

# 多能硫杆菌 RubisCO 基因鉴定以及在 大肠杆菌中的表达\*

刘振盈 颜望明

(山东大学生命科学院微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

多能硫杆菌(*Thiobacillus versutus*)是兼性能自养细菌,在生理学和分类学上具有重要的地位,也是研究硫杆菌生理、生化、遗传学的理想材料<sup>[1]</sup>。该菌通过卡尔文循环固定 CO<sub>2</sub>,其关键酶是 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(简称 RubisCO)<sup>[2]</sup>。我们从多能硫杆菌中分离得到的 RubisCO 基因片段能够在大肠杆菌细胞中表达,说明自养细菌与异养细菌在基因表达方面是相似的。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

多能硫杆菌(*Thiobacillus versutus*)<sup>[1]</sup>,由 Kelly D P 提供;pUC18-29N 质粒<sup>[3]</sup>由 Tabita F R 提供,编码 *Rhodobacter sphaeroides* *rbcL-rbcS* 3.4 kb 片段克隆在 pUC18 *Sma*I 位点;pTR11 质粒<sup>[4]</sup>由 Kusano T 提供,编码 *Thiobacillus ferrooxidans* *rbcL-rbcS* 4.0 kb *Pst*I 片段,克隆在 pUC18。

### 1.2 培养基和培养条件

多能硫杆菌异养生长采用 LB 培养基<sup>[5]</sup>,37℃ 培养;自养生长采用无机盐培养基<sup>[1]</sup>。

### 1.3 主要生化试剂

限制性内切酶、连接酶和尼龙膜均购自 Promega 公司;分子杂交所用试剂来自英国的 Amersham 的辣根过氧化物酶-化学发光增强检测试剂盒(ECM<sup>TM</sup> direct nucleic acid labelling and detection systems)。

### 1.4 DNA 操作技术

DNA 提取、酶切、片段的纯化参见文献[5]。Southern 转移、探针标记以及杂交后探针的检测,均按 Amersham 产品说明书进行。

### 1.5 RubisCO 酶活性测定

参见文献[6]。

## 2 结果

### 2.1 多能硫杆菌 RubisCO 基因鉴定

以氧化亚铁硫杆菌(*Thiobacillus ferrooxidans*)RubisCO 基因片段为探针,与多能硫杆菌染色体 DNA 进行 Southern 杂交,杂交后没有显示出杂交带型;而以光合细菌 *Rhodobacter sphaeroides* 类型 I RubisCO 基因为探针与多能硫杆菌染色体 DNA 杂交出现了杂交带型(图略)。多能硫杆菌能与 *R. sphaeroides* RubisCO 基因杂交,表明它们在 RubisCO 结构上与光合细菌具有较高的同源性,而与同属

\* 国家及山东省自然科学基金资助。

本文于 1996 年 3 月 25 日收到。

为氧化亚铁硫杆菌同源性较低。

2.2 多能硫杆菌 RubisCO 基因片段的分离和酶切分析

将多能硫杆菌染色体 DNA 用 PstI 酶切, 与 pUC9 载体连接, 转化大肠杆菌 JM83, 然后用 *R. sphaeroides* 类型 I RubisCO 基因为探针, 从转化的重组子中分离到一个阳性的重组质粒 pSDLS-10。进一步用 PstI、Bgl II、Hind III、EcoRI 和 Sma I 对 pSDLS-10 进行单酶切(表 1)和双酶切分析(表 2), 并结合 Southern 杂交(图 1), 确定出了 Pst I、Bgl II、Hind III、EcoR I 和 Sma I 的位置, 由于外源片段上存在着多个 Sal I 切点, 我们通过部分酶切和完全酶切(表 3)定出 Sal I 在外源插入片段的位置。

表1 pSDLS-10各单酶解片段大小			表2 pSDLS-10双酶切片段大小		
内切酶	片段大小(kb)	片段长度总和(kb)	内 切 酶	片段大小(kb)	片段长度总和(kb)
Sma I	2.8, 3.1	5.9	Bgl II+EcoR I	3.9, 1.5, 0.5	5.9
Bgl II	6.1	6.1	Bgl II+Pst I	2.6, 1.8, 1.2, 0.3	5.9
Pst I	2.6, 2.1, 1.2	5.9	Bgl II+Sma I	2.8, 1.6, 1.5	5.9
Eco RI	3.9, 2.0	5.9	Bgl II+Hind III	2.6, 1.8, 1.5	5.9
Hind III	3.3, 2.7	6.0	Bgl II+Pvu II	2.2, 1.9, 1.9	6.0

表3 pSDLS-10 Sal I部分和完全酶切片段的大小				
部分酶切片段的大小 (kb)	6.0	5.3	4.8	4.0
	4.0	3.2	2.6	2.1
	2.0	1.4	1.3	0.7
完全酶切片段的大小 (kb)	2.6	1.4	1.3	0.7

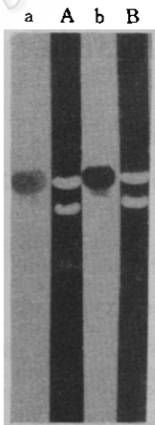


图1 pSDLS-10质粒DNA Hind III与SmaI酶切片段与rbcL-rbcS基因探针杂交结果  
A,a: Hind III酶切片段和杂交结果  
B,b: Sma I酶切片段和杂交结果

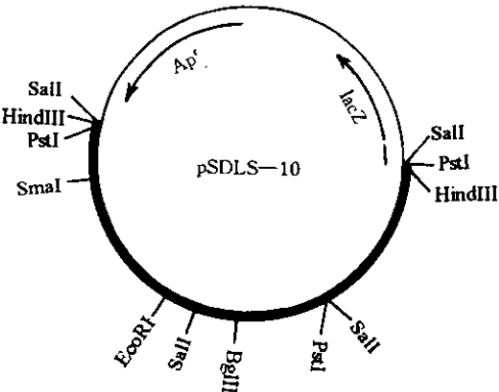


图2 pSDLS-10限制性内切酶图谱

根据各种酶的单酶切、双酶切和部分酶切分析,作出了 pSDLS-10 的酶切图谱(图 2),对照 *R. sphaeroides* *rbcL-rbcS* 基因片段图谱<sup>[1]</sup>,发现两者存在着极大的相似性。

此外通过 Southern 杂交(图 1),证实所克隆的多能硫杆菌片段与 *R. sphaeroides* 类型 I RubisCO 基因具有同源性。

### 2.3 多能硫杆菌 RubisCO 基因在大肠杆菌中的表达

pSDLS-10 质粒 DNA 上的 RubisCO 酶基因是位于 lac 启动子后的多克隆位点,将该质粒转入大肠杆菌 JM109,培养细胞进行酶活性的测定,测定其酶活性在有 IPTG 诱导时为  $3.5 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  蛋白,无 IPTG 诱导时酶活性较低(为  $1.2 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  蛋白);而对照 JM109(pUC9)没有酶活性,说明多能硫杆菌 *rbcL-rbcS* 基因能够在 lac 启动子下,在大肠杆菌中表达。

本文从兼性的化能自养多能硫杆菌中分离到了 RubisCO 基因片段,并对该基因在大肠杆菌中的表达进行了研究,它为我们进一步研究该基因在自养细菌中的表达,以及与其它二氧化碳固定基因的相互作用机制。基因表达调节等方面的工作奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [1] Smith A L, Kelly D P, Wood A P. *J Gen Microbiol*, 1980, 121: 127~138.
- [2] 刘振益,颜望明. 微生物学通报, 1993, 20(2): 110~114.
- [3] Quivey R G, Tabita F R. *Gene*, 1984, 31: 91~101.
- [4] Kusano T, Sugawara K, Inoue C *et al.* *Current Microbiology*, 1991, 22: 35~41.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [6] 李粹芳,李立人. 植物生理学通讯, 1989, 25(1): 49~50.

## IDENTIFICATION AND EXPRESSION OF RIBULOSE 1,5-BISPHOSPHATE CARBOXYLASE/OXYGENASE GENE FROM *THIOBACILLUS VERSUTUS*

Liu Zhenying     Yan Wangming

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100)

**Abstract** The chromosomal DNA of *Thiobacillus versutus* was hybridized with various heterologous ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) gene as probes. Only *Rhodobacter sphaeroides* form I RubisCO gene showed homology with *T. versutus*. The RubisCO gene fragment of *T. versutus* was isolated using the RubisCO gene of *R. sphaeroides* as a probe. And the RubisCO gene of *T. versutus* can express in *E. coli* cell.

**Key words** *Thiobacillus versutus*, Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase