ -丁内酯的含量。

最适温度：控制反应 pH 值相同， $\gamma$ -丁内酯 10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，相同酶活力添加量的关键酶酶液进行转化，反应温度分别为 20、25、30、35、37、40 $^{\circ}\text{C}$ ，气相色谱法检测转化液中 1,4-丁二醇、4-羟基丁醛以及  $\gamma$ -丁内酯的含量。

最适底物浓度：控制反应温度和 pH 值相同，设置不同浓度的  $\gamma$ -丁内酯：5、10、15、20  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，进行多酶级联催化，气相色谱法检测转化液中 1,4-丁二醇、4-羟基丁醛以及  $\gamma$ -丁内酯的含量。

### 2.2.10 基于底物流加策略进行多酶级联制备 1,4-丁二醇

$\gamma$ -丁内酯作为一种有机试剂，添加浓度过高会大大影响多酶级联催化反应体系中关

键酶的酶活，所以在初始底物浓度较低的情况下，为了获得更高浓度的 1,4-丁二醇，本研究决定采用底物流加策略来进行多酶级联的转化；初始添加  $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\gamma$ -丁内酯，每反应 12 h 补加一次等量的  $\gamma$ -丁内酯，分别添加一次、两次和三次，以不进行底物流加作为对照，对比 1,4-丁二醇产量以及摩尔转化率的变化。

### 2.2.11 1,4-丁二醇气相色谱分析测定方法

在多酶级联催化反应过程中定时取样，将样品经过乙酸乙酯萃取以及无水硫酸镁除水后用甲醇稀释，经过气相色谱法进行 1,4-丁二醇、 $\gamma$ -丁内酯和 4-羟基丁醛的检测<sup>[50]</sup>，色谱柱型号为 HP-Innowax ( $60\text{ m}\times 0.25\text{ mm}\times 0.5\text{ }\mu\text{m}$ ) 色谱柱。检测条件设置为：初始柱温  $70^\circ\text{C}$ ，保持 1 min，以  $20^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  的速度升温至  $220^\circ\text{C}$ ，保持 5 min。进样口温度： $230^\circ\text{C}$ 。载气：氦气（纯度 $\geq 99.999\%$ ），流速  $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。进样方式：脉冲不分流进样；进样脉冲压力：30 psi；时间：0.5 min；进样量：1  $\mu\text{L}$ 。具体参照文献<sup>[51]</sup>。

## 第三章 结果与讨论

### 3.1 关键酶基因的克隆表达

#### 3.1.1 重组质粒的构建

己内酯水解酶 ChnC (EC 3.1.1.83) 已被报道可用于多种多元碳酯环的水解<sup>[52]</sup>, 因此选择了来源于红球菌 (*Rhodococcus* sp.TK6) 的己内酯水解酶。在 NCBI 数据库中检索到该 *Rschnc* 基因的序列, 长度为 1179 bp, GenBank 登录号: AY486161.1。之后委托生工(上海)生物工程有限公司进行了基因合成。以 *Bam*HI 和 *Eco*R I 酶切位点序列和 *Rschnc* 基因序列为模板设计了目的基因的上下游引物 (表 2-2)。利用所设计的引物进行目的基因的扩增, *Rschnc* 目的基因条带如图 3-1 所示, 所扩增的 PCR 产物在 1179 bp 左右, 且条带较亮、较粗即成功扩增目的基因 *Rschnc*。

同样的, 根据文献报道筛选羧酸还原酶<sup>[53]</sup>。羧酸还原酶主要用于羧基的还原, 它需要磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶<sup>[54]</sup> (作为纯化蛋白或在大肠杆菌中共表达) 在 T 结构域中的保守丝氨酸残基处进行翻译后的磷酸泛乙酰化<sup>[55]</sup>。而大多数来源的羧酸还原酶底物偏好基本重叠<sup>[56]</sup>, 包括芳香族、杂芳香族和脂肪族 (C2 至 C18) 羧酸, 以及双官能羧酸 (二酸、羟基酸、含氧酸和氨基酸)。以单羧酸为底物, 纯化的羧酸还原酶对 C3-C16 底物表现出显著的还原酶活性, 对 C4-C12 酸具有最大活性<sup>[57]</sup>。最终选取了来源于海洋分枝杆菌 (*Mycobacterium marinum*) 的羧酸还原酶<sup>[58]</sup>, 在 NCBI 数据库中检索到该基因 *Mmcar* 的序列长度为 3525 bp, GenBank 登录号: NZ\_CP058277.1。并委托生工(上海)生物工程有限公司对其进行合成。随后, 以 *Nhe*I 和 *Xho*I 酶切位点序列和 *Mmcar* 基因序列为模板设计了目的基因的上下游引物 (表 2-2)。利用所设计的引物进行目的基因的扩增, *Mmcar* 目的基因条带如图 3-1 所示, 在 3525 bp 左右存在较亮、较粗的目的基因 *Mmcar* 条带。

根据现有文献报道证明, 大多数细菌类的醇脱氢酶具有 40-50% 的序列相似性, 当醇脱氢酶被用于它的可逆反应即醛还原时有一些则表现不出活性<sup>[59]</sup>。为了找出拥有短链醛还原活性的醇脱氢酶, 从相关文献中查找筛选, 本研究最终确定了来源于大肠杆菌 (*E. coli* K12 MG1655) 的醇脱氢酶<sup>[60]</sup> (YqhD, GenBank 登录号: AP009048.1), 当用短链醇作为底物进行测试时, 它显示不出来任何可以检测的酶催化活性<sup>[61]</sup>。相反的, 它只显现出来显示了短链醛的还原活性, 包括一些不饱和或羟基化的醛。通过这些实验分析确定了它可以用 4-羟基丁醛的还原。以 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切位点序列和 *Ecyqhd* 基因序列为模板设计了上下游引物即表 2-2 中所列, 利用所设计的引物进行目的基因的扩增, 结果如图 3-1 所示, 可见条带位置与目标基本一致, 在 1164 bp 左右。

按照 2.2.1 以及 2.2.2 的方法将表达质粒 pETDuet1 用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Eco*R I 双酶切, 在 37°C 水浴 1 h 进行酶切, 酶切之后进行凝胶琼脂糖电泳, 将得到的双酶切产物和目的基因 *Rschnc* 的 PCR 产物胶回收以后进行同源重组酶连和质粒的转化。成功转化即说明 *E. coli* BL21/ pETDuet1-*Rschnc* 重组大肠杆菌构建成功。

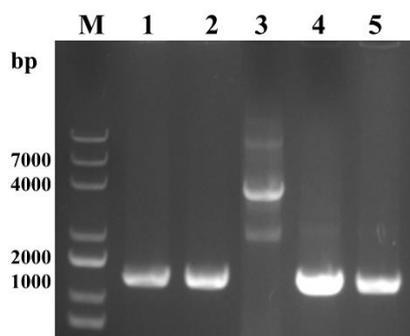


图 3-1 关键目的基因的扩增克隆

Fig. 3-1 Cloning and amplification of key genes

M: DNA Marker; 1-2: 基因 *Rschnc*; 3: 基因 *Mmcar*; 4-5: 基因 *Ecyqhd*

将质粒 pETDuet1 用限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Xho* I 进行双酶切和凝胶琼脂糖电泳，双酶切产物和 *Mmcar* 基因的 PCR 产物同样进行胶回收、同源重组酶连以及质粒转化。完成 *E. coli* BL21/pETDuet1-*Mmcar* 重组大肠杆菌的构建。

用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 将质粒 pET28a 进行双酶切，在 37°C 水浴 1 h 进行酶切，然后进行凝胶琼脂糖电泳，对 PCR 扩增得到目的基因 *Ecyqhd* 的片段和双酶切产物进行胶回收、同源重组酶连和质粒的转化。构建 *E. coli* BL21/pET28a-*Ecyqhd* 重组大肠杆菌。

### 3.1.2 重组酶的表达情况分析

在 50 mg·L<sup>-1</sup> 氨苄青霉素或卡那霉素抗性的 LB 平板上进行重组菌株的划线活化，活化后的单菌落进行接种培养，于 37°C、160-180 r·min<sup>-1</sup> 的条件下培养 12 h，得到种子液；将种子液以 1% 的接种量转接入 50 mL 的 TB 培养基中，继续培养 2 h 至 OD<sub>600</sub> 为 0.8，得到发酵液；发酵液在加入终浓度为 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> 的 IPTG 后于 16°C 诱导 12-14h。发酵完毕之后，在 4°C，8000 r·min<sup>-1</sup> 的条件下离心 10 min 收集菌体；将菌体用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液清洗两次后彻底洗去培养基；最后将菌悬液置于细胞破碎仪中破碎，待破碎完毕之后，4°C、12000 r·min<sup>-1</sup> 条件下离心 30 min 获得细胞破碎上清液。吸取适量上清液处理后用 SDS-PAGE 分析蛋白的表达情况，结果如图 3-2 所示，其中重组菌 *E. coli* BL21/pETDuet1-*Rschnc* 的细胞破碎上清液在约 43 KDa 位置处有明显的蛋白条带，说明重组质粒 pETDuet1-*Rschnc* 已经成功的导入到 *E. coli* BL21 宿主中，并实现成功表达；重组菌 *E. coli* BL21/pETDuet1-*Mmcar* 的细胞破碎上清液在约 129 KDa 位置处有明显的蛋白条带，说明重组质粒 pETDuet1-*Mmcar* 已经成功的导入宿主，即重组菌株 *E. coli* BL21/pETDuet1-*Mmcar* 成功构建；重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-*Ecyqhd* 的细胞破碎上清液蛋白条带约在 42 KDa 位置处，说明重组大肠杆菌 *E. coli* BL21/pET28a-*Ecyqhd* 成功构建。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/058115070024006042>