

血色红假单胞菌 Form II Rubisco 基因的克隆及序列分析

吕 红 王 竞 杜翠红 周集体 安利佳

(大连理工大学环境与生命学院 大连 116023)

摘要: 根据 GenBank 中已登录的 Form II Rubisco (*cbbM*) 基因序列, 设计一对引物 R_1 和 R_2 , 并在引物 5' 端分别加上 *Sma* I 和 *Not* I 位点。以血色红假单胞菌 1.2352 的染色体为模板, 通过 PCR 扩增目的片段, 克隆后测序。核苷酸序列测定结果表明, 该菌株的 *cbbM* 基因全长为 1,386 bp, 共编码 461 个氨基酸, 推导的氨基酸序列与其它生物相应序列的同源性在 76% ~ 90% 之间。表明了 *cbbM* 基因在进化上的保守性。

关键词: 血色红假单胞菌, *cbbM*, 测序, 同源比较

中图分类号: Q785 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2004) 02-0076-06

CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF *RHODOPSEUDOMONAS* *RUTILA* FORMII RUBISCO

Li Hong WANG Jing DU Cui-Hong ZHOU Ji-Ti AN Li-Jia

(School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116023)

Abstract: The *cbbM* gene of *Rhodopseudomonas rubila* 1.2352 was obtained by PCR from the chromosome of the strain with primers designed according to the *cbbM* genes in GenBank database. The result of sequencing shows that 1,386 bp of *cbbM* gene covers the complete open frame, encoding 461 amino acid residues. There is homology of 76% ~ 90% at deduced amino acid level. It reveals that the FormII Rubisco is conserved throughout evolution.

Key words: *Rhodopseudomonas rubila*, *CbbM*, Sequencing, Homology comparison

1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (简称 Rubisco) 是卡尔文循环的关键酶, 该酶既催化 CO_2 固定反应, 又能催化 CO_2 氧合反应, 放出 CO_2 。可见, Rubisco 在这两种反应中起着重要的枢纽作用, 它调节着细胞中碳的流向。特别是在植物当中, 它影响了 CO_2 的固定效率和作物的产量, 并且它是植物可溶性蛋白中含量最高的蛋白质^[1]。因此, 对于 Rubisco 的研究既有理论意义又有应用价值。

Rubisco 一般分为两种类型^[2]: Form I Rubisco 和 Form II Rubisco。Form I Rubisco 广泛存在于植物和一些原核生物中。它是由 8 个大亚基和 8 个小亚基组成的 L_8S_8 结构, 分子量约为 550kD。而 Form II Rubisco 是由大亚基组成的 L_x 结构, 分子量范围为 110 ~ 450kD, 最初是在深红红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*) 中发现的。它除了含有与催化相关的保守氨基酸残基如 Lys-329、Lys-191 和 Lys-166 等^[3]外, 所有亚基氨基酸序列基本上不同于 Form I 的大亚基。研究发现许多自养细菌中都含有 Rubisco 的两种类型, 血色红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas rubila*) 就是其中之一。本文以血色红假单胞菌 (AS1.2352) 的染色体为模板, 通过 PCR 扩增到 Form II Rubisco (*cbbM*) 基因序列, 克隆后测序, 并与已发表的相应序列进行比较。为深入研究 Rubisco 基因结构及进一步构建

固定 CO₂ 的基因工程菌提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌种及质粒

血色红假单胞菌 (AS1.2352) 购自中国科学院菌种保藏中心, 大肠杆菌 (*E. coli*) BL21 和载体 pGEM4T-1 购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.2 生化试剂

Taq 酶、dNTP、T4 连接酶、限制性内切酶均购自宝生物工程 (大连) 有限公司, RNaseA、溶菌酶、氨苄青霉素购自上海华美生物公司。

1.3 菌株 1.2352 的异养培养

用带有橡皮塞的血清瓶作为培养容器, 30℃、光照 (光照强度约 2,000 Lx)、静止培养。异养培养基参见文献[4]。

1.4 菌株 1.2352 染色体的提取

将菌株 1.2352 异养培养至对数中期, 离心收集菌体, 放入 -20℃ 冰箱过夜。取出于 37℃ 迅速融化, 按每克湿菌体加入 25mL 提取液 (50mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 10mmol/L EDTA) 悬浮菌体。加入溶菌酶至 1mg/mL, 37℃ 水浴 1h, 加入 10% SDS 至终浓度 1.6%, 55℃ 轻摇 15min, 加入 5mol/L KAc 至终浓度 0.5mol/L, 置于冰浴 2h, 加入等体积氯仿/异戊醇 (24:1), 混匀, 8,000 r/min 离心 10min。吸取上清, 向上清液中再加入等体积的苯酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1), 氯仿/异戊醇, 各抽提 1 次。加入 2 倍体积的预冷无水乙醇, -20℃ 冰箱放置 4h, 离心取沉淀, 自然晾干。加入适量纯水溶解, 弃去不溶物, 加入 RNaseA 至终浓度 10μg/mL, 37℃ 水浴 30min, 冷却后备用。

1.5 PCR 引物的设计

根据 GenBank 中已登录的 Form II Rubisco (*cbbM*) 基因序列, 设计一对引物 R₁ 和 R₂。上游引物 R₁: 5'-TACCCGGGATGACCACTCGAACCGCTAC-3', 下游引物 R₂: 5'-TCAGCGGCCGCTTACGCCGCTGCGGCTTCAG-3', 为克隆方便, 引物的 5' 端分别设计有 *Sma* I 和 *Not* I 位点, 由宝生物工程 (大连) 有限公司合成设计引物。

1.6 PCR 扩增

以菌株 1.2352 的染色体为模板进行 PCR 扩增, PCR 扩增条件: 94℃, 1min, 进入循环: 94℃, 30s; 55℃, 30s; 72℃, 1min; 30 个循环; 72℃, 7min。PCR 结束后电泳, 将含扩增产物的琼脂块切下, 用宝生物 DNA 凝胶回收试剂盒回收。

1.7 PCR 产物的克隆和鉴定

将扩增产物和 pGEX4T-1 载体分别用 *Sma* I / *Not* I 双酶切后, 前者乙醇沉淀后回收, 后者电泳回收, 用宝生物 DNA 连接试剂盒进行连接反应, 然后电转化至大肠杆菌 BL21 感受态中。涂布 LB (内含 50mg/L 氨苄青霉素) 平板 37℃ 过夜培养, 挑选阳性菌落进行摇瓶培养, 碱裂解法^[5]提取质粒, 命名为 LR。将质粒 LR 用 *Sma* I / *Not* I 双酶切及 PCR 扩增来鉴定。

1.8 *cbbM* 基因的序列测定和同源比较

序列测定由宝生物工程 (大连) 有限公司完成, 分析软件为 GeneDoc, 所用数据库为 GenBank、PDB 数据库。

2 结果

2.1 菌株 1.2352 染色体提取和 PCR 扩增

如上所述,将提取物进行电泳(见图1),可以看到分子量很大的一条DNA带,即染色体。以它为模板进行PCR扩增,所得扩增产物为一条分子量约为1.4kb的DNA带,没有其它非特异DNA带出现(见图2)。而且其分子量与GenBank中已登录的*cbbM*基因分子量很相近。

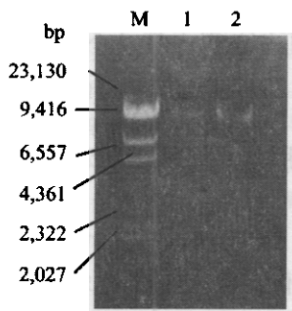


图1 菌株 1.2352 的染色体

M λ DNA/*Hind* III, 1, 2 均为染色体

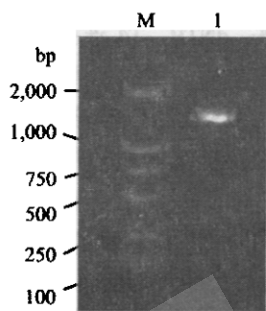


图2 *cbbM* 基因的 PCR 扩增

M DL2000, 1 PCR 扩增产物

2.2 重组质粒的鉴定

将重组质粒 LR 进行 *Sma* I 单酶切及 *Sma* I/*Not* I 双酶切(见图3),结果表明该质粒 LR 比载体分子量大,双酶切后有一条分子量约为1.4kb的DNA带,以重组质粒 LR 为模板进行PCR扩增,反应条件如上,在电泳图上也呈现出一条分子量约为1.4kb的DNA带(见图4),表明克隆成功。

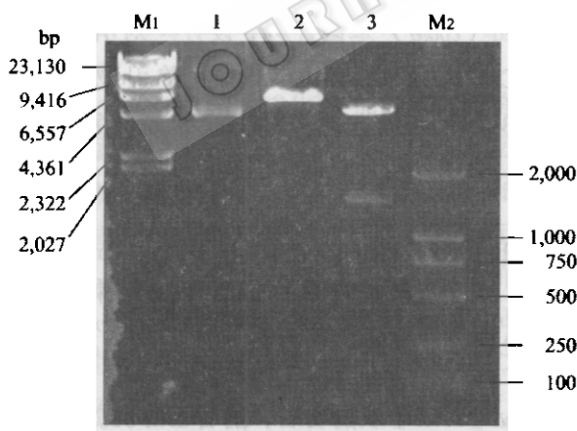


图3 重组质粒 LR 的酶切谱图

M1 λ DNA/*Hind* III, 1 重组质粒 LR, 2 重组质粒 LR/*Sma* I, 3 重组质粒 LR/*Sma* I + *Not* I, M2 DL2000

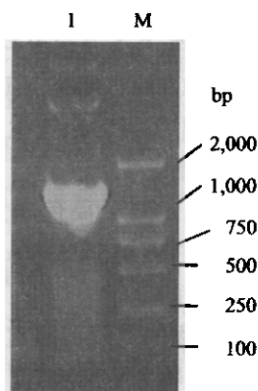


图4 重组质粒 LR 的 PCR 扩增

M DL2000, 1 PCR 扩增产物

2.3 菌株 1.2352 *cbbM* 基因的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

在PCR引物的设计中,由于上游引物含起始密码子ATG(下划线标出),下游引物含终止密码子TTA(下划线标出),因此PCR扩增产物包含基因的完整读码框(图5)。核苷酸序列分析表明,PCR扩增产物长约1,400个核苷酸,含有一个完整的*cbbM*基因

序列, 长为 1,386 个核苷酸, 共编码 461 个氨基酸, G + C 含量为 66.4%, 单个大亚基的分子量理论值为 50.492 kD。

TGGATCCCGGAATTC	CGGG	ATG	GAC	CAG	TCC	AAC	CGC	TAC	CCC	AAC	CTC	AAC	CTC	57
		M	D	Q	S	N	R	Y	A	N	L	N	L	12
AAA	GAG	AGC	GAG	CTG	ATC	GCG	GGC	GGA	CGG	CAC	GTG	CTG	TGC	117
K	E	S	E	L	I	A	G	G	R	H	V	L	C	32
AAG	CCC	GGC	TTC	GCT	AAC	TTC	ATC	CAG	ACC	GCC	GCG	CAG	TTC	177
K	A	C	F	C	N	F	I	Q	T	A	A	H	F	52
GGC	ACC	AAC	CTC	GAA	GTC	TCC	ACC	GAC	GAC	TTC	ACC	CGC	GGC	237
C	T	N	V	E	V	S	T	T	D	D	F	T	R	72
TAC	GAG	ATC	GAC	GAG	CGC	AAG	GGC	CTG	ATC	AAG	ATC	GAG	CCG	297
Y	E	I	D	E	A	K	G	L	M	K	I	A	Y	92
CGC	AAC	GTG	ATC	GAC	GGC	CGC	GCC	ATG	ATC	GCC	TGC	CTG	ACC	357
R	N	V	I	D	G	R	A	M	I	A	S	F	L	112
AAC	CAG	GGC	ATG	CGC	GAC	GTC	GAA	TAC	GCC	AAG	ATG	TAC	GAC	417
N	Q	G	M	G	D	V	E	Y	A	K	M	Y	D	132
TAC	TTC	AAG	CTG	TTC	GAC	GGC	CCG	TCC	ACG	ACG	ATT	CGG	GAT	477
Y	L	K	L	F	D	G	P	S	T	T	I	R	D	152
CGC	CGC	GTC	GTC	AAC	GGC	CGC	TTC	ATC	GTC	GGC	ACC	ATC	AAG	537
R	P	V	V	N	G	G	F	I	V	G	T	I	I	172
CGC	CGC	CAG	CCG	TTC	GCC	AAT	GCC	TGC	TAC	GAT	TTC	TGC	CTG	597
R	P	Q	P	F	A	N	A	C	Y	D	F	W	L	192
AAC	GAC	GAG	CCG	CAG	GGC	AAC	CAG	GTG	TTC	CGC	CGC	TTC	AAG	657
N	D	E	P	Q	G	N	Q	V	F	A	P	F	K	212
GGC	GAC	GGC	ATG	CGC	GGC	GAC	GAC	AAG	ACC	GGC	GAA	CCC	AAC	717
A	D	A	M	R	R	A	Q	D	K	T	C	E	A	232
ATC	ACC	CCC	CAC	GAT	CAC	TAC	GAC	ATG	CTC	CGC	CGC	GGT	GAG	777
I	T	A	D	D	H	Y	E	M	L	A	R	G	E	252
GGC	GAC	AAC	GGC	GAC	ATC	GCG	TTC	CTG	GTC	GAC	GCC	TAC	GTT	837
A	D	N	A	D	H	I	A	F	L	V	D	G	Y	272
GTG	ACC	ACC	GGC	CGC	CGC	GCG	TTC	CGG	AAG	CAG	TAC	CTG	CAC	897
V	T	T	A	R	R	A	F	P	K	Q	Y	L	H	292
GGT	GCG	GTG	ACC	TCC	CGC	CAG	TCC	AAG	CGC	GGC	TAC	ACC	GGC	957
G	A	V	T	S	P	Q	S	K	R	C	Y	T	A	312
GGC	CGC	TTC	CAG	GGC	GCC	TCC	GGC	ATC	CAC	ACC	GGC	ACC	ATG	1017
A	R	L	Q	G	A	S	G	I	H	T	G	T	M	332
GGC	GAA	GGC	GGC	GAC	CGC	GCG	ATC	GCC	TAC	ATG	ATC	ACC	GAG	1077
G	E	A	A	D	R	A	I	A	Y	M	I	T	E	352
TAC	TTC	CAC	CAG	GAG	TGG	CTC	GGC	CTC	AAC	CCG	ACC	ACC	CGG	1137
Y	F	H	Q	E	W	L	G	L	N	P	T	T	P	372
AAC	CGC	CTG	CGG	ATG	CGG	GGC	TTC	TTC	GAC	AAC	CTC	GGC	CAC	1197
N	A	L	R	M	P	C	F	F	D	N	L	G	H	392
GGC	GGC	GGC	GGT	GGC	TTC	GAT	CAC	GTC	GAC	GGC	GGC	CGC	CGC	1257
A	G	C	G	A	F	C	H	V	D	C	G	A	A	412
CAG	GGC	GAA	CAG	TCC	TGG	AAG	CAG	GGC	GCC	GAT	CCG	GTC	GAG	1317
Q	A	E	Q	C	W	K	Q	G	A	D	P	V	E	432
GAA	TTC	GGC	CGC	GGC	TTC	GAG	AGC	TTC	CCG	CAG	GAC	GAC	AAG	1377
E	F	A	R	A	F	E	S	F	P	Q	D	A	D	452
CGC	GGC	AAG	CTG	AAC	CGC	CAG	GCG	GCG	TAA	CGCGCCGATCCTGACTGACTCA				1430
R	A	K	L	K	P	Q	A	A	*	461				

图 5 菌株 1.2352 *cbmM* 基因的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

2.4 *cbmM* 基因的氨基酸序列的同源比较

由菌株 1.2352 *cbmM* 基因推导的氨基酸序列与其它生物的相应序列进行了同源比较 (见表 1 和图 6), 结果表明, 血色红假单胞菌 *cbmM* 基因的氨基酸序列与同是红假单胞菌属的 *R. globiformis*^[6] 和 *R. capsulatus* 的相应序列同源性最高, 都是 90%。与其它菌属的 *R. rubrum*、*T. denitrificans*、*H. marinus*^[7] 的相应序列同源性依次为 86%、84% 和 76%。与 *R. pachyptila symbiont* 的相应序列同源性则为 87%。可见它们的 Form II Rubisco 的同源性很高, 表明其在进化上的保守性。

3 讨论

研究表明 Form II Rubisco 的同源性很高, 这便于人们通过核酸杂交及 PCR 来发现其它生物的 Form II Rubisco。

由于人们最初是在 *R. rubrum* 中发现的 Form II Rubisco, 因此对其研究的比较深入。研究者通过亲合标记和 X 射线等方法对其活性位点已经了解的比较清楚, 比如 Lys-329、Gly328、Lys-191、Ile-164 和 Lys-166 等^[3,8,9] 位点。这些位点中, 以 Lys 残基居多, 研究表明 Rubisco 活性区 Lys 残基的 ϵ 氨基与 CO_2 作用形成氨基碳酸基团, 然后与 Mg^{2+} 键合。Rubisco 反应平衡及动力学研究表明, ϵ 氨基的 CO_2 化对形成有活性的 Rubisco 有重要作用。从图 6 中可以看到, 在这些氨基酸及其附近的区域, 上述生物都具有相同的序列, 表明这些位点有可能也是血色红假单胞菌 1.2352 Form II Rubisco 的活性位点, 这有待进一步证实。

血色红假单胞菌 1.2352 *cbbM* 基因的克隆和测序, 为进一步进行该基因的表达和定点诱变奠定了基础。

参考文献

- [1] 陈为钧, 赵贵文, 顾月华. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26 (5): 433~436.
- [2] 董晓丽, 周集体, 杜翠红, 等. 高技术通讯, 2001, (12): 95~97.
- [3] George H L, Chen Y R, Hartman F C. Biochem, 1993, 32: 9018~9024.
- [4] 钱存荣, 黄仪秀编. 微生物学实验教程. 北京: 北京大学出版社, 1999. 211~212.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning, a laboratory manual second edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [6] Janet L G, Deane L F, Tabita F R. J Biol Chem, 1991, 266: 14646~14653.
- [7] Yaguchi T, Chung S Y, Igarashi Y, et al. Biosci Biotechnol Biochem, 1994, 58 (9): 1733~1737.
- [8] Tabita F R, McFadden B A. J Biol Chem, 1974, 249: 3459~3464.
- [9] Chene P, Day A G, Fersht A R, et al. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 232 (2): 482~486.