

# 苏云金芽孢杆菌酪氨酸酶基因的克隆表达及应用初探

何 伟 阮丽芳 孙 明 李茜茜 喻子牛\*

(华中农业大学 农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070)

**摘 要** 酪氨酸酶基因编码的酪氨酸酶是生物体合成黑色素的关键酶。采用比较酪氨酸酶的同源保守结构域氨基酸序列的方法设计引物,从苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*) 4D11 中通过 PCR 扩增得到了包含酪氨酸酶基因的 DNA 片段。将该片段亚克隆到载体 pGEM-7zf 上并转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 所得到的转化子在添加了 L-酪氨酸的 LB 培养基中能合成可溶性的黑色素。测定该菌株黑色素的产量和在紫外光照射后的菌体活力,结果表明该基因产生的黑色素能在一定程度上保护菌体免受紫外辐射。

**关键词** 酪氨酸酶基因,黑色素,苏云金芽孢杆菌,克隆

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)06-0824-03

酪氨酸酶是生物体中合成黑色素的关键酶,它催化 L-酪氨酸形成 L-多巴及多巴醌,随后多巴醌经一系列非酶促反应形成黑色素。黑色素是一类广泛分布于生物界的一种无定型物质,它在生物体内表现多种生物学功能:例如抗氧化<sup>[1]</sup>、对生物大分子具有光保护活性<sup>[2]</sup>等。目前报道能产生黑色素的细菌包括 *Aeromonas*, *Azotobacter*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Vibrio*, *Rhizobium* 和 *Shewanella*。

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是目前世界上产量最大的微生物杀虫制剂。Bt 产生黑色素的现象已经有人报道<sup>[3,4]</sup>。Lifang Ruan<sup>[5]</sup>首次发现苏云金芽孢杆菌高温诱导产黑色素的新现象,并且发现这个现象具有普遍性。进一

步研究发现苏云金芽孢杆菌高温诱导所产黑色素也是经酪氨酸酶氧化酪氨酸途径产生的,该黑色素能大大提高苏云金芽孢杆菌对 UV 的抗性。本文在此研究的基础上,克隆了苏云金芽孢杆菌酪氨酸酶基因并在大肠杆菌中获得表达,验证了其功能。同时对黑色素的产生以及对生物活性的保持也进行了研究。为苏云金芽孢杆菌功能基因组研究及构建产黑色素杀虫基因工程菌提供了有益的参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

实验中采用的菌株见表 1。

表 1 供试菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this work

Strains/Plasmids	Characteristics	Source
Strains		
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	SupE44, $\Delta$ lacU169, hsdR17, recA1, endA1, gryA966, thi-1, relA1	Store in this lab.
<i>Bacillus thuringiensis</i> 4D11	Serotype 3a, 3b, 3c—Serovar. <i>kurstaki</i> , Cry <sup>-</sup>	Store in this lab.
EMB7zf	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ contains the plasmid pGEM-7zf	This work
EMB1179	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ contains the plasmid pGEM-1179	This work
Plasmids		
pGEM-1179	Fragment 1179 containing <i>mel</i> gene cloned in pGEM-7zf	This work
pGEM-7zf	Amp <sup>r</sup> , clone vector	Store in this lab.

所用抗生素为氨苄青霉素(Amp)100 $\mu$ g/mL。产黑色素验证所需培养基为酪素培养基,配方:LB 培养基添加 0.1% L-酪氨酸<sup>[5]</sup>。各种 DNA 限制酶、DNA 聚合酶及 T4 DNA 连接酶均购于 TaKaRa 公司, Gel extraction Kit 购于 Vitagen 公司,上海 Sangon 公司合成引物,其它化学试剂均为国产分析纯。

### 1.2 PCR 引物的设计和扩增

通过 NCBI 网站将各种已知酪氨酸酶(Tyrosinase)蛋白质

的氨基酸序列进行同源性比较得到其结构域保守氨基酸序列,编号为 pfam00246。由于有人将苏云金芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌已报道的基因序列进行比较发现,二者的相似性高达 98%<sup>[6]</sup>,因此将该结构域保守氨基酸序列通过在测序的蜡状芽孢杆菌 ATCC10987(NRS-248)总基因组中比对,查找得到与其同源性最大的一段 DNA 序列。根据这段序列设计引物 Primer M1: 5'-GAAGGATCCTTTGTAGCAGATAATCCAGGT-

\* 通讯作者。Tel: 86-27-87283455; Fax: 86-27-87280670; E-mail: yz41@mail.hzau.edu.cn

作者简介:何伟(1979-),男,河南洛阳人,硕士研究生,研究方向为芽孢杆菌分子生物学。E-mail: myway@webmail.hzau.edu.cn

收稿日期:2004-02-27,修回日期:2004-05-20

3'; Primer M2 :5'-CCCGAGCTCGTATTAATAGGGTCTGTCT-3'。  
PCR 扩增条件 :94℃ 60s, 55℃ 60s, 72℃ 60s, 28 个循环 ;  
72℃ 10min。扩增体系 :10 × buffer 2 $\mu$ L, primer 10pmol, dNTP  
0.2mmol/L, *ExTaq* 0.5 $\mu$ L, 补水至 20 $\mu$ L 混匀, 加矿物油覆盖。

### 1.3 DNA 操作和转化

Bt 总 DNA 抽提、质粒的提取及酶切等方法见文献 [7]。

### 1.4 细胞全蛋白 SDS-PAGE

菌体在液体酪素培养基中 37℃ 培养 36h, 收集菌体,  
1mol/L NaCl 洗涤 3 次, 蒸馏水洗涤 3 次, 100 $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 悬浮菌  
体, 加等量 2 × SDS-PAGE 上样缓冲液, 100℃ 加热 3 ~ 5min,  
10000r/min 离心 2min, 取上清液点样电泳。

### 1.5 黑色素含量的测定

配制 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50mg/mL 黑色素标准  
溶液, 测定其  $OD_{400}$  值, 制作黑色素标准曲线(资料未给出),  
该曲线中溶液的  $OD_{400}$  值与黑色素的浓度呈线性关系, 算出  
其斜率。测定发酵黑色素含量时, 将发酵液离心, 取上清用  
721 型分光光度计测得  $OD_{400}$  值, 则黑色素的含量( $g/L$ ) =  
 $OD_{400} \times (1/k) \times 1/100 \times N$  (其中  $k$  表示黑色素标准曲线的斜  
率,  $N$  表示稀释倍数)。

### 1.6 菌体存活力的计算

取 4mL 菌液于事先放置一大头针的灭菌培养皿( $\Phi =$   
3cm)中。将培养皿盖子打开放置于磁力搅拌器上, 调转速为  
100r/min。打开 300nm 波长紫外灯进行照射, 紫外光源功率  
16W, 距离被照射菌液 25cm。照射完成后, 关上紫外灯, 将样  
品进行 10 倍梯度稀释, 每个稀释度取 100 $\mu$ L 涂布抗性 LB 平  
板, 所有操作应在无菌且避光或红光下进行。置于 37℃ 培  
养 12 ~ 16h 后进行菌落计数。

## 2 结果和分析

### 2.1 *mel* 基因的克隆和表达

以苏云金芽孢杆菌 4D11 总 DNA 为模板, 用引物 M1/M2  
进行 PCR 扩增, 得到大小约 1179bp 的 DNA 片段。将该 DNA  
片段亚克隆到载体 pGEM-7zf 上, 得到重组质粒 pGEM1179。  
进一步转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 得到转化子 EMB1179。将转化  
子 EMB1179 在液体酪素培养基中 37℃ 培养 36h 后可观察到  
明显的产黑色素现象(图 1)。实验结果证明, PCR 扩增得到

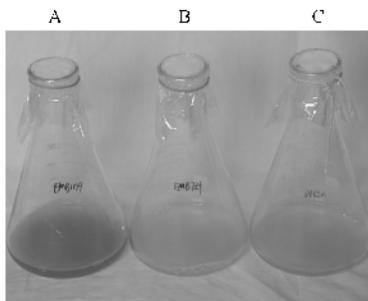


图 1 转化子 EMB1179 利用自身启动子表达酪氨酸酶产黑色素  
效果

Fig.1 Pattern of melanin production of EMB1179

A: EMB1179; B: EMB7zf; C: DH5 $\alpha$ .

的 1179bp DNA 片段上含有完整的 *mel* 基因, 并且此 *mel* 基  
因能赋予大肠杆菌产生黑色素的新表型。

### 2.2 PCR 扩增产物的序列分析

将 PCR 扩增得到的 1179bp DNA 片段在 TaKaRa 公司进  
行测序, 利用 Vector NTI Suit 7 DNA 分析软件进行序列分析。  
结果表明, 该片段内部有一长度为 741bp 的 ORF, 该 DNA 序  
列提交 GenBank, 登陆号为 AY451324。

### 2.3 酪氨酸酶蛋白的 SDS-PAGE 分析

将转化子 EMB1179 和宿主菌 DH5 $\alpha$  以及载体菌株  
EMB7zf 在液体酪素培养基中 37℃ 培养 36h, 进行细胞全蛋白  
样品的制备。制好的样品进行 12% SDS-PAGE 分析(图 2),  
由测序结果得到的 741bp ORF 推测所表达的蛋白质分子量  
约为 28.5kD, 从电泳结果可以看出, 与对照相比, 重组菌株  
获得一条与预期大小一致的特异条带。由以上实验结果可以  
推断此特异蛋白带为酪氨酸酶蛋白带。

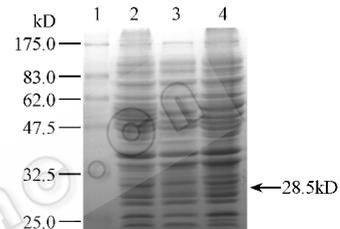


图 2 转化子 EMB1179 表达酪氨酸酶蛋白的 SDS-PAGE

Fig.2 SDS-PAGE separations of tyrosinase protein from the total soluble  
cell proteins of transformed cells

1. Protein molecular weight Marker; 2. DH5 $\alpha$ ; 3. EMB7zf; 4.  
EMB1179.

### 2.4 重组菌株黑色素生成量的测定

将产黑色素的转化子 EMB1179 在酪素培养基中连续培  
养 6、12、24、30、36、48h 后取样并在紫外分光光度计上进行吸  
光度的测定。根据公式: 黑色素的含量( $g/L$ ) =  $OD_{400} \times 0.015$   
 $\times N$  计算出各培养时期的黑色素含量。结果表明, 黑色素在  
菌体培养前 6h 内生成量不大, 在 6 ~ 18h 内生成量逐渐增  
大, 到 18h 达到峰值。

### 2.5 重组菌株经紫外照射后菌体存活率的测定

将 EMB1179 在摇瓶中 37℃ 培养 36h, 此时黑色素浓度为  
5.6mg/mL。按方法中所述进行紫外照射, 从打开培养皿盖子

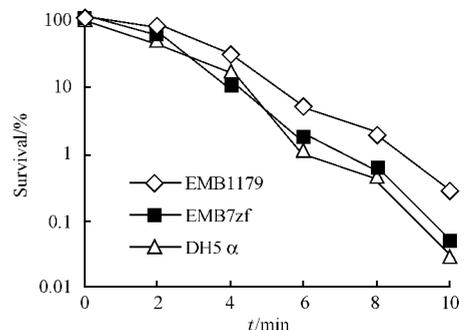


图 3 EMB1179 在 300nm 紫外灯下照射后的菌体存活率对比

Fig.3 The survival comparison of EMB1179, EMB7zf and DH5 $\alpha$  under  
UV irradiation

起分别开始计时照射 2、4、6、8、10min。菌落计数后算出存活率(图 3),结果表明 EMB1179 由于具有了产黑色素的新特征,在紫外线照射下与对照相比存活率显著提高。以上实验结果表明重组大肠杆菌 EMB1179 所产生的黑色素能有效增强其对紫外线的抵抗。

### 3 讨论

本研究首次在苏云金芽孢杆菌中克隆了产黑色素的关键酶基因 *mel*,并在大肠杆菌中验证了此 *mel* 基因的功能,在表型和蛋白质水平上检测了它的表达。同时初步研究了此重组菌株黑色素的产生与时间的关系,并进一步检测了此重组菌株对紫外线的抗性。研究结果表明,黑色素作为一种紫外吸收物质可以较好地增强菌体对紫外辐射的抗性。本研究将此苏云金芽孢杆菌高温诱导产黑色素的新现象从细胞水平的研究深入到分子水平,为进一步研究此 *mel* 基因的调控机制提供了理论及实验基础。

由于 Bt 制剂释放田间最大的一个问题就是持效期的问题,日光中 300~380nm 波长范围的紫外辐射是造成制剂中晶体失活的最重要的因素之一<sup>[8]</sup>,本实验用该范围最小波长进行照射,目的是为了更好评价黑色素对高能紫外线的吸收效果。目前所报道的有关利用黑色素提高 Bt 制剂持效性的途径包括直接添加黑色素作为光屏蔽剂<sup>[3]</sup>,利用外源酪氨酸酶基因在 Bt 中进行表达<sup>[9]</sup>等。苏云金芽孢杆菌自身 *mel* 基因的克隆将为其应用前景开辟新的天地,若将此 *mel* 基因构建到 Bt 非温度诱导型强启动子的控制下并转入高毒力苏云金芽孢杆菌,将会获得抗紫外线的 Bt 高毒力菌株。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 陈 玢,彭珍荣.嗜麦芽假单胞菌黑色素的抗氧化作用研究.氨基酸和生物资源,1997,19(2):32-34.
- [ 2 ] 宁 华.工程菌所产黑色素对生物大分子光保护作用的研究.华中师范大学学报,2001,35(1):84-88.
- [ 3 ] Liu Y T, Sui M J, et al. Protection from ultraviolet irradiation by melanin of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *J Invertebr Pathol*, 1993, 62: 131-136.
- [ 4 ] Deepak S, Eitan B, Robert M, et al. A UV tolerant mutant of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* producing melanin. *Current Microbiology*, 2002, 44: 25-30.
- [ 5 ] Lifang R, Ziniu Y, Bin F, et al. Melanin pigment formation and increased UV resistance in *Bacillus thuringiensis* following high temperature induction. *Systematic and Applied Microbiology*, 2004, 27: 56-60.
- [ 6 ] Read T D, Peterson S N, Tourasse N, et al. The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Letters to Nature*, 2003, 423: 81-86.
- [ 7 ] 孙 明,朱晨光,喻子牛.类似 S-层蛋白的苏云金芽孢杆菌伴孢晶体蛋白基因的克隆.微生物学报,2001,41(2):141-147.
- [ 8 ] Pusztai M, Fast P, Gringorten L, et al. The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Biochem J*, 1991, 273: 43-47.
- [ 9 ] Ruan L, Huang Y, Zhang G, et al. Expression of the *mel* gene from *Pseudomonas maltophilia* in *Bacillus thuringiensis*. *Letters in Applied Microbiology*, 2002, 34: 244-248.

## Cloning and Expression of Tyrosinase-encoding Gene (*mel*) of *Bacillus thuringiensis* and Its Initial Research of Application

HE Wei RUAN Li-Fang SUN Ming LI Xi-Xi YU Zi-Niu\*

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Tyrosinase, which is encoded by Tyrosinase gene (*mel*), is the key enzyme in the process of melanin formation in animals, plants and microorganisms. Using the primers designed by comparing the conserved domain of tyrosinase, a DNA fragment was amplified which contain the *mel* gene from *Bacillus thuringiensis* 4D11. The recombinant *E. coli* EMB1179 was gained by subcloning this DNA fragment onto the vector pGEM-7zf and transformed it into *E. coli* DH5 $\alpha$ . EMB1179 express the tyrosinase activity and produce melanin under the presence of L-tyrosin. The effect of melanin on survival of *E. coli* was also determined. The results showed that the melanin produced by EMB1179 effectively increased its resistance against UV light.

**Key words:** Tyrosinase, Melanin, *Bacillus thuringiensis*, Cloning

\* Corresponding author. Tel 86-27-87283455; Fax 86-27-87280670; E-mail: yz41@mail.hzau.edu.cn