

藤黄微球菌海藻糖生物合成基因的克隆与鉴定

黄雪峰 欧阳立明* 吴海珍 叶江 张惠展** 袁勤生

(华东理工大学生物工程学院 上海 200237)

摘要:首次从一株能利用淀粉产生海藻糖的藤黄微球菌中克隆了海藻糖生物合成基因。采用 PCR 方法结合非随机鸟枪法得到藤黄微球菌中低聚麦芽糖苷基海藻糖合成酶 (MTSase) 基因 (*MtreY*) 的全序列及低聚麦芽糖苷基海藻糖水解酶 (MTHase) 基因 (*MtreZ*) 的部分序列, 其中 *MtreY* 共有 2,370 个碱基, 编码 789 个氨基酸, 表达产物分子量为 86.7 kD。同源性分析表明, 与已报道的 MTSase 和 α -淀粉酶家族成员具有相同的保守模体。将 *MtreY* 基因在大肠杆菌 JM83 中表达, 证明表达产物具有预期的酶活性。

关键词:藤黄微球菌, 海藻糖, 低聚麦芽糖苷基海藻糖合成酶 (MTSase), 低聚麦芽糖苷基海藻糖水解酶 (MTHase), 同源性分析

中图分类号: Q393.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2006) 04-0074-06

Cloning and Analysis of Genes Correlated to Trehalose Biosynthesis from *Micrococcus luteus*

HUANG Xue-Feng OUYANG Li-Ming* WU Hai-Zheng YE Jiang
ZHANG Hui-Zhan** YUAN Qin-Sheng

(Bioengineering Department, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract: Genes related to trehalose biosynthesis from a bacterial strain *Micrococcus luteus* which can convert partially hydrolyzed starch into trehalose were cloned. Full sequence of gene (*MtreY*) encoding trehalose maltotriose synthase (MTSase) and partial sequence of gene (*MtreZ*) encoding maltotriose trehalose trehalohydrolase (MTHase) were got using PCR combined non-random shotgun method. Sequence analysis of *MtreY* predicts a 2,370bp open reading frame encoding a protein of 790 amino acids with a predicted molecular weight of 86734 Da. Homologous analysis shows that this new gene has the same conservative motifs with α -amylase family enzymes. The *MtreY* gene was expressed in *E. coli*, and the expression product has the anticipative enzyme activity.

Key words: *Micrococcus luteus*, Trehalose, Maltotriose trehalose synthase (MTSase), Maltotriose trehalose trehalohydrolase (MTHase), Homologous analysis

海藻糖 (Trehalose) 是两个葡萄糖残基经 α -1, 1 糖苷键连接而成的非还原二糖, 对生物体和生物大分子有非特异性的保护功能, 能使生物在逆境条件 (如高温、干燥、冷冻、高渗透压等) 下, 维持细胞膜和蛋白质的稳定, 故具有应用于食品、化妆品、生物制品和医药工业的巨大价值^[1]。

海藻糖生物合成有多种途径, 其中以淀粉水解物为底物, 经过麦芽寡糖基海藻糖合酶 (Maltotriose trehalose synthase, MTSase) 和麦芽寡糖基海藻糖海藻糖基水解酶 (Maltotriose trehalose trehalohydrolase, MTHase) 生成海藻糖的途径因有工业应用价值

* 并列第一作者

** 通讯作者 Tel: 021-64252515, E-mail: huizhzh@ecust.edu.cn

收稿日期: 2005-11-02, 修回日期: 2006-01-31

而备受瞩目。已证明节杆菌 (*Arthrobacter* sp.) Q36^[2]、分支节杆菌 (*Arthrobacter ramosus*)、微黄短杆菌 (*Brevibacterium helvolum*) 等^[3]微生物具有这两种酶,并获得了基因序列。本文从本实验室获得的一株具有上述途径的藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) IF03046^[4,5]出发,克隆得到了其 MTSase 编码基因的 DNA 全序列及 MTHase 编码基因的部分序列,并将之与其他微生物来源的 MTSase 进行氨基酸序列同源性比较分析,证实这些酶的氨基酸序列具有 α -淀粉酶家族的保守模体。将该基因进行异源表达,证明表达产物具有预期的酶活性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:藤黄微球菌菌株 (*Micrococcus luteus*) IF03046,大肠杆菌受体菌 JM83, BL21 (DE3) 和质粒 pUC-18, pTrc-99a 为本室保存, pMD-18T 购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 酶和试剂等:限制性内切酶、T4DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶等工具酶购自 TaKaRa 公司。核酸 DIG 杂交试剂盒购自 BRL 公司。核酸分子量标准为本室自备,蛋白质分子量标准购自华美生物工程公司。麦芽糊精购自上海融氏企业有限公司。凝胶回收试剂盒购自 GIBCO BRL 公司。引物合成和 DNA 测序由上海申能博彩生物技术有限公司完成。

1.1.3 生物软件:DNASTar、DNAssist 1.02、BLAST。

1.2 方法

1.2.1 引物设计和 PCR:参照 GenBank 中已发表的节杆菌 (*Arthrobacter* sp.) Q36^[4]、分支节杆菌 (*Arthrobacter ramosus*)、微黄短杆菌 (*Brevibacterium helvolum*)^[5]低聚麦芽糖苷基海藻糖合成酶 (MTSase) 的核苷酸序列,选择两个保守区序列设计引物进行 PCR,以获得部分目的基因 DNA。

P1: 5' -GGC ACC ACC/A GGC/A TAC GAC-3' (含两个简并位点);

P2: 5' -CGC TGC GCT TGG TGT CGT G-3'。

以藤黄微球菌染色体为模板,用高 GC 含量 PCR 的方法进行 PCR 扩增,参数如下:97℃5min, (95℃ 45s, 62℃ 1min, 72℃ 2min) 30 个循环, 72℃10min, 4℃终止。

在非随机鸟枪法获得 MTSase 基因的 5' 端部分序列之后,参考了以上同源序列和部分已知序列后设计了另一对引物,用以扩增 MTSase 基因的 3' 端。

P3: 5' -AGG TGG TTG TAG ACC ACG TCC TG-3';

P4: 5' -GGA CCC CTC GGT GTT CTC C-3'。

在得到 MTSase 基因全序列之后,根据测序结果,设计合成如下引物进行 PCR,以构建表达质粒。

P5: 5' -GGA TGC TGA CTC CCA CTT CCA-3';

P6: 5' -CAT GGG TTC AGC CGT CCT TC-3'。

1.2.2 探针标记和分子杂交:依照试剂盒说明书进行。

1.2.3 DNA 序列分析:用 DNA star 和 DNAssist 等软件对序列进行编译、读码框分析和比对。将基因的氨基酸序列登录 GenBank 网站,进行在线 BLAST 分析,寻找与该 DNA 序列相似性最高的基因。

1.2.4 重组质粒的构建和表达: 以藤黄微球菌染色体为模板, PCR 条件为: 97℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30s, 60℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 3 min, 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min, 获得 2.4kb 左右 PCR 产物。将 PCR 产物条带回收后连接到 T 载体 (pMD18-T), 获得重组质粒 pMtrY。用 *EcoRI* 和 *HindIII* 双酶切 pMtrY, 将酶切的 DNA 片段与经同样酶切的表达质粒 pTrc-99a 载体连接, 转化大肠杆菌 JM83, 酶切鉴定重组子, 获得含有重组表达质粒 pTrc-MtrY 的基因工程菌株。基因工程菌株经 1mmol/L 的 IPTG 诱导培养 4.5h, 离心收集菌体, 每 1g 菌体溶解于 10mL PBS 缓冲液, 冰浴下超声破碎, 离心获得上清 (即粗酶液), 并以含有空质粒的菌株为相应空白对照, 进行蛋白电泳和酶活力测定。

1.2.5 表达产物的酶活力测定方法: 2mL DE 值 7.4, 2.5% (w/v) 的麦芽低聚糖溶液中, 加入 2mL 粗酶液, 50mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0), 加入 Zn^{2+} 使其浓度达到 10mmol/L (抑制 MTHase 酶), 37℃ 保温 120min, 100℃ 终止反应。Somogyi-Nelson^[6] 方法测定 OD_{590} 计算还原糖含量, 每分钟内使相当于葡萄糖减少 1μg 的酶量定义为一个酶活力单位。

酶活计算公式: 酶活 (U/g 细胞) = $Wi / (T \times Wc)$

Wi: 反应后减少的相当于葡萄糖的量 (μg), Wc: 细胞克数 (g), T: 反应时间 (min)。

2 结果

2.1 PCR 获得部分目的基因作为探针

以藤黄微球菌染色体为模板, P1 和 P2 为引物进行 PCR 扩增, 得到 850bp 的产物。将此 PCR 产物测序后和节杆菌 (Q36) 基因序列进行同源比较分析, 发现与节杆菌 MTSase 基因 *MtrY* 的 DNA 同源性高达 70%。因此认为此 PCR 产物为藤黄微球菌中 MT-Sase 基因的内部序列。将此 PCR 产物 DIG 标记后, 作为基因组文库的杂交探针。

2.2 非随机鸟枪法克隆目的基因 5' 端

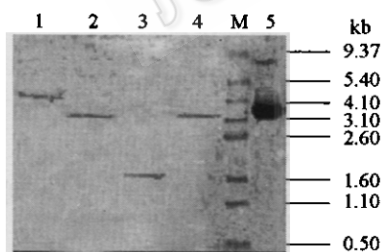


图 1 Hybridation Map of *Micrococcus luteus* Chromosome

1 *Bam*HI, 2 *Pst*I, 3 *Sac*I, 4 *Sma*I,
5 Linear pML-T, M DNA marker

将藤黄微球菌染色体 DNA 用 *Bam*HI、*Pst*I、*Sac*I、*Sma*I 4 种限制性内切酶分别酶切, 以 PCR 得到的 850bp 序列 DIG 标记后为探针进行转膜杂交, 得到阳性条带 (图 1)。根据杂交图谱, 选择 *Pst*I 酶切藤黄微球菌染色体的 2.9 ~ 3.3kb 片段作为外源片段, 以 pUC-18 为载体构建限制性基因文库。共得到 1,500 个白色克隆, 取样计算文库的重组率为 70%。用 PCR 方法筛选基因文库, 得到期望重组子, 经亚克隆后测序并进行序列拼接, 得到 2,152bp DNA 序列, 其中含有起始翻译密码子 GTG。

2.3 PCR 方法克隆目的基因 3' 端

以藤黄微球菌染色体为模板, P3 和 P4 为引物, 得到 1,600bp 的扩增产物。经亚克隆测序后得到此 PCR 产物的全序列。

2.4 序列分析

将结果 2.3 和 2.4 中得到的序列拼接, 共有 3,752bp 序列, 已提交 GenBank, 登录

号 DQ119337。经开放读码框分析, 序列中含有藤黄微球菌 MTSase 的全长基因, 共 2,370bp, 编码的肽链含有 789 个氨基酸, 命名为 *MtreY*。此基因的氨基酸序列经在线 BLAST 分析, 表明其与其他微生物来源的 MTSase 有很高同源性。以 *MtreY* 为基准, 不同微生物来源 MTSase 的 DNA 和氨基酸序列与之相比较的相似性数据见表 1, 算法基于 ClustalW 程序。

表 1 *MtreY* 与其他微生物来源的 MTSase 酶基因序列相似性 (基于 ClustalW 多重序列比较算法)

微生物	DNA (%)	氨基酸 (%)
<i>Arthrobacter ramosus</i>	68.3	55.1
<i>Arthrobacter. sp. Q36</i>	66.2	55.2
<i>Brevibacterium helvolum</i>	64.5	51.1

在其他 3 个微生物菌株的已知基因序列中, MTSase 基因与 MTHase 基因均为紧密串联排列, 本文的藤黄微球菌也不例外, 在 *MtreY* 终止密码子 TGA 下游 4 个碱基后即发现 *MtrZ* 的起始密码子 ATG。*MtrY* 全长序列和 *MtrZ* 5' 端部分序列见图 2。

GTGCTGACTCCCACTTCCACGTACCGGTTGCAAATCACCACCCAGCAGACCTCCACCGCGCGGCGGAAC 70
V L T P T S T Y R L Q I T T Q Q D L H R A A E L

MtreY

TGGTCCCGTACCTCCGGCGCCTCGGGGCGGACTGGGTGTACCTCTCACCGATCCTGCGCGCCACGAGCGG 140
V P Y L R R L G A D W V Y L S P I L R A T S G
CTCCGACCACGGCTACGACGTGGTGACCCACCGAGGTGGACCCCGAGCGTGGCGGTTCGAGGGCTTG 210
S D H G Y D V V D P T E V D P E R G G S E G L
CGGGCACTGTCGACGCGCGCACGCGCGGGTCTGGGCGTGGTGGACATCGTCCCAACCACGAGG 280
R A L S D A A H A A G L G V V V D I V P N H Q G
GCGTGGCGGAACCGCAGCAGAACCCTGGTGGTGGTCCCTGCTCGCGGAGGGCCGCGAGAGCCGTACGC 350
V A E P Q Q N P W W W S L L A E G R E S R Y A
GGACGCGTTCGACGTGGACTGGGAGGCCGCGCGCGCAAGGTGCTGATCCCGGTGCTGGGGGACGGGGAC 420
D A F D V D W E A G G G K V L I P V L G D G D
GAGGACCTCGCCGCGCTGACAGTGCAGGACGGCACCCTGCGCTACTACGACAACGTGTACCCCTGGCGG 490
E D L A A L T V Q D G T L R Y Y D N V Y P L A E
AGGCCAGTGGAGCGAGGGTGAAGACCCGCGGAGGTGCACCTCCCGTCAGCACTACGAGCTGGTCAACTG 560
G T W T E G E D P A E V H S R Q H Y E L V N W
GCGCCGCGGGGACTCCGAGCTGAACCTACCGCGGTTCTTCACCGTGGCCACCCTCGCGGGGTGCGCGTG 630
R R G D S E L N Y R R F F T V A T L A G V R V
GAGAACCCGCGCTCTTCGAGGAGTCCACCGGGAGGTCTCCCGCTGGTTCGCGAGGGTCTCGTGGACG 700
E N P R V F E E S H R E V S R W F R E G L V D G
GGCTGCGCATCGACCACCCGGACGGGTGCGGGACCCGCGCGCTACCTGGACGCGCTGGCCGAGCTCAC 770
L R I D H P D G V R D P R G Y L D A L A E L T
GAGCGCGCGTGGACCGTGGTGGAGAAGATCCTGGAGCCGGGGAGTACCTCCCTTCGACTGGCGCACC 840
S G A W T V V E K I L E P G E Y L P S D W R T
GCCGGCACCACGGGTACGACTCCCTGGGTGGATCGACCGGGTGTACGAGACGCCCCGGGGCCACTACG 910
A G T T G Y D S L G W I D R V L T D A R G H Y E
AACTGGCGTCCCTGGACACCAAGCTGCGCGCGGGGACCCGCGCGCTGGGACGAGCTGATCCACGGCAC 980
L A S L D T K L R G G D P A R W D E L I H G T
CAAGCGCCGCATGGCGGACGAGGACTCTCCGCGGAGATCCACCGCTGGTGGCGGAGCTGCCCGCCGAC 1050
K R R M A D E G L S A E I H R L V R E L P A D
TTCCCGCACGACGCCCGCGGGCTACGACGGGTCTCGCGAGATCGTCTCGAACTTCCCGGTGATCCGGA 1120
F P H D A P A A Y D G L A E I V S N F P V Y R T
CGTACCTGCCCGAGGAGTCCAGCACTTGGCGGAGGCCGTGGCCGCGGACGCGCGCGCGCCCGCTCT 1190
Y L P E G V E Q H L R E A V A A A R G R P D L
CGCTGCGGTGCTACGGACCTCGCGGAGGTCTGGGTGCTGAGGCAGCTCACGAGGAGACCTGGGGGAG 1260
A A V L T D L A E V L G A E A A H E E D L G E
GTGGCCCGCGCTTCAGCAGACCTCGGGCATGGTCATGCCAAGGGCGTGAGGACACCGCGTCTTACC 1330

V A R R F Q Q T S G M V M A K G V E D T A F Y R
 GCTGGACCAGGCTCACCTCGCTCACCGAGGTGGCGGGGACCCCTCGGTGTTCTCCCTGGACGCGGACGC 1400
 W T R L T S L T E V G G D P S Y F S L D A D A
 GTTCCACGCCGAGGCCGCCAGGCGCCAGCGGAGACCCGCTGACCATGAACGCGCTGACCACGCACGAC 1470
 F H A E A A R R Q R E T P L T M N A L T T H D
 ACCAAGCGTTCCCGCGCGGTTCGGGCCCGGCTCACGGTGCTCTCGGAGCTCCCGCGCGTGTGGTCCGAGA 1540
 T K R S A A V R A R L T V L S E L P R V W S E T
 CGGTGTCCACGCTGCTCGGCCGGCGAAGGACGCCGGATCTCCCTGACCAGCGGTCCCGCGGTGAACCT 1610
 V S T L L G R A K D A G I S L T D G P A V N L
 CGTGCTGCAGCCGTGGTGGGCGCGTGGCCCTGGACCGGGACCGCGCGTGGACTACGCCATGAAGGCC 1680
 V L Q A V V G A W P L D R D R A V D Y A M K A
 GTGCGCGAGGCTCCGTGTCCACCGCGTGGGTGGACGGGACAGGAGTTCGAGGAGCAGCTCACCCTACT 1750
 V R E A S V S T A W V D G D Q E F E E Q L T H F
 TCATCGACTTCTCTTACCGATCCCCGCGCCCGCGGCATCGTGGAGGGCTGCGTGGCCCGCGTGAAGCGA 1820
 I D F L F T D P R A R G I V E G C V A R V S E
 GCCGGGTGGTGAACGCCCTCGCCGCCACCGCGTGCAGCTCACCCTGCCCGCGCTCCCGGAGCTGTAC 1890
 P G W S N A L A A T A L Q L T L P G V P D V Y
 CAGGGTCAGGAGCTGTGGGATCCCTCCCTCGTGGACCCGACAACC GCCCGCCCGTGGACTTCGCGCGCGC 1960
 Q G Q E L W D P S L V D P D N R R P V D F A A R
 GCGAGGAGATGCTCTCGCGGCTCGACGCCCGCGCCCCCGTTCGGGGCGCGGCACCCCGCCCGTGGACGA 2030
 E E M L S R L D A A A P G S G A G T P P V D E
 GACCGGCGCGCGCATGCTGCTGACCTCCCGCGCCCTGCGGCTGCGCCGCGAGCACCCGGAGCTGTTC 2100
 T G A A R M L L T S R A L R L R R E H P E L F
 ACCGACTACACCCCGCTGCGGTTCACCGCGCGCTCGCGGCGCACGCCCTGGGCTTCGACCGCGCGCGGCG 2170
 T D Y T P L R F T G A L A H A L G F D R G G A
 CGGCCACCGTGGTACCCGCTTCCCGCCACACTCGCCGCGGAGGGCGGGTTCACGGACGAGACCGTGA 2240
 A T V V T R F P A T L A A E G G F T D E T V E
 GCTGCCGCGCGGCACGTGGCATGACATCTGACCCACCGCGAGTTCACGGCCGCCAGGACGCGCCCGTG 2310
 L P A G T W H D I L T H R E F T A A Q D A P V
 GCGCTCGCCGAACCTCTCGACACCTACCCCGTGGCGATCTGCGCCGGAAGGACGGCTGAACCCATGAGC 2380
 A L A E L L D T Y P V A I L R R K D G * M S
MtreZ
 ACCGACCACCGCTTCGACGCTCTGGGCGCCCCACGCCCGCAAGGTACCGTCCGCATCGAGGGTGGGACC 2450
 T D H R F D V W A P H A R K V T V R I E G A D H
 ACCCCATGGAGGGCCTCGCGGACCGCCCCGCGTGGTGGACCTGCGCGGAGGACGCCCGCCCGCCGAGGG 2520
 CACCGTGGCTACGGCTACATCTCACCAAGACCTTCGACGAGGGCACACCCGAGGAGCGCGAGCAGGTC 2590
 TCCGACGTGCTCCCGGACCCCGTTCGGGCGTCAGCCCCAGGGCGTGCACGAGCTGTCTGCACGTTTCG 2660
 ACCCGGACGCGTGCAGTGGCAGCAGCCGAGTTCGCGCCCCGCCGCTGCAGGACTCCGTGCTGTACGA 2730
 GCTGCACCCCGGCACGTTACCCCGGAAGGCACGCTGGACGCGGCCATCGAGAAGCTGGACCACCTGGTG 2800
 GACCTCGGTGTACGGCGGTGGAGCTGCTGCCCCCAACGGCTTCAACGGCGAGCACAACTGGGGCTACG 2870
 ACGGCGTGGCGTGGTACACCGTGGCGGAGCCCTACGGCGGGCCCGAGGCGTACCAGCGTTTCGTGGACCG 2950
 TGCCACGGCCGCGGCATCTCCGTGATCCAGGACGTGGTCTACAACCACCT 3000

图 2 *MtreY* 基因全序列和 *MtreZ* 基因的部分序列

将藤黄微球菌 MTSase 与 α -淀粉酶家族酶进行氨基酸序列比较 (表 2), 可以发现它们具有相同的保守模体。三维结构和位点突变分析的信息都证明这 4 个模体的氨基酸残基为 α -淀粉酶类催化活性相关部位^[4], 因此推测藤黄微球菌的 MTSase 也属于 α -淀粉酶家族。

表 2 *MtreY* 与 α -淀粉酶家族成员*的同源区比较

Enzyme	A-region	B-region	B'-region	C-region
<i>MtreY</i>	87 DIVPNH	234 GLRIDHP	262 TVVEKI	485 ALTTHD
α -Amylase	117 DVVANH	202 GLRIDTV	227 CIGEVN	292 RVENHD
G4-Amylase	133 DVVPNH	210 GFRFDV	237 CVGELW	309 FVDNHD
CGTase	135 DFAPNH	225 GIRFDAV	255 TFGWEF	324 FIDNHD

续表 2

Maltase	106 DLVINH	210 GFRIDTA	273 RVGEVA	344 YIENHD
Pullulanase	619 DVVYNH	690 GFRFDLM	720 FFGEGW	846 YVSKHD
Isoamylase	317 DVVYNH	396 GFRFDLA	439 ILREFT	528 FIDVHD
Branching enzyme	238 DWVPGH	304 GFRVDAV	348 MIAEDS	414 LPFSDH

注: 表 2 中 α -淀粉酶家族成员氨基酸序列的微生物来源, α -淀粉酶 (EC 3.2.1.1) 来自 *Aspergillus oryzae*, G4-淀粉酶 (即葡萄糖 1, 4- α -麦芽四糖水解酶) (EC 3.2.1.60) 来自 *Pseudomonas stutzeri*, CGTase (即环状麦芽糊精葡聚糖转移酶) (EC 2.4.1.19) 来自 *Bacillus macerans*, 麦芽糖酶 (即 α -葡萄糖苷酶) (EC 3.2.1.20) 来自 *Saccharomyces cerevisiae*, 普鲁兰酶 (即 α -糊精内切-1, 6- α -葡萄糖苷酶) (EC 3.2.1.41) 来自 *Klebsiella aerogenes*, 异淀粉酶 (EC 3.2.1.68) 来自 *Pseudomonas amyloclavata*, 分支酶 (即 1, 4- α -葡聚糖分支酶) (EC 2.4.1.18) 来自 *Bacillus stearothermophilus*

2.5 MTSase 基因的异源表达和酶活性初步分析

将 *MtreY* 基因插入表达载体 pTrc-99a, 在大肠杆菌 JM83 中诱导表达, 收集诱导前和诱导不同时间后的培养物, 以 OD₆₀₀ 为参照经稀释以保证同样的菌体量, 然后进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 3。*MtreY* 表达产物理论分子量为 86.7kD, 电泳图显示, 与对照和诱导前样品相比, 诱导后的菌体蛋白在预期分子量大小处出现了一条新增带 (图中箭头所指)。但表达量较低, 还需要进一步摸索诱导表达条件。

提取粗酶液, 以含有空质粒的菌株为相应空白对照, 按照 1.2.5 方法进行酶活测定和计算。与对照相比, pTrc-*MtreY*/JM83 表达产物使反应液还原糖含量明显下降。按公式计算, pTrc-*MtreY*/JM83 菌体超声破碎液中 MTSase 的酶活力为 16.8U/g, 超声破碎液上清中 MTSase 的酶活力为 18.9U/g。证明表达产物具有预期的生物活性。

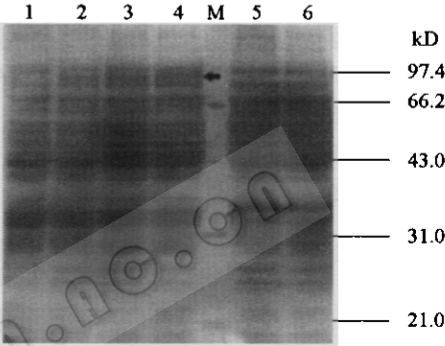


图 3 pTrc - *MtreY*/JM83 的诱导表达蛋白电泳图
1 pTrc-*MtreY*/JM83 诱导前, 2 ~ 4 分别为 pTrc-*MtreY*/JM83 诱导后 0.5h, 2.5h, 4.5h, M 蛋白质分子量标准, 5 pTrc-99a/JM83 诱导前, 6 pTrc-99a/JM83 诱导后

3 讨论

对于克隆新基因, 需要不同策略相结合。微球菌属与节杆菌属亲缘关系较近, 因此, 本文根据已知节杆菌属及其他微生物来源的 MTSase 和 MTHase 基因序列保守区设计简并引物, PCR 扩增出一段目的基因的内部序列, 并以此为探针, 杂交筛选限制性基因文库, 从而获得目的基因的部分序列。进而根据新的已知序列, 扩增出全长基因。从其他微生物的基因信息推测, *MtreY* 上下游还存在 *MtreX* 和 *MtreZ* 与藤黄微球菌海藻糖生物合成相关, 本文已获得其部分序列, 还需要进一步研究获得全长序列。

参考文献

[1] Richards A B, Krakowak S, Dexter L B, et al. Food and Chemical Toxicology, 2002, 40: 871 ~ 898.
[2] Maruta K, Hattori K, Nakada T, et al. Biochim. Biophys. Acta, 1996, 1289 (1): 10 ~ 13.
[3] Kim Y H, Kwon T K, Park S, et al. Appl Environ Microbiol, 2000, 66 (11): 4620 ~ 4624.
[4] 欧阳立明, 王善利, 施超欧, 等. 微生物学通报, 2004, 31 (4): 49 ~ 52.
[5] 赖承兴, 葛 宇, 袁勤生. 中国医药工业杂志, 2003, 34: 433 ~ 435.
[6] Maruta K, Yutaka M, Masoka K, et al. Biosci Biotech Biochem, 1996, 60 (3): 546 ~ 550.
[7] 张惟杰主编. 糖复合物生化研究技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1988. 2 ~ 4.