

# 红色亚栖热菌 TPS/TPP 海藻糖合成途径中相关基因的克隆、表达及功能鉴定

朱玥明\*, 唐亦辰\*, 徐恒毅, 张娟, 魏东盛, 邢来君, 李明春

南开大学微生物学系 分子微生物学与技术教育部重点实验室, 天津 300071

**摘要:** 通过构建红色亚栖热菌(*Meiothermus ruber* CBS-01)的基因组 DNA 文库, 克隆得到该嗜热菌海藻糖合成途径中的磷酸海藻糖合成酶(TPS)和磷酸海藻糖磷酸酯酶(TPP)基因。以 pET21a 为表达载体, 将磷酸海藻糖合成酶和磷酸海藻糖磷酸酯酶在大肠杆菌中进行表达并纯化, 利用薄层层析的方法验证了这两个酶的活性。同时, 本研究检测了红色亚栖热菌在各种环境压力下细胞内含物成分的变化情况, 发现在高渗环境压力的诱导下, 该菌会在胞内积累大量的 6-磷酸海藻糖, 而非海藻糖, 这为进一步研究 TPS/TPP 和 TreS 途径在细胞体内的作用奠定了基础。

**关键词:** 红色亚栖热菌, 海藻糖, 海藻糖合成途径, 磷酸海藻糖合成酶(TPS), 磷酸海藻糖磷酸酯酶(TPP)

## Cloning, expression and functional analysis of the genes in TPS/TPP trehalose synthetic pathway of *Meiothermus ruber*

Yueming Zhu\*, Yichen Tang\*, Hengyi Xu, Juan Zhang, Dongsheng Wei, Laijun Xing, and Mingchun Li

Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071, China

**Abstract:** By constructing the genomic DNA library of *Meiothermus ruber* CBS-01, the genes of trehalose phosphate synthase (TPS) and trehalose phosphate phosphatase (TPP) involved in trehalose synthesis were cloned. The genes were cloned into the plasmid pET21a, and expressed in *Escherichia coli* Rosetta gami (DE3). The activities of these two purified enzymes were confirmed by thin layer chromatography (TLC). Meanwhile, we tested the cellular compatible solutes of *M. ruber* CBS-01 under different environmental pressure, and found that under hyperosmotic pressure, this strain can accumulate trhalose-6-phosphate, but not trehalose. These results can give more insight to future research in the roles of TPS/TPP and TreS pathway.

**Keywords:** *Meiothermus ruber*, trehalose, trehalose synthetic pathway, trehalose 6-phosphate synthase (TPS), trehalose 6-phosphate phosphatase (TPP)

海藻糖是由 2 个葡萄糖分子通过 $\alpha$ ,  $\alpha$ -1, 1-糖苷键结合而成的非还原性二糖。在自然界中, 海藻糖

广泛分布于细菌、藻类、酵母、丝状真菌、低等植物、昆虫和其他无脊椎动物体内<sup>[1]</sup>。在正常条件下,

Received: October 15, 2008; Accepted: December 10, 2008

Supported by: Tianjin Natural Science Foundation (No. 06YFJZJC02100), and National Innovative Experiment Project to University Students (No. 081005509).

Corresponding author: Mingchun Li. Tel: +86-22-23508506; Fax: +86-22-23508800; E-mail: nklimingchun@yahoo.com.cn

\* These authors contribute equally to this study.

天津市应用基础研究计划重点项目(No. 06YFJZJC02100), 国家大学生创新性实验计划(No. 081005509)资助。

海藻糖为生物体的新陈代谢贮存和提供能量<sup>[2,3]</sup>,更为重要的是,当生物体遇到干旱、高温、冷冻、高渗等环境压力时,它可以通过在生物体内的大量储备来帮助生物体抵御外界不良环境的伤害,使之在一种极低的新陈代谢状态长期生存,对生物起着不可替代的抗逆境保护作用<sup>[4,5]</sup>。由于海藻糖结构稳定,无毒性,不能被糖苷酶水解,并且能够在高温、高寒、高盐和干燥失水等恶劣条件下有效地保护生物大分子结构不被破坏,该双糖已经被广泛应用到食品、医药、化妆品和分子生物学研究等领域<sup>[6,7]</sup>。

在生物体内,目前已经发现了5条海藻糖的合成途径,如图1所示。其中,TPS/TPP途径是自然界中分布最广泛的一条海藻糖合成途径,在真细菌、古生菌、真菌、植物和某些低等无脊椎动物体内都发现了该途径<sup>[8]</sup>。该途径在6-磷酸海藻糖合成酶(Trehalose 6-phosphate synthase, TPS)和6-磷酸海藻糖磷酸酯酶(Trehalose 6-phosphate phosphatase, TPP)的共同作用下将UDP-葡萄糖和6-磷酸葡萄糖转化为海藻糖。在大肠杆菌中,编码这2个酶的基因分别被命名为*otsA*和*otsB*,这2个基因与*E. coli*细胞的渗透压抗性密切相关故而得名<sup>[9]</sup>。da Costa等克隆、异源表达了嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)的TPS和TPP基因,并详细研究了这2个酶的酶学特性<sup>[10]</sup>。在酿酒酵母中,TPS、TPP和另外2个亚基组成蛋白复合体来行使功能<sup>[11]</sup>。在其他真菌

和植物体内,海藻糖的合成也是由这种蛋白复合体催化的<sup>[8]</sup>。

在本实验室前期研究过程中,已经克隆并表达了*Meiothermus ruber* CBS-01的海藻糖合酶(TreS)基因<sup>[12]</sup>,通过进一步的基因序列比对分析,作者发现在该基因的上游与之相连的2个基因很可能是潜在的*tps*和*tpp*基因。本研究利用pET21a构建了TPS和TPP的原核表达载体,使其成功表达于大肠杆菌中,并验证了这2个酶的活性。在此基础上,作者还对红色亚栖热菌在各种环境压力下的反应情况做了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

红色亚栖热菌(*Meiothermus ruber* CBS-01)由张峻老师提供,大肠杆菌*Escherichia coli* Rosetta gami(DE3)由沈萍教授提供,大肠杆菌*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 、质粒pUC18和pET21a为本实验室保存。

#### 1.1.2 主要试剂

限制性内切酶、T4 DNA连接酶购自宝生物工程公司,Long Taq DNA聚合酶、细菌基因组DNA提取试剂盒、胶回收试剂盒购自Tiangen公司,UDP-葡萄糖、6-磷酸葡萄糖、海藻糖购自Sigma公司,Ni-NTA琼脂糖凝胶填料购自北京韦氏博慧色谱科

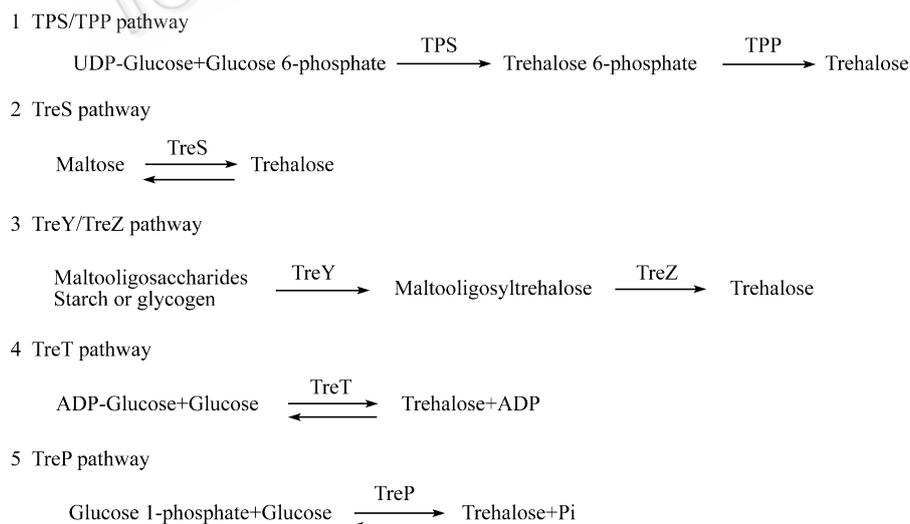


图1 海藻糖的生物合成途径及相关的海藻糖合成酶

Fig. 1 Trehalose biosynthetic pathways and enzymes involved. TPS: trehalose 6-phosphate synthase; TPP: trehalose 6-phosphate phosphatase; TreS: trehalose synthase; TreY: maltooligosyl-trehalose synthase; TreZ: maltooligosyl-trehalose trehalohydrolase; TreT: trehalose glycosyltransferring synthase; TreP: trehalose phosphorylase.

技术有限公司, 硅胶薄层层析板购自天津思利达色谱技术开发公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 培养基及培养条件

大肠杆菌培养在 LB 培养基, 克隆过程中转化子的选择用含有氨苄青霉素(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 LB 培养基, 诱导表达选用含有氨苄青霉素(200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、氯霉素(34  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和卡那霉素(15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 LB 培养基。

红色亚栖热菌保存培养基: 每升中含有有蛋白胨 1 g, 酵母粉 1 g, 氨三乙酸 100 mg,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  60 mg,  $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  100 mg, NaCl 8 mg,  $\text{KNO}_3$  103 mg,  $\text{NaNO}_3$  689 mg,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  140 mg,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.47 mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  2.2 mg,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 mg,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.5 mg,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  25  $\mu\text{g}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  25  $\mu\text{g}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  46  $\mu\text{g}$ , pH 7.8。

红色亚栖热菌生长培养基: 每升中含有有蛋白胨 5 g, 酵母粉 1 g,  $\text{NaNO}_3$  0.7 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g,  $\text{CaCl}_2$  0.1 g, pH 7.5。

### 1.2.2 TPS、TPP 基因的克隆

*M. ruber* 基因组 DNA 文库的构建: 提取 *M. ruber* 基因组 DNA, 利用超声破碎的方法将其随机断裂为 3~5 kb 的片段, 平末端补齐后, 将这些片段连接于 *Sma* I 酶切的 pUC18 载体, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。用牙签将转化子转接到 LB 培养基, 每个转化子同时接到 2 块平板上, 每块平板含有 96 个转化子(12 $\times$ 8), 并确保每个转化子在平板上的位置相同。这 2 块平板其中一块用于混合质粒筛选, 另一块为保留板。

混合质粒 PCR 方法筛选基因: 将筛选平板上的 96 个转化子分为 4 个部分(每部分 12 $\times$ 2), 用无菌水将每部分培养基上的所有菌落冲下, 提取混合质粒。根据已获得的 *treS* 基因部分序列设计引物 P1、P2, P1: 5'-CCTCACGGCTTCACCCTTTTCG-3', P2: 5'-TGCAGCTGGAGGAGGGTGAG-3'。以混合质粒为模板进行 PCR, 扩增条件为: 94 $^\circ\text{C}$  5 min; 然后按 94 $^\circ\text{C}$  30 s, 56 $^\circ\text{C}$  40 s, 72 $^\circ\text{C}$  30 s 循环 30 次; 72 $^\circ\text{C}$  保温 10 min。如果结果为阳性, 则提取保留平板对应位置的所有转化子质粒, 用引物 P1、P2 按同样条件进行 PCR 扩增。将所有具有阳性结果的转化子质粒进行

测序。

质粒的提取、DNA 的内切酶水解和连接、DNA 片段的分离、感受态细胞的制备、以及基因的转化方法均参照文献[13]。细菌基因组 DNA 提取, 从琼脂糖凝胶提取 DNA 等操作按照 Tiangen 试剂盒使用指南进行。

### 1.2.3 TPS、TPP 基因表达载体的构建

根据红色亚栖热菌 *tps* 的基因序列设计并合成引物 P3 和 P4, P3: 5'-GGAATTCATATGGGACTGGTCATCGTGG-3'(划线部分为 *Nde* I 酶切位点), P4: 5'-CGGAATTCCTCCCTCCGCCAACGAA-3'(划线部分为 *EcoR* I 酶切位点); 根据红色亚栖热菌 *tpg* 的基因序列设计并合成引物 P5 和 P6, P5: 5'-GGAATTCATATGAGGGCGGAAAACCCG-3'(划线部分为 *Nde* I 酶切位点), P6: 5'-CGGAATTCAGGTAAGTTTTCAAGTAG-3'(划线部分为 *EcoR* I 酶切位点), 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。分别用这 2 对引物, 以 *M. ruber* 的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增条件为 94 $^\circ\text{C}$  5 min; 然后按 94 30 s, 56 40s, 72 1.5 min, 循环 30 次; 72 保温 10 min。PCR 扩增结束后, 电泳检测并将 PCR 产物从胶回收后纯化, 用 *Nde* I 和 *EcoR* I 酶切、回收, 以适当比例与 *Nde* I 和 *EcoR* I 双酶切的载体 pET21a 片段混合并连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  构建含 TPS、TPP 基因片段的原核表达载体 pET21-TPS 和 pET21-TPP。

### 1.2.4 TPS、TPP 在大肠杆菌中的表达及纯化

将构建好的重组质粒转入 *E. coli* Rosetta gami(DE3), 挑取单菌落接入含有氨苄青霉素(200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、氯霉素(34  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和卡那霉素(15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )抗性的 LB 培养液中。37 $^\circ\text{C}$  过夜培养后用相同 LB 培养基洗涤菌体 3 次, 按照 0.5%的接种量接入新鲜的相同培养基中, 继续培养待  $OD_{600}$  达到 0.6~0.8 时, 加入 IPTG 并使其终浓度为 1.0 mmol/L, 20 $^\circ\text{C}$  过夜培养。离心、收集菌体, 用 10 mmol/L, pH 7.0 的磷酸钾缓冲液洗涤菌体, 并加入适量的该缓冲液悬浮菌体。超声破碎(破碎 20 s, 间隔 20 s, 共破碎 3~5 min), 12 000 r/min 离心 10 min, 所得上清液用 Ni-NTA 琼脂糖凝胶柱进行纯化, 按说明书操作。

### 1.2.5 酶活性测定

反应体系如下: A: 取 6-磷酸葡萄糖、UDP-葡萄

糖溶液各 50  $\mu\text{L}$ , 加入 50  $\mu\text{L}$  的 TPS 的纯酶液和 50  $\mu\text{L}$  的 TPP 的纯酶液; B: 取 6-磷酸葡萄糖、UDP-葡萄糖溶液各 50  $\mu\text{L}$ , 只加入 50  $\mu\text{L}$  的 TPS 的纯酶液; C: 在 B 的反应产物中加入 50  $\mu\text{L}$  的 TPP 的纯酶液; 6-磷酸葡萄糖、UDP-葡萄糖均以 10 mmol/L、pH 7.0 的磷酸钾缓冲液配制, 浓度为 50 mmol/L。过夜反应后, 采用薄层层析法(TLC)对各体系的反应产物进行鉴定。薄层层析展层剂: 正丁醇-乙醇-水(体积比为 5:3:2); 显色剂: 10% 硫酸。

### 1.2.6 红色亚栖热菌在高渗环境诱导下细胞内含物的测定

培养条件如下: A: 将 *M. ruber* 于含有 1% NaCl、1% NaCl 和 0.5% 麦芽糖、1% NaCl 和 0.5% 海藻糖的生长培养基中过夜培养; B: 将 *M. ruber* 在生长培养基中过夜培养, 加入无菌的 NaCl 饱和溶液, 并调整体系中 NaCl 的浓度为 1%、2%、3%、4%、5%, 继续培养 1 h。将所收获菌体超声破碎, 12 000 r/min 离心 10 min, 利用高效液相色谱法测定上清液中糖分的组成。

高效液相色谱法(HPLC): 检测器为示差折光检测器 Waters 410, 分析柱为 Hypersil NH2, 流动相 80% 乙腈, 柱温 28 $^{\circ}\text{C}$ , 流速 1 mL/min, 进样量 20  $\mu\text{L}$ 。

## 2 结果

### 2.1 TPS、TPP 基因的克隆

通过构建 *M. ruber* 的基因组 DNA 文库, 共获得大约 25 000 个转化子, 库容量约为 100 Mbp, 满足下一步的筛选要求。通过对第 1 批 2500 个转化子进行混合质粒 PCR, 有 3 组混合质粒显示出阳性结果, 进而对这 72 个转化子的质粒进行第 2 轮 PCR, 从每组中各筛选得到 1 个具有阳性结果的转化子。图 2 显示具有阳性结果的混合质粒和单个转化子质粒的 PCR 结果。测序结果表明, 已经获得了 TPS 和 TPP 的全长基因, TPS 基因全长 1350 bp, 所编码蛋白分子量推测为 51 kD, TPP 基因全长 690 bp, 编码蛋白的分子量推测为 25 kD。目前这 2 个基因的序列已经被 GenBank 收录, 编号分别为: FJ360766 和 FJ360767。

### 2.2 TPS、TPP 基因原核表达载体的构建

以 *M. ruber* 菌的基因组 DNA 为模板进行 TPS、TPP 基因的 PCR 扩增, 电泳检测结果表明, 分

别在 1.4 kb 和 700 bp 附近有一条很亮的扩增带, 而且没有明显的非特异条带(图 3)。分别将 PCR 产物克隆至大肠杆菌表达载体 pET21a 中, 构建出重组质粒。用 PCR 和双酶切的方法对重组质粒进行鉴定, 结果证实 TPS、TPP 基因都已插入到表达载体中。

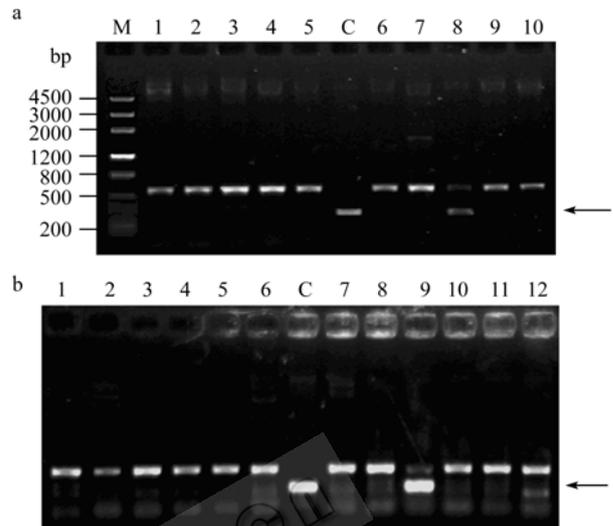


图 2 混合质粒和单个转化子质粒的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR results of the mixed-plasmids and individual transformants plasmids. (a) PCR screening of mixed transformants. M: DNA molecular mass marker; C: the *M. ruber* genomic DNA was used as templates; 1-10: plasmids of mixed transformants were used as templates. (b) PCR screening of individual transformants. C: the *M. ruber* genomic DNA was used as templates; 1-12: plasmids of individual transformants from the positive mixed transformants were used as templates. The arrows show the correct PCR products.

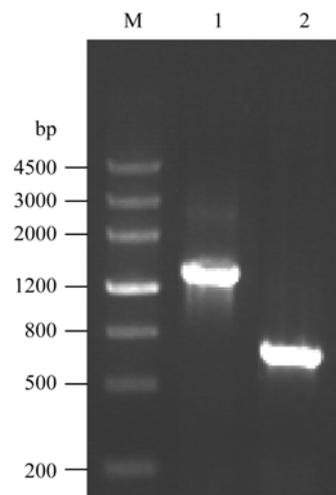


图 3 TPS、TPP 基因的扩增结果

Fig. 3 PCR products of TPS and TPP genes. M: DNA molecular mass marker; 1: PCR product of TPS gene; 2: PCR product of TPP gene.

### 2.3 TPS、TPP 基因在大肠杆菌中的表达及纯化

将重组质粒 pET21-TPS、pET21-TPP 和质粒 pET21a 分别转化大肠杆菌 *Rosetta gami*(DE3)。诱导表达后, 收集菌体细胞进行 SDS-PAGE(分离胶的浓度为 10%), 考马斯亮蓝染色的结果见图 4a。从电泳图谱上可以看出, 含有重组质粒 pET21-TPS 和 pET21-TPP 的大肠杆菌分别在分子量 50 kD 和 25 kD 处有明显的蛋白表达带, 由此可知 TPS 和 TPP 基因在大肠杆菌中实现了表达。表达菌破碎后的上清液用 Ni-NTA 琼脂糖凝胶柱纯化重组蛋白。取少量纯化产物进行 SDS-PAGE 分析, 如图 4b 所示, 可见所得酶液较纯, 分子量与纯化前一致。

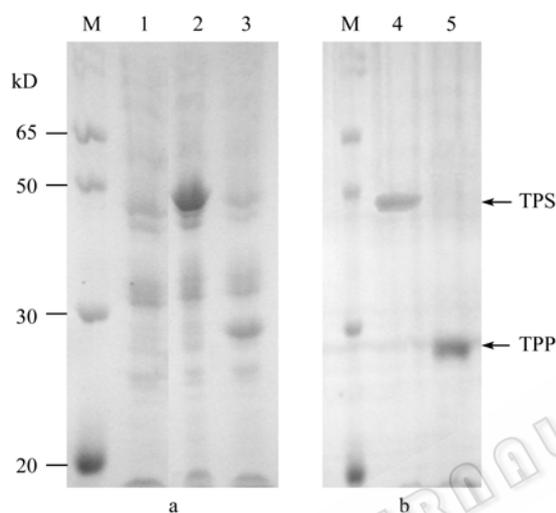


图 4 SDS-PAGE 检测重组蛋白在 *E. coli Rosetta gami* (DE3) 中的表达(a)及纯化情况(b)

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant protein expressed in *E. coli Rosetta gami* (DE3) (a) and enzymes purified (b). M: protein molecular weight marker; 1: *E. coli Rosetta gami* (DE3) containing pET21a induced with IPTG; 2: *E. coli Rosetta gami* (DE3) containing pET21-TPS induced with IPTG; 3: *E. coli Rosetta gami* (DE3) containing pET21-TPP induced with IPTG; 4: TPS purified by Ni-NTA Sepharose; 5: TPP purified by Ni-NTA Sepharose.

### 2.4 TPS、TPP 基因的功能验证

1.2.5 中 A、B、C 三种反应体系的反应产物的薄层层析如图 5 所示。以 6-磷酸葡萄糖和 UDP-葡萄糖为底物, 加入 TPS 和 TPP 反应后所得产物应为海藻糖; 先加入 TPS 充分反应后, 再加入 TPP 反应后所得的产物亦为海藻糖; 只加入 TPS 反应后得到 TPS/TPP 途径的中间代谢产物——6-磷酸海藻糖。

### 2.5 *M. ruber* 对环境压力的反应

按照表 1 中所列出的培养条件对 *M. ruber* 加以

外界压力, 利用 HPLC 测定细胞内所积累的物质。通过与标准品出峰时间的对比, 发现外界压力下, 在该菌细胞内积累的物质是 6-磷酸海藻糖(6-P-Tre), 而非海藻糖; 而且在培养基中加入麦芽糖或者海藻糖, 菌体内也没有出现海藻糖的积累。6-P-Tre 的积累量与 NaCl 的诱导剂量呈现正比关系, 具体数值如表 1 所示。



图 5 TPS、TPP 作用产物的薄层层析

Fig. 5 TLC analysis of the *in vitro* TPS/TPP reaction. 1: glucose 6-phosphate (6-P-Glc) standard; 2: UDP-glucose (UDP-Glc) standard; 3: trehalose standard; 4: reaction product of TPS/TPP using 6-P-Glc and UDP-Glc as substrate; 5: reaction product of TPP using the product of line 4 as substrate; 6: reaction product of TPS using 6-P-Glc and UDP-Glc as substrate.

表 1 红色亚栖热菌在高渗条件下积累 6-磷酸海藻糖的含量

Table 1 The content of trehalose 6-phosphate in *M. ruber* under hyperosmotic pressure

Cultivate conditions	Content of trehalose 6-phosphate ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ )	
Control	0	
Induced after cultivate	1% NaCl	$6.01 \pm 0.5$
	2% NaCl	$14.85 \pm 0.2$
	3% NaCl	$23.81 \pm 0.2$
	4% NaCl	$32.26 \pm 0.3$
	5% NaCl	$36.05 \pm 0.6$
Induced during cultivate	1% NaCl	$6.90 \pm 0.2$
	1% NaCl + 0.5% maltose	$7.35 \pm 0.1$
	1% NaCl + 0.5% trehalose	$8.12 \pm 0.1$

### 3 讨论

作为一种嗜热菌,红色亚栖热菌基因组的 GC 含量很高,达到 62%<sup>[12]</sup>,而且其基因组内部的酶切位点较少,这使得接头 PCR<sup>[14]</sup>、TAIL-PCR<sup>[15]</sup>等获得已知基因侧翼序列的方法并不适用。因此,在克隆 *M. ruber* 海藻糖合成酶相关基因的过程中,本研究对传统的筛选基因组文库的方法进行了改进,利用混合质粒 PCR 的方法对基因组 DNA 文库进行了筛选,在较短时间内成功获得了 TPS、TPP 等海藻糖合成相关的基因。

TPS 是 TPS/TPP 海藻糖合成途径中的关键酶,本研究将已报道的 TPS 氨基酸序列通过 CLUSTAL X 1.83 进行序列对比,然后通过 MEGA 2.1 按邻连接法 (Neighbor-Joining method) 构建 Bootstrap consensus tree,结果如图 6 所示。从图中可以看出,分枝结核杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)和谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)的 TPS 属于单独的一个类群中,这可能是由于海藻糖是分枝杆菌和棒状杆菌细胞壁的重要组成部分之一<sup>[16,17]</sup>,海藻糖的合成对这些细菌的生长尤为重要,故而其 TPS 在进化中的地位与一般细菌不同。

序列分析显示,红色亚栖热菌的 TPS、TPP 和

TreS 三个基因紧密相连,组成一个操纵子类似的结构(Operon-like structure),这种结构与嗜热栖热菌海藻糖合成相关基因在基因组中的分布一致<sup>[18]</sup>。进一步的序列比对分析还发现,红色亚栖热菌 TPS、TPP 和 TreS 的氨基酸序列与嗜热栖热菌相似性很高,相同性分别高达 74%、76%和 75%。根据报道,嗜热栖热菌能够在高盐浓度的培养基中生长,其耐受 NaCl 的最高浓度可达到 5%,并能够在体内积累大量的海藻糖;该文献还利用基因缺失突变的技术证明了海藻糖的生成来自 TPS/TPP 途径,而并非 TreS 途径<sup>[18]</sup>。本研究测定了红色亚栖热菌对高渗环境的耐受力 and 胞内积累物质的情况。结果发现红色亚栖热菌只能在含有 1% NaCl 的培养基中生长,而当 NaCl 浓度提高到 2%或以上时,该菌不能生长;而且胞内积累的物质并不是海藻糖而是 6-磷酸海藻糖,先培养菌体再改变培养基中 NaCl 浓度加以诱导的结果进一步证明了该点。作者推测,当培养基渗透压增大后,*M. ruber* 的 TPS 大量表达,并生成 6-磷酸海藻糖,而 TPP 蛋白在表达方面可能具有一定缺陷,不能将生成的 6-磷酸海藻糖转化为海藻糖,导致该菌不能在高于 2% NaCl 的培养基中生长。目前作者正尝试利用 Western blotting 和基因缺失突变等方法进一步详细研究 TPS、TPP 在 *M. ruber* 细胞内的作用。

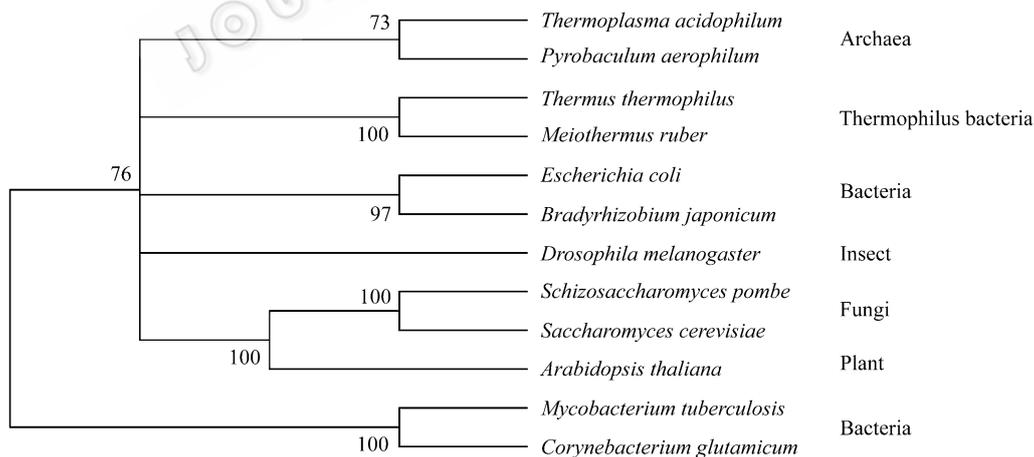


图 6 TPS 的系统进化分析

Fig. 6 Phylogenetic relationship between TPS from various organisms. Sequence alignment and phylogenetic tree were done by using CLUSTAL X v.1.83 and MEGA v.2.1. *Thermoplasma acidophilum* (NP\_394666), *Pyrobaculum aerophilum* (NP\_559183), *Thermus thermophilus* (AAQ16095), *Meiothermus ruber* (FJ360766), *Escherichia coli* (CAA48913), *Bradyrhizobium japonicum* (NP\_766962), *Drosophila melanogaster* (NP\_608827), *Schizosaccharomyces pombe* (CAB95998), *Saccharomyces cerevisiae* (NP\_009684), *Arabidopsis thaliana* (NP\_173143), *Mycobacterium tuberculosis* (NP\_218007), *Corynebacterium glutamicum* (YP\_226865).

## REFERENCES

- [1] Elbein AD, Pan YT, Pastuazak I, *et al.* New insights on trehalose: A multifunctional molecule. *Glycobiology*, 2003, **13**(4): 17R–27R.
- [2] Argüelles JC. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeast: A comparative analysis. *Arch Microbiol*, 2000, **174**(4): 217–224.
- [3] Thevelein JM. Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol Rev*, 1984, **48**(1): 42–59.
- [4] Crowe JH, Crowe LM, Chapman D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organism: the role of trehalose. *Science*, 1984, **223**: 701–703.
- [5] Hounsa CG, Brandt EV, Thevelein J, *et al.* Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology*, 1998, **144**(3): 671–680.
- [6] Schiraldi C, Di Lernia I, De Rose M. Trehalose production: exploiting novel approaches. *Trends Biotechnol*, 2002, **20**(10): 420–425.
- [7] Richards AB, Krakowka S, Dexter LB, *et al.* Trehalose: A review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food Chem Toxicol*, 2002, **40**(7): 871–898.
- [8] Avonce N, Mendoza-Vargas A, Morett E, *et al.* Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evol Biol*, 2006, **6**: 109.
- [9] Kaasen I, Falkenberg P, Styrvold OB, *et al.* Molecular cloning and physical mapping of the otsBA genes upon exposure, which encode the osmoregulatory trehalose pathway of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1992, **174**(3), 889–898.
- [10] Silva Z, Alarico S, da Costa MS. Trehalose biosynthesis in *Thermus thermophilus* RQ-1: Biochemical properties of the trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase. *Extremophiles*, 2005, **9**(1): 29–36.
- [11] Bell W, Sun W, Hohmann S, *et al.* Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. *J Biol Chem*, 1998, **272**(50): 33311–33319.
- [12] Zhu Y, Zhang J, Wei D, *et al.* Isolation and identification of a thermophilic strain producing trehalose synthase from geothermal water in China. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, **72**(8): 2019–2024.
- [13] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [14] Rosenthal A, Jones DS. Genomic walking and sequencing by oligo-cassette mediated polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18**(10): 3095–3096.
- [15] Liu YG, Whittier RF. Thermal asymmetric interlaced PCR: Automatable amplification and sequencing of insert and fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics*, 1995, **25**(3): 674–681.
- [16] De Smet KA, Weston A, Brown IN, *et al.* Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria. *Microbiology*, 2000, **146**(1): 199–208.
- [17] Tzvetkov M, Klopprogge C, Zelder O, *et al.* Genetic dissection of trehalose biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*: Inactivation of trehalose production leads to impaired growth and an altered cell wall lipid composition. *Microbiology*, 2003, **149**(7): 1659–1673.
- [18] Silva Z, Alarico S, Nobre A, *et al.* Osmotic adaptation of *Thermus thermophilus* RQ-1: a lesson from a mutant deficient in the synthesis of trehalose. *J Bacteriol*, 2003, **185**(20): 5943–5952.

## 本期广告索引

企业	版位	企业	版位
GE Healthcare 公司	封底	美国 Promega 公司	内页
Roche 诊断产品有限公司	封二	生物谷网站	内页
赛默飞世尔科技有限公司	封三	上海国强生化工程装备有限公司	内页
泰州贝今生物技术有限公司	内页	镇江东方生物工程公司	内页