

mhbR 和 *mhbT* 基因移码突变对 3-羟基苯甲酸代谢的影响*

高晓莉 刘虹 王淑君 周宁一**

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

摘要: *Klebsiella pneumoniae* M5a1 菌株能以 3-羟基苯甲酸作为唯一碳源和能源生长, 编码分解代谢 3-羟基苯甲酸的基因被克隆至一 8kb 的 DNA 片段上 (pBSI 质粒), 含有该质粒的大肠杆菌获得了以 3-羟基苯甲酸作为唯一碳源和能源生长的能力。经测序并与 GenBank 中的已知基因产物进行氨基酸同源性比较后, 发现其中的 *mhbR* 与转录调节基因和 *mhbT* 与底物转运基因具有较高同源性, 推断可能具有相应的功能。含有 *mhbR* 的移码突变子或 *mhbT* 的移码突变子的大肠杆菌在底物 3-羟基苯甲酸中培养时, 其生长速度和代谢速度都较野生型明显缓慢。

关键词: 3-羟基苯甲酸代谢, 龙胆酸途径, 移码突变

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 02-0041-04

THE IMPACT OF FRAMESHIFT MUTATIONS WITHIN *mhbR* AND *mhbT* ON THE CATABOLISM OF 3-HYDROXYBENZOATE

GAO Xiao-Li LIU Hong WANG Shu-Jun ZHOU Ning-Yi**

(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, 430071)

Abstract: *Klebsiella pneumoniae* M5a1 metabolizes 3-hydroxybenzoate via gentisate to central metabolites. The plasmid pBSI encoding the full catabolic pathway endowed *E. coli* with the ability to grow on 3-hydroxybenzoate. We have determined the sequence of an 8-kb region spanning the *mhb* genes. Blast search in the GenBank revealed the *mhbR* was a putative transcript regulator and *mhbT* was a putative 3-hydroxybenzoate transporter. The *E. coli* strain containing the plasmid with frameshift mutation either in *mhbR* or *mhbT* grew more slowly on 3-hydroxybenzoate than that containing the wild type clone.

Key words: 3-Hydroxybenzoate catabolism, Gentisate pathway, Frameshift mutation

微生物对环境污染物的代谢起着很重要的作用, 是当今环境污染研究中最活跃的领域之一。芳香烃类化合物的微生物降解主要有 3 条途径: 间位裂解途径, 邻位裂解途径和龙胆酸代谢途径^[1]。相对于另外两种代谢途径来说, 龙胆酸途径的分子生物学及生化研究显得滞后。龙胆酸代谢途径早在 20 世纪 50 年代末期就有描述^[2], 后来发现许多芳香烃代谢通过这条途径, 包括萘, 水杨酸, 3-羟基苯甲酸和取代苯酚等。但整个途径的分子生物学研究在 2001 年才有首次报道^[3,4], 该报道描述了一条通过龙胆酸的萘代谢途径。而待研究的肺炎克氏杆菌 M5a1 菌株以 3-羟基苯甲酸 (3-hydroxybenzoate, 3HBA) 作为唯一碳源和能源生长, 3-羟基苯甲酸 6-单加氧酶将 3HBA 转化成龙胆酸, 进入龙胆酸途径。本研究将在分子生物学水平上丰富这条代谢途径的知识。

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30170036)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No.30170036)

** 联系人 E-mail: Zhouningyi2002@yahoo.com

收稿日期: 2003-04-17, 修回日期: 2003-06-20

肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) M5a1 菌株能以 3HBA 作为唯一碳源和能源生长, 编码代谢 3HBA 的酶的基因定位于 8kb 的 DNA 片段上并克隆至 pUC18 产生 pBSI 质粒, 含有该质粒的大肠杆菌获得了以 3HBA 作为唯一碳源和能源生长的能力, 并证明是通过龙胆酸途径^[5]。双向测序这 8kb 片段, 推断其所有基因图谱如图 1。已将其中的 *mhbM*, *mhbD*, *mhbI* 和 *mhbH* 基因单独克隆表达出有活性的酶, 并验证了其功能 (图 1)。此 4 个酶将 3HBA 依次代谢为龙胆酸, 顺丁烯二酸-单酰丙酮酸, 反丁烯二酸-单酰丙酮酸, 最终水解成反丁烯二酸和丙酮酸进入 TCA 循环 (将另文报道)。利用生物软件 DNASTar 分析 *mhbR* 和 *mhbT* 并与 GenBank 中已知基因进行保守序列分析和氨基酸序列同源分析。*mhbR* 在 8kb 的 DNA 片段上的位置为 1247 ~ 252, 产物大小为 331 氨基酸 (37.0kD), 与已知的 *Pseudomonas aeruginosa* 菌株的转录调节基因产物 LysR 家族 (序列号 AE004674) 的相同性达 41%, 所以推断其为转录调节基因。*mhbT* 的位置为 1296-2654, 产物大小为 452 氨基酸 (48.1kD), 与已知的 *Pseudomonas aeruginosa* 菌株的 4-羟基苯甲酸转运基因产物 PcaK (序列号 AE004461) 的相同性达 43%, 所以推断其为底物 3HBA 转运基因。本文就是利用移码突变的方法研究 *mhbR* 和 *mhbT* 基因对 3HBA 代谢的作用。

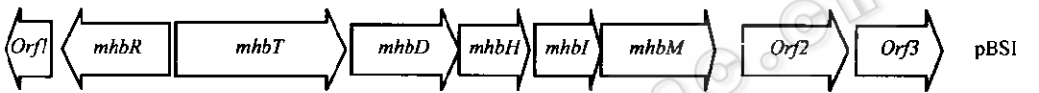


图 1 pBSI 质粒上插入片段 (8217bp) 所含的基因及其功能

已证实基因: *mhbM* 为编码 3-羟基苯甲酸-6-单加氧酶的基因, *mhbD* 为编码龙胆酸 1, 2-双加氧酶的基因, *mhbI* 为编码顺丁烯二酸-单酰丙酮酸异构酶的基因, *mhbH* 为编码反丁烯二酸-单酰丙酮酸水解酶的基因;
推断基因: *mhbR* 为转录调节基因; *mhbT* 为 3HBA 的转运基因

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌种: *Escherichia coli* DH5 α 。

1.1.2 质粒: 见表 1。

表 1 本实验中所用和所构建的质粒

质粒	描述
pUC18	载体: Amp ^r
pBSI	来自 <i>Klebsiella pneumoniae</i> M5a1 的 8216bp <i>Sph</i> I 酶切片断插入 pUC18 构建的质粒
pZWGRT5	<i>Eco</i> RI 酶切 pBSI 得到的 6375bp 片断, 刚好将 <i>orf2</i> 和 <i>orf3</i> 切下, 酶切后产物只含有 <i>mhbR</i> , <i>mhbT</i> , <i>mhbM</i> , <i>mhbD</i> , <i>mhbH</i> , <i>mhbI</i> 基因, 正向插入 pUC18 构建的质粒
pZWGR5	修饰了 <i>Mlu</i> I 位点引起 <i>mhbR</i> 移码突变的 pZWGRT5
pZWGT5	修饰了 <i>Eco</i> NI 位点引起 <i>mhbT</i> 移码突变的 pZWGRT5

1.1.3 液体选择培养基配方: 见参考文献 [6], 3HBA 过滤除菌后单独加入, 终浓度 2mmol/L。

1.2 实验方法

1.2.1 *mhbR* 和 *mhbT* 基因失活^[17,8]: (1) 失活 *mhbR*: *Mlu*I 酶切 pZWGRT5 后, 用 T4 DNA 多聚酶 (Takara) 将 5' 端悬出的 *Mlu*I 位点补平, T4 连接酶连接后, 转入 DH5 α 得

到突变子 DH5 α (pZWGR5) (表 1), 并做酶切验证。(2) 失活 *mhbT*: *Eco*NI 酶切 pZWGR5, 627bp 片断被切下后, 用 T4 DNA 多聚酶 (Takara) 将 5' 端悬出的 *Eco*NI 位点补平, T4 连接酶连接后, 转入 DH5 α 得到突变子 DH5 α (pZWGT5) (表 1), 并做酶切验证。

1.2.2 培养条件: 分别将突变子, DH5 α (pUC18) 和 DH5 α (pZWGR5) 5mL LB 培养过夜后, 次日用液体选择培养基洗 2 次, 1% 接种量接种到的液体选择培养基中, 37℃ 培养。

1.2.3 分光光度法检测: 每 12h 取培养液 1mL, 12,000g 离心 10min 后取上清, 用双蒸水稀释一倍后检测。测定 OD_{600} 值以确定菌体生长浓度。从 250nm 到 400nm 扫描, 以确定菌体是否利用 3HBA^[9], 因为 3HBA 在 290nm 处有吸收峰, 通过 290nm 吸收峰是否减少来确定菌体是否利用 3HBA。

2 结果与分析

2.1 突变子的构建和验证

基因中插入或缺失 1 个或几个碱基对 (不是 3 个和 3 个的倍数), 会使 DNA 的读码框发生改变, 导致插入或缺失部位之后的所有密码子都跟着发生变化, 从而失活这个基因 (移码突变)。本试验利用 T4 DNA 多聚酶 (Takara) 的 5'-3' 多聚酶活性, 将 5' 端酶切位点切后悬出的 1 个或 2 个的碱基补平, 造成移码突变。在 pZWGR5 上, 只在基因内部有且仅有所选的酶 *Mlu*I 和 *Eco*NI, 所以移码的位置即为酶切位点处。*mhbR* 基因的序列位置为 252~1247, 在其基因内部 587 处 *Mlu*I 酶切位点开始移码突变。*mhbT* 基因的序列位置为 1296~2654, 在其内部 2006 和 2633 处有 2 个 *Eco*NI 切点, 627bp 片断被切下后, 开始移码突变。被移码突变基因后的质粒, 再用突变时所用的酶酶切, 如用 *Mlu*I 酶切 pZWGR5/DH5 α 或用 *Eco*NI 酶切 pZWGT/DH5 α , 凝胶电泳结果显示其不能再如突变前那样正常切断质粒, 而是和未酶切的质粒一样, 说明此处的酶切位点已经被改变, 移码突变成功。

2.2 突变子利用 3HBA 生长的结果及分析

含有完整的 *mhbR* 和 *mhbT* 的大肠杆菌 DH5 α (pZWGR5) 与突变 *mhbR* 的 DH5 α (pZWGR5) 和突变 *mhbT* 的 DH5 α (pZWGT5), 都能在 3HBA 选择培养基上生长, 但是生长速度和代谢 3HBA 的速度不同, 野生型阳性对照 DH5 α (pZWGR5) 生长速度比突变子 DH5 α (pZWGR5) 和 DH5 α (pZWGT5) 要快, 阴性对照 DH5 α (pUC18) 基本无生

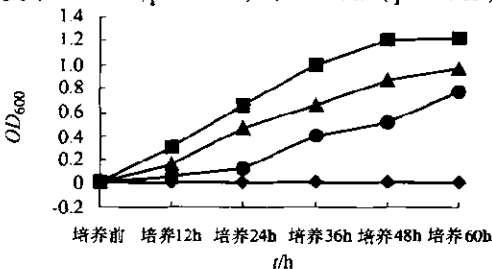


图 2 菌株生长曲线

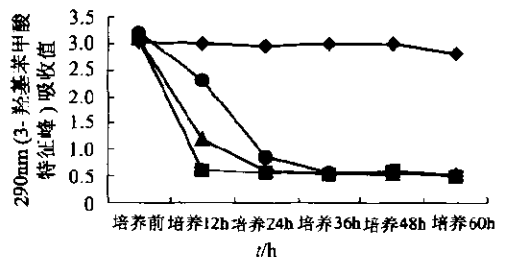


图 3 菌株对 3-羟基苯甲酸的代谢曲线

■ 阳性对照 DH5 α (pZWGR5), ● 突变子 DH5 α (pZWGT5),
▲ 突变子 DH5 α (pZWGR5), ◆ 阴性对照 DH5 α (pUC18)

长, 如图 2; 阳性对照和突变子均可将 3HBA 完全代谢, 但代谢速度不同, 野生型 DH5 α (pZWGR15) 12h 后可将 3HBA 完全代谢, 而同样条件下, 突变子要 24h 后才可将 3HBA 完全代谢, 代谢速度相比之下缓慢, 如图 3。所以, *mhbR* 和 *mhbT* 基因对代谢底物 3HBA 有一定影响, 说明 *mhbR* 和 *mhbT* 是有功能的。

3 讨论

通过移码突变鉴定 *mhbR* 和 *mhbT* 基因的功能发现, *mhbR* 和 *mhbT* 基因在大肠杆菌中表达后的突变子虽然仍能代谢底物 3HBA, 但是其生长速度和代谢速度都较野生型相比缓慢, 说明 *mhbR* 和 *mhbT* 基因对代谢 3HBA 有一定的影响, *mhbR* 和 *mhbT* 是有功能的。但由于该 8 kb 片段是克隆在载体 pUC18 上, 其转录过程受 *mhbR* 控制外, 还受 pUC18 上的 *Lac* 启动子调控, 后者是一个渗漏型的启动子。因此 *mhbR* 的失活并没有完全使大肠杆菌丧失代谢 3HBA 的能力。底物转运基因 *mhbT* 在野生型菌株 *Klebsiella pneumoniae* M5a1 代谢 3HBA 时是必需的, 但由于大肠杆菌和 *Klebsiella pneumoniae* 的细胞膜结构和对底物的转运机制不同, 大肠杆菌对于 3HBA 的吸收不完全依赖于 *mhbT* 的存在。若要鉴定 *mhbR* 和 *mhbT* 在 *Klebsiella pneumoniae* M5a1 代谢 3HBA 的功能, 必须在野生型菌株 *Klebsiella pneumoniae* M5a1 中 *mhbR* 和 *mhbT* 基因失活来进一步研究它们的功能。

参考文献

- [1] 林稚兰, 黄秀梨. 现代微生物学与实验技术. 北京: 科学出版社, 2000. 202~230.
- [2] Lack L. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1959, **34**: 117~123.
- [3] Zhou N Y, Fuenmayor S L, Williams P A. *J Bacteriol*, 2001, **183**: 700~708.
- [4] Zhou N Y, Al-Dulayymi J, Baird M S, *et al.* *J Bacteriol*, 2002, **184** (6): 1547~55.
- [5] Robson N D, Parrott S, Cooper R A. *Microbiology*, 1996, **142**: 2115~2120.
- [6] Hareland W A, Crawford R L, Chapman P J, *et al.* *J Bacteriol*, 1975, **121**: 272~285.
- [7] J. 萨姆布鲁克, E.F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆试验指南 (第二版). 北京: 科学出版社, 1996.
- [8] 奥斯曼, 金斯顿. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1998.
- [9] Monica S, Estrella F, Amando G P, *et al.* *FEMS Microbiology Letters*, 1995, **126**: 283~290.