

# 南极深海底泥中度嗜盐菌盐单胞菌属 Nj223 *ectC* 基因的 克隆表达及 ectoine 合成酶性质分析

陈志亮<sup>1</sup>, 傅英楠<sup>1</sup>, 姜蔚宇<sup>1</sup>, 陈荣忠<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>厦门大学生命科学学院 厦门 361005)

(<sup>2</sup>国家海洋局第三海洋研究所海洋生物遗传资源重点实验室 厦门 361005)

**摘 要:** 从南极深海底泥中筛选得到一株中度嗜盐菌 *Halomonas* sp. Nj223, 利用 PCR 技术, 以该菌株基因组为模板, 扩增出 *ectC* 基因。将目的基因的 PCR 扩增产物克隆至表达载体 pET-his。经酶切、PCR 鉴定、测序验证结果表明, 目的基因插入的位置、大小和读码框均正确, 表达载体构建成功。经 SDS-PAGE 分析, 出现预期大小的目的蛋白条带。分离纯化复性的 ectoine 合成酶后测定其酶活力, 在体外验证了 ectoine 的部分生物合成途径。进一步分析了 pH 和温度对酶活的影响发现, 该酶最适 pH 为 8.0, 最适温度为 25℃。

**关键词:** 相容性溶质; 四氢嘧啶; *ectC* 基因; ectoine 合成酶; pET-his-*ectC*

**中图分类号:** Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2007)02-0363-03

大多数耐盐微生物在长期的进化过程中逐步形成了适应渗透压变化的机制, 它们通过在细胞内积累小分子有机溶质, 如糖、多元醇、甜菜碱及氨基酸等来使细胞内外渗透压达到平衡。这类具有平衡细胞内外渗透压而又不影响细胞正常代谢功能的有机渗透溶质即为“相容性溶质”(compatible solute)<sup>[1]</sup>。到目前为止, 已发现的相容性溶质主要有糖类的蔗糖、海藻糖; 氨基酸中的脯氨酸、丙氨酸; 氨基酸衍生物中的甜菜碱(N-三甲基甘氨酸), ectoine(1,4,5,6-四氢-2-甲基-4-嘧啶羧酸)及 hydroxyectoine(1,4,5,6-四氢-2-甲基-5-羟基-4-嘧啶羧酸)等。其中 ectoine 及 hydroxyectoine 几乎为所有中度嗜盐菌主要累积的相容性溶质<sup>[2]</sup>。在盐单胞菌属 *Halomonas elongata* 中, ectoine 在细胞内浓度高达 3.05 mol/L<sup>[3]</sup>, 由此可见它对耐盐细菌调渗功能的重要性。

研究已发现, ectoine 生物合成途径的 3 个酶分别为 L-二氨基丁酸转氨酶(L-Diaminobutyric acid transaminase, DAT), L-二氨基丁酸乙酰转移酶(L-Diaminobutyric acid transferase, DAA)和 ectoine 合成酶(Ectoine synthase, ES)<sup>[4]</sup>。本研究利用基因重组技术将 ectoine 合成酶(ES)基因 *ectC* 克隆到表达载体 pET-his 中, 利用大肠杆菌进行融合表达, 分离纯化复性出有活性的 ES, 并研究了 *ectC* 基因在 ectoine 生物合成途径中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒和菌种:** 表达载体选用 pET-his (Novagen), 宿主菌为大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3); *Halomonas* sp. Nj223 由南极普里兹湾 PN5-6(74°25'E, 66°55'S)深海沉积物样品(采集于中国第 18 次南极考察期间)中分离筛选得到, 经菌株鉴定后, 确定其为盐单胞菌属, 命名为 *H. sp.* Nj223, 其 16S rDNA 在 GenBank 登录序列号为 DQ303381。

**1.1.2 试剂:** Taq DNA 聚合酶及 PCR 试剂、RNA 酶抑制剂、DNA 纯化试剂盒、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等均购于 TaKaRa 公司产品; N-乙酰-L-2,4-二氨基丁酸(ADABA), ectoine 购于 Sigma 公司。

**1.1.3 引物:** 根据 NCBI 公开的 *H. sp.* ARD M36 中 *ectC* 基因的序列(GenBank 登录序列号为 AB196589), 设计合成了一对引物, 引物的下划线部分为人工引入的限制性内切酶位点。*EctC* 上游引物 *ectCF*: 5'-GCAGAAATTCATGATCGTTTCGTAACCTCG-3'(EcoR I 酶切位点); 下游引物 *ectCR*: 5'-CTTAAGCTTTCACCTCAGGTGCTGCGTAA-3'(Hind III 酶切位点)。

### 1.2 基因组 DNA 的提取

参照 Ausubel 等<sup>[5]</sup>的方法进行。

### 1.3 *ectC* 基因的 PCR 扩增

取基因组 DNA 2.5 ng, 10×PCR 缓冲液 5 μL, 含 Mg<sup>2+</sup> dNTP 4 μL (各 2.5 mmol/L), 引物 *ectCF*、*ectCR* 各 1 μL (20 μmol/L), Taq 酶 0.5 μL (5 U/μL) 加灭菌去离子水至 50 μL。反应条件: 94℃ 4 min, 55℃ 90 s, 72℃ 2 min, 30 个循环, 72℃ 10 min。

### 1.4 *ectC* 基因与 pET-his 重组表达质粒的构建

通过 PCR 方法在 *ectC* 基因的 5' 端加入 EcoR I 酶切序列, 在其 3' 端加入 Hind III 酶切位点。把上述 *ectC* 基因的 PCR 产物直接用 EcoR I 和 Hind III 进行双酶切, 将纯化回收的目的片段与用 EcoR I 和 Hind III 酶切的 pET-his 表达载体进行连接, 构建重组表达质粒 pET-his-*ectC*。

### 1.5 阳性克隆的筛选

重组表达质粒 pET-his-*ectC* 转化感受态细胞 BL21(DE3), 把转化菌涂布于含氨苄的 LB 琼脂平板, 37℃ 过夜培养后少量制备质粒, 经酶切、PCR 鉴定后送 Invitrogen 公司测序。

### 1.6 *ectC* 基因的诱导表达

将上述鉴定好的阳性重组菌接种于含氨苄的 LB 培养基中 37℃ 振荡培养, 然后加入 IPTG 进行诱导培养, 在相同条件

基金项目: 大洋专项(DY105-04-02-06)

\* 通讯作者。Tel: 86-592-2195393; Fax: 86-592-2085376; E-mail: jhysscz@sina.com

作者简介: 陈志亮(1981-), 男, 福建漳州人, 硕士研究生, 主要从事海洋生物分子生物学研究。E-mail: czl223@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-08-08; 接受日期: 2006-09-08; 修回日期: 2006-11-01

下以不诱导的含表达载体 pET-his 的受体菌作为对照。

### 1.7 SDS-PAGE 分析

将上述诱导培养的菌液离心收集沉淀,重悬于  $1 \times$  SDS 凝胶加样缓冲液,  $100^\circ\text{C}$  加热 3min, 加样  $20\mu\text{L}$  于事先配制好的聚丙烯酰胺凝胶(分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 5%) 中, 进行 SDS-PAGE, 考马斯亮兰染色后脱色直到条带清晰, 观察电泳结果。

### 1.8 融合蛋白的纯化及复性

重组表达质粒 pET-his-ectC 转化感受态细胞 BL21( DE3 ), 重组子用 LB 培养基振荡培养过夜, 离心收集菌体后重悬于 Tris-HCl 缓冲液( pH8.0 ), 加入溶菌酶至终浓度  $1\text{mg/mL}$ ,  $37^\circ\text{C}$  裂解 15min 后, 加入终浓度为  $5\mu\text{g/mL}$  的 DNase I 和  $5\mu\text{g/mL}$  RNase A 继续处理 5min。将菌体超声破碎后,  $12000 \times g$  离心 15min, 弃上清。沉淀用终浓度 1% 的 TrionX-100 及  $4\text{mol/L}$  尿素洗涤后, 溶解于变性液中。磁力搅拌变性 12h,  $12000 \times g$  离心 20min。将变性的包涵体蛋白加入已用变性液平衡的 Ni-NTA His Bind 层析柱中, 用含  $45\text{mmol/L}$  咪唑的变性液洗柱, 再用含有  $250\text{mmol/L}$  咪唑的变性液洗脱吸附在柱上的表达蛋白。然后用尿素梯度凝胶层析法复性蛋白<sup>[6]</sup>。

### 1.9 酶活测定

酶活测定参照文献[7]进行。ES 催化 ADABA 合成 ectoine。通过 HPLC 检测 210nm 处 ectoine 合成速率来分析 ES 的酶活力。在  $45\mu\text{L}$  混合体系中, ADABA 的终浓度为  $10\text{mmol/L}$ , NaCl 终浓度为  $0.5\text{mol/L}$ , Tris-HCl( pH 8.5 )终浓度为  $50\text{mmol/L}$  反应通过加入  $5\mu\text{L}$   $800\text{mg/mL}$  的纯化复性的 ES 酶液起始, 并于  $15^\circ\text{C}$  水浴 10min 后加入终浓度为 0.3% 三氟乙酸 TFA 终止反应。活力单位( U )定义为在上述条件下每分钟产生  $1\mu\text{mol}$  ectoine 所需的酶量。

## 2 结果

### 2.1 ectC 基因的扩增及重组表达质粒的构建

以提取的 *H. sp.* NJ223 染色体 DNA 为模板, 利用上述合成的引物, 用 Taq DNA 聚合酶 PCR 扩增目的基因后, 经琼脂糖电泳可见特异的目的条带, 其大小同预测的结果( 393bp )相一致, 表明成功的扩增出 ectC 基因片段。其 GenBank 登录序列号为 DQ886907。

用 ectC 与 pET-his 构建得重组表达质粒 pET-his-ectC。该重组质粒经 EcoR I 和 Hind III 双酶切后, 可切下约 393bp 的片段, 同预期的结果相符合。PCR 鉴定及测序结果表明 ectC 基因插入位置、大小和读码框均正确, 未发生错配及移码。

### 2.2 重组质粒 pET-his-ectC 在大肠杆菌中的表达及纯化

重组表达质粒 pET-his-ectC 转化宿主菌 BL21( DE3 ), 用 IPTG 诱导表达。菌体经  $100^\circ\text{C}$  加热 3min 后, 进行 SDS-PAGE 分析。结果显示, 在分子量为 15kDa 左右处出现明显的条带, 对融合蛋白进行 Ni-NTA His Bind 层析柱亲和纯化后, 纯度高达 90% 以上( 图 1 )。

### 2.3 重组子中 ES 的活力测定

对重组菌中的 ES 的酶活进行了分析。结果显示, 分离纯化复性后的 ES, 在 pH 8.5, NaCl 终浓度  $0.5\text{mol/L}$ ,  $15^\circ\text{C}$  水浴反应 10min 后, 经 HPLC 分析测得 ectoine 含量约为  $95\mu\text{mol/L}$ , 酶活力为 9.5U。进一步分析了 pH 和温度对 ES 的影响, 由图 2 可以看出, 最适酶活条件为 pH 8.0, 温度  $25^\circ\text{C}$ 。此最适酶活温度明显小于菌株最适生长温度  $37^\circ\text{C}$ , 这可能是细胞内

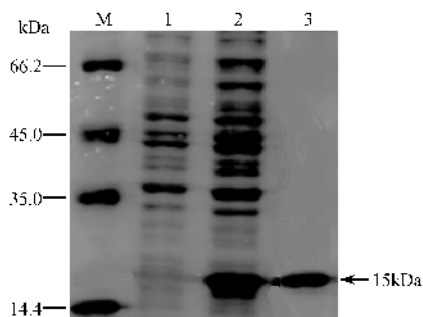


图 1 诱导表达蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE of induced expression protein expressed in *E. coli* BL21. M. Molecular weight marker; 1. *E. coli* BL21( pET-his ); 2. *E. coli* BL21( pET-his-ectC ); 3. Purified fusion protein.

离子种类、浓度及 pH 与试验条件下的差异有关。已有报道, ectoine 可以稳定乳酸脱氢酶 LDH 和磷酸果糖激酶抵御各种胁迫如冷冻、干燥和热<sup>[8]</sup>, 但从图 2 中可以看出, 当温度达到  $45^\circ\text{C}$  时, ES 都无酶活力, 我们分析可能是由于体系中 ectoine 浓度太低, 因而起不到稳定酶结构的作用。

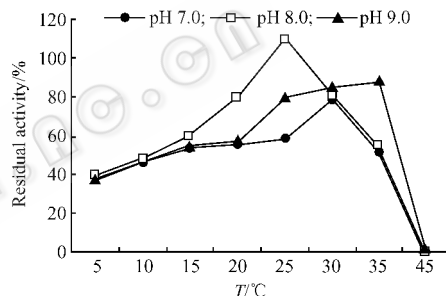


图 2 温度及 pH 值对 ES 酶活力的影响

Fig. 2 Effects of temperature and pH on the activity of ectoine synthase produced by recombinants.

## 3 讨论

在大多数耐盐微生物中, ectABC 基因簇共同作用分别编码 ectoine 生物合成途径中的 3 个酶, 而 ectC 基因是 *H. sp.* NJ223 中 ES 的编码基因。本文研究了在 *E. coli* 中引入 ectC 基因时重组菌的表达情况, 并进一步分离纯化复性出有活性的 ES。结果显示, ectC 基因编码 ES, 该酶作用底物 ADABA 催化合成相容性溶质 ectoine。

在高渗透压胁迫下, 耐盐微生物通过细胞内大量累积 ectoine 来调节细胞内外渗透压平衡, 在低渗透压下, 细胞释放 ectoine。正是相容性溶质的这种细胞渗透压调节机理使得多数的耐盐微生物得以在恶劣的高盐、碱环境中存活。耐盐微生物相容性溶质渗透压调节机理已成为研究嗜盐菌耐盐机制的热点之一, 最近 Zhao 等<sup>[9]</sup>扩增出 *Halobacillus dabanensis* D-8( T )ectABC 全基因, 何健等<sup>[10]</sup>利用 SEFA-PCR ( Self-Formed Adaptor PCR )技术从中度嗜盐菌 *H. sp.* BYS21 总 DNA 中克隆了 ectoine 合成基因 ectABC 及其上游序列。在本试验中, 我们成功地将 ectC 基因在 *E. coli* 中表达, 并分离出有活性的 ES, 从而在细胞体外试验条件下说明了 ectoine 的部分生物合成途径。

由于  $^{13}\text{C}$ -NMR(  $^{13}\text{C}$ -核磁共振 )<sup>[11]</sup>、HPLC( 高压液相色谱 )等技术能够快速、灵敏、有效地分离和鉴定有机化合物, 应用

这些技术找到了不少新的相容性溶质。另一方面,已有报道,在微生物体内找到了不少植物体内尚未发现的高效相容性溶质<sup>[12,13]</sup>,运用分子生物学手段重组相关基因,研究其渗透调节机理,对于构建重组基因植物,可望得到抗旱能力强的转基因植物,对于我国沙漠面积大、旱地多的国情具有重要意义。

# 参 考 文 献

- [ 1 ] Brown D. Microbial water stress. *Bacteriol Rev*, 1976, **40**: 803 – 846.
- [ 2 ] Antonio V, Joaquin J, Aharon O. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, **62**(2): 504 – 544.
- [ 3 ] Wohlfarth A, Severin J, Galinski EA. The spectrum of compatible solutes in heterotrophic halophilic eubacteria of the family *Halomonadaceae*. *J Gen Microbiol*, 1990, **136**(44): 705 – 722.
- [ 4 ] Peters P, Galinski EA, Truer HG. The biosynthesis of ectoine. *FEMS Microbiol Lett*, 1990, **71**: 157 – 162.
- [ 5 ] Ausubel F, Kingston R, Brent R, et al. Short Protocols in Molecular Biology. 4<sup>th</sup> ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 1999, 55.
- [ 6 ] 唐彩华, 肖锡宾, 吴 涛, 等. BACS-scFv 的表达、复性及活

- 性检测. 细胞与分子免疫学杂志, 2006, **22**(1): 67 – 70.
- [ 7 ] Ono H, Sawada K, Khunajakr N, et al. Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately halophilic eubacterium, *Halomonas elongata*. *J Bacteriol*, 1999, **181**(1): 91 – 99.
- [ 8 ] Lippert K, Galinski EA. Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Applied Microbiology Biotechnology*, 1992, **37**: 61 – 65.
- [ 9 ] Zhao B, Lu W, Yang L, et al. Cloning and characterization of the genes for biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus dabanensis* D-8(T). *Curr Microbiol*, 2006, **53**(3): 183 – 188.
- [ 10 ] 何 健, 黄 星, 顾立锋, 等. 盐单胞菌属 BYS21 四氢嘧啶合成基因 *ectABC* 克隆及其盐激表达. 微生物学报, 2006, **46**(1): 28 – 32.
- [ 11 ] Motta A, Romano I, Gambacorta A. Rapid and sensitive NMR method for osmolyte determination. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, **58**: 289 – 294.
- [ 12 ] Yoshida K. Plant biotechnology——genetic engineering to enhance plant salt tolerance. *J Biosci Bioeng*, 2002, **94**(6): 585 – 590.
- [ 13 ] Hideki N, Kazuya Y. Ectoine, the compatible solute of *Halomonas elongata*, confers hyperosmotic tolerance in cultured tobacco cells. *Plant Physiology*, 2000, **122**: 1239 – 1247.

## Characterization of the *ectC* gene and its expression product in *Halomonas* sp. Nj223 from Antarctica deep-sea sediment

CHEN Zhi-liang<sup>1</sup>, FU Ying-nan<sup>1</sup>, JIANG Wei-yu<sup>1</sup>, CHEN Rong-zhong<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

(<sup>2</sup> Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, Third Institute of Oceanography, Xiamen 361005, China)

**Abstract** A moderately halophilic bacterium *Halomonas* sp. NJ223 was isolated from Antarctica deep-sea sediment. This bacterium accumulates ectoine as the main compatible solute in response to severe osmotic stress. Ectoine synthase catalyzes circulation of  $\gamma$ -N-acetyl- $\alpha$   $\gamma$ -diaminobutyric acid (ADABA) to ectoine in the last step of the three enzymatic steps. The gene of ectoine synthase from this strain was amplified by PCR and the DNA sequence of a 393-bp segment was sequenced. The amino acid sequences of this enzyme present high homology to the known sequence. The significance of this gene was proved by the expression in *Escherichia coli*. Thus, the amplified fragment was cloned into the expression vector pET-his. The insert position, the size and the reading frame were identified by PCR, restriction digestion and the sequence analysis of the recombinant plasmids. SDS-PAGE shows that the relative molecular mass of the expression product was 15kDa as predicted, which indicated that the recombinant plasmids could express the gene of ectoine synthase. The biosynthetic pathway of ectoine was partially elucidated by renaturation and enzyme activity detection of purified ectoine synthase *in vitro*. Determination of effect of pH and temperature on enzyme activity shows that the optimal reaction condition of pH was 8.0 and temperature was 25℃.

**Keywords**: compatible solute; ectoine; *ectC* gene; Ectoine synthase; pET-his-ectC

Foundation item: China Mineral Resources R & D Association(DY105-04-02-06)

\* Corresponding author. Tel: 86-592-2195393; Fax: 86-592-2085376; E-mail: jhysscz@sina.com

Received: 8 August 2006/ Accepted: 8 September 2006/ Revised: 1 November 2006