

耐辐射奇球菌类胡萝卜素 C3',4'-脱氢酶底物特异性

孙宗涛^{1,2}, 田兵¹, 沈绍传¹, 华跃进¹

1 浙江大学原子核农业科学研究所, 杭州 310029

2 浙江省农业科学院病毒学与生物技术所, 杭州 310021

摘要: 为了鉴定耐辐射奇球菌类胡萝卜素 C3',4'-脱氢酶 (DR2250) 催化底物的特异性, 利用 PCR 方法将 *dr2250* 基因的克隆到载体 pUC19 上, 形成了重组载体 pUC-CRTD。利用质粒共转化方法将不同组合的质粒 pACCRT-EBI_{Eu}、pRK-CRTC 和 pUC-CRTD 转化到大肠杆菌中, 筛选阳性克隆并提取其色素进行产物分析。结果表明, DR2250 修饰的底物具有选择性, 它不能以未经过羟基化修饰的直链类胡萝卜素为底物, 而能在 C1(1') 羟基修饰的羟基化类胡萝卜素的基础上进行 C3',4'-脱氢反应。

关键词: 耐辐射奇球菌, 类胡萝卜素, C3',4'-脱氢酶, 底物特异性

Substrate specificity of carotenoid 3',4'-desaturase from *Deinococcus radiodurans*

Zongtao Sun^{1,2}, Bing Tian¹, Shaochuan Shen¹, and Yuejin Hua¹

1 Institute of Nuclear-Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

2 Department of Virology and Biotechnology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China

Abstract: To examine the substrate specificity of carotenoid 3',4'-desaturase (DR2250) from *Deinococcus radiodurans*, we amplified the *dr2250* gene by using PCR methods. The PCR products were digested by *Hind* III-*Bam*HI and ligated into the vector pUC19, yielding recombinant vector pUC-CRTD. We analyzed the carotenoids of *E. coli* transformants containing pACCRT-EBI_{Eu} and (or) pRK-CRTC and (or) pUC-CRTD. Our results demonstrated that DR2250 had substrate specificity on the carotenoids with hydroxyl group at C1 (1').

Keywords: *Deinococcus radiodurans*, carotenoid, C3',4'-desaturase, substrate specificity

耐辐射奇球菌 *Deinococcus radiodurans* (DR) 是一种红色的、非流动性、不产生孢子的球形细菌。该细菌以对电离辐射、UV 辐射、干燥等各种 DNA

损伤试剂具有超强的抗性而著称, 它能在几个小时内准确地修复由辐射产生的几十个双链 DNA 碎片^[1]。研究报道称, 电离辐射产生约 80% 的 DNA 损

Received: June 2, 2010; **Accepted:** September 10, 2010

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2007CB707804), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA021305), National Natural Science Foundation of China (Nos. 30830006, 30670026, 30870035), Project 'Application of Nuclear Techniques in Agriculture' from the Chinese Ministry of Agriculture (No. 200803034).

Corresponding author: Yuejin Hua. Tel/Fax: +86-571-86971703; E-mail: yjhua@zju.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2007CB707804), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2007AA021305), 国家自然科学基金项目 (Nos. 30830006, 30670026, 30870035), 农业部核技术农业应用项目 (No. 200803034) 资助。

伤由辐射水解产生的活性氧自由基 (Reactive oxygen species, ROS) 攻击 DNA 造成的^[2], 负责清除自由基的抗氧化系统对 DR 菌的抗性有着重要的贡献。

类胡萝卜素 Deinoxanthin 作为 DR 菌非酶类抗氧化系统中的一种特殊天然化合物, 能有效地清除过氧化氢 (H_2O_2), 猝灭单线态氧 (1O_2) 等活性氧自由基, 我们实验室的研究证明这种特殊结构的类胡萝卜素比其他类胡萝卜素有更高的自由基清除能力^[3]。这种高效的自由基清除能力主要归功于 deinoxanthin 中存在着的多种活性基团如 C3',4'-双键、C1'-羟基、C4-酮基^[4]。我们通过分子生物学方法对参与 deinoxanthin 生物合成途径的合成酶进行了系统的研究, 鉴定了八氢番茄红素合成酶 (CrtB, DR0862)^[3]、八氢番茄红素脱氢酶 (CrtI, DR0861)^[5]、C3',4'-脱氢酶 (CrtD, DR2250)^[6]、C1',2'-水合酶 (CruF, DR0091)^[7] 和 C4-酮基化酶 (CrtO, DR0093)^[8]。通过对上述这些合成酶的突变体分析以及色素产物抗氧化能力实验, 我们得知这些活性基团对 DR 菌的辐射抗性有着重要的贡献。这些活性基团合成酶中, C3',4'-脱氢酶 (CrtD) 负责催化在类胡萝卜素的 C-3(3'), 4(4)上脱氢形成不饱和键。在 DR 菌中, 我们通过构建 DR2250 突变体研究得知其编码 C3',4'-脱氢酶, 然而 DR2250 所编码蛋白的催化功能的底物特异性却还不清楚, 以下将围绕着 DR2250 的底物选择性展开研究。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒、试剂和主要仪器

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 和耐辐射奇球菌 *D. radiodurans* R1 为本实验室保存。质粒 pACCRT-EBI_{Eu} (德国 Goethe 大学 Sandmann 教授提供)、pRK-CRTC 为实验室保存。质粒 pUC19、pMD18 均购自 TaKaRa 公司。氨苄青霉素、氯霉素、四环素购自上海生物工程公司, 引物合成由上海生物工程公司完成, HPLC 级乙腈、甲醇、异丙醇等有机溶剂购自美国 Tedia 公司, PCR 纯化和胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司, 基因组提取试剂盒和质

粒抽提试剂盒购自百泰克公司, DNA 测序反应均委托上海英骏公司完成。实验仪器包括: Waters 2695 Alliance 高效液相色谱仪 (HPLC)、PCR 扩增仪、凝胶成像系统 Model-3000 (美国 Bio-Rad 公司) 等。

1.2 基因克隆与重组载体构建

耐辐射奇球菌在 30℃ 用 TGY 液体培养基 (5 g/L 胰蛋白胨, 3 g/L 酵母提取物, 1 g/L 葡萄糖) 培养过夜, 利用基因组提取试剂盒进行基因组的提取。设计引物: P1: 5'-CgGTaagcttGATGATACTGCTCCC GCTACACTGC-3' (下划线部分为 *Hind* III 位点), P2: 5'-CAGCggatccCGGTCCGCCATAAGAATCAA G-3' (下划线部分为 *Bam*H I 位点), 以野生型 R1 基因组作为模板, 进行 PCR 扩增, 获得 PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳的方法进行纯化, 纯化片段再经 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切后电泳割胶回收; 回收纯化片段并连接到同样双酶切的 pUC19 质粒, 将连接产物转化大肠杆菌并最终获得重组质粒 pUC-CRTD。重组表达质粒经过测序验证, 确定没有任何碱基发生突变和移码。

1.3 不同重组转化体的获得

不同组合的质粒 pACCRT-EBI_{Eu}、pRK-CRTC 和 pUC-CRTD 利用常规 $CaCl_2$ 转化方法分别转化大肠杆菌, 在 LB 抗性平板进行筛选, 挑取阳性克隆并进行质粒酶切鉴定。

1.4 菌体合成色素产物的鉴定

将上述获得的重组大肠杆菌菌株转入 100 mL LB 培养基培养, 37℃ 培养至 $OD_{600} \approx 0.5$, 加 IPTG (0.5 mmol/L) 诱导, 250 r/min 继续培养 24 h, 6 000 r/min 离心 10 min 收集细胞, 使用缓冲液清洗 2 次后, 使用丙酮/甲醇溶液 (7:2, V/V) 提取菌体色素。

通过 HPLC 方法对大肠杆菌合成的色素进行分析, 色谱分析条件如下: Waters Alliance 2695 高效液相色谱系统, Hypersil ODS-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m), Waters-Millennium 32 色谱工作站, Waters 996 光电二极管检测仪检测波长 200~800 nm, 流动相使用乙腈-甲醇-异丙醇 (40:50:10, V/V/V), 流速 1 mL/min, 柱温 35℃, 进样体积 20 μ L。

2 结果

2.1 *crtD* 基因的克隆与载体 pUC-CRTD 的构建

以耐辐射奇球菌 R1 菌株基因组为模板, 通过体外 PCR 扩增的方法获得 DR2250 全基因产物, 电泳结果显示 PCR 产物与理论值相同, 大小为 1 476 bp (图 1)。经过 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切后的 PCR 产物和同样双酶切过的载体 pUC19 在 T4 DNA 连接酶的作用下形成重组载体 pUC-CRTD。经过酶切电泳验证 (图 1) 和测序, 重组载体 pUC-CRTD 构建正确。

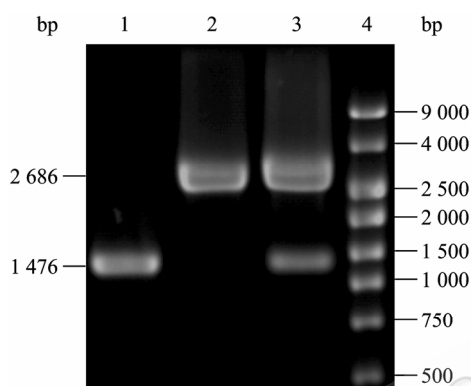


图 1 *crtD* 基因和重组载体 pUC-CRTD 的酶切电泳鉴定图

Fig. 1 PCR product of the *crtD* gene and confirmation of recombinant plasmid pUC-CRTD. 1: PCR product of the *crtD* gene; 2: pUC19 vector digested by *Hind* III and *Bam*H I; 3: the recombinant vector pUC-CRTD digested by *Hind* III and *Bam*H I; 4: marker.

2.2 *CrtD* 蛋白功能分析

为了验证 DR2250 蛋白的功能和底物特异性, 我们利用质粒共转化的方法来检验其功能。质粒 pACCRT-EBI_{Eu} 在大肠杆菌中能产生番茄红素, 而质粒 pRK-CRTC 则能在番茄红素的基础上通过水合反应产生羟基化的番茄红素^[9]。首先构建了能表达 DR2250 的克隆载体 pUC-CRTD, 然后利用常规 CaCl₂ 转化方法分别转化上述不同组合的质粒混合物, 得到的克隆经过鉴定后, 提取类胡萝卜素进行液相色谱分析。

HPLC 分析结果如图 2 所示, 只含有质粒 pACCRT-EBI_{Eu} 的大肠杆菌中产生番茄红素 (图 2, 峰 6)。当共转化质粒 pACCRT-EBI_{Eu} 和 pUC-CRTD

时大肠杆菌也只产生一种类胡萝卜素 (峰 6), 其保留时间和吸收光谱与番茄红素相同 (图 3), 这表明当 DR2250 表达在产生番茄红素的大肠杆菌中不能使其发生脱氢反应, 因此, DR2250 并不能以番茄红素为底物。当共转化质粒 pACCRT-EBI_{Eu} 和 pRK-CRTC 到大肠杆菌后产生 3 种类胡萝卜素, 根据它们的保留时间、吸收光谱 (图 3) 以及对照以前的文献^[10-11], 这 3 个产物分别为 1,1'-二羟基-番茄红素 (图 2, 峰 3)、1-羟基-番茄红素 (图 2, 峰 5) 和番

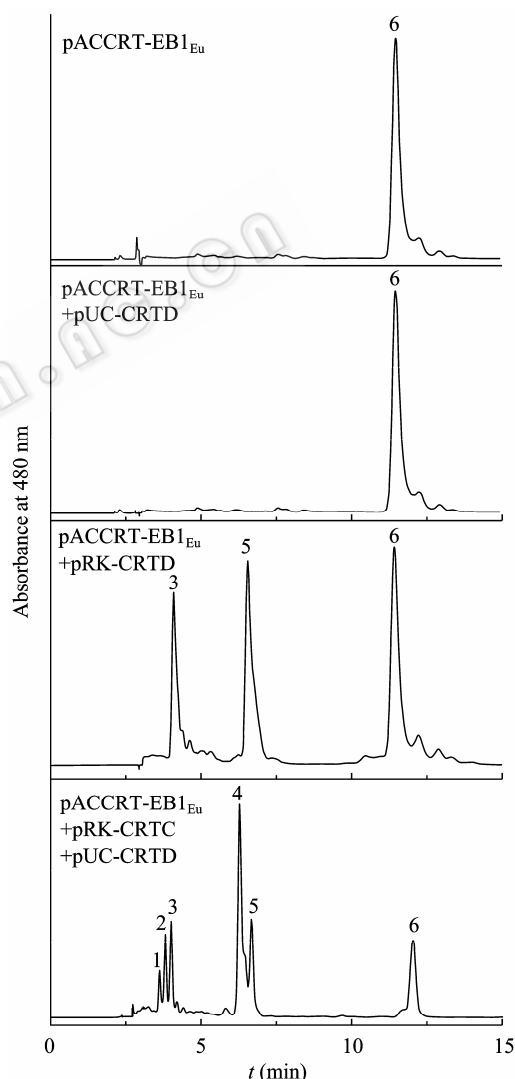


图 2 DR2250 蛋白功能分析

Fig. 2 HPLC analysis of carotenoids in lycopene-producing *E. coli* transformants containing the plasmids pACCRT-EBI_{Eu}; pACCRT-EBI_{Eu} and pUC-CRTD; pACCRT-EBI_{Eu} and pRK-CRTC; pACCRT-EBI_{Eu}, pRK-CRTC and pUC-CRTD. Peak 1: 1,1'-(OH)₂-3,3',4,4'-tetrahydrolycopene; peak 2: 1,1'-(OH)₂-3,4,-didehydrolycopene; peak 3: 1,1'-(OH)₂-lycopene; peak 4: 1-OH-3,4,-didehydrolycopene; peak 5: 1-OH-lycopene; peak 6: lycopene.

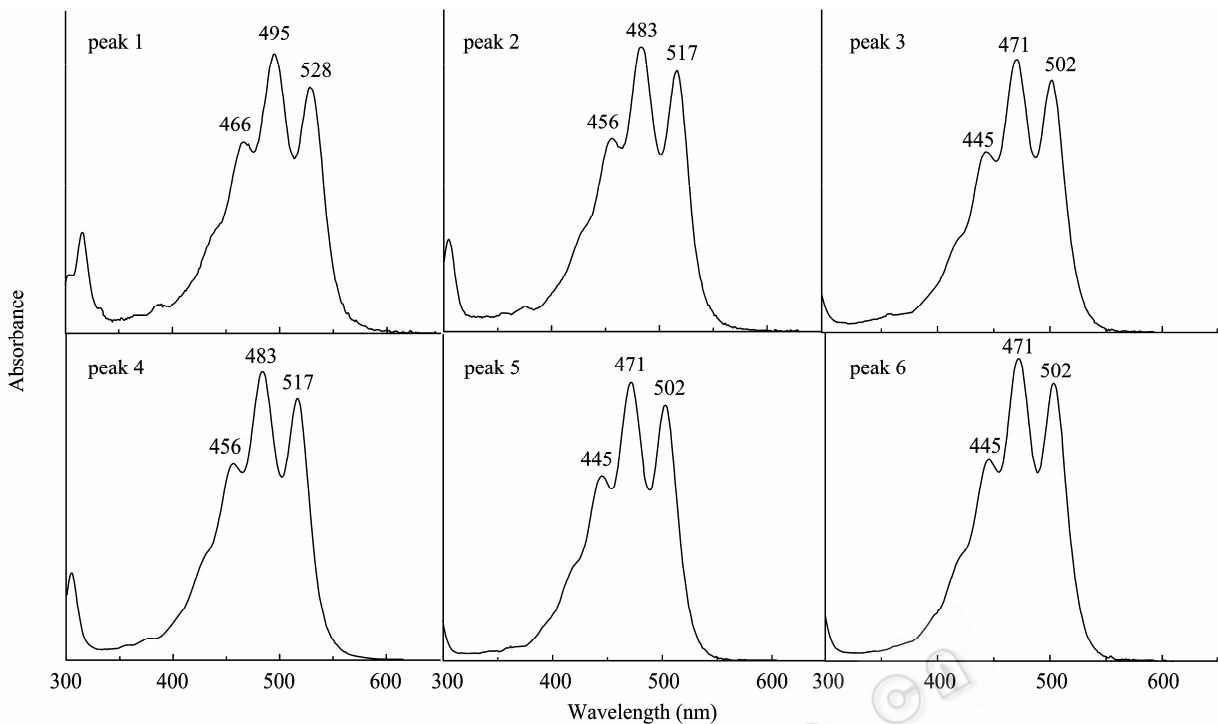


图3 峰1~6的紫外可见吸收光谱图

Fig. 3 UV-vis spectrum for peak 1-6 in *E. coli* transformants.

茄红素(图2,峰6)。当共转化质粒 pACCRT-EBI_{Eu}、pRK-CRTC 和 pUC-CRTD 时,类胡萝卜素组成发生了明显的变化(图2),产生了3个新的产物峰1、峰2、峰4。峰4(λ_{\max} =456, 483, 517 nm)与峰5(λ_{\max} =445, 471, 502 nm)相比发生了红移约10 nm(图3)。

类胡萝卜素碳骨架上规律性排列的共轭双键系统使得类胡萝卜素在可见光区以及在紫外区具有特征吸收峰,而类胡萝卜素的吸收光谱与共轭双键的数目有关,并呈现一定的规律性^[9]:类胡萝卜素的最大吸收光值(λ_{\max})与共轭双键数目有关, λ_{\max} 随着共轭双键数目的增加而增大。按照此理论,每增加一个共轭双键, λ_{\max} 值就会向长波方向移动10 nm^[12]。羟基、甲氧基、含氧的非共轭基团不会影响 λ_{\max} 值。对于无环化的类胡萝卜素如番茄红素,它的共轭系统是以接近平面的构型存在的,所以它的吸收光谱图是尖的精细的三指状吸收峰。因此,UV-Vis λ_{\max} 值、光谱的形状都可以作为鉴定类胡萝卜素化学结构(尤其是共轭双键结构)的一种重要依据。这意味着峰4比峰5多一个共轭双键。我们以前的实验结果表明 DR2250 编码类胡萝卜素 C3,4-脱氢酶^[6],因

此,可以判断峰4产物是在峰5产物的C-3,4位置上脱氢得到的,其结构为1-羟基-3,4-双脱氢-番茄红素。同样的比较峰2与峰3的吸收光谱,峰2(λ_{\max} =456, 483, 517 nm)比峰3(λ_{\max} =445, 471, 502 nm)发生了红移约10 nm,同样意味着峰2产物比峰3产物多一个共轭双键数目,峰2产物是在峰3产物的C-3,4位置脱氢得到的,其结构为1,1'-二羟基-3,4-双脱氢-番茄红素。观察峰1的吸收光谱图,它(λ_{\max} =466, 495, 528 nm)比峰2和峰3分别大了10多纳米和20多纳米,意味着峰1产物有着比峰2产物更多的共轭双键数目,它是在峰2产物的C-3,4位置上再进一步脱氢产生的,其结构为1,1'-二羟基-3,3',4,4'-四脱氢-番茄红素。

根据以上实验结果,我们可以看出,DR2250不能直接以未经过羟基化修饰的番茄红素为底物,而能在C1(1')羟基修饰的羟基化类胡萝卜素基础上催化发生脱氢反应。

3 讨论

Deinoxanthin 作为耐辐射奇球菌中主要的类胡萝卜素,其高效的清除自由基的能力已经得到验证,

但其体内的合成途径却没有完全阐明。我们以前的研究表明 DR2250 蛋白参与了 deinoxanthin 的生物合成, 负责催化 C3',4'-脱氢反应, 但其催化的底物特异性却没有足够实验证实。本文利用质粒共转化实验揭示了 CrtD 的催化底物是具有选择性的, 它不能识别 C1(1')位没有羟基修饰的类胡萝卜素, 而能在 C1(1')位存在羟基基团的基础上进行脱氢反应。由此也可以验证 DR2250 所催化的脱氢反应在耐辐射奇球菌 deinoxanthin 生物合成途径中是在 C1 位羟基化以后发生的。对 DR2250 蛋白底物特异性的研究有助于我们深入了解 deinoxanthin 生物合成途径中的反应步骤, 同时这一特性将对构建工程菌株合成具有高效自由基清除能力的类胡萝卜素具有重要意义。

REFERENCES

- [1] Battista JR. Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. *Annu Rev Microbiol*, 1997, **51**: 203–224.
- [2] Hutchinson F. Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1985, **32**: 115–154.
- [3] Tian B, Xu Z, Sun Z, *et al.* Evaluation of the antioxidant effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* through targeted mutagenesis, chemiluminescence, and DNA damage analyses. *Biochim Biophys Acta*, 2007, **1770**(6): 902–911.
- [4] Lemeë L, Peuchant E, Clerc M, *et al.* Deinoxanthin: a new carotenoid isolated from *Deinococcus radiodurans*. *Tetrahedron*, 1997, **53**(3): 919–926.
- [5] Xu Z, Tian B, Sun Z, *et al.* Identification and functional analysis of a phytoene desaturase gene from the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology*, 2007, **153**(5): 1642–1652.
- [6] Tian B, Sun Z, Xu Z, *et al.* Carotenoid 3',4'-desaturase is involved in carotenoid biosynthesis in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology*, 2008, **154**(12): 3697–3706.
- [7] Sun Z, Shen S, Wang C, *et al.* A novel carotenoid 1,2-hydratase (CruF) from two species of the non-photosynthetic bacterium *Deinococcus*. *Microbiology*, 2009, **155**(8): 2775–2783.
- [8] Sun Z, Shen S, Tian B, *et al.* Functional analysis of gamma-carotene ketolase involved in the carotenoid biosynthesis of *Deinococcus radiodurans*. *FEMS Microbiol Lett*, 2009, **301**(1): 21–27.
- [9] Albrecht M, Takaichi S, Misawa N, *et al.* Synthesis of atypical cyclic and acyclic hydroxy carotenoids in *Escherichia coli* transformants. *J Biotechnol*, 1997, **58**(3): 177–185.
- [10] Takaichi S. Characterization of carotenes in a combination of a C18 HPLC column with isocratic elution and absorption spectra with a photodiode-array detector. *Photosynth Res*, 2000, **65**(1): 93–99.
- [11] Saito T, Ohyama Y, Ide H, *et al.* A carotenoid pigment of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Microbios*, 1998, **95**(381): 79–90.
- [12] Takaichi S, Shimada K. Characterization of carotenoids in photosynthetic bacteria. *Methods Enzymol*, 1992, **213**: 374–385.