

大肠杆菌 *otsA* 基因的克隆和表达*

王忆琴 戴秀玉** 王韞恂 周 坚

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要: 用 PCR 方法扩增了 1.5kb 的 *otsA* 基因片段,将该片段连接到多拷贝克隆载体后转化 *otsBA* 缺失和 *otsA* 缺陷的大肠杆菌菌株,使转化株重新获得 *otsA* 基因功能。生长曲线表明转化株在高渗培养基中生长良好,薄层层析法(TLC)检测海藻糖实验说明转化株细胞经诱导后合成海藻糖,*otsA* 基因的克隆和表达为赋予转基因植物抗高渗、耐干旱能力提供了实验依据和材料。

关键词: *otsA* 基因,海藻糖,PCR 扩增,表达

中图分类号:Q785 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2000)05-0470-74

抗旱、抗盐碱等抗逆基因的发现及其克隆是植物基因工程研究领域中的重要课题。一些低等动植物,包括微生物能够通过渗透压调节适应干旱、盐碱胁迫。已经研究了几种相关的代谢物,如甘露醇、脯氨酸、甜菜碱等,将它们的合成酶基因转入植物后均能不同程度地提高耐盐性^[1-3]。最新研究表明海藻糖也是一种很有效的渗透剂。海藻糖(Trehalose)是由两个葡萄糖分子以 $\alpha, \alpha 1 \rightarrow 1$ 糖苷键结合的非还原性双糖,它广泛存在于细菌、真菌、昆虫以及某些低等动植物中^[4-5]。海藻糖对各种不同生物的抗逆耐受性起着重要作用,例如在高温和干燥条件下,酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞合成海藻糖以抵抗逆境的胁迫,其合成量与抗逆能力呈正比关系^[6]。已经证明外加的海藻糖也能保护干燥状态下的酶、蛋白质和细胞膜。因此海藻糖在医药、农业、食品、化妆品等领域均有广阔的应用前景^[7]。利用海藻糖的抗逆耐干特性,采用基因工程技术将海藻糖合成能力转入农作物,可望使农作物在干旱、盐碱环境下生长良好,这对培育抗旱耐盐的作物新品种和粮食的增产增收具有重要意义。植物中海藻糖的合成途径还不清楚,但在细菌和酵母中这一途径已被阐明^[8-9]。大肠杆菌(*Escherichia coli*)中由渗透压引起的海藻糖的合成由 *otsA* 基因编码的海藻糖合成酶催化 UDP-葡萄糖和 6-磷酸葡萄糖合成 6-磷酸海藻糖,再经 *otsB* 基因编码的海藻糖磷酸酯酶脱磷酸后生成海藻糖^[10]。Kaasen 等人^[11]的工作证明 *otsA* 和 *otsB* 基因包含在染色体 41~42min 位置,经 *Hind*III 酶切的 2.87kb 片段中,并已测定了该片段的碱基顺序。在此研究基础上,我们设计了海藻糖合成酶 *otsA* 基因的 PCR 引物,并将扩增的 DNA 片段与适当载体连接后分别转化至 *otsA* 基因缺失和缺陷株,测定转化株在高渗透压培养基中的生长和细胞内海藻糖的累积,证明转化受体菌表达 *otsA* 基因功能,现将这一结果报道如下。

* 国家自然科学基金资助项目(39980023)

** 联系人

作者简介:王忆琴(1975-),女,湖北人,在读硕士生,主要从事微生物遗传研究

收稿日期:1999-07-09,修回日期:1999-10-27 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: *Escherichia coli* 菌种, MC4100(F^- *araD139* Δ (*argF-lac*)U169*f1b recA1 rpsL deoC1 ptsF25 rbsR*)为 *otsBA*⁺ 基因野生型菌株, pEG5005(*MuetsA*⁺*B*⁺ Kan^r *rep* pMB1 Amp^r)是带有细胞内克隆系统 Mud5005 的质粒,由 M. Casadaban 教授赠送; FF4050(MC4100 Δ [*otsA1*::Tn10 ϕ (*otsB-lacZ*)8]), *otsA*、*otsB* 基因缺失株, FF4169(MC4100*otsA1*::Tn10), *otsB*⁺ *otsA*⁻ 基因缺陷株(*otsA* 基因中插入了转座子 Tn10),由 A. R. Strom 教授惠赠; pUC19 质粒 DNA 购于 Promega 公司。pDW1 为 Mud5005 上克隆了来源于 MC4100 的完整 *otsBA* 基因片段的质粒,由本实验室构建和保存。

1.1.2 培养基和抗生素浓度: LB 培养基^[12]、高渗透压选择培养基为 M63 基础培养基^[12]补加 0.5mol/L NaCl, 抗生素 Amp 用于完全培养基时,选择浓度为 50 μ g/mL,用于基础培养基时减半。

1.1.3 酶和试剂: 实验用分子生物学试剂购自华美公司,海藻糖为 Sigma 公司产品,所用化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 质粒 DNA 提取、纯化、酶切、粘末端补平、连接及转化等操作均按文献^[13]的方法进行, DNA 片段的分离回收按试剂盒产品说明书操作。

1.2.2 PCR 引物: Primer I GTGGTCGACATGAGTCGTTTAGTCGTA

Primer II :GCGAAATTCTACGCAAGCTTTGGAAAGGTAGC 由中国科学院微生物研究所技术中心合成,提取 pDW1 质粒 DNA 为模板,反应条件:94 $^{\circ}$ C, 35s; 51 $^{\circ}$ C, 35s; 72 $^{\circ}$ C, 2min, 反应循环 30 次,再 72 $^{\circ}$ C 延长 10min。

1.2.3 生长曲线的测定: 将待测菌株接种于 M63 培养液, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜,按 1:40 稀释至含 0.5mol/L NaCl 的 M63 培养液中继续培养,并每隔 2h 取 2mL 培养物在 OD₄₂₀ 测光密度值,直至进入生长稳定期,以检测细胞的生长速率。

1.2.4 海藻糖的诱导合成和检测: 将经两次活化的转化菌株,从 LB 斜面接入 200mL M63 培养液, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养到对数时期,向培养物中添加诱导物 IPTG 和 NaCl,并使终浓度分别达到 40 μ g/mL 和 0.5mol/L, 37 $^{\circ}$ C 继续振荡培养 3~4h。4,000r/min 离心 10min 收集菌体,细胞重悬于 5mL 0.4mol/L 的高氯酸中,重复离心抽提两次,将两次抽提上清液合并,用 3mol/L KOH 中和该抽提液至 pH7.0,以析出高氯酸钾盐,留取上清液作薄层层析分析。取上清液 20 μ L 分别点在硅胶板上,用正丁醇:乙酸:水=2:1:1 层析系统展开后浸入 15% H₂SO₄ 溶液,即刻取出置 100 $^{\circ}$ C 烤箱加热至显色^[14],观察。

2 结果和讨论

2.1 *otsA* 基因的分离

根据 Kaasen 等人^[11]对 2.87kb *Hind*III 酶切片段的分析, *otsA* 基因为 1.418kb 长,且转录从 *otsB* 开始至 *otsA*, 但该片段 *otsA* 基因端经 *Hind*III 酶切后,将终止位点切除在外。为了保持该基因序列完整性,所设计的引物加进终止位点的 6 个碱基,为有利于下一

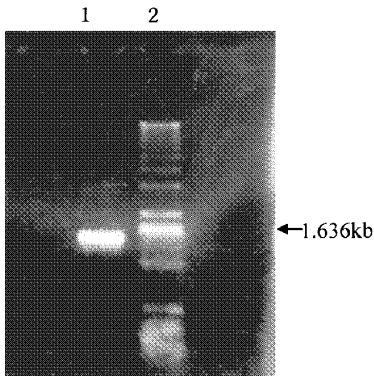


图1 PCR扩增DNA片段

Fig. 1 DNA fragment by PCR amplification

1. PCR product; 2. 1kb ladder.

DH5 α , 获得 DH5 α (pUC19-*otsA*)。为了使设计的适用于构建双元载体的克隆片段也能利用 pUC19 阅读框架正确表达, 将 pUC19-*otsA* 质粒 DNA 经 *Sal*I 酶切后, 用 Klenow 片段补平后平端连接, 分别转化 *otsA* 基因缺失株 FF4050 和 *otsA* 基因缺陷株 FF4169 在含 Amp 的 LB 平皿上选择转化子, 将长出的 Amp^r 转化子分别挑到 0.5mol/L NaCl 的 M63 平板检测这些转化子的抗高渗性能, 结果表明大部分 Amp^r 转化子能够在高渗透压培养基生长。挑取 FF4050 (pUC19-*otsA*) 和 FF4169 (pUC19-*otsA*) 转化子在同样平皿上纯化后提取质粒 DNA, 琼脂糖凝胶电泳检查分子量的增大。图 2 照片说明受体菌所含构建的质粒均带有 1.5kb 的扩增片段。

2.3 转化子生长曲线的测定

已知大肠杆菌在受到高渗透压环境胁迫时, 可以通过抗渗透压调节机制, 在体内累积 K⁺、合成甘露醇、甜菜醇、氨基酸、海藻糖等相容性介质, 以使细胞内外的渗透压达到平衡, 而且细胞 80% 的抗高渗功能是由海藻糖负责的, 因此检测细胞在高渗透压培养基中的生长, 可以确定细胞是否具有合成海藻糖的能力。

将 FF4050 (pUC19-*otsA*-8) FF4169 (pUC19-*otsA*-9) MC4100 和 FF4050 分别接入 M63 培养液, 37℃ 振荡培养过夜后, 以 1:40 稀释至含 0.5mol/L NaCl 的 M63 培养液。按所述方法间隔一定时间测定光密度值。图 3 是转化子的生长曲线, 可以看出, *otsBA* 野生型菌株 MC4100 转接后 6h 进入对数生长期, 12h 达到生长高峰, 转化子则分别在 8h 左右进入生长旺盛时, 经 12h 培养后与野生型菌株基本相同, FF4050 是 *otsBA* 基因缺失株, 不可能产生回复突变, 在高渗培养基中没有明显生长; FF4169 虽然带有野生型 *otsB* 基因, 但 *otsA* 基因是缺陷的, 它们的转化子如图 3 所示都能在高盐培养基中生长, 表明转化受

步分析扩增的片段, 在 Primer I 和 Primer II 中分别引入 *Sal*I 和 *Eco*RI 酶切位点。由于本实验室采用 Mu 转座子细胞内克隆的方法, 已经获得了完整的 *otsBA* 基因, pDW1 就是带有上述基因的 Mud5005 质粒^[15], 提取纯化该质粒 DNA 作为 PCR 扩增模板, 按材料和方法所述条件, 在 50 μ L 体积内进行扩增反应, 然后取 1 μ L 电泳检查扩增片段。图 1 是 PCR 扩增产物的电泳照片, 证明获得了克隆片段, 且长度与所设计的相符。

2.2 *otsA* 基因表达质粒的构建

扩增的 *otsA* 基因片段将用于构建双元载体, 利用农杆菌感染转化至烟草植物。为了验证扩增片段是否具有 *otsA* 基因功能, 我们将 1.5kb DNA 和 pUC19 同时用 *Sal*I 和 *Eco*RI 双酶切, 经 T4 连接酶连接后转化

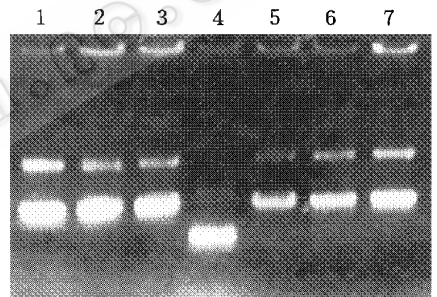


图2 转化子电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of transformants

1~3. FF4050 (pUC19-*otsA*);

4. pUC19; 5~7. FF4169 (pUC19-*otsA*).

体菌获得了 *otsA* 基因赋予的合成海藻糖能力,进而能够在高渗透压环境胁迫下进行正常的生长代谢。

2.4 *otsA* 基因的诱导表达及产物分析

为了证明转化子的抗高渗透压能力与细胞内海藻糖的合成有关,我们对转化子进行诱导后提取细胞内海藻糖进行检测。由于 *otsA* 基因构建在 pUC19 质粒的 *lacZ* 启动子后, IPTG 诱导可大大增强启动子活性,有利于 *otsA* 基因的表达。我们将菌株培养至对数期,加入 IPTG 和 NaCl 至转化株培养物中(MC4100 除外),使终浓度分别达 $40\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $0.5\text{mol}/\text{L}$,继续振荡培养 3h,按材料与方法所述,离心收集细胞,提取海藻糖,用硅胶板薄层层析法(TLC)分析测定海藻糖(图 4)。

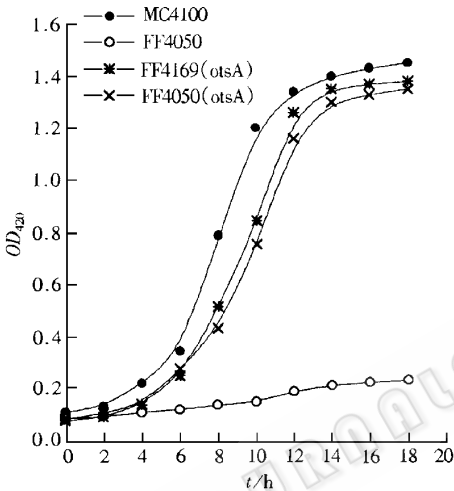


图 3 转化子在高渗透压培养基中的生长曲线

Fig. 3 The growth curve of transformants in high osmotic medium

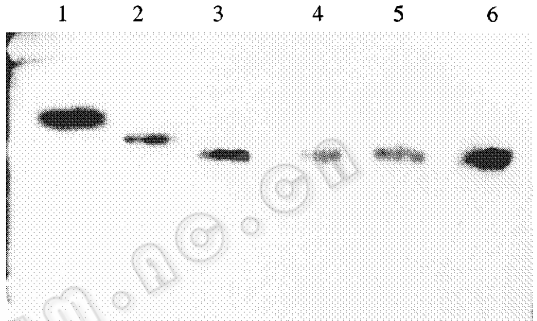


图 4 转化株中海藻糖的表达

Fig. 4 Trehalose expression in the transformants 1~3. represent standard glucose, sucrose and trehalose, respectively; 4~5. FF4169(pUC19-*otsA*) and FF4050 (pUC19-*otsA*) separately 6. MC4100.

图 4 中 6 位置,在与标准海藻糖相同层析高度处显示出较深的炭化带,带有 *otsBA*⁺ 基因的 MC4100 在高渗透压培养基中正常合成海藻糖。图中 4 和 5 位置也能观察到清晰的糖炭化条带,说明转化株经 IPTG 诱导后在高渗透压培养基中也能合成海藻糖,因此克隆的 *otsA* 基因获得了功能性表达,同时也进一步证明能够在高浓度 NaCl 培养基中生长的细胞与胞内合成海藻糖密切相关。

FF4169 是 *otsA* 基因缺陷株,当引入克隆的 *otsA* 基因后通过基因产物的互补而重新获得海藻糖合成能力。而 FF4050 是 *otsBA* 两基因的缺失株,它不可能通过自身回复突变为野生型,当引入 *otsA* 基因后在高渗环境下也能诱导合成海藻糖,且合成量与 FF4169 (pUC19-*otsA*) 无明显差异,说明 *otsA* 在海藻糖合成途径中起主要作用。*otsB* 基因并非该合成途径特异的,在细胞内存在的其它磷酸酯酶作用下将海藻糖-6-磷酸脱磷酸形成海藻糖,可见转入单个 *otsA* 即能使细胞合成海藻糖。

以上实验证明我们获得的 *otsA* 基因具有合成海藻糖功能。根据海藻糖能够保护生

物耐干旱、抗逆的特性,将 *otsA* 单个海藻糖合成酶基因转入植物,可望改善和提高植物的抗逆品质,对培育优良的农作物品种、粮食的增产增收有重要意义。*otsA* 基因的克隆和表达为进一步开展这一目的的研究,提供了可靠的实验依据和材料。

参 考 文 献

- [1] Tarczynski M C , Jensen R G , Bohnert H J . *Proc Natl Acad Sci* ,1992 **89** :2600~2604.
- [2] Kishor P B K , Hong Z , Miao G-H , *et al* . *Plant Physiol* ,1995 **108** :1387~1394.
- [3] Liang Z , Ma D Q , Dai X Y , *et al* . *Chinese Journal of biotechnol* ,1997 **13** :153~159.
- [4] Crowe J H , Crowe L M , Chapman D . *Science* ,1984 **223** :701~703.
- [5] Crowe J H , Hoekstra F A , Crowe L M . *Annu Rev Physiol* ,1992 **54** :579~599.
- [6] Hottiger T , Boller T , Wiemken A . *FEBS lett* ,1987 **255** :5518~5522.
- [7] 戴秀玉 程 苹 周 坚 等 . 微生物学通报 ,1995 **22** :102~104.
- [8] De Virgilio C , Hottiger T , Dominguez J , *et al* . *Eur J Biochem* ,1994 **219** :179~186.
- [9] Bell W , Klaassen P , Ohnacker M , *et al* . *Eur J Biochem* ,1992 **209** :915~959.
- [10] Kaasen I , Faldenberg P , Styrvold O B , *et al* . *J Bacteriol* ,1992 **174** :889~898.
- [11] Kaasen I , McDougall J , Strom A R . *Gene* ,1994 **145** :9~15.
- [12] Silhavy T J , Berman M L , Enquist L W . Experiments with gene fusion . Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1984.
- [13] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T . Molecular Cloning . 2nd edition . Cold Spring harbor Laboratory Prees ,1989.
- [14] 周 坚 吴大鹏 戴秀玉 等 . 微生物学通报 ,1997 **24** :125~127.
- [15] 戴秀玉 吴大鹏 周 坚 等 . 遗传学报 ,2000 **27** :158~164.

CLOWING AND EXPRESSION OF *otsA* GENE IN *E. COLI* *

Wang Yiqin Dai Xiuyu Wang Yunxun Zhou Jian

(*Institute of microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080*)

Abstract : 1.5kb of *otsA* gene encoding trehalose synthase has been cloned by PCR amplification. The DNA fragment was ligated to multi-copy vector and transformed to *otsBA* deleted and *otsA* deficient strains of *E. coli* separately. The transformants exhibited growth as well as the *otsBA*⁺ wild type on medium containing 0.5mol/L NaCl. Trehalose was synthesized and accumulated in the transformed cells under osmotic pressure , which was determined by thin layer chromatograph. The results confirmed that *otsA* gene was functionally expressed in the recipient strains. These studies suggested that engineering *otsA* gene and trehalose accumulation into crop plants may improve drought and salinity tolerance.

Key words : *otsA* gene , Trehalose , Expression

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(39980023)