

真菌一氧化氮还原酶细胞色素 P-450nor 2 cDNA 序列的测定

刘德立

(华中师范大学生命科学学院 武汉 430070)

Hirofumi SHOUN

(筑波大学应用生物化学系 日本)

在真菌的反硝化作用中,一种细胞色素 P-450 起着一氧化氮还原酶的作用,被称为细胞色素 P-450nor^[1]。最近的研究发现:真菌细胞色素 P-450nor 有三种类型。除了镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)P-450nor(即 F.P-450nor)外,还有两种存在于柱孢菌(*Cylindrocarpus tonkinense*),即 C.P-450nor1 和 2^[2]。F.P-450nor 和 C.P-450nor1 能以 NADH 为直接的电子供体,使 NO 还原生成 N₂O。C.P-450nor2 不仅能直接利用 NADH,而且能直接利用 NADPH,还原 NO 生成 N₂O。F.P-450nor 基因已被克隆和测序^[3~4]。本文测定了 C.P-450nor2 的 cDNA 编码区全序列,3'非编码区部分序列和 5'引导序列。

1 材料与方法

1.1 材料

含 P-450nor2 cDNA 序列的重组质粒 pCTnor2 是将 P-450nor2 cDNA 序列插入到 pBluescript II 的多克隆位点处构建而成。*E. coli* Y1090、HB101、pUC19 及 pBluescript II 均为本室收集和保存。BcaBEST™ 双脱氧序列分析试剂盒购于 TakaRa Co., 限制酶、T4DNA 连接酶、Klenow 大片段、核酸外切酶 Exo. III 等购于 TakaRa Co. 和 Toyobo Co.。Mung Bean 核酸酶来自 Nippon Gene Co.。[α -³²P]dCTP(>3 000Ci/mmol)为 Amersham Co. 产品。

1.2 方法

将 P-450nor2 cDNA 克隆到 pBluescript II 中,构建重组质粒 pCTnor2。提取质粒 DNA,按 Steven 和 Celeste 的方法^[5~6]系列缺失后,用双脱氧末端终止法^[7]分别测序。重叠法拼接全序列。反向测序是将 pCTnor2 的插入片段亚克隆到 pUC19 的多克隆位点中,用系列缺失法和双脱氧终止法测序后,拼接而成。质粒 DNA 的制备、酶切、连接和转化等主要参照分子克隆手册^[8]或有关厂家提供的说明。

2 结果与讨论

2.1 含细胞色素 P-450nor2 cDNA 的重组质粒 pCTnor2 的构建和鉴定

从柱孢菌(*C. tonkinense*)cDNA 文库中,经抗体筛选出含细胞色素 P-450nor2 cDNA 的阳性克隆(P-450nor2 cDNA 的抗体筛选和表达另文发表)。其中 4 个阳性克隆带有不同长度的 cDNA 片段(即 pCTnor2-1, 2, 9 和 11)。回收插入片段,分别克隆到 pBluescript II 的 EcoR I 切点处,构建重组质粒 pCTnor2。限制酶酶切插入片段,绘制限制酶酶谱。按 BcaBEST™ 双脱氧序列分析试剂盒提供的正向及反向公用引物分别测定了插入片段的 3'和 5'端区核苷酸序列。结果表明:pCTnor2-1 插入片段最长,约 1.3kb。3'端有 poly(A)⁺ 结构,5'端区编码的多肽序列与纯化的 C.P-450nor2 N 末端区氨基酸序列分析结果一致。但 5'端缺少起始密码 ATG。因此,选用 Rsa I 酶切 pCTnor2-1 后,制备约 600bp 的 5'端 DNA 探针。再次筛选 cDNA 文库,获得了带有 1.6kb 插入片段的阳性克隆。回收插入片段,克隆到

本文于 1995 年 7 月 27 日收到。

pBluescript II 中,构建重组质粒 pCTnor2-12。pCTnor2-1 和 pCTnor2-12 作全序列分析。

2.2 P-450nor2 cDNA 全序列测定

细胞色素 P-450nor2 cDNA 5'→3'全序列测定是用 Apa I /Hind III 双酶切重组质粒 pCTnor2-1 和 12,经外切酶 Exo. III 和 Mung Bean 核酸酶系列缺失后,用 Klenow 酶修补,自身连接并转化。挑选不同长度的 cDNA 片段,逐一测序。用重叠法拼接而成全序列。

P-450nor2 cDNA 反向测序是用 Xba I /Hind III 双酶切 pCTnor2-1,再克隆到 pUC19 中,构建 pUC19-P450nor 质粒。经 Xba I /Kpn I 酶切后,用外切酶 Exo. III 和 Mung Bean 核酸酶系列缺失。然后选不同长度的 cDNA 片段分别测序,最后重叠拼接而成。序列分析结果表明:pCTnor2-1 含有 1300bp 的插入片段。有终止密码 TAG 和 Poly(A)⁺尾巴,但缺少起始密码 ATG。从 5'端到 Poly(A)⁺为止的 1300bp 与 pCTnor2-12 中 4~1303bp 的序列完全相同。pCTnor2-12 的插入片段长 1 623bp,有起始密码、终止密

—320 TTTGG CTCGTA CTC CAA GCC	
AGT TAC CTG GCC GTCTGG ACCAACGCATGA GCC CAG ACC AGG CAGAGAAC CCG GCATAG	
ACGCCA ATCTCGAGGACT CTCTTG CGCCOA TGGACT TTG CAA GGA AGATGTTGA ATTGAG	
ATTGGA AGCCGG AGCTCA GAT ACT CTGAAT CAT CACGGGTGGAGGAGATGTGGGTGTGGT	
AGT CGCTGATGT ACTTGGGCA ACGGCGTCAAT GCT GCT CGGAATATGTGAGACCTTGG	
CGCCAA GTTGCGGTGGTAT ACA GCCGGGTAGCGT TGT CGA CGT ATCAGATAAACAAC	
ATGCAC OCT ACCGAA GACGAGACCC ACC ACCATC CCC CGA TTC CCC TTTCAGCGGCT TCG	60
M H A T E D E T T I P R F F Q R A S	
GCA TTTGAA CCC CT GCA GAGTTT GCT CGC CTC CGG GCCAATGAA CCA ATCTCCCAA GTG	120
A F E P P A E F A R L R A N E P I S Q V	
GAACTCTTTGATGGGAGCTTGCGCTGGCTGGTCAAA CAT GAGGATGTA TGCAGGGTA	180
E L F D S L A W L V V K H E D V C R V	
GCT ACGGATGAGAGACTC TCCAAGGAGAGAACTAGA CTT GGC TTC CCC GAGCTGAGT GCC	240
A T D E R L S K E R T R L G F P E L S A	
GGTGGTAAGGCT GCA GCCAAGAATAAG CCC ACGTTT GTT GACATGGAT GCT CCC GCA CAC	300
G G K A A A K N K P T F V D M D A P A H	
ATGAACCAGAGAAGCATGGTGAA CCT TTC TTC ACC GAGGAT CAC GTGGAAAATTTAAGA	360
M N Q R S M V E P F F T E D H V E A A L R	
CCT TATATCAAGAGACT GTTCAA GGT CTT TTGAAT GATATG GTG GCCA ACGGAT GCGGAG	420
P Y I K E T V Q G L L N D M V A N G C E	
GAG CCC GTCGACTG ATCGAGAA GTTT GCC CTT CCT GTT CCGTCT TACATCATCTACACT	480
E P V D L I E K F A L P V P S Y I I Y T	
ATCTTTGGGAGTT CCG TTT GAGGACCTTGAATAC TTGACTGAOCAGAAT GCCATCCGACG	540
I L G V P F F E D L E Y L T E Q N A I R S	
AACGGC AGCGGACT GCT CAAGAA GCGGCG GCC GCC AACCAGCAG CTG CTC AAGTAC CTC	600
N G S G T A Q E A A A A N Q Q L L K Y L	
GCAAAGCTA GTT GACCAA CGC CTC CAAGAG CCC AAGGACGAC CTC ATCGGC CGC CTA GTG	660
A K L V D Q R L Q E P K D D L I O R L V	
GACCAGCAA CTC GTG CCC GGG CAC ATCGAAAAGTCC GAC GCC GTG CAGATC GCC TTC CTG	720
D Q Q L V P G H I E K S D A V Q I A F L	
CTG CTT GTGGCG GGT AAT GCC ACCATGTCAACATGATT GCT CTG GCGGTC GTC ACG CTG	780
L L V A G C N A T M V N M I A L G V V T L	
ATGCAGAAC CCC AGCCAA CTCAGGAGCTGAAA GCC GAC CCG ACC CTT GTC CCT GGC TTT	840
M Q N P S Q L E E L K A D P T L V P G F	
GTGGAGGA CTA TGC CGC TACCAC ACCGGT TCC TCC ATG GCC ATGAAGAGAGTG GCC AAG	900
V E R L C R Y H T G S S M A M K R V A K	
GAAAGATATGGAG CTC CGT GGA AAA CTCATA CGG GCT GGAGAGGGT ATCATT GCC TCT AAT	960
E D M E L G G K L I R A G E G I I A S N	
CAG TCC GCCAAT CGG GACGAGGAC GTG TTC CCC AAC CCC GAC GTG TGCACATC CAC CGT	1020
Q S A N R D E D V F P N P D V F D M H R	
GAT TTCGAC TCC CGC GAT GGG CTC GGG TTT GGA TTC GGC CCA CAC CGT TGC ATC GCA GAG	1080
D F D S R D G L G F G F G P H R C I A E	
TTG CTT GCCAAA GCCGAGCTA GAGATCGTT TTCGAA ACC TTG TTC GCT ACC CTA CCG GAC	1140
L L A K A A G E L E I V F E T L F A T L P D	
TTGAGAGTGTG CAC CCT CTT GATGAGATT GAGTGC ACG CCGAGACACAAGGAT GTC GGC	1200
L R V S I P L D E I E C T P R H K D V G	
ATCGTGAGACTA CCC GTC AAA TGGTAGATGGAT GACAGATGGCGG CCG TTGGAC ACC CAC	1260
I V R L P V K W *	
AAGGCT AAT CTC CCG TGC CGG CAAAAA AAAAAAAAAAAAAA	1303

图1 P-450nor2 cDNA 序列及编码的氨基酸序列

码、Poly(A)⁺ 尾巴和 5' 引导序列(图 1)。cDNA 编码区长 1303bp, 可转译 408 个氨基酸残基肽链。编码蛋白分子量为 45 381。从柱孢菌(*C. tonkinense*)分离纯化 C. P-450nor2N 末端区的 20 个氨基酸残基序列为: MHATEDETTTIPRFPQRAS^[2]。与 cDNA 转译的多肽序列完全一致(图 1 中横线所示)。细胞色素 P-450nor2 cDNA 的 3' 端没有典型的加尾信号, 在终止密码后 55 个碱基处直接加尾。而在 F. P-450nor 基因中, 在终止密码后 55 个碱基处是 AATAAA 加尾信号^[4]。其原因还不清楚。待 P-450nor2 基因结构搞清之后有可能得到合理地解释。总之, 细胞色素 P-450nor2 cDNA 序列的阐明, 为深入研究 P-450nor2 的作用机理, 探讨其结构与功能的关系创造了条件。

致谢: 本文是作者在日本筑波大学留学期间研究工作的一部分。曾得到 Dr. Tomura 的热情帮助, 在此深表谢意!

参 考 文 献

- [1] Nakahara K, Tanimoto T, Hatano K, *et al.* J Biol Chem, 1993, 268: 8350~8355.
- [2] Usuda K, Toritsuka N, Matsuo Y *et al.* Appl and Envir Microbiol, 1995, 61: 883~889.
- [3] Kizawa H, Tomura D, Oda M *et al.* J Biol Chem, 1991, 266: 10632~10637.
- [4] Tomura D, Obika K, Fukamizu A *et al.* J Biochem., 1994, 116: 88~94.
- [5] Steven H. Gene, 1984, 28: 351~359.
- [6] Celeste Y P, Jeffrey V, Joachim M. Gene, 1985, 33: 103~119.
- [7] Sanger F, Nickle S, Coulson A R. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977, 74: 5463~5467.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, and Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, (2nd), Cold Spring Harbor Press, New York, 1989.

Nucleotide Sequence of the Cytochrome P-450nor2 cDNA from *Cylindrocarpum tonkinense*

Liu Deli

(College of Life Sciences, Huazhong Normal University, Wuhan 430070)

Hirofumi SHOUN

(Department of Applied Biochemistry, University of Tsukuba, Ibaraki 305, Japan)

Abstract The positive clones contained the Cytochrome P-450nor2 cDNA were screened with the antibody from the cDNA library of *Cylindrocarpum tonkinense*. The inserts were deleted by exonuclease III, and sequenced by the dideoxy method. The full-length sequence of the Cytochrome P-450nor2 cDNA was determined, which encoded a polypeptide of 408 amino acid residues (Mr = 45 381). The N-terminal region of amino acid sequence of the purified fungal C. P-450nor2 was consistent with that of the amino acid sequence reduced from P-450nor2 cDNA.

Key words Cytochrome P-450nor2, cDNA, DNA sequence