

假单胞杆菌 2-萘酸加氧酶基因的克隆与表达

孙国萍

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

Theophilou S Ribbons D W

(英国帝国理工与医学院生物工程中心 伦敦)

摘 要 采用 Cosmid pLARF1 构建了完整的 2-萘酸代谢菌 2-NAT 菌株的基因文库。通过分析基因文库中产生蓝色色素的克隆验证了 2-萘酸代谢基因在大肠杆菌体内得到表达,并导致重组细菌产生靛蓝。从产生靛蓝的克隆抽提重组的 Cosmid DNA 进行酶解分析,发现所有能产生靛蓝的克隆均含有一大小相同的 DNA 片段。用重组细菌进行靛蓝生物合成的试验展示了微生物法生产靛蓝的美好前景。

关键词 基因文库, 靛蓝, 加氧酶

假单胞杆菌 (*Pseudomonas*) 2-NAT 菌株可以利用 2-萘酸作为唯一碳源和能源生长, 其 2-萘酸代谢途径基本确定为非代谢的分支^[1]。已经发现 2-NAT 菌株至少携带一个质粒, 该菌株的 2-萘酸代谢功能由染色体和质粒共同编码控制^[2]。2-萘酸代谢涉及在苯环类有机化合物生物降解中起重要作用的两种加氧酶, 即双加氧酶和单加氧酶, 研究 2-萘酸代谢的控制基因不仅从理论上可探讨环境微生物对环境污染物的降解机理, 为构建清除环境污染物的“超级细菌”提供材料, 而且可以开展代谢途径工程的研究, 人工构建自然界并不存在的微生物代谢途径以合成有价值的医药与化工产品。细菌合成靛蓝的代谢途径就是假单胞杆菌加氧酶和大肠杆菌色氨酸酶共同作用所构成。靛蓝是印染工业中应用很广的一种染料。传统生产方法由从植物提取发展为化学合成。自从 Wackett 和 Gibson^[3]报道含有克隆的假单胞杆菌双加氧酶基因片段的大肠杆菌可以合成靛蓝后, 细菌法生产靛蓝已为世人所关注, 用于工业化生产靛蓝的重组细菌正在研究之中。自然界尚未发现可以合成靛蓝的野生微生物, 基因工程技术创造了新的微生物合成靛蓝的途径, 并开辟了代谢途径工程研究的新领域。本文报道 2-NAT 菌株基因文库的构建以及 2-萘酸加氧酶基因的克隆与表达。

1 材料和方法

1.1 菌株

Pseudomonas 2-NAT: $Tc^{-}2NAT^{+}$, 能利用 2-萘酸作为唯一碳源和能源生长; *E. coli*

HB101; recA Str^r Pro Leu 和 *E. coli* MM294 (pRK2013) 均由英国帝国理工与医学学院生物工程中心提供。

1.2 化学试剂

靛蓝、三氯甲烷等购于 Aldrich, 限制性内切酶类购于 Amersham, λ DNA、Cosmid pLARF1、质粒 pRK2013 等由英国帝国理工与医学学院生物工程中心 Dr. Theophilou 提供。

1.3 靛蓝的抽提

参照 Wackett 和 Gibson^[32]的方法进行, 得到的抽提物以商品靛蓝为对照, 用分光光度仪扫描分析。

1.4 DNA 制备

2-NAT 菌株总 DNA 采用 SDS 溶菌、乙醇沉淀的方法, 经蛋白酶处理后用酚/氯仿/异戊醇抽提, 再经乙醇沉淀, 最后溶于适量缓冲液中。

1.5 2-NAT 菌株基因文库的构建

2-NAT 菌株的总 DNA 经 EcoRI 部分酶解后选择 15—35kb 的片段与经 EcoRI 酶解并磷酸化的 Cosmid pLARF 1 DNA 用 T₄DNA 连接酶连接; 连接混合物参照 Friedman A. M.^[4]的程序体外包装 λ 噬菌体并感染 *E. coli* HB101 和 MM294 (pRK2013), 分别用含有 Tc 和 Tc Kan 的 LB^[33]平板选择转导子并计算感染频率。

1.6 转导子重组 Cosmid DNA 的抽提及酶解

基因文库转导子的重组 Cosmid DNA 的抽提参照 Maniatis^[5]的方法进行。提抽的 Cosmid DNA 用限制性内切酶 EcoRI 酶解分析。酶反应体系为 5 μ l Cosmid DNA, 1 μ l EcoRI 酶反应缓冲液, 0.5 μ l EcoRI (10u/ μ l), 3.5 μ l H₂O, 37℃ 保温 1h 后终止反应, 并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检查结果。

2 结果和讨论

2.1 2-萘酸代谢菌 2-NAT 菌株基因文库的构建

确证了 2-萘酸细菌代谢途径后, 构建 2-萘酸代谢菌的基因文库对于深入研究代谢基因、进行基因定位和分离都十分必要。Cosmid pLARF 1^[4]具有一个四环素抗性基因和一个单一的 EcoRI 酶位点, 寄主范围广, 可以在 helper 质粒作用下结合转移至多种革兰氏阴性菌体内并保持稳定地复制, 适合用于构建具有特殊功能的细菌基因文库。由于 Cosmid pLARF 1 可以包装的插入片段大小为 12.8—30kb, 根据 Clark 和 Carbon^[6]的公式, 构建基因组大小约 4100kb 的假单胞杆菌的基因文库大约 820 个克隆就可以包含基因组 99% 以上的 DNA。我们用 EcoRI 部分酶解 2-NAT 菌株总 DNA 后, 选择 15—35kb 大小的片段与 Cosmid pLARF1 重组并体外包装 λ 噬菌体, 感染 *E. coli* HB101 和 MM294 后, 获得了 4400 个克隆。

从基因文库随机挑选 11 个 Tc^r Kan^r 转导子抽提 Cosmid DNA, 用 EcoRI 酶解后电泳, 11 个转导子均含有载体 pLARF1、受体的 pRK2013 质粒和插入 DNA 片段。插入片段多在 20kb 左右, 平均大小约为 30kb (图 1)。因此, 从理论上可以肯定该基因库是成功的, 它基本包含 2-NAT 菌株基因组的全部 DNA 序列。

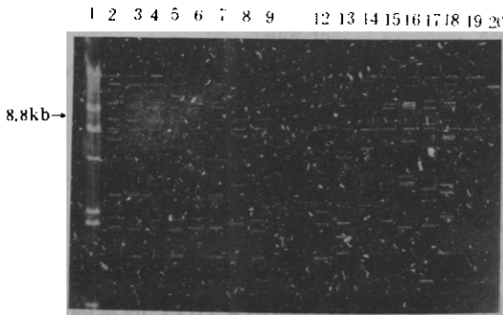


图1 转导子 Cosmid DNA 的 EcoRI 酶解电泳图

Fig.1 The electrophoretogram of transconjugants' cosmid DNA digested with EcoRI
1. λ DNA/Hind III;
2-9, 12-18. 转导子 Cosmid DNA/EcoRI;
19. pRK2013/EcoRI; 20. pLARF1/EcoRI.

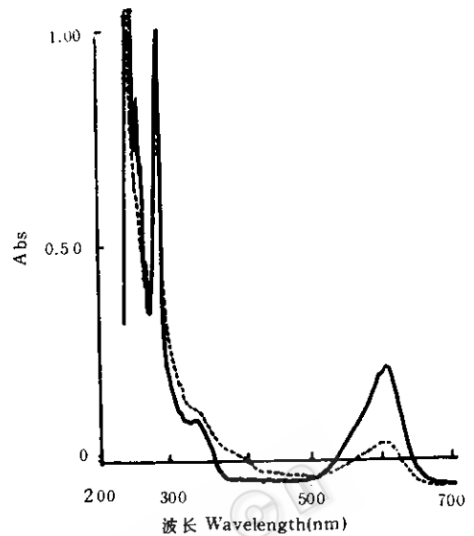


图2 靛蓝和 2-NAT 菌株基因文库蓝色克隆色素抽提物的光谱

Fig.2 The spectra of Indigo and blue pigment extracted from blue colony of 2-NAT strain's gene library
— 靛蓝 Indigo;
--- 蓝色克隆色素抽提物 Pigment extracted from blue colony.

2.2 基因文库中蓝色克隆的色素分析

根据报道^[3,7], 假单胞杆菌有关芳香族化合物代谢的双加氧酶可以转化吲哚产生靛蓝, 并有人利用氧化吲哚产生靛蓝的反应作为测定假单胞杆菌加氧酶活性的方法之一^[3]。在 2-NAT 菌株基因文库里发现有 5 个克隆可以在 LB 平板上产生蓝色色素。挑取蓝色克隆经 LB 液体培养基培养后提取蓝色色素并以商品靛蓝为对照用分光光度仪扫描分析, 两者的光谱完全一致 (图 2), 吸收峰都在 250nm、285nm 和 600nm, 证明蓝色克隆产生的色素即为靛蓝。

2.3 2-萘酸加氧酶基因在大肠杆菌体内的表达

大肠杆菌由于色氨酸酶 (Tryptophanase) 的作用可以在体内合成吲哚, 假单胞杆菌具有代谢芳香族化合物的特殊加氧酶但缺乏色氨酸酶, 故大肠杆菌和假单胞杆菌都无法单独合成靛蓝。当假单胞杆菌双加氧酶基因在大肠杆菌体内表达时, 吲哚可以被双加氧酶氧化产生顺式-吲哚-2, 3-二羟基乙醇, 然后自发地进行两步反应, 即脱水并在空气中氧化成靛蓝^[3] (图 3)。

假单胞杆菌单加氧酶氧化吲哚产生靛蓝仅见关于 Tol 质粒的 Xylene (二甲苯) 单加氧酶^[8]的报道, 其机制不同于双加氧酶。推测单加氧酶直接氧化吲哚产生吲哚酚, 然后转化为靛蓝。2-萘酸代谢途径中第一个关键的酶——2-萘酸羟化酶和第一个环裂解酶均为

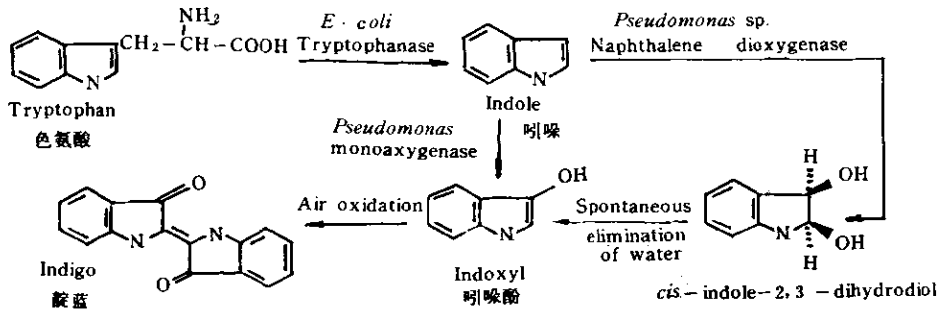


图 3 重组大肠杆菌生物合成靛蓝的假定途径

Fig. 3 Proposed pathway for indigo biosynthesis in the recombinant strain of *E. coli*

单加氧酶。当带有 2-萘酸加氧酶基因片段的重组 Cosmid 进入大肠杆菌体内后,若加氧酶基因得到表达,大肠杆菌受体细胞即可合成靛蓝。在 2-萘酸代谢菌 2-NAT 的基因文库中发现能产生靛蓝的克隆证明 2-萘酸加氧酶基因在大肠杆菌体内得到了表达。虽然不清楚表达的究竟是编码哪种酶或哪些酶基因,但成功表达的这一个或一簇代谢基因为 2-萘酸代谢途径的基因定位奠定了良好的基础。

2.4 2-萘酸加氧酶基因片段的确定

从产生靛蓝的克隆抽提 Cosmid DNA 并进行酶解分析的结果表明,所有产生靛蓝的克隆除了都含有载体 pLARF 1 DNA 片段和受体菌所含的 pRK2013 质粒 DNA 片段外,唯一共同的特点是均含有一大小为 8.8kb 的插入片段(图 1, 2—9 号)。根据假单胞杆菌加氧酶转化吲哚产生靛蓝的原理,可以初步确认编码 2-萘酸加氧酶的基因即位于该片段,所有已检测的产生靛蓝的克隆都表达了 2-萘酸代谢菌 2-NAT 菌株的同一个或同几个基因。

2.5 细菌生物合成靛蓝的初步试验

采用 LB 培养基小量培养能产生靛蓝的克隆,在 50ml 培养液中获得 20mg 的粗制靛蓝,得率虽然不高,却显示了用细菌生产靛蓝的可能性。如何在现有菌株和已克隆的基因的工作基础上选育靛蓝高产菌株还需要大量的工作,但用节能、廉价的微生物合成法取代高能耗、污染环境的传统靛蓝生产法的前景是美好的。

参 考 文 献

- [1] Terisa M. A Thesis Submitted in Partid Fufilment of the Requirements for the Award of DIPLOMA of Imperial College. London: Imperial College of Science and Technology, 1987.
- [2] Sun G, Terisa M, Kirk S *et al.* proceedings 113th Ordinary Meeting of U. K. Society for General Microbiology, Reading. 1989.
- [3] Wackett L P, Gibson D T. *Science*, 1983, **222**: 167—169.
- [4] Friedman A M, Long S R, Brocon S E *et al.* *Gene*, 1982, **18**: 289—296.
- [5] Maniatis T. *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 104—106, 250—253.
- [6] Clark L, Carbon J. *Methods in Enzymology*. New York: Academia Press, 1979, **68**: 396—408.

- [7] Jenkins R O, Dalton H, *FEMS Microbiology Letters*, 1985, **30**: 227—231.
[8] Keil H, Saint C M, Williams P A. *J Bacteriology*, 1987, **169**: 764—770.

CLONING AND EXPRESSION OF OXYGENASE GENE FOR 2-NAPHTHOIC ACID FROM *PSEUDOMONAS*

Sun Guoping

(*Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071*)

Theophilou S Ribbons D W

(*Centre for Biotechnology, Imperial College of Science, Technology and Medicine, London*)

Abstract A gene library which includes total DNA of 2-NAT strain's genome has been constructed successfully with cosmid pLARF1. The pigment produced by the transconjugants from the gene library is identified. The result of restriction endonuclease digestion of the recombinant cosmids purified from indigo producing colonies indicates that all of the blue colonies contain a 8.8kb insert DNA fragment. It shows that they expressed the same gene. The indigo biosynthesis experiment with blue colonies reveals a good view of producing the pigment with recombinant microorganism.

Key words Gene library, Indigo, Oxygenase