

极端嗜盐硫解酶基因的克隆和氨基酸组成分析

刘铁汉 周培瑾

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 根据嗜盐菌(*Halobacterium salinarum*)NRC-34001 中硫解酶的基因序列信息,采用 PCR 技术从菌株 *Halobacterium* sp. ZP-6 中克隆了极端嗜盐硫解酶的基因,并对此酶的氨基酸组成进行了分析。同非嗜盐硫解酶相比,极端嗜盐硫解酶不但含有较多的负电荷氨基酸,较少的正电荷氨基酸和强疏水氨基酸,而且同类氨基酸中的小氨基酸含量明显增高。这表明极端嗜盐硫解酶的嗜盐特性不单来自形成的分子静电屏蔽网和疏水作用的调节,且与分子表面张力减小密切相关。

关键词 硫酸酶氨基酸组成,嗜盐蛋白

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2002)04-0406-05

嗜盐蛋白如何在高盐环境中维持稳定性和活性是极端环境生物学研究的重要问题之一。到目前为止,虽没有关于蛋白嗜盐机制的确切解释,但嗜盐蛋白中与嗜盐机理相关的结构特性却不断被揭示^[1~3]。多种生物学方法可用于该领域的研究,本文所用嗜盐蛋白和非嗜盐蛋白之间的氨基酸组成对比,操作简单,易于获得充足的可比数据,是揭示蛋白嗜盐机制的重要手段之一。

在以前的工作中^[4],纯化了嗜盐菌株 *Halobacterium* sp. ZP-6 中的硫解酶,对 N-末端进行了测序,结果表明 N-末端 14 个氨基酸残基与 *Halobacterium salinarum* NRC-34001 中 *acaB1* 基因所编码蛋白的硫解酶 N-末端序列完全一致。鉴于菌株 *Halobacterium* sp. ZP-6 和菌株 *H. salinarum* NRC-34001 的 16S rRNA 基因序列具有极高的同源性^[4]。利用菌株 *Halobacterium* NRC-34001 中硫解酶的基因序列信息,采用 PCR 技术从菌株 *Halobacterium* sp. ZP-6 中克隆了极端嗜盐硫解酶的基因,同时对比了极端嗜盐硫解酶与 55 个非嗜盐硫解酶的氨基酸组成,以此为基础对硫解酶的嗜盐机制作了简要分析。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

Halobacterium ZP-6 为本实验室保藏菌株;感受态大肠杆菌 DH5 α 为北京博大公司产品;pGEM T-Vector 为 Promega 公司产品。

1.2 总 DNA 的提取

参照徐毅等所用方法^[5],用 50mmol/L Tris-HCl(pH7.5)溶液裂解细胞,用酚-氯仿(1:1)

作者简介 刘铁汉(1972-)男,辽宁省台安县人,中国遗传和生物信息学中心药品研发人员,博士,主要从事酶学研究。

收稿日期 2001-09-05,修回日期 2002-01-25

抽提蛋白,冷冻无水乙醇沉淀 DNA,最后用 TE 缓冲液(pH8.0)溶解。

1.3 极端嗜盐硫解酶基因的 PCR 扩增

依据菌株 *H. salinarum* NRC-34001 的 *acaB1* 基因序列设计 PCR 引物^[6]。

引物 1 5'-GGTCCGATATGACAGACGCGCGTAGCTG-3' ;

Nde I

引物 2 5'-CGCGGATCCTCATGCCGCATCCGCCTCCGTG-3'.

*Bam*H I

PCR 反应条件:变性温度 97℃,时间 1min;复性温度 54℃,时间 1min;延伸温度 74℃,2min。总共 30 个循环。

1.4 硫解酶基因重组质粒的构建

将 PCR 产物纯化以后,与 pGEM T-Vector 连接,转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,涂含 Amp, X-gal 和 IPTG 的 LB 固体平板,筛选出白色菌落,以碱裂解法小规模提取 DNA,进一步验证阳性克隆。

1.5 序列分析

利用双脱氧终止法,采用 T7-Sp6 公用引物,在 377DNA 自动分析仪上进行 DNA 的序列测定。具体操作由上海基康公司完成。

1.6 生物学软件

Clustal X(1.8)用于同源性分析,Anthepro(4.3)用于氨基酸组成统计和嗜盐硫解酶等电点计算。

1.7 统计数据来源

统计过程中所涉及的非嗜盐硫解酶氨基酸序列来自 GenBank 数据库。具体序列号如下:*Acinetobacter* sp., AF009224;*Acinetobacter* sp., L37761;*Almangifera indica* (P), X75329;*Alcaligenes* sp. sh-69, AF002013;*Arabidopsis thaliana* (g), AB008854;*Arabidopsis thaliana* (P), AF062590;*Azotobacter vinelaneli*, AF267243;*B. Napus* (g), X93015;*Burkholderia pseudomallei*, AY007371;*Burkholderia* sp. DSMZ 9242, AF153086;*Cacnorhabdix elegans*, D86473;*Candida tropicalis* (C), D13471;*Candida tropicalis* (P), D13470;*Candida tropicalisa* (P), D17320;*Candida tropicalis* b (P), D17321;*Chromatium* sp., L05770;*Clostridium acetobutylium*, U08465;*Comamonas acidovorans*, AB009273;*C. thermosacchrolyticum*, Z82038;*Cucurbita* sp.(g), D70895.*Cucumis sativus* (P), X67696;*Drosophila melanogaster*, AB010262;*E. coli*, M74164;*E. coli*, X97452;*Ectothiorhodospira shaposhnikovii*, AF307334;*Enterobactercloacae*, AF191029;*Homo sapiens*, D16294;*Homo sapiens*, M75883;*Homo sapiens*(C), S70154;*Homo sapiens*(M), D90228;*Homo sapiens*(P), BC000635;*Homo sapiens*, D16481;*Oryctolagus cuniculus*, AF051897;*Paracoccus denitrificans*, D49362;*Polyandrocarya misakiensis*, AB053115;*Pseudomonas* sp. 61-3, Z80157;*Pseudomonas putida*, AF290949;*Pseudomonas putida*, U10895;*Ralstonia eutropha*, J04987;*Ralstonia eutropha*, AF026544;*Rapphanus sativus*(C), X78116;*Rattus norvegicus*, D16479;*Rattus norvegicus*, M57453;*Rattus norvegicus* (P), J02749;*Rattus norvegicus*, X05341;*Rat* (M), D13921;*Rhizobium meliloti*, X93358;*Saccharomyces sativus* (C), X07976;*Saccharomyces cerevisiae* (C), L20428;*Saccharomyces cerevisiae* (P), X53946;*Streptomyces* sp. AF109386;*Sus scrofa*, AF028007;*Thiocystis*

violacea ,L01113 ;*Yarrowia lipolytica*(C),AB042276 ;*Yarrowia lipolytica*(P),X69988 ;*Zogloea ramigera* ,J02631.

Abbreviations :C ,cytosolic ;M ,mitochondrial ;P ,peroxisomal.

2 结果和讨论

2.1 PCR 产物测序

PCR 产物测序结果表明此 PCR 产物与 *acaB1* 基因的序列完全一致 (GenBank Access No. AE 0054014)。鉴于菌株 *Halobacterium* sp. ZP-6 和菌株 *H. salinarum* NRC-34001 的 16S rRNA 基因序列具有极高的同源性^[4] ,可以认为菌株 *Halobacterium* sp. ZP-6 和菌株 *H. salinarum* NRC-34001 实际上是同一个菌株 ,所纯化的 β-酮脂酰辅酶 A 硫解酶即为基因 *acaB1* 所翻译的蛋白质产物。

```

ATGACAGACGCGCGGTAGCTGGCGTGGGGTTGACCCACTTCGGTGTGCATCCCAGCGG 60
ACGAGCCGCGACCTGTTTCGCGGAAGCCGGGCTGGCGGCGCTGGACGACGCCGGCTCGCC 120
CGCGAAGACGTGGCCGCGGTGCACTACGGCAACTTCATGGGGAGATTGAGCGAGCACCAG 180
GGCCACCAGGGCCGCTGGTCGCGGAGGCGCTGGGCCTCGACGTGCCCGCAACCCGGTAC 240
GAGTCGGCGTGCCGCTCGAGCGCGTCCGCTCCGGCGCGCGTCCCGTGACGTTCCGAAC 300
GGCGAGGCTGACGTGGTGGTTGTTCGGCGGCGCGGAGCGCATGAACAACCTCGAAAACGCC 360
GAATCGACGAGCGCTGGCGATCGCGGCCGACGGCTTGTACGAGGTGCGCGCGGGCATG 420
ACGTTCCCGGCGCGTACGCCCTGATGGCGGCGTCTACTTCGAGCAGTTCGGCGGCAGC 480
CGGGAGGACCTCGCGCACATCGCCGTCAAAAACACGCCAACCGGTGGACAACGACCCG 540
GCGCAGTACCAGCAGGCGATCACCGTCCGCGGACGCCCTGGAGTCGCCGCCGGTCGCGGAA 600
CCACTGCATCTGTACGACCGGTGCCCGTACCGACGGCGCGAGCGCGTCTGTCTCGTG 660
AGCGAGTCGTACGCCGACACGACGACGTCAGCGCACCAGTTCGGGTGACCGGCACCGGC 720
CAGGGCGGGACAAGATGGCGCTCCAGGACCGCCAGAACATGGCGACCTCGCCGCCCGCG 780
ACCGACGCCGCCACCGAAGCCTACGCGGACGCGAGGGGTGCCCGGACGACGTGGACGCTG 840
GCGGAAGTACAGACTGTTTACCATCGCGGAAGTGATGGCGACGGAGTCGCTGGGCTTT 900
TTCGACCCCGGAGCCGGCATCACTGCCGCGCGGAGGGTGTACGACCAAAGACGGGCGG 960
CTGCCGTTAACTCTCGGGGGGCTGAAAGCCAAGGGCCATCCGGTTCGGCGCGACCGGC 1020
ACCAGCCAGGTTCGGGAGCTCACCAGGCTGCTGCGCGGCGACACGTCAACAGCGAGCAC 1080
GTCGCGGACGCACAGACCGGTCGCGCACAACGCCGGGGGACGGTTCGCCAGCGCCGTC 1140
GTGCACGTGCTTGAGACGGTTCGGGACACGGAGGCGGATGCGGCATGA 1188

```

图 1 *Halobacterium* ZP-6 硫解酶的基因序列

Fig.1 Nucleotide sequence of *Halobacterium* ZP-6 thiolase

2.2 不同硫解酶氨基酸组成的统计对比分析

对嗜盐硫解酶和 55 个来自真核生物和真细菌的非嗜盐硫解酶的氨基酸序列进行了氨基酸组成情况分析 ,结果如表 1 和表 2 所示。除嗜盐硫解酶带电荷氨基酸含量有明显的提高外 ,其正电荷氨基酸与负电荷氨基酸的比例也发生了明显的改变。在非嗜盐硫解酶中 ,正电荷氨基酸的量略微高于负电荷氨基酸的量(11.7% : 10.2%) ,而在嗜盐硫解酶中情况恰好相反 ,负电荷氨基酸的量明显高于正电荷氨基酸的量。除个别活性催化残基之外 ,各种带电荷氨基酸均位于蛋白质的表面 ,因此极端嗜盐硫解酶蛋白的表面分布着超额的负电荷。这与嗜盐硫解酶等电点(4.2)为酸性相一致。蛋白表面具有超额的负电荷是嗜盐蛋白的一个显著特性。静电屏蔽学说认为这些负电荷主要是与溶液中的阳离子形

成离子对,对整个蛋白形成静电屏蔽网,起到对蛋白的稳定作用^[2,7]。

表 1 不同硫解酶氨基酸组成的统计

Table 1 Statistical comparison of different kinds of amino acids from thiolases

Thiolases	Charged/ %	Positive charge/ %	Negative Charge/ %	Apolar/ % I ,L ,M ,F ,V
55 non-halophilic thiolases	(19.8 ~ 25.03) 21.91	(9.88 ~ 13.91) 11.71	(8.85 ~ 12.21) 10.2	(25.68 ~ 30.92) 27.8
<i>Halobacterium</i> ZP-6 thiolase	24.28	9.6	14.68	23.51

表 2 不同硫解酶各个氨基酸残基组成的统计分析

Table 2 Statistical comparison of amino acid from thiolases

Amino acids	Average amino acid composition of non-halophilic thiolases/ %		Amino acid of halobacterium ZP-6 thiolase/ %
Alanine	(8.73 ~ 18.36)	13.56	18.73
Cysteine	(0.67 ~ 2.99)	1.53	0.75
Aspartic acid	(3.37 ~ 6.89)	5.02	8.10
Glutamic acid	(3.36 ~ 6.86)	5.29	6.58
Phenylalanine	(1.07 ~ 4.43)	2.80	2.27
Glycine	(6.73 ~ 11.67)	10.21	9.62
Histidine	(0.50 ~ 2.66)	1.66	3.79
Isoleucine	(2.78 ~ 9.06)	5.55	1.26
lysine	(1.51 ~ 8.67)	5.54	1.26
Leucine	(6.71 ~ 11.3)	8.40	7.08
Methionine	(1.50 ~ 6.39)	3.05	2.02
Asparagine	(2.53 ~ 6.71)	3.77	2.78
Proline	(2.79 ~ 6.07)	4.35	3.29
Glutamine	(1.26 ~ 6.12)	3.60	2.78
Arginine	(2.60 ~ 8.86)	4.68	4.55
Serine	(3.99 ~ 8.52)	5.95	5.06
Threonine	(3.56 ~ 6.83)	4.83	6.83
Valine	(5.86 ~ 10.2)	8.05	10.88
Tryptophan	(0 ~ 1.27)	0.55	0
Tyrosine	(0.49 ~ 3.60)	1.67	2.27

统计结果也表明,极端嗜盐硫解酶中位于蛋白内部的强疏水氨基酸(I,L,M,P,V)的含量明显降低(27.8%~23.51%)。在高盐环境中,随着盐浓度的提高,疏水作用力逐渐增强。嗜盐硫解酶降低其内部强疏水氨基酸的含量则可减小由于盐浓度提高所增加的疏水作用力,使嗜盐硫解酶在高盐条件下仍能保持灵活性。

另外对极端嗜盐硫解酶氨基酸量的改变进行精确的分析后发现(表 2):1)嗜盐硫解酶中负电荷氨基酸的量明显增加,但谷氨酸的量几乎没变,因此负电荷氨基酸含量的提高主要是来自于天冬氨酸量的提高(5.02%~8.10%)。2)极端嗜盐硫解酶中正电荷氨基酸残基的总量明显降低,组氨酸的量不但没有降低反而大幅增高(1.66%~3.79%),正电荷氨基酸总量的降低主要来自于赖氨酸含量的降低(5.44%~1.26%)。3)极端嗜盐硫解酶中强疏水氨基酸的总量明显降低,作为其中重要成员的缬氨酸含量明显升高(8.05%~10.88%)。其总量的降低主要来自异亮氨酸量的降低(5.55%~1.26%)。那么,为什么极端嗜盐硫解酶中同类氨基酸含量的改变表现出明显的不同?当利用分子大小(侧链长短)的尺度来衡量这些对氨基酸(D:E,H:K,V:I)后发现,极端嗜盐蛋白优先使用了同类氨基酸中较小的氨基酸。在高盐溶液中,使用较小氨基酸残基能够明显降低分子的表面张力,有利于增加分子的灵活性。溶液中盐的浓度越高,这种作用就应该越是明显。在嗜盐硫解酶中,丙氨酸的明显增高(13.56%~18.73%)也很容易用这种理论解释。因此我们认为在一定范围内优先使用较小侧链的氨基酸是嗜盐硫解酶适应高盐环境的又一重要机制。

参 考 文 献

- [1] Madern D, Pfister C, Zaccai G. *Eur J Biochem*, 1995, **230**: 1088 ~ 1095.
- [2] Dym O, Mevarech M, Sussman J L. *Science*, 1995, **267**: 1344 ~ 1346.
- [3] Richard S B, Madern D, Zaccai G. *Biochemistry* 2000, **39**: 992 ~ 1000.
- [4] Liu T H, Liu S J, Xue Y F, *et al.* *Extremophiles* 2002 (accepted).
- [5] Xu Y, Zhou P, Tian X. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, **49**: 261 ~ 266.
- [6] Ng W V, Kennedy S P, Mahairas G G, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**: 12176 ~ 12181.
- [7] Frolow F, Harel M, Sussman J L, *et al.* *Nat Struct Biol*, 1996, **3**: 452 ~ 458.

Molecular Cloning and Amino Acid Composition Analysis of A Halophilic Thiolase Gene

Liu Tiehan Zhou Peijin

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, Beijing 100080, China)

Abstract: 5' and 3' end sequence of *acaB1* gene as primers, the gene of halophilic thiolase from haloarchae, *Halobacterium* sp. ZP-6 was cloned and its amino acid composition was calculated. Compared with non-halophilic thiolase, the halophilic thiolase contains more negative charge amino acid, less positive amino acid and less strong hydrophobic amino acid, and use preferably small side-chain amino acid. Those suggest that electrostatic screen, hydrophobic effect and surface tension all contribute to halophilic properties of thiolase.

Key words: Thiolase amino acid composition, Halophilic protein