

喜盐芽孢杆菌 D8 基因文库的构建及甘氨酸甜菜碱转运蛋白 *betH* 基因的筛选

卢伟东 赵百锁 冯德芹 王 磊 杨苏声*

(中国农业大学生物学院 农业部农业微生物资源及其应用重点开放实验室 北京 100094)

摘 要 喜盐芽孢杆菌(*Halobacillus*)D8 是一株产生芽孢的革兰氏阳性中度嗜盐菌,能够耐受 25% NaCl。以其总 DNA Sau3AI 部分酶切的片段为供体, pUC18 为载体 构建了该菌株的基因文库,共获得约 9000 个重组质粒。通过菌落原位杂交、菌落 PCR 检测及 DNA 序列测定,从该文库中筛选到含有完整的甘氨酸甜菜碱次级转运系统基因的重组质粒,将此基因命名为 *betH* 基因。序列分析发现, *betH* 基因的大小为 1515bp,编码由 505 个氨基酸组成的 BetH 蛋白,分子量为 56.1kD。经蛋白疏水性分析,推测为含有 12 个跨膜区的跨膜蛋白,与 *Oceanobacillus theyensis* 甘氨酸甜菜碱转运蛋白、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) OpuD、楚氏喜盐芽孢杆菌(*Halobacillus trueperi*) BetH、单核细胞增生利斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*) BetL、嗜盐海球菌(*Marinococcus halophilus*) BetM 和耐盐芽孢杆菌(*Bacillus halodurans*)甘氨酸甜菜碱转运蛋白的氨基酸同源性分别为 64%、51%、49%、48%、43%和 44%。

关键词 喜盐芽孢杆菌(*Halobacillus*) 基因文库,甘氨酸甜菜碱转运蛋白

中图分类号: Q93, Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)03-0451-04

目前的研究表明,微生物抵御外界环境高盐胁迫主要采取两种应对机制,即内盐机制和相容性溶质机制。前者是指细胞通过在细胞质内积累与外界环境相近浓度的 KCl 来平衡细胞内外的渗透压,绝大多数嗜盐古菌和少数细菌采用这种机制。后者是指细胞通过自身合成或从外界摄取的方式,在细胞内积累不同种类和浓度的相容性溶质,来调节细胞内外的渗透压,绝大多数细菌和少数嗜盐古菌采用这种机制^[1]。

中度嗜盐菌不是一个分类学上的名词,而是指一大类生长离不开 NaCl、能够适应很宽盐浓度范围的、庞杂的异源微生物生理群体。它们属于极端环境微生物细菌域的范畴,其耐盐范围极广,能够耐受的 NaCl 的范围为 0.1%~32.5%^[2]。相对于极端嗜盐古菌而言,中度嗜盐菌耐盐机制的研究起步较晚。在高盐环境下,绝大多数中度嗜盐菌细胞内通过积累相容性溶质来维持其细胞内渗透压和膨压^[3]。与其它耐盐和不耐盐的细菌相同,中度嗜盐菌细胞质内并不积累高浓度的无机盐离子,但是能够耐受外界环境较高的盐浓度,因而成为研究微生物耐盐机制的良好材料。

在高盐环境下,甘氨酸甜菜碱是中度嗜盐菌细胞内积累的主要相容性溶质^[4]。目前,国内外对中度嗜盐菌耐盐机制的研究主要集中在革兰氏阴性菌,如伸长盐单胞菌(*Halomonas elongata*)等。Canovas 等已经从该菌中克隆和鉴定了胆碱-甘氨酸甜菜碱合成途径的相关基因^[5,6],然而对于革兰氏阳性中度嗜盐菌耐盐机制的遗传学研究较少。本

实验室已报道了楚氏喜盐芽孢杆菌(*Halobacillus trueperi*)甘氨酸甜菜碱 *betH* 基因的克隆研究^[7],而且从新疆达板城盐湖分离了一株革兰氏阳性中度嗜盐菌 D8,经系统发育学鉴定为 *Halobacillus* 属的成员。由于中度嗜盐菌不是分类学的名词,同属内、不同种间具有相同功能基因的结构和表达调控机制可能相差很大,所以本文拟通过构建 D8 的基因文库,从中筛选含有甘氨酸甜菜碱转运蛋白 *betH* 基因全序列的重组质粒,并将测序结果与喜盐芽孢杆菌属内外甘氨酸甜菜碱次级转运蛋白基因进行比较,以了解其差异。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:表 1 为实验所用的菌株和质粒。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in experiment		
Strain and plasmid	Characteristic	Source
<i>Halobacillus</i> sp. D8	Wild type	This laboratory
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>supE44 lacU169</i> Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Beijing Ding Guo Co. Ltd.
pUC18	Cloning vector, Amp ^r	Beijing Sabe Co. Ltd.
pGEM-T easy	Cloning and sequencing vector, Amp ^r	Promega Co. Ltd.(USA)

基金项目: 国家“863 计划”(2003AA241150) 欧盟科技合作项目(ICA4-CT-2001-10056)

* 通讯作者。Tel 86-10-62732674; Fax 86-10-62731332; E-mail: yangssh@cau.edu.cn

作者简介: 卢伟东(1973-)男,山东昌邑人,博士研究生,主要从事分子微生物的研究。E-mail: luweidong2008@hotmail.com

收稿日期: 2004-10-08, 修回日期: 2005-01-25

1.1.2 主要试剂和仪器: *Sau3A I* 购自 New England BioLabs 公司, 限制性内切酶、*Ex Taq* DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 北京分公司; 小牛肠碱性磷酸酶购自 Progema 公司; DNA 胶内回收试剂盒和氨苄青霉素购自上海生工生物工程技术服务有限公司; *X-gal* 和 IPTG 购自北京新经科有限公司; 地高辛标记和检测试剂盒购自德国罗氏 (Roche Diagnostic GmbH) 公司 (产品编号为: 1745832)。引物的合成和 DNA 测序由上海博亚生物技术有限公司完成。PCR 仪器的型号为 PTC-200, 购自 MJ Research Inc。

1.2 培养基和培养条件

喜盐芽孢杆菌 D8 采用 SWYE 培养基^[8], 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 菌株采用 LB 培养基^[9], 两者均在 37 $^{\circ}$ C 条件下培养。氨苄青霉素 (Amp) 的使用终浓度为 100 μ g/mL。

1.3 DNA 的提取

D8 总 DNA 的提取按文献^[10]进行; 质粒 DNA 的提取按文献^[9]进行。

1.4 D8 基因文库的构建

将 D8 的总 DNA 用 *Sau3A I* 部分酶切, 经 0.6% 琼脂糖电泳分离后, 回收 4 ~ 16kb 大小的酶切片段。以 *BamH I* 完全酶切载体 pUC18, 用小牛肠碱性磷酸酶对酶切产物进行末端去磷酸化, 然后与回收的 D8 总 DNA 酶切片段进行连接, 将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 涂布在含有 *X-gal*、IPTG 和 Amp 的 LB 平板上, 在 37 $^{\circ}$ C 培养 20h。用牙签将白色菌落点种到另一个含有 Amp 的 LB 的平板上, 数量为 80 ~ 100 个/板, 在 37 $^{\circ}$ C 培养 20h。分别将每个平板的菌落混合收集, 提取质粒, 在 -70 $^{\circ}$ C 下保存。

1.5 *betH* 基因探针的制备

简并引物 trans1 和 trans2 的合成和 PCR 反应按文献^[7]进行。将 PCR 反应产物回收纯化后, 用地高辛标记成探针。

1.6 点杂交、菌落 PCR 和 Southern 杂交

按文献^[9]进行点杂交和菌落 PCR。Southern 杂交检测按罗氏公司试剂盒说明书进行。

1.7 DNA 序列测定和分析

将 PCR 产物连接到 pGEM-T easy 载体上。由上海博亚生物技术有限公司完成序列的测定, 通过 GenBank 进行氨基酸序列的同源性分析。

2 结果

2.1 D8 基因文库的构建

将 *Sau3A I* 部分酶切的 D8 总 DNA 产物回收纯化后, 与用 *BamH I* 酶切后去磷酸化的 pUC18 载体连接, 转化到大肠杆菌 DH5 α 中, 共获得约 9000 个重组质粒。

2.2 甘氨酸甜菜碱 *betH* 基因的筛选

2.2.1 D8 *betH* 基因部分片段的获得: 以 D8 总 DNA 为模板, trans1 和 trans2 为简并引物, 经过 PCR 扩增获得约 1kb 大小的 DNA 片段, 将其连接到 pGEM-T easy 载体上, 并进行测序。在 GenBank 中进行 BLAST 分析, 发现该片段与 *Oceanobacillus iheyensis* 甘氨酸甜菜碱转运蛋白 (GI:

22776940) 枯草芽孢杆菌 *OpuX* (GI: 1524397) 楚氏喜盐芽孢杆菌 *BetH* (GI: 41398204) 和单核细胞增生利斯特氏菌 *BetL* (GI: 4835822) 氨基酸的同源性分别为 63%、51%、48% 和 49%。由此判断已获得了喜盐芽孢杆菌 D8 甘氨酸甜菜碱次级转运蛋白基因的部分片段, 根据文献^[7]将其命名为 *betH* 基因。将扩增片段用地高辛标记成探针, 用于筛选含有完整 *betH* 基因的重组质粒。

2.2.2 含有甘氨酸甜菜碱转运蛋白 *betH* 基因重组质粒的筛选: 在构建的 D8 基因文库管中, 每管取 1 μ L 溶液点到硝酸纤维素膜上。经紫外线照射固定 DNA 后, 以地高辛标记的 *betH* DNA 片段为探针, 采用原位杂交方法对基因文库进行筛选。根据显色时间的先后, 初步确定阳性信号在第 40 管。取第 40 管的质粒溶液 1 μ L, 稀释 100 倍后转化 *E. coli* DH5 α , 涂布在含有 *X-gal*、IPTG 和 Amp 的 LB 平板上, 在 37 $^{\circ}$ C 培养 20h。用牙签挑取单菌落, 以 trans1 和 trans2 为引物, 采用菌落 PCR 筛选阳性克隆 (图 1)。提取阳性克隆质粒, 测序结果表明插入片段的大小为 4.3kb。

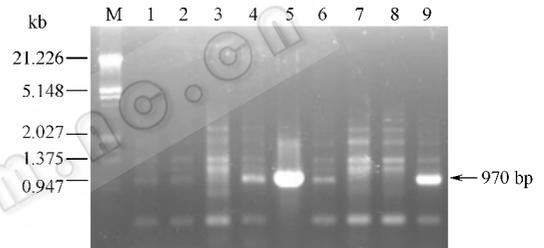


图 1 D8 菌落 PCR 的检测结果

Fig.1 Result of colony PCR for strain D8

M: λ DNA *EcoR I* + *Hind III*; 1 ~ 8: Colony PCR results of sample 1 ~ 8; 9: Positive control.

此外, 对 D8 总 DNA 采用 6 种限制性内切酶酶切, 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后, 转移到硝酸纤维素膜上, 再与用地高辛标记的 1kb 纯化的 PCR 产物作为探针进行 Southern 杂交, 结果均为单一杂交信号, 表明 *betH* 基因在 D8 基因组 DNA 中为单一拷贝 (图 2)。

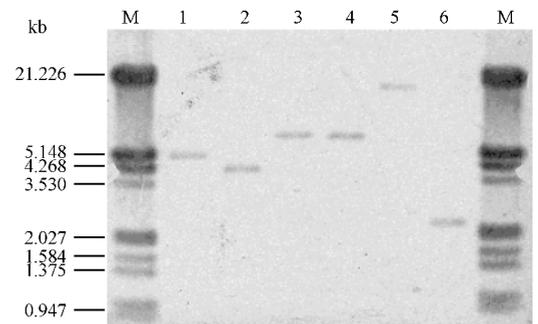


图 2 D8 基因组 DNA 经酶切后与 PCR 产物标记探针的 Southern 杂交图谱

Fig.2 Southern hybridization analysis of strain D8 genomic DNA digested by six endonucleases with the purified PCR products as probe

M: λ DNA *EcoR I* + *Hind III*; 1 ~ 6: D8 genomic DNA digested by *BamH I*, *Bgl II*, *Hind III*, *Kpn I*, *Nco I* and *Sac I*, respectively.

2.3 D8 的 4.3kb 插入片段的序列分析

在 GenBank 中,使用 BLAST 对 D8 4.3kb 插入片段可能的开放性阅读框(ORF)进行分析,发现存在 3 个 ORF,其中 ORF1 预测编码 BetH,它与 *O. iheyensis* 甘氨酸甜菜碱转运蛋白氨基酸的同源性最高(GI:22776940)(64%),它与枯草芽孢杆菌 OpuD(GI:1524397)、楚氏喜盐芽孢杆菌 BetH(GI:41398204)、单核细胞增生利斯特氏菌 BetI(GI:4835822)、嗜盐海球菌 BetM(GI:34398345)、耐盐芽孢杆菌甘氨酸甜菜碱转运蛋白(GI:15614021)氨基酸的同源性分别为 51%、49%、48%、43%和 44%。ORF2(762bp)预测编码一个含 254 个氨基酸残基的蛋白质。ORF3(957bp)预测编码一个含有 319 个氨基酸残基的蛋白质。

2.4 D8 甘氨酸甜菜碱转运蛋白 *betH* 基因的特性分析

D8 甘氨酸甜菜碱转运蛋白 *betH* 基因(GenBank 登录号 No. AY623428)大小为 1515bp,推测编码一个含有 505 个氨基酸残基的蛋白质,蛋白质的分子量为 56.1kD。对 BetH 氨基酸序列进行疏水性分析(<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp>),发现该蛋白是一个跨膜蛋白。跨膜区位于 N-末端第 6 位与 C-末端第 485 位氨基酸之间,由 12 个跨膜区组成,包括 10 个初级螺旋和 2 个次级螺旋(表 2)。在其推测的终止密码子后形成一个茎环样结构[$\Delta G(25^\circ\text{C}) = -15.6\text{kCal}$],茎环样结构后紧随 7 个连续的碱基 T(图略),因此判断为不依赖与 *rho* 因子的转录终止子参与 *betH* 基因的转录终止。

表 2 D8 菌株 BetH 蛋白 12 个跨膜区的位置和类型

Table 2 The 12 putative transmembranes for BetH of *Halobacillus* sp. D8

No.	N-terminal	Transmembrane region	C-terminal	Type	Length/bp
1	6	WVFWYGLGICGLFVLWGVIGPEH	28	Primary	23
2	46	WYLLHIMIMLAFVYLIFSRFN	68	Primary	23
3	83	LVSWFAMLFSAAGMGLVFWTTA	105	Secondary	23
4	137	WGIHAWAVYALVALVLAIFYKFKH	158	Primary	23
5	182	LGKIIDTLAVVATVVGVAATLGF	204	Primary	23
6	217	FNTPTSTYGVQLIILISTALFIF	239	Primary	23
7	257	MMLGFLMILLIVGPTLYILNM	279	Primary	23
8	314	IFYWAWWISWSPFVGIFARISR	336	Secondary	23
9	344	MLGVLFVPAIVCFIFAVFGVSA	366	Primary	23
10	401	FTTLFVIAIFFITSADSATFVLG	423	Primary	23
11	435	GTVKIHWGLCLSSMAAIIYVFGG	457	Primary	23
12	463	NVLIIAAFPFSVIVLLMGVSFYK	485	Primary	23

3 讨论

本研究中,我们最初是在先建立了 D8 基因文库后,将其转入大肠杆菌甘氨酸甜菜碱合成/转运缺失株 MKH13 中,试图通过功能互补以获得编码甘氨酸甜菜碱转运、合成的相关基因。然而在将基因文库转化到大肠杆菌 MKH13 后,于选择性培养基平板上没有获得预期的阳性克隆。因此,我们决定采用核酸探针杂交的方法,通过点杂交和菌落 PCR 来获得 D8 *betH* 基因。

对实验结果的分析发现,喜盐芽孢杆菌 D8 *betH* 蛋白与海洋嗜盐嗜碱芽孢杆菌(*Oceanobacillus iheyensis* HTE831)甘氨酸甜菜碱转运蛋白的氨基酸序列同源性最高,而与同属内的楚氏喜盐芽孢杆菌 BetH 蛋白氨基酸的同源性却较低。此外,D8 *betH* 基因与其同属的楚氏喜盐芽孢杆菌 *betH* 基因终止密码子后的茎环样结构不同,后者在茎环样结构后面不存在连续的碱基 T 序列^[7],这在一定程度上表明两者在甘氨酸甜菜碱转运方面存在不同的转录调控机制。迄今为止,革兰

氏阳性中度嗜盐菌仍然缺乏必要的遗传学工具和遗传转移的方法,所以有关 D8 甘氨酸甜菜碱转运蛋白 *betH* 基因的功能鉴定尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Wood J M, Bremer E, Csonka L N, et al. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Compara Biochem Physiol*, 2001, **130**: 437-460.
- [2] Ventosa A, Nieto J J, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**: 504-544.
- [3] Canovas D, Vargas C, Iglesias-Guerra F, et al. Isolation and characterization of salt-sensitive mutants of the moderately halophile *Halomonas elongata* and cloning of the ectoine synthesis gene. *J Bio Chem*, 1997, **272**(41): 25794-25801.
- [4] Imhoff J, Rodriguez-Valera F. Betaine is the main compatible solute of halophilic eubacteria. *J Bacteriol*, 1984, **160**: 478-479.
- [5] Canovas D, Vargas C, Csonka L N, et al. Osmoprotectants in *Halomonas elongata*: high-affinity betaine transport system and choline-betaine pathway. *J Bacteriol*, 1996, **178**: 7721-7726.

- [6] Canovas D , Vargas C , Csonka L N , *et al.* Synthesis of glycine betaine from exogenous choline in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata*. *Appl Environ Microbiol* , 1998 , **64** : 4095 – 4097.
- [7] Lu W , Zhao B , Feng D , *et al.* Cloning and characterization of the *Halobacillus trueperi betH* gene , encoding the transport system for the compatible solute glycine betaine. *FEMS Microbiol Lett* , 2004 , **235** : 393 – 399.
- [8] Quesada E , Ventosa A , Rodríguez – Valera F , *et al.* Numerical taxonomy of moderately halophilic gram – negative bacteria from hypersaline soils. *J Gen Microbiol* , 1983 , **129** : 2649 – 2657.
- [9] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T E. 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, 1996.
- [10] Spring S , Ludwig W , Marquez M C , *et al.* *Halobacillus* gen. nov. with description of *Halobacillus litoralis* sp. nov. and *Halobacillus trueperi* sp. nov. , and transfer of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus halophilus* comb. nov.. *Int J Syst Bacteriol* , 1996 , **46** : 492 – 496.

Construction of the genomic library of *Halobacillus* sp. D8 and isolation of the glycine betaine transporter *betH* gene

LU Wei-dong ZHAO Bai-suo FENG De-qin WANG Lei YANG Su-sheng*

(Key Laboratory for Agro-Microbial Resources and Application of Agriculture Ministry , College of Biological Sciences , China Agricultural University , Beijing 100094 , China)

Abstract : *Halobacillus* sp. D8 is a sporing-forming , gram-positive moderately halophilic bacterium which could tolerate up to 25% (W/V) NaCl. A genomic library of *Halobacillus* sp. D8 was constructed using pUC18 as vector , and 9000 recombinant plasmids were obtained. By dot blot hybridization , colony PCR and DNA sequencing , the entire glycine betaine transporter *betH* gene was isolated from the constructed library. Inspection of the sequenced 4.3 kb DNA region revealed the presence of three ORFs. The putative ORF of *betH* is 1515bp long , encoding a 505-residue protein (BetH) with a calculated molecular mass of 56.1kD. Hydrophobicity plot analysis of BetH indicated a transmembrane protein containing 12 transmembrane regions. Homology searches for BetH of strain D8 in the GenBank using the BLAST program revealed significant sequence identities to other glycine betaine transporters : the putative glycine betaine transporter of *O. iheyensis* (64% identity) , OpuD of *B. subtilis* (51% identity) , BetH of *H. trueperi* (49% identity) , BetL of *L. monocytogenes* (48% identity) , BetM of *M. halophilus* (43% identity) and the putative glycine betaine transporter of *B. halodurans* (44% identity).

Key words : *Halobacillus* , Genomic library , Glycine betaine transporter

Foundation item : National Program for High Technology Research and Development of China (2003AA241150) ; European Commission INCO-DC Program (ICA4-CT-2001-10056)

* Corresponding author. Tel. : 86-10-62732674 ; Fax : 86-10-62731332 ; E-mail : yangssh@cau.edu.cn

Received date : 10-08-2004