

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(10):1305-1312; 4 October 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

地中海富盐菌中 *phaB* 基因的鉴定及 PHBV 前体供应途径的分析

冯博, 蔡双凤, 韩静, 刘海龙, 周坚, 向华*

(中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101)

摘要:【目的】进一步揭示地中海富盐菌 (*Haloferax mediterranei*) 中聚羟基丁酸羟基戊酸酯 [poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), PHBV] 前体供应的途径并鉴定其中的关键基因。【方法】将细菌及其他古菌中已鉴定的与聚羟基脂肪酸酯前体(3-羟基脂酰-CoA)供应相关的酶与地中海富盐菌预测的全蛋白质组进行同源性比对, 得到相似性比较高的 5 个基因, 分别命名为: *phaB1*, *phaB2*, *phaJ1*, *phaJ2* 和 *phaJ3*。首先利用 RT-PCR 检测了 5 个基因在产 PHBV 的条件下的转录情况。然后利用同源重组双交换的方法, 将 5 个基因分别或组合敲除, 得到突变株: $\Delta phaB1$, $\Delta phaB2$, $\Delta phaJ1$, $\Delta phaJ2$, $\Delta phaJ3$, $\Delta phaB1 phaB2$, $\Delta phaJ1 phaJ2$ 和 $\Delta phaJ1 phaJ2 phaJ3$ 。并在突变株 $\Delta phaB1 phaB2$ 中分别互补 *phaB1* 和 *phaB2* 基因。【结果】无论是将 3 个 *phaJ* 基因单独敲除, 还是组合敲除, 对地中海富盐菌 PHBV 的积累都没有明显影响。单独敲除 *phaB1* 基因对 PHBV 的积累没有明显影响, 单独敲除 *phaB2* 基因导致突变株 PHBV 产量明显下降, 而且 3-HV 单体组分所占的摩尔比例也有所下降。将 *phaB1* 和 *phaB2* 基因同时敲除后, 得到的突变株不再产生 PHBV。【结论】在地中海富盐菌中可能主要存在由乙酰-CoA 和丙酰-CoA 提供 PHBV 前体的途径, 其中编码乙酰乙酰-CoA 还原酶的两个基因即为 *phaB1* 和 *phaB2*。

关键词: 地中海富盐菌; 聚羟基脂肪酸酯; 乙酰乙酰-CoA 还原酶; 前体供应途径

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 10-1305-08

聚羟基脂肪酸酯 (Polyhydroxyalkanoate, PHA) 是由 3-羟基脂肪酸单体组成的一种线性聚酯, 通常是原核微生物, 包括极端嗜盐古菌, 在碳源过量而其他营养元素缺乏的情况下, 作为碳源和能源储备物而合成的高分子聚合物^[1]。由于人们对石油塑料引起的“白色污染”和经济社会可持续发展等问题的日益关注, 近年来微生物产生的生物可降解塑料的研究再次成为热点。PHA 作为一种可再生的生物材料, 它既具有与传统的石油来源的塑料如聚乙烯、聚丙烯相类似的物化性质, 还具有生物可降解性、生物相容性等特殊性质, 因而具有广阔的应用前

景, 如可生物降解的包装材料、手术缝合线、药物释放载体、聚合物支架等医用材料^[2]。然而, 与石油化工塑料相比, PHA 生产成本目前仍然较高, 这在很大程度上阻碍了其商业化的进程。

利用地中海富盐菌 (*Haloferax mediterranei*) 发酵生产 PHA 具有以下优势: 其一、地中海富盐菌是一种极端嗜盐古菌, 生长在含有高盐浓度的极端环境中, 可以减少杂菌的污染^[3], 从而降低了灭菌的标准甚至可以省略灭菌^[4]; 其二、地中海富盐菌可以利用廉价的碳源 (比如淀粉、葡萄糖、废糖蜜、乳清等) 合成占自身干重 60% 的聚羟基丁酸羟基戊酸

基金项目: 国家自然科学基金 (30830004); 国家“863 计划” (2006AA09Z401)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-64807472; E-mail: xiangh@sun.im.ac.cn

作者简介: 冯博 (1986-), 男, 山东人, 硕士研究生, 主要从事微生物遗传与代谢研究。E-mail: feng.bo1986@163.com

收稿日期: 2010-04-26; 修回日期: 2010-05-09

酯 [poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)], 即 PHBV^[5]; 其三、地中海富盐菌胞内的高渗透压环境使菌体在水中便能裂解, 从而简化了 PHA 的提取过程, 而且减少了有机溶剂的使用^[6-7]; 其四、地中海富盐菌积累的 PHBV, 在不添加 3-HV 相关碳源的情况下即可保持高水平 3-HV 组分, 具有比细菌通常产生的聚羟基丁酸酯 [poly (3-hydroxybutyrate), 即 PHB] 更好的材料特性^[8-9]。因此, 采用地中海富盐菌生产 PHBV, 有望降低生产成本、简化制备工艺、获得高质量 PHBV, 故该菌被认为是最有潜力的 PHBV 生产菌株之一^[5]。

在细菌中 PHA 的合成途径已经研究得较为透彻^[10-15]。目前细菌中已知的典型途径有 3 条: (1) 由乙酰-CoA 和丙酰-CoA 合成 PHA。其中 β -酮硫解酶 (β -ketothiolase, PhaA) 催化两分子乙酰-CoA 形成一分子乙酰乙酰-CoA, 或催化一分子乙酰-CoA 与一分子丙酰-CoA 形成一分子 3-酮戊酰-CoA, 然后在乙酰乙酰-CoA 还原酶 (acetoacetyl-CoA reductase, PhaB) 的作用下还原为 (R)-羟基丁酰-CoA 或 (R)-羟基戊酰-CoA, 最后在 PHA 合酶 (PHA synthase, PhaC) 的作用下聚合成 PHB 或 PHBV^[13-14]。(2) 经脂肪酸 β -氧化途径合成 PHA。其中脂肪酸 β -氧化的中间产物 (R)-烯脂酰-CoA 由 (R)-烯脂酰-CoA 水合酶 (enoyl-CoA hydratase, PhaJ) 催化形成 PHA 的前体 3-羟基脂酰-CoA, 再由 PHA 合酶合成 PHA^[16]。(3) 经脂肪酸从头合成途径合成 PHA。其中脂肪酸从头合成途径的中间产物 (R)-3-羟基脂酰-ACP, 由

3-羟基脂酰-ACP: CoA 转移酶 (3-hydroxyacyl-acyl carrier protein-CoA transferase, PhaG) 催化形成 3-羟基脂酰-CoA, 再由 PHA 合酶聚合生成 PHA^[10]。

在极端嗜盐古菌中, PHA 的代谢途径研究的比较少。最近, 死海盐盒菌 (*Haloarcula marismortui*)、西班牙盐盒菌 (*Haloarcula hispanica*) 和地中海富盐菌中的 PHA 合酶, 以及西班牙盐盒菌中的 PhaB 已经得到鉴定与研究^[6, 17-18]。但是在地中海富盐菌中, PHBV 前体供应途径还不清楚。在本研究中, 经过基因敲除与互补实验, 首次发现并鉴定了与 PHBV 合成密切相关的两个乙酰乙酰-CoA 还原酶基因, 即 *phaB1* 和 *phaB2*, 说明地中海富盐菌中存在由乙酰-CoA 和丙酰-CoA 合成 PHBV 的途径。而敲除 3 个可能的 *phaJ* 基因对 PHBV 合成无明显影响, 提示该菌中可能不存在经脂肪酸 β -氧化中间产物合成 PHBV 的途径。地中海富盐菌 PHBV 前体供应途径的确定和重要基因的发现对于其 PHBV 的生物工程利用具有非常重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 表 1 为本研究使用的菌株和质粒。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 为基因克隆的宿主, 采用 LB 培养基于 37°C 培养^[19]; 在需要时添加终浓度为 100 mg/L 的氨苄青霉素作为抗性选择。地中海富盐菌通常用 AS-168 培养基于 37°C 培

表 1 本文所涉及的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Description	Sources or references
Strains		
<i>H. mediterranei</i> CGMCC 1.2087	Wild-type strain = ATCC 33500	CGMCC
<i>H. mediterranei</i> Δ <i>phaB1</i>	<i>phaB1</i> -deleted mutant of <i>H. mediterranei</i>	This study
<i>H. mediterranei</i> Δ <i>phaB2</i>	<i>phaB2</i> -deleted mutant of <i>H. mediterranei</i>	This study
<i>H. mediterranei</i> Δ <i>phaJ1</i>	<i>phaJ1</i> -deleted mutant of <i>H. mediterranei</i>	This study
<i>H. mediterranei</i> Δ <i>phaJ2</i>	<i>phaJ2</i> -deleted mutant of <i>H. mediterranei</i>	This study
<i>H. mediterranei</i> Δ <i>phaJ3</i>	<i>phaJ3</i> -deleted mutant of <i>H. mediterranei</i>	This study
<i>H. mediterranei</i> Δ <i>phaB1phaB2</i>	<i>phaB1</i> and <i>phaB2</i> -deleted mutant of <i>H. mediterranei</i>	This study
<i>H. mediterranei</i> Δ <i>phaJ1phaJ2</i>	<i>phaJ1</i> and <i>phaJ2</i> -deleted mutant of <i>H. mediterranei</i>	This study
<i>H. mediterranei</i> Δ <i>phaJ1phaJ2phaJ3</i>	<i>phaJ1</i> , <i>phaJ2</i> and <i>phaJ3</i> -deleted mutant of <i>H. mediterranei</i>	This study
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi</i>	19
Plasmids		
pWL102	10.5-kb shuttle vector, Amp ^r , Mev ^r	20
pWLB1	derivative of pWL102, 11.4 kb, <i>phaB1</i> and native promoter	This study
pWLB2	derivative of pWL102, 11.5 kb, <i>phaB2</i> and native promoter	This study
pUBP	6.6 kb, derivative of pUBP2 by removing the pHH9-ori region	6
pUBPDB1	8.2 kb, integration vector for knockout of <i>phaB1</i>	This study
pUBPDB2	8.2 kb, integration vector for knockout of <i>phaB2</i>	This study
pUBPDJ1	8.3 kb, integration vector for knockout of <i>phaJ1</i>	This study
pUBPDJ2	8.2 kb, integration vector for knockout of <i>phaJ2</i>	This study
pUBPDJ3	8.2 kb, integration vector for knockout of <i>phaJ3</i>	This study

养^[6]。为了分析 PHBV 积累情况,地中海富盐菌先在 AS-168 培养基中培养 48 h,然后按 5% 的接种量(体积比)转移到 100 mL 的 MG 培养基^[6]中培养 72 h,期间 pH 值控制在 7.2 左右;在需要时添加终浓度为 3 - 5 mg/L 的莫维诺林(mevinolin, Mev)作为抗性选择。基因敲除和互补中所用的质粒分别由 pUBP^[6]和 pWL102^[20]构建而成(表 1)。这些质粒通常是在大肠杆菌 JM109 中构建完成,然后再用聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)介导的方法转化到地中海富盐菌中^[21]。

1.1.2 引物:本研究使用的引物见表 2。

表 2 本文中所涉及的引物

Table 2 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')
phaB1 RTF	CGGGCTAAAACGTGTGTC
phaB1 RTR	CGCCTTTTCCCACGATAC
phaB2 RTF	TGCGGATGTCGTGCTGATAA
phaB2 RTR	CCGCGTAGTTGGCTTGTC
phaJ1 RTF	CGCACAGCCCCGACATAC
phaJ1 RTR	GACCGTCGCGCCCAACAC
phaJ2 RTF	CGGCTCGCTCGTCTGCTG
phaJ2 RTR	CCGGCCGGGAGATTCTGTC
phaJ3 RTF	CCGCCACGAACCGAAAGA
phaJ3 RTR	GGGCCGCGCTGATGAGTC
phaB1 F1	ATACTGCAGCGTCTGTGCAGTGAAAG
phaB1 R1	AGATAAGCTTCCGGTCCCGGTTCCATCTCG
phaB1 F2	TATGGATCCAGCGCGTCTATCTCTCG
phaB1 R2	ATAGGTACCCACACAACAGCCGTCCT
phaB2 F1	GCGAAGCTTTTTTGGGTAGTTGCTTGT
phaB2 R1	ATCGGATCCCGCCTCGTTATACAATC
phaB2 F2	ATAGGATCCCTGGGATGGAGTGGTGACA
phaB2 R2	ATAGGTACCAACCGTCTCAGCTCTCAC
phaJ1 F1	ATCGGTACCCGGGTA AAAAGACTCTA
phaJ1 R1	ATCGGATCCGAGCCGGTGTAGTAAAAC
phaJ1 F2	ATAGGATCCCGCTTTTCGACCCACTCA
phaJ1 R2	ATCCTGCAGTGTGGCAGGTCTCTCGA
phaJ2 F1	AGCAAGCTTCGCGGAGCAAATTA ACTG
phaJ2 R1	ATAGGATCCCGCAATTCGGAACGGTGT
phaJ2 F2	ATAGGATCCCCACGTCGCGGCAACTGT
phaJ2 R2	ATAGGTACCCCGCCGAGTTTCGTATC
phaJ3 F1	ATCAAGCTTCACCGACGAGTCCATCAT
phaJ3 R1	ATAGGATCCCGCCCAACTTATGTACT
phaJ3 F2	ATAGGATCCCGCAAACCGTTTCTACAAT
phaJ3 R2	ATAGGTACCCGCTCGTTATACAATC
phaB1 F3	ATGGATCCGGCGGTTTCCAAGACGAT
phaB1 R3	ATGGTACCCCGGTGACGAGAGATAG
phaB2 F3	CGGTCTAGAGTCTTCTTATACATGA
phaB2 R3	CGGTCTAGAGTTTCTGCTGTTATAGTC

Sequences underlined represented the restriction sites.

1.1.3 主要试剂和仪器:TRIzol 购自 Invitrogen 公司。RNase-free RQ1 DNase 购自 Promega 公司。OneStep RT-PCR 试剂盒购自 Qiagen 公司。FD-1PF 冷冻干燥机购自德天佑公司。GC-6820 气相色谱仪

购自 Aligent 公司。

1.2 同源性比对

为了在地中海富盐菌中找到可能编码 PhaB, PhaJ, PhaG 的基因,将西班牙盐盒菌中的 PhaB1^[17], 绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*)中的 PhaJ (ABD83959.1)和恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)中的 PhaG (AAU44816.1)的氨基酸序列与地中海富盐菌预测的全蛋白质组进行同源性比对(利用本地服务器 BLAST),将同源性较高的编码基因作为基因敲除的对象。

1.3 RT-PCR

在基因敲除之前,先用 RT-PCR 检测地中海富盐菌中待敲除的基因在发酵培养基中培养时的转录情况。根据待敲除的基因的碱基序列,设计了 5 对特异的 RT-PCR 引物: phaB1 RTF/phaB1 RTR, phaB2 RTF/phaB2 RTR, phaJ1 RTF/phaJ1 RTR, phaJ2 RTF/phaJ2 RTR 和 phaJ3 RTF/phaJ3 RTR(表 2)。将地中海富盐菌在 MG 培养基中培养 72 h 后,根据 Invitrogen 公司的说明书,用 TRIzol 试剂法提取总 RNA。然后,总 RNA 用 RNase-free RQ1 DNase 处理,以消除 DNA 的污染。在 RT-PCR 之前,用 PCR 检测 DNA 污染。根据 Qiagen 公司的说明书,利用 OneStep RT-PCR 试剂盒,以无 DNA 污染的总 RNA 为模板,进行 RT-PCR。

1.4 基因敲除

利用 5 对引物: phaB1 F1/phaB1 R1, phaB2 F1/phaB2 R1, phaJ1 F1/phaJ1 R1, phaJ2 F1/phaJ2 R1 和 phaJ3 F1/phaJ3 R1(表 2),以地中海富盐菌基因组为模板,PCR 分别扩增出 5 个待敲除基因的上游片段;利用 5 对引物: phaB1 F2/phaB1 R2, phaB2 F2/phaB2 R2, phaJ1 F2/phaJ1 R2, phaJ2 F2/phaJ2 R2 和 phaJ3 F2/phaJ3 R2(表 2),以地中海富盐菌基因组为模板,PCR 分别扩增出 5 个待敲除基因的下游片段。将对应的上下游片段测序后,克隆到质粒 pUBP(表 1)中,分别得到敲除质粒 pUBPDB1, pUBPDB2, pUBPDJ1, pUBPDJ2 和 pUBPDJ3。将上述敲除质粒转化地中海富盐菌或其突变株,利用双交换同源重组的方法(详见文献^[17]),得到对应的基因敲除菌株: $\Delta phaB1$, $\Delta phaB2$, $\Delta phaJ1$, $\Delta phaJ2$, $\Delta phaJ3$; 以及多个基因的组合敲除菌株: $\Delta phaB1 phaB2$, $\Delta phaJ1 phaJ2$ 和 $\Delta phaJ1 phaJ2 phaJ3$ 。利用 5 对引物 phaB1 F1/phaB1 R2, phaB2 F1/phaB2 R2, phaJ1 F1/phaJ1 R2, phaJ2 F1/phaJ2 R2 和 phaJ3 F1/phaJ3 R2(表 2)对 5 个待敲除基因分别进

行单交换和双交换的 PCR 验证。将上述突变株进行 PHBV 发酵,并用气相色谱分析 PHBV 积累情况。

1.5 基因互补

利用 2 对引物: *phaB1F3/phaB1R3*, *phaB2F3/phaB2R3*(表 2),以地中海富盐菌基因组为模板,PCR 分别扩增出 *phaB1* 和 *phaB2* 基因序列(包括自身启动子序列)。然后将扩增出的 *phaB1* 和 *phaB2* 基因序列克隆到质粒 pWL102(表 1)中,分别得到互补质粒:pWLB1 和 pWLB2。互补质粒经测序验证正确后,分别转化地中海富盐菌突变株 $\Delta phaB1phaB2$,得到重组菌: $\Delta phaB1phaB2/B1$ 和 $\Delta phaB1phaB2/B2$ 。将上述重组菌进行 PHBV 发酵,并用气相色谱分析 PHBV 积累情况。

1.6 PHBV 的分析

收集 PHBV 发酵的菌体,冷冻干燥,然后称取约 75 mg 冻干的菌体,置于酯化管中,再向其中加入 2 mL 酯化液(3% 体积的浓硫酸溶于甲醇中,含 1 g/L 苯甲酸作为内标)和 2 mL 氯仿,混匀后将其置于

100 °C 的烘箱中酯化 4 小时。酯化后加入 1 mL 蒸馏水,混匀,待有机相和水相分层后,取 1 μ L 下层有机相用 GC-6820 气相色谱仪进行检测。

2 结果

2.1 同源性比对结果

经本地服务器 BLAST 比对,找到 2 个与西班牙盐盒菌中的 PhaB 同源性较高的基因,根据所在位置,将染色体上的基因命名为 *phaB1*,质粒 pHM300 上的基因命名为 *phaB2*。找到 3 个与绿针假单胞菌中的 PhaJ 同源性较高的基因,将染色体上的基因命名为 *phaJ1*,质粒 pHM500 上的基因命名为 *phaJ2*,质粒 pHM300 上的基因命名为 *phaJ3*。没有找到与恶臭假单胞菌中的 PhaG 有同源性的基因(表 3)。同源性比对出来的上述 5 个基因是基因敲除的对象。上述结果暗示着在地中海富盐菌中可能不存在经脂肪酸从头合成途径合成 PHBV 的途径。

表 3 同源性比对结果

Table 3 Results of homologous alignment					
Query protein	Gene name	ID	Location	Identity/%	E-value
FabG1 (PhaB) (<i>H. hispanica</i>)	<i>phaB1</i>	HFX_1281	chr	57	8.00E-70
	<i>phaB2</i>	HFX_5215	pHM300	72	2.00E-88
	<i>phaJ1</i>	HFX_1483	chr	67	3.00E-20
PhaJ(<i>P. chlororaphis</i>)	<i>phaJ2</i>	HFX_6433	pHM500	48	6.00E-16
	<i>phaJ3</i>	HFX_5217	pHM300	44	6.00E-15

2.2 RT-PCR 结果

RT-PCR 结果表明:在积累 PHBV 的情况下,5

个待敲除的基因均有不同程度的转录(图 1)。因此推测,这 5 个基因可能在 PHBV 合成途径中起作用。为了进一步验证,将这 5 个基因逐个进行敲除。

2.3 五个基因单独敲除后对 PHBV 积累的影响

利用双交换同源重组的方法分别得到 5 个基因的敲除突变株: $\Delta phaB1$, $\Delta phaB2$, $\Delta phaJ1$, $\Delta phaJ2$ 和 $\Delta phaJ3$ 。突变株已经 PCR 验证,所有双交换成功的菌株均只扩增出与预期基因敲除后大小一致的单一一条带(图 2)。将这些突变株进行发酵,并用气相色谱检测 PHBV 积累情况。发酵结果表明:基因 *phaB1*, *phaJ1*, *phaJ2* 和 *phaJ3* 单独敲除之后,对 PHBV 的积累没有明显影响,但是将 *phaB2* 敲除后, $\Delta phaB2$ 所积累的 PHBV 总量明显下降(图 3), PHBV 所占干重的比例由野生型的 28.95% 下降至 8.94%,而且 3-HV 单体组分摩尔百分比也有明显的下降,由野生型的 9.28 mol% 下降至 2.93 mol%(表 4)。表明 PhaB2 参与了 PHBV 合成主要前体的供应。但由于菌株 $\Delta phaB2$ 中还能合成少量的 PHBV,因此可能还存在其它提供前体的酶。

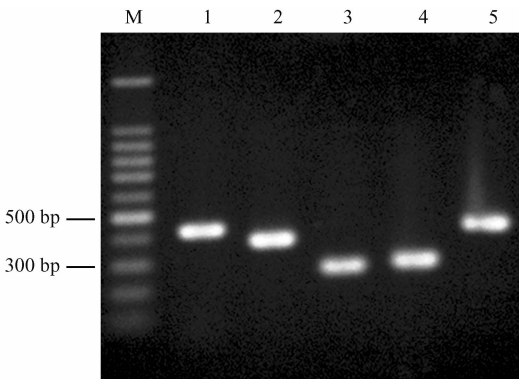


图 1 PHBV 积累的情况下 5 个基因的 RT-PCR 琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 RT-PCR analysis of five genes in *H. mediterranei* under PHBV-accumulating conditions. Lane 1, *phaB1* (433 bp); lane 2, *phaB2* (383 bp); lane 3, *phaJ1* (271 bp); lane 4, *phaJ2* (284 bp); lane 5, *phaJ3* (423 bp); lane M, 100-bp DNA ladder.

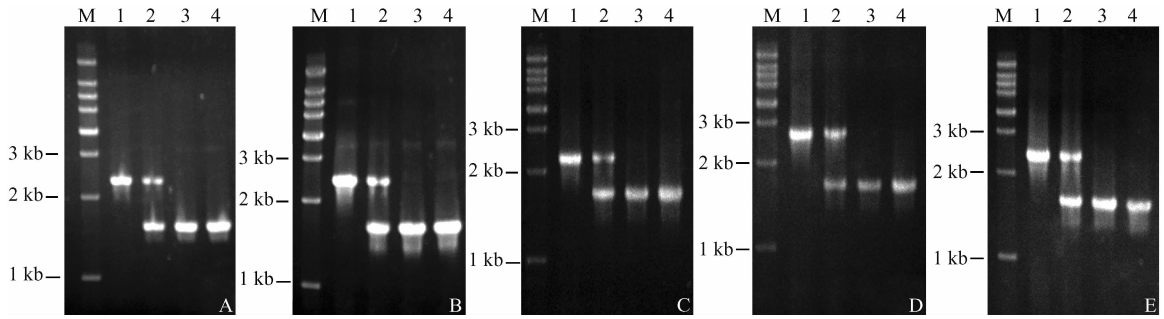


图 2 PCR 验证 5 个基因的敲除株

Fig. 2 PCR identification of *phaB1* (A), *phaB2* (B), *phaJ1* (C), *phaJ2* (D) and *phaJ3* (E) -deleted strains, respectively. Lane 1, Genomic DNA from wild-type strain, used as negative controls; lane 2, genomic DNA from single-crossover strains; lane 3, genomic DNA from double-crossover strains; lane 4, plasmids pUBPDB1 (A), pUBPDB2 (B), pUBPDJ1 (C), pUBPDJ2 (D) and pUBPDJ3 (E), respectively, used as positive controls.

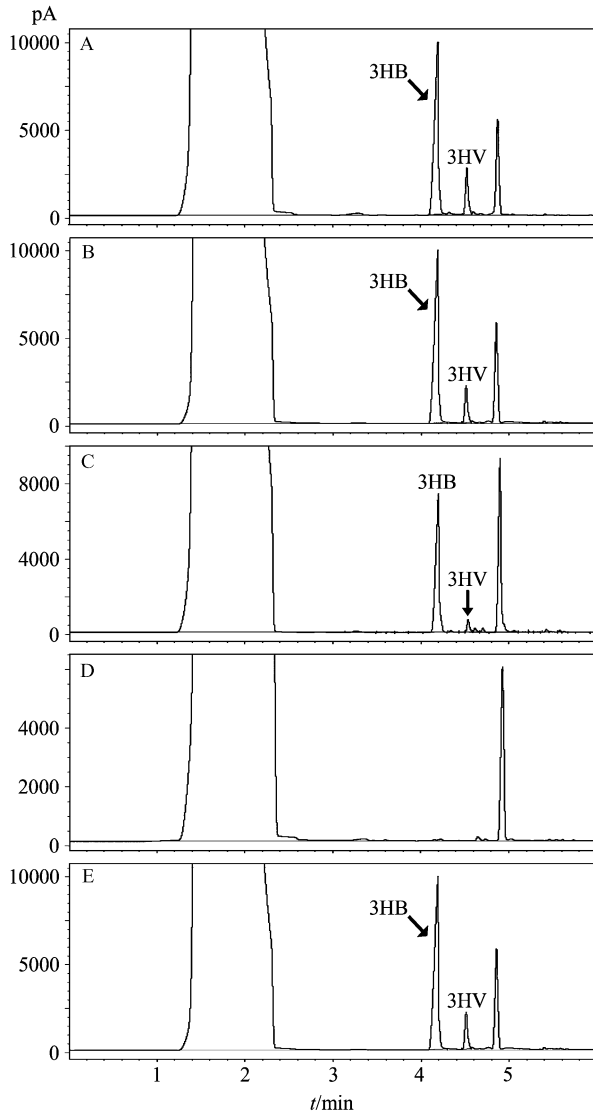


图 3 地中海富盐菌及其突变株积累 PHBV 的气相色谱图
Fig. 3 GC analysis of PHBV accumulation in *H. mediterranei* and the recombinant strains. (A) *H. mediterranei* wild-type strain; (B) Δ *phaB1*; (C) Δ *phaB2*; (D) Δ *phaB1phaB2*; (E) PHBV standard (Sigma). The peaks marked with 3HB and 3HV represent 3-HB methylester and 3-HV methylester, respectively. The peaks at 4.85 min represent the methylester product of an internal standard (1 ng of benzoic acid). The *H. mediterranei* recombinants were cultivated in MG medium at 37°C for 96 h.

2.4 五个基因组合敲除后对 PHBV 积累的影响

在菌株 Δ *phaB2* 中进一步敲除基因 *phaB1*, 得到突变株 Δ *phaB1phaB2*。在菌株 Δ *phaJ1* 中进一步敲除基因 *phaJ2* 和 *phaJ3*, 得到突变株 Δ *phaJ1phaJ2* 和 Δ *phaJ1phaJ2phaJ3*。突变株均经 PCR 验证正确。将突变株 Δ *phaB1phaB2*, Δ *phaJ1phaJ2* 和 Δ *phaJ1phaJ2phaJ3* 进行发酵, 并用气相色谱检测 PHBV 积累情况。发酵结果表明: 在突变株 Δ *phaB1phaB2* 中已经检测不到 PHBV 的存在 (图 3D)。而无论是 Δ *phaJ1phaJ2* 还是 Δ *phaJ1phaJ2phaJ3* 产生 PHBV 的总量和 3-HV 组分摩尔百分比与野生型相比, 都无明显变化 (表 4)。说明在地中海富盐菌中可能不存在脂肪酸 β -氧化途径合成 PHBV 的途径, 而主要存在由乙酰-CoA 和丙酰-CoA 合成 PHBV 的途径。编码乙酰乙酰-CoA 还原酶的两个基因为 *phaB1* 和 *phaB2*。但是 2.3 中的结果表明单独敲除 *phaB1* 之后对 PHBV 的积累没有明显影响。可能基因 *phaB1* 在 *phaB2* 存在的情况下不发挥作用, 在 *phaB2* 被敲除之后, *phaB1* 才代替 *phaB2*, 行使相应的功能。

2.5 在 Δ *phaB1phaB2 中互补 *phaB1* 和 *phaB2* 基因*

将构建好的互补质粒: pWLB1 和 pWLB2 分别转化突变株 Δ *phaB1phaB2*, 得到重组菌: Δ *phaB1phaB2/B1* 和 Δ *phaB1phaB2/B2*。将这两株重组株发酵, GC 检测结果表明: Δ *phaB1phaB2/B2* 所产的 PHBV 已经接近野生型的水平, 而 Δ *phaB1phaB2/B1* 所产的 PHBV 与突变株 Δ *phaB2* 的情况相似 (表 5)。这个结果更加证实了 2.4 中的结论。

表 4 地中海富盐菌及其突变株 PHBV 积累情况

Table 4 PHBV accumulation in *H. mediterranei* wild-type and mutant strains

Strains	Cell dry wt/(g/L)	PHBV content [% (wt/wt)]	3HV fraction/(mol%)	c(PHBV)/(g/L)
<i>H. mediterranei</i>	5.96 ± 0.10	28.95 ± 1.80	9.28 ± 0.69	1.72 ± 0.02
$\Delta phaB1$	5.88 ± 0.08	30.57 ± 0.19	11.07 ± 0.60	2.14 ± 0.15
$\Delta phaB2$	3.66 ± 0.26	8.94 ± 2.00**	2.93 ± 0.32**	0.32 ± 0.03**
$\Delta phaJ1$	5.66 ± 0.10	30.33 ± 3.21	11.03 ± 1.24	1.70 ± 0.07
$\Delta phaJ2$	4.64 ± 0.57	29.08 ± 8.76	9.99 ± 1.34	1.34 ± 0.16
$\Delta phaJ3$	5.24 ± 0.51	28.69 ± 3.19	9.66 ± 0.66	1.50 ± 0.21
$\Delta phaB1phaB2$	2.66 ± 0.14	ND**	ND**	ND**
$\Delta phaJ1phaJ2$	3.57 ± 0.51	27.59 ± 0.83	9.73 ± 0.51	0.99 ± 0.14
$\Delta phaJ1phaJ2phaJ3$	6.16 ± 0.55	23.52 ± 2.64	8.45 ± 0.64	1.72 ± 0.08

The data are shown as mean ± standard deviation (n = 3). ND, not detectable. **P < 0.01 (t-test), the significance of differences between wild-type and mutant strains.

表 5 地中海富盐菌及其突变株基因互补后 PHBV 积累情况

Table 5 PHBV accumulation in *H. mediterranei* wild-type and gene knockout/complementation strains

Strains	Cell dry wt/(g/L)	PHBV content [% (wt/wt)]	3HV fraction/(mol%)	c(PHBV)/(g/L)
<i>H. mediterranei</i>	5.96 ± 0.10	28.95 ± 1.80	9.28 ± 0.69	1.72 ± 0.02
$\Delta phaB1phaB2/B2$	5.88 ± 0.25	23.03 ± 1.19	8.73 ± 0.35	1.99 ± 0.13
$\Delta phaB1phaB2/B1$	5.44 ± 0.33	6.85 ± 0.18**	2.87 ± 0.89**	0.37 ± 0.02**

The data are shown as mean ± standard deviation (n = 3). **P < 0.01 (t-test), the significance of differences between wild-type and mutant strains.

3 讨论

在本文的研究中,将细菌中的 PhaG 的氨基酸序列与地中海富盐菌预测的全蛋白质组进行同源性比对,没有得到有同源性的基因。将细菌中的 PhaJ 的氨基酸序列与地中海富盐菌预测的全蛋白质组进行同源性比对,得到 3 个同源性较高的 *phaJ* 基因,无论将 3 个基因单独敲除还是组合敲除,都对 PHBV 的积累没有明显影响。说明在地中海富盐菌中可能不存在经脂肪酸 β -氧化途径和脂肪酸从头合成途径提供中间产物合成 PHBV 的途径。

最近本实验室在西班牙盐盒菌中鉴定了特异为聚羟基脂肪酸酯(PHA)提供前体的乙酰乙酰-CoA 还原酶(PhaB),其编码基因是迄今为止在古菌域中第一个实验验证为 *phaB* 的基因。在本文的研究中,利用西班牙盐盒菌中 PhaB 的氨基酸序列与地中海富盐菌预测的全蛋白质组进行同源性比对,得到两个同源性较高的基因:*phaB1* 和 *phaB2*。将两个 *phaB* 基因同时敲除后,得到的突变株 $\Delta phaB1phaB2$ 不再产生 PHBV,说明这两个 *phaB* 基因即为编码 PHBV 特异的乙酰乙酰-CoA 还原酶。而且更加证实了前文中得到的结论:地中海富盐菌中应存在由乙酰-CoA 和丙酰-CoA 合成 PHBV 的途径。在西班牙盐盒菌中也有相似的情况,将该菌中的 *fabG1* (*phaB*)基因敲除后,菌体中不再产生 PHA^[17]。

有意思的是,两个 *phaB* 基因虽然均编码 PHBV 特异的乙酰乙酰-CoA 还原酶。但是将 *phaB1* 基因

敲除之后对 PHBV 的积累没有明显影响;将 *phaB2* 基因敲除之后,PHBV 的积累量与 3-HV 单体组分所占的摩尔百分比则都有明显下降。说明在地中海富盐菌中,两个 *phaB* 基因可能存在调控作用,使得在 *phaB2* 基因存在的情况下,*phaB1* 基因不发挥作用。将 *phaB2* 基因敲除之后,*phaB1* 基因作为替补发挥作用。*phaB2* 基因与已经鉴定为编码 PHA 合酶的 *phaEC* 基因都在质粒 pHM300 上,而且只相隔 4 个基因,而 *phaB1* 基因存在于染色体上。因此推测两个 *phaB* 基因在来源与进化方面存在一定的差异。同时也说明 PhaB2 的催化活性比 PhaB1 的要高,并且 PhaB2 对 3-酮戊酰-CoA 催化特异性也比 PhaB1 高。

将 PhaB1 和 PhaB2 的氨基酸序列与细菌和西班牙盐盒菌中的 PhaB 进行多序列比对发现:和细菌与西班牙盐盒菌中一样,催化活性三联体(Ser, Tyr 和 Lys)及 PhaB 标志性 Gly motif (ValThrGlyXXXGlyIleGly)^[22-23]在 PhaB1 和 PhaB2 中也是完全保守的,因此可以肯定,PhaB1 和 PhaB2 即为地中海富盐菌中负责 PHBV 前体供应的还原酶。

参考文献

- [1] Rehm BH. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal*, 2003, 376:15-33.
- [2] Madison LL, Huisman GW. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, 63: 21-53.

- [3] Madigan MT, Oren A. Thermophilic and halophilic extremophiles. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2:265-269.
- [4] Lillo JG, Rodriguez-Valera F. Effects of Culture Conditions on Poly (beta-Hydroxybutyric Acid) Production by *Haloferax mediterranei*. *Applied Environmental Microbiology*, 1990, 56:2517-2521.
- [5] Koller M, Hesse P, Bona R, Kutschera C, Atlic A, BrauneGG G. Potential of various archae- and eubacterial strains as industrial polyhydroxyalkanoate producers from whey. *Macromolecular Bioscience*, 2007, 7:218-226.
- [6] Han J, Lu Q, Zhou L, Zhou J, Xiang H. Molecular characterization of the *phaECHm* genes, required for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) in the extremely halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*. *Applied Environmental Microbiology*, 2007, 73:6058-6065.
- [7] Hezayen FF, Rehm BH, Eberhardt R, Steinbuechel A. Polymer production by two newly isolated extremely halophilic archaea: application of a novel corrosion-resistant bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 54:319-325.
- [8] Bauer H, Owen AJ. Some structural and mechanical properties of bacterially produced poly- β -hydroxyvalerate. *Colloid & Polymer Science*, 1988, 266: 241-247.
- [9] Lee SY. Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology*, 1996, 14:431-438.
- [10] Hoffmann N, Amara AA, Beermann BB, Qi Q, Hinz HJ, Rehm BH. Biochemical characterization of the *Pseudomonas putida* 3-hydroxyacyl ACP: CoA transacylase, which diverts intermediates of fatty acid *de novo* biosynthesis. *Journal Biological Chemistry*, 2002, 277:42926-42936.
- [11] Liebergesell M, Steinbuechel A. Cloning and nucleotide sequences of genes relevant for biosynthesis of poly (3-hydroxybutyric acid) in *Chromatium vinosum* strain D. *European Journal of Biochemistry*, 1992, 209:135-150.
- [12] McCool GJ, Cannon MC. Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181: 585-592.
- [13] Peoples OP, Sinskey AJ. Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (*phbC*). *Journal Biological Chemistry*, 1989, 264:15298-15303.
- [14] Peoples OP, Sinskey AJ. Poly-beta-hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Characterization of the genes encoding beta-ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase. *Journal Biological Chemistry*, 1989, 264:15293-15297.
- [15] Timm A, Steinbuechel A. Cloning and molecular analysis of the poly (3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *European Journal of Biochemistry*, 1992, 209:15-30.
- [16] Fukui T, Doi Y. Cloning and analysis of the Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179:4821-4830.
- [17] Han J, Lu Q, Zhou L, Liu H, Xiang H. Identification of the polyhydroxyalkanoate (PHA)-specific acetoacetyl coenzyme A reductase among multiple FabG paralogs in *Haloarcula hispanica* and reconstruction of the PHA biosynthetic pathway in *Haloferax volcanii*. *Applied Environmental Microbiology*, 2009, 75:6168-6175.
- [18] Lu Q, Han J, Zhou L, Zhou J, Xiang H. Genetic and biochemical characterization of the poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) synthase in *Haloferax mediterranei*. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190:4173-4180.
- [19] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [20] Lam WL, Doolittle WF. Shuttle vectors for the archaeobacterium *Halobacterium volcanii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86:5478-5482.
- [21] Cline SW, Lam WL, Charlebois RL, Schalkwyk LC, Doolittle WF. Transformation methods for halophilic archaeobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 1989, 35:148-152.
- [22] Oppermann U, Filling C, Hult M, Shafqat N, Wu X, Lindh M, Shafqat J, Nordling E, Kallberg Y, Persson B, Jornvall H. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chemico-Biological Interactions*, 2003, 143-144:247-253.
- [23] Taroncher-Oldenburg G, Nishina K, Stephanopoulos G. Identification and analysis of the polyhydroxyalkanoate-specific beta-ketothiolase and acetoacetyl coenzyme A reductase genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Applied Environmental Microbiology*, 2000, 66:4440-4448.

Identification of the *phaB* genes and analysis of the PHBV precursor supplying pathway in *Haloferax mediterranei*

Bo Feng, Shuangfeng Cai, Jing Han, Hailong Liu, Jian Zhou, Hua Xiang*

(State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: [**Objective**] Identification and characterization of the genes involved in precursor supplying for poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) biosynthesis in the haloarchaeon *Haloferax mediterranei*. [**Methods**] By using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search methodology, we obtained five genes (*phaB1*, *phaB2*, *phaJ1*, *phaJ2* and *phaJ3*) that were possibly involved in the 3-hydroxyacyl-CoA precursor supplying for PHBV biosynthesis in *H. mediterranei*. Firstly, we proved that these five genes were all transcribed under the PHBV-accumulating condition in *H. mediterranei*. Then, we knocked out these genes individually or in combination, by double-crossover homologous recombination, resulting in the following mutants: $\Delta phaB1$, $\Delta phaB2$, $\Delta phaJ1$, $\Delta phaJ2$, $\Delta phaJ3$, $\Delta phaB1phaB2$, $\Delta phaJ1phaJ2$ and $\Delta phaJ1phaJ2phaJ3$. Finally, we performed the complementation analysis of the $\Delta phaB1phaB2$ strain, with the *phaB1* and *phaB2* genes, respectively. [**Results**] Whenever the three *phaJ* genes were knocked out individually or in combination, there was no obvious influence on PHBV accumulation in *H. mediterranei*. Knockout of *phaB1* also did not affect the PHBV accumulation obviously. However, when *phaB2* was knocked out, the yield of PHBV and the fraction of the 3-HV monomer decreased significantly. Notably, when the *phaB1* and *phaB2* were knocked out in combination, the mutant $\Delta phaB1phaB2$ no longer produced PHBV. [**Conclusions**] The PHBV-specific acetoacetyl-CoA reductases (PhaB) involved in the precursor supplying for PHBV biosynthesis are encoded by *phaB1* and *phaB2* in *H. mediterranei*.

Keywords: *Haloferax mediterranei*; PHA; acetoacetyl-CoA reductase; PHBV precursor supplying

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30830004) and the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA09Z401)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-64807472; E-mail: xiangh@sun.im.ac.cn

Received: 26 April 2010/ Revised: 9 May 2010

《微生物学报》审稿程序

问:贵刊的审稿程序是怎样的?一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答:本刊严格遵守“三审制”,即:编辑部内审,专家外审,主编总审。从投稿日期开始,争取在2个月之内给出审稿结果,5-7个月之内发表。

- (1) 收到来稿后,首先将请2位专家进行初审,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过2个月。如果初审2位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第3位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过2个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给出作者发出E-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后,经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者,在没有完成全部审稿之前,不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。