

一株海洋细菌的初步鉴定及其产黑色素相关新基因(簇)的分离*

魏力 方加玮 周俊初 李友国**

(农业微生物学国家重点实验室 华中农业大学 武汉 430070)

摘要 对分离自近海沼泽地大米草根际的一株供试海洋细菌 MWYL1 进行了形态观察、生理特性检测以及 16S rDNA 序列分析。实验结果表明,该菌株属于海洋单胞菌属(*Marinomonas*),革兰氏染色呈阴性,直杆状,好氧生长,适于 28℃ 生长。基于 16S rDNA 序列的 Blast 分析表明,菌株 MWYL1 与 *Marinomonas pontica* 和 *Marinomonas dokdonensis* 的序列相似性分别为 97% 和 95%。通过基因组 fosmid 文库的构建,直接分离到一个产生黑色素的克隆,进一步亚克隆和测序后获得与黑色素产生相关的功能新基因(簇),并且对其进行了生物信息学的初步分析。

关键词 海洋细菌,黑色素,新基因簇,分离

中图分类号:Q93-3 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)06-1118-05

Identification of a Marine Bacterium Strain and Characterization of a Novel Functional Gene Cluster Involved in Melanin Biosynthesis*

WEI Li FANG Jia-Wei ZHOU Jun-Chu LI You-Guo**

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract A marine bacterium MWYL1, originally isolated from the roots of *Spartina anglica* growing in a salt marsh near seaside, was identified as a member of the genus of *Marinomonas* via morphology characterization, physiological test and 16S rDNA sequencing and Blast analysis. The strain was short, rod, gram-negative, grew aerobically and optimally at 28°C. The analysis of 16S rDNA sequence suggests that the sequence similarity values are 97% and 95% with *Marinomonas pontica* and *Marinomonas dokdonensis*, respectively. One fosmid clone producing melanin was directly isolated by plating from the genomic library of *Marinomonas* MWYL1. The novel functional gene cluster involved in melanin biosynthesis was screened after subcloning and sequencing of the 14kb insert in pUC18, further more, the putative functional genes was preliminary analyzed using bioinformatics.

Key words Marine bacterium, Melanin, Novel gene cluster, Isolation

海洋是地球早期生命的诞生地,具有高压、高盐、低营养、低温、无光照以及局部高温等独特的环境,海洋微生物由于适应了这种环境,造就了其种类的特异性及代谢途径的多样性,尤其是初级代谢产物和次生代谢产物种类更加繁多,结构更加新颖,可产生与陆地微生物完全不同的生物活性物质^[1,2]。目前海洋生物资源的研究和开发越来越受到世界各国的重视,已成为自然科学中相当活跃的研究领域之一。黑色素(melanin)是一类由细菌、真菌及动植物产生的多酚聚合物,具有复杂的结构。它作为一种次生代谢产物,对生物的防御功能有关^[3]。它

能防御很多胁迫因子(诸如紫外线、氧化剂、自由基等)最近报道黑色素具有抗菌活性^[4]。本文对从近海分离到的一株海洋细菌 MWYL1 进行了初步的鉴定,分离到与黑色素生物合成相关的功能基因簇,并且对该基因簇进行了生物信息学初步分析。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

一株供试海洋细菌 MWYL1 由英国东安尼亚大学生物学院安迪教授惠赠,分离自英国某沿海盐沼泽地中生长的大米草(*Spartina anglica*)植物根际。

* 农学教学实验用微生物菌种资源标准化整理、整合及共享试点(2005DKA21208-6)

** 通讯作者 Tel:027-87281685, Fax:027-87280670, E-mail:liyoguo2001@yahoo.com.cn

收稿日期:2007-03-24,修回日期:2007-06-29

1.2 主要试剂和仪器

质粒抽提试剂盒购自武汉天源公司,细菌基因组DNA提取试剂盒购自TIAN GEN公司,QIAGEN Genomic-tip 100/G试剂盒和Copy Control Fosmid Library Production Kit购自基因有限公司,Taq酶和各种内切酶以及pMD18-T载体均购自TaKaRa公司,PCR扩增仪为MJ Research Inc生产的PTC2-100型,分光光度计为Beckman生产的DU270型。

1.3 菌体形态和培养特征观察

将菌株MWYLI划线接种于LB固体培养基上,28℃培养24h,观察菌落大小、颜色、形态等特征。采用革兰氏染色法在光学显微镜下观察菌体形态^[5]。

1.4 生理生化特性检测

实验方法参照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第九版),包括H₂O₂酶活性、产氨试验、淀粉水解试验、纤维素分解实验、甲基红试验、V.P.试验和硝酸盐还原试验。唯一碳源利用试验中分别选择:麦芽糖、蔗糖、乙醇、酒石酸钾钠、山梨醇、甘露醇、乳糖、乙酸盐和柠檬酸盐,唯一氮源利用试验中分别选择:硝酸盐、亚硝酸盐和铵盐。

1.5 16S rDNA序列扩增及系统发育分析

基因组DNA的抽提采用细菌基因组DNA提取试剂盒。采用细菌16S rDNA保守区通用引物扩增该细菌16S rDNA的部分片段。

引物序列为正向引物fD1: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';反向引物rD1: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。扩增的反应体系为(50μL): 10×buffer 5.0μL, dNTP混合物(20mmol/L) 1μL,引物fD1和rD1(各20μmol/L) 2.0μL,模板DNA 50ng, Taq酶2U,加超纯水补足50μL。PCR反应条件: 94℃ 4min, 94℃ 1min, 56℃ 1min, 72℃ 1min, 30个循环; 72℃ 5min。通过PCR扩增反应获得菌株MWYLI的16S rDNA。然后将纯化后的16S rDNA片段克隆于pMD18-T载体(TaKaRa公司产品)上,送北京三博远志公司测定DNA序列。将测定的16S rDNA序列在GenBank数据库中进行同源性比对,并用Fast Minimum Evolution方法构建系统发育树。

1.6 基因组文库的构建

基因组DNA的制备和纯化采用QIAGEN Genomic-tip 100/G试剂盒完成,文库的构建采用

Copy Control Fosmid Library Production Kit进行。操作方法严格按照产品说明书提供的程序进行。

1.7 产黑色素克隆的分离和亚克隆

产黑色素克隆经过BamHI酶切连接到同种酶切后的pUC18载体上,再转化*E. coli* JM83,分离到产黑色素的亚克隆并测序,序列测定由奥科公司完成。

1.8 序列分析

采用NCBI/ORF finder和Softberry等软件查找ORF,并通过Blast程序与GenBank中的数据进行比较分析。

2 结果与分析

2.1 个体形态和培养特征

菌株MWYLI在LB培养基上培养24h后,菌落呈乳白色,不透明,圆形,直径约1.5mm,低凸起,边缘整齐。菌体为短杆状,革兰氏染色呈阴性。

2.2 生理生化特性检测

生理生化特性检测结果表明,菌株MWYLI好氧生长,最适生长温度为28℃,37℃不生长,其pH值生长范围为5.0~10.0,最适pH值为7.0。在NaCl浓度8.0%下可生长,最适NaCl生长浓度为5.0%。

进一步发现:其H₂O₂酶活性、产氨试验为阳性,淀粉水解试验、纤维素分解实验、甲基红试验、V.P.试验和硝酸盐还原试验均为阴性。该菌能够利用麦芽糖、蔗糖、乙醇、酒石酸钾钠、山梨醇、甘露醇作为唯一碳源在基本培养基M9上生长,但不能利用乳糖、乙酸盐、柠檬酸盐作为唯一碳源,能利用硝酸盐、亚硝酸盐和铵盐作为唯一氮源。

2.3 16S rDNA序列及系统发育分析

对菌株MWYLI的16S rDNA扩增获得了1536bp的序列(GenBank的注册号为EF094505),将该16S rDNA序列在GenBank中进行同源性比对,结果发现Query coverage和Max ident分别在90%以上的序列有34个,同源性最高的是*Marinomonas pontica*和*Marinomonas dokdonensis*,相似值分别为97.0%和95.0%(图1)。

2.4 基因组文库的质量检测

为了检测基因组文库的构建质量,随机挑取克隆检测外源插入片段平均在35kb~40kb,文库初始大小约含2.0×10⁶克隆。

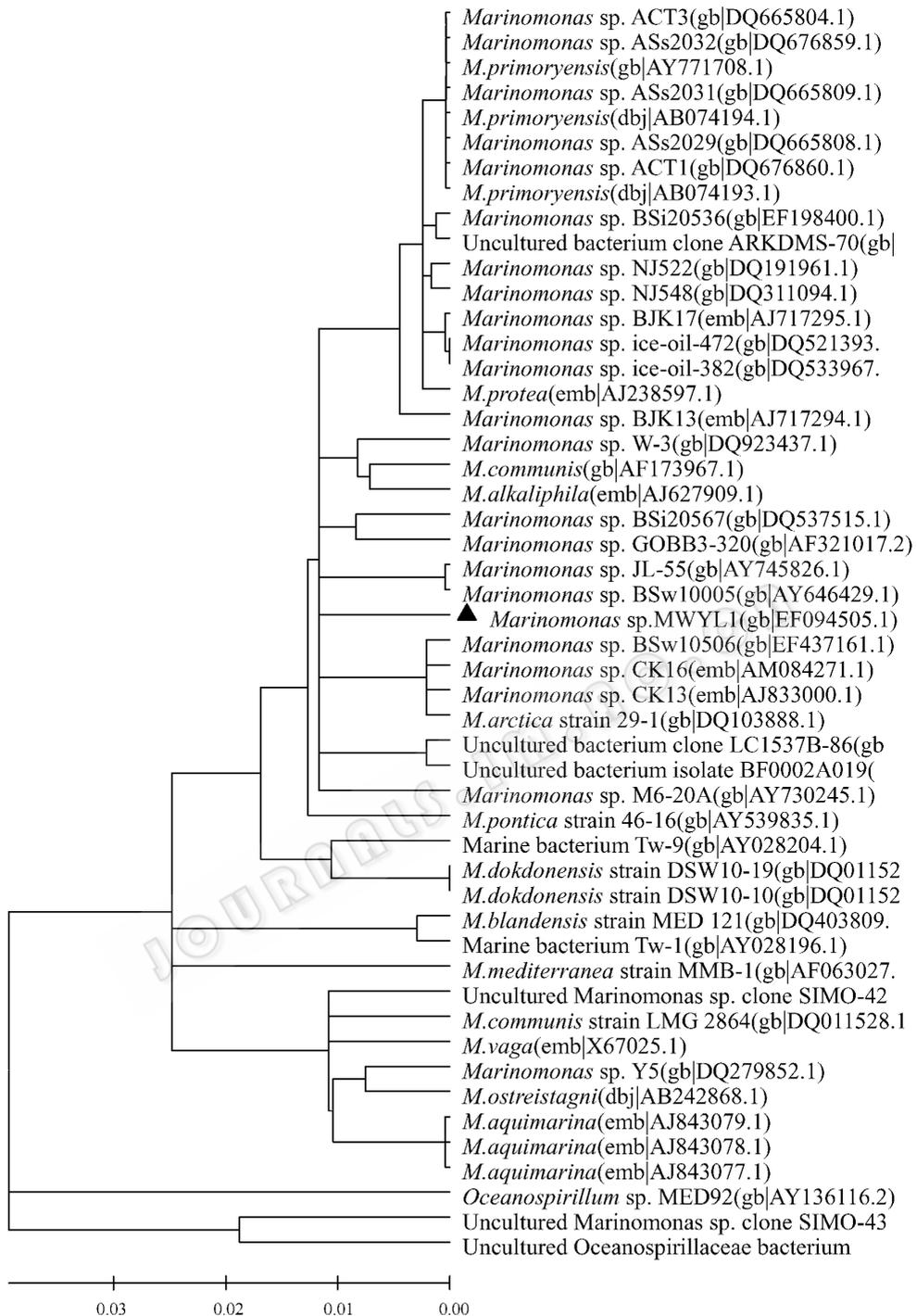


图1 相关海洋单胞菌 16S rDNA 系统发育树

2.5 黑色素合成基因簇的克隆

供试海洋单胞菌 MWYL1 本身不产生色素,但构建基因组文库后,从文库中直接分离获得 1 个产生黑色素的大肠杆菌 fosmid 克隆(图 2),经亚克隆后其相关功能片段在 9416bp 和 23130bp 之间(图 3),并对其进行了全长插入片段的测序。

2.6 黑色素合成功能基因簇的序列分析

通过用 NCBI/ORF finder 和 Softberry 等软件分析,发现上述相关 14kb 片段含有 14 个推测的开放式阅读框(ORF),并通过 Blast 程序与 GenBank 中的数据进行比较分析,对其编码蛋白功能进行了注释(表 1 和图 4)。

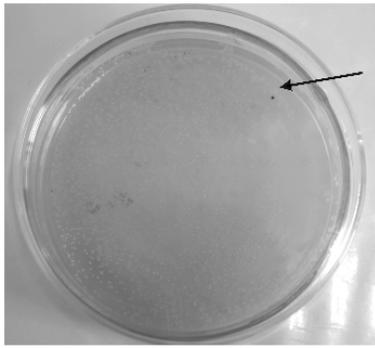


图2 基因组文库中获得的产黑色素 fosmid 克隆

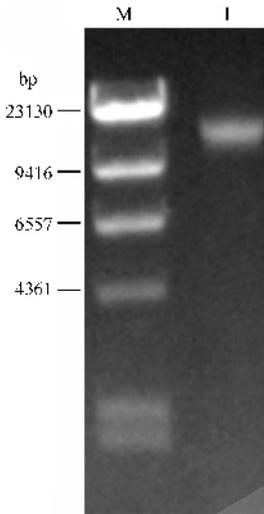


图3 产生黑色素的亚克隆功能片段大小

表1 推定基因编码的注释及其功能

开放阅读框	基因编码的蛋白(酶)	在相关黑色素合成途径中各基因的功能
ORF1	乙醛脱氢酶	未知
ORF2	阿拉伯糖 C 型 DNA 结合蛋白	转录调节
ORF3	吡啶乙酰胺羟化酶	未知
ORF4	(S)-2-羟酸氧化酶	未知
ORF5	FMN 结合黄素还原酶	电子运输有关
ORF6	细胞色素 P450	从 NAD(P)H 获得电子后,催化单加氧反应
ORF7	乙酰基载体蛋白还原酶	乙酰基的转移
ORF8	芬芳环羟化双加氧酶 β 亚基	未知
ORF9	环羟化双加氧酶	未知
ORF10	预测芬芳环羟化双加氧酶 β 亚基	未知
ORF11	周质底物结合蛋白	底物运输有关
ORF12	乙酰辅酶 A 脱氢酶相类似	未知
ORF13	ABC 转运蛋白	长链氨基酸的运输(胞外与配体结合受体)
ORF14	ABC 转运蛋白	内膜运输(透性酶组分)

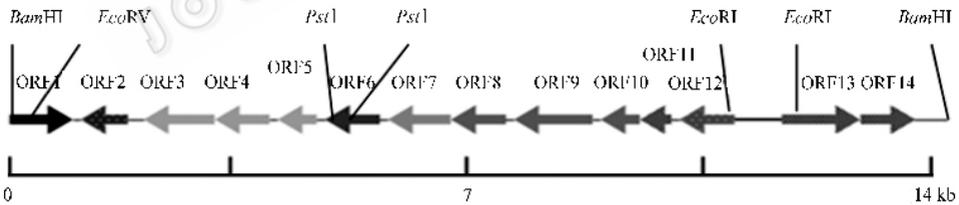


图4 黑色素合成亚克隆功能片段的基因注释及其物理酶切图

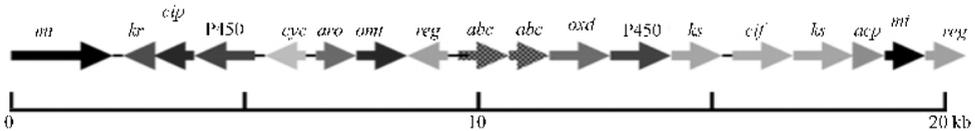


图5 链霉菌中黑色素合成基因簇

基因符号缩写: *abc*, ABC 运输蛋白; *acd*, 乙酰辅酶 A 脱氢酶; *acp*, 乙酰载体蛋白; *aro*, 芳香化酶; *clf*, 长链因子; *clp*, ATP 依赖蛋白酶; *cyc*, 环化酶; *dh*, 脱水酶; *hyd*, 羟化酶; *kr*, 酮还原酶; *ks*, β-酮酰合酶; *mt*, 转甲基酶; *p450*, 细胞色素 P450; *omt*, O-转甲基酶; *oxy*, 氧化还原酶; *reg*, 调控蛋白。

由表 1 可见,在插入片段中存在至少 6 个在细菌中与黑色素生物合成相关的基因,如乙醛脱氢酶基因(ORF1)、阿拉伯糖 C 型 DNA 结合蛋白基因(ORF2)、细胞色素 P450 基因(ORF6)、乙酰基载体蛋

白还原酶基因(ORF7)、乙酰辅酶 A 脱氢酶相类似基因(ORF12)和 ABC 转运蛋白基因(ORF13,14)等^[6,7]。它们存在于链霉菌的黑色素合成基因簇中^[15](图 5),但是同时也发现另外两个新基因:芳香环羟化双

加氧酶 β 亚基基因(ORF8)和环羟化双加氧酶基因(ORF9),它们在目前已报道的微生物黑色素合成途径中均不存在,推测该合成途径与已报道的不同,它们在黑色素途径合成中的功能有待进一步研究。

3 讨论

根据《伯杰氏细菌鉴定手册》(第九版)和《伯杰氏系统细菌学手册》所描述的属的特征,再结合以16S rDNA序列为基础进行系统发育学分析结果,菌株MWYL1与已经报道的海洋单胞菌有很大程度的相似性^[8,9],可将该供试菌归入海洋单胞菌属,但是否是海洋单胞菌属中新成员,需要进一步的分子生物学鉴定。

微生物黑色素的合成具有多条途径:1)以酪氨酸作为前体,在酪氨酸酶作用下合成黑色素;2)漆酶作用下合成黑色素;3)黑色素也能通过氧化尿黑素或P-联苯酚产生;4)二羟基奈黑色素是通过聚酮合成酶途径,从乙酸衍生而来。其中,酪氨酸酶和漆酶同属于多酚氧化酶家族^[10]。二羟基奈黑色素研究得较为清楚,漆酶在植物和真菌中广泛存在,在微生物中也发现它的存在,微生物酪氨酸酶在根瘤菌、链霉菌中发现。对于海洋单胞菌属而言,酪氨酸酶和漆酶在 *Marinomonas mediterranea* 中都被发现,它们同属于多酚氧化酶家族,但菌株 MWYL1 的黑色合成基因簇不存在编码酪氨酸酶和漆酶的基因^[11-14],这也暗示该菌有可能属于海洋单胞菌的一个新成员。从14kb亚克隆功能片段的序列分析和基因注释中发现,该菌黑色素合成基因簇中存在聚酮合成酶途径中某些基因(如阿拉伯糖C型DNA结合蛋白基因(ORF2)、细胞色素P450基因(ORF6)、乙酰基载体蛋白还原酶基因(ORF7)、乙酰辅酶A脱氢酶相类似基因(ORF12)和ABC转运蛋白基因(ORF13,14),但非常有兴趣的是其又缺少该途径中的必需关键基因聚酮合成酶或聚酮还原酶基因,所以有理由推测该菌株的黑色素产生途径可能不是传统的聚酮合成酶途径。但是,环羟化双加氧酶 β 亚基(ORF)与小孢霉酮脱氢酶在结构上非常相似,存在保守结构域,二者都属于核内运输因子2(NTF2)超家族,小孢霉酮脱氢酶是与黑色素合成相关的,在

真菌中普遍存在^[16-18],参与形成2-羟基奈黑色素。因此,环羟化双加氧酶 β 亚基可能具有小孢霉酮脱氢酶同样的功能,深入研究该细菌的黑色素合成途径具有一定的理论意义,将有利于认识原核微生物和真核生物黑色素合成途径的系统进化和发育。本室也正在继续开展功能基因的表达调节、黑色素合成的底物和黑色素成分等方面的研究,该菌在什么环境胁迫条件下合成黑色素、黑色素对细菌本身的生态学意义以及该黑色素是否具有其它生物活性(如拮抗细菌或真菌)值得深入探索研究。

参考文献

- [1] Frette L, Johnsen K, Jorqensen NO, et al. Int Microbiol, 2004, 7(3):219~227.
- [2] Mincer TJ, Spyere A, Jensen PR, et al. Curr Microbiol, 2004, 49(4):300~307.
- [3] Plonka PM, Grabacka M. Acta Biochim Pol. 2006 53(3):429~443.
- [4] Nosanchuk JD, Casadevall A. Cell Microbiol, 2003 5(4):203~223.
- [5] 赵斌,何绍江主编.微生物学实验.北京:科学出版社,2002, pp.38~40,141~142.
- [6] Funa N, Funabashi M, Ohnishi Y, Horinouchi S. J Bacteriol 2005 187(23):8149~8155.
- [7] Zhu D, He X, Zhou X, et al. J Bacteriol 2005 187(9):3180~3187.
- [8] Macian MC, Arahal DR, Garay E, et al. Syst Appl Microbiol, 2005, 28(2):145~150.
- [9] Lau KW, Ren J, Wai NL, et al. Int J Syst Evol Microbiol, 2006 56 Pt 10):2271~2275.
- [10] Lopez-Serrano D, Solano F, Sanchez-Amat A. Gene, 2004 342(1):179~187.
- [11] Sanchez-Amat A, Lucas-Elio P, Fernandez E, et al. Biochim Biophys Acta, 2001 1547(1):104~116.
- [12] Solano F, Lucas-Elio P, Fernandez E, et al. J Bacteriol, 2000 182(13):3754~3760.
- [13] Lopez-Serrano D, Sanchez-Amat A, Solano F. Pigment Cell Res, 2002, 15(2):104~11.
- [14] Lucas-Elio P, Solano F, Sanchez-Amat A. Microbiology, 2002 148(8):2457~2466.
- [15] Omura S, Ikeda H, Ishikawa J, et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(21):12215~12220.
- [16] Kihara J, Moriaki A, Ueno M, et al. Curr Genet, 2004 45(4):197~204.
- [17] Thompson JE, Fahnestock S, Farrall L, et al. J Biol Chem, 2000 275(45):34867~34872.
- [18] Wang HL, Kim SH, Breuil C. Mol Genet Genomics, 2001 266(1):126~132.