

罗伊乳酸杆菌甘油脱水酶基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达

平丽英, 柳志强, 薛亚平, 郑裕国

浙江工业大学生物工程研究所, 杭州 310014

摘要: 迅速升温的生物柴油投资热导致了其副产物甘油的大量积累, 这一现状使得开发和利用甘油生产各种精细化工产品备受关注。本实验通过构建基因工程菌来生物转化甘油生产 3-羟基丙醛, 为甘油下游产品的开发开辟了一条新途径。3-羟基丙醛是一种重要的化学中间体, 同时也是一种有效的抗菌剂和生物组织的固定剂, 在化学工业中具有广泛的应用前景。实验主要利用甘油脱水酶 N 末端序列, 并根据 NCBI 中公布的甘油脱水酶的氨基酸序列设计了一对克隆引物, 并以菌株罗伊乳酸杆菌 *Lactobacillus reuteri* 的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 获得约为 1.6 kb 的片段, 将其克隆到 T 载体上进行测序, 对测序结果进行分析, 重新设计两端含有 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点的表达引物, 利用 PCR 扩增得到了甘油脱水酶基因, 该基因片段长度为 1674 bp, 编码 558 个氨基酸。将所得片段定向克隆到 pET28b 载体中, 并转化至大肠杆菌 BL21 感受态细胞中。经 IPTG 诱导后, 进行 SDS-PAGE 电泳, 在约 65 kD 处检测出一蛋白表达条带, 另外还对该重组菌进行比活力测定, 最高比活力可达 1.14 U/mg, 比野生型菌株提高了 86.88%。

关键词: 乳酸杆菌, 甘油脱水酶, 克隆, 表达

Cloning and expression of *Lactobacillus reuteri* glycerol dehydratase gene in *Escherichia coli*

Liyong Ping, Zhiqiang liu, Yaping Xue, and Yuguo Zheng

Institute of Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

Abstract: There is growing interest in biodiesel and this results in the accumulation of glycerol. The exploitation and application of glycerol has attracted more and more attention. In the current study, glycerol was biotransformed to produce 3-hydroxypropionaldehyde by genetic engineering bacteria. It is known that 3-hydroxypropionaldehyde has been widely used as an important intermediate for chemicals, effective antimicrobial agent, and fix agent for tissues. A pair of primers was designed on the basis of the sequence of both NH₂-terminus and the amino acid sequence of glycerol dehydratase reported by NCBI, and a fragment about 1.6 kb was obtained by PCR amplification using the total genome DNA of *Lactobacillus reuteri* as template, then the fragment was cloned to the pMD18-T vector and sequenced. Two specific primers were designed according to the obtained sequence, and a fragment with length of 1674 bp was amplified using PCR with these two specific primers. Consequently, the resulting products were digested with *EcoR* I and *Hind* III and ligated using T4 DNA ligase to the pET28b vector digested with the same enzymes. The

Received: September 25, 2009; **Accepted:** November 19, 2009

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2009CB714304).

Corresponding author: Yuguo Zheng. Tel: +86-571-88320360; Fax: +86-571-88320360; E-mail: Zhengyg@zjut.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2009CB714304) 资助。

recombinant plasmid, named pET28b-dhaB, was transformed into *E. coli* BL21. The positive clones were induced with IPTG and the expression products were further analyzed by SDS-PAGE, indicating that protein with a molecule weight of around 65 kD was obtained. Furthermore, the glycerol dehydratase activity was evaluated and compared with the wild type strain as well.

Keywords: *Lactobacillus reuteri*, glycerol dehydratase, cloning, expression

随着全球石油储备的日益减少和温室效应等带来环境压力的不断加剧,生物燃料的生产和开发势在必行。生物柴油这一典型的“绿色能源”便应运而生,生物柴油作为石化燃料替代品,具有可生物降解、无毒、安全等优点^[1-2]。然而,迅速升温的生物柴油投资热导致了其副产物——甘油的大量积累,每生产 9 kg 生物柴油约产生 1 kg 的甘油,这使得甘油的产量快速增长;在美国甘油每年的产量约为 3.2 亿英镑,而全世界范围内甘油每年的产量约为 8 亿英镑,这就导致了甘油的价格也随之不断下降,2004 年甘油的市场价为 5~15 美分/磅,而目前其售价约为 2.5 美分/磅^[3-4]。甘油大量积累这一现状使得寻求甘油利用的新用途倍受关注,已成为各国研究机构竞相研究的热点。

甘油的分子结构特征决定了它的广泛应用,甘油可以被氧化、还原、酯化、羟化同时还可以脱水生成丙烯醛^[3,5-7]。高纯度的甘油是一种非常重要的工业原料,在食品、药品、烟草和化妆品等工业中被广泛应用^[6,8-9]。生物法转化甘油生产各种精细化工产品是解决甘油过剩的有效途径之一,同时也符合绿色化学和可持续发展的要求。

甘油脱水酶(dhaB)能催化甘油、1,2-丙二醇和乙醇分别生成 3-羟基丙醛、丙醛和乙醛,在化学工业中具有广泛的应用前景^[10]。其主要存在于克雷伯氏杆菌、乳酸杆菌、弗氏柠檬菌和巴氏梭状芽孢杆菌中。甘油脱水酶是由 α 、 β 、 γ 三个亚基通过非共价键的疏水作用缔合而成的异形六聚体,只有在辅酶维生素 B₁₂ 存在时才能发挥其催化作用^[11-12]。为了进一步研究甘油脱水酶的结构,探索酶的功能并对其进行合理的改造,国内外众多研究者进行了广泛的尝试和研究。

本研究试图建立用基因工程的方法生产 3-羟基丙醛的技术平台,为甘油脱水酶进一步的工业应用奠定必要的理论和实践基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

罗伊乳酸杆菌 *Lactobacillus reuteri* 由本实验室筛选并保藏,该菌现保藏在武汉普通培养物保藏中心,保藏编号: CCTCC M 209213; 大肠杆菌 BL21 (DE3)和表达载体 pET28b 由本实验室保存;克隆载体 pMD18-T 购自大连宝生物工程有限公司。

1.2 培养基、酶及试剂

罗伊乳酸杆菌采用 MRS 培养基进行富集培养,具体配方参照文献[13]; 大肠杆菌采用 LB 培养基,配方参照文献[14]。*EcoR* I、*Hind* III 内切酶、T4 DNA 连接酶均购自大连宝生物工程有限公司; DNA Marker、Protein Marker 均购自 TaKaRa 公司; AxyPrep DNA 清洁试剂盒、AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒购自北京赛百盛生物技术公司; 微生物基因组提取试剂盒购自美国 MP 公司。

1.3 基因组 DNA 的提取

实验采用快速核酸提取仪及微生物基因组提取试剂盒提取罗伊乳酸杆菌的基因组 DNA。

1.4 甘油脱水酶基因的扩增

根据 NCBI 报道的甘油脱水酶基因和氨基酸序列及序列同源性分析,利用软件 DNAMAN 设计了一对克隆引物: P1: 5'-ATGAAACGCCAAAAACGCTTTG-3'; P2: 5'-CAGTTCAGGTGTTCCGGATC C-3'。

以罗伊乳酸杆菌基因组 DNA 为模板,利用引物 P1、P2 进行 PCR 扩增(美国 BioRad 公司, PTC200 扩增仪),PCR 反应条件为: 95°C 预变性 5 min; 94°C 变性 50 s, 55°C 复性 1.5 min, 72°C 延伸 2 min, 重复 35 个循环; 72°C 延伸 10 min。扩增结束后用 0.9%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.5 目的基因的回收

目的基因的回收采用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒,具体步骤见试剂盒使用说明书。

1.6 克隆载体的构建与鉴定

1.6.1 甘油脱水酶基因的克隆

将回收的目的片段同载体 pMD18-T 进行连接, 连接体系组成: pMD18-T 载体 1 μ L, 胶回收产物 5 μ L, solution I 4 μ L, 混合均匀后 16 $^{\circ}$ C 连接 12~16 h, 构建重组质粒 pMD18-T-dhaB。连接后按分子克隆实验手册提供的方法将重组质粒转化到 *E. coli* JM109 宿主菌中^[14]。

1.6.2 蓝白斑筛选阳性单克隆

将转化后的菌液涂布到含 24 μ g/mL 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG)、50 μ g/mL 氨苄青霉素(Amp)、40 μ g/mL 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷(Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside, X-gal)的 LB 琼脂平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜^[14]。利用蓝白斑筛选法, 从平板上挑取白色单菌落, 提取质粒后用自动序列仪进行测序(由大连宝生物工程有限公司完成), 并用 DNAMAN 软件分析测序结果。

1.7 表达载体的构建与鉴定

1.7.1 甘油脱水酶结构基因的扩增

在 1.6.2 测序结果的基础上, 设计一对含有 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点的表达引物 P3、P4。P3: 5'-GCCGAATTCATGAAACGCCAGAAACGCTT TGAAG-3'(下划线部分为 *EcoR* I 酶切位点); P4: 5'-AATAAGCTTCAGTTCCAGGXTGTTCCGGATC CAGAG -3'(下划线部分为 *Hind* III 酶切位点)。

以质粒 pMD18-T-dhaB 为模板, 利用表达引物 P3、P4 扩增甘油脱水酶基因, 具体的 PCR 过程见 1.4。

1.7.2 表达载体的构建

胶回收后的甘油脱水酶基因用 *EcoR* I 和 *Hind* III 37 $^{\circ}$ C 酶切 5 h, 酶切结束后用 DNA 纯化试剂盒进一步的纯化。将表达载体 pET28b 同样用 *EcoR* I 和 *Hind* III 在 37 $^{\circ}$ C 酶切 5 h, 然后用 DNA 回收试剂盒回收。载体和目的基因酶切后进行连接, 构建表达重组质粒 pET28b-dhaB。

1.7.3 阳性单克隆的筛选

将 1.7.2 中构建好的表达质粒热击转化至大肠杆菌 BL21 宿主菌中, 然后涂布到含有 50 μ g/mL 卡那霉素(Kan)的 LB 琼脂平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。从

平板上筛选阳性单菌落, 接种于含 50 μ g/mL Kan 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、250 r/min 培养过夜。利用质粒抽提试剂盒提取质粒, 然后用 *EcoR* I 和 *Hind* III 在 37 $^{\circ}$ C 酶切 5 h, 电泳检测酶切产物, 以验证载体与目的基因是否连接。

1.8 诱导表达

将鉴定为阳性的单克隆接种于 5 mL 含有浓度为 50 μ g/mL Kan 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、250 r/min 培养过夜。取 500 μ L 培养物, 将其转接于 50 mL 含有浓度为 50 μ g/mL Kan 的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C、250 r/min 培养至菌体浓度 OD_{600} 约为 0.6~0.8 左右。向培养物中分别加入 0.1 mmol/L、0.5 mmol/L、1 mmol/L IPTG 诱导培养 10 h^[14]。收集菌体供电泳分析及酶活力测定。

1.9 表达产物 SDS-PAGE 分析

以转入空载体的大肠杆菌 BL21 菌体作为对照。鉴定为阳性的 *E. coli* BL21/pET28b-dhaB 重组菌经 IPTG 诱导培养一定时间后, 取 0.5 mL 诱导培养物, 离心收集菌体, 重悬于 50 μ L 蒸馏水中, 加入 50 μ L 上样缓冲液, 混匀后煮沸 10 min, 进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.10 酶活力测定

以未经转化的 *E. coli* BL21 菌株和未诱导的重组菌株作为对照, 挑取 2 个阳性重组菌落, 利用含有 Kan 抗性的 LB 培养基进行培养, 并用 IPTG 进行诱导表达, 最后离心收集菌体, 经超声破碎后作为催化用酶。

采用 Circle 等^[15]报道的显色法检测甘油脱水酶活力, 其原理为: 1 mol/L 的 3-羟基丙醛(3-HPA)会脱水生成 1 mol/L 的丙烯醛, 而丙烯醛会与色氨酸试剂反应生成一种紫色的络合物, 该物质在 560 nm 处有最大吸收峰。具体的实验步骤如下: 向破碎后的菌悬液中加入 50 mmol/L 的甘油和 15 μ mol/L 的维生素 B₁₂, 在 37 $^{\circ}$ C、150 r/min 条件下反应 30 min, 离心去除菌体后, 取 1 mL 样品与 0.75 mL 的 D,L-色氨酸试剂、3 mL 浓盐酸混匀, 在 37 $^{\circ}$ C 水浴 20 min, 然后在 560 nm 处测其 OD 值。

酶活力单位定义: 37 $^{\circ}$ C 下, 每分钟催化甘油生成 1 μ mol/L 3-HPA 所需的酶量定义为一个酶活力单位(U)。

2 结果

2.1 基因组 DNA 的提取及 PCR 扩增

采用快速核酸提取仪及微生物基因组提取试剂盒来提取罗伊乳酸杆菌的基因组 DNA, 然后以罗伊乳酸杆菌基因组 DNA 为模板, 利用克隆引物 P1、P2 进行 PCR 扩增。扩增产物进行 0.9% 的琼脂糖凝胶电泳, 发现在 1.6 kb 处出现明亮的特异性条带, 见图 1。

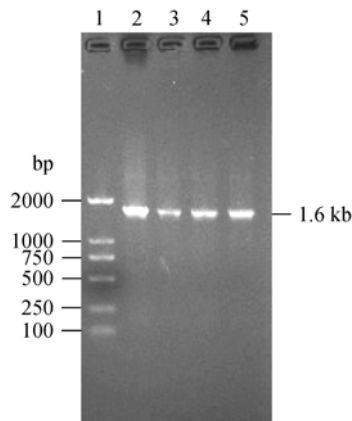


图1 *dhaB*基因的PCR扩增

Fig. 1 PCR products of *dhaB* gene. 1: DL2000 DNA marker; 2-5: PCR products.

2.2 甘油脱水酶基因的克隆

将胶回收得到的甘油脱水酶基因片段与 pMD18-T 载体连接, 构建克隆载体 pMD18-T-*dhaB*, 并转化至 *E. coli* JM109 受体菌, 涂布于含 Amp、IPTG、X-gal 的 LB 琼脂平板上, 37°C 培养过夜。利用蓝白斑筛选方法, 从平板上挑取白色单菌落, 提取质粒后进行测序, 并用 DNAMAN 软件对测序结果进行分析。分析结果表明: 该序列含有一个开放阅读框(Open reading frame, ORF), 长度为 1674 bp。为了进一步研究甘油脱水酶基因, 根据测序结果设计了表达引物 P3、P4, 用以扩增甘油脱水酶的结构基因。

2.3 *dhaB* 结构基因的扩增

以质粒 pMD18-T-*dhaB* 为模板, 利用表达引物 P3、P4 进行 PCR 扩增, 用 0.9% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 并与标准分子量对照, 在约 1.6 kb 处有特异性条带出现。对 PCR 产物进行测序, 并利用软件 DNAMAN 对测序结果进行分析, 结果表明:

本实验获得的甘油脱水酶的氨基酸序列与 NCBI 中报道的罗伊乳酸杆菌 CF48-3A 的同源性为 99%, 证明本研究成功获得了罗伊乳酸杆菌甘油脱水酶基因。

2.4 表达载体的构建

将 2.3 中扩增得到的 PCR 产物与载体 pET28b 分别用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切, 酶切产物纯化后进行连接, 构建表达载体 pET28b-*dhaB*, 其构建过程见图 2。将重组质粒 pET28b-*dhaB* 转化至 *E. coli* BL21 宿主菌中, 在 37°C 培养过夜, 随机挑取转化子接种到含 50 μg/mL Kan 的 LB 培养基中, 提取重组质粒, 用限制性内切酶对重组质粒进行酶切鉴定, pET28b-*dhaB* 能被 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切获得一条约 1.6 kb 的片段, 该片段同 PCR 扩增获得的片段大小一致; 而在约 5.3 kb 处存在一条片段, 该片段小于分别用 *EcoR* I 和 *Hind* III 进行单酶切的 pET28b-*dhaB* 大片段, 见图 3。该结果初步证明目的基因 *dhaB* 已成功同载体 pET28b 连接并转入宿主菌 *E. coli* BL21 中。

2.5 SDS-PAGE 检测

鉴定为阳性的 *E. coli* BL21/pET28b-*dhaB* 经 IPTG 诱导后收集菌体, 加上样缓冲液煮沸 10 min, 进行 SDS-PAGE 电泳。从电泳图谱上可以看出, 经 IPTG 诱导后, 含有重组质粒 pET28b-*dhaB* 的大肠杆菌有分子量约为 65 kD 的蛋白表达带, 见图 4。该结果进一步证明了重组表达载体 pET28b-*dhaB* 构建成功。

2.6 酶活检测

以对照组全细胞作为酶进行转化反应, 经检测, *E. coli* BL21 及 *E. coli* BL21/pET28b 没有 3-羟基丙醛生成, 而经 IPTG 诱导的重组菌株有目的产物 3-羟基丙醛产生, 最高酶活为 1.14 U/mg。

3 讨论

国外关于甘油脱水酶的报道较多, 韩国釜山国立大学的 Raj SM 和 Rathnasingh C 等将甘油脱水酶与醛脱氢酶偶联表达, 最终实现了甘油到 3-羟基丙酸的转化^[4-16]。而国内这方面的报道较少, 且多数集中在甘油脱水酶单一亚基的功能分析^[17-18]。尽管不同来源的甘油脱水酶基因已被克隆和测序, 并且实现

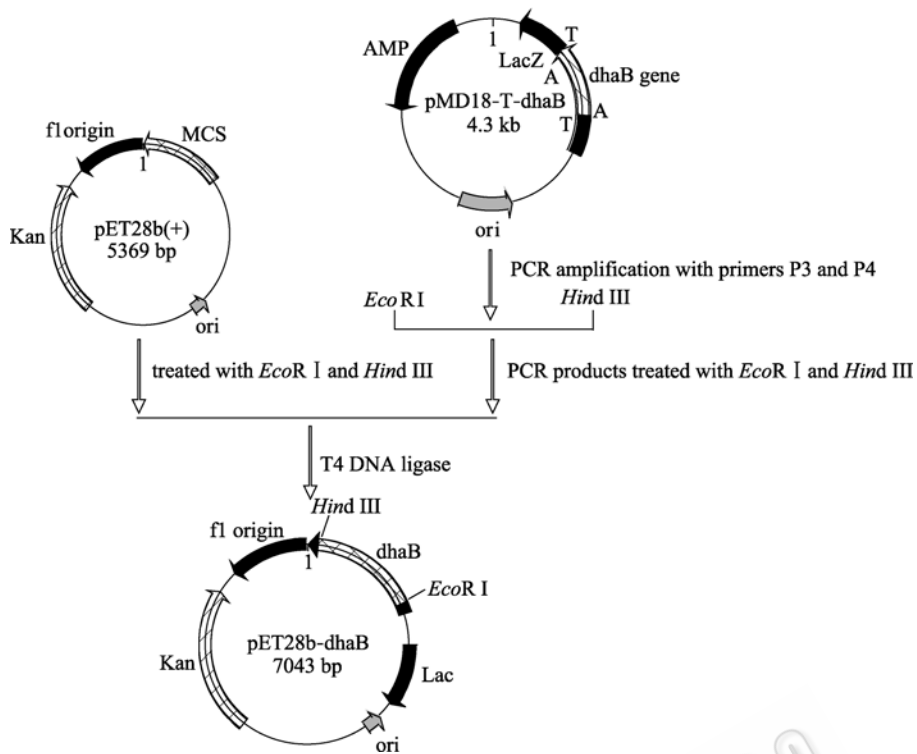


图 2 重组质粒 pET28b-dhaB 构建过程图
Fig. 2 Construction of recombinant expression plasmid pET28b-dhaB.

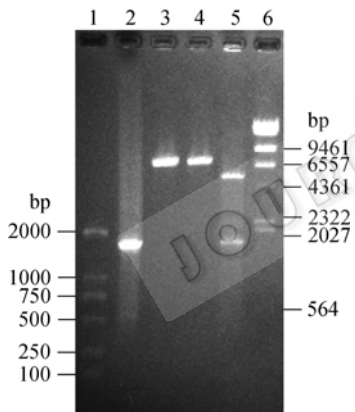


图 3 重组质粒 pET28b-dhaB 的酶切鉴定
Fig. 3 Characterization of recombinant plasmid pET28b-dhaB treated with restriction endonuclease. 1: DL2000 DNA marker; 2: structural DNA gene encoding glycerol dehydratase; 3: pET28b-dhaB/EcoRI; 4: pET28b-dhaB/HindIII; 5: pET28b-dhaB/EcoRI and HindIII; 6: DNA/HindIII DNA marker.

表 1 甘油脱水酶酶活力测定结果
Table 1 Assay results of glycerol dehydratase activity

Strain/plasmid	Activity (U/mg)
<i>E. coli</i> BL21	0
<i>E. coli</i> BL21/pET28b	0
<i>E. coli</i> BL21/pET28b-dhaB-1	1.14
<i>E. coli</i> BL21/pET28b-dhaB-2	1.09

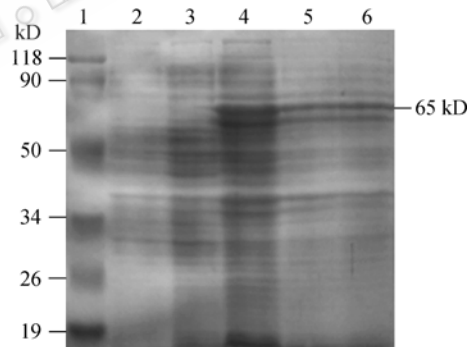


图 4 重组菌全细胞蛋白的 SDS-PAGE 分析
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of proteins in whole cells. 1: protein marker; 2: *E. coli* BL21; 3: *E. coli* BL21/pET28b-dhaB with 0 mmol/L IPTG; 4: *E. coli* BL21/pET28b-dhaB with 0.5 mmol/L IPTG; 5: *E. coli* BL21/pET28b-dhaB with 0.1 mmol/L IPTG; 6: *E. coli* BL21/pET28b-dhaB with 1 mmol/L IPTG.

了在不同宿主中的表达,但仍存在酶活力较低,且需要成本较高的辅酶维生素 B₁₂ 等问题,这已成为限制甘油脱水酶进行大规模生产的瓶颈。因此,构建具有高表达量和高活力的甘油脱水酶基因工程菌意义重大。另外,利用基因工程技术来改善野生型甘油脱水酶菌株的不足,为甘油脱水酶的工业化应用提供了新思路。

本实验通过对 NCBI 中公布的甘油脱水酶序列的保守区域设计了一对特异性引物, 并利用 PCR 扩增成功获得了约为 1.6 kb 的片段。对该片段进行克隆、测序, 并用软件 DNAMAN 对测序结果进行分析, 结果表明: 该片段含有一长为 1674 bp 的开放阅读框。将编码甘油脱水酶的结构基因定向克隆到表达载体 pET28b 上, 以含有表达重组质粒的 *E. coli* BL21/pET28b-dhaB 重组菌为酶源, 检测到了甘油脱水酶活性, 最高活力可达 1.14 U/mg, 比野生型菌株 (0.61 U/mg) 提高了 86.88%。甘油脱水酶基因的克隆和表达, 为研究该酶的催化机制, 及其进一步的工业化应用奠定了必要的基础。为了进一步提高甘油脱水酶的活性和操作稳定性, 可以利用蛋白质工程手段, 如定点突变和定向改造的方法对甘油脱水酶进行有针对性的改造。

REFERENCES

- [1] Karaosmanoglu F. Biodiesel from rapeseed oil of Turkish as an alternative fuels. *Environ Sci Technol*, 2001, **35**(9): 1742–1747.
- [2] Zhu JL, Zhang GJ. Current situation and development trend of the research and production of biodiesel. *Chem Ind Times*, 2006, **1**: 23–28.
朱建良, 张冠杰. 生物柴油研究生产现状及发展趋势. *化工时刊*, 2006, **1**: 23–28.
- [3] Zheng YG, Chen XL, Shen YC. Commodity chemicals derived from glycerol, an important biorefinery feedstock. *Chem Rev*, 2008, **108**(12): 5253–5277.
- [4] Raj SM, Rathnasingh C, Jo JE, *et al.* Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by a novel recombinant *Escherichia coli* BL21 strain. *Proc Biochem*, 2008, **43**: 1440–1446.
- [5] Ruppert AM, Meeldijk JD, Kuipers BWM, *et al.* Glycerol etherification over highly active CaO-based materials: new mechanistic aspects and related colloidal particle formation. *Chem Eur J*, 2008, **14**(7): 2016–2024.
- [6] Ferreira P, Fonseca IM, Ramos AM, *et al.* Glycerol acetylation over dodecatungstophosphoric acid immobilized into a silica matrix as catalyst. *Applied Catalysis B: Environ*, 2009, **91**: 416–422.
- [7] Katryniok B, Paul S, Capron M, *et al.* Towards the sustainable production of acrolein by glycerol dehydration. *ChemSusChem*, 2009, **2**(8): 719–730.
- [8] Yasuda Y. A novel method improving motor disturbance in Parkinson disease: application of glycerin poultice to the flexor digitorum profundus in the middle phalanx of the little finger. *Neurorehabilitation*, 2009, **24**(3): 219–223.
- [9] Choi WJ. Glycerol-based biorefinery for fuels and chemicals. *Recent Pat Biotechnol*, 2008, **2**(3): 173–180.
- [10] Garai-Ibabe G, Ibarburu I, Berregi I, *et al.* Glycerol metabolism and bitterness producing lactic acid bacteria in cidermaking. *Int J Food Microbiol*, 2008, **121**: 253–261.
- [11] Yamanishi M, Yunoki M, Tobimatsu T, *et al.* The crystal structure of coenzyme B₁₂-dependent glycerol dehydratase in complex with cobalamin and propane-1,2-diol. *Eur J Biochem*, 2002, **269**(18): 4484–4494.
- [12] Liao DI, Dotson G, Turner I Jr, *et al.* Crystal structure of substrate free form of glycerol dehydratase. *J Inorg Biochem*, 2003, **93**(1-2): 84–91.
- [13] Doleyres Y, Beck P, Vollenweider S, *et al.* Production of 3-hydroxypropionaldehyde using a two-step process with *Lactobacillus reuteri*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **68**(4): 467–474.
- [14] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [15] Circle SJ, Stone L, Boruff CS. Acrolein determination by means of tryptophane: a colorimetric micromethod. *Ind Eng Chem*, 1945, **17**: 259–262.
- [16] Rathnasingh C, Raj SM, Jo JE, *et al.* Development and evaluation of efficient recombinant *Escherichia coli* strains for the production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol. *Biotechnol Bioeng*, 2009, **104**(4): 729–739.
- [17] Qi XH, Liang T, Cao B, *et al.* Molecular cloning, co-expression and characterization of dhaF and dhaG genes encoding glycerol dehydratase reactivating factor of *Citrobacter freundii*. *China Biotechnol*, 2009, **29**(1): 39–43.
齐向辉, 梁甜, 曹博, 等. 弗氏柠檬酸菌甘油脱水酶激活因子基因的克隆、表达与功能鉴定. *中国生物工程杂志*, 2009, **29**(1): 39–43.
- [18] Chen YS, Liu CJ, Shao JW, *et al.* Cloning and expression of glycerol dehydratase α -subunit gene in *E. coli* and purification of expressed product. *Chin J Biol*, 2008, **21**(1): 19–22.
陈永胜, 刘长江, 邵敬伟, 等. 甘油脱水酶 α 亚基基因的克隆、表达及纯化. *中国生物制品学杂志*, 2008, **21**(1): 19–22.