

北京红菱菌聚羟基烷酸合成酶基因的克隆与表达

张 伟 姜成英 戴 欣 刘双江*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 :以北京红菱菌基因组 DNA 为供体, pKC505 cosmid 质粒为载体系统 λ -噬菌体体外包装重组质粒并转染感受态细胞 *E. coli* JM109, 构建了该菌株基因组 DNA 文库。以聚羟基烷酸(PHA)合成酶基因通用简并引物扩增的 PHA 合成酶部分基因为探针, 经 DIG 标记后利用菌落原位杂交技术对文库进行筛选, 获得 3 个阳性克隆菌株, PCR 检测证明这 3 个克隆具有 PHA 合成酶基因片段。酶活测定表明 3 个克隆都具有 PHA 合成酶及与 PHA 合成相关的乙酰乙酰辅酶 A 还原酶的活性。

关键词 北京红菱菌 聚羟基烷酸 PHA 合成酶

中图分类号 :Q786 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2004)03-0332-04

利用光合细菌进行 PHAs 合成及其代谢途径的研究主要在紫色硫细菌和紫色非硫细菌两个类群中进行。紫色非硫细菌 *Rhodobacter*、*Rhodospirillum* 已经从紫色硫细菌 *Chromatium*、*Thiocapsa*、*Thiocystis* 等属菌中克隆获得了 PHA 合成途径中 PHA 合成酶或其它两个与 PHA 合成相关的 β -酮硫解酶、乙酰乙酰辅酶 A 还原酶的基因, 并且进一步研究发现紫色硫细菌 *Chromatium*、*Thiocapsa* 属菌株的 PHAs 合成酶由 *phbC* 和 *phbE* 两个多肽链组成, 明显区别于 *Rastonia eutropha* 中的 PHA 合成酶, 因而被划分为除 *R. eutropha*、*Pseudomonas oleovorans* 外的第 III 类 PHA 合成酶^[1,2]。

1992 年 Kawasaki 建立的光合细菌红菱菌属 (*Rhodocista*), 目前包括世纪红菱菌 (*Rcs. centenum*) 和北京红菱菌 (*Rcs. pekingensis*)^[3,4]。我们曾经对北京红菱菌合成 PHAs 的能力和特性进行了研究^[5]。本实验构建了北京红菱菌基因组文库, 利用 DIG 标记探针和菌落杂交筛选的方法筛选到含有 PHA 聚合酶基因片段的阳性克隆, 通过 PCR 扩增、酶活性测定的方法证明筛选到的重组粘粒含有 PHA 合成酶、乙酰乙酰辅酶 A 还原酶基因, 为进一步阐明北京红菱菌 PHA 合成及代谢途径奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 :北京红菱菌 (*Rcs. pekingensis*

strain 3-p AS 1.2194 = JCM11669) 为我室分离并鉴定^[4]。质粒 pKC505 由中国科学院微生物研究所微生物分子遗传与育种室提供, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109, XL1-Blue 为本室保藏菌株。

1.1.2 培养条件 :北京红菱菌菌种保存及培养采用 Imhoff & Trüper 培养基^[6], 去除 NaHCO_3 , 补加酵母膏 (1g/L), 蛋白胨 (1g/L); 厌氧螺口瓶 (20mL), 光照 1000~2000 Lux, 30~35℃。 *E. coli* JM109, XL1-Blue 采用 LB 培养基 (酵母浸膏 5g/L, 胰蛋白胨 10g/L, NaCl 10g/L), 37℃ 摇床培养。

1.1.3 限制性内切酶和主要试剂 :DNA 限制性内切酶、T4 连接酶、pMD18-T 载体系统购自 TaKaRa 公司; λ 噬菌体包装蛋白 Gigapack III Gold Packaging Extract 为美国 STRATAGENE 公司产品; PCR 反应系统试剂购自华美生物工程公司; 硝酸纤维素膜 (NC 膜) 为美国 Amersham 产品; DNA 纯化试剂盒为 QIAEX II 产品; DIG 杂交及检测试剂盒购自 Roche 公司, 产品编号分别为 1603558, 1585762。 抗生素氨基青霉素 (Am) 购买于农业科学院兽药检定所; 乙酰乙酰辅酶 A、辅酶 A 及 3-HB 辅酶 A 购自美国 Sigma 公司; NADPH 为北京鼎国生物公司产品。

1.2 基因组文库的构建和筛选

1.2.1 文库的构建 :以北京红菱菌 DNA 为供体, pKC505 质粒为载体系统, 使用 Gigapack III Gold Packaging Extract 试剂盒包装重组质粒并转染感受态细胞 *E. coli* JM109, 在含有氨基青霉素的 LB 平板上培

基金项目 :中国科学院院长青年创新基金

* 通讯作者。 Tel 86-10-62527118 Fax 86-10-62652317 E-mail Liusj@sun.im.ac.cn

作者简介 :张 伟 (1977 -) 女, 天津人, 硕士, 研究方向为环境微生物学。

收稿日期 :2003-07-22, 修回日期 2004-01-05

养,将获得的单菌落转接到同样的 LB 平板培养基上,获得基因组文库。

1.2.2 文库的筛选 将基因组文库中菌落转移到硝酸纤维素膜上,原位裂解使核酸结合于膜上^[7]。使用 DIG 标记的探针,参照 DIG 杂交及检测试剂盒方法杂交并显色。挑出阳性菌株。

1.3 DIG 标记探针的制备

利用 PHA 合成酶基因保守片段设计通用简并引物^[8],序列为:P1 5'-CC(C/G)CC(C/G)TGGATCAA(T/C)AAGT(T/A)(T/C)TA(T/C)ATC-3';P2 5'-(G/C)AGCCA(G/C)GC(G/C)GTCCA(A/G)TC(G/C)GGC-CACCA-3',对北京红菱菌基因组 DNA 进行扩增。反应条件:95℃ 5min,98℃ 20s,65℃ 2min,65℃ 2min,25 个循环。扩增片段与 pMD18 T-vector 连接后测序,得到的序列结果经比对与 GenBank 中 *Azospirillum brasilense* strain Sp7 PHA 合成酶基因有很高的相似性。这一段 PHA 合成酶基因序列在 GenBank 中的登记号为 AY283802。PCR 扩增片段纯化后进行 DIG 标记,作为杂交探针。

1.4 酶活的测定

实验菌株 β-酮硫解酶、乙酰乙酰辅酶 A 还原酶、PHA 合成酶酶活性的测定参照文献^[9]进行。

2 结果和分析

2.1 北京红菱菌基因组文库的构建

Mbo I 部分酶切基因组 DNA,回收 15~25kb 的酶切片段。*Hpa* I 及 *Bam* H I 处理质粒 pKC505 得到 2kb 和 16.7kb 两个片段,T4 连接酶使之与基因组 DNA 酶切片段相连。λ-噬菌体蛋白体外包装重组质粒并转染感受态细胞 *E. coli* JM109,转染产物涂布 LB(含 Am 11.6μg/mL)平板,共获得约 1200 个单菌落。随机挑取 20 个克隆,提取质粒,质粒酶切后证明所插入的外源基因片段主要为 15~25kb 左右,且插入片段的多态性较好。

参考相关光合细菌基因组信息,我们假定北京红菱菌基因组 DNA 全长约为 4500kb 左右,根据 Clarke-Carbon 公式 $N = \ln(1 - P) / \ln(1 - F)$ (P 代表筛选到目的基因的概率,F 代表插入片段与基因组 DNA 全长的比值,N 代表筛选到含目的片段的阳性克隆所需要的克隆数目),设定文库中含有 PHA 合成相关酶基因的概率为 99%,则筛到目的基因片段共需要 800 个以上的重组质粒,实验构建的文库中重组质粒的数目可以满足这一要求。

2.2 基因组文库的筛选

2.2.1 地高辛标记探针的制备:以北京红菱菌基因组 DNA 为模板,简并引物 P1、P2 扩增得到 900bp 左右的扩增条带(图 1, Lane 4)。将此 PCR 产物回收纯化后进行 DIG 标记作为杂交探针。

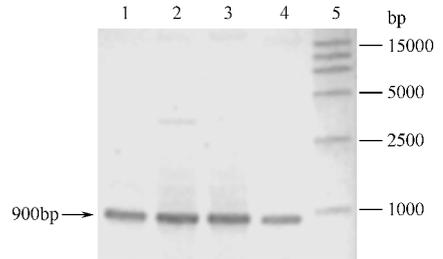


图 1 北京红菱菌 PHA 合成酶基因片段的扩增和阳性菌株质粒 PCR 结果

Fig.1 PCR amplification of PHA synthase fragment of *Rcs. penkingensis* and from hybrid cosmids

1. No.1 hybrid cosmid; 2. No.2 hybrid cosmid; 3. No.3 hybrid cosmid; 4. *Rhodocista pekingensis*; 5. Marker.

2.2.1 基因组文库阳性质粒的筛选:使用地高辛探针与接合于 NC 膜上的菌落核酸杂交,共筛选了 1200 个菌株,得到 3 个阳性结果的重组菌株(图 2)。

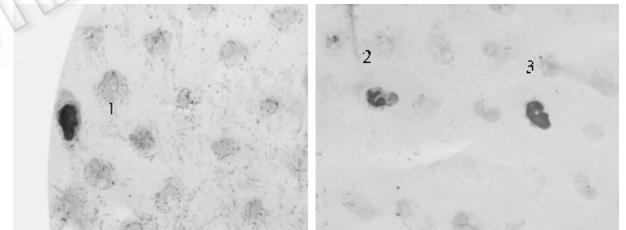


图 2 菌落原位杂交筛选到的阳性质粒

Fig.2 Results of *in situ*-colony hybridization

1~3. The positive hybrid clones.

提取这 3 个菌株的质粒,P1、P2 引物扩增,发现 3 个菌株都可以得到 900bp 的扩增片段(图 1, Lane 1~3),证明这 3 个质粒中插入的北京红菱菌基因组片段中都含有 PHA 合成酶的部分基因。对这 3 个质粒进行 *Eco* R I、*Pst* I、*Xba* I 限制性酶切(图 3),发现这 3 个重组质粒具有不同的酶切带型,证明这 3 个质粒含有不同的外源基因片段。

2.3 阳性克隆菌株酶活的测定

目前,已经阐明的光合细菌合成 PHAs 的代谢途径主要包括 3 个酶催化过程^[1]:首先是在 β-酮硫解酶催化下把两个分子的乙酰 CoA 合成为乙酰乙酰 CoA,后者在乙酰乙酰 CoA 还原酶作用下被还原为 3-羟基丁酰 CoA,最后 PHA 合成酶以链延长的方式把 3-羟基丁酰 CoA 连接到 PHB 长链上。实验中分别测定了北京红菱菌和 3 个阳性克隆菌株的相关

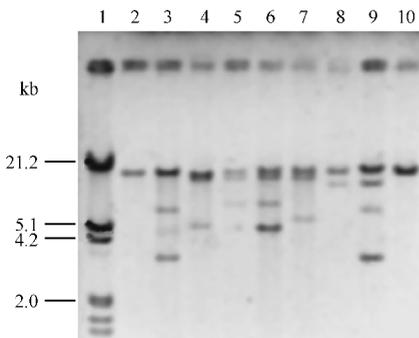


图3 阳性克隆质粒酶切结果

Fig.3 Restriction enzyme digestion of the hybrid cosmids

1. Marker ; 2. No. 1 hybrid cosmid/*EcoR* I ; 3. No. 2 hybrid cosmid/*EcoR* I ; 4. No. 3 hybrid cosmid/*EcoR* I ; 5.No. 1 hybrid cosmid/*Pst* I ; 6. No.2 hybrid cosmid/*Pst* I ; 7. No.3 hybrid cosmid/*Pst* I ; 8. No. 1 hybrid cosmid/*Xba* I ; 9. No. 2 hybrid cosmid/*Xba* I ; 10. No. 1 hybrid cosmid/*Xba* I .

酶活(单位时间内每 mg 蛋白与底物作用生成产物的量 μmol) 结果见表 1。

表 1 北京红菱菌和 3 个阳性克隆菌株中与 PHA 合成相关酶活测定

Table 1 Activities of PHA synthase, β -ketothiolase, and Acetylacetyl-CoA reductase of *Res. pekingensis* and selected clones

Strains	Enzyme activities($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)		
	β -ketothiolase $\times 10^{-3}$	Acetylacetyl-CoA reductase $\times 10^{-3}$	PHA synthase $\times 10^{-3}$
<i>Res. penkinensis</i>	0.653	2.030	0.295
<i>E. coli</i> JM109/pKC505	0	0	0.004
No.1 clone	0	0.118	0.267
No.2 clone	0	0.328	0.22
No.3 clone	0	0.135	0.252

这 3 个重组质粒都含有 PHA 合成途径中乙酰乙酰 CoA 还原酶和 PHA 合成酶的活性,说明在重组质粒的插入片段中含有这两个酶的基因片段。同时发现,这两个酶在克隆菌株的活性低于原始菌株,这与 1992 年 Hustede 报道的光合细菌 *Rhodobacter sphaeroides* 和 *Rhodospirillum rubrum* PHA 合成酶基因在 *E. coli* 中表达极差的实验结果相近^[10]。原因可能在于北京红菱菌 PHA 积累途径中基因调控系统与大肠杆菌不同。

3 讨论

克隆得到的光合细菌 PHA 合成途径表明紫色

非硫细菌的 *phaC* 由单体组成,区别于紫色硫细菌和蓝细菌的两个亚基组成的 PHA 合成酶。

实验中利用在插入位点的两端各有一个 *Pst* I 酶切位点,容易将插入的外源片段切下来深入研究的 cosmid 质粒 pKC505 作为载体构建了北京红菱菌的基因组文库,构建好的重组菌株共有 1200 株。

应用细菌 PHA 合成酶基因扩增通用简并引物,从北京红菱菌基因组 DNA 中扩增到 900bp 左右的片段。测序和序列比对结果表明扩增产物为 *phaC* 的部分片段。DIG 标记为探针后对文库进行筛选,得到 3 株有杂交信号的阳性菌株。PCR 鉴定,酶切结果证明这 3 株阳性菌株插入了 PHA 合成酶基因的部分片段,且插入的 DNA 片段不相同。

这 3 株菌都有乙酰乙酰 CoA 还原酶和 PHA 聚合酶的活性,没有 β -酮硫解酶的活性,说明 3 个阳性质粒的插入片段中,都没有 *phaA* 的完整片段。在已知克隆到的光合细菌 PHA 合成途径中,*phaA*、*phaB*、*phaC* 基因读写框并不相连,而是被基因片段或其他读写框相互隔开,区别于 *Ralstonia eutropha* PHA 合成途径。所以实验筛选到的这 3 个克隆没有 β -酮硫解酶的活性是可以解释的。酶活测定结果还表明在 *E. coli* 中表达的这 3 株阳性菌株的酶活远低于原始菌株北京红菱菌。此外,PHA 测定实验也表明,在重组菌株没有发现 PHA 的积累。推测原因在于:质粒上插入的外源基因片段在从 DNA-RNA 的转录过程和 RNA-蛋白质的翻译过程中,相应结构如启动子、核糖体结合位点等可能不易于被 *E. coli* 识别,所以表达酶活很低;*phaA* 的缺失或基因的不完整,造成 PHA 合成途径的不完整,本身并不能合成 PHA 的 *E. coli* 无法在菌体生长过程中合成 PHA 积累途径中相关酶合适的底物。

综上所述,本实验构建了北京红菱菌基因组 DNA 文库,并从这个文库中成功地筛选到含有 PHA 合成相关基因的 3 个重组质粒,并在这 3 个重组菌株中检测到 PHA 合成途径中乙酰乙酰 CoA 还原酶、PHA 合成酶的活性。本项工作为光合细菌尤其是紫色非硫细菌合成 PHAs 途径的研究奠定了基础,对于北京红菱菌 PHA 合成酶基因的进一步亚克隆和高效表达的工作也正在进行中。

参 考 文 献

- [1] Liebergesell M, Steinbüchel A. Cloning and nucleotide sequences of genes relevant for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid) in *Chromatium vinosum* strain D. *Eur J Biochem*, 1992, **209**: 135 - 150.

- [2] Liebergesell M ,Mayer F ,Steinbüchel A. Analysis of polyhydroxyalkanoic acid-biosynthesis genes of anoxygenic phototrophic bacteria reveals synthesis of a polyester exhibiting an unusual composition. *Appl Microbiol Biotech* ,1993 **40** :292 – 230.
- [3] Kawasaki H ,Hoshino Y ,Kuraishi H ,et al. *Rhodocista centenaria* gen. nov. ,a cyst-forming anoxygenic photosynthetic bacterium and its phylogenetic position in the proteobacteria alpha group. *J Gen Appl Microbiol* ,1992 **38** :541 – 551.
- [4] 张德民,黄志勇 杨惠芳. 紫色非硫细菌 *Rhodocista* 属一新分离株的鉴定及其系统学研究. *微生物学报* ,2000 **40**(1):14 – 20.
- [5] 张 伟,姜成英 戴 欣,等. 北京红菱菌合成聚羟基烷酸的研究. *微生物学通报* 2004 **31**(1)26 – 29.
- [6] Kawasaki H ,Hoshino Y ,Kuraishi H ,et al. *Rhodocista centenaria* gen. nov. ,a cyst-forming anoxygenic photosynthetic bacterium and its phylogenetic position in the proteobacteria alpha group. *J Gen Appl Microbiol* ,1992 **38** :541 – 551.
- [7] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁,黎孟枫,等译. 第二版. 北京 科学出版社 ,1992 :61 – 66.
- [8] Toshiaka F ,Yoshiharu D. Cloning and analysis of the poly(3-Hydroxybutyrate-co-Hydroxyhexanoate)biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. *Journal of Bacteriology* ,1997 **179**(15):4821 – 4830.
- [9] Nishimura T Saito T ,Tomita K. Purification and properties of beta-ketothiolase from *Zoogloea ramigera*. *Arch Microbiol* ,1978 **116**(1):21 – 27.
- [10] Hustede E ,Steinbüchel A ,Schlegel H G. Cloning of poly(3-hydroxybutyric acid) synthase genes of *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodospirillum rubrum* and heterologous expression in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology Letters* ,1992 **93** :285 – 290.

Cloning and Expression of Poly-hydroxyalkanoates Synthase Genes of *Rhodocista pekingensis*

ZHANG Wei JIANG Cheng-Ying DAI Xin LIU Shuang-Jiang*

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

Abstract : Genomic DNA of *Rhodocista pekingensis* was partial digested , ligated to cosmid pKC505 , packaged with λ -coat protein using a *vitro* packaging kit , and transfected into *E. coli* JM109. Using the DIG-labeled probe obtained from part of the PHA synthase gene of *Rhodocista pekingensis* by PCR. The genomic library was screened by *in situ*-colony hybridization and 3 positive hybrid strains were obtained. PCR amplification and enzyme activity measurement revealed that all the 3 strains had a fragment of PHA synthase gene and the activities of PHAs synthase , NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase related to synthesis of PHAs.

Key words : *Rhodocista pekingensis* , Poly-hydroxyalkanoates , PHA synthase

Foundation item : Young Scientists Innovation Foundation Granted by Ex-president of CAS

* Corresponding author. Tel 86-10-62527118 ; Fax 86-10-62652317 ;E-mail : Liusj@sun.im.ac.cn

Received date : 07-22-2003

本期广告索引

企业	版位	企业	版位
Amersham Biosciences	封二	镇江达森发酶设备有限公司	文后彩插 II
广州市华奥行仪器有限公司	文前彩插 I	南京宁和生化设备有限公司	文后彩插 III
上海联环生物工程设备有限公司	文前彩插 II	岛津(香港)有限公司	封三
香港徠卡仪器有限公司	文中彩插 I	镇江东方生物工程设备技术有限公司	封底
扬中市威柯特生物工程设备公司	文后黑白插 I		