

重组肺炎链球菌甘油脱氢酶活性及晶体培养的初步分析

赵沙沙¹⁾, 牛司强^{1) 2)}, 金 丽¹⁾, 杨 伟¹⁾, 汪德强^{1) 3)} *

(¹⁾ 重庆医科大学检验医学院, 重庆 400016; (²⁾ 重庆医科大学附属第一医院, 重庆 400016;

(³⁾ 重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘要 甘油脱氢酶能够氧化胞内甘油为代谢活动提供能量, 并参与调控宿主粘附相关细菌蛋白质的表达, 是潜在的抗菌药物靶点。本文利用大肠杆菌 BL21 原核表达肺炎链球菌甘油脱氢酶, 获得大量上清表达的目的蛋白。再用 Ni-NAT-Sepharose Fast Flow 亲和层析、DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换层析以及 Superdex 200 分子筛进行纯化。经数据拟合, 证实该酶在溶液中以同源二聚体形式存在。光谱实验证实, 该重组表达甘油脱氢酶仍具有氧化甘油生成 1,3-二羟基丙酮的活性。用 Hampton 试剂盒初筛晶体及棋盘法优化晶体, 在 0.1 mol/L Bicine pH 9.6, 13% PEG MME 5000, 0.2 mol/L KSCN 4% Dioxone 条件下, 得到了晶型好且有一定衍射能力的单晶, 为解析肺炎链球菌甘油脱氢酶的三维结构及研究结构与酶活之间的关系奠定了基础。

关键词 肺炎链球菌; 甘油脱氢酶; 蛋白表达纯化; 酶活性鉴定; 蛋白质晶体培养

中图分类号 Q71

A Preliminary Study of the Bioactivity and Crystallization of the Recombinant Glycerol Dehydrogenase from *Streptococcus pneumoniae*

ZHAO Sha-Sha¹⁾, NIU Si-Qiang^{1) 2)}, JIN Li¹⁾, YANG Wei¹⁾, WANG De-Qiang^{1) 3)} *

(¹⁾ Department of Clinical Laboratory, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

(²⁾ Department of Clinical Laboratory of First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

(³⁾ Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract Glycerol dehydrogenase (GldA) hydrolyzes glycerol to provide energy for some metabolic process. GldA regulates the expression of some pathogen proteins relating to the adhesion to host. Consequently, the pathogen GldA was considered as a potential target of novel antibacterial agent drugs. The expression, purification, bioactivity determination and crystallization of the GldA of *Streptococcus pneumoniae* were reported. The recombinant protein of GldA was expressed by *E. coli* BL21 in supernatant and purified by Ni-NAT-Sepharose Fast Flow, DEAE-Sepharose Fast Flow and Superdex 200 chromatography. The recombinant enzyme exhibited as a homodimer in solution and could hydrolyze glycerol to dihydroxyacetone. Initial crystallization screening was carried out using Hampton kits by the sitting-drop method. Single crystal was obtained by using the hanging drop vapour diffusion method in 0.1 mol/L Bicine pH 9.6, 13% PEG MME 5000, 0.2 mol/L KSCN and 4% Dioxone. These results provide some key basis to study the relationship between the three-dimensional structure and bioactivity of GldA.

Key words *Streptococcus pneumoniae*; glycerol dehydrogenase; expression and purification; identification of initial function; crystal screen

收稿日期: 2012-07-06; 接受日期: 2012-09-07

国家自然科学基金(No. 30970563) 资助项目

* 联系人 Tel: 023-68486780; E-mail: wangd@ustc.edu

Received: July 6, 2012; Accepted: September 7, 2012

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30970563)

* Corresponding author Tel: 023-68486780; E-mail: wangd@ustc.edu

甘油脱氢酶 (glycerol dehydrogenase, GldA) 在生物中分布极其广泛, 在细菌^[1]、真菌^[2-3] 和哺乳动物^[4] 等物种中均已经被发现。甘油脱氢酶具有重要的生理生化功能, 可通过氧化降解甘油为机体提供能量^[2-5], 并能帮助生物体清除代谢中的毒性物质^[6]。有研究报道, 甘油脱氢酶通过调控鼠伤寒沙门菌的侵袭素表达来调控病原细菌对宿主的侵袭过程, 是潜在的新一代抗菌药物靶位点^[7]。蛋白质三维结构的解析为深入研究结构和功能的关系提供了重要的研究基础。目前来源于多个物种的甘油脱氢酶的三维结构已得到解析, 包括嗜热脂肪芽孢杆菌 (PDB code: 1JPU)^[8]、裂殖酵母菌 (PDB code: 1TA9)、喜温海洋杆菌 (PDB code: 1KQ3)^[9] 及丙酮丁醇梭菌 (PDB code: 3CE9) 等。但对于甘油脱氢酶的活性及其催化反应机制目前尚未完全解析。

肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, *Spn*) 是一种革兰氏阳性的兼性厌氧菌, 是世界范围内引发疾病和死亡的重要致病菌之一, 可引起细菌性肺炎、菌血症、脑膜炎等相关疾病。每年因感染肺炎链球菌而死亡的人数超过一百万, 多重耐药菌株已成为临床感染控制中棘手的难题^[10, 11]。因此有效控制肺炎链球菌的感染和开发新一代抗菌药物是非常重要且十分迫切的任务。肺炎链球菌 GldA 与已报道的其他物种甘油脱氢酶的酶活性中心有一定的差异。序列比对研究发现 (Fig. 1), 肺炎链球菌的 95 位、119 位、128 位和 130 位氨基酸与其它物种的甘油脱氢酶明显不同, 预示肺炎链球菌 GldA 水解甘油的机制具有一定的特异性。目前尚无有关肺炎链球菌 GldA 的研究报道。如果能够解析肺炎链球菌 GldA 的三维结构, 深入研究分析该酶酶活反应的分子机制, 将有望设计开发出对肺炎链球菌特异的抗菌药物, 有助于肺炎链球菌的临床治疗与控制。

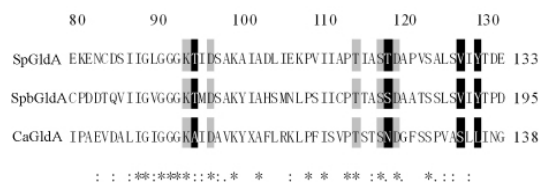


Fig. 1 Amino acid sequence alignment Amino acid sequences are shown for GldA from *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (NP_344792), *Schizosaccharomyces pombe* 972h (NP_593651) and *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (NP_348253). The residues at active sites are colored in grey (identical residues) and black (species specific residues)

1 材料与方法

1.1 材料

Gel Doc 1000 数字化凝胶成像系统、垂直蛋白电泳系统、PCR 仪: 美国 Bio-Rad 公司制造; Ultrospec 2100 pro 紫外可见分光光度计: 英国 Biochrom 公司制造; EPS-300 水平核酸电泳仪: 美国 C. B. S. SCIENTIFIC 生产; 超声破碎仪: SONICS 公司制造; Ni-NTA-Sepharose Fast Flow 亲和层析柱、DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换层析柱、Superdex 200 凝胶层析柱: GE 公司制造; Pet28a 原核表达质粒: Novagen 生产; DL2000 DNA marker、蛋白质 marker、限制性内切酶及缓冲液: TaKaRa 公司制造; T4 DNA 连接酶及缓冲液: Promega 公司提供; BCA 试剂盒: Pierce 公司提供; 晶体初筛试剂盒购于 Hampton 公司; 其他试剂均为分析纯, 购于北京鼎国和上海生工公司。

从肺炎链球菌 TIGR4 (NC_003028) 中提取基因组模板; Pet28a 进行改造得到克隆和表达用的载体 pw28; 克隆用感受态 *E. coli* DH5 α 及表达用感受态 *E. coli* BL21 购于 Novagen 公司。

1.2 培养基和培养条件

LB 培养基, Kana 终浓度 50 μ g/mL; 增菌过程中, 温度为 37 $^{\circ}$ C, 摇床为 200 r/min; 诱导时, 诱导剂 IPTG 终浓度为 0.2 mmol/L, 温度为 20 $^{\circ}$ C, 摇床为 200 r/min, 诱导时间为 15 h。

1.3 引物设计

在 NCBI 中找到肺炎链球菌 TIGR4 (*Spn* TIGR4) 的基因序列, 初步生物信息学分析后, 应用软件 Primer 5.0 设计引物, 正向引物 F: 5'-GCCAATTCATGAGAATTTTCTAGTC-3', 反向引物 R: 5'-GGCCTCGAGTTATTTTGAATTTACATAG-3', 由北京华大基因公司合成。

1.4 PCR 扩增目的基因

用肺炎链球菌 TIGR4 的基因组为模板, 通过 PCR 扩增 GldA, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 接着 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.5 重组质粒的构建

双酶切 (*Eco*R I + *Xho* I) PCR 产物, 纯化后与经相同双酶切的 pw28 进行过夜连接, 再转化到克隆用感受态 *E. coli* DH5 α 中, 提取质粒, 经菌液 PCR、质粒双酶切及测序鉴定后, 再转化到表达用感受态 *E. coli* BL21 中进行诱导表达。

1.6 GldA 的表达

将转化后的大肠杆菌 BL21 接种于含 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 培养基中至 A_{600} 约为 0.6, 加入终浓度为 0.2 mmol/L IPTG, 于 20 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达 15 h, 收集菌体, 冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$.

1.7 GldA 的纯化

用结合缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, pH8.0) 将菌体重悬、混匀. 超声破碎: 4 $^{\circ}\text{C}$, 超声 3 s, 间隔 7 s, 振幅 29%, 超声时间 10 min. 再将破菌液离心 (13 000 r/min, 30 min), 所得上清液为粗提液.

上清液通过预先用结合缓冲液平衡过的 Ni-NTA-Sepharose Fast Flow column, 然后用 200 mL 洗涤缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, pH8.0, 20 mmol/L 咪唑) 洗脱杂蛋白, 最后用洗脱缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 300 mmol/L 咪唑) 洗脱目的蛋白.

为提高蛋白纯度, 再用 DEAE-Sepharose Fast Flow 纯化. 上样前用平衡缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl pH8.0) 预平衡 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱, 上样, 再平衡柱子, 最后用 0~500 mmol/L NaCl (含 20 mmol/L Tris-HCl, pH8.0) 梯度洗脱目的蛋白.

用 Superdex 200 进行进一步分子筛纯化, 同时进行蛋白聚集状态的估算. 最后用 BCA 法测蛋白浓度. 蛋白于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用.

1.8 GldA 酶活性的测定

据文献^[6,8,12]报道, 甘油脱氢酶氧化甘油生成 1,3-二羟基丙酮, 该过程中 NAD^{+} 接受氢生成 NADH. 参考 Ahrens 等^[12]的方法, 做适当修改后用于测定 GldA 的酶活性. 反应液: 30 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2 mol/L 甘油, 1.2 mmol/L NAD^{+} , 0.1 mol/L K_2CO_3 缓冲液, pH 9.8. 加入纯化的 GldA 后, 先将反应体系做全波长 (200~900 nm) 扫描, 找到反应体系的特征吸收波长为 340 nm, 与 NADH 的最大吸收波长吻合. 设定反应温度为 30 $^{\circ}\text{C}$, 在 340 nm 波长下测定反应体系的吸光度, 每隔 6 s 测 1 次, 共测 6 min. 分别以不加底物甘油、不加 NAD^{+} 、不加 GldA、无关蛋白质 B 替代 GldA, 共设置 4 个对照组, 以证实 GldA 的作用下, 甘油被氧化为 1,3-二羟基丙酮, 该过程中 NAD^{+} 接受氢生成 NADH. 调整反应体系, 将吸光度控制在 1.0 以内. 然后再以其他的几种醇类 (包括乙醇、1,6-己二醇、异丙醇、甲醇、丙二醇、异戊醇) 为底物, 调整至底物的摩尔浓度相同, 检测酶的底物特异性.

1.9 GldA 蛋白质晶体的初筛和优化

先用 Hampton 试剂盒 Index、Salt1、Salt2、PEG Rx1、PEG Rx2 进行晶体初筛. 然后根据晶型较好的条件, 调整沉淀剂、pH 缓冲、添加剂等的浓度与种类, 用棋盘法进行晶体的优化, 直到得到晶型好、衍射能力强的单晶. 初筛选择坐滴法, 优化选择悬滴法, 晶体生长的室温控制在 20 $^{\circ}\text{C}$.

2 结果

2.1 基因克隆的 PCR 扩增

1% 琼脂糖核酸电泳结果显示, PCR 扩增的片段长度大约为 1 000 bp, 与目的片段 1 086 bp 长度相吻合 (Fig. 2A).

2.2 菌液 PCR, 双酶切及测序鉴定

将 PCR 产物跟 pw28 连接后, 转化大肠杆菌克隆菌株 DH5 α 筛选阳性克隆. 提取 PCR 阳性菌液质粒并用 *EcoR* I + *Xho* I 双酶切, 鉴定时在约 1 000 bp 处出现目的条带, 表明连接正确 (Fig. 2B). 再将阳性克隆质粒送本实验室测序中心进一步测序, 结果表明所构建的质粒完全正确.

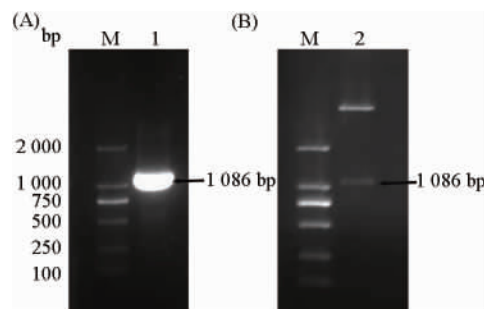


Fig. 2 Agarose electrophoresis of *GldA* amplification and digestion identification (A) Gene amplification of *GldA*. 1: PCR product, M: DNA marker DL2000; (B) The identification of the recombinant plasmid pw28-*GldA* by *EcoR* I and *Xho* I. 2: *GldA* (1 086 bp) and pw28. M: DNA marker DL2000

2.3 GldA 的纯化

SDS-PAGE 显示, 表达蛋白位于约 40 kD 处, 该实验目的蛋白 39.7 kD, 加上融合的 6 个 his 标签, 条带位置相吻合. GldA 为上清表达, Ni-NTA-Sepharose Fast Flow column 纯化的靶蛋白浓度比较大, 但纯度不够高. 于是将得到的蛋白质再用 DEAE-Sepharose Fast Flow 进一步纯化, 蛋白纯度有很大提高 (Fig. 3).

最后用 Superdex 200 凝胶层析对 GldA 进行纯

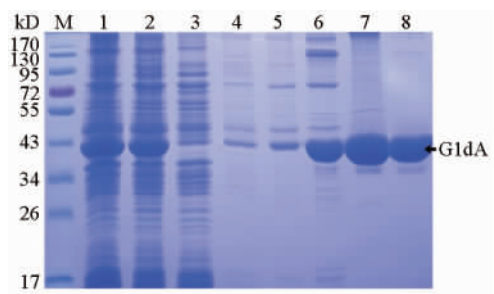


Fig. 3 Polyacrylamide gel electrophoresis of GldA

The proteins were separated by electrophoresis in 15% polyacrylamide gel. M: Marker; 1: Total proteins of induced *E. coli*; 2: Supernatant after ultrasonication of induced *E. coli*; 3: Flow through after Ni-NAT-Sepharose Fast Flow column; 4, 5: Eluent washed by 20, 40 mmol/L imidazole; 6: Eluent washed by 300 mmol/L imidazole; 7: Purified GldA after DEAE-Sepharose Fast Flow; 8: Purified GldA after Superdex 200 gel-filtration. GldA was showed at molecular mass 39.7 kD

化及分子量的检测 (Fig. 4). 根据分子量标准曲线和 GldA 的流出体积 67 mL 计算, 然后进行数据拟合. $\text{LogMW} = -0.01712V_e + 6.05667$ (R^2 值为 0.9726). 经计算得 GldA 在 20 mmol/L Tris-HCl pH8.0 200 mmol/L NaCl 的缓冲液中分子量为 79.4 kD, 提示在溶液环境中 GldA 是以同源二聚体形式存在. 且电泳结果显示, GldA 蛋白质经分子筛后纯度更高, 达到 90% 以上. 目的蛋白质经超滤浓缩脱盐, 用 BCA 法测得蛋白质浓度为 39.1 mg/mL, 分装后置 -80°C 冻存.

2.4 GldA 酶活性的测定

先将反应体系做全波长 (200 ~ 900 nm) 检测, 得到特殊吸收波长为 340 nm, 与 NADH 的最大吸收波长吻合. 在 340 nm 波长下测定反应体系的吸收峰, 从对照组可以看出, 该酶具有酶活性, 能催化甘油脱氢, 发生氧化反应. 实验结果还表明, GldA 也能与其他醇类发生氧化反应, 其中底物为丙二醇时具有较高的活性 (Fig. 5).

2.5 GldA 晶体培养与衍射

选择初筛晶型较好的条件, 用棋盘法进行优化. 在 0.1 mol/L Bicine pH9.6, 13% PEG MME 5000, 0.2 mol/L KSCN 4% Dioxone 条件下, 20°C , 7 d 得到晶型好, 外形尺寸约为 $0.05 \times 0.05 \times 0.1$ mm 的长棒状晶体 (Fig. 6A). 将晶体送北京同步辐射光源 (Beijing Synchrotron Radiation Facility, BSRF) 进行衍射数据收集, GldA 的空间群为 C2 (晶胞参数

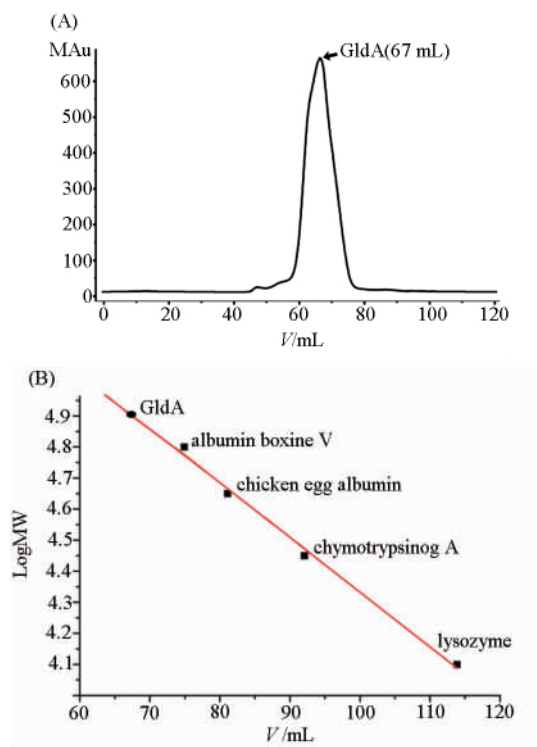


Fig. 4 Purification after size exclusion chromatography

(A) Size exclusion experiment was carried out by Superdex 200 gel-filtration. The elution volume was 67 mL with elution buffer (20 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 200 mmol/L NaCl); (B) Standard curve of Superdex 200 experiment. Four standard proteins were albumin bovine V, chicken egg albumin, chymotrypsinogen A and lysozyme, respectively. The molecular weight was estimated to be 79.4 kD, implying that GldA formed homodimer in solution

为: $a = 147.7 \text{ \AA}$, $b = 403.2 \text{ \AA}$, $c = 313.3 \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 92.6^\circ$, $\gamma = 90^\circ$) (Fig. 6B). 目前正在继续优化晶体以提高衍射分辨率.

3 讨论

通过重组蛋白质技术, 以大肠杆菌原核表达肺炎链球菌的 GldA, 不仅大量表达出上清的目的蛋白, 且纯化后获得的 GldA 具有较高的酶活性. 这与传统的从细菌菌体中直接提取甘油脱氢酶相比^[13], 具有表达量高, 基于 Ni-NAT-Sepharose Fast Flow 及 DEAE-Sepharose Fast Flow 亲和层析的纯化方法更简便, 获得的目的酶的纯度高特点, 为大量生产甘油脱氢酶提供了很好的方法. GldA 的表达纯化过程都是在有氧条件下进行, 与 Ahrens 等^[12]描述的厌氧条件不同, 本实验证实肺炎链球菌 GldA 对外界氧环境具有较强的耐受力.

研究发现, 不同物种编码的甘油脱氢酶在溶液

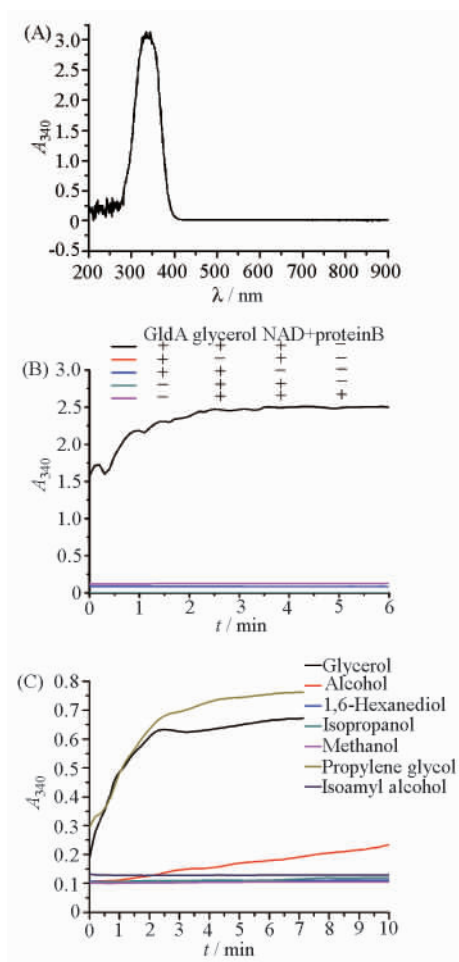


Fig. 5 Activity and substrate specificity of GldA

(A) A wavelength scan. The specific absorption peak was 340 nm. (B) The GldA reaction mixture contained 0.2 mol glycerol/L, 1.2 mmol/L NAD^+ , 30 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 0.1 mol/L K_2CO_3 (pH9.8). The assay was initiated by adding 3 $\mu\text{mol/L}$ GldA, and the absorption increase was followed at 340 nm and 30 $^\circ\text{C}$ for 6 min. The control mixtures were absented glycerol, NAD^+ , GldA, and added protein B to instead of GldA, respectively. The results indicated that GldA could catalyze the oxidation of glycerol. (C) Comparisons of the reactions between GldA and different substrates such as glycerol, ethanol, 1, 6-hexanediol, isopropanol, methanol, propylene glycol and isoamyl alcohol, implying that GldA could catalyze the oxidation of kinds of alcohols

中具有不同的聚集形式。嗜热脂肪芽孢杆菌甘油脱氢酶在溶液中为八聚体^[8],大肠杆菌甘油脱氢酶为二聚体和八聚体两种聚集方式^[14],栗酒裂殖酵母菌甘油脱氢酶的两亚型 GDH2 和 GDH4 分别为八聚体和二聚体^[13],嗜温海洋杆菌的为同源四聚体^[15],而本研究发现肺炎链球菌 GldA 只有二聚体一种聚

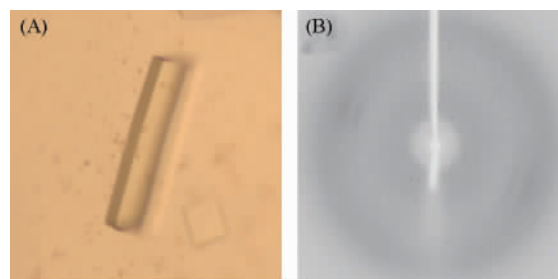


Fig. 6 Crystal of GldA (A) GldA crystals were grown at 293 K in 0.1 mol/L Bicine pH9.6 with 13% PEG MME 5000, 0.2 mol/L KSCN and 4% Dioxone. The crystals were obtained after 7 days in manually hanging drop in a 24-well plate by the vapor diffusion method. (B) The protein crystal diffraction data were collected by Synchrotron Radiation Facility at the BSRF

集形式。遗憾的是目前对于活性位点的疏水性与蛋白聚集状态之间的相关性以及聚集状态与其生物学功能的关系还未见报道。

Tang 等^[14]研究报道,甘油脱氢酶底物特异性不强,除了可以降解甘油外,还可以催化降解 1,2-丙二醇、2,3-丁二醇、1,2-乙二醇等醇类。本研究发现,肺炎链球菌编码的 GldA 除可催化降解甘油外,乙醇和丙二醇等也可作为其底物,尤其是丙二醇为底物时其活性较强。

蛋白质三维结构是其行使相应功能的基础。应用气相悬滴法,已经获得晶型好、具有一定衍射能力的肺炎链球菌 GldA 的单晶,为今后继续进行晶体优化、收集高分辨率的晶体衍射数据、解析其三维结构奠定了重要的研究基础。若能利用蛋白晶体 X 射线衍射技术解析出肺炎链球菌的 GldA 的三维结构,将有利于推动该蛋白质结构与功能关系的研究,为最终基于其三维结构设计开发出新一代抗菌药物奠定重要的研究基础。

参考文献 (References)

- [1] Cintolesi A, Clomburg J M, Rigou V, et al. Quantitative analysis of the fermentative metabolism of glycerol in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2012, **109**(1): 187-198
- [2] Jung J Y, Yun H S, Lee J, et al. Production of 1,2-propanediol from glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2011, **21**(8): 846-853
- [3] Liepins J, Kuorelahti S, Penttilä M, et al. Enzymes for the NADPH-dependent reduction of dihydroxyacetone and D-glyceraldehyde and L-glyceraldehyde in the mould *Hypocrea jecorina* [J]. *FEBS J*, 2006, **273**(18): 4229-4235
- [4] Kormann A W, Hurst R O, Flynn T G. Purification and

- properties of an NADP^+ -dependent glycerol dehydrogenase from rabbit skeletal muscle [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1972, **258** (1): 40-55
- [5] Clomburg J M, Gonzalez R. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 1, 2-propanediol from glycerol [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2011, **108**(4): 867-879
- [6] Subedi K P, Kim I, Kim J, et al. Role of GldA in dihydroxyacetone and methylglyoxal metabolism of *Escherichia coli* K12 [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2008, **279**(2): 180-187
- [7] Nakayama S, Watanabe H. Mechanism of hlaA repression by 1, 2-Propanediol consists of two distinct pathways, one dependent on and the other independent of catabolic production of propionate, in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [J]. *J Bacteriol*, 2006, **188**(8): 3121-3125
- [8] Ruzhenikov S N, Burke J, Sedelnikova S, et al. Glycerol dehydrogenase: structure, specificity, and mechanism of a family III polyol dehydrogenase [J]. *Structure*, 2001, **9**(9): 789-802
- [9] Lesley S A, Kuhn P, Godzik A et al. Structural genomics of the *Thermotoga maritima* proteome implemented in a high-throughput structure determination pipeline [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, **99**(18): 11664-11669
- [10] WHO. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization—WHO position paper [J]. *Wkly Epidemiol Rec*, 2007, **82**(12): 93-104
- [11] O'Brien K L, Wolfson L J, Watt J P, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates [J]. *Lancet*, 2009, **374**(9693): 893-902
- [12] Ahrens K, Menzel K, Zeng A, et al. Kinetic, dynamic and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella Pneumoniae* in anaerobic continuous culture: III. Enzymes and fluxes of glycerol dissimilation and 1, 3-propanediol formation [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1998, **59**(5): 544-552
- [13] Marshall J H, Kong Y C, Sloan J, et al. Purification and properties of glycerol: NADP^+ 2-oxidoreductase from *Schizosaccharomyces pombe* [J]. *J Gen Microbiol*, 1989, **135** (3): 697-701
- [14] Tang C T, Ruch F E Jr, Lin C C. Purification and properties of a nicotinamide adenine dinucleotide-linked dehydrogenase that serves an *Escherichia coli* mutant for glycerol catabolism [J]. *J Bacteriol*, 1979, **140**(1): 182-187
- [15] Srinivasan V, Ma K, Adams M W, et al. Towards the crystal structure of glycerol dehydrogenase from *Thermotoga maritima* [J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2002, **58**(Pt 5): 867-869