

假单胞菌 ZL13 邻苯二酚 2, 3 - 双加 氧酶基因的克隆表达

张鲁进, 杨 谦, 李 娟

(哈尔滨工业大学 生命科学与工程系, 哈尔滨 150001, lujin@hit.edu.cn)

摘要: 寻找新型高效石油降解菌, 并研究其相关基因一直是石油降解领域的热点. 本文以细菌 *Pseudomonas* sp. ZL13 的降解性质粒 pZL-1 的 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增的方法进行基因克隆, 得到邻苯二酚 2, 3 - 双加氧酶基因. 序列分析结果表明, 该基因大小为 924 bp, 编码 307 个氨基酸; 序列同源性比较结果显示, 该基因与荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 和恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 的基因序列的相似性较高, 处于同一分支. 将目的基因连接到 pGEX-4T-2 表达载体上, 在 *E. coli* BL21 中成功表达, 转化子具有原油降解能力.

关键词: 假单胞菌; 邻苯二酚 2, 3 - 双加氧酶; 基因克隆; 序列分析; 原核表达

中图分类号: Q786 文献标志码: A 文章编号: 0367-6234(2010)08-1297-04

Cloning of a new catechol 2, 3 - dioxygenase gene from *Pseudomonas* sp. ZL13 and its expression in the *E. coli* BL21

ZHANG Lu-jin, YANG Qian, LI Juan

(Department of Life Science and Technology, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China, lujin@hit.edu.cn)

Abstract: Researches about screening oil - degrading bacteria and their genes involed in the degrading procedure are always important. In this paper, rocatechol - 2, 3 pyrocatechol gene was cloned from plasmid pZL - 1 by PCR method. This gene is 924 bp long and encoding apeptide of 307 amino acids. After multiple sequence alignment, it is found that the *c23O* gene from *P. putida*. ZL13 is highly similar with the *c23O* gene from *P. fluorescens* and *P. putida*. The pyrocatechol - 2, 3 pyrocatechol gene was ligated to pGEX - 4T - 2 and transformed in *E. coli* BL21. The results show that this gene can be successfully expressed.

Key words: *Pseudomonas*; catechol 2, 3 - dioxygenase (C23O); gene cloning; sequence analysis; gene expression

邻苯二酚 2, 3 - 双加氧酶 (C23O) 是芳香族化合物开环裂解的关键酶, 能催化邻苯二酚的间位代谢途径, 生成 2 - 羟基粘康酸半醛 (2 - HMS), 其催化机制及进化关系已研究的较为深入^[1-2]. 目前已在 *Achromobacter xylosoxidans*, *Azotobacter vinelandii*, *Alcaligenes eutiophus*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas* sp. ,

Alcaligenes sp. , *Comamonas* sp. 等菌株中克隆到邻苯二酚 2, 3 双加氧酶基因^[3-6].

在前期研究中发现本文高效石油降解菌株 *Pseudomonas* sp. ZL13 有降解质粒, 并且有较高的邻苯二酚 2, 3 - 双加氧酶活性, 为了进一步研究其降解机理, 对其编码邻苯二酚 2, 3 - 双加氧酶 (*c23O*) 基因进行克隆和原核表达研究, 以期阐明该菌株降解芳香烃的机理提供依据, 为该基因的进一步研究以及基因工程菌构建奠定基础.

收稿日期: 2009 - 10 - 22.

基金项目: 黑龙江省青年科技专项基金资助项目 (QC05C04).

作者简介: 张鲁进 (1978—), 男, 讲师, 博士研究生;

杨 谦 (1959—), 男, 教授, 博士生导师.

1 试 验

1.1 菌株和质粒

试验所用的菌株 ZL13 为本实验室从大庆油田东八队 2-114 号油井附近原油污染表层土壤微生物分离筛选出的原油降解菌株; 宿主菌 *E. coli* DH5 α 为本实验室保藏. 质粒 pZL-1 为从菌株 ZL13 提取到降解性质粒; T 载体购于大连宝生物有限公司; 质粒 pGEX-4T-2 由东北林业大学分子生物学实验室惠赠.

1.2 酶和试剂

RnaseA、*taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶均购自 IBM 公司, 所有限制性内切酶及连接酶均购自华美生物工程公司, 其余试剂未经说明均为分析纯.

1.3 引物设计

根据 Junca 等报道的邻苯二酚 2,3-双加氧酶基因设计 PCR 引物, 扩增 *c230* 的编码区. 带有酶切位点 *Bam*HI、*Eco*RI 的引物 L: 5'-ATCGGGATC-CATGAAGAAAGGTGTAATGCGCCAG-3'; R: 5'-CGATGAATTCCGGTCATAACGGTCATGAATCGTTCC-3'.

1.4 PCR 扩增产物的测序鉴定分析

PCR 扩增产物纯化后, 连接 T 载体并测序, 对测序结果进行分析. 测序工作委托上海英俊生物公司完成.

1.5 目的基因在大肠杆菌中的表达

c230 基因 PCR 扩增产物与质粒 pGEX-4T

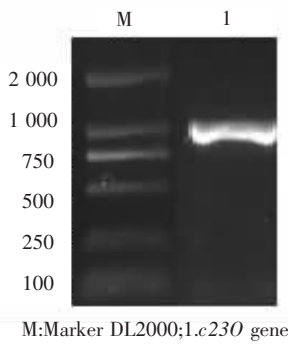


图 1 质粒 PZL-1 中 *c230* 基因的 PCR 扩增

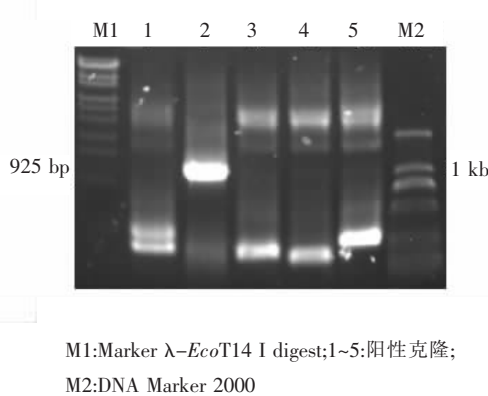


图 2 重组质粒 PCR 鉴定

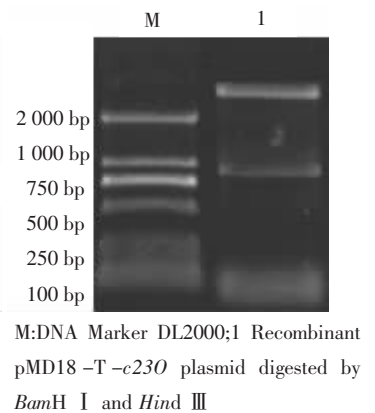


图 3 pMD18-T-*c230* 重组质粒双酶切鉴定

2.3 表达载体构建

用两种限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 对带有 *c230* 基因的 pGEX-4T-2 质粒载体进行双酶切, 胶回收纯化. *c230* 基因与 pGEX-4T-2 质粒载体用 T4 DNA ligase 进行连接, pGEX-4T-2-*c230* 转入 *E. coli* BL21. 将 pGEX-4T-2-*c230*

-2 分别双酶切后连接, 转化 *E. coli* BL21 的感受态细胞^[7]. 通过抗性筛选转化子, 并对抗性转化子进行菌落 PCR 及测序验证. 邻苯二酚 2,3-双加氧酶酶活检测^[8-12]: 转化子在过夜培养后, 加入 IPTG 至 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 诱导培养 2 h. 进行邻苯二酚 2,3-双加氧酶酶活检测.

2 结果与讨论

2.1 邻苯二酚 2,3-双加氧酶编码基因的克隆

以假单胞菌 ZL13 的质粒 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 产物电泳结果如图 1 所示. 得到一个大小约 900 bp 左右的特异性条带, 这一结果与引物设计的预期目的相符.

2.2 阳性克隆的筛选与鉴定

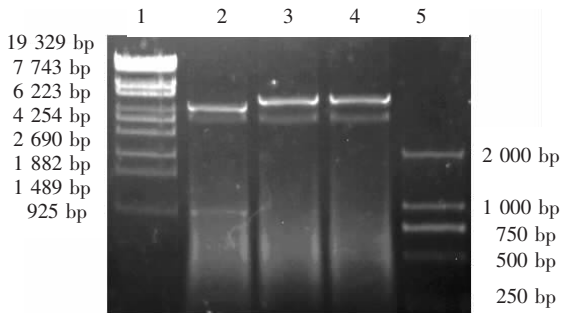
在抗性选择平板上 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养, 挑选阳性克隆菌株, 选择 5 个阳性克隆进行菌落 PCR 的扩增验证, 结果在 2 号阳性克隆得到一特异性的 900 bp 左右的基因片断, 与目的基因大小一致, 将该阳性克隆命名为 *E. coli* DH5 α -*c230*, 电泳验证结果见图 2. 对阳性克隆 *E. coli* DH5 α -*c230* 进行质粒抽提, 做酶切验证. 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 对重组质粒进行双酶切, 得到了 3 kb 和 0.9 kb 左右的两条 DNA 条带, 一条对应于 pMD 18-T 载体 (2 690 bp), 另一条对应于目的基因 *c230* 基因 (900 bp), 结果与预期相符, 确为阳性克隆子, 目的基因成功转化. 见图 3.

转入大肠杆菌 *E. coli* BL21 转化子中, 并在 Amp^r 抗性平板上进行筛选.

2.4 重组菌株的鉴定

将筛选出的阳性重组菌株 *E. coli* BL21-*c230* 进行质粒抽提, 并对所得重组质粒用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定和 PCR 克隆鉴定,

以确定目的基因确实存在于表达菌株 *E. coli* BL21 - *c230* 中,结果如图 4 所示. 重组质粒双酶切的电泳检测结果显示:有两条带,一条大小为 4 000 多 bp,对应表达载体;一条大小为 920 bp 左右,对应目的基因 924 bp,表明目的基因片段已被成功导入表达宿主菌 *E. coli* BL21 中.

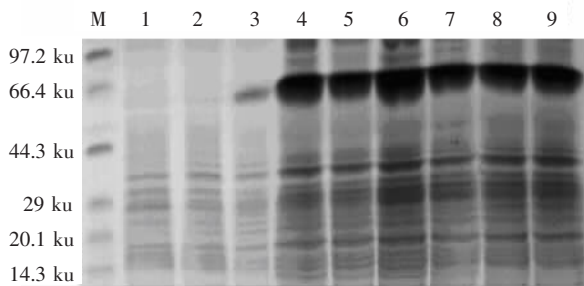


1.Marker:A-EcoT14 I digest;2.重组质粒双酶切;
3.重组质粒 BamH I 单酶切;4.重组质粒 EcoR I 单酶切;5.Marker: DL2000.

图 4 重组质粒酶切鉴定

2.5 重组菌株的蛋白电泳检测

将构建成功的含有 pGEX - 4T - 2 - *c230* 载体的重组菌株 *E. coli* BL21 - *c230* 在 LB 液态培养基中培养至 OD₆₀₀ 1.0 时进行诱导表达,利用 SDS - PAGE 进行检测. pGEX 系列的载体,携带谷胱甘肽 S 转移酶 GST 基因编码 GST 蛋白相对分子质量为 26 ku;当外源基因片段正确插入载体单克隆位点后,表达 GST 融合蛋白 pGEX - 4T - 2 - *c230* 在 64 ku 处出现一明显的特异性蛋白带,其大小与预期的相当.可以推算出蛋白大小在 36 ku 左右.而对胞外,胞间诱导得到的产物进行 SDS - PAGE 检测,并没有得到蛋白条带,说明蛋白在胞外,胞间表达量低,见图 5.



M:蛋白 Marker;1.胞外诱导产物;2.胞间诱导产物;3~9.大肠杆菌 BL21/pGEX-4T-2-c230.

图 5 重组蛋白 C230 在大肠杆菌 BL21 中表达的 SDS - PAGE 鉴定

2.6 重组菌株邻苯二酚 2,3-双加氧酶酶活检测

对重组菌株 *E. coli* BL21 - *c230* 进行邻苯二酚 2,3-双加氧酶酶活检测,同时以野生菌 ZL13

为对照, *E. coli* BL21 为阴性对照,结果如表 1 所示. 将试验菌株 37 °C IPTG 诱导表达后离心,提取并检测胞外提取液、膜周质提取液和膜内提取液的邻苯二酚 2,3-双加氧酶活性^[13]. 结果显示:在表达菌株 *E. coli* BL21 - *c230* 的 3 种提取液均检测到双加氧酶活性,说明 *c230* 基因在大肠杆菌中得到表达,且膜内提取液中的酶活远远高于膜周质和胞外,双加氧酶主要作为一种胞内酶存在.

试验结果还表明,表达菌株的双加氧酶活性要高于野生菌中的酶活性.而在胞外和膜周质提取液中,表达菌株 *E. coli* BL21 - *c230* 中的酶活却明显低于野生菌 ZL13 中的双加氧酶活.分析原因可能是在野生菌中,仍有一部分酶被分泌到胞外,而 *c230* 基因的表达产物被信号肽定位在大肠杆菌中的周质膜内,极少分泌到细胞体外,因此,在胞外和膜周质提取液中,只能测出微弱的酶活性.

表 1 菌株 *E. coli* BL21 - *c230*、ZL13 及 *E. coli* BL21 中邻苯二酚 2,3-双加氧酶的活性

菌株	C230 活性/($\mu\text{m} \cdot \text{mL}^{-1}$)		
	胞外	膜周质	膜内
表达菌 <i>E. coli</i> BL21 - <i>c230</i>	3.05	5.32	476.70
野生菌 ZL13	13.12	19.74	142.05
<i>E. coli</i> BL21	未检测到	未检测到	未检测到

序列分析该发现基因大小为 924 bp,编码 307 个氨基酸;对该基因序列进行同源性比较显示,ZL13 菌的 *c230* 基因与荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) 和恶臭假单胞菌 (*P. putida*) 的 *c230* 基因序列的相似性较高,处于同一分支(图6).

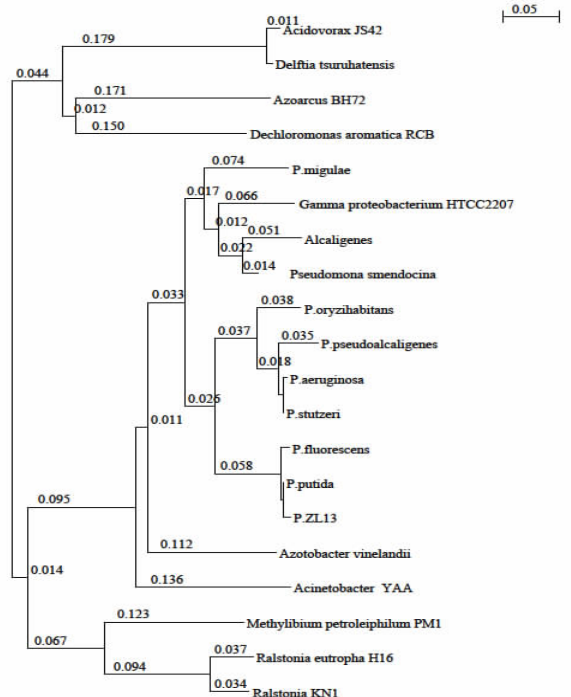


图 6 不同来源的 *c230* 基因序列同源性分析

过进化树比对发现,来源于同一属细菌中邻苯二酚 2,3-双加氧酶基因序列的相似性较高,不同属间酶基因的差异则较大.

对于该基因进行 *E. coli* BL21 表达试验,从重组菌株全细胞蛋白电泳和对重组菌株的酶活检测都显示目的基因得到了成功表达.重组菌株的产酶量明显高于出发菌株,且目的基因得到了大量表达.

参考文献:

- [1] TOYAMA T, SEI K, YU Ning, *et al.* Enrichment of bacteria possessing catechol dioxygenase genes in the rhizosphere of *Spirodela polyrrhiza*: A mechanism of accelerated biodegradation of phenol[J]. *Water Research*, 2009, 15: 3765 - 3776.
- [2] PLATT A, SHINGLER V, TAYLOR S C, *et al.* The 4 - hydroxy - 2 - oxovalerate aldolase and acetaldehyde dehydrogenase (acylating) encoded by the *nahM* and *nahO* genes of the naphthalene catabolic plasmid pWW60 - 22 provide further evidence of conservation of *meta* - cleavage pathway gene sequences [J]. *Microbiology*, 1995, 141: 2223 - 2233.
- [3] JUHASZ A, NAIDU R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the microbial degradation of benzo[α]pyrene [J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2000, 45: 57 - 88.
- [4] TAKEO M, NISHIMURA M. Purification and characterization of alkylcatechol 2,3 - dioxygenase from butylphenol degradation pathway of *Pseudomonas putida* MT4 [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2007, 4: 309 - 314.
- [5] NOJIRI H, SHINTANI M, OMORI T. Divergence of mobile genetic elements involved in the distribution of xenobiotic-catabolic capacity [J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2004, 64: 154 - 174.
- [6] TOP E M, SPRINGAEL D. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, 14: 262 - 269.
- [7] JEENES D J, WILLIAMS P A. Excision and integration of degradative pathway genes from TOL plasmid pWW0 [J]. *Journal of Bacteriology*, 1982, 150: 188 - 294.
- [8] ROMINE M F, STILLWELL L C, WONG K K. Complete sequence of a 184 - kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199 [J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181: 1585 - 1602.
- [9] CHAE J C, KIM E. Comparative analysis of the catechol 2,3 - dioxygenase gene locus in thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* strain 98/2 [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 3: 815 - 819.
- [10] ZANG Shuyan, LIAN Bin. Synergistic degradation of 2 - naphthol by *Fusarium proliferatum* and *Bacillus subtilis* in wastewater [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 1: 33 - 38.
- [11] 刘卫今, 蒋勇, 完迪迪. 简单高效的感受态细胞制备和质粒转化体系的建立 [J]. *安徽农业科学*, 2008, 7: 2745 - 2746.
- [12] 游雷鸣, 翁海波, 韩绍印, 等. 大肠杆菌 JM109 感受态形成因素分析 [J]. *生物技术*, 2007, 2: 37 - 40.
- [13] LI Zonglai, YANG Min, LI Dong, *et al.* Nitrobenzene biodegradation ability of microbial communities in water and sediments along the Songhua River after a nitrobenzene pollution event [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2008, 7: 778 - 786.
- [14] 张建峰, 苏凤宜, 邢新会. 邻苯二酚 2,3 - 双加氧酶在恶臭假单胞杆菌整细胞催化中的酶活检测方法 [J]. *化工学报*, 2008, 2: 450 - 455.
- [15] HAMES B, HOOPER N. *Instant Notes in Biochemistry* [M]. BIOS Scientific Publishers Limited, 2000: 6 - 15.
- [16] CHAKRABARTY A. Genetic basis of the biodegradation of salicylate in *Pseudomonas* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1972, 112: 815 - 823.
- [17] MEYER S, MOSER R, NEEF A, *et al.* Differential detection of key enzymes of polyaromatic - hydrocarbon - degrading bacteria using PCR and gene probes [J]. *Microbiology*, 1999, 145: 1731 - 1741.
- [18] URAKAMI S, NAKMISHI Y, KODAMA N. Purification, characterization and gene analysis of catechol 2,3 - dioxygenase from the aniline - assimilating bacterium *Pseudomonas* species AW - 2 [J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1998, 62: 747 - 752.
- [19] 王银善, 庞学军, 赵永芳. 解酚假单胞菌邻苯二酚 - 2,3 - 双加氧酶的纯化和某些特性 [J]. *生物物理化学进展*, 1983, 5: 44 - 48.

(编辑 刘 彤)