

嗜麦芽假单胞菌酪氨酸酶基因在类产碱假单胞菌中的转移与表达

蔡信之^{1,2} 谢志雄² 沈 萍²

(¹ 盐城师范学院生物系 盐城 224002)(² 武汉大学生命科学院 武汉 430072)

摘 要:类产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)是从盐城市农村粪池中采集的自然病死蝇蛆体内分离的具有显著杀蛆作用的细菌,野外使用易受阳光中紫外线的影响而失活。黑色素具有很强的抗辐射作用。将构建的含有嗜麦芽假单胞菌酪氨酸酶基因的质粒 pWSY 导入类产碱假单胞菌体内,使后者获得了稳定产生黑色素的能力。Southern 杂交实验证实酪氨酸酶基因来源于嗜麦芽假单胞菌。SDS-PAGE 电泳显示该重组子体内额外表达了一分子量为 18kD 的蛋白,该蛋白很可能就是重组子表达的酪氨酸酶。经测定,重组子抗辐射作用明显增强,有效杀蛆时间显著延长,对畜、禽安全。

关键词:嗜麦芽假单胞菌,类产碱假单胞菌,酪氨酸酶基因,转移,表达

中图分类号:Q786 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 05-0553-06

酪氨酸酶基因(*mel*)编码的酪氨酸酶又称多酚氧化酶,是合成黑色素的关键酶,存在于细菌、放线菌、真菌、植物和动物体内,其功能主要是产生黑色素。黑色素是一类结构复杂的类多酚聚合物,具有独特的结构和性质,有很强的抗辐射作用,可以作为紫外线吸收剂,对生物体具有保护作用^[1]。本实验室分离并鉴定的嗜麦芽假单胞菌(*Pseudomonas maltophilia*)AT18 能稳定产生黑色素,并已证明该系统是由酪氨酸酶控制的。已将该菌的酪氨酸酶基因(*mel*)片段克隆到 *E. coli* 质粒载体 pUC18 上,构建了产生黑色素的工程菌 *E. coli*/pWSY^[2]。

类产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)是我们从盐城市农村粪池中采集的自然病死的蝇蛆体内分离到的具有显著杀蛆作用的细菌,但野外使用易受阳光中紫外线的影响而失活^[3]。目前,国内外细菌杀虫剂在使用中普遍存在的突出问题是:残效期太短,严重影响防治效果。主要是菌体和杀虫物质易被阳光中的紫外线灭活和钝化。有的在细菌杀虫剂中添加紫外线防护剂,以增强其对紫外线的抗性^[4]。其主要方法是将链霉菌产生的黑色素与 Bt 杀虫剂混合使用,可以有效地防止紫外线的破坏作用,大大延长其杀虫残效期。但是,这种混合使用方法的缺点是在野外环境中黑色素易被水冲洗掉,从而影响使用效果。若是杀虫菌体能产生黑色素,则可大大提高杀虫剂抵抗紫外线对菌体物质和杀虫物质破坏的能力,使其杀虫活性保持稳定^[5]。

将嗜麦芽假单胞菌的酪氨酸酶基因导入类产碱假单胞菌,使后者获得稳定产生黑色素的能力,就可以抵抗紫外线的辐射作用,从而稳定提高其杀虫效果。并且,由于黑色素惰性

作者简介:蔡信之(1945-),男,江苏盐城人,盐城师范学院生物系副教授,武汉大学生命科学院访问学者,主要从事杀虫微生物研究。

收稿日期:2000-09-05,修回日期:2001-01-03

强,不会与杀虫菌剂的有效成分作用^[6]。目前,国内外尚未见到过这方面的研究报告。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:嗜麦芽假单胞菌 AT18、工程菌 *E. coli*/pWSY 均由武汉大学生命科学学院微生物遗传室提供。类产碱假单胞菌由盐城师范学院生物系提供。

1.1.2 试剂:各种限制性内切酶、DNA 分子量标准、蛋白质分子量标准等均购自华美或原平生物工程公司。地高辛标记检测试剂盒购自 Boehringer - Mannheim 公司。

1.1.3 培养基:LB 培养基按文献[7]配制;酪素培养基和诱导培养基按文献[2]配制;发酵培养基:硫酸铵 5.0g,磷酸氢二钾 7.0g,磷酸二氢钾 3.0g,氯化钠 5.0g,硫酸镁 0.1g,葡萄糖 2.0g,蛋白胨 8.0g,pH7.0,定容至 1L。

上述后两种液体培养基,均在振荡培养 12h 后加入底物 L-酪氨酸至终浓度 1mg/mL。以上培养基使用前加氨苄青霉素至终浓度为 100mg/L。

肉汤蛋白胨培养基:牛肉浸膏 3.0g,蛋白胨 10.0g,氯化钠 5.0g,pH7.2,定容至 1L。

1.1.4 丽蝇幼虫饲养:由盐城师范学院生物系微生物实验室饲养。

1.1.5 安全性试验:所用畜禽系盐城市城区南洋镇农民饲养的成年畜禽。

1.2 方法

1.2.1 质粒的提取、纯化及检测:参照文献[7]进行。

1.2.2 类产碱假单胞菌感受态细胞的制备:参照文献[7~9]的方法进行。

1.2.3 转化反应:参照文献[7~9]的方法进行。

1.2.4 杂交实验:用 *Bam*HI 和 *Hind*III 切下 *E. coli*/pWSY 重组质粒上插入的外源 *mel* 基因片段,以原平生物工程公司 DNA 回收试剂盒回收之,以其为探针,用 Southern blotting 法进行杂交^[7]。地高辛标记探针及杂交结果的免疫检测均参照 B. M 公司地高辛标记检测试剂盒所附的使用说明书。

1.2.5 重组子 *mel* 基因的诱导表达及检测:参照文献[2,7]的方法进行。

1.2.6 重组子的抗辐射作用:重组子在发酵培养基中振荡培养 48h,将 15mL 菌液倒入 Ø9cm 平皿中,分别置于紫外灯(2530Å,20w)下方 35cm 处和日光下照射,经常摇动平皿,每隔一定时间取样稀释,进行平板菌落计数,最后进行生物测定。

1.2.7 重组子的杀蛆作用:生物测定按文献[3]的方法进行。

1.2.8 重组子的安全性试验:参照文献[3]的方法进行。

2 结果和讨论

2.1 类产碱假单胞菌细胞感受态的建立

假单胞菌细胞的感受态在对数期后期及稳定期中期较易建立^[9]。本实验采用培养至 OD₆₀₀ = 0.8 时的细胞进行 CaCl₂ 处理效果比较理想。较长时间的 CaCl₂ 处理有利于转化,但 CaCl₂ 处理时间过长也会使细胞存活率下降。本实验处理时间为 4h,效果较好。

2.2 酪氨酸酶基因的转移

以含有酪氨酸酶基因的质粒 pWSY 转化类产碱假单胞菌感受态细胞,将转化混合物

涂布于含有氨苄青霉素的酪素培养基平板上。30℃培养 36h,有的菌落周围便出现暗棕色圈,表明这些菌落产生可溶性黑色素,并已扩散到培养基中。初步断定它们就是本实验所需要的克隆有酪氨酸酶基因的阳性重组子。

上述产黑菌株反复在酪素培养基中转接、培养,发现其可以稳定地产生黑色素,与受体菌完全不同。将其与供体菌、受体菌同时划线接种在同一酪素平板培养基上,30℃培养 28h,结果如图 1。受体菌类产碱假单胞菌在酪素培养基中虽经较长时间的培养,始终不能产生黑色素。可见重组子产生黑色素的能力是由外源酪氨酸酶基因赋予的。

挑取上述产黑菌株分别在 LB 液体培养基中振荡培养,进行质粒检测,在绝大多数菌株中,虽经多次检测,均未发现有质粒存在。

2.3 Southern 杂交实验

将分别用 *Hind*Ⅲ消化的 *P. maltophilia* AT18 总 DNA、类产碱假单胞菌总 DNA、重组子总 DNA、*E. coli* HB101 总 DNA 和用 *Hind*Ⅲ 及 *Bam*H I 双酶消化的 pWSYDNA、pUC18DNA 及 λDNA/*Hind*Ⅲ经琼脂糖凝胶电泳分离后,转移到尼龙膜上,以地高辛标记的有 *mel* 基因的 pWSYDNA 的 0.7kb 小片段为探针进行 Southern 杂交实验。结果如图 2。AT18 总 DNA、重组子总 DNA、pWSYDNA、pUC18DNA 都有杂交信号,而受体类产碱假单胞菌总 DNA 及 *E. coli* HB101 总 DNA 均无杂交信号。说明重组子染色体上含有来自嗜麦芽假单胞菌的酪氨酸酶基因片段,而且已整合到染色体上。该结果还表明此片段与 *E. coli* HB101 DNA、类产碱假单胞菌 DNA 均无同源性,而与 pUC18DNA(相当于 pWSY 上的大片段)有同源性。

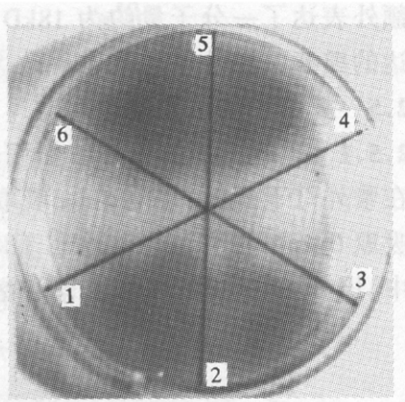


图 1 各菌株在酪素平板上产生黑色素的比较(28h)

Fig. 1 Comparison of strains producing melanin on the casein medium plate
1, 4. *E. coli*/pWSY; 2, 5. Recombinant;
3, 6. *P. pseudoalcaligenes*.

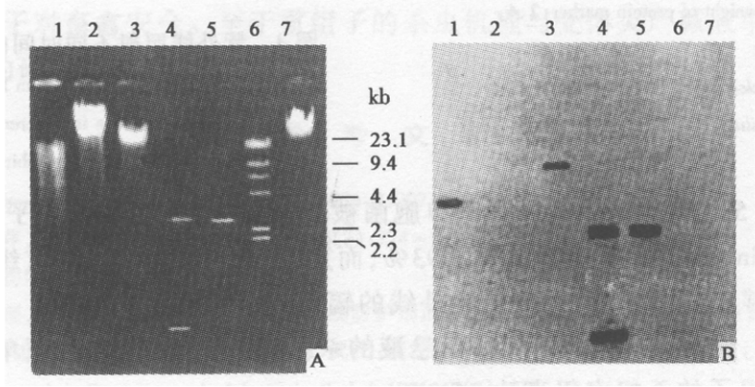


图 2 Southern 杂交实验

Fig. 2 Southern hybridization experiment

A. Spectrum of agarose electrophoresis; B. Southern hybridization, with dig-labelled probe prepared with 0.7kb fragment.
1. *P. maltophilia* AT18 total DNA; 2. *P. pseudoalcaligenes* total DNA; 3. Recombinant total DNA;
4. pWSY DNA; 5. pUC18 DNA; 6. λ DNA/*Hind*Ⅲ; 7. *E. coli* HB101 total DNA.

2.4 重组子酪氨酸酶基因的诱导表达

重组子、受体菌、供体菌及 *P. maltophilia* AT18、*E. coli* HB101 在诱导培养基中经过 L-酪氨酸诱导表达后,其总蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱(图 3)。经过比较,可以看到重组子额外表达了一分子量约为 18kD 的蛋白。这一结果与根据核酸序列中 ORF504 推断所表达的酪氨酸酶分子量基本一致^[2]。说明该蛋白即为表达的酪氨酸酶。

2.5 重组子的抗辐射作用

2.5.1 重组子的抗紫外线作用:将相同浓度的重组子与受体类产碱假单胞菌悬液同时放在紫外灯下照射,每隔 5min 吸取 0.5mL 菌悬液进行不同程度的稀释(试管外裹有黑纸),吸取 0.2mL 稀释菌悬液涂布于肉汤蛋白胨平板上,每个稀释度重复三次,30℃(在黑布袋中)培养 4d 后进行平板菌落计数,求出各自的存活率。结果如图 4。

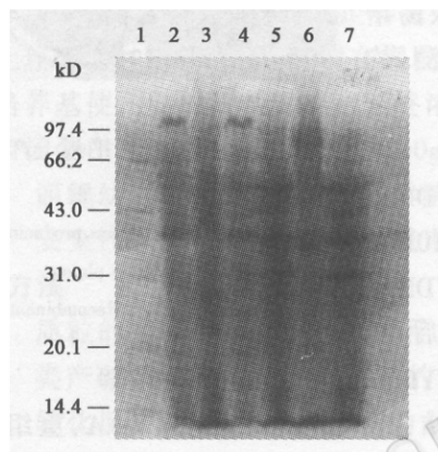


图 3 几株细菌总蛋白的 SDS-PAGE 图谱比较

Fig.3 SDS-PAGE illustration comparison of total protein of several strains

1. Molecular weight of protein marker; 2, 4, Recombinant;
3. *P. pseudoalcaligenes*; 5. *E. coli*/pWSY;
6. *P. maltophilia* AT18; 7. *E. coli* HB101.

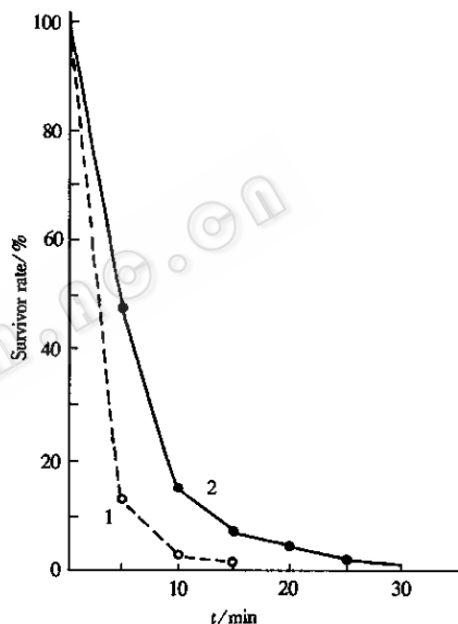


图 4 紫外线照射不同时间的菌体存活率

Fig.4 Survivor rates of bacterium by radiating of ultraviolet rays in different time

1. *P. pseudoalcaligenes*; 2. Recombinant.

紫外线照射 5min 后,受体类产碱假单胞菌被杀死的达 88%,而重组子仅死亡 51.6%;紫外线照射 10min,受体菌存活率仅为 0.93%,而重组子仍达 15.2%。重组子由于含有酪氨酸酶基因,能够产生黑色素,可抵抗紫外线的辐射,存活率明显提高。

经生物测定,紫外线照射 30min 后菌悬液的杀蛆作用,受体类产碱假单胞菌的杀蛆率仅为 34.7%,重组子的杀蛆率仍高达 56.8%。

2.5.2 重组子的抗日光辐射作用:将相同浓度的重组子与受体类产碱假单胞菌悬液同时放在日光下直接照射,每隔 1h 吸取菌悬液 0.5mL 进行不同程度的稀释(试管外裹有黑纸),分别吸取 0.2mL 稀释菌液涂布于肉汤蛋白胨培养基平板上,每个稀释度重复三次,30℃(在黑布袋中)培养 4d 后进行平板菌落计数,计算各自的存活率。结果如图 5。

日光照射 1h 后菌体的存活率,受体类产碱假单胞菌仅为 16.2%,而重组子高达 41.4%;照射 2h 后,受体菌的存活率为 1.2%,重组子仍达 15.0%。可见,重组子抗日光辐射的能力是显著的。

生物测定的结果表明,烈日照射 4h 的菌悬液的杀蛆率,受体类产碱假单胞菌为 55.8%,重组子为 67.4%。

受辐射作用后的菌悬液,其杀蛆作用的减弱与其存活率的下降不成比例,可能主要由于其杀虫物质与其菌体物质对紫外辐射作用的敏感性不同。据研究,类产碱假单胞菌对昆虫具有毒杀作用的物质是一种胞外蛋白质,存在于该菌的培养液中^[10]。而蛋白质与菌体的主要物质核酸对紫外线(2530Å)的敏感性差距较大。

2.6 重组子的杀蛆作用

多次生物测定的结果表明,重组子的杀蛆作用与受体类产碱假单胞菌基本相同,其 5d 校正杀虫率,前者为 75.8%,后者为 74.7%。

2.7 重组子的安全性试验

在两地同时进行的安全性试验的结果都表明,重组子与受体类产碱假单胞菌一样,对猪、兔、鸡、鸭等畜禽安全,连续饲喂 3d,给药后连续观察 40d,均无死亡,亦无异常反应。

综上所述,将嗜麦芽假单胞菌的酪氨酸酶基因(*mel*),通过转化导入类产碱假单胞菌,并整合在其染色体上,使其获得了稳定产生黑色素的能力,可以抵抗紫外线的辐射作用,延长其残效期,提高其杀蛆效果。并且,不会被雨水冲洗掉而影响其使用效果,使其杀虫活性比较稳定。又由于黑色素嗜性强,不能与杀虫剂的有效成分作用,不会降低其杀蛆能力。同时,重组子对畜禽安全。至于重组子的杀虫机理与受体类产碱假单胞菌有无区别,有待于进一步的研究。

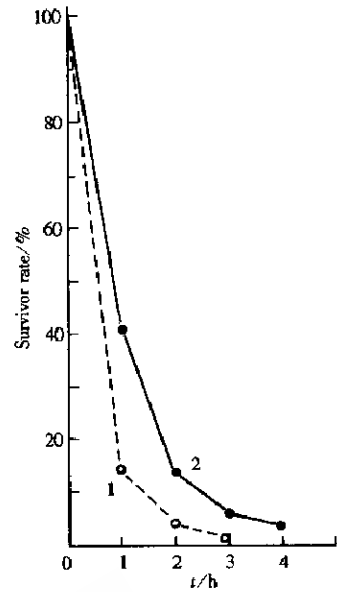


图 5 日光照射不同时间的菌体存活率

Fig.5 Survivor rates of bacterium by sunning in different time
1. *P. pseudocaligenes*;
2. Recombinant.

参 考 文 献

[1] Donald A R. *Copper Proteins and Copper Enzymes*, 1984, 2: 207 ~ 234.
[2] 王戈林, 沈 萍, 杨 澜, 等. 遗传学报, 1999, 26(3): 274 ~ 279.
[3] 蔡信之. 微生物学报, 2000, 40(5): 559 ~ 562.
[4] 崔云龙, 刘训理, 田 明. 苏云金杆菌制剂紫外线防护剂的研究. 见: 中国微生物学会农业微生物学专业委员会, 《杀虫微生物》编委会编. 杀虫微生物. 第四卷. 武汉: 武汉大学出版社, 1994. 64 ~ 65.
[5] Patel K R, Wyman J A, Patel K, et al. *J Invertebr Pathol*, 1996, 67(2): 120 ~ 124.
[6] Liu Y T, Sui M J. *J Invertebr Pathol*, 1993, 62: 131 ~ 136.
[7] Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold spring Harbor press, 1989.
[8] 北京大学生物系遗传教研室编. 遗传学实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1983. 22 ~ 37.
[9] 袁 斌, 沈 萍. 武汉大学学报(自然科学版), 1993, 39(1): 93 ~ 98.
[10] 张 文, 杨志荣, 朱 文, 等. 微生物学报, 1998, 38(1): 57 ~ 62.

TRANSFER AND EXPRESSION OF TYROSINASE GENE OF *PSEUDOMONAS MALTOPHILIA* IN *PSEUDOMONAS PSEUDOALCALIGENES*

Cai Xinzhi^{1,2} Xie Zhixiong² Shen Ping²

(¹ Biology Department of Yancheng Normal College, Yancheng 224002, China)

(² College of Life Sciences Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* is a notably killing maggots bacterium, which was isolated from natural dead maggots in the manure pits in the countryside of Yancheng. It easily die from effect of ultra-violet ray when it is exposed in the sun. Antiradiation effect of melanin is quite strong. *Mel* gene of *P. maltophilia* AT18 has been introduced into *P. pseudoalcaligenes*, and enabled it the ability of producing melanin steadily. Southern hybridization studies confirmed that the small fragment cloned in the *P. pseudoalcaligenes* comes from *P. maltophilia* DNA. SDS-PAGE analysis also revealed that an additional protein of 18kD, which was equal to the size of the putative tyrosinase according to *mel* fragment, was expressed in the *P. pseudoalcaligenes* recombinant carrying the *mel* gene. The results of assay show that antiradiation effect of recombinant is quites strong, the effect time of killing maggats is longer than the recipient, the recombinant can't infect animals and fowls.

Key words: *Pseudomonas maltophilia*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, Tyrosinase gene, Transfer, Expression