

类产碱假单胞菌酪氨酸酶基因重组子 所产黑色素性质的研究*

蔡信之

(盐城师范学院生物系 盐城 224002)

摘 要:将构建的含有嗜麦芽假单胞菌酪氨酸酶基因的重组质粒导入从自然病死蝇蛆体内分离的具有显著杀蛆作用的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,具有很强的抗辐射作用。所产黑色素是无定形物质,在大多数有机和无机溶剂中溶解度低或不溶解,在碱性溶液中有较好的溶解性,在中性及弱酸性溶液中溶解度低,在 pH < 4 的溶液中沉淀;可用过氧化氢或次氯酸钠氧化,也能被银离子或硫化氢还原;含有自由基,并能清除由紫外线诱导产生的自由基;能吸收所有波长的光线,在紫外波长下吸收值最大,能有效地保护紫外辐射对蛋白质及 DNA 等生物大分子物质的损害。

关键词:类产碱假单胞菌酪氨酸酶基因重组子,黑色素,性质

中图分类号:Q786 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2001)06-0699-05

类产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)是从盐城农村粪池中采集的自然病死蝇蛆体内分离到的具有显著杀蛆作用的细菌,在野外使用易受阳光中紫外线的影响而失活^[1]。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。主要是菌体物质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^[2]。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。但是,这种混合使用的方法不仅成本高,而且在野外环境中,黑色素易被水冲洗掉,影响使用效果^[3,4]。

酪氨酸酶是合成黑色素的关键酶,酪氨酸酶基因(*mel*)编码酪氨酸酶^[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,经 Southern 杂交实验证实,*mel* 基因已整合到受体菌的染色体上。形成的重组子具有稳定产生黑色素的能力,可以抵抗紫外线的辐射作用,由于黑色素惰性强,不会与杀虫剂的有效成份作用^[3],能够稳定提高其杀虫效果^[6]。本实验对重组子所产生黑色素的物理化学性质进行研究,并通过测定其清除超氧自由基的能力和抗紫外辐射的作用,为进一步利用重组子所产黑色素提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:类产碱假单胞菌 *mel* 基因重组子,其染色体上整合了嗜麦芽假单胞菌的酪氨酸酶基因,由本实验室构建并保存。嗜麦芽假单胞菌(*Pseudomonas maltophilia*) AT18 及

* 江苏省盐城市科学基金资助项目(S9811)

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,武汉大学生命科学学院访问学者,主要从事杀虫微生物研究。

收稿日期:2001-02-16,修回日期:2001-07-16

含有 *mel* 基因的工程菌 *E. coli*/pWSY 均由武汉大学生命科学院提供^[5]。

1.1.2 培养基:LB 培养基、酪素培养基及发酵培养基参照文献[4~7]。

1.1.3 仪器:UV-916 紫外分光光度计(GBC 公司);VIS-723 分光光度计(上海第三分析仪器厂);721 型分光光度计(上海第三分析仪器厂);NICOLET FT-IR 红外光谱仪(NICOLET 公司)。

1.2 方法

1.2.1 摇瓶发酵生产黑色素:250mL 三角瓶装发酵培养基 60mL,类产碱假单胞菌 *mel* 基因重组子的 LB 培养液以 1:20 的比例接种,于 30℃ 以 250r/min 摇床培养 12h 后再加入底物 L-酪氨酸至终浓度为 1mg/mL,再发酵 2d 收获发酵液。

1.2.2 黑色素的测定:按文献[7]的方法,用 721 型分光光度计测定黑色素溶液的 OD_{400nm} 值,则黑色素的含量(g/L) = $OD_{400nm} \times 0.105 \times N$ (N 为稀释倍数)

1.2.3 黑色素的提纯:参照文献[7]的方法进行。

1.2.4 黑色素清除超氧自由基实验:参照文献[8]的方法进行。

1.2.5 重组子黑色素的抗辐射作用:参照文献[6]的方法进行。

2 结果

2.1 重组子所产黑色素的溶解性和氧化还原性

重组子所产黑色素在碱性溶液中有较好的溶解性,在中性及弱酸性溶液中溶解度较低,在 pH < 4 的溶液中沉淀。在大部分有机溶剂中也不溶解。它与嗜麦芽假单胞菌及含有 *mel* 基因的工程菌 *E. coli*/pWSY 等细菌所产黑色素的溶解性及氧化还原性等性质的比较见表 1。

表 1 重组子与其他细菌所产黑色素性质的比较

Table 1 Comparison of the properties of the recombinant's melanin with other strains¹

	Solubility in water	Solubility in alkaline solution	Diposit when pH < 4	Solubility in methanol	Achromatized by H ₂ O ₂	Characteristic absorption band from 350 to 650nm
Recombinant	-	+	+	-	+	-
<i>P. maltophilila</i> AT18	-	+	+	-	+	-
<i>E. coli</i> /pWSY	-	+	+	-	+	-

重组子与嗜麦芽假单胞菌、*E. coli*/pWSY 所产黑色素在以上几项重要性质方面是一致的,由于它们都携带有酪氨酸酶基因。

2.2 黑色素的可见光吸收光谱

称取 2.9mg 经提纯的重组子等细菌所产黑色素,用少量 1mol/L NaOH 溶解后,以蒸馏水定容至 50mL,配制成 58μg/mL 的黑色素溶液,进行可见光连续扫描。

黑色素在波长 330~700nm 的区域内,吸收值随波长的减小而升高,无特征性吸收峰,这与嗜麦芽假单胞菌 AT18 及工程菌 *E. coli*/pWSY 所产生的黑色素也是一致的。

2.3 黑色素的紫外光吸收光谱

用以上配制的 $5.8\mu\text{g/mL}$ 黑色素溶液进行紫外光连续扫描。

重组子黑色素在波长为 $180\sim 500\text{nm}$ 紫外分光光度计扫描区域内,吸收值随波长减小稳定升高,无特征性吸收峰。这与工程菌 *E. coli/pWSY* 所产生黑色素是一致的。供体菌嗜麦芽假单胞菌 AT18 所产黑色素除在约 210nm 处有一特征性吸收峰,与重组子有点差异外,其余部分均相同。

2.4 黑色素的红外光谱扫描

用提纯的黑色素粉末进行红外光连续扫描,并与 *P. maltophilia* AT18 及 *E. coli/pWSY* 所产黑色素进行比较。

重组子与 *P. maltophilia* AT18 及 *E. coli/pWSY* 所产黑色素在约 $3\mu\text{m}$ 处都有一较大的特征性吸收峰,除在约 $4.2\mu\text{m}$ 处有大小略不相同的吸收峰外,三者的吸收曲线类似(图1)。也与鸟贼墨汁等黑色素的红外吸收曲线相同^[9]。重组子所产黑色素与 *P. maltophilia* AT18 及 *E. coli/pWSY* 所产黑色素一样,都是由酪氨酸酶催化 L-酪氨酸,经过一系列反应生成的,都是真黑色素。

2.5 黑色素对超氧阴离子自由基的消除作用

在所选择的浓度范围内,黑色素都能有效地清除由紫外线诱导产生的超氧自由基,但随黑色素浓度的增高,清除作用并不递增,并在黑色素增加到一定浓度后开始递减(图2),清除率最大值为 86% 。

2.6 重组子黑色素的抗辐射作用

将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,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°C 培养 4d 后进行平板菌落计数,求出各自的存活率,结果如图3。

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% ;照射 10min 后,受体菌存活率仅为 0.93% ,而重组子仍达 15.2% 。重组子能够产生黑色素,可抵抗紫外线的辐射作用,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为 34.7% ,重组子的杀蛆率仍高达 56.8% 。

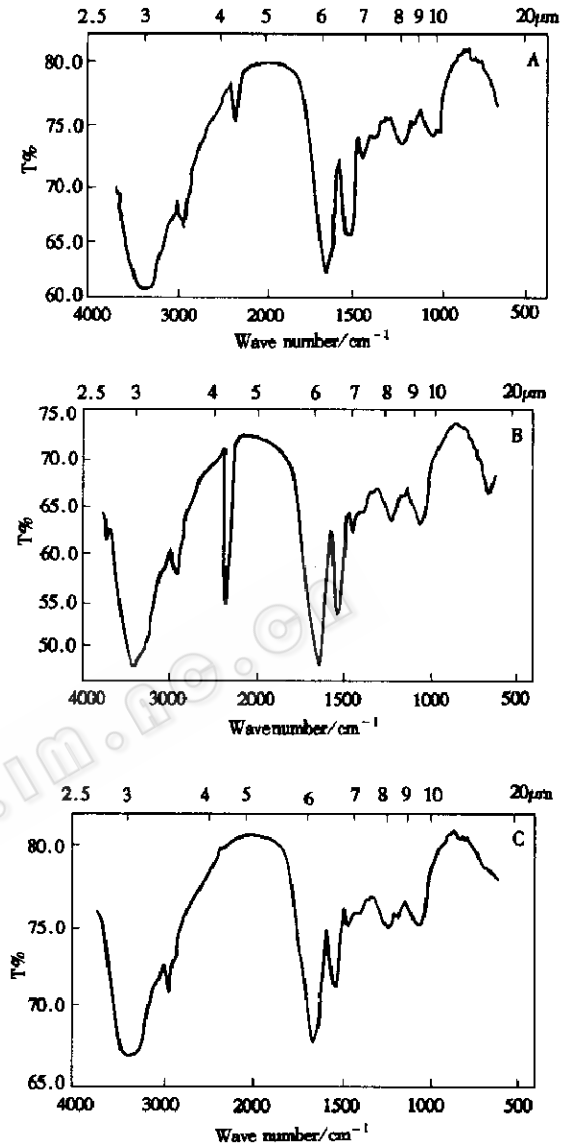


图1 几种细菌所产黑色素的红外光谱图

Fig.1 Ultrared absorption curves of the strains' melanin
A. Recombinant; B. *P. maltophilia* AT18; C. *E. coli/pWSY*.

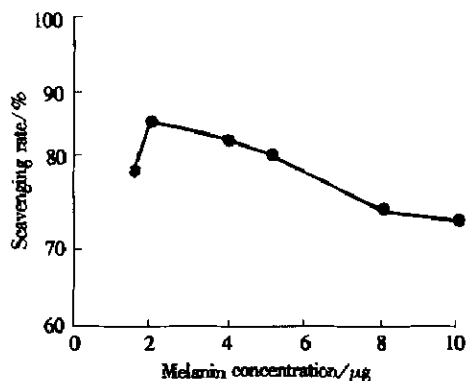


图2 黑色素对超氧阴离子自由基的清除作用

Fig.2 Scavenging of ultra-oxygen negative ion free radical by the melanin

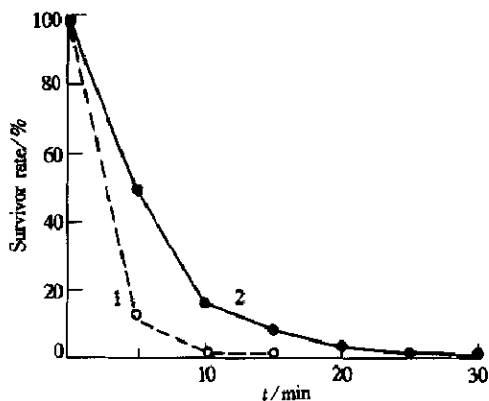


图3 紫外线照射不同时间的菌体存活率

Fig.3 Survivor rates of bacterium by radiating of ultraviolet rays in different time
1. *P. pseudoalcaligenes*; 2. Recombinant.

3 讨论

黑色素是一类结构复杂的类多酚聚合物,是广泛存在于生物界中的一类重要色素,具有许多独特的物理化学性质。不同来源的酪氨酸酶有不同的分子特性,分子量、等电点都有较大的变化。因而不同生物体产生的黑色素的性质也有差别。本实验研究的类产碱假单胞菌重组子黑色素具有其他生物黑色素都具有的一般性质。

(1)溶解性 它是无定形物质,在大多数有机和无机溶剂中溶解度低或不溶解,但当它的色基与糖类或蛋白质大量结合时,又具有水溶性,在碱性溶液中有较好的溶解性,在中性及弱酸性溶液中溶解度较低,在强酸性($\text{pH} < 4$)的溶液中沉淀。

(2)氧化还原性 它既可作为电子供体又可作电子受体,故可用过氧化氢或次氯酸钠氧化,也可用银离子或硫化氢还原。因此,它具有抗氧化作用,能防止心磷脂脂质的过氧化,能抵抗高锰酸盐、次氯酸盐及其它氧化物的氧化作用^[10]。

(3)超氧自由基 它含有天然物质中少见的超氧自由基,并能吸收环境中的超氧自由基^[11]。它还能清除自由基^[12]。在正常生理状态下,生命活动产生自由基较少,并能及时清除,使其处于生理性低水平,对人体有利。自由基浓度过高时,自由基和活性氧相互作用会导致 DNA 链断裂、碱基破坏和 DNA - 蛋白质交联,对机体损伤很大。

(4)抗辐射性 它能吸收所有波长的光线,在紫外和可见光区域随波长的增大,吸收值逐渐降低,在紫外波长下吸收值最大,能有效地保护紫外辐射对蛋白质和 DNA 等生物大分子物质的伤害。不同的黑色素在波长约为 $3\mu\text{m}$ 处都有特征性吸收峰。它是良好的紫外线吸收剂,可以保护机体免受紫外线的辐射伤害。黑色素也具有抗日光、X 射线、 γ 射线、宇宙射线、核辐射等多种辐射的作用。黑色素是目前所知的唯一保护皮肤免受辐射伤害的天然生物聚合物。

重组子所产黑色素的溶解性和氧化还原性测定结果、可见光吸收曲线等方面都与嗜麦芽假单胞菌 AT18、工程菌 *E. coli*/pWSY 所产黑色素一样,但紫外吸收曲线和红外光谱

图都与 *mel* 基因供体菌嗜麦芽假单胞菌 AT18 及工程菌 *E. coli*/pWSY 略有不同,显示它们的性质略有差异。

参 考 文 献

- [1] 蔡信之. 微生物学报, 2000, 40(5): 559 ~ 562.
- [2] 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: 杀虫微生物(第四卷). 武汉: 武汉大学出版社, 1994, 64 ~ 65.
- [3] Liu Y T, Sui M J. *J Invertebr Pathol*, 1993, 62: 131 ~ 136.
- [4] 蔡信之. 微生物学. 上海: 上海科学技术出版社, 1996. 208 ~ 209.
- [5] 王戈林, 沈 萍, 杨 澜, 等. 遗传学报, 1999, 26(3): 274 ~ 279.
- [6] 蔡信之, 谢志雄, 沈 萍. 微生物学报, 2001, 41(5): 553 ~ 558.
- [7] 段晓红, 毛 歆, 彭珍荣. 武汉大学学报(自然科学版), 1997, 43: 249 ~ 253.
- [8] Porebska-Budny M, Sakina N. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1116: 11 ~ 16.
- [9] Bonner T G. *Nature*, 1962, 194: 1078 ~ 1079.
- [10] Dunford R, Land E J, Rozanowska M, et al. *Free Radical Biol Med*, 1995, 19(6): 735 ~ 740.
- [11] Pathak M, Fitzpatrick T B. In *Sunlight and Man*. Tokyo: University of Tokyo Press, 1974. 725 ~ 750.
- [12] Lukiewicz S, Pilas B. Proceedings of the 11th international pigment cell conference. Tokyo: University of Tokyo Press, 1981. 647 ~ 653.

MELANIN PROPERTIES STUDIES OF THE RECOMBINANT OF *PSEUDOMONAS PSEUDOALCALIGENES* CONTAINING TYROSINASE GENE

Cai Xinzhi

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

Abstract: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* is a notably killing maggots bacterium, which was isolated from natural dead maggots. Tyrosinase gene of *P. maliophilia* AT18 has been introduced into *P. pseudoalcaligenes*, and enabled it the ability of producing melanin steadily. Antiradiation effect of the melanin is quite strong. The melanin of the recombinant is nonfixiform material. It's solubility is very little in many sorts of organic or inorganic solvent. It's solubility is big in alkaline solution, but little in neutral or weak acid solution. It is deposited when pH < 4. It is oxidized by H₂O₂ or NaClO. It is also reduced by Ag⁺ or H₂S. It has free radical and it can absorb free radical generated by ultra-violet ray. It can absorb ray of all sorts of wave length. The absorption rate of ultra-violet ray is the biggest in all sorts of wave length. It can effectively protect protein, DNA and other biomacromolecule matter against the damages by ultra-violet ray.

Key words: Recombinant of *P. pseudoalcaligenes* containing tyrosinase gene, Melanin, Property