

深海来源低温诱导表达载体 pSW4 的构建及其应用

程瑞雪 蹇华哗 许冠鹏 王凤平*

(上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240)

摘要:【目的】在深海来源穿梭载体 pSW2 的基础上构建低温诱导高效表达载体, 为最终获得环境污染物高效降解菌提供基础和工具。【方法】通过最小化敲除实验确定载体必需基因, 以绿色荧光蛋白 GFP 为报告基因检测载体的表达能力变化, 进一步添加纯化标签、多克隆位点及替换启动子等改造获得低温诱导表达载体 pSW4。【结果】敲除实验结果显示编码单链结合蛋白的基因 *fpsB* 敲除后载体的表达效率显著提高。以 GFP 为报告基因检测发现, pSW4 的表达效率较 pSW2 有显著提升(4 °C 条件下提高 10.7 倍)。以深海细菌 *Shewanella piezotolerans* WP3 为宿主菌, 应用 pSW4 为表达载体表达深海细菌 *Shewanella psychrophila* WP2 的聚合酶亚基, 检测显示其在 Mg^{2+} 条件下具有切割单链 DNA 的核酸酶活性, 而在 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 条件下具有切割双链 DNA 的核酸酶活性。【结论】构建了低温诱导表达载体 pSW4, 并证实了其适用性, 有助于今后构建环境修复菌及相关的应用性研究。

关键词: 低温诱导, 载体构建, 深海细菌, 环境污染修复

Construction of cold inducible expression vector pSW4 and expression of DNA polymerase III epsilon subunit

CHENG Rui-Xue JIAN Hua-Hua XU Guan-Peng WANG Feng-Ping*

(State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: [Objective] Deep-sea derived shuttle vector pSW2 has been constructed previously. In this study, a cold inducible expression vector was constructed based on pSW2 to provide useful explant materials and toolbox for the construction of an engineered strain that can degrade environmental pollutants. [Methods] Mutation experiments were performed to identify essential gene in the vector, and green fluorescent protein (GFP) was used as reporter gene to test the expression efficiency of mutated vectors. Finally, the cold inducible vector pSW4 was constructed by adding purification tags and multiple cloning sites, and by replacing of the promoter region. [Results] The mutation experiment indicated that the GFP intensity was significantly increased by deletion of *fpsB* gene, which encodes the ssDNA binding protein. The expression efficiency of pSW4

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31290232)

*Corresponding author: Tel: 86-21-34204503; E-mail: fengpingw@sjtu.edu.cn

Received: May 09, 2016; Accepted: June 03, 2016; Published online (www.cnki.net): October 09, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31290232)

*通讯作者: Tel: 86-21-34204503; E-mail: fengpingw@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2016-05-09; 接受日期: 2016-06-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-10-09

was higher than that of pSW2 (10.7-fold at 4 °C) by using GFP as reporter gene. The *sps01203* gene in the deep-sea bacterium *Shewanella psychrophila* WP2 was successfully expressed using *Shewanella piezotolerans* WP3 as expression host and pSW4 as expression vector. Subsequent assay indicated that the protein possesses nuclease activity. Specifically, Mg^{2+} is essential for the ssDNA substrate, whereas Mg^{2+} or Mn^{2+} is required for the dsDNA substrate. **[Conclusion]** A cold-induced expression vector pSW4 has been successfully constructed, and its applicability has been verified. Thus, our study will contribute to the further applied research of bioremediation bacterium.

Keywords: Cold induction, Vector construction, Deep-sea bacterium, Bioremediation

海洋作为地球上最大的生态系统,蕴含着丰富的生物基因资源^[1-2]。*Shewanella* 菌属广泛分布于包括深海在内的各类环境中,具有强大的呼吸能力,能够使用十几种甚至几十种不同的电子受体进行厌氧呼吸,它们不仅能够利用锰铁等常见的金属氧化物,还能够利用很多不常见的金属或者非金属物质作为电子受体,例如铀、铬、镉、镓、钪、钒、碘、硒、碲等,甚至还有一些菌株能够还原芳香族化合物,这使得 *Shewanella* 菌属在环境生物修复(如放射性污染的环境)和微生物燃料电池方面有着巨大的应用潜力^[3-5]。

由于绝大多海洋微生物,特别是深海微生物无法在实验室操作环境下获得纯培养,因此,蛋白异源表达是获取深海生物基因资源的重要途径之一^[6-7]。但是目前常用的蛋白系统在表达深海来源蛋白时经常出现基因不表达、蛋白失活及形成包涵体等问题,这在很大程度上限制了深海生物基因资源的开发利用^[8-9]。目前已报道的唯一利用深海细菌构建表达系统的尝试来自于 *Photobacterium profundum* SS9,其分离自 2 500 m 水深的深海沉积物。Lauro 等利用接合转移自杀载体 pEE3 和表达载体 pJN105 中的元件构建了表达载体 pFL190 (9 538 bp),并用其在 *P. profundum* SS9 中表达了 β -Galactosidase,活性检测发现其效率约为以 *Escherichia coli* 为宿主的 18%^[10]。

深海细菌 *Shewanella piezotolerans* WP3 分离自西太平洋 1 914 m 水深的深海沉积物中,为兼性厌氧菌,能利用多种物质作为电子受体生长^[11-12]。其生长温度范围在 0–28 °C 之间,压力范围 0.1–50 MPa^[13],可作为深海来源基因表达的良好宿主菌。前期的研究中,我们已经将 WP3 包含天然噬

菌体 SW1 改造成为穿梭质粒 pSW2 (表 1),其可在大肠杆菌及希瓦氏菌中稳定复制^[14]。虽然该载体能够在 WP3 中表达异源蛋白,但是其中仍然存在一些非必需基因,可进一步进行最小化改造。另外,pSW2 低温诱导效率偏低,缺少蛋白纯化标签,因此还需要进一步的优化。本研究通过对 pSW2 优化改造构建高效低温诱导表达载体 pSW4,并且表达深海来源的聚合酶亚基。本研究得到的深海低温表达系统 WP3-pSW4 为今后环境污染物高效降解菌的构建提供了较好的工具和经验参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株和质粒: 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、WM3064 和 BL21(DE3)由本实验室保藏,WP3 Δ SW1 菌株(不含有噬菌体 SW1 的 *S. piezotolerans* WP3 菌株)由本实验室构建并保藏。穿梭质粒 pSW2 由本实验室构建,克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司,表达载体 pSW4-01203 (包含 *sps01203* 编码序列的 pSW4 表达载体)由本研究构建。

1.1.2 培养基: 2216E 培养基(g/L):酵母膏 1.0,蛋白胨 5.0,NaCl 34.0,琼脂 15.0,pH 7.0;LB 培养基(g/L):酵母膏 5.0,蛋白胨 10.0,NaCl 10.0,琼脂 15.0,pH 7.0;LCD 培养基:LB 培养基加 0.1 氯霉素贮存液和 0.1% DAP (二氨基庚二酸)贮存液。

1.1.3 主要试剂和仪器: 蛋白染色液(5.0 g 考马斯亮蓝 R-250,100 mL 甲醇,300 mL 冰醋酸,去离子水至 1 000 mL);蛋白脱色液(100 mL 甲醇,300 mL 冰醋酸,去离子水至 1 000 mL);5 \times SDS-PAGE 电泳缓冲液(3% Tris-HCl,1% SDS,14.4%甘氨酸,

pH 8.3); 15%尿素变性缓冲液(480 g 8 mol/L Urea , 142.5 g 丙烯酰胺 , 7.5 g 甲叉丙烯酰胺 , 50 mL 10×TBE , 去离子水至 1 000 mL); 15% 8 mol/L 尿素变性聚丙烯酰胺凝胶(35 mL 15% 8 mol/L 尿素变性缓冲液 , 220 mL 10% AP , 17.5 mL TEMED); 核酸酶反应 Buffer (20 mmol/L Tris-HCl , 0.2 mol/L NaCl , 2 mmol/L DTT , 2 mmol/L Mg²⁺ , pH 8.0); 酶活反应终止液(90% Formanide , 0.25% SDS , 0.25%溴酚蓝 , 100 mmol/L EDTA); DNA 限制性内切酶为 TaKaRa 公司产品 ; KOD 酶为 TOYOBO 公司产品 ; DNA 重组酶 ClonExpress 为 Vazyme 公司产品 ; 质粒抽提和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒

购自 Omega 公司 ; RNase A、氯霉素、卡那霉素等均购自上海生工生物工程公司 ; 其余试剂均为进口分装或国产分析纯。高压蒸汽灭菌锅 GI54DW 型 , 美国致微仪器公司 ; 超净工作台 ZHJH-C1115C 型、恒温培养箱 ZDP-2160 型 , 上海智诚分析仪器制造有限公司 ; 可见分光光度计 UV-2550 型 , 日本岛津公司 ; 高速冷冻离心机 CR21G III 型 , 日本 HITACHI 公司 ; 恒温培养振荡器 HZQ-X100 型 , 江苏太仓市实验设备厂 ; 酶标仪 SYNERGY H1 , 美国 BioTek 仪器有限公司。

1.1.4 引物: 引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成 , 引物序列见表 1。

表 1 实验所用引物	
Table 1 Primers used in this study	
引物及用途 Primer and application	核苷酸序列 Nucleotide sequence (5'→3')
载体构建 Vector construction	
pSW2PR1869-For	GGGAATCCTGCTCTGCGAGGAAGGCATACCCTGACGGTGC
pSW2PR1869-Rev	GCGACGCGTGCATGCCTGCAGAGGCTGTTTAACTCTGACTCAACA
pSW2-For	TGCAGGCATGCACGCGTC
pSW2-Rev	CCTCGCAGAGCAGGATTCC
ΔfpsB-For	AATACATAAACTATGACTGAATTTA
ΔfpsB-Rev	TCAGTCATAGTTTATGTATTCCTAT
MCS+His-Tag-For	TCAGAGTTAAAAACAGCCTATGCGATCGGGGCCCA
MCS+His-Tag-Rev	GGTACCGAGCTCCTCGAGGTGATGATGATGATGAT
pSW3-For	CTCGAGGAGCTCGGTACCCGGGGAT
pSW3-Rev	ATCAAGACAGCGCAATCACCAAAGACTTGAACGTC
GFP-For	GTCAGAGTTAAAAACAGCCTCATGGTGAGCAAGGGCGAGG
GFP-Rev	GCGACGCGTGCATGCCTGCATTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
pSW4-For	TGCAGGCATGCACGCGTC
pSW4-Rev	GAGGCTGTTTAACTCTGACTCAACA
缺失突变 Deletion mutation	
pSW2ΔfpsBCD-For	AGCGGGCCCTTAGGCGCATTCAAATAAAT
pSW2ΔfpsBCD-Rev	AGCGGGCCCTTATGTATTCCTATTTATT
pSW2ΔfpsCD-For	AGCGGGCCCTTAGGCGCATTCAAATAAAT
pSW2ΔfpsCD-Rev	AGCGGGCCCATAGATCCCTTTATAGCGT
pSW2ΔfpsA-For	AGCGGGCCCCCTTGACTCGTGTCAATAA
pSW2ΔfpsA-Rev	AGCGGGCCCTGTAGCGTTGTGGCCTAGTT
pSW2ΔfpsB-For	AGCGGGCCCTATGACTGAATTTAAGCGT
pSW2ΔfpsB-Rev	AGCGGGCCCTTATGTATTCCTATTTATT
pSW2ΔfpsC-For	AGCGGGCCCATGAATACATTGATGATT
pSW2ΔfpsC-Rev	AGCGGGCCCATAGATCCCTTTATAGCGT
pSW2ΔfpsD-For	AGCGGGCCCTTAGGCGCATTCAAATAAAT
pSW2ΔfpsD-Rev	AGCGGGCCCGTTATTTGTTTCCTAACTGC
pSW2ΔfpsR-For	TTGGGGGCCCTTTGTTGCCCCCTTT
pSW2ΔfpsR-Rev	CACGGGGCCCCGACGCGTGCATGCC
蛋白表达克隆 Protein expression	
pSW4-01203-For	CATCATCACGCGCGCCCCGCGGATGAACATAGTTTCTAGTGCAAAAAGG
pSW4-01203-Rev	ATGATGATGATGATGAGGCCTTATTACGCCAGGCACAAA

1.2 实验方法

1.2.1 pSW2 突变载体的构建: 设计引物从 pSW2 中扩增两端各含有一个 *Apa* I 酶切位点的片段(表 1), PCR 反应体系和条件参照 KOD-Plus-Neo 说明书, *Apa* I 酶切割 PCR 产物, 反应条件参照 TaKaRa *Apa* I 说明书, 切胶回收上述酶切产物后, T4 连接酶连接过夜, 将连接产物转化感受态 WM3064, 涂布抗生素平板 LCD 37 °C 培养, 菌落 PCR 筛选阳性克隆划线至新的 LCD 平板, 最后待划线平板长出克隆后酶切验证突变载体是否构建成功。

1.2.2 质粒转化 *E. coli*: 提取质粒采用 42 °C 热激 (DH5 α /BL21 : 45 s ; WM3064 : 90 s) 的方法转化到 *E. coli* 感受态细胞: 将目的 DNA (质粒 : 50 ng ; 重组片段 : 2 ng) 加入到 50 μ L 感受态细胞(冰浴融化)中混匀并置于冰上 30 min, 转移到 42 °C 水浴热激 45/90 s, 接着立即置于冰水中 2 min, 加入 5 倍体积的 LB 液体培养基(感受态为 WM3064 时, 需添加 DAP 缓冲液)于 37 °C、200 r/min 活化 1 h, 涂布在抗生素平板中培养过夜, 最后筛选鉴定克隆子。

1.2.3 接合转移: 将包含有 pSW2 系列质粒的 WM3064 菌株和 WP3 菌株分别于 LB+Chl⁺+DAP (LCD)和 2216E 培养基中, 37 °C 或 20 °C、200 r/min 培养过夜。转接 WM3064 菌株于 LB+DAP 培养基、转接 WP3 于 2216E 培养基 37 °C 或 20 °C、200 r/min 培养 5 h, 按照 1:2、1:1、2:1 的比例混合两种菌液, 分别取 100 μ L 混合菌液点在 2216E+DAP 平板上, 28 °C 避光放置 24 h 后用 5 mL 2216E 液体培养基冲洗平板, 并将冲洗液涂布于 2216E+Chl⁺平板并置于 20 °C 培养 72 h, 筛选验证克隆子, 将阳性克隆活化后保存。

1.2.4 GFP 荧光强度检测接合转移: 分别将带有不同载体的 WP3 菌株在 20 °C/4 °C、200 r/min 培养至平台期, 取菌液测试其荧光强度(测定条件: 酶标仪, 25 °C, 激发波长为 460 nm, 发射波长为 490 nm)^[10], 各实验重复 3 次, 并计算标准差。

1.2.5 蛋白纯化: 4 °C、8 000 \times g 离心 5 min 收集菌

液, 加入 Binding buffer 重悬菌体并涡旋振荡均匀后超声破碎细胞, 混合液经 4 °C、12 000 \times g 离心 15 min 收集上清蛋白液, 同时用 Binding buffer 平衡 Ni 柱, 将收集的上清液缓慢流经平衡后的 Ni 柱后利用 Washing buffer 冲洗非特异结合的杂蛋白, 咪唑洗脱液按照 1 mL 的量依次收集 5 管到 4 °C 预冷的离心管内, 最后将洗脱的蛋白上样 SDS- PAGE 检测。

1.2.6 蛋白脱盐处理: 蛋白脱盐采用 GT-600 微量离心脱盐柱: 将脱盐柱放在 2 mL 收集管中 1 000 \times g 离心 2 min 去除储存液, 用交换液平衡柱子后缓慢加入蛋白缓冲液样品, 静置 2 min 让凝胶充分吸收样品, 将柱子放到一个新的离心管中 1 000 \times g 离心 4 min, 收集脱盐后蛋白液。

1.2.7 DNA 核酸酶活性测定: 首先在冰上加入如下反应体系: 底物(ssDNA/dsDNA) 1 μ L, Reaction buffer 1 μ L (Tris-HCl 20 mmol/L, NaCl 200 mmol/L, DTT 2 mmol/L, Mg²⁺ 2 mmol/L, pH 8.0), 蛋白纯化液 0.5 μ L (约 0.5 mg/mL), 金属离子(Mn²⁺/Ca²⁺/Co²⁺/Mg²⁺/Ni²⁺/Cu²⁺) 20 mmol/L, 去离子水 6.5 μ L, 混合均匀后将体系置于 15 °C 反应 30 min, 1:1 加入反应终止液置于 95 °C 5 min 终止反应, 最后上样 Urea-denatured PAGE 检测核酸酶活性。

2 结果与分析

2.1 鉴定 pSW2 中的非必需基因

穿梭载体 pSW2 (6 451 bp)由深海丝状噬菌体 SW1 改造而来, 因而保留一些与载体复制无关的基因, 如编码衣壳蛋白(*fpsC*, *fpsD*)和单链结合蛋白(*fpsB*)的基因(表 2)。因此, 我们首先对这些片段进行了缺失验证, 从而确定 pSW2 中可以删减的序列。通过反向 PCR 的方法构建了单基因缺失的 pSW2 突变质粒 pSW2 Δ *fpsB*、pSW2 Δ *fpsC* 和 pSW2 Δ *fpsD*, 多基因缺失的 pSW2 突变质粒 pSW2 Δ *fpsCD* 和 pSW2 Δ *fpsBCD*。所得质粒转入 *E. coli* WM3064 菌株, 经双酶切验证正确(图 1)后再通过接合转移导入 WP3, 根据接合转移是否成功判断该序列是否为 pSW2 复制所必需(表 3)。

根据不同缺失突变载体的接合转移实验结果, 判定 pSW2 质粒上可敲除片段包括 *fpsB*、*fpsC*、*fpsD*。另外, *fpsCD* 也可同时敲除。编码复制蛋白的基因 *fpsA* 敲除后, 接合转移无法成功, 说明 *fpsA* 对于 pSW2 在 WP3 中复制是必需的(表 3)。

表 2 pSW2 载体序列说明				
Table 2 pSW2 vector information				
名称	链	大小	位置	功能注释
Name	Strand	Length (aa)	Location	Function
<i>fpsA</i>	+	541	672–2 297	复制蛋白
<i>fpsB</i>	+	104	2 359–2 673	单链结合蛋白
<i>fpsC</i>	+	61	2 496–2 681	主要衣壳蛋白
<i>fpsD</i>	+	79	2 775–3 014	次要衣壳蛋白
ChlR	–	220	3 218–3 878	氯霉素抗性基因
<i>fpsR</i>	–	116	6 146–50	调控蛋白

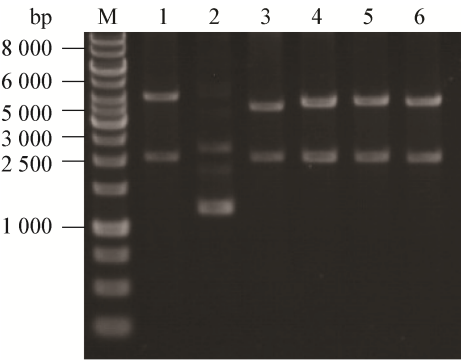


图 1 pSW2 突变载体双酶切验证 DNA 电泳图
Figure 1 Electrophoretic analysis of DNA restriction fragments from pSW2 mutated vectors
Note: M: GeneRuler™ 1 kb DNA ladder. 1: pSW2; 2: pSW2Δ*fpsBCD*; 3: pSW2Δ*fpsCD*; 4: pSW2Δ*fpsB*; 5: pSW2Δ*fpsC*; 6: pSW2Δ*fpsD*.

表 3 pSW2 突变载体接合转移检测		
Table 3 Conjugal transfer of pSW2 mutated vectors		
突变载体	敲除片段	接合转移(Yes/No)
Mutated vectors	Mutated sequences (bp)	Conjugal transfer
pSW2Δ <i>fpsBCD</i>	1 236	N
pSW2Δ <i>fpsCD</i>	519	Y
pSW2Δ <i>fpsA</i>	1 625	N
pSW2Δ <i>fpsB</i>	314	Y
pSW2Δ <i>fpsC</i>	186	Y
pSW2Δ <i>fpsD</i>	240	Y

2.2 pSW2 突变载体的表达能力检测

对于获得的一系列 pSW2 突变载体, 以绿色荧光蛋白 GFP 为报告基因对它们在低温下的蛋白表达能力进行了检测。需要指出的是, pSW2 原来所用的是噬菌体自身的启动子(*PfpsA*), 其存在着强度较低的问题。为了提高低温下启动子的强度, 在 pSW2 突变载体中加入了编码冷激蛋白基因的启动子(*PcspA*)。结果显示, 加入 *PcspA* 后, pSW2 的表达能力确实有部分提高。更显著的是, *fpsB* 基因敲除后, pSW2 突变载体(pSW2Δ*fpsB*-*PcspA*)的 GFP 强度较原始载体极大地提高。其中 20 °C 条件下增加 2.7 倍, 4 °C 条件下增加 10.7 倍(图 2)。

2.3 pSW4 载体的构建

在以上工作的基础上, 对表达载体 pSW2 进行了一系列的改造, 包括敲除 *fpsB* 基因, 添加强启动子 *PcspA* 及 RBS 位点, 添加多克隆位点 Multiple cloning site (MCS)和 6×His 标签方便外源蛋白 N-末端、C-末端连接标签以供蛋白纯化(图 3)。以上全长为 101 bp 的序列通过全基因合成, 然后用同源重组的方法克隆到 *PcspA* 启动子的尾部。最终完成了全部的改造, 新的载体命名为 pSW4 (NCBI GenBank 登录号 KX296734), 其全长为 6 623 bp。

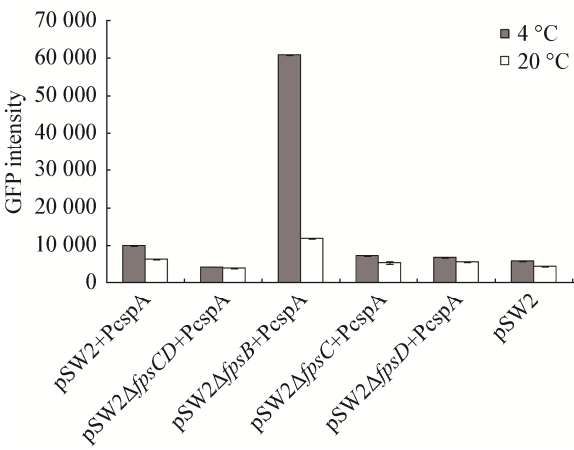


图 2 pSW2 突变载体在不同温度条件下的 GFP 强度检测
Figure 2 GFP intensity assays of pSW2 mutated vectors at different temperatures

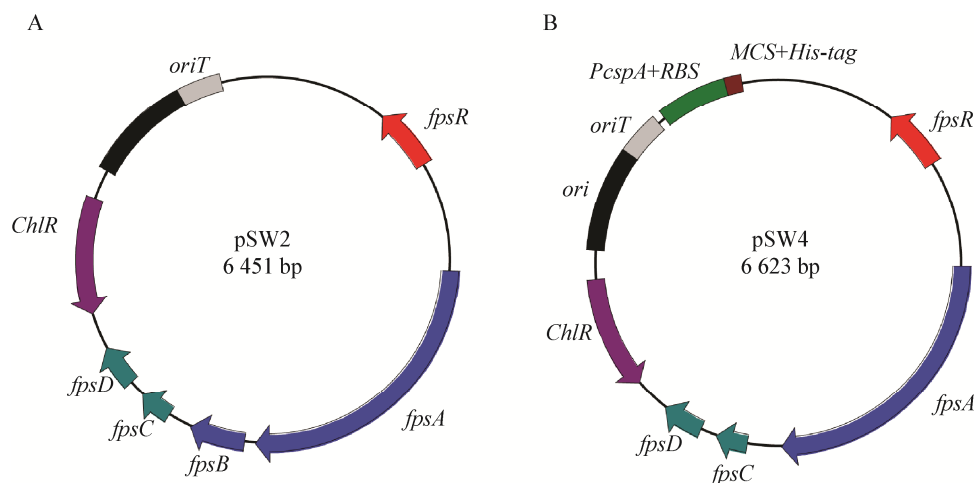


图3 pSW2 (A)与 pSW4 (B)对比图
Figure 3 Comparison of pSW2 (A) and pSW4 (B) vector

2.4 深海来源基因 *sps01203* 基因克隆及蛋白表达纯化

为了验证 pSW4 的可用性,我们选择了深海嗜冷细菌 *Shewanella psychrophila* WP2 中的基因 *sps01203* (编码 DNA 聚合酶 III 的 ϵ 亚基),其全长为 729 bp。将片段克隆至 pSW4,双酶切验证正确(图 4A)。构建的表达载体 pSW4-*01203* 通过接合转移到 WP3 中,得到表达菌株 WP3-pSW4-*01203*。按照 1:100 的比例接种于锥形瓶中培养(2216E 培养基,

20 °C、200 r/min)约 12 h,待菌株生长至平台期 ($OD_{600}=3.5$)将锥形瓶转移至 4 °C、200 r/min 低温诱导 36 h,最后高速离心收集菌体,提取蛋白并通过 SDS-PAGE 检测目的条带。结果显示目的条带单一,且大小与理论值一致(图 4B)。蛋白纯化后计算其得率为 11.13 mg/L。

2.5 *Sps01203* 蛋白的活性检测

DNA 聚合酶 III 的 ϵ 亚基一般具有核酸酶活性。分别以双链和单链 DNA 作为底物通过 Urea-denatured PAGE 检测(图 5)发现,在金属离子 Mn^{2+}

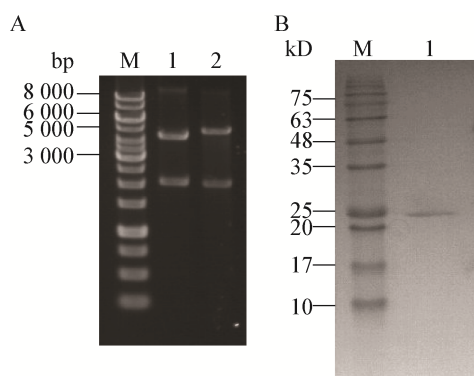


图4 重组质粒 pSW4-*01203* 双酶切验证 DNA 电泳图 (A)及蛋白表达纯化 SDS-PAGE 图(B)

Figure 4 Electrophoretic analysis of DNA restriction fragments from recombinant plasmid pSW4-*01203* and SDS-PAGE of purified protein

Note: A: M: GeneRuler™ 1 kb DNA ladder. 1: pSW4; 2: pSW4-*01203*. B: M: Protein standard marker; 1: Purified *Sps01203* recombinant protein.

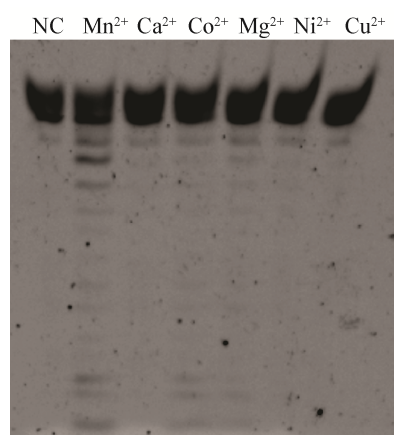


图5 *Sps01203* 在不同金属离子条件下切割 dsDNA 酶活检测

Figure 5 Analysis of dsDNA nuclease activity of the *Sps01203* protein with different metal ions

存在的条件下, Sps01203 蛋白具有切割 dsDNA 的核酸酶活性。而在金属离子 Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 存在的条件下, Sps01203 蛋白具有切割 ssDNA (图 6) 的核酸酶活性。以上结果说明, 通过 pSW4 能表达出可溶蛋白, 且具有活性。

3 结论

Shewanella piezotolerans WP3 分离自深海环境, 是良好的低温蛋白表达宿主菌。其天然丝状噬菌体 SW1 具有低温诱导的特征, 已被改造成能在 *E. coli* 和 *Shewanella* 不同菌株中穿梭的质粒 pSW2, 但是其作为一个功能完全的表达载体还需要进一步地改造完善^[14]。通过对 pSW2 的敲除实验发现, 单链结合蛋白 FpsB 的缺失不影响 pSW2 在 WP3 中的复制, 同时其低温条件下蛋白表达能力显著提高。在此基础上构建的表达载体 pSW4 与 pSW2 大小相当, 但包括了强启动子和蛋白纯化标签。通过深海细菌 WP2 的聚合酶 III ϵ 亚基 (Sps01203) 的表达和体外活性检测, 证实了 pSW4 的实用性。本研究构建的 WP3-pSW4 系统是国内首次利用深海来源的菌株和质粒构建低温蛋白表达系统。与来自于南极海水中的低温表达系统 (*Shewanella* sp. Ac10-pJRD215) 相比^[15], WP3-pSW4 系统在 20 °C 条件下表达效率相当,

4 °C 条件下表达效率更高; 而与同样来自于深海的 *P. profundum* SS9-pFL190 系统相比^[10], 其优势包括宿主菌基因组更小(<19%)、接合转移效率更高(>4.5×10²)、温度范围更宽(0–28 °C)、生物量更高(10 倍), 因而具有较好的应用潜力。

海洋是地球最大的生态系统, 而深海是海洋的主要组成部分, 具有黑暗、高压、低温、寡营养等极端环境, 蕴含着丰富的生物基因资源^[16]。对这些基因资源利用工具, 如蛋白表达系统的开发改造不仅对了解微生物的极端环境适应性机理具有重要的意义, 还能够促进对于海洋生物基因资源的有效开发利用。WP3 能够耐受多重极端环境, 特别是具有良好的低温生长能力并能够利用多种物质作为电子受体^[11–13], 因此是构建环境污染降解菌的良好材料。本研究中构建的深海蛋白表达载体 pSW4 与 WP3 具有天然的适配性^[17–18], 可用来高效表达一些与污染物降解相关的基因簇。今后将尝试利用该系统进行相关的应用性研究。

参 考 文 献

- [1] Zeng RY, Chan ZH. Progress in research and development techniques on deep sea microorganism resource[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2012, 24(9): 991-996 (in Chinese)
曾润颖, 产竹华. 深海微生物资源研究开发技术进展[J]. 生命科学, 2012, 24(9): 991-996
- [2] Xiao X, Wang FP. Research and development of deep-sea microbes[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2006, 31(2) (in Chinese)
肖湘, 王凤平. 深海微生物的研究开发[J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(2)
- [3] Fredrickson JK, Romine MF, Beliaev AS, et al. Towards environmental systems biology of *Shewanella*[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(8): 592-603
- [4] Hau HH, Gralnick JA. Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*[J]. Annual Review of Microbiology, 2007, 61: 237-258
- [5] Nealson KH, Scott J. Ecophysiology of the genus *Shewanella*[J]. Prokaryotes, 2006, 6: 1133-1151
- [6] Bowler C, Karl DM, Colwell RR. Microbial oceanography in a sea of opportunity[J]. Nature, 2009, 459(7244): 180-184
- [7] Zhang C, Kim SK. Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects[J]. Marine Drugs, 2010, 8(6): 1920-1934
- [8] Chen R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond[J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(5): 1102-1107
- [9] Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5(172)
- [10] Lauro FM, Eloë EA, Liverant N, et al. Conjugal vectors for cloning, expression, and insertional mutagenesis in Gram-negative bacteria[J]. Bio Techniques, 2005, 38(5): 989-996

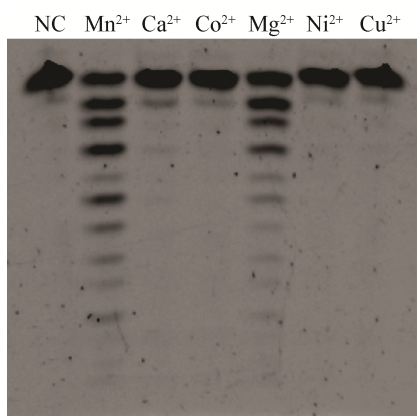


图 6 Sps01203 在不同金属离子条件下切割 ssDNA 酶活检测

Figure 6 Analysis of ssDNA nuclease activity of the Sps01203 protein with different metal ions

- 708-710
- [11] Wang FP, Wang P, Chen MX, et al. Isolation of extremophiles with the detection and retrieval of *Shewanella* strains in deep-sea sediments from the west Pacific[J]. *Extremophiles*, 2004, 8(2): 165-168
- [12] Xiao X, Wang P, Zeng X, et al. *Shewanella psychrophila* sp. nov. and *Shewanella piezotolerans* sp. nov., isolated from west Pacific deep-sea sediment[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(1): 60-65
- [13] Wang FP, Wang JB, Jian HH, et al. Environmental adaptation: genomic analysis of the piezotolerant and psychrotolerant deep-sea iron reducing bacterium *Shewan piezotolerans* WP3[J]. *PLoS One*, 2008, 3(4): e1937
- [14] Yang XW, Jian HH, Wang FP. pSW2, a novel low-temperature-inducible gene expression vector based on a filamentous phage of the deep-sea bacterium *Shewanella piezotolerans* WP3[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(16): 5519-5526
- [15] Miyake R, Kawamoto J, Wei YL, et al. Construction of a low-temperature protein expression system using a cold-adapted bacterium, *Shewanella* sp. strain Ac10, as the host[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(15): 4849-4856
- [16] Leary D, Vierros M, Hamon G, et al. Marine genetic resources: a review of scientific and commercial interest[J]. *Marine Policy*, 2009, 33(2): 183-194
- [17] Wang F, Wang FP, Li Q, et al. A novel filamentous phage from the deep-sea bacterium *Shewanella piezotolerans* WP3 is induced at low temperature[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(19): 7151-7153
- [18] Jian HH, Xu J, Xiao X, et al. Dynamic modulation of DNA replication and gene transcription in deep-sea filamentous phage SW1 in response to changes of host growth and temperature[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): 41578

2017 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-2)

序号	会议名称	主办/协办单位	时间	人数	地点	联系方式
20	第三届中国临床微生物学医院感染学术会议	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	9 月	50	待定	马晓莹
21	2017 年中国微生物学会酿造分会学术年会	中国微生物学会酿造分会	10 月	200	青岛	鲁菲 高洁
22	第 13 届全国海洋药物年会	中国微生物学会海洋微生物学专业委员会	10 月	300	青岛	于广利
23	2017 国际化学生物学会议	中国微生物学会生化过程模型化与控制专业委员会	10 月	500	上海	谭高翼
24	2017 年中国微生物学会学术年会	中国微生物学会	10 月中下旬	800	待定	杨海花 王旭 010-64807200
25	第三届放线菌生物学与产业化暨首届微生物药物学术研讨会	中国微生物学会分子微生物学与生物工程专业委员会	10 月下旬	100	湖南长沙	夏立秋
26	第十届全国青年微生物学工作者学术讨论会	中国微生物学会普通微生物学专业委员会	10 月	200	湖南长沙	王琳淇 胡胜标 胡玮
27	首届微生物前沿交叉创新论坛	中国微生物学会普通微生物学专业委员会、环境微生物学专业委员会和分子微生物学及生物工程专业委员会联合主办	10 月	50	湖南长沙	李越中 覃重军 周宁一
28	第二届全国昆虫肠道微生物与环境治理学术研讨会暨第五届全国食用昆虫与微生物转化废弃物及产业化研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	10 月	200	湖北武汉	郑龙玉 罗勤 ly.zheng@mail.hzau.edu.cn
29	类鼻疽病的实验室诊断与临床诊治	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	11 月	50	海南三亚	陈海
30	幽门螺杆菌快速分离培养、鉴定、药敏试验新技术培训班	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	11 月	50	浙江宁波	吕宝霞
31	第九届全国微生物资源学术暨国家微生物资源平台运行与服务研讨会	中国微生物学会微生物资源专业委员会	11 月	400	江苏南京	阮志勇 010-8210863 李 盼 010-82105075
32	人体微生物组学与健康	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会	待定	50	上海	郭晓奎、秦金红
33	全国医学微生物学高峰论坛	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会	待定	200	上海	郭晓奎、秦金红
34	第二十次全国环境微生物学学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	11 月	600	浙江杭州	钟卫鸿
36	2017 中国生物制品年会	中国微生物学会生物制品专业委员会	11 月	800	四川成都	毛群颖
37	第十二届全国芽孢杆菌青年工作者学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	12 月	200	江苏南京	高学文 025-84395268