

邻单胞菌邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因(*tfd C*)的克隆 及其在大肠杆菌中表达^{*}

马忠华¹ 罗如新² 夏怡丰¹ 王文东¹ 陈文峻¹ 蒯本科¹

(¹ 复旦大学生命科学学院生物化学系 上海 200433)

(² 复旦大学环境科学与工程系 上海 200433)

摘 要 根据已报道的邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因(*tfd C*)序列,设计 PCR 引物,从一株邻单胞菌(*Plesiomonas*)的 pL1 质粒上扩增到 *tfd C* 基因片段,连接到 pGEM-T 载体上,并转化大肠杆菌 JM109 菌株,筛选到阳性克隆。序列分析结果表明,PCR 产物全长 801bp,有一个阅读框,编码 255 个氨基酸,与增氧产碱菌(*Alcaligenes eutroplus*)的 *tfd C* 基因相比,在 693 位相差一个碱基(C→A),导致编码产物在 228 位相差一个氨基酸。将目的片段克隆到 pBluescript-II KS 质粒载体上,筛选到阳性克隆 pBt12G,在大肠杆菌 JM109 中可表达邻苯二酚 1,2-双加氧酶(C120)的活性,将翻译起始密码子为 ATG 的目的片段克隆到 pET-30a 质粒载体上,筛选到阳性克隆 pET30A,在大肠杆菌 BL21(DE3)_{plyS} 中可表达目的蛋白。C120 是芳香族化合物降解过程中的关键酶,为了进一步在草坪草中表达 *tfd C* 基因,利用草坪草降解环境中芳香族污染物,将该基因翻译起始密码子由 GTG 突变成 ATG,突变后的基因在大肠杆菌中可正常表达 C120 的活性。

关键词: 邻单胞菌,邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因(*tfd C*),PCR,克隆,表达

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2000)06-0579-85

邻苯二酚 1,2-双加氧酶(C120)是第一个被发现催化苯环开环的双加氧酶^[1],它催化苯环上邻位羟基内部开裂,故又称其为内二元醇双加氧酶。该酶在芳香族化合物降解中起非常重要的作用^[2,3]。在恶臭假单胞杆菌(*Pseudomonas putida*)和增氧产碱菌(*Alcaligenes eutroplus*)中已克隆到邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因(*tfd C*)^[4,5]。作者曾分离到一株能降解氯苯的邻单胞菌(*Plesiomonas*),在其细胞提取液中检测到 C120 的活性,并证明该菌株中的质粒与降解氯苯有关。本文在此基础上进一步克隆了编码 C120 酶的基因(*tfd C*),并研究了该基因在大肠杆菌中表达。为了研究该基因在草坪草中的表达机理,以便培育能够降解芳香族污染物的草坪草,已将该基因克隆到植物高效表达的质粒载体上。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

pL1 为降解氯苯的邻单胞菌(*Plesiomonas*)中的质粒, pGEM-T Easy Vector 及其宿主

^{*} 国家自然科学基金资助项目(39770478)

作者简介: 马忠华(1970-)男,江苏淮安人,复旦大学生命科学学院生物化学系副教授,博士,1999 年赴美国加州大学从事博士后研究工作,主要从事基因克隆、转化和表达研究

收稿日期: 1999-06-15, 修回日期: 2000-03-18

菌 *E. coli* JM109 为 Promega 产品 ,pBluescriptII KS 质粒为 Stratagene 产品 ,pET-30a 质粒及其表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)p_{lys}S 为 Novagen 产品 ,植物中高效表达质粒载体 pAJEBUB106 由协作研究单位英国草地环境研究所 Bettany 博士构建。

1.2 酶和试剂

Taq DNA 聚合酶 ,所有限制性内切酶及连接酶 ,PCR 产物纯化试剂盒 (5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖 X-gal) ,异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 均为 Promega 公司产品 ,其它所用的化学试剂均为分析纯。

1.3 引物合成及 PCR 扩增

根据 Perkins 等^[2]报道的邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因(*tfd C*)序列 ,用 PC/GENE 软件中 PCR 引物设计程序 ,设计 PCR 引物 ,扩增 *tfd C* 的编码区。

引物 I 5'—ACG GAG GCA AAG TGA ACA AAA GAG—3'

引物 II 5'—ACT GCT TCA ATC GCG TCA ATC TTC—3'

50μL PCR 反应混合物中含有 pL1 质粒模板 0.1μL(100ng/μL) ,10× Buffer(含 Mg-Cl₂) 5μL ,10mmol/L dNTP 2μL ,2μmol/L 引物各 1μL ,Taq DNA 聚合酶 0.5μL(1U) 。循环参数为 94℃ 变性 1min ,50℃ 复性 1min ,72℃ 延伸 2min ,30 个循环 ,最后 ,72℃ 延伸 5min。扩增产物经 PCR 纯化试剂盒纯化后备用。

1.4 PCR 扩增产物的克隆与鉴定

PCR 扩增产物纯化后 ,按 pGEM-T Easy Vector 试剂盒使用说明 ,连接到 pGEM-T Easy Vector 上 ,并转化大肠杆菌 ,在涂 IPTG 和 X-gal 的 LB 平板上筛选白色菌落 ,通过 PCR 和酶切鉴定后 ,获得重组质粒 pGEMt12G ,并进行核苷酸序列分析。

1.5 翻译起始密码子的突变

利用引物 III 和 1.3 的引物 II ,通过 PCR 方法将 *tfd C* 基因的翻译起始密码子 GTG 突变成 ATG。PCR 条件同 1.3 节。突变后的 PCR 产物按 1.4 的方法克隆到 pGEM-T Easy Vector 上 ,获得重组质粒 pGEMt12A。

引物 III 5'—ACG GAG GCA AAA TGA ACA AAA GAG—3'

引物 II 5'—ACT GCT TCA ATC GCG TCA ATC TTC—3'

1.6 邻单胞菌 *tfd C* 基因在大肠杆菌中的表达分析

1.6.1 质粒载体 pBt12G 和 pBt12A 的构建 :为确保邻单胞菌 *tfd C* 基因的阅读框在质粒载体 pBluescriptII KS 上不被破坏 ,分别用 *Sac* I 和 *Sac* II 从 pGEMt12G 和 pGEMt12A 重组质粒上切下目的片段 ,定向插入到 pBluescriptII KS 上的 *Sac* I 和 *Sac* II 位点间 ,将连接产物转化大肠杆菌 JM109 ,通过 PCR 和酶切筛选重组质粒 ,分别命名为 pBt2G(翻译起始密码子为 GTG) 和 pBt2A(翻译起始密码子为 ATG) 。质粒的构建过程见图 1。

1.6.2 质粒载体 pET30A 的构建 :用 *Eco*RI 从 pGEM12A 重组质粒上切下目的片段 ,插入到 pET-30a 的 *Eco*RI 位点之间 ,将连接产物转化大肠杆菌 JM109 ,通过酶切筛选重组正方向质粒 ,并命名为 pET30A(翻译起始密码子为 ATG) 。质粒构建过程见图 2。

1.6.3 邻苯二酚 1,2-双加氧酶粗酶液的提取 :分别将含有 pBt12G ,pBt12A 和 pET30A 质粒的大肠杆菌在含 IPTG 1mmol/L 的 50mL LB 培养基中 ,30℃ 下振荡培养 6h。4℃ 下离心收集菌体 ,用 0.05mol/L 的磷酸缓冲液(pH7.0)洗涤 2 次 ,再将菌体重新悬浮在

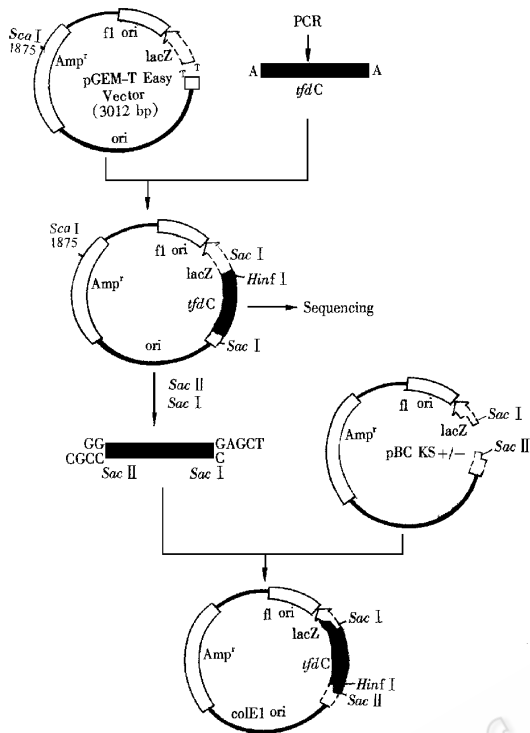


图 1 pBt12G 质粒的构建

Fig. 1 Construction of plasmid pBt12G

20mL 磷酸缓冲液中,经超声波破碎菌体细胞(破碎 4 次,每次 30s,间隔 2min),4℃ 下 15 000r/min 离心 30min,上清液即为酶粗提液。

1.6.4 邻苯二酚 1,2-双加氧酶活性检测 参照 Spain 等人^[6]的方法进行。反应混合物中含 40mmol/L EDTA 0.2mL,30mmol/L 邻苯二酚 0.02mL,酶粗提液 0.4mL,0.05mol/L 的磷酸缓冲液(pH7.0)1.38mL。反应混合物在 25℃ 水浴中反应 30min,每 5min 取样一次。反应产物顺,顺-己二烯二酸的吸收峰在 A_{260} 处。 A_{260} 峰值的增加表示产物顺,顺-己二烯二酸的积累。酶活以每毫克蛋白每分钟生成产物的微摩尔数表示($1\mu\text{mol}$ 邻苯二酚完全转变成顺,顺-己二烯二酸时, A_{260} 增加 5.6)。

1.6.5 SDS-PAGE 检测 将含有 pET30A 的大肠杆菌在含 IPTG 1mmol/L 的 50mL LB 培养基中,37℃ 下振荡培养 6h,4℃ 下离心收集菌体。用菌体收集缓冲液(含 50mmol/L Tris-HCl,pH8.0,2mmol/L EDTA)洗涤一次,用 0.1 倍体积的缓冲液重悬,加入 Triton X-100 破碎菌体,4℃ 下,15 000r/min 离心 30min,弃上清,加入 $1\times$ SDS 上样缓冲液,电泳。

2 结果和讨论

2.1 PCR 扩增

以邻单胞菌(*Plesiomonas*) pL1 的质粒为模板,按所设计的优化反应条件进行 PCR 扩增。扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测为单一条带,长度约为 800bp(图 3)。

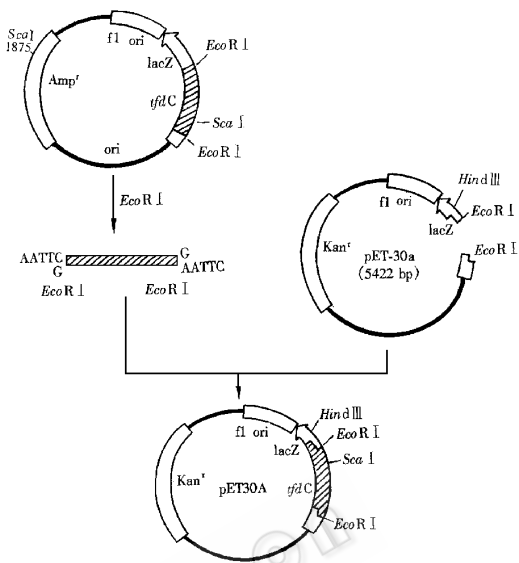


图 2 pET30A 质粒的构建

Fig. 2 Construction of plasmid pET30A

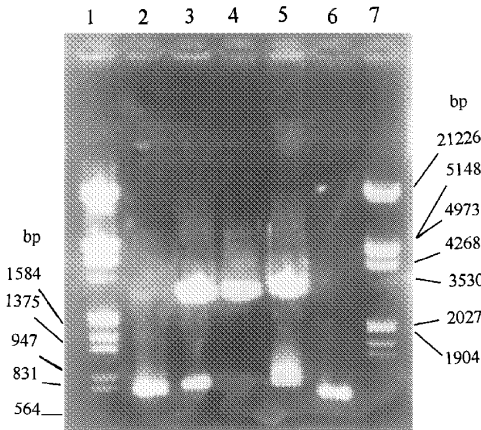


图3 PCR产物及pBt12G、pBt12A质粒酶切电泳分析(1.0% Agarose)

Fig.3 Electrophoresis analysis of PCR amplified product and

lasmsids pBt2G and pBt2A digested with *Sac* I and *Sac* II

1. λ DNA/*Eco*RI + *Hind*III Markers ; 2. PCR amplified product with primers I and II ; 3. Plasmid pBt12G digested with *Sac* I and *Sac* II ; 4. Plasmid pBluescript II KS digested with *Sac* I ; 5. Plasmid pBt12A digested with *Sac* I and *Sac* II ; 6. PCR amplified product with primers III and II ; 7. λ DNA/*Eco*RI + *Hind*III Markers.

2.2 扩增产物的克隆和序列分析

纯化后的PCR产物,克隆到pGEM-Easy Vector上,通过PCR和*Eco*RI酶切鉴定,筛选出多个重组质粒。对重组质粒pGEMt12G中的目的片段进行测序,结果发现PCR产物长801bp,有一个阅读框,编码255个氨基酸(图4),与发表的增氧产碱菌(*A. eutroplus*) JM134菌株pJ4质粒上*tfd* C序列^[4]基本相同。但在基因编码区693位上是A,而不是C,从而使得228位上脯氨酸变成了苏氨酸。

为了在草坪草中有效表达*tfd* C基因,通过PCR方法将邻单胞菌中*tfd* C基因的翻译起始密码子GTG突变成植物中的翻译起始密码子ATG。PCR产物克隆到pGEM-T Easy Vector上,获得重组质粒pGEMt12A,经序列测定,证实该基因翻译起始密码子突变成功。

2.3 邻单胞菌中*tfd* C基因在大肠杆菌中的表达

将转化pGEMt12G和pEMt12A的大肠杆菌在涂IPTG和X-gal的LB平板上生长,菌落呈蓝色。表明pBluescriptII KS质粒的多克隆位点上插入*tfd* C基因没有破坏 β -半乳糖苷酶基因(*lacZ*)的阅读框,重组质粒中*lacZ*

基因能正常表达。

以pBluescriptII KS质粒转化的大肠杆菌的细胞提取液为对照,发现含有pBt12G和pBt12A质粒的大肠杆菌,在1mmol/L IPTG诱导后,细胞提取液中均可检测到邻苯二酚1,2-双加氧酶的活性(图5)。这一结果表明邻单胞菌*tfd* C基因在大肠杆菌中可以表达,翻译起始密码子由GTG突变成ATG不影响该基因在大肠杆菌中的表达活性。但是,SDS-PAGE未能检测到目的蛋白,可能是由于pBt2G和pBt2A表达水平偏低。

试验选用pET-30a质粒载体及相应的表达宿主菌*E. coli* BL21(DE3) pLysS进行进一步的表达分析。上述结果表明,翻译起始密码子的突变对该基因在大肠杆菌中的表达无明显影响,同时考虑将来要在植物中表达这一基因,因此选用含ATG起始密码子的目的片段克隆到pET-30a载体上,经酶切鉴定获得了正向重组质粒pET30A(图6),并转入表达宿主菌。以1mmol/L IPTG,在30℃和37℃下分别诱导表达,在细胞提取上清液(30℃诱导)和沉淀(37℃诱导)中检测目的蛋白。发现在细胞提取液中,有较高的邻苯二酚1,2-双加氧酶活性(图7);在沉淀中,SDS-PAGE检测到与预计分子量吻合的目的蛋白(图8)。

ACGGAGGCAAAGTGAACAAAAGAGTCAAGGATGTTGTCGATGCGATCGTCGCGCGGTAC 60bp
V N K R V K D V V D A I V A A V Q
AGCGGGTGCTCGACCAGAAGGAGGTTACTGAGGCGGAATACCGAAGTGCAGGTTTCATTACC 120
R V L D Q K E V T E A E Y R T A V H Y L
TCATGCAAGTAGCCGAACAGCGTGAAACCGCTCTTCTTTGCGATGTTTTTTCAATAGCA 180
M Q V A E Q R E T A L L C D V F F N S T
CCGTGGCTGCGACGAAGGCTCGTATTAGCGAAGGTTCAACGCCTGCTATCGAGGGACCCCT 240
V A A T K A R I S E G S T P A I E G P Y
ACTATCGCGACGACGCCCTCTGGTCGATGACCGGCTCAAGACTTACGACACGGACGACC 300
Y R D D A P L V D D R L K T Y D T D D H
ACAAGCCTTTGCTTATCCAGGGAACGGTCAAAGCGGTCGACGGGAGCGTTGTCGAGGACG 360
K P L L I Q G T V K A V D G S V V E D V
TGACGATTGATGTCTGGCATTTCGACGCCCGATGGGAAGTACAGCGGTTTCCATGACGACA 420
T I D V W H S T P D G K Y S G F H D D I
TCCCGACTGATTTTTATCGAGGGAAGCTCAGGGTGGGCACCGATGGCAGCTTCCGCGTGC 480
P T D F Y R G K L R V G T D G S F R V R
GCACAACGATGCCGGTGCCGTATCAGATCCCGGATCAGGGTCCCACGGGCGCATTTGCTCG 540
T T M P V P Y Q I P D Q G P T₂ G A L L E
AAACCATGGGTGGTCACTCGTGGCGTCCCGCTCATGTACATTCAAGGTGAAGGGCGCGG 600
T M G G H S W R P A H V H F K V K A P G
GATATGAAACGTTGACCACGCAGTACTACTTCGAAGGTGGAGATTGGATACCGGACGACT 660
Y E T L T T Q Y Y F E G G A T I D D C
GTGCAACGGCGTCCAGTCTAGTCTGATTACTA*CCGATATTGTGGAAGGGTGTCCGCC 720
C N G V Q S S L I T T D I V E E G V R L
TGATGAACATCAACTTCGTTATGGAGCCCGCGGTGCGCAGGCGGGGGCAAACCCGTGAA 780
M N I N F V M E P A R A Q A G A N P
GATTGACGCGATTGAAGCAGT

图4 邻单胞菌(*Plesiomonas tfd C*基因核苷酸及其氨基酸序列

Fig.4 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *tfd C* from *Plesiomonas*
* Base difference between the *tfd C* from *Plesiomonas* and the one from *Alcaligenes eutroplus*.

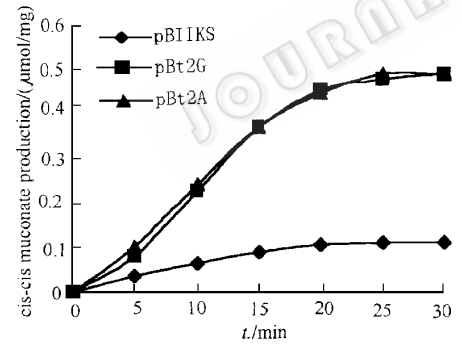


图5 含有 pBt12G 和 pBt12A 质粒的大肠杆菌细胞提取液中 C120 的反应进程曲线 (pBI-
IKS 为对照)

Fig.5 C120 reaction proceeding curves in cell ex-
tracts from *E. coli* containing plasmids pBt12G and
pBt12A respectively (pBI1KS used as the control)

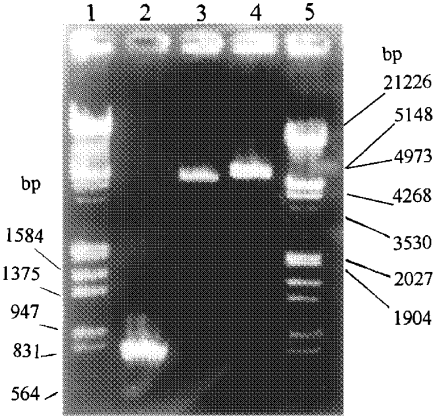


图6 pET30A 质粒酶切电泳分析(1.2%
Agarose)

Fig.6 Electrophoresis analysis of plasmid pET30A
digested with *EcoRI*

1. λ DNA/*EcoRI* + *Hind*III Markers; 2. PCR
amplified product with primers II and III; 3. Plas-
mid pET30A digested with *EcoRI*; 4. Plasmid
pET-30a digested with *EcoRI*; 5. λ DNA/*EcoRI* +

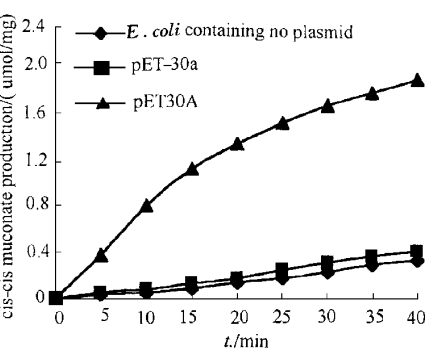


图 7 含有 pET30A 质粒的大肠杆菌细胞提取液中 C120 的反应进程曲线

Fig.7 C120 reaction proceeding curves in cell extracts from *E. coli* containing pET30A(*E. coli* containing no plasmid and plasmid pET-30a used as controls)

3 讨论

Leader 等^[7]研究发现 ,*Sphingomonas* 属的一些菌中 *tfd* C 基因编码的氨基酸序列与 *P. putia* 中 *tfd* C 基因编码氨基酸有 88% ~ 100% 的同源性 ,与 *A. eutroplus* 的同源性也达 86%。本研究克隆到的 *Plesiomonas tfd* C 基因与 *A. eutroplus* JMP134 菌株的 *tfd* C 基因编码的氨基酸基本相同。Perkins 报道^[4] 的 *A. eutroplus* JMP134 菌株的 pJP4 质粒上邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因编码区 765bp ,编码 255 个氨基酸。本研究通过 PCR 克隆到的邻单胞菌 *tfd* C 基因与增氧产碱菌的 *tfd* C 基因在 693 位上相差一个碱基 ,导致一个氨基酸的差异。但从大肠杆菌中的表达研究可知邻单胞菌 *tfd* C 基因所编码的产物仍具有明显的邻苯二酚 1,2-双加氧酶活力。

原核生物中翻译起始密码子为 GTG 的基因在植物中不能有效地表达。增氧产碱菌中起始密码子为 GTG 的 2,4-D 单氧化酶(*tfd* A)基因转入烟草中 ,不能有效表达 ,因而不能获得抗 2,4-D 的转基因植株 ;但将 GTG 突变成 ATG 后再转入烟草中 ,转基因植株便获得了对 2,4-D 的抗性^[8]。因此 ,为了在草坪草中表达从邻单胞菌中克隆到的 *tfd* C 基因 ,已将 *tfd* C 中翻译起始密码子 GTG 突变成 ATG ,突变后的基因在大肠杆菌中能表达出同样邻苯二酚 1,2-双加氧酶活性。这表明起始密码子由 GTG 突变成 ATG 并不影响该基因的有效表达。目前已将翻译起始密码子为 ATG 的 *tfd* C 基因克隆到植物高效表达的质粒载体 pAJEBUB106 上 ,以便研究该基因在植物中的表达机理 ,并探索培育能够降解芳香族污染物草坪草的可行性。

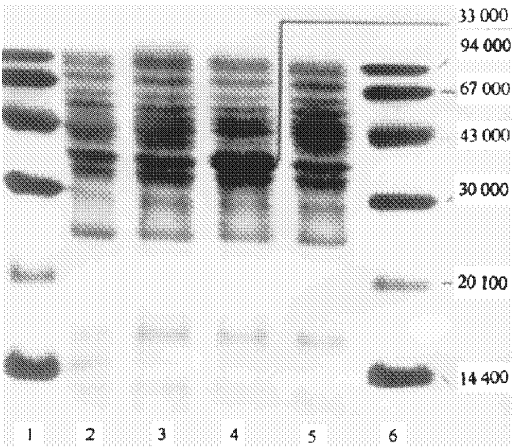


图 8 转化 pET30A 质粒的大肠杆菌细胞不溶组分的 SDS-PAGE 结果

Fig.8 SDS-PAGE of insoluble component of *E. coli* cells containing pET30A

1. Lower molecular weight protein markers ; 2. *E. coli* containing no plasmid ;3. *E. coli* containing pET-30a induced with IPTG ; 4. *E. coli* containing pET30A induced with IPTG ,the expected 33kD proteins indicated ; 5. *E. coli* containing pET30A without induction ; 6. lower molecular weight protein markers.

参 考 文 献

[1] Harayama S ,Rekik M. *J Bacteriology* ,19(9)264(26)15328-15331 联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [2] 李 钦,李 丽,寇秀芬,等.微生物学报,1989,29(1):39~44.
- [3] 寇秀芬,李 钦.微生物学报,1990,30(5):397~399.
- [4] Perkins E J, Gordon M P, Caceres O, et al. J Bacteriology, 1990, 172(5):2351~2359.
- [5] Koiv V, Marits R, Heinari A. Gene, 1996, 174:293~297.
- [6] Spain J C, Nishind S F. Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53(5):1010~1019.
- [7] Leander M, Vallaey T, Fulthorp R. Can J Microbiol, 1998, 44(5):482~486.
- [8] Lyon B R, Llewellyn D J, Huppata J L, et al. Plant Molecular Biology, 1989, 13:533~540.

CLONING OF A NEW CATECHOL 1,2-DIOXYGENASE GENE(*tfd C*) FROM PLESIOMONAS AND ITS EXPRESSION IN THE *E. COLI**

Ma Zhonghua¹ Luo Ruxin² Xia Yifeng¹ Wang Wendong¹ Chen Wenjun¹ Kuai Benke¹

(¹ Department of Biochemistry, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433)

(² Department of Environmental Science and Engineering, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract: A new catechol-1,2-dioxygenase gene(*tfd C*) was cloned from the *Plesiomonas* using the PCR method. Primers were designed according to the reported sequence of Catechol-1,2-dioxygenase(C120) gene from *Alcaligenes eutroplus*. The amplified fragment contained a 765 bp open reading frame(ORF), encoding a protein of 255 amino acids. The new *tfd C* gene shared a high homology with the one cloned from *Alcaligenes eutroplus*, showing only one base difference at 693 site(C→A) and consequently one amino acid difference at 228 site(P→T). The ORF was cloned to the plasmid pBluescriptII KS, which was transferred to *E. coli* JM109 and a positive clone, pBt2G, was then selected. A significant activity of C120 was detected in the positive clone. When the ORF was cloned to the plasmid pET-30a, which was transferred to *E. coli* BL21(DE3) plysS, the expected 33 kD protein was detected from a positive clone, pET30A, by SDS-PAGE. The C120 is a key enzyme in degrading aromatic pollutants in the environment. In order to use plants to degrade aromatic pollutants, the gene will be introduced into the turfgrass. To express the gene properly in plants, its translation initiation codon was modified from GTG to ATG. A similar activity of C120 was obtained following the modification.

Key words: *Plesiomonas*, Catechol 1,2-dioxygenase gene(*tfd C*), PCR; Cloning, Expression