

## 嗜热菌 *Aquifex pyrophilus* 中 *mbh2* 基因簇的鉴定 和部分基因的克隆及测序

吕 健<sup>1</sup> G Rakhely<sup>2</sup> K L Kovacs<sup>2</sup> 肖昌松<sup>1</sup> 周培瑾<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(<sup>2</sup> 匈牙利科学院生物研究中心生物物理研究所 赛格德 匈牙利)

**摘 要:** 基于嗜热菌 *Aquifex aeolicus* 的 *mbhS2* 基因, 设计合成特异性引物, 以 *Aquifex pyrophilus* 的染色体 DNA 为模板, 应用 PCR 技术扩增出目的片段。序列测定结果显示, 其推导出的氨基酸序列与 *A. aeolicus* 的相应序列具有 85% 的同源性。以此 PCR 片段为探针, 从 *A. pyrophilus* 的 *Nco* I 部分基因组文库 (4~6kb) 中筛选出含 5kb 大小插入片段的阳性克隆, 进而对其进行了亚克隆及测序。结果表明, 该插入子包含 *A. pyrophilus mbh2* 基因簇的小亚基基因 *mbhS2*、*orf1* 基因和部分 *orf2* 基因。所推导出的氨基酸序列与 *A. aeolicus* 的 *MbhS2* 和 *Orf963* 相比较的同源性分别为 81% 和 60%。

**关键词:** *Aquifex pyrophilus*, *mbh2* 基因簇, 基因组文库, 亚克隆

中图分类号: Q785 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2001) 06-0674-06

自 70 年代石油危机以来, 氢气作为一种最有希望的替代能源, 已成为全世界研究的热点<sup>[1]</sup>。90 年代, 人们对于全球变暖的关注更加深了氢气作为新型能源的研究与开发<sup>[2-4]</sup>。而这些工作的中心问题是关于氢化酶的研究<sup>[5,6]</sup>。

有机体内, 氢化酶或存在于胞浆内 (杂四聚体), 或结合于膜上 (杂二聚体), 提供有机体利用或产生氢气的能力, 参与机体的能量代谢。几乎所有的氢化酶都是铁硫蛋白, 且大部分都含有镍。许多氢化酶都已从细菌或古细菌中分离得到, 一些编码 [NiFe] 氢化酶的基因簇也已被分离、克隆及测序。一般情况下, 编码 [NiFe] 氢化酶大小亚基的结构基因及其辅助基因位于同一转座子上, 且小亚基基因位于大亚基之前。 *Thiocapsa roseopersicina* 是一株耐热紫膜硫化光合细菌, 其含有两种 [NiFe] 氢化酶, 分别由 *hup* 和 *hyd* 基因簇所编码<sup>[7,8]</sup>。虽然这两种氢化酶均为膜结合的杂二聚体 (*HupSL*, *HydSL*), 且亚基大小相似<sup>[8]</sup>, 但是它们在稳定性及基因排列上具有非常明显的差异: 1. *HupSL* 对氧和温度敏感, 很易失活, 而 *HydSL* 对氧和热不敏感, 且能抵抗蛋白酶的消化; 2. 编码这种热稳氢化酶 (*HydSL*) 的基因簇具有非常特殊的排列方式, 即编码大小亚基的结构基因被两个 *orf* (*isp1* & *isp2*) 所分开。

1998 年, 嗜热非光合硫化细菌 *Aquifex aeolicus* 的全基因组序列发表<sup>[9]</sup>。序列结果表明, 该菌中含有四种 [NiFe] 氢化酶; 数据库检索显示, 其膜结合氢化酶 2 (*Mbh2*) 与 *T. roseopersicina* 的 *hyd-isp* 基因产物, 在所检测的所有蛋白质序列中, 同源性最高, 从而揭示,

**作者简介:** 吕 健 (1974 - ), 男, 天津市人, 中国科学院微生物研究所, 硕士生, 1999~2000 年赴匈牙利科学院生物研究中心从事极端环境微生物分子生物学方面的研究。

**收稿日期:** 2000-11-30, **修回日期:** 2001-02-16

二者在进化上存在一定的关系。由于专利的限制, *A. aeolicus* 无法利用, 因此本实验选取 *A. pyrophilus* 作为模式菌株。

*Aquifex pyrophilus* 分离自冰岛附近海底沉积物中, 可在 67℃ ~ 95℃ 之间生长, 最适生长温度为 85℃<sup>[10]</sup>。基于 16SrRNA 基因序列的系统发育分析表明, *Aquificaceae* 属位于进化树细菌分支的最底端<sup>[11]</sup>。虽然关于该菌生理、分子及系统进化方面的研究均有报道<sup>[10-12]</sup>, 但由于在分离突变株方面存在的困难及缺乏有效的基因转移系统, 该菌基因组结构和遗传学方面的研究进展缓慢。本文首次对 *A. pyrophilus* 中的 *mbh2* 基因簇进行了鉴定与分离。基于 *A. aeolicus* *Mbh2* 小亚基基因 *mbhS2*, 从 *A. pyrophilus* 的基因组中扩增出相应片段, 以此为同源探针, 从 *A. pyrophilus* 的部分基因组文库中得到一个 5kb 大小的片段, 进而对之进行了克隆、亚克隆及测序。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株、质粒及培养条件

菌株 *A. pyrophilus* DSM6858 购自 DSMZ, 质粒 pBluscribe19 + 购自 Stratagene 公司。

*A. pyrophilus* DSM6858 培养物培养于 SME 培养基中<sup>[10]</sup>。培养基过滤灭菌, 在 150mL 培养瓶中装入 30mL, 密封, 以 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (79:21) 混合气体排气 2min, 然后分别向瓶中注射 3mL 氧气和 3mL 种子液, 最后以 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (300kPa; 79:21) 混合气体充气 0.5min, 置 85℃ 静置培养 8 ~ 10h。

### 1.2 基因组 DNA 的提取

*A. pyrophilus* 培养物于 15 000r/min 离心 50min, 所得菌体保存于 -20℃ 供使用。以下方法参考自文献[13], 略有修改。将离心所得细胞重悬于 250μL R. caps<sup>[13]</sup> 缓冲液, 加入 5μL 20mg/mL 蛋白酶 K 和 100μL 0.5mol/L EDTA (pH8.0), 37℃ 温浴 1h; 然后加入 65μL 10% SDS, 25μL 25% Triton X-100, 70μL 5mol/L NaCl 及 65μL 10% CTAB, 轻微震荡, 65℃ 保温 45min; 混合液以 350μL 酚:350μL 氯仿-异戊醇 (24:1) 抽提除蛋白, 以 500μL 异丙醇沉淀, 70% 乙醇漂洗后抽干, 然后溶于无离子水或 TE 缓冲液中; 加入 RNase, 并于 37℃ 保温 1h, 以除去 RNA。

### 1.3 质粒 DNA 的纯化及基因克隆

按文献[14]所述方法进行。

### 1.4 DNA 片段的分离

从琼脂糖凝胶上分离纯化 DNA 片段按两种方法进行。一种是使用 DNA 抽提试剂盒 (MBI Fermentas), 另一种按下面的步骤进行: 从琼脂糖凝胶上将所需要的 DNA 片段切下, 装入 0.5mL PCR 管中 (其中预先放入一些玻璃棉), 置 -80℃ 冷冻 30min 以上; 取出 PCR 管后, 迅速在其底部以无菌针头扎一小洞, 然后放入 1.5mL eppendorf 管内, 6 000r/min 离心 10min; 所得溶液以一般方法抽提并沉淀<sup>[14]</sup>。

### 1.5 Southern 杂交和菌落原位杂交

杂交探针以 Digoxigenin 通过随机引物法进行标记 (参见 Dig High Prime DNA labelling and Detection Kit, Roche Diagnostic)。Southern 杂交和菌落原位杂交参照试剂盒说明进行, 洗脱条件采用 68℃, 0.1 x SSC, 0.1% SDS。

## 1.6 PCR 扩增

PCR 反应在 Minicycler™ (MJ Research Inc.) PCR 仪上进行。典型的扩增程序如下: 95℃ 3min; 95℃ 1min, 50℃ ~ 56℃ 1min, 72℃ 1 ~ 3min, 30 ~ 50 个循环; 72℃ 5min。

基于 *A. aeolicus* 的 *mbhS2* 基因所设计合成的引物如下:

AAH2P1: 5'TCGAAAGTCTTTACGAAATTTTT 3'

AAH2P2: 5'TTAAACTACCGTTATCTCCATC 3'

AAH2P3: 5'TCATATGGCTCGAGTTTCAGGATTG 3'

AAH2P4: 5'CTGAGCATCCGAAACAGGGGTCTCC 3'

AAH2P5: 5'GTACGTCACACTCACAGCTGGT 3'

AAH2P6: 5'AGAATCCACACCCGAACTTT G3'

## 2 结果和讨论

### 2.1 *A. aeolicus* 与 *T. roseopersicina* 氢化酶的相似性

使用 *T. roseopersicina* Hyd 氢化酶的亚基序列在国际序列数据库中进行检索, 其结果表明, 与该蛋白复合物最为接近的为嗜热硫化菌 *A. aeolicus* 的 Mbh2 氢化酶。同时, *A. aeolicus* 的 Mbh1 氢化酶与 *T. roseopersicina* 的 HupSL 也十分相似(图 1)。以前认为, *T. roseopersicina* 中 Hyd 氢化酶基因簇 *hyd-isp* 的排列方式仅限于光合紫膜硫化细菌, 并推测该酶与光合作用有关<sup>[15]</sup>。相似性比较结果表明, *A. aeolicus* 与 *T. roseopersicina* 在进化上存在着某种关系, *T. roseopersicina* Hyd 氢化酶的特殊性质也并不限于光合紫膜硫化细菌。同时, 既然 *A. aeolicus* 不能进行光合作用, 则 *T. roseopersicina* 中的 Hyd 氢化酶更有可能参与硫的代谢而不是光合作用。

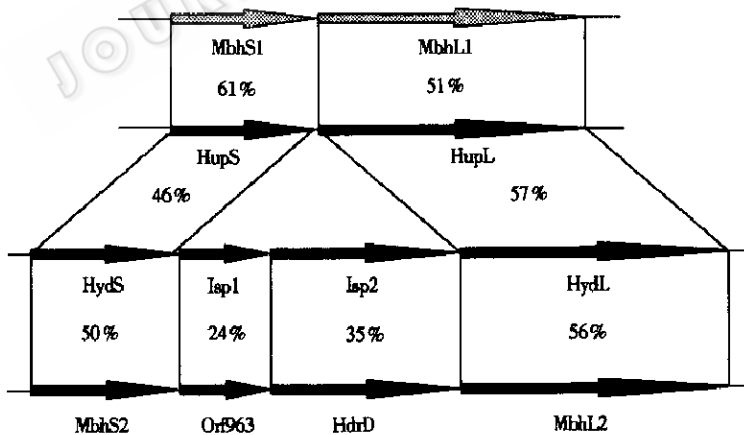


图 1 *T. roseopersicina* 和 *A. aeolicus* 氢化酶的同源性

Fig.1 Sequence homology of the hydrogenases in *T. roseopersicina* and *A. aeolicus*

HupSL, HydSL: hydrogenases in *T. roseopersicina*; lsp1, lsp2: product of accessory genes in *T. roseopersicina*; MbhSL1, MbhSL2: hydrogenases in *A. aeolicus*; Orf963, HdrD: product of accessory genes in *A. aeolicus*.

### 2.2 *A. pyrophilus* 中 *mbh2* 基因簇的鉴定

由于专利的限制, 无法以 *A. aeolicus* 进行深层的研究。因此, 它的同属近亲 *Aquifex*

*pyrophilus* 被选来做下面的工作。虽然 *A. aeolicus* 的全基因组都已公布,但是否在 *A. pyrophilus* 中存在同样类型的 *mbh2* 基因簇还未可知。为此目的,6个基于 *A. aeolicus mbh2* 基因簇不同区域的引物被设计合成(图2),并以不同组合,以 *A. pyrophilus* 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。结果表明,只有以 AAH2P3-AAH2P4 为引物的 PCR 反应得到了期望大小(0.7kb)的扩增片段(图2,图3)。该片段末端被切平及磷酸化后,克隆进入载体 pBluescribe19+ 的 *Hinc* II 位点,获得重组质粒 pAPH1/6。该插入片段测序结果表明,其长度为 729bp,衍生出的氨基酸序列与 *A. aeolicus* 的 *MbhS2* 亚基及 *T. roseopersicina* 的 *HydS* 亚基同源性分别为 85% 和 53%。从而表明,在 *A. pyrophilus* 基因组中存在类似 *A. aeolicus mbh2* 的基因簇。该插入片段以 Digoxigenin 标记,作为杂交探针。

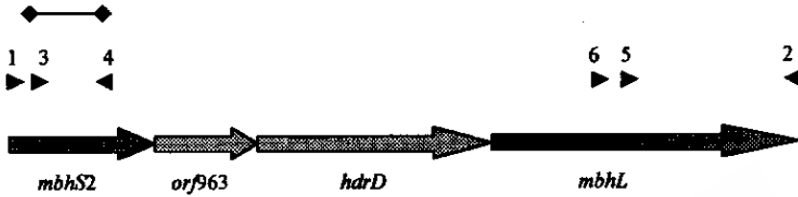


图2 用于扩增 *A. pyrophilus* 相应区域的引物在 *A. aeolicus mbh2* 基因上的位置

Fig.2 The position of primers in the *mbh2* genes of *A. aeolicus* used to amplify the corresponding region of *A. pyrophilus*  
The numbers mean the number in the AAH2P primers (see Materials and Methods)

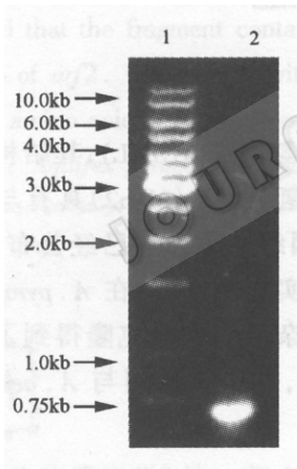


图3 PCR 产物

Fig.3 PCR product

1.1kb DNA ladder;2. PCR product.

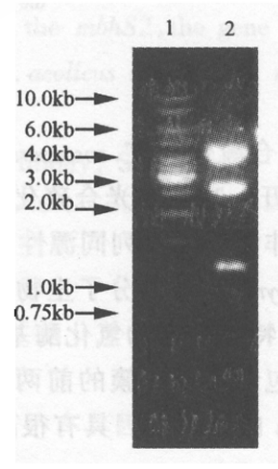


图4 pAPH1/7/*Hind* III 酶切片段

Fig.4 pAPH1/7/*Hind* III fragments

1.1kb DNA ladder;2. pAPH1/7/*Hind* III.

### 2.3 *A. pyrophilus* 中 *mbh2* 基因簇的分离

*A. pyrophilus* 的染色体 DNA 经不同限制酶酶切后,以 pAPH1/6 中的插入序列为探针,进行 Southern 杂交后,一个 5kb 的 *Nco* I 酶切片段给出阳性杂交信号。随后,以 *Nco* I 消化 *A. pyrophilus* 的染色体 DNA,分离 4~6kb 片段,插入载体 pBSN 的 *Nco* I 位点,构建部分基因组文库(在 pBluescribe19+ 的 *Hinc* II 位点插入一个 *Nco* I linker,得到载体 pBSN)。该部分基因组文库再以 pAPH1/6 中的插入序列为探针,进行菌落原位杂交,得到阳性克隆 pAPH1/7。

## 2.4 pAPH1/7 中插入子的酶切图谱、亚克隆及测序

以不同限制酶消化 pAPH1/7, 得到其部分酶切图谱(图 4, 图 5)。随后, 一个 2.7kb 和 1.2kb 的 *Hind*III 片段分别被亚克隆进入 pBluscribe19+ 的相应位点, 得到克隆 pAPH2/7 和 pAPH3/3。

对 pAPH1/7 和两个亚克隆进行两端测序, 结果表明, pAPH1/7 的插入序列中包含 *A. pyrophilus* Mbh2 氢化酶的小亚基基因(*mbhS2*)、相当于 *A. aeolicus* *orf963* 的第一个插入 *orf* 和第二个 *orf* 的前 366bp(相当于 *A. aeolicus* 的 *hdrD* 基因)。其衍生出的氨基酸序列与 *A. aeolicus* 的 MbhS2 和 Orf963 序列同源性分别为 81% 和 60%。

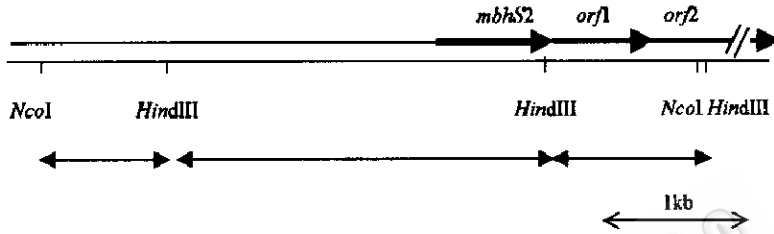


图 5 pAPH1/7 的酶切图谱及其亚克隆

Fig.5 The mapping and subcloning strategy of the pAPH1/7 clone harbouring half of the about *mbh2* gene cluster of *A. pyrophilus*

## 3 结论

耐热光合硫化菌 *T. roseopersicina* 中含有一种稳定的氢化酶(HydSL), 其结构基因被两个 *orf* 所分开。嗜热非光合硫化菌 *A. aeolicus* 的膜结合氢化酶 2(Mbh2) 具有与之相同的基因排列, 非常高的序列同源性。虽然 *A. aeolicus* 的基因组全序列都已经公布, 但其对同属近亲 *A. pyrophilus* 的分子生物学研究却很少。我们的实验已证明, 在 *A. pyrophilus* 中同样存在这种特殊排列的氢化酶基因簇。并通过 Southern 杂交的方法克隆得到了其部分基因簇, 其中包含该基因簇的前两个基因。序列比较显示, 这两个基因与 *A. aeolicus* 和 *T. roseopersicina* 的相应基因具有很高的同源性。

## 参 考 文 献

- [1] Benemann J R. Proc 10<sup>th</sup> World Hydrogen Energy Conf. Florida: Cocoa Beach, 1994.
- [2] Smith G D, Ewart G D, Tucker W. *Int J hydrogen Energy*, 1992, 17: 695 ~ 698.
- [3] Biochenko V A, Hoffman P. *Photosynthetica*, 1994, 30: 527 ~ 552.
- [4] Markov S A, Bazin M, Hall D O. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 1995, 52: 61 ~ 86.
- [5] Cammack R, Yaltes M G. *Nature*, 1986, 319: 182.
- [6] Albracht S P. *Biochem Biophys Acta*, 1994, 1188: 167 ~ 204.
- [7] Colbeau A, Kovacs K L, Chabert J, et al. *Gene*, 1994, 140: 25 ~ 31.
- [8] Rakhely G, Colbeau A, Garin J, et al. *J Bacteriol*, 1998, 180: 1460 ~ 1465.
- [9] Decket G, Warren P V, Gaasterland T, et al. *Nature*, 1998, 392: 353 ~ 358.
- [10] Huber R, Wilharm T, Huber D, et al. *Syst Appl Microbiol*, 1992, 15: 349 ~ 351.

- [11] Burggraf S, Olsen G J, Stetter K O, et al. *Syst Appl Microbiol*, 1992, 15:352 ~ 356.
- [12] Acca M, Bocchetta M, Ceccarelli E, et al. *Syst Appl Microbiol*, 1994, 16:629 ~ 637.
- [13] Ausubel F M. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2nd ed. New York: Greene Pub, 1992. 241 ~ 245.
- [14] Sambrook J, Maniatis T, Fritsch E F. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [15] Dahl C, Rakhely G, Kovacs K L, et al. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, 180(2):317 ~ 324.

## IDENTIFICATION AND CLONING OF PARTIAL *MBH2* GENE CLUSTER OF HYPERTHERMOPHILE *AQUIFEX PYROPHILUS*

Lu Jian<sup>1</sup> G Rakhely<sup>2</sup> K L Kovacs<sup>2</sup> Xiao Changsong<sup>1</sup> Zhou Peijin<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

(<sup>2</sup> Institute of Biophysics, Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Hungary)

**Abstract:** A 0.8kb fragment of *mbhS2* gene of *Aquifex pyrophilus* was obtained by PCR with designed primers basing *mbhS2* gene of *A. aeolicus*. It showed 85% homology with the corresponding region of *A. aeolicus*. Using it as probe, a 5.0kb *Nco* I fragment was fished out from the partial genomic library of *A. pyrophilus*. Then this fragment was cloned, subcloned and sequenced. The result revealed that the fragment contains the full length gene for the *mbhS2*, the gene *orf1* and the first 366 bp of *orf2*. Comparison with *mbhS2* and *orf963* of *A. aeolicus* shows 81% and 60% homologies in amino acid sequence, respectively.

**Key words:** *Aquifex pyrophilus*, *mbh2* gene cluster, Genomic library, Subclone