

一株南极嗜冷杆菌产丙酮酸脱氢酶的性质研究及基因克隆

张 锋¹ 黄硕芬² 张金伟³

(1 漳州教育学院 福建 漳州 363000; 2 福建师范大学生命科学学院 福州 350007)

3 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 福建 厦门 361005)

摘要:从南极普利兹湾深海沉积物中筛选到一株嗜冷杆菌 7195,其 16S rDNA 序列分析表明该菌株属于嗜冷杆菌属 (*Psychrobacter*),从该菌的全基因组 DNA 中克隆到编码丙酮酸脱氢酶系 E1 (PDHcE1) 的完整 ORF,全长为 2817bp,使用 DNAMAN 5.1 对其全长 ORF 的 PDHcE1 基因进行分析,PDHcE1 基因编码一个由 939AA 残基组成、分子量预计为 100663Da 的 PDHcE1 蛋白质,与 *Psychrobacter* sp. 273-4 的 PDHcE1 有 78.53% 的相似性。

关键词:嗜冷杆菌;丙酮酸脱氢酶系 E1;克隆;序列分析

中图分类号:Q55 **文献标识码:**A

Characterization and Gene Cloning of the Pyruvate dehydrogenase E1 (PDHE1) from an Antarctic Psychrobacter Strain

ZHANG Feng¹, HUANG Shuo-qin², ZHANG Jin-wei³

(1 Zhangzhou Education College, Zhangzhou 361000;

2 School of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350007;

3 Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, Fujian, China)

ABSTRACT: A strain 7195, which produces Pyruvate dehydrogenase (E1), was isolated from the deep sea sediment of Prydz Bay, Antarctic. The morphology identification and 16S rDNA sequence analysis showed that it belonged to genus *Psychrobacter*. The Pyruvate dehydrogenase (E1) gene was cloned by PCR according to the primers. Nucleotide sequence analysis revealed an open reading frame (ORF) of 2817 bp encoding the PDHcE1. The amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence of the PDHcE1 gene corresponded to a protein of 939 amino acid residues with a molecular weight of 100663 kDa. The PDHcE1 shows a high sequence, with homology of 78.53%, similar to the PDHcE1 gene from *Psychrobacter* sp. 273-4.

Key words: Psychrotrophic *Psychrobacter*; Pyruvate dehydrogenase (E1); Gene cloning; Sequence analysis

丙酮酸脱氢酶系(Pyruvate dehydrogenase complexes, 以下简称 PDHc)存在于微生物、哺乳动物及高等植物中,是 1 个定位在线粒体中的多酶复合体,是 2-氧(代)酸脱氢酶复合体(OADHc)家族的一个成员,它催化糖代谢中丙酮酸的不可逆地氧化脱羧产生乙酰 CoA^[1,2]。该酶复合体由丙酮酸脱氢酶(PDH, EC 1.2.4.1)(以下简称 E1)、二氢硫辛酸乙酰转移酶(DLAT, EC 2.3.1.12)(以下简称 E2)、二氢硫辛酸脱氢酶(DLDH, EC 1.8.1.4)(以下简称 E3)的多重拷贝组成的。而关于细菌丙酮酸脱氢酶系的克隆工作在国内外目前未见报道。

本研究报道了从南极普利兹湾深海沉积物中筛选得到嗜冷杆菌 7195(*Psychrobacter* sp.)的全基因组中克隆到丙酮酸脱氢酶系 E1(PDHcE1)的核酸全长 ORF 序列,并对其进行了序列的比较分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

菌株 7195 筛选自南极普利兹湾深海沉积物 (74°25'E, 66°

55'S, 水深 900m),样品于 2001 年 11 月~2002 年 4 月中国第十八次南极考察航次期间采集,采用多管采样器采集,在超净台中去除表层后,将内层样品保存于-20℃ 条件下带回。

1.1.2 菌种和质粒

大肠杆菌 *E.coli* Top10 F⁻ 为本实验室保存, T-载体购自 Promega。

1.1.3 试剂

GENECLEAN II Kit 购自 BIO101 公司;限制性内切酶购自 Promega, Taq 酶等 PCR 用品购自 MBI, 其他化学试剂均为国产分析纯。

1.1.4 培养基

改良的 2216E 培养基:蛋白胨 1%, 酵母膏 0.2%, 用福建沿海处取的陈海水(放置一个星期以上的海水,用 0.22 μm 滤膜过滤后使用)配制,室 pH 7.0~8.0。固体培养基另加 1.5%琼脂粉。

生长培养基:5 倍稀释的改良 2216E 培养基。

1.2 方法

1.2.1 菌种分离

将样品稀释^[3]后涂布于改良 2216E 培养基上,于 15℃ 培养 3~7d,取单菌落镜检后接种于液体改良 2216E 培养基中,培养 3~7d 后加入 15%(终浓度)甘油,于-80℃ 超低温冰箱中保存。

作者简介:张锋,男,(1979-),助教,在职硕士,福建漳州云霄人

通讯作者:张金伟 E-mail: jinweizhang@21cn.com

(收稿日期:2006-09-10 接受日期:2006-10-08)

1.2.2 总 DNA 提取及核酸操作参考文献^[4]

1.2.3 16S rDNA 的扩增和克隆

以基因组 DNA 为模版, 使用通用引物^[5]27F:5'-A-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和 1492R:5'-GGTTAC-CTTGTTACGACTT-3'(上海生工合成) 扩增细菌 16S rDNA。

扩增参数为:96°C 2min, 然后 94°C 30s, 55°C 90s, 72°C 90s 为一个循环, 共进行 30 个循环。PCR 产物经凝胶电泳回收后, 按 T 载体试剂盒标准方法将得到的产物连接到 T 载体上, 转化 *E.coli Top10 F'*, 重组质粒经鉴定正确后保存于-20°C。

1.2.4 PDHcE1 序列的扩增和克隆

以基因组 DNA 为模板, 参考文献^[7]设计 PCR 引物, 扩增 PDHcE1 引物: PDHcE1F (forward primer): 5'-ATGAAT-TATTACAAGGATGCTGATAG-3' 和 PDHcE1R (reverse primer): 5'-TTATTCTGTGACGTCATCATTATTAA-3', 由上海生工合成。PCR 反应体系为: Buffer 10 μ L, dNTP 10uL, 引物各加 10pmol, Mg^{2+} 浓度为 1mmol/L, Taq 酶 2u/100 μ L, 补 ddH₂O 到 100 μ L。反应条件为: 95°C 2min, 94°C 1min, 57°C 1min, 72°C 1.5min 为一个循环, 共进行 30 个循环。

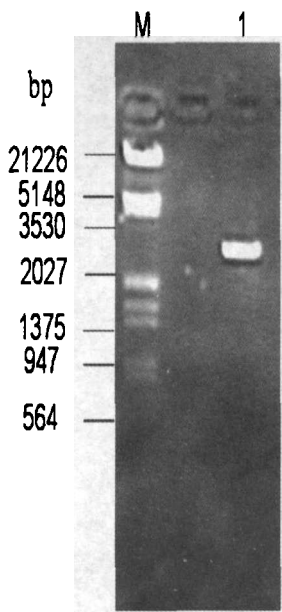


图 1 PCR 扩增 PDHcE1 基因

Fig.1 PCR amplification of PDHcE1 gene

M: λ DNA /EcoRI+HindIII

1: PCR 产物

2.3 PCR 扩增 PDHcE1 基因及其克隆

以基因组 DNA 作为模板, PCR 扩增的产物大小在 2.8K 左右(图 1), 纯化后连接到 T 载体(3KB)上, 转化 *E.coli Top10 F'*, 培养过夜。提取的重组 T 载体质粒, 经 BamHI 和 NheI 双酶切后, 得到一条大小约是 2800 bp 左右的片段, 说明重组 T 载体质粒中插入的片段大小约为 2800bp, 确实为 PCR 扩增的产物(图 2), 鉴定正确后测序, 获得 PDHcE1 的核酸全长 ORF 序列为 2817bp, 在 EMBL 数据库中注册号为 AM176760。

产物由 U-gene 的 PCR-Pure Kit 纯化后按 3:1 连接到 TaKaRa 的 pMD18-T 载体, 转化 *E.coli Top10 F'*, 菌落 PCR 筛选含有 PDHcE1 基因的克隆。

1.2.5 核酸测序及同源性分析

上海生工完成所有测序及拼接工作, 序列同源性分析采用 NCBI 的 BLASTn 完成。

2 结果

2.1 嗜冷菌的分离

在 1.5 mL 灭菌离心管中将样品与灭菌 dd H₂O 按 1:100 比例混合, 稀释后接种于 5mL 生长培养基中, 分别在 4、10、20、30°C 水浴下培养 5~15d; 菌体生长后稀释涂布在分离平板培养基上, 15°C 培养 3~5d。挑平板上长出的单菌落, 接种于 5 ml 生长培养基, 15°C 培养至 OD₆₀₀ 为 3.0 时, 保种备用。

2.2 7195 菌株 16S rDNA 序列分析

将 7195 菌株的 16S rDNA 序列与 EMBL 数据库中的序列进行同源性比较, 发现与其同源性较高的菌株均为嗜冷杆菌属 (*Psychrobacter*)^[8]。

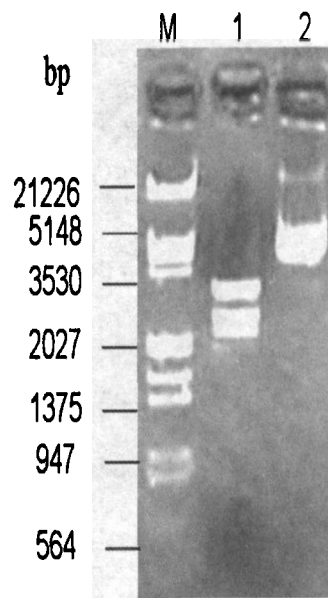


图 2 重组质粒 pT- PDHcE1 的酶切鉴定

Fig.2 Digestion pattern of recombinant plasmid pT- PDHcE1

M: λ DNA /EcoRI+HindIII

1: 重组 T 载体经 BamHI 和 NheI 双酶切产物

2: 重组 T 载体

2.4 7195 的 PDHcE1 氨基酸序列分析

采用 DNAMAN (version 5.1) 软件对全长 ORF 为 2817 bp 的 PDHcE1 基因进行分析。该基因编码一个由 939AA 残基组成、分子量预计为 1100,663Da 的 PDHcE1 蛋白质(EMBL 注册号为: CAJ45362)。与嗜冷杆菌属 (*Psychrobacter*) 的两个 PDHcE1 有较高的序列的相似性, 其中与 *Psychrobacter arcticus* 273-4 和 *Psychrobacter cryohalolentis* K5 菌株 PDHcE1 的相似性分别为 78.53% 和 76.08%(表 1, 图 3)。

表 1 7195 菌株 PDHcE1 序列同源性比较结果
Table 1 Homology comparison of strain 7195 PDHcE1

菌株来源	数据库编号	相似性(%)
<i>Psychrobacter arcticus</i> 273-4	YP_264612	78.53
<i>Psychrobacter cryohalolentis</i> K5	ZP_00653451	76.08
<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	YP_047975	57.66
<i>Microbulbifer degradans</i> 2-40	ZP_00315287	46.13
<i>Methylobacillus flagellatus</i> KT	ZP_00565929	45.98
<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400	ZP_00640861	45.22
<i>Azotobacter vinelandii</i> AvOP	ZP_00419149	45.13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	NP_253702	44.33
<i>Idiomarina loihiensis</i> L2TR	YP_154850	44.12
<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472	AAQ58203	43.21
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A	YP_265854	39.29

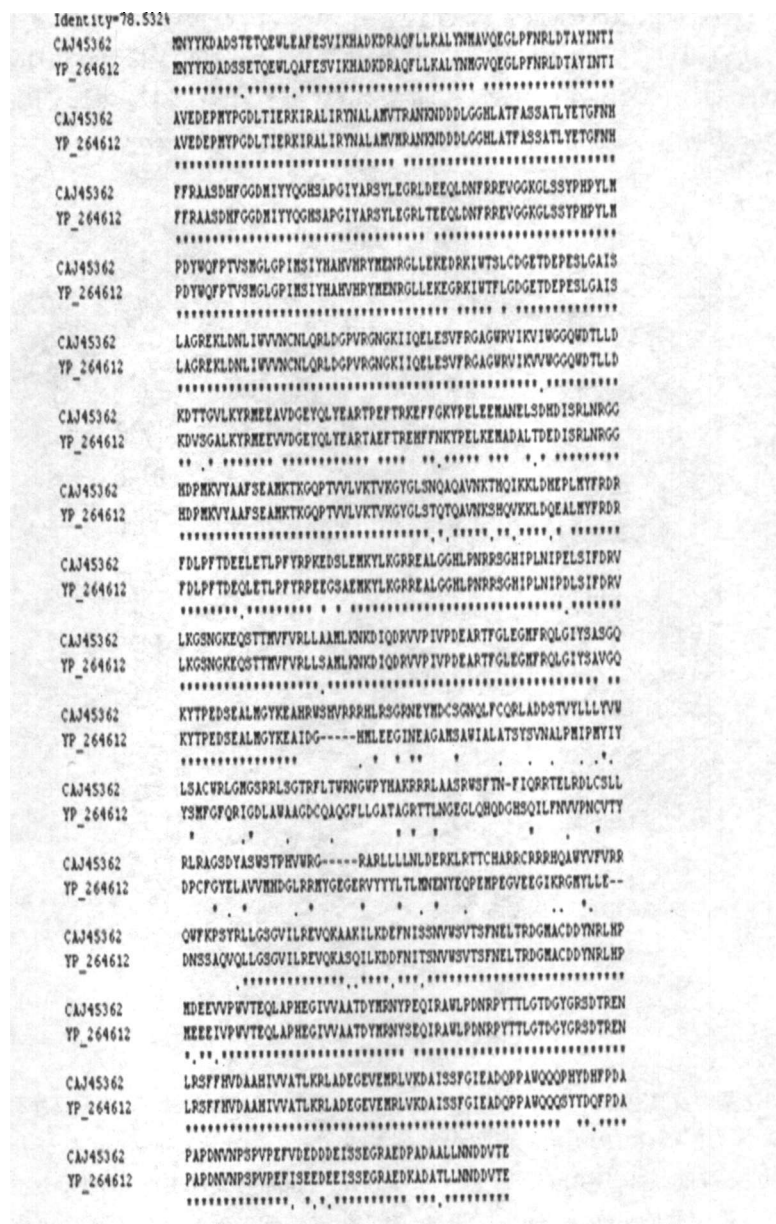


图 3 菌株 7195 和菌株 273-4 的 PDHcE1 氨基酸序列比较
Fig. 3 Comparison of PDHcE1 amino acid sequences between Strain 7195 and Strain 273-4
CAJ45362: PDHcE1 来自 Pseudomonas sp.7195;
YP_264612: PDHcE1 来自 Psychrobacter arcticus 273-4

2.5 细菌丙酮酸脱氢酶 PDHcE1 的进化树分析

从细菌中选择具有代表性的物种的丙酮酸脱氢酶 (PDHcE1) 构建进化树 (图 4), 我们所得到的菌株 7195 的 PDHcE1 (CAJ45362) 与来自嗜冷杆菌属的 *arcticus* 273-4 和 *cryohalolentis* K5 的 PDHcE1 具有较近的亲缘关系, 同处于一个分支上, 它们和不动杆菌 (*Acinetobacter*) 的 PDHcE1 同处于一个簇(II)中(图 4)。从进化树中我们可以发现, 甲基菌属 (*Methylobacillus*) 的 PDHcE1 与一株黄杆菌 (*Chromobac-*

terium violaceum) 的 PDHcE1 具有较近的亲缘关系, 在同一个分支上; 而铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) 与棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) 的 PDHcE1 具有较近的亲缘关系, 在同一个分支上; 中国希瓦氏菌 (*Shewanella frigidimarina*) 与 (*Idiomarina loihiensis*) 的 PDHcE1 具有较近的亲缘关系, 在同一个分支上; 它们与产微球茎菌属 (*Microbulbifer*) 和伯克氏菌属 (*Candidatus Pelagibacter*) 的 PDHcE1 形成同一个簇(I)

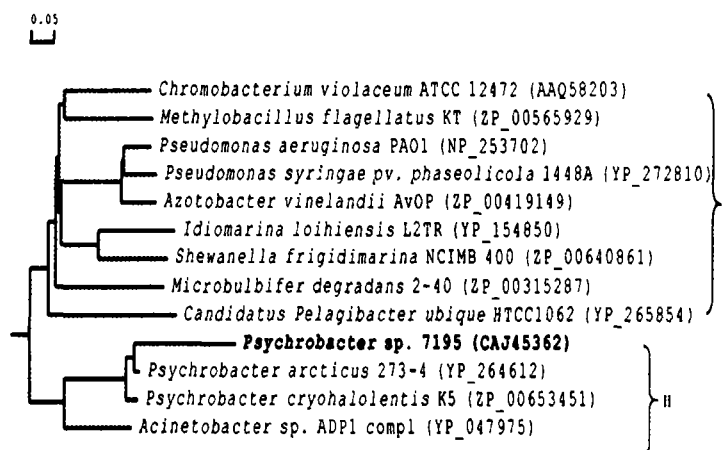


图 4 根据不同来源的 PDHcE1 氨基酸序列所构建的系统发育树 (括号内为不同来源的 PDHcE1 在数据库中的蛋白序列编号)

Fig. 4 Phylogenetic tree of PDHcE1 from different organisms based on the amino acid sequences

3 讨论

菌株 7195 的 PDHcE1 与文献报道的来自 *Psychrobacter arcticus* 273-4 和 *Psychrobacter cryohalolentis* K5 菌株 PDHcE1 的相似性分别为 78.53% 和 76.08%, 它们同为嗜冷杆菌属, 但保守性不高; 而与来自不动杆菌 (*Acinetobacter*) 的 PDHcE1 的同源性为 57.66%, 为不同属而在进化树上处于同一分支上的亲缘关系。说明 PDHcE1 作为生物代谢途径中的一个关键酶, 在微生物各种属的生命过程中具有一定的保守性; 同时也说明了种属进化与具体某一分子进化并不同步, 具体功能基因的分子进化与其生存环境关系更为密切^[9]。

葡萄糖经糖酵解成为丙酮酸, 然后在丙酮酸脱氢酶的催化下将丙酮酸转化成为三羧酸循环所需要的乙酰辅酶 A, 同时将 NAD⁺ 还原为 NADH。丙酮酸脱氢酶缺乏致使其不能将丙酮酸转化为乙酰辅酶 A, 而还原为乳酸。故依靠三羧酸循环作为乙酰辅酶 A 的来源受阻, 同时 ATP 的产量亦减少, 从而导致代谢障碍, 组织受损。因此, 丙酮酸脱氢酶在维系生物生命代谢正常进行起着重要的作用。丙酮酸脱氢酶系中的 E1 和 E2 唯一属于该复合物, 而 E3 与其它 2-氧(代)酸脱氢酶复合体有联系^[10,11]。PDHc 的空间立体结构十分复杂, 都是以多拷贝的 E2 为核心构成的立体几何结构, 但来源不同的 PDHc 的结构和组成并不完全相同。在革兰氏阴性细菌中, PDHc 包含 24 个 E2 亚单位, 12 个 E1 和 6 个 E3 亚单位, 每 3 个 E2 亚单位形成一个三聚体, 然后 8 个三聚体亚单位再排列结合成一个正立方体的核心结构。而在革兰氏阳性菌和真核生物中, PDHc 的核心结构由 60 个 E2 亚单位组成, 包含 30 个 E1 和 6 个 E3 亚单位。每 3E2 亚单位同样形成三聚体, 然后, 20 个这种三聚体再组装成一个五边形的正十二面体的核心结构^[10]。E1 根据复合物的对称结构而存在两种形式: 在革兰氏阴性菌的八面体复合物中, E1 是个同型二聚体(α_2); 在革兰氏阳性菌的二十面体复合物中, E1 是个异型四聚体($\alpha_2\beta_2$)^[12,13]。

参考文献

[1] Berg, A, De Kok, A. 2-Oxo acid dehydrogenase multienzyme com-

plexes. The central role of the lipoyl domain [J]. Biol Chem, 1997, 378:617-634

- [2] Ferrari E, Jarnagin AS, Schmidt BF. Commercial production of extracellular enzymes. In: Sonenshein AL, Hoch JA, Losiek Redts. *Bacillus subtilis* and other gram -positive bacteria, biochemistry, physiology and molecular genetics [M]. Washington DC: American Society for Microbiology, 1993, 917-938
- [3] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验 (第三版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 1996: 69-73
- [4] Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [5] Fred A, Roger B, Robert EK, et al. *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd ed [M]. New York: John Wiley & Sons Inc, 1997
- [6] 林念炜, 张锐, 赵晶, 等. 南极产低温蛋白酶菌株 *Marinobacter* sp. R2 的发酵条件及酶学性质研究 [J]. 厦门大学学报, 2004, 43(6): 865-869
- [7] Yeaman SJ. The 2-oxo acid dehydrogenase complexes: recent advances [J]. Biochem J, 1989, 257: 625-632
- [8] 张金伟, 曾润颖. 南极产低温脂肪酶菌株 *Psychrobacter* sp. 7195 的选育、发酵条件及酶学性质研究 [J]. 生物磁学, 2006, 6(1): 6-10
- [9] 张金伟, 曾润颖. 嗜冷假单胞菌 7197 S- 腺苷甘半胱氨酸 (SAHH) 基因的克隆、序列分析及表达 [J]. 现代生物医学进展, 2006, 6(4): 5-7
- [8] (英) W. 费迪南德. 酶分子 [M]. 北京: 科学出版社, 1985: 102-127
- [9] De Clercq E. S-Adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors as broad-spectrum antiviral agents [J]. Biochem Pharm, 1987, 36: 2567-2575
- [10] Hoch JA, Coukoulis HJ. Genetics of the -ketoglutarate dehydrogenase complex of *Bacillus subtilis* [J]. J Bacteriol, 1978, 133: 265-269
- [11] Neveling U, Bringer-Meyer S, Sahm H. Gene and subunit organization of bacterial pyruvate dehydrogenase complexes [J]. Biochem Biophys Acta, 1998, 1385: 367-372
- [12] Mattevi A, de Kok A, Perham RN. The pyruvate dehydrogenase multienzyme complex [J]. Curr Opin Struct Biol, 1992, 2: 877-887
- [13] Reed LJ, Hackert ML. Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases [J]. J Biol Chem, 1990, 265: 8971-8974