

嗜碱性兼性自养莫拉氏菌 M-z 1.5-二磷酸核酮糖羧化酶基因的克隆

赵孝先

(山东大学微生物学系 济南 250100)

加藤美雪 五十岚泰夫 儿玉彻

(东京大学农学部 日本)

摘要 以莫拉氏菌 (*Moraxella* sp.) M-z 1.5-二磷酸核酮糖羧化酶 (RubisCO) 大小亚基 N-末端氨基酸序列和真养产碱菌 (*Alcaligenes eutrophus*) RubisCO 大亚基靠 C-末端保守区域 DNA 序列为依据,合成 3 个引物,以莫拉氏菌 M-z 染色体 DNA 为模板通过 PCR 扩增制备了二种探针,Southern 杂交分析表明上述探针与莫拉氏菌 M-z 染色体 DNA 的两个 *Apa* I 酶切片断 (5kb、4kb) 呈阳性杂交反应。认为完整的 RubisCO 基因包含在这两个片段中。分别将含目的基因的 5kb、4kb DNA 片段克隆至 pUC118 和 pBluescript KS⁺, 构成质粒 pP-CL511 和 pBS4, 并绘制了这二个质粒限制性核酸酶酶谱。

关键词 嗜碱性兼性自养菌, 1.5-二磷酸核酮糖羧化酶, 基因克隆

1.5-二磷酸核酮糖羧化酶 (RubisCO EC4.1.1.39) 是自养生物 CO₂ 固定的关键酶, 是地球上含量最丰富的单一蛋白质^[1], 对来源于不同微生物类群的 RubisCO 及其基因已有较深入的研究^[2~6], 比较学的分析可对其潜在的工业应用前景及预防温室效应提供理论依据。近些年, 极端环境微生物 RubisCO 基因的研究倍受重视, 但尚无来自嗜碱性菌的有关报道。

莫拉氏菌 M-z 是一嗜碱性菌, 最适生长 pH 为 8~10, 它能利用甲酸或甲醇为唯一碳源生长, 并有较高的 RubisCO 比活性^[7]。纯化的 RubisCO 为典型的由 8 个大亚基和 8 个小亚基组成的 L₈S₈ 结构, 其大小亚基 N-端氨基酸序列也已测定^[8]。本菌还可利用某些有机质生长, 是一嗜碱性兼性自养菌, 这种自身对自养-异养代谢具有“开关”调节的机理尚不十分清楚, 推测是以控制代谢所需酶的基因转录为基础, 尤其是对代谢关键酶的调控。为阐明这一嗜碱性菌的 RubisCO 结构基因及其表面调控, 我们首先进行了该基因克隆的工作。

1 材料与方 法

1.1 菌种与质粒

实验所用菌种与质粒见表 1。

1.2 培养基

1.2.1 莫拉氏菌 M-z 培养基 (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, K_2HPO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, Bacto-Yeast extract 0.1, Na_2SeO_3 1.0mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0mg, CaCl_2 1.0mg, 微量元素溶液 0.5ml, 甲酸钠 6.8g, 或甲醇 1.5g, 用 3% 无菌 Na_2CO_3 调 pH 至 9。

表 1 菌种与质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Description	Source
Strain		
<i>Moraxella</i> sp. M-z	Wild type	This laboratory
<i>E. coli</i> JM109	Amp ^r	as above
Plasmid		
Charomid 9-36	Amp ^r	Promega Co
pBluescript KS ⁺	Amp ^r	Promega Co
pUC118	Amp ^r	Promega Co

1.2.2 LB 培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10, pH7.2。

1.3 酶

所用限制酶为宝酒造产品, T4 DNA 连接酶及 Taq DNA 聚合酶为 promega 产品。

1.4 DNA 操作技术

染色体 DNA 的抽提参照文献 [9] 的方法进行, 质粒的抽提采用 SDS-NaOH 裂解法^[10], DNA 酶切片段的分离采用凝胶电泳法, 片段的回收采用 Geneclean I 试剂 (Bio 101 Inc)。质粒 DNA 酶切、连接、转化均采用分子克隆手册所载方法^[10], 并参照有关厂家说明书。

1.5 引物合成和探针的制备与标记

根据已测定的该菌株 RubisCO 大小亚基 N-末端氨基酸序列和真养产碱菌 RubisCO 大亚基靠 C-末端保守区域 DNA 序列设计并合成了引物 1, 2 和 3, 以莫拉氏菌 SP M-z 染色体 DNA 为模板通过 PCR 扩增制备了探针 A 和 B, 探针回收后采用 Boehringer Mannheim 试剂盒 (cat No. 1175033) 非放射性标记。

1.6 Southern 分子杂交及检出

杂交所用滤膜为 Boehringer Mannheim 尼龙膜, 膜上 DNA 样品的吸印, 膜的预杂交, 杂交按其说明书要求操作, 杂交的检出采用其试剂盒 (cat No. 1175041)。

1.7 菌落原位杂交

先在含有氨苄青霉素的 LB 固体平板上点种要杂交的菌落, 37°C 培养待菌落长至 2~3mm 时, 将尼龙膜 (Hybond-N) 铺在此平板上, 后移入含 Amp 的新 LB 平板上 37°C 培养 5~6h, 膜的预杂交、杂交等条件同 Southern 杂交。

2 结果与讨论

2.1 引物的合成与探针的制备、标记

设计合成的引物序列见图 1。以莫拉氏菌 M-z 染色体 DNA 为模板, 引物 1) 和 2) 为一组, 引物 1) 和 3) 为另一组, PCR 扩增制备探针结果见图 2。对不同原核生物来源的

- 1) 5'-AA (AorG) ACIGA (AorG) ATIACIGA (TorC) AA (AorG) AA
- 2) 3'-GGICT (AorG) (AorG) AICT (AorG) CT (AorG) CGIGT
- 3) 3'-GT (TorC) AA (AorG) CCICCCITGITA (AorGorT) CC

图 1 合成的引物 1, 2 和 3 的序列

Fig. 1 Synthetic oligonucleotide primers.

The sequences for prime 1) and prime 2) were determined from the N-terminal amino acid sequences of LSU and SSU of RubisCO from strain M-z. The prime 1) and prime 2) were designated LSU forward and SSU reverse, respectively. The prime 3) was determined from a conserved region 403 ~410 of LSU of RubisCO from *Alcaligenes eutrophus* and designated LSU reverse.

ISU large subunit; SSU small subunit.

RubisCO 基因研究表明: 其共同特点是编码其大小亚基的两个基因一前一后串联在染色体 DNA 同一条链上, 中间有一间隔区, 两基因共转录, 不同来源的 RubisCO 基因有同源性, 同源性的低与物种在进化中的亲缘性相关^[1]。因此我们在设计引物时, 除采用本菌株自身 RubisCO 大小亚基 N-端序列外, 还引用了真养产碱菌这一兼性自养菌的有关保守区域 DNA 序列。由图 2 所示使用引物 1 和 2 经 PCR 扩增主要产物是 1.5 kb DNA 片段 (探针 A)。按理论推测使用引物 1 和 2 扩增的区域包含 RubisCO 大亚基基因 (cbbL), cbbL 与 RubisCO 小亚基基因 (cbbS) 中间间隔区及 cbbS 起始序列, 这部分 DNA 在 1.5~1.6 kb 左右, 这与图 2 中探针 A 的大小相吻合。如菌株 M-z 的 cbbL 基因与真养产碱菌的 cbbL 基因有较高同源性的话, 使用引物 1 和 3 扩增的 DNA 应是除去终止区域的大部分 cbbL 基因, 来源于细菌 cbbL 基因大小在 1.4~1.5 kb 范围, 因此探针 B 的大小与理论推测也相符合, 这也暗示了上述二种菌的 RubisCO 基因有较高同源性。我们由此确认探针制备成功, 即探针 A 包含编码 RubisCO 大亚基 (LSU) N-末端至小亚基 (SSU) N-末端的 DNA 序列; 探针 B 内含 cbbL 基因绝大部分序列, 这为下一步获取目的基因奠定了基础。

2.2 Southern 杂交确定 RubisCO 基因的定位

将莫拉氏菌 M-z 染色体 DNA 的不同限制性核酸酶酶解产物与标记的探针 A、B 杂交, 结果见图 3 和图 4。

最初认为图 3 中 Pst I 酶解所得约 3 kb DNA 杂交带为最理想目的基因克隆片段, 但使用质粒 pUC19 克隆这一片段未获得成功。Apa I 处理后的染色体 DNA 与探针 A 杂交出现 9 kb, 5 kb 和 4 kb 的检出带, 与探针 B 杂交有 9 kb, 5 kb 的检出带, 由此推断染色体 DNA 在对应于引物 2 和 3 中间的区域中有一 Apa I 酶切点, 完整的 RubisCO 基因包含在此 9 kb DNA 片段中或分别包含在 5 kb, 4 kb 两个片段中, 根据合成探针的性质, 绝大部分 cbbL 基因可定位在 5 kb 片段上, cbbL 基因的终止区域和 cbbS 基因可定位于 4 kb DNA 片段上, 故 Rubis CO 完整基因的克隆采用分别克隆上述 9 kb, 5 kb 和 4 kb DNA 片段来进行。

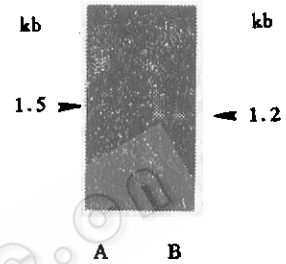


图 2 PCR 扩增制备的对应于 RubisCO 基因的 DNA 片段

Fig. 2 Amplified DNA fragments corresponding to RubisCO genes region of strain M-z by Polymerase Chain Reaction (PCR).

A: prime 1) and 2); B: prime 1) and 3)

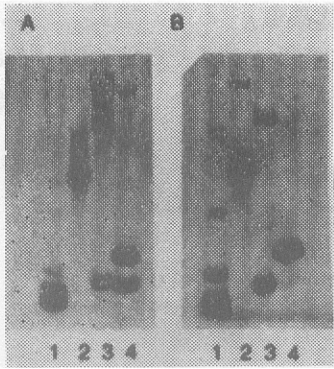


图3 菌株 M-z 染色体 DNA 的限制酶水解物与探针 A 和 B 的分子杂交

Fig. 3 Hybridization of strain M-z with probe A and probe B.

The total chromosomal DNA from strain M-z were digested with several restriction enzymes and analysed for the presence of RubisCO genes. 1. Sal I, 2. Pst I, 3. EcoR I, 4. BamH I

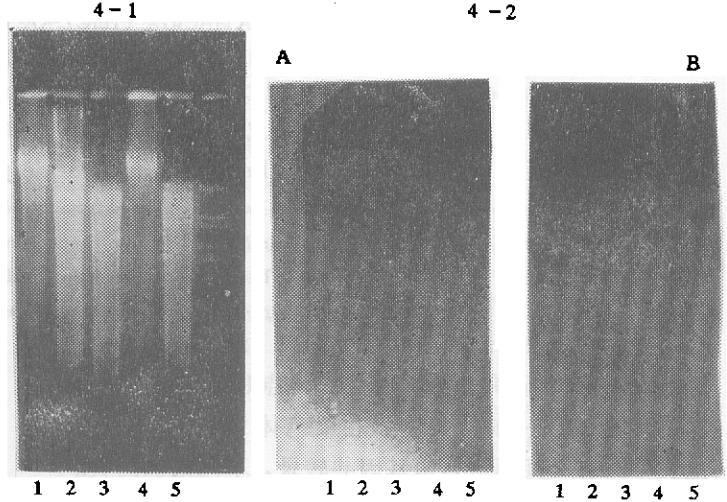


图4 菌株 M-z 染色体 DNA 的限制酶水解物电泳图 (4-1) 及其与探针 A 和 B 的分子杂交 (4-2)

Fig. 4 Electrophoretic photo of strain M-z chromosomal DNA digested with several restriction enzymes (4-1) and their hybridization with probe A and B to analysis the presence of RubisCO genes (4-2).

1. Sma I, 2. Sac I, 3. Kpn I, 4. Hind III, 5. Apa I

2.3 RubisCO 基因的克隆和亚克隆

莫拉氏菌 M-z 染色体 DNA 的 Apa I 酶解产物 9kb, 5kb 和 4kb DNA 片段从琼脂糖凝胶中用 GeneClean I 试剂盒回收后, 与质粒 Charomid 9-36 的同酶水解物连接后转化 E. coli JM109, 在 LB (Amp50µg/ml) 平板上通过原位杂交筛选抗性重组子, 从 2000 个转化子中获得二种共 9 个阳性克隆, 即在质粒 Charomid 9-36 Apa I 位点上分别插入 5kb 和 4kb 片段的重组质粒, 将它们命名为 pCL5 和 pCS4。质粒 Charomid 9-36 分子量为 36kb, 拷贝数低, 为下一步工作方便, 含 RubisCO 基因的 5kb, 4kb DNA 片段分别被亚克隆至质粒 pUC118 和 pBluescript KS⁺上构成质粒 pPCL511 和 pBS4。

2.4 重组质粒 pPCL511 和 pBS4 外源插入序列的酶切图谱分析

以质粒 pUC118 和 pBluescript KS⁺多克隆酶切位点为参照, 采用单酶切或双酶切, 最后定出外源插入目的片段的酶切图谱 (图 5)。

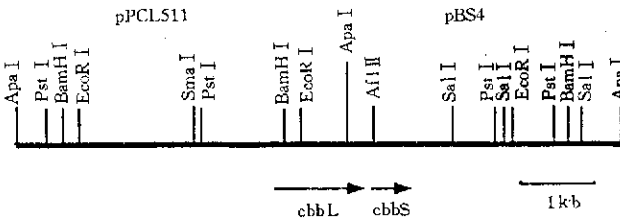


图5 重组质粒 pPCL511 和 pBS4 外源插入目的片段的酶切图谱
Fig. 5 Restrictive endonuclease enzyme map of inserted target DNA fragments of pPCL 511 and pBS4

质粒 pUC118 和 pBluescript KS⁺都是可直接用于 DNA 序列分析的载体, 我们对 pPCL511 和 pBS4 中的外源插入 5kb 或 4kb DNA 片段从双向进行了序列分析, 发现质粒 pBS4 Apa I -

Afl II 一侧, 质粒 pPCL511 Apa I -EcoR I 一侧与真养产碱菌 RubisCO 基因的相应区域有较高同源性 (结果未在此列出)。因此含有莫拉氏菌 M-z RubisCO 基因的 5kb, 4kb DNA 片段以图 5 的方式连接起来。它们酶切图谱的构建为进一步深入研究 RubisCO 基因及其整个 cbb 基因簇提供了有益的信息。

本实验表明, 在已知某一酶蛋白的部分氨基酸序列后, 反推设计出引物, 或借鉴已知相同基因保守序列合成引物, 制备探针, 采用 Southern 杂交调动的基因是一有效手段。克隆的目的基因通过正在进行的 DNA 序列分析将得到更有力的证实。

参 考 文 献

- [1] Miziorko H M, Lorimer G H. *Ann Rev Biochem.*, 1983, **52**: 507~535.
- [2] Yaguchi T, Chung S Y, Igarashi Y *et al.* *J Ferment Bioeng*, 1993, **75**: 1~8.
- [3] Anderson K, Melinda W D. *J Bacteriol.* 1987, **169**: 1997~2004.
- [4] Gibson J, Tabita FR. *J Bacteriol.* 1993, **175**: 5778~5784.
- [5] Kusano T, Sugawara K. *J Bacteriol.* 1993, **175**: 1019~1025.
- [6] Windhovel U, Bowien B. *Mol Microbiol.* 1991, **5**: 2695~2705.
- [7] Zhao X X, Hayashi N R, Igarashi Y *et al.* Annual Report of ICBiotech Osaka University, Japan 1994. Vol 17.
- [8] Kato B. Master Dissertation of Tokyo University. 1992.
- [9] Ausual F M. *Current Protocols in Molecular biology*, 1991.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2ed 1989.
- [11] Anderson K, Caron J. *J Bacteriol.* 1987, **169**: 4547~4558.

Ribulose-1, 5-bisphosphate Carboxylase/oxygenase Genes Cloning of an Alkalophilic C-1 Compound

Assimilating *Moraxella* sp. M-z

Zhao Xiaoxian

(Department of microbiology, Shandong University, Jinan 250100)

B. Kato Y, Igarashi, T. Kodama

(The University of Tokyo, Japan)

Abstract *Moraxella* sp. M-z is an alkalophilic C-1 compound assimilating bacterium. For isolating its RubisCO genes, two primes were synthesized according to the N-terminal amino acids sequences of LSU and SSU of its RubisCO, the third prime was determined from the conservative region of RubisCO's LSU gene of *Alcaligenes eutrophus*. Two probes corresponding to the LSU gene and LSU gene with the initial part of SSU gene of Rubis CO were prepared via PCR. Southern hybridization showed the total RubisCO genes were harboured in two DNA fragments (5kb and 4kb) derived from the chromosomal DNA of strain M-z with Apa I digestion. The 5kb DNA segment which believed to bear the LSU gene of RubisCO and its upstream genes and the 4kb DNA segment encoding the SSU gene of RubisCO and its downstream genes were cloned into plasmid pUC118 and pBluescript II KS+, respectively, to yield plasmids pPCL511 and pBS4. Restriction endonuclease map of the cloned target fragments were constructed using pPCL511 and pBS4. It is the first report of cloning the RubisCO genes from an alkalophilic C-1 compound assimilating bacterium.

Key words RubisCO, gene cloning, alkalophilic bacterium