

# 假单胞菌 (*Pseudomonas* sp. cn 4902) 甘露醇-1-磷酸脱氢酶基因克隆及表达\*

刘广发 谭 静 陈启伟

(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** 参照几种生物的甘露醇-1-磷酸脱氢酶基因 (*mlhD*) 的序列设计引物, 以极端耐盐的假单胞菌 (*Pseudomonas* sp. cn 4902) 的总 DNA 为模板, 采用 PCR 扩增、构建重组高效表达载体以及生物信息学研究等方法, 进行基因克隆、表达及功能定性等研究。结果表明, 克隆获得一长为 1149bp 的基因。经蛋白质保守区域研究, 初步判别该基因为 *mlhD* 结构基因。将该基因与 pBV220 质粒构建成高效表达原核重组载体 pBH。SDS-PAGE 电泳表明, 含 pBH 的转化子产生特异的、分子量约为 41kD 的蛋白带, 表达量约占菌体可溶性蛋白 6.7%。转化子的耐盐水平比对照提高了约 1/5。在含 0.9mol/L NaCl 的液体培养基中, 转化子培养 24h 后其生物量约是对照的 10.2 倍, 甘露醇含量约是对照的 4.1 倍。可见, 假单胞菌的甘露醇-1-磷酸脱氢酶基因是一个重要的耐盐相关基因, 该基因已在 GenBank 登记, 代号为 AY112696。

**关键词** 假单胞菌, 甘露醇-1-磷酸脱氢酶, 耐盐基因, 基因克隆

**中图分类号** Q78

据统计, 全世界的盐碱地约占陆地面积的三分之一, 我国有大约 1 亿亩盐碱化耕地。随着人口的不断增加和现代工业的发展, 人均耕地面积日趋减少。因此, 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政府和科学家必须直面的迫切问题(林栖凤等, 2000; Zhu, 2002)。

盐胁迫是盐碱地抑制植物生长、降低农作物产量的最重要环境因素之一。长期以来, 如何提高植物的耐盐性、增加盐胁迫下农作物的产量一直受到政府和科学家的关注。深入研究植物对盐胁迫的反应机制和耐盐机理是改造植物、提高其耐盐性的前提(Bohnert *et al.*, 2001; 王广策等, 2002)。其中, 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; 谭 静等, 2001)。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烟草和番茄, 明显提高其耐盐性的报道(Tarczynski *et al.*, 1993; Ruiz *et al.*, 2001)。最近作者从极端耐盐

的假单胞菌中克隆了甘露醇-1-磷酸脱氢酶基因并成功转化大肠杆菌, 大大提高了受体菌的耐盐性。该基因的克隆成功为培育转基因耐盐作物奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种及载体

假单胞菌 (*Pseudomonas* sp. cn 4902) 由本实验室分离保存, *E. coli* JM101 由本实验室保存。PCR 产物克隆载体 pMD18-T 购自大连宝生物工程有限公 司。原核基因表达载体 pBV220 具有抗性标记基因 Amp<sup>r</sup>, 42℃ 温控表达, 由国家海洋局第三海洋研究所徐洵院士惠赠。

### 1.2 主要试剂及培养基

限制性核酸内切酶、*pfu* DNA 聚合酶、dNTPs、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺和 Tris 购自上海生工生物工程公司, T<sub>4</sub>DNA 连接酶购自大连宝生物工程公司。λDNA/*Hin* dIII + *Eco*RI markers 购自美国 MBI 公司, 小量质粒抽提试剂盒和凝胶回收试剂盒购自华舜公司, IPTG 和

\* 科技部转基因植物专项基金资助, J00-B-014 号; 厦门市科委科技发展基金资助项目, 350222000104 号。刘广发, 副教授, E-mail: liugf@xmu.edu.cn

收稿日期: 2003-04-15, 收修改稿日期: 2003-09-15

X-gal 为 BBI 公司产品, DIG 引物标记和检测试剂盒为 Roche 公司产品。LB 培养基中加入 NaCl 1.5mol/L 即为假单胞菌的培养基。

### 1.3 假单胞菌总 DNA 的提取

参照 Sambrook 等(1989)的方法进行。

### 1.4 引物设计及 PCR 扩增

根据已报道的几种生物的甘露醇-1-磷酸脱氢酶基因(*mtl D*)的序列设计了几对 PCR 扩增引物,其中一对能高效扩增目的基因的引物如下:

Primer 1: 5' 端引物: 5' AGGATCCATGATAGCAT-TACATCATGGCG 3'

Primer 2: 3' 端引物: 5' TGTCGACATTATTG-CATTGCTCTATGAGC 3'

在两个引物的两端分别设计添加 *Bam* H I 和 *Sal* I 的酶切位点(下划线)。PCR 反应参数: 95℃ 5min; 94℃ 1min; 55℃ 1min; 72℃ 2min; 35 个循环。72℃ 10min, 4℃ 保存。

### 1.5 回收 PCR 扩增的目的基因

参照华舜公司凝胶回收试剂盒说明书进行。

### 1.6 PCR 产物加尾、连接及检测

参照 Sambrook 等(1989)的方法在 PCR 产物末端加上 polyA“尾巴”,与 pMD18-T 载体连接过夜,转化 *E. coli* JM101,在含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 LB 平板挑选原色菌落,培养过夜,提取其中的重组质粒。以 *Bam* H I 和 *Sal* I 双酶切或用引物 PCR 扩增鉴定重组子。

### 1.7 重组载体中的克隆基因测序

由大连宝生物工程有限公司进行。

### 1.8 原核表达重组载体的构建、转化及转化子耐盐性检测

从重组 pMD18-T 载体中切下经 PCR 扩增的目的基因,插入原核表达载体 pBV220 的多克隆位点中,转化 *E. coli* JM101。配制系列含 NaCl 培养基检测转化子的耐盐水平。配制含 NaCl 0.9mol/L 的培养基,接种转化子,每隔 8h 以光密度检测转化子和对照的生长状况。

### 1.9 转化子的蛋白电泳检测

按常规 SDS-PAGE 法进行(李永明等, 1998)。

## 2 结果

### 2.1 从假单胞菌总 DNA 中 PCR 扩增得约 1.1kb 的片段

图 1 显示,经多次 PCR 扩增终于获得一条比较清晰的 DNA 片段,分子量和预期值相符,且未出现

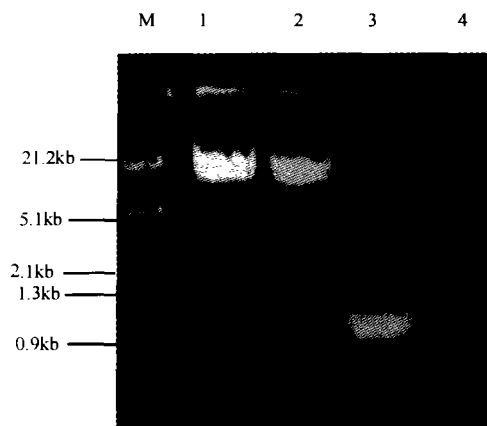


图 1 假单胞菌基因组 DNA 的 PCR 扩增产物电泳图谱  
Fig.1 Electropherogram of the PCR amplification products from genome DNA of *Pseudomonas* sp. cn 4902  
M:  $\lambda$ DNA/*Eco*R I + *Hind* III, molecular markers; 1, 2: Total DNA of *Pseudomonas* sp. cn 4902; 3, 4: PCR 扩增产物

非特异扩增条带。

### 2.2 扩增产物回收并克隆到 pMD18-T 载体上

回收上述片段并“加尾”后,与 pMD18-T 载体重组成 pMDH。经蓝白菌落检测,其重组率达 99% 以上。对 pMDH 重组质粒分别进行酶切及 PCR 分析,均可以看到重组质粒含有约 1.1kb 的插入片段(图 2)。

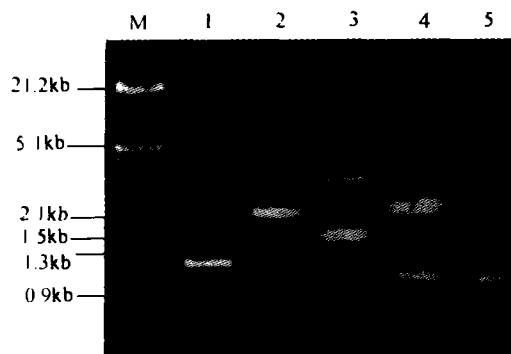


图 2 重组质粒 pMDH 酶切及 PCR 扩增产物分析电泳图谱  
Fig.2 Electropherogram of the reconstructed plasmid pMDH digested by restriction endonuclease and the product of PCR amplification  
M:  $\lambda$ DNA/*Eco*R I + *Hind* III molecular markers; 1: pUC18; 2: pUC18/*Bam* HI + *Sal* I; 3: pMDH; 4: pMDH/*Bam* HI + *Sal* I; 5: PCR 扩增产物

### 2.3 克隆片段的 Southern 杂交及序列测定

重组质粒 pMDH 中的外源插入片段经回收,制成 DIG 标记的探针,与假单胞菌的总 DNA 进行 Southern 杂交,出现明显的杂交信号,证明该片段来自假单胞菌(未示出)。该片段由大连宝生物工程有限公司测序,结果见图 3。

```

1   ATGAAAGCATTACATTTTGGCCGACGGTAATATCGGTCGGCTTATCGGTAACACTGCTG   60
61  GCAGACGCGGGTATCCAACCTGACGTTTGCCGATGTCAATCAGGTGGTACTTGATGCCCTG   120
121 AATGCCCGTCATAGCTATCAGGTACATGTGGTTGGTGAACCCGAGCAGGTAGATACCGTT   180
181 TCCGGCGTCAATGCTGTCAGCAGCATTGGTGATGATGTCGTTGATCTGATTGCTCAGGTT   240
241 GATTTAGTCACTACC GCCGTTGGCCCGGTTGTGCTGGAACGTATTGCTCCGGCAATCGCC   300
301 AAAGGGCTGGTAAACGTAAGAACAAGGTAATGAATCCCCGCTGAACATCATCGCCTGT   360
361 GAAAACATGGTACGCGGTACCACGCACTGAAAGGCCATGTGATGAACGCCCTGCCGGAA   420
421 GACGCCAAAGCGTGGGTAGAAGAACCGTTGGCTTTGTCGATTCCGCCGTTGACCCGATC   480
481 GTACCGCCTTCGGCTTCGACAACACTAACGATCCGCTGGAAGTGACGGTAGAAACTTTCAGC   540
541 GAATGGATTGTCGATAAAACGCAGTTCAAAGGCGCACTGCCGAACATCCAGGCATGGAG   600
601 TTAACCGACAACCTGATGGCATTGTCGAACGTAAACTCTTACCCTGAACACGGGTCAT   660
661 GCTATAACCGCTACCTCGGAAAACCTGGCCGGTCCATCAGACCATTCTGACGCGATTCTC   720
721 GACGAGAAAATCCGCGCGGTGGTAAAAGGTGCGATGGAAGAAAGTGGTGCAGTATTGATC   780
781 AAGCGCTACGGCTTTGACGCTGACAAGCATGCGGCGTACATCCAGAAAATCTCGGTCGT   840
841 TTTGAGAACCCTGATCTGAAAGATGATGTAGAGCGCGTAGGCCGTCAGCCGCTGCGTAAA   900
901 CTGAGTGCTGGCGACCGTCTGATCAAGCCACTGCTCGGTACGCTGGAATATGGTCTGCCA   960
961 CATAAAAACCTGATTGAAGGTATTGCCGCTGCAATGCACCTCCGCACTGAAGATGATCCG   1020
1021 CAGGCTCAGGAACTGGCAGCACTGATCGCTGACAAAAGTCCGACGGCGGCGCTGGCACAG   1080
1081 ATTTCCGGTCTTGATGCCAACACGCGAGGTTGTATCCGAGGCGGTAACCGCTTATAAAGCA   1140
1141 ATGCAATAA

```

图3 被克隆的假单胞菌目的基因的核苷酸序列

Fig.3 Nucleotide sequence of the cloned gene of *Pseudomonas* sp.cn 4902

图中,起始的 ATC 为起始密码;末尾的 TAA 为终止密码

```

A: 1 MKALHFGAGNIGRFIGKLLADAGIQ LTFADVNOVVDLALNARHSYQVHVVGTEQVDTV 60
B: 1 MLAVHFGAGNIGRFIGSLLSQSGYEVVFDINDELVRLLEKEQEYRVI IADENRQELL I 60
C: 1 MIALHFGAGNIGRFIGALLHHSGYDVVFDVNETMVSLLNEKKEYTV ELAEGRSSE I I 60
D: 1 MKALHFGAGNIGRFIGKLLADAGIQ LTFADVNOVVDLALNARHSYQVHVVGTEQVDTV 60

A 61 SGVNAVSSIGDD--VVDLI AQVDLVTAVGPPVLERIAPAIKGLVKRKEQGNESPLN I I 118
B 61 RNVSAVNSQTEREKVIDYI TKAHLITAVGPHILPAIA TILAEGLQKRIT INKT-FLH I I 119
C 61 GPVSA INSGSQTEELYRLMNEAAL-TTAVGPNVLLKLIAPSI AEBGLRRRNTAN---TLN I I 117
D 61 SGVNAVSSIGDD--VVDLI AQVDLVTAVGPPVLERIAPAIKGLVKRKEQGNESPLN I I 118

A 119 ACENMVRGTTQLKGHVMNALPEDAKAWVEEHVGFVDSAVDRIVPPSA STTNDPLEVTVET 178
B 120 ACENMIGGSDVLKSHVFEKISEADKPLFEKYYGFLNCAVDRIVF--NQKHDDPLSVVVEP 177
C 118 ACENMIGGSSFLKKEIYSHL TEAEQKSVSETLGF PNSAVDRIVF--IQHEDPLKVSVEP 175
D 119 ACENMVRGTTQLKGHVMNALPEDAKAWVEEHVGFVDSAVDRIVPPSA SATNDPLEVTVET 178

A 179 FSEWIVDKTQFKGALPNIPGMELTDNLM AFVERKLFNTGHAITAYLGKLAGHOTIRDA 238
B 178 FFEWVI EKRNII GAI PP IQGAHFVDDLKPYIERKLFVNTGHAIASYLGYYKQLTIOEA 237
C 176 FFEWVIDESGFKGKTPVINGALFVDDL TPIERKLFVNTGHAIVTAAYVGYQRGLKTVKEA 235
D 179 FSEWIVDKTQFKGALPNIPGMELTDNLM AFVERKLFNTGHAITAYLGKLAGHOTIRDA 238

A 239 ILDEKIRAVVKGAMBEESGAVLIIKRYGF DADKHAAYIQKILGRFENPYLKDDVERVGRQPI 298
B 238 MCDQEIRSDVEKALHEESGAVLVKKGWNEHEHQSYYQKIIQRFINPSISDEVVRVARSPI 297
C 236 IDHPEIRRVVHSALELE TQDYLVKSYGFKQTEHEQYI-KNQRSLLKSFHFGRCDPRSEVTS 294
D 239 ILDEKIRAVVKGAMBEESGAVLIIKRYGF DADKHAAYIQKILGRFENPYLKDDVERVGRQPI 298

A 299 RKL SAGDRLIKPIL LGTLEY-GLPHKNLIEGIAAAMHFRSEDDPQAQELAAALIADKGPQAALA 358
B 298 RKL LGANDRLIGPATQYYDLFGQVPHGLVKGIAALLFDYENDEEAVALOKTIOETGVEGALY 358
C 295 QKTGRKORLVQPAKKIKE-----P NALAEGLIAAALRFDF TGDPEAVELQALIEEKDTAAYFK 350
D 299 RKL SAGDRLIKPIL LGTLEY-GLPHKNLIEGIAAAMHFRSEDDPQAQELAAALIADKGPQAALA 358

```

图4 四种杆菌的甘露醇-1-磷酸脱氢酶多肽链的保守区域比较

Fig.4 Comparison of conserved domains of mannitol-1-phosphate dehydrogenase among 4 species of bacillus

A表示 *Pseudomonas* sp.cn 4902; B表示 *Bacillus stearothermophilus*; C表示 *Bacillus subtilis*; D表示 *Escherichia coli*。可能的保守区域已用方框表示

## 2.4 被克隆基因功能的生物信息学探讨

从图3得知,该基因长1149bp,具起始密码和终止密码,是一个较完整的基因编码框。由该基因推测的氨基酸序列通过 Search for Conserved Domains 软件在 GenBank 中与其它生物的甘露醇-1-磷酸脱氢酶保守区域进行比较,结果见图4。

图4表明,被克隆基因推测的多肽与其它3种杆菌的甘露醇-1-磷酸脱氢酶具有很高的同源性。在358个氨基酸残基中完全相同的氨基酸高达120个,63处(方框中),占33.5%。其中最大的保守区域由连续13个氨基酸残基(No.5-17)组成,连续5个以上氨基酸残基完全一致的保守区域就有6处,因此可以认为,作者克隆的基因应该是假单胞菌的甘露醇-1-磷酸脱氢酶基因。该基因已在 GenBank 登记,代号为 AY112696。

## 2.5 大肠杆菌高效表达载体的构建

为了使克隆基因在原核生物中获得正常表达,将它插入到 pBV220 的多克隆位点中构建成重组质粒 pBH,转化 *E. coli* JM101。挑取转化子,提取其中的质粒,酶切鉴定结果见图5。

如图5所示,重组质粒经 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切,获得约3.7kb的载体片段和约1.1kb的外源片段;同时重组质粒(第二栏)的分子量也明显大于原载体 pBV220。因此可以说, *mtl* D 基因确实已经插入到 pBV220 的多克隆位点中。

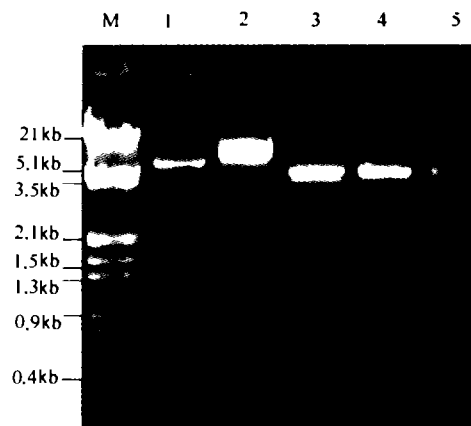


图5 重组质粒 pBH 的酶切电泳图谱

Fig.5 Electropherogram of recombinant plasmid pBH digested by restriction endonuclease  
M:  $\lambda$ DNA/*Eco*RI + *Hind*III molecular markers; 1: pBV220; 2: recombinant plasmid pBH; 3: pBH/*Bam*HI + *Sal*I; 4: pBH/*Bam*HI; 5: pBH/*Sal*I

## 2.6 假单胞菌 *mtl* D 基因在 *E. coli* JM101 中的表达

含有重组质粒 pBH 的 *E. coli* JM101 的总蛋白 SDS-PAGE 电泳后,发现在大约41kD处比对照多出一条清晰的蛋白带(未示出),其分子量与 *mtl* D 基因推测的表达产物分子量相一致。将上述电泳图谱扫描后该吸收峰清楚可见(图6)。据测算,该蛋白的表达量约占转化子总蛋白的6.7%。

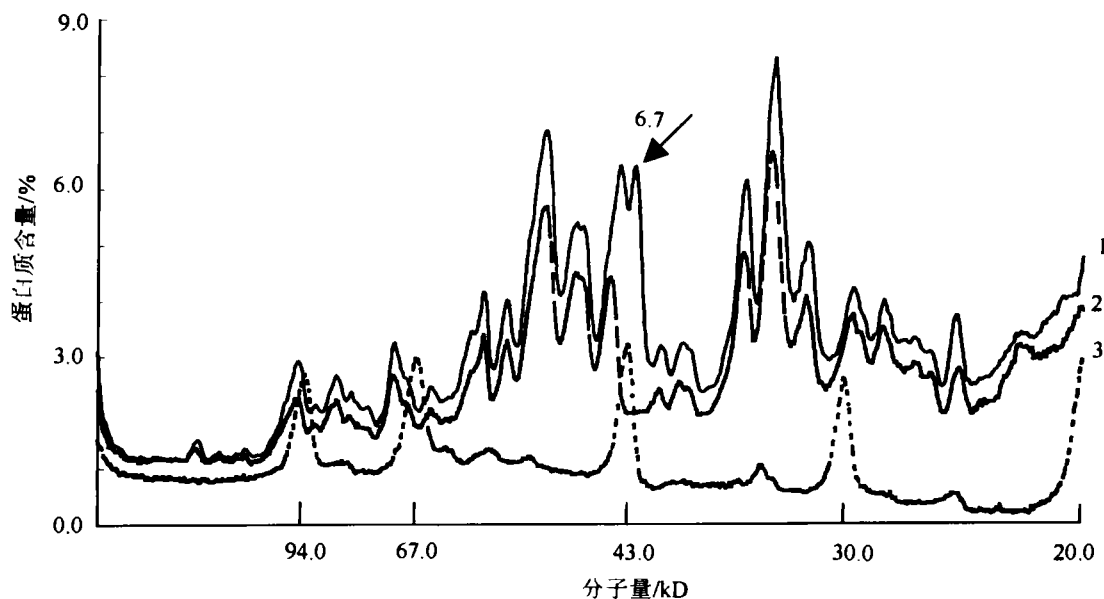


图6 转化子 *E. coli* JM101/pBH 蛋白质 SDS-PAGE 电泳扫描图谱

Fig.6 Densitometric scanning of protein of the transformant *E. coli* JM101 on SDS-PAGE  
1: Transformant *E. coli* JM101/pBH; 2: *E. coli* JM101/pBV220; 3: Markers of molecular weight

## 2.7 转化子在高盐培养基中的生长状况

将含重组质粒 pBH 的转化子培养至指数生长后期,42℃诱导 6h 后,分别涂布在含 NaCl 0.7、0.8、0.9、1.0、1.1 和 1.2mol/L 的 LB 琼脂培养基上,37℃培养 48h 后,观察重组子和对照的生长情况,结果见表 1。

表 1 含重组质粒 pBH 转化子的耐盐水平

Tab.1 Salt tolerance level of transformant with the reconstruction plasmid pBH

菌株	NaCl 浓度(mol/L)					
	0.7	0.8	0.9	1.0	1.1	1.2
<i>E. coli</i> JM101/pBV220	+++	++	+	-	-	-
<i>E. coli</i> JM101/pBH	++++	++++	++++	++	+	-

注: + 表示各种程度的生长; - 表示不能生长

表 1 显示,含重组质粒 pBH 的转化子对 NaCl 的最高耐受水平可达到 1.1mol/L,而对照仅能在含 NaCl 0.9mol/L 的培养基上勉强生长,转化子比对照的耐盐水平提高了约 22%。由于 pBH 是在 pBV220 中插入 *mtl D* 基因构成,显然是 *mtl D* 基因促使转化子提高了耐盐水平。

此外,将转化子和对照分别培养在含 NaCl 0.9mol/L 的液体培养基中 24h 后发现,对照菌的浓度仅勉强增长约 56 倍( $OD_{660}$  从 0.002 增至 0.111);与此同时,转化子却迅猛增长了约 566 倍( $OD_{660}$  从 0.002 增至 1.132),转化子的总菌数约是对照的 10.2 倍( $OD_{660} = 1.132 / OD_{660} = 0.111$ ),每  $10^6$  个转化子中的甘露醇含量是对照的 4.1 倍(9.516ng/2.326ng)。上述实验证明,转化假单胞菌的甘露醇-1-磷酸脱氢酶基因的确能使受体菌的耐盐能力显著提高。因此可以认为,该基因是一种与生物耐盐性密切相关的基因,具有良好的应用前景。

## 3 讨论

近年来,生物信息学已经成了后基因组时代研究和分析基因功能的重要手段(庄丽等,2001;王在照等,2002)。本实验对克隆基因测序后再经信息库(GenBank)多重查询,基本确定了该基因的性质,而后再通过基因转移、转化子蛋白质分析以及测定转化子在高盐培养基中的生长状态,进一步证明了本文得到的甘露醇-1-磷酸脱氢酶基因是一个与提高生物耐盐性有关的主要基因。

能否对植物抗渗透胁迫特性进行遗传改良的关键在于能否找到合成渗透调节剂的限速代谢环节及

其限速酶基因。目前已成功克隆的渗透调节限速酶基因主要有:催化谷氨酸合成脯氨酸代谢途径中的关键酶——吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS)基因(Verbruggen, 1993; Strizhov *et al*, 1997)催化胆碱合成甜菜碱的最后一个酶——甜菜碱醛脱氢酶(BADH)基因(Weretilny *et al*, 1990; McCue *et al*, 1992),以及催化甘露醇合成的关键酶——甘露醇-1-磷酸脱氢酶基因(*mtl D*)(Davis *et al*, 1988)等。甘露醇是已知的氢氧根离子清除剂,在氧化胁迫下甘露醇可以保护巯基酶类或其它巯基调控的叶绿体组分,如黄素蛋白、硫氧还原蛋白和谷胱甘肽(杜秀敏等,2001)。这说明,虽然植物对盐胁迫的抗性受多基因控制,但如能克隆并转化与盐胁迫应答的主基因或限速酶基因,通过单基因转化培育耐盐植物也是可能的。

本实验中克隆的与生物强耐盐性有关的假单胞菌甘露醇-1-磷酸脱氢酶基因为今后培育转基因耐盐作物、开发利用我国广袤的盐碱地和沿海滩涂奠定了良好的基础。

## 参 考 文 献

- 王广策,孙海宝,曾呈奎,2002. 三角褐指藻磷酸甘油酸变位酶基因可能侧翼序列的筛选、克隆及序列测定. 海洋与湖沼, 33(3): 259—264
- 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(5): 432—438
- 庄丽,陈月琴,李钦亮等,2001. 赤潮叉角藻 18S rDNA 和 ITS 区序列测定与分析. 海洋与湖沼, 32(1): 148—154
- 许祥明,叶和春,李国风,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
- 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
- 杜秀敏,殷文璇,赵彦修等,2001. 植物中活性氧的产生及清除机制. 生物工程学报, 17(2): 121—125
- 林栖凤,李冠一,2000. 植物耐盐性研究进展. 生物工程进展, 20(2): 20—25
- 谭静,刘广发,2001. 盐生盐杆菌含耐盐相关基因 DNA 片段的克隆. 厦门大学学报(自然科学版), 40(1): 146—149
- Bohnert H J, Ayoubi P, Borchert C *et al*, 2001. A genomics approach towards salt stress tolerance. Plant Physiol Biochem, 39: 295—311
- Davis T, Yamada M, Elgort M, 1988. Nucleotide sequence of the mannitol (*mtl*) operon in *Escherichia coli*. Molecular Microbiol, 2 (3): 405—412
- McCue K F, Hanson A D, 1992. Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. Plant Mol Bio, 18: 1—11

- Ruiz T, Juan M, 2001. Engineering salt tolerance in crop plants. *Trends in Plant Science*, 6: 451
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 193—207
- Strizhov N, Abraham E, 1997. Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABAI, ABAII and AXR2 in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 12 (3): 557—569
- Tarczynski M C, Jensen R G, Bohnert H J, 1993. Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Sciences*, 259: 508—510
- Verbruggen N, 1993. Osmoregulation of a pyrroline-5-carboxylate reductase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 103: 711—781
- Weretilnyk E A, Hanson A D, 1990. Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 2745—2749
- Zhu J K, 2002. Salt and drought stress signal transduction in plant. *Annu Rev Plant Biol*, 53: 247—273

## CLONING AND EXPRESSION OF MANNITOL-1-PHOSPHATE DEHYDROGENASE GENE OF *PSEUDOMONAS* sp. cn 4902

LIU Guang-Fa, TAN Jing, CHEN Qi-Wei

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

**Abstract** According to the essential characteristic of the genome of prokaryotes that no intron can be found in the genes, an attempt was made to find a new gene of mannitol-1-phosphate dehydrogenase (*mtl D*) in *Pseudomonas* sp. cn 4902 by means of PCR amplification.

Based on the short conserved sequence of the halo-tolerant-related gene in some microorganisms, a pair of primers were designed for PCR amplification with the template of genomic DNA of *Pseudomonas* sp. cn 4902. An approximate 1.1 kb DNA fragment of PCR amplification product could be found in the agarose gel electropherogram. The fragment was, then, retrieved, a poly A "tail" added and finally lined together with plasmid pMD18-T overnight to form the reconstructed vectors. The white colonies were picked out, some of them were cultivated and the plasmids were extracted in the transformants and digested by two endonucleases *Bam* H I and *Sal* I for the detection of the reconstructed vectors after agarose gel electrophoresis. The inserted DNA fragment was sequenced and transferred to the multicloned site of high efficiency expression plasmid pBV220 in *E. coli* JM101 to constitute a new plasmid named pBH. The tolerance levels against to serious concentrations of NaCl and its protein expression products were researched.

It was clear that the cloned gene was 1149bp in length and coded for 383 amino acid residuals. Using the biological informatics in GenBank we found that the nucleotide sequence and deduced amino acid residuals of this gene share more than 90% homology with the *mtl D* gene of other organisms, including *E. coli* K12. The result of protein SDS-PAGE electrophoresis of transformants indicated that a 41kD protein coincided with the molecular weight of the transferred *mtl D* gene, which was 6.7% of the total protein, was produced in this transformants under the condition of 42°C hot shock. As a result, the highest tolerant level against NaCl of the transformants cultivated in the agar LB medium was raised from 0.9 to 1.1 mol/L, which was 22% higher than that of the control. Meanwhile, the biomass of transformants cultivated in the liquid medium containing 0.9 mol/L NaCl was about ten-fold that of the control.

It was believed that the cloned gene should be a mannitol-1-phosphate dehydrogenase (*mtl D*) gene, one of the key genes responsible for osmoregulation in the cells of organisms. The successful cloning and expression of the *mtl D* gene supplied a good foundation for cultivation of halo-tolerant-related crop plants in the future.

**Key words** *Pseudomonas* sp., Mannitol-1-phosphate dehydrogenase, Halo-tolerant-related gene, Gene clone