

# 假单胞菌(*Pseudomonas* sp. cn4902) 磷酸甘油磷酸酯酶基因克隆与鉴定\*

刘广发 张会永 谢金镇

(厦门大学生命科学学院 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 厦门 361005)

**提要** 采用随机克隆、功能筛选、逐次排除和同源比较的基因克隆新策略进行克隆假单胞菌(*Pseudomonas* sp. cn4902)磷酸甘油磷酸酯酶基因的研究。结果表明,该结构基因长819bp,与铜绿假单胞菌的磷酸甘油磷酸酯酶基因的核苷酸一致性达61.5%,氨基酸同源率为56.2%。该基因已输入GenBank数据库,收录号AF348165。将该基因转化大肠杆菌,受体菌在含NaCl 1.0mol/L的培养基中甘油含量升高2.9倍,最终菌浓度提高3.6倍。可见这是一个与生物耐盐性相关的主基因,以其转化、培育耐盐农作物的前景十分光明。

**关键词** 假单胞菌,磷酸甘油磷酸酯酶,耐盐性,甘油,基因克隆  
**中图分类号** Q78

据统计,全球三分之一的土地已经或正在发生盐碱化。我国有大约6700万ha(1亿亩)盐碱化土地,随着人口的持续增加和工业发展,人均耕地面积日趋减少已是不争的事实。如何开发利用广阔的盐碱地来发展农业生产、提高粮食等作物的产量已经成为一个关系国计民生的迫切问题。

提高农作物的抗逆性是作物育种的主要目标之一(林栖凤等,1999;Zhu,2002)。通过转耐盐基因提高植物耐盐性是一条日益受重视的途径(许祥明等,2000)。虽然生物的耐盐性是由多基因决定的综合性状,但近年来已陆续有克隆生物的单个耐盐主基因并将它转入农作物,明显提高其耐盐性的报道(Tarczynski *et al.*, 1993; Ruiz *et al.*, 2001)。克隆基因的经典策略是构建基因组文库或cDNA文库,然后用已知序列的探针筛库(Sambrook *et al.*, 1989; 王在照等, 2002)。该实验比较繁琐且只能克隆已知基因。最近作者以随机克隆、功能筛选、逐次排除和同源比较的策略(刘广发等, 2004)从极端耐盐的假单胞菌中克隆了磷酸甘油磷酸酯酶结构基因并转化大肠杆菌,大大提高了受体菌的耐盐性。磷酸甘油磷酸酯酶是

细胞内甘油代谢过程中的关键酶,它单向催化3-磷酸甘油脱去磷酸基团产生并积累甘油(Ginzburg, 1987),因此磷酸甘油磷酸酯酶结构基因是一个比较重要的直接与生物耐盐性相关的基因。本研究中的克隆的基因源自海洋细菌。可以认为,用类似的手段也可从海洋生物,尤其是原核生物中克隆耐盐相关基因,从而为培育转基因耐盐作物、广泛利用沿海滩涂种植经济作物奠定良好的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 假单胞菌基因组DNA来源及处理

碱法提取(Sambrook *et al.*, 1989)能在饱和盐水中生存的假单胞菌(*Pseudomonas* sp. cn4902, 本实验室分离保存)基因组DNA,用*Sau* 3A I部分酶切,将酶切产物进行1%琼脂糖凝胶电泳。在紫外灯下切下含1—9kb DNA片段的凝胶,回收纯化DNA(上海华舜生物工程有限公司试剂盒)。质粒载体pUC19经*Bam* HI酶切、碱性磷酸酶处理,电泳后回收。线性pUC19载体与假单胞菌基因组DNA片段连接,转化*E. coli* JM109。转化菌液涂布于LB琼脂培养基(含Amp 100μg/ml),37℃

\* 国家科技部转基因植物专项基金资助, J00-B-014号; 厦门大学生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室项目资助, 2004106号。刘广发, 副教授, E-mail: liugf@s@xmu.edu.cn

收稿日期: 2004-05-22, 收修改稿日期: 2005-01-18

培养,任意挑取单菌落,提取其中质粒进行电泳观察。

## 1.2 假单胞菌耐盐相关 DNA 片段的获取

测定受体菌 *E. coli* JM109 对 NaCl 的最高耐受水平。将转化子转接在高盐 LB 琼脂培养基上 (Amp 100 $\mu$ g/ml), 37 $^{\circ}$ C 培养 2d, 筛选耐盐转化子。提取其中的重组质粒, 酶切, 电泳, 回收插入的耐盐相关 DNA 片段。将该片段分别进行不同酶切, 所得到的各个片段分别与 pUC19 质粒连接, 转化 *E. coli* JM109, 再涂布于高盐培养基上, 确定与耐盐相关的 DNA 片段。

## 1.3 耐盐 DNA 片段来源的确认

克隆得到的重组质粒用 *Bam* H I 完全酶切, 电泳, 回收, 以该片段作为探针进行 DIG 标记 (Roche 公司), 与假单胞菌基因组 DNA 进行 Southern 杂交。

## 1.4 DNA 片段的测序与分析

将目的 DNA 片段与 pUC19 质粒连接, 寄往上海基康生物公司进行测序, 对测序结果用 DNAsis 和 BLAST 软件中的“Search the conserved domain database”进行分析。

## 1.5 磷酸甘油磷酸酯酶基因亚克隆及其耐盐性和蛋白表达检测

根据测序结果分析, 选定其中的 ORF3, 设计一对引物进行 PCR 扩增。回收 PCR 产物, 与温控表达载体 pBV220(国家海洋局第三海洋研究所徐海院士惠赠)重组, 转化 *E. coli* ER2566, 测定转化子的耐盐水平; 培养 12h 后 42 $^{\circ}$ C 热休克 4h, 检测蛋白表达情况(李永明等, 1998)。

## 1.6 耐盐转化子生长曲线的绘制及甘油含量的检测

将耐盐转化子接入含 NaCl 1.0mol/L 的培养基中, 每隔 6h 测定一次培养液的 OD 值, 绘制转化子在高盐培养基中的生长曲线。根据王剑峰等(2001)的方法略加修改检测转化子中的甘油含量。

# 2 结果

## 2.1 假单胞菌部分基因组文库的构建

任意挑取 27 个转化子, 提取其中的(重组)质粒进行电泳分析。结果发现, 多数质粒中含有大小不同的外源 DNA 片段(图 1), 说明 DNA 连接和转化的效果较为理想。但有的重组质粒似乎与第一列的对照处于同一条水平线附近, 这或许说明

它们中无外源插入片段, 或者外源片段的分子量较小, 难以看清。图 1 中各重组质粒经电泳后大多出现 2—3 条带, 这是天然共价闭环环型质粒与同一种质粒由于提取过程中某些外因影响而形成的开环型或线型质粒共存的缘故(吴乃虎, 1998)。

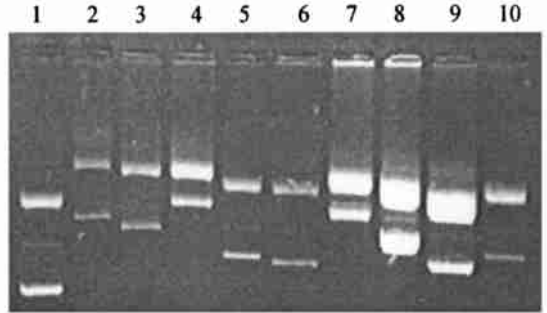


图 1 假单胞菌部分基因组文库中部分重组质粒的电泳鉴定

Fig. 1 The electropherogram of some reconstruction plasmids of partial genomic library of *Pseudomonas* sp. cn4902

1: 质粒载体 pUC19; 2—10: 各个转化子中的(重组)质粒

## 2.2 假单胞菌耐盐相关 DNA 片段的命名

由实验得知, *E. coli* JM109 的最高耐盐性 (NaCl, 下同) 不超过 4.5%, 因此本实验将转化子经含 NaCl 6.0% 的 LB 琼脂培养基筛选, 获得 1 株耐盐性比对照提高约 1/3 的耐盐转化子。提取其中的重组质粒, 发现其中插入了约 8.8kb 的 DNA 片段(图 2), 命名为 pZY。以数种限制性核

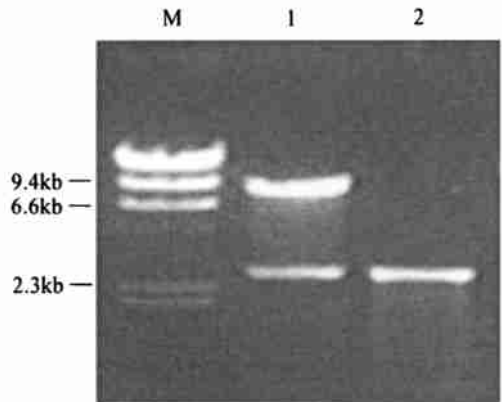


图 2 重组质粒 pZY 酶切鉴定分析

Fig. 2 Identification of the reconstruction plasmid pZY digested by *Xba* I + *Kpn* I

M:  $\lambda$  DNA/*Hind* III marker; 1: pZY/*Xba* I + *Kpn* I

(8.8kb, 2.7kb); 2: pUC 19/*Bam* HI(2.7kb)

酸内切酶对该片段进行酶切, 亚克隆, 再进行筛选, 最终将与耐盐有关的 DNA 区域定位在该片段经 Bam HI 酶切产生的一个约 4.2kb 的 DNA 片段上(未示出), 将该重组质粒命名为 pZYX。

### 2.3 耐盐相关 4.2kb 片段来源的确定

DIG 标记亚克隆得到的 4.2kb 片段, 与假单胞菌基因组 DNA 进行 Southern 杂交。结果可见, 假单胞菌和重组质粒 pZYX 都出现明显的杂交信号, 对照 *E. coli* JM109 未见杂交信号, 说明 4.2kb

DNA 片段的确源自假单胞菌(未示出)。

### 2.4 磷酸甘油磷酸酯酶基因序列及同源性分析

该 4.2kb 片段经上海基康生物公司进行测序, 发现包含 3 个完整开读框(未示出), 其中 ORF3 开读框(命名为 PGP)长 819bp。经与 GenBank 数据库中的已知基因序列进行比较后发现, PGP 开读框很可能是磷酸甘油磷酸酯酶结构基因(图 3)。该基因已在美国 GenBank 数据库中登记, 收录号为 AF348165。

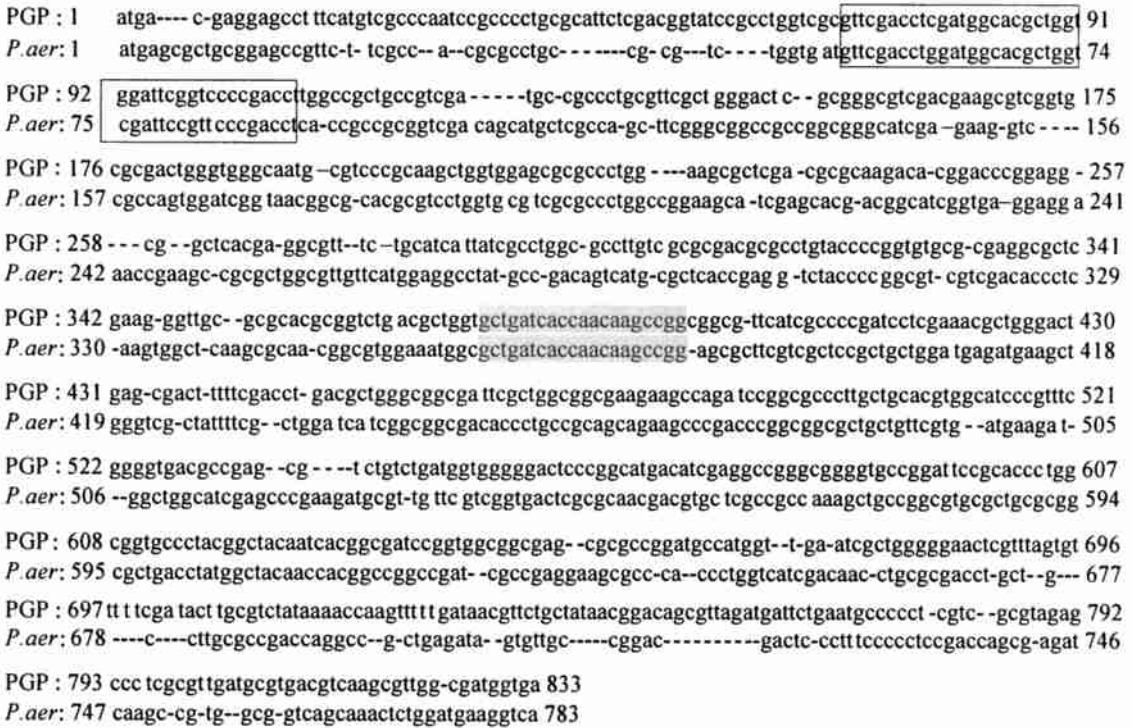


图 3 PGP 开读框和铜绿假单胞菌的磷酸甘油磷酸酯酶基因同源性比较

Fig. 3 The homologous comparison between PGP Open Reading Frame of *Pseudomonas* sp. cn4902 and the gene of phosphoglycolate phosphatase of *P. aeruginosa*

注: *P. aer* 即铜绿假单胞菌

图 3 表明, 通过 GenBank 进行生物信息学分析后发现, PGP 开读框与铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的磷酸甘油磷酸酯酶(phosphoglycolate phosphatase, PGPase)基因的核苷酸一致性达 61.5%(570/927), 两者之间核苷酸连续相同的片段最长达 20bp(以阴影表示), 而且图中方框所示的核苷酸区段两者的一致性高达 90.5%(38/42), 6 个以上核苷酸连续相同的片段有 19 个。由此可见, PGP 开读框应该是 *Pseudomonas* sp. 4902 的磷酸甘油磷酸酯酶结构基因, 而且图中的阴影部分和划方框部分很可能是该基因的高度保守区

域。为了进一步验证上述 PGP 开读框性质的推论, 将 PGP 开读框推测的氨基酸序列和铜绿假单胞菌的磷酸甘油磷酸酯酶利用美国 GenBank 中的“Search the conserved domain database”软件进行比较后发现, 两者的同源性可达 56%。如果将 PGP 开读框与其他 6 个物种的磷酸甘油磷酸酯酶的氨基酸序列进行了比较(未示出), 发现这 7 个物种的氨基酸一致率也相当高。这进一步说明 PGP 开读框很可能就是磷酸甘油磷酸酯酶基因。

### 2.5 PGP 开读框亚克隆及其蛋白表达

为了进一步以实验确认 PGP 开读框的功能,

根据测序分析,设计一对引物对其进行 PCR 扩增。回收 PCR 产物,与温控表达载体 pBV220 重组成 pBVORF3(未示出),转化 *E. coli* ER2566,测定转化子的蛋白表达情况(图 4)。

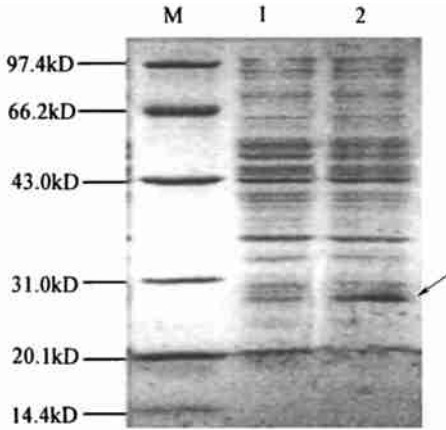


图 4 转化子 *E. coli* ER2566/pBVORF3 总蛋白 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 4 SDS-PAGE electropherogram of the total proteins of transformant *E. coli* ER2566/pBVORF3  
M: 蛋白分子量标志; 1: 对照 *E. coli* ER2566/pBV220;  
2: 转化子 *E. coli* ER2566/pBVORF3。  
箭头指处为 PGP 开读框的表达蛋白带

经 PCR 扩增、凝胶电泳,在重组质粒 pBVORF3 中的 PGP 开读框大小约为 850bp(包含终止符后一小段序列),与预期相符。以 pBVORF3 转化 *E. coli* ER2566,提取转化子中的可溶性蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后可以明显看到,转化子在大约 28kD 处有一条清楚的表达带,其大小和 PGP 开读框推测值基本相符(图 4)。

## 2.6 转化子的甘油含量的测定

依据上述关于 PGP 开读框功能的分析,对转化子中的甘油含量进行了测定(表 1)。

表 1 说明,在盐胁迫下(1.0mol/L NaCl),转化子的甘油含量达到 7.93fg/cell,约是对照组的 2.9 倍(7.93/2.69)。本结果进一步证明了 PGP 开读框是磷酸甘油磷酸酯酶的结构基因。该基因转入受体菌后使后者的甘油合成能力有了较大幅度提高。

## 2.7 转化子耐盐水平的测试

耐盐水平测试表明,转化子可在含 NaCl 高达 1.3mol/L 的 LB 培养基中生长,而对照组最高耐盐能力仅为 1.1mol/L(未示出)。转化子和对照在含 NaCl 1.0mol/L 的 LB 培养基中的生长曲线见图 5。

表 1 转化子 *E. coli* ER2566/pBVORF3 的甘油含量

Tab. 1 The glycerol content of transformant *E. coli* ER2566/pBVORF3

菌株	菌液 (ml)	细菌总数 ( $\times 10^{11}$ 个)	甘油总含量 (mg)	平均甘油含量 (fg/cell)
<i>E. coli</i> ER2566/pBV220	8.000	1.71	0.46	2.69
<i>E. coli</i> ER2566/pBVORF3	1.156	1.74	1.38	7.93

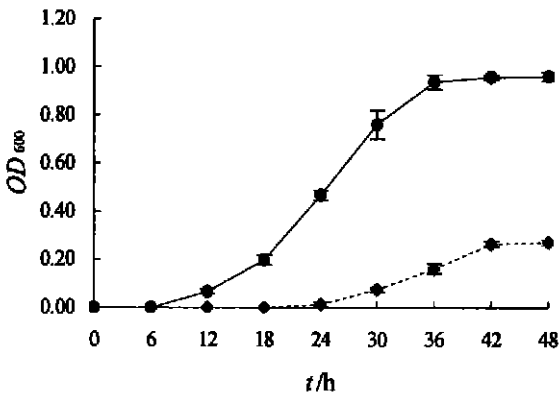


图 5 转化子 *E. coli* ER2566/pBVORF3 在含 NaCl 1.0mol/L 的 LB 培养基中的生长曲线

Fig. 5 The growth curve of transformant *E. coli* ER2566/pBVORF3 growing in the LB medium containing NaCl 1.0mol/L  
— *E. coli* ER2566/pBVORF3;  
- - *E. coli* ER2566/pBV220, control

如图 5 所示,转化子被接入高盐培养基后仅 6h 就开始明显增长,36h 后基本达到了平衡期。对照菌直到约 24h 后才逐渐缓慢生长,42h 后达到平衡期。转化子的生长速度和最终菌浓度远高于对照组。达到生长平衡期时转化子的生物量约是对照组的 3.6 倍。可以认为,正是转化子中拥有若干拷贝的磷酸甘油磷酸酯酶结构基因,在质粒载体启动子的带动下转录生成相应的 mRNA,促进了甘油的合成,从而提高了菌体甘油的含量,才使转化子具有较高的耐盐能力。

## 3 讨论

为了克隆极端耐盐的假单胞菌的耐盐相关基因,作者采用随机克隆的策略,从构建该菌的部分基因组文库入手,以转化子耐盐功能提高为筛选手段,再经系列亚克隆,获得该菌的耐盐相关基

因,并经生物信息学查询(包括核酸同源性比较和多肽保守区域分析)及转化子甘油含量和生长曲线测定,终于基本确定该基因为磷酸甘油磷酸酯酶结构基因。作者从检测转化子功能变化入手克隆耐盐目的基因的技术路线,目标明确,方法简捷,尚可进一步用于克隆其他耐盐相关基因。依据同样的原理,本技术经改进,也可被借鉴作为克隆其他基因的重要手段。

将外源基因组 DNA 片段插入系列载体中保存是构建以质粒为载体的基因组文库的基本方法。检测插入片段大小有以下三种手段:①不酶切,②单酶切,③双酶切。不酶切指的是将提取出的(重组)质粒不经酶切直接电泳,只要泳动速度低于对照就初步表明原质粒中有片段插入。本方法的优点在于不经酶切,快捷又经济。缺点是在提取过程中由于外因(如碱变性、剧烈振荡)的作用,有些质粒的 DNA 双链之一可能出现断裂,从而由天然存在的共价闭环环状(ccc DNA)转变成开环型(oc DNA),甚至完全断裂成线型(少量)。在凝胶电泳中,ccc DNA 走在前,oc DNA 落于后,线型质粒位于两者之间(一般情况下),因此电泳后常见“2—3 条带”,但它们实际上仍是同一种质粒的不同存在形式,由此导致不易准确判别插入片段的大小;如果以一种在原质粒上具有单一识别位点的内切酶对重组质粒进行酶切,其产物将可能是一条线性 DNA。在 Marker 存在下与对照一同电泳,就能方便地知道插入片段的大小,但上述酶切产物也可能不止一条(在插入片段具有上述内切酶位点的情况下);同理,双酶切也存在类似的情况,出现的酶切片段甚至更多。因此,经综合考虑,作者选择了不经酶切直接电泳重组质粒的途径。

耐盐性状是一种典型的数量性状,机制十分复杂,涉及多种基因,克隆并转化这些基因已经获得了一些转基因耐盐作物,如 *p5cs* 基因(Kishor *et al.*, 1995)、BADH 合成基因(郭北海等, 2000)、*mtl D* 基因(Tarczynski *et al.*, 1993)、*nha A* 基因(Ruiz *et al.*, 2001)等。自然界耐盐生物极其多样,可以预料,将可能从中克隆更多、更有效的耐盐相关基因,并用这些基因对农作物进行遗传改造以造福人类。

## 参 考 文 献

王在照, 相建海, 崔朝霞, 2002. 编码中华绒螯蟹蜕皮抑

制激素基因的 cDNA 片段克隆和序列分析. 海洋与湖沼, 33(4): 432—438 [Wang Z Z, Xiang J H, Cui C X, 2002. Molecular cloning and sequencing analysis of cDNA encoding partial putative molt-inhibiting hormone from the crab *Eriocheir sinensis*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 33(4): 432—438]

王剑锋, 修志龙, 范圣第, 2001. 甘油转化生产 1, 3-丙二醇发酵液中甘油含量的测定. 工业微生物, 31(2): 33—35 [Wang J F, Xiu Z L, Fan S D, 2001. Determination of glycerin concentration during the fermentation of glycerin to 1, 3-propanediol. *Industrial Microbiology*, 31(2): 33—35]

刘广发, 谭 静, 陈启伟, 2004. 假单胞菌甘露醇-1-磷酸脱氢酶基因克隆及在大肠杆菌中的表达. 海洋与湖沼, 35(2): 183—188 [Liu G F, Tan J, Chen Q W, 2004. Cloning and sequencing of mannitol-1-phosphate dehydrogenase gene of *Pseudomonas* sp. cn4902. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 35(2): 183—188]

许祥明, 叶和春, 李国凤, 2000. 植物抗盐机理的研究进展. 应用与环境生物学报, 6(4): 379—387 [Xu X M, Ye H C, Li G F, 2000. Progress in research of plant tolerance to salt stress. *Chin J Appl Environ Biol*, 6(4): 379—387]

李永明, 赵玉琪, 1998. 实用分子生物学方法手册. 北京: 科学出版社, 69—77

吴乃虎, 1998. 基因工程原理. 北京: 科学出版社, 176—178

林栖凤, 邓用川, 吴多桂等, 1999. 耐盐辣椒分子育种. 生物工程进展, 19(5): 19—23 [Lin X F, Deng Y C, Wu D G *et al.*, 1999. Molecular breeding of salt-resistant *Capsicum annum*. 19(5): 19—23]

郭北海, 张艳敏, 李洪杰等, 2000. 甜菜碱醛脱氢酶(BADH)基因转化小麦及其表达. 植物学报, 42(3): 279—283 [Guo B H, Zhang Y M, Li H J *et al.*, 2000. Transformation of wheat with a gene encoding for the betaine aldehyde dehydrogenase (BADH). *Acta Botanica Sinica*, 42(3): 279—283]

Ginzburg M, 1987. *Dunaliella*, a green alga adapted to salt. *Advances in Botanical Research*, 14: 93—183

Kishor P B K, Hong Z, Miao G H *et al.*, 1995. Overexpression of delta<sup>1</sup>-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol*, 108: 1387—1394

Ruiz T, Juan M, 2001. Engineering salt tolerance in crop plants. *Trends in Plant Science*, 6(10): 451

Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 193—207

Tarczynski M C, Jensen R G, Bohnert H J, 1993. Stress

protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science*, 259: 508—510

Zhu J K, 2002. Salt and drought stress signal transduction in plant. *Annu Rev Plant Biol*, 53: 247—273

## CLONING AND CHARACTERIZATION OF PHOSPHOGLYCOLATE PHOSPHATASE GENE FROM HALOPHILIC STRAIN *PSEUDOMONAS* SP. CN4902

LIU Guang-Fa, ZHANG Hui-Yong, XIE Jin-Zhen

(The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, 361005)

**Abstract** It is well known that, phosphoglycolate phosphatase (PGPase) is a key enzyme for converting glycerol phosphate into glycerol, responsible to salt tolerance in some organisms, especially in algae (Ginzburg, 1987). Nowadays, gene-encoding of PGPase has been performed for halophilic strain *Pseudomonas* sp. cn4902 isolated from a salt pool of extremely high concentration of NaCl, in Xiamen City, Fujian, by a functional gene screening technique described previously (Liu *et al.*, 2004).

Based on the knowledge that the PGPase is critical for the ability of salt tolerance in some halophilic organisms, our cloning strategy was optimized as follows. Total genomic DNA of *Pseudomonas* sp. cn4902 was extracted gently and digested partially by a restriction enzyme, e. g. *Eco* RI, and then run an agarose gel electrophoresis. Then the DNA fragments ranged from 1—9kb were retrieved and linked with the linear plasmid pUC19 digested by the same enzyme. The reconstructed plasmids were found and transformed to *E. coli* JM101. All the transformants were inoculated on the LB agar media containing 6.0% NaCl to find the salt tolerance colonies. The survived colonies were selected and cultured in liquid salt media again to extract the reconstructed plasmids that consist of gene(s) responsible for salt tolerance. After digesting and subcloning step by step, a short DNA fragment (open reading frame) was finally found. Sequencing of the insert revealed an 819bp DNA with an open reading frame encoding a peptide of 272 amino acid residues. Both the DNA and its putative protein sequences were used with the “Search the Conserved Domain Database” using the Blast search of the GenBank by a bioinformatic approach, we found that they are highly homologous to the gene of phosphoglycolate phosphatase of *Pseudomonas aeruginosa* (61.5% and 56.2% at DNA and amino acid levels, respectively).

The results mentioned above indicate that this short sequence may code for a phosphoglycolate phosphatase (PGPase) in *Pseudomonas* sp. cn4902. To satisfy this guess, we linked the gene with a high expression temperature control plasmid pBV220 and transferred them into *E. coli* ER2566.

New transformants were found and cultivated in a liquid salt medium until  $OD_{600}$  to 0.9—1.0 and then all the proteins and glycerol content of the transformants were detected. A clear protein band of about 28kD, which matches to the product of the cloned gene, could be seen after SDS-PAGE electrophoresis. On the other hand, it was showed that glycerol content in the transformants was 2.9 times more than control. Furthermore, the characteristic of salt tolerance of the transformant can be observed better in its liquid culture. The growth vs time plot was built by inoculating both transformant and control in liquid LB media supplied with 1.0mol/L NaCl and shaking at 37 °C, monitored by checking  $OD$  every 6h in 48h growth period. The growth curve was repeated three times. We found that the transformant was clearly out performed than control by the phenomena that the former grew 6h after inoculation, while the latter did so much slower after 24h. Finally, the growth rate and its final bacteria concentration were much greater than the control group, which is 3.6-folds higher. This result indicated the function of the transgene by raising salt tolerance level of the transformants.

It is believed that the gene we cloned is the PGPase gene of *Pseudomonas* sp. cn4902. GenBank has included it with access number AF348165.

**Key words** *Pseudomonas* sp., Phosphoglycolate phosphatase, Salt tolerance, Glycerol, Gene clone