

拟南芥海藻糖酶基因克隆及其在大肠杆菌中 高效表达与功能研究

郭蓓^{1,2} 胡磊³ 盖颖¹ 王喜智¹ 陈雪梅^{1*} 蒋湘宁¹

(1. 北京林业大学生物科学与技术学院 国家林业局树木花卉育种生物工程重点开放实验室 北京 100083)

(2. 北京农学院生物技术系 北京 102206)

(3. 南昌大学中德联合研究院 教育部重点实验室 南昌 330047)

摘要: 从拟南芥幼苗中提取 RNA, 通过 RT-PCR 克隆得到海藻糖酶基因后, 将其构建到原核高效表达载体 pET30a(+) 上并在大肠杆菌 BL21 菌株中进行高效诱导表达, 继而对纯化得到的海藻糖酶蛋白进行活性检测和酶学特性研究。实验结果表明, 植物源的海藻糖酶基因在异体大肠杆菌中能够高效表达, 纯化获得的海藻糖酶蛋白在试管条件下具有较高的海藻糖水解活性, 其活性最适温度为 45℃。通过 GC-MS 分离检测, 可以明显地看到酶反应过程中底物海藻糖和产物葡萄糖的含量随反应时间变化的消长关系, 这充分证明克隆基因在大肠杆菌中的表达产物具有海藻糖酶的功能。

关键词: 拟南芥, 海藻糖酶, 基因克隆, 功能表达

Cloning of Trehalase Gene from *Arabidopsis thaliana*, Over-expression in *E.coli* and Its Functional Activity Assay *in vitro*

GUO Bei^{1,2} HU Lei³ GAI Ying¹ WANG Xi-Zhi¹ CHEN Xue-Mei^{1*} JIANG Xiang-Ning¹

(1. College of Life Sciences and Biotechnology of Beijing Forestry, the Ornamental Plant and Tree Breeding and Biotechnology Laboratory of National Forestry Administrative, Beijing 100083)

(2. Department of Biotechnology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206)

(3. Sino-German Joint Research Institute, Key Lab of Food Science of Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330047)

Abstract: The molecular researches of trehalose biosynthesis and metabolization have been attended because of its important roles in the cyto-physiology process of animal and plant cell. By using RT-PCR (reverse transcription PCR) method, the cDNA sequence of trehalase has been cloned through the RNA extracted from *Arabidopsis* sprout in this experiment. 1674 bp cDNA identified by sequencing was constructed to pET30a (+) vector and transformed to BL21 of *E. coli*. The target protein has overexpressed and has been

purificated by using Ni-NTA Agarose, and then its activity assay and enzymatic characteristic were studied in vitro. The results indicated that this plant trehalase gene can overexpress in *E. coli* and the trehalase protein which purified through Ni-NTA Agarose has higher hydrolysis activity and its suitable reaction temperature is 45°C. The quantity change between glucose and trehalose occurred obviously in the enzymatic reaction as time through GC-MS analysis. This further confirmed that the trehalase gene come from *Arabidopsis* has expressed functionally in *E. coli*.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, Trehalase, Gene cloning, Functional expression

海藻糖(Trehalose, Tre)是由 2 个葡萄糖残基通过 α , α -1, 1 糖苷键连接而成的非还原性二糖, 对生物细胞抗脱水、抗冷冻和抗高渗透具有独特的保护作用, 是一种天然的非特异性细胞保护物质。海藻糖所特有的生物细胞活性保护特性使其在植物抗逆性机理及其遗传改良中具有潜在的应用价值, 因而受到普遍关注。

在对海藻糖的化学性质、生理功能、作用机理、代谢途径等进行了较为广泛深入的研究之后, 海藻糖生物合成与代谢分子生物学的研究也悄然兴起。海藻糖生物合成与代谢过程的若干关键酶(如海藻糖-6-磷酸合成酶 trehalose-6-phosphate synthase, TPS、海藻糖-6-磷酸磷酸酯酶 Trehalose-6-phosphate phosphatase, TPP 和海藻糖酶 Trehalase, TRE)基因已从大肠杆菌^[1,2]、酵母^[3]、担子菌灰树花^[4]、耐放射异常球菌^[5]等材料中相继被克隆并转入烟草^[1,2,6]、甘蔗^[3]、马铃薯^[6]、拟南芥^[2]等, 使转基因植物抗非生物胁迫的能力得到了不同程度的提高。Garg^[7]将大肠杆菌中的海藻糖合成酶基因 *otsA*、*otsB* 进行融合, Jang^[8]将大肠杆菌的 TPS 和 TPP 的基因融合, 分别成功地获得了转基因水稻。

在对微生物海藻糖生物合成代谢分子生物学研究的同时, 现已证明海藻糖生物合成代谢途径也广泛地存在于高等植物细胞中。截至目前, 已从模式植物拟南芥中克隆出与海藻糖合成有关的 TPS^[9-11]基因和 TPP^[12]基因。但是在上述的研究中, 人们主要关注的是与海藻糖生物合成有关的基因, 希望通过这些基因表达量的增加来提高转基因受体的海藻糖含量。在前人研究的基础上, 我们试图在增加合成的同时降低分解, 即抑制海藻糖酶(TRE)基因的表达, 减少海藻糖的降解代谢, 以此达到提高植物体内海藻糖含量的目的。为此, 本研究以拟南芥为材料直接克隆出海藻糖酶基因并在大肠杆菌中进行高效表达, 进而对其酶学特性进行了研究, 同时建

立起了快速简便灵敏准确分析单糖和双糖物质的气相色谱-质谱联用方法, 为海藻糖酶的后续研究奠定良好基础。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 植物材料: 海藻糖酶基因克隆自拟南芥(*Arabidopsis Columbia*)。

1.1.2 载体和菌株: 实验中所用的克隆载体 pMD18-T vector 购自大连宝生物工程有限公司, 原核高效表达载体 pET30a(+)为 QIAGEN 公司产品、大肠杆菌 JM109(克隆及转化菌体)、BL21(基因高效表达菌体)菌株为本实验室保存。

1.1.3 DNA 回收与蛋白纯化: DNA 回收使用北京生隆嘉生物科技有限公司的玻璃珠回收试剂盒; 目的蛋白质一步纯化使用 QIAGEN 公司的 Ni-NTA Agarose(30210)。

1.1.4 活性检测: 海藻糖水解酶活性检测用 UNICO UV-2102 分光光度计对海藻糖水解生成的产物葡萄糖进行比色分析。为了进一步直观证实海藻糖水解过程中底物与产物的消长关系继而用气相色谱-质谱联用仪(Thermo 公司的 Trace GC-DSQ)检测其酶促反应体系中海藻糖和海藻糖水解产物葡萄糖(Glucose, Glu)之间的消长关系。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与基因克隆: 根据 GenBank 中拟南芥海藻糖酶的同源序列(AC002343), 按需要加入适宜的内切酶(*EcoR* 和 *Xho*)位点, 设计出一对 PCR 引物:

上游引物 P₁: 5'-GCGATATCATGTTGGACTC-GGACAC-3';

下游引物 P₂: 5'-CGCTCGAGTACTAGGCTT-CAATGCT-3'。

用 CTAB 法提取拟南芥的 RNA, 反转录得到

cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增获得海藻糖酶 cDNA 序列。反应条件为: 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s, 58℃ 45 s, 72℃ 1.5 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。将 PCR 扩增产物(1674 bp)经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳、玻璃珠法回收后与 pMD18-T 克隆载体连接并对大肠杆菌 JM109 进行转化。

1.2.2 高效表达载体构建: 克隆得到的序列经过测序分析确定无误后, 选择正确的重组质粒进行 *EcoR*V 和 *Xho*I 双酶切后与同样酶切的高效表达载体 pET30a(+)连接, 转化大肠杆菌 BL21 菌株, 对阳性克隆进行酶切验证后确定正确的重组子。

1.2.3 目的基因的诱导表达: 挑取含有重组质粒的单菌落过夜培养后以 1:50 (*V/V*) 转入 100 mL LB+Km(50 mg/L)液体培养基中, 活化培养至 OD_{600} 值为 0.6 左右时再以 1:50 转入 1000 mL LB+Km(50 mg/L)液体培养基中继续培养, 当 OD_{600} 为 0.3 左右时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L, 37℃ 振荡培养 8 h。为了观测目标蛋白在高效表达菌株中随诱导时间延长的表达过程, 分别在不同诱导时间(10 min、30 min、1 h、2 h、3 h、4 h)取样 1 mL, 并将菌液离心后去上清, 加 100 μ L 2 \times 上样缓冲液重悬菌体, 沸水浴 5 min 裂解细胞, 离心后取上清做 SDS-PAGE 检测。剩余菌液离心收集菌体-20℃ 保存, 为大量提取和纯化高效表达蛋白质备用。

1.2.4 酶蛋白的提取与纯化: 将-20℃ 保存的菌体(由 120 mL 培养物获得)置于冰上融化, 用 2 mL 裂解缓冲液(50 mmol/L 磷酸二氢钠, 300 mmol/L 氯化钠, 10 mmol/L 咪唑)重悬菌体, 加入溶菌酶至浓度为 1 mg/mL, 冰上放置 30 min。将裂解液移至 5 mL 离心管冰浴超声波破碎细胞(超声波工作条件: 工作 3 s, 间歇 3 s, 重复超声 40 次, 功率 200 W~300 W)。超声破碎后 4℃ 低温 18000 r/min 离心 20 min~30 min, 收集上清液为高效表达蛋白质粗提液。在所得蛋白质粗提液中加入 50% Ni-NTA Agarose 5 mL, 冰浴状态 50 r/min~100 r/min 震荡进行镍离子交换螯合 60 min 后, 将混合液装入纯化柱中, 移开下盖收集流出液至两管中, 分别用 L_1 和 L_2 表示; 再用淋洗缓冲液(50 mmol/L 磷酸二氢钠, 300 mmol/L 氯化钠, 20 mmol/L 咪唑)淋洗若干次(每次 0.4 \times 柱体积, 约 1 mL), 分别收集在不同管中, 用 W_1 、 W_2 ……表示; 最后用 0.5 μ L (约 0.2 \times 柱体积) 洗脱缓冲液(50 mmol/L 磷酸二氢钠, 300 mmol/L 氯化钠, 250 mmol/L 咪唑)

洗脱 4~8 次, 分别收集在不同管中, 用 E_1 ~ E_8 表示。对收集的 3 种溶液进行 SDS-PAGE 电泳检测以确定目标重组蛋白质的最优纯化条件。

1.2.5 蛋白质含量的测定 (Bradford 测定法): 用牛血清白蛋白(BSA)溶液(1 mg/mL)制作标准曲线。20 μ L 蛋白样品+80 μ L NaCl 缓冲液(0.15 mol/L)+1000 μ L Bradford 工作液, 反应 2 min 后测定 OD_{595} 值, 通过标准曲线计算蛋白浓度。

1.2.6 酶活性的测定: 以 2 mmol/L 的葡萄糖标准液制作标准曲线。取磷酸缓冲液 (pH 5.8, 20 mmol/L) 450 μ L, 加入酶液 100 μ L 及适量的海藻糖溶液 (2 mmol/L), 混匀后 37℃ 进行酶反应 60 min。加入 3,5-二硝基水杨酸试剂 1000 μ L, 沸水浴加热 5 min, 冷却后测定 OD_{550} 值(参考钟国华方法^[13])。

1.2.7 糖的提取与衍生化: 葡萄糖与海藻糖衍生化方法主要参考胡磊等^[14]方法, 具体操作如下: 取海藻糖酶反应液 200 μ L, 加入 250 μ L 碳水化合物抽提液(甲醇:氯仿:水=12:5:3, *V/V/V*)和 250 μ L 双蒸水, 充分混匀后 5000 r/min 离心 5 min, 取上清 50 μ L 放入毛细管中进行真空浓缩, 待样品全部干燥后加入 10 μ L 盐酸羟胺(100 mg/mL), 80℃ 水浴 5 min, 冷却后加入 10 μ L 乙酸酐, 室温放置 10 min, 加入 30 μ L 氯仿, 充分混匀后再加入 60 μ L~80 μ L ddH₂O 萃取 3~4 次, 最后转移封装于盛有无水硫酸钠的毛细管中, 4℃ 保存。

1.2.8 气相色谱检测条件: 气相色谱-质谱检测方法参考胡磊等^[15]方法。色谱柱为 DB-1MS 柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m), 载气为 He(1.2 mL/min)。进样器温度为 300℃; 柱箱温度为程序升温, 起始为 120℃ 停留 3 min, 然后以 40℃/min 升温至 200℃, 不停留再直接以 2℃/min 速率升温至 220℃, 保留 1 min 后以 50℃/min 快速升至 300℃, 最后以 5℃/min 升至 320℃ 保留 5.5 min。

2 结果与分析

2.1 目的基因克隆与序列测定

经 RT-PCR(reverse transcription PCR)反应获得预期分子量的特异产物, 结果见图 1。将目标 DNA 片段回收后与 pMD18-T vector 连接并转化 JM109, 挑选迁移率改变的质粒(图 2)进行酶切验证, 将正确的转化子送上海申友公司进行序列测定。

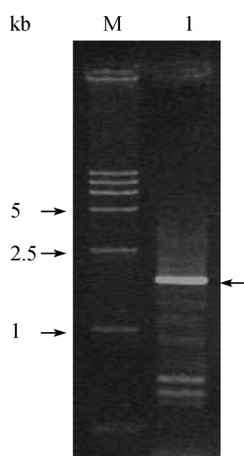


图 1 RT-PCR 产物

Fig.1 RT-PCR product of Tre

M: DNA Marker DL 15kb

1: Tre 的 PCR 产物 1: PCR product of Tre

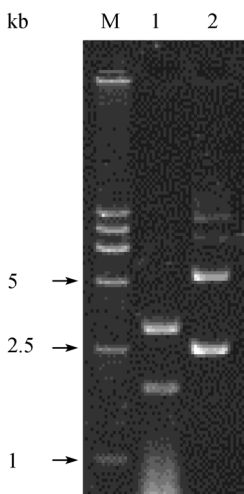


图 2 质粒电泳图

Fig.2 Electrophoresis of plasmid

M: DNA Marker DL 15kb

1: pUC18 质粒; 2: 重组质粒

1: pUC18 plasmid; 2: recombinant plasmid

测序结果表明, 该片段全长 1674 bp, 负责编码 558 个氨基酸。通过 DNAMAN 软件比对, 与 GenBank 上的拟南芥海藻糖酶序列(AC002343)的碱基数目和氨基酸数目完全相同, 其中碱基序列存在 3 处差异, 一致率为 99.82%; 氨基酸序列存在 3 处差异, 一致率为 99.46%。由此可以推断克隆的基因为拟南芥的海藻糖酶基因。

2.2 pET30a(+)-Tre 高效表达载体构建及其诱导表达

对序列测定分析正确的重组子进行 *EcoRV* 和

Xho I 双酶切后, 与同样酶切的高效表达载体 pET30a(+)连接, 构建出 pET30a - Tre 并转化大肠杆菌 BL21 菌株, 挑取阳性克隆提取质粒 DNA, 通过限制性内切酶的酶切验证(图 3), 确定正确的重组子。

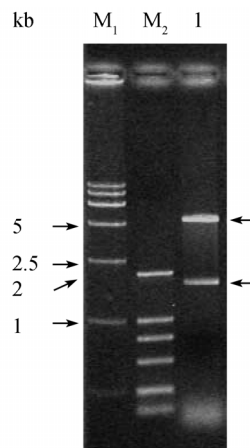


图 3 重组质粒的酶切

Fig.3 Enzyme digestion of recombinant plasmid

M₁: DNA Marker DL 15kb M₂: DNA Marker DL 2kb

1: pET30a-Tre 重组质粒

1: pET30a-Tre recombinant plasmid

将带有目的基因的菌种接种活化后, 加入 IPTG 进行诱导表达, 按 CK(未诱导)、诱导 10 min、30 min、1 h、2 h、3 h 和 4 h 6 个时间段各取样 1 mL, 离心沉淀菌体后进行全细胞裂解, 得到裂解上清液进行 SDS-PAGE 电泳, 结果见图 4。

图中 M 为标准蛋白质, CK 为未诱导的对照, 1、2、3、4、5、6 分别代表 IPTG 诱导表达 10 min、30 min、1 h、2 h、3 h、4 h。

从电泳图谱可以看出: 未诱导时没有出现目的蛋白; 通过 IPTG 诱导目的蛋白出现, 并且随着诱导时间的延长, 蛋白合成量不断增加。检测结果表明, 克隆自拟南芥的海藻糖酶基因已经在大肠杆菌细胞中得到高效表达。

2.3 蛋白质纯化与酶活力测定

依照方法 1.2.4 对目标蛋白进行纯化, 对收集液 L₁、L₂、W₁、W₃、W₄、E₄、E₅、E₆、E₇ 进行 SDS-PAGE 电泳检测。经检测, 过柱后的裂解缓冲液中存在有大量非目标蛋白, 而目标蛋白没有出现, 说明目标蛋白质已被 Ni-NTA Agarose 镍离子螯合吸附, 随着淋洗缓冲液洗涤次数的增加, 非目标蛋白逐渐减少; 当用洗脱缓冲液进行洗脱时, 目标蛋白开始出现,

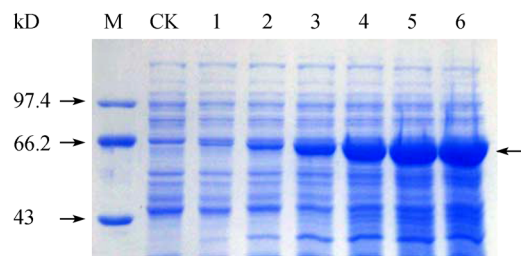


图 4 海藻糖酶表达电泳图谱
Fig. 4 Electrophoretic map of trehalase expression

并且在 E₆ 达到最大量。以上结果表明，用 Ni-NTA Agarose 金属离子螯合对海藻糖酶进行纯化能得到较好的纯化效果(图 5)。

根据电泳检测结果，对目标蛋白含量较高的 E₄、E₅、E₆、E₇ 进一步测定蛋白质含量与酶活性，继而可以计算出海藻糖酶的酶活力[单位：μg 葡萄糖/mg 蛋白(min)，即每分钟每毫克酶蛋白产生葡萄糖的 μg 数](见表 1)。

从表 1 测定结果可以看出：在 E₄ 中虽然蛋白含量较高，但海藻糖酶的活性却很低；相反，E₆ 中虽然

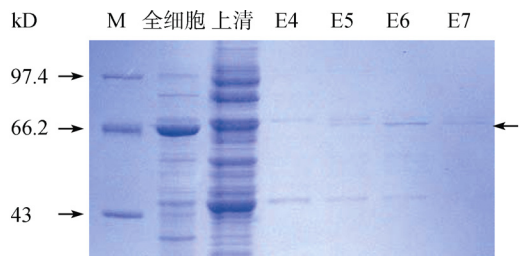


图 5 海藻糖酶纯化后电泳图谱
Fig. 5 Electrophoretic map of trehalase purified

蛋白含量较低，但海藻糖酶的活性却比较高。这一现象说明，在洗脱的过程中仍有部分杂蛋白存在，但随着洗脱次数的增加，杂蛋白将逐渐减少，目标蛋白所占的比例显著提高，酶活性增加。表 1 中的酶活力计算结果也证明了这一点。

2.4 酶反应的最佳底物量

根据反应需要将适量的磷酸缓冲液及海藻糖酶液充分混匀后分装到不同试管中，每管 550 μL，在每管中分别加入不同量的海藻糖(见表 2)后定容至 1600 μL，反应 1 h 后 80℃ 终止反应，加入 1000μL

表 1 不同洗脱液中的酶活力				
Table 1 Enzyme activity in various elution buffer				
	洗脱缓冲液 Elution buffer			
	E ₄	E ₅	E ₆	E ₇
OD ₅₉₅	0.068	0.053	0.036	0.007
蛋白含量 protein content(mg)	0.00475	0.00371	0.00252	0.00049
OD ₅₅₀	0.002	0.67	1.482	0.265
生成葡萄糖 producing glucose(μmol)	0.02	0.756	1.672	0.289
酶活力 enzyme activity	0.007	3.396	11.058	9.829

表 2 不同海藻糖用量的酶反应结果						
Table 2 Result of trehalase reaction with various amount trehalose						
缓冲液 Buffer (μL)	酶液 Enzyme (μL)	海藻糖 Trehalose (μL)	水 H ₂ O (μL)	水杨酸 Salicylic acid (μL)	总体积 Total volume (μL)	OD ₅₅₀
450	100	0	1050	1000	2600	0.027
450	100	10	950	1000	2600	0.001
450	100	200	850	1000	2600	0.068
450	100	300	750	1000	2600	0.166
450	100	400	650	1000	2600	0.198
450	100	500	550	1000	2600	0.261
450	100	600	450	1000	2600	0.391
450	100	700	350	1000	2600	0.508
450	100	800	250	1000	2600	0.467
450	100	900	150	1000	2600	0.415
450	100	1000	50	1000	2600	0.438

注：酶反应条件为 pH5.8, 37℃，酶液浓度为 0.6 μg/μL，海藻糖溶液浓度为 2 mmol/L。
Note : condition of trehalase reaction pH5.8, 37℃, trehalase concentration 0.6 μg /μL, trehalose concentration 2 mmol/L

水杨酸试剂, 沸水浴 5 min, 显色后立即测定 OD_{550} 值。

通过测定各种糖量反应液的 OD_{550} 值可以看出: 当海藻糖量为 700 μL 时 OD_{550} 值最大, 生成的葡萄糖最多, 因此可以判断, 100 μL (约 0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 酶液的最佳底物用量为 700 μL 海藻糖。

2.5 温度对酶活性的影响

取 2.7 mL 磷酸缓冲液和 4.2 mL 海藻糖混合后分装在不同试管中, 每管 1150 μL , 然后将试管分别置于 5 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 、100 $^{\circ}\text{C}$ 环境中, 待管内反应液温度与环境温度平衡后, 分别加入 100 μL 酶液, 1h 后终止反应, 加入水杨酸试剂沸水浴 5 min, 降温后测定 OD_{550} 值, 结果见图 6。

由图 6 可以明显看出: 海藻糖酶反应液在 45 $^{\circ}\text{C}$ 时活性最高, 由此可推断出海藻糖酶的最适反应温度为 45 $^{\circ}\text{C}$, 当反应温度达到 60 $^{\circ}\text{C}$ 以上时, 海藻糖酶活性丧失。

2.6 海藻糖和葡萄糖含量变化质谱检测

将适量磷酸缓冲液、海藻糖、海藻糖酶、水混

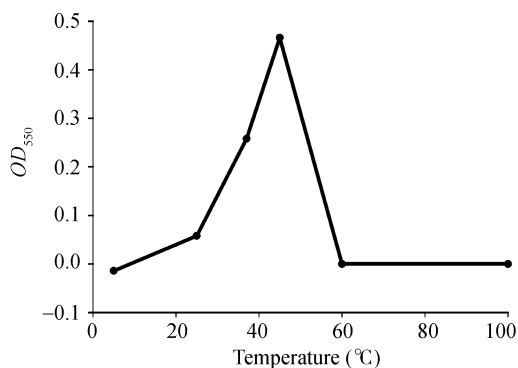


图 6 不同反应温度下的酶活性

Fig.6 Trehalase activity under different temperature

合后进行酶反应, 分别在反应 1 min、2 min、4 min、8 min、20 min、40 min 和 80 min 时取出 1 mL 反应液, 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 min 终止反应。利用 1.2.7 的方法进行糖的提取和衍生化。

将衍生化产物稀释 20 倍之后进行气相色谱检测, 图 7 自上至下依次显示的 5 个图谱分别代表反应时间为 2 min、8 min、20 min、40 min 和 80 min 时产物中海藻糖和葡萄糖的含量变化。

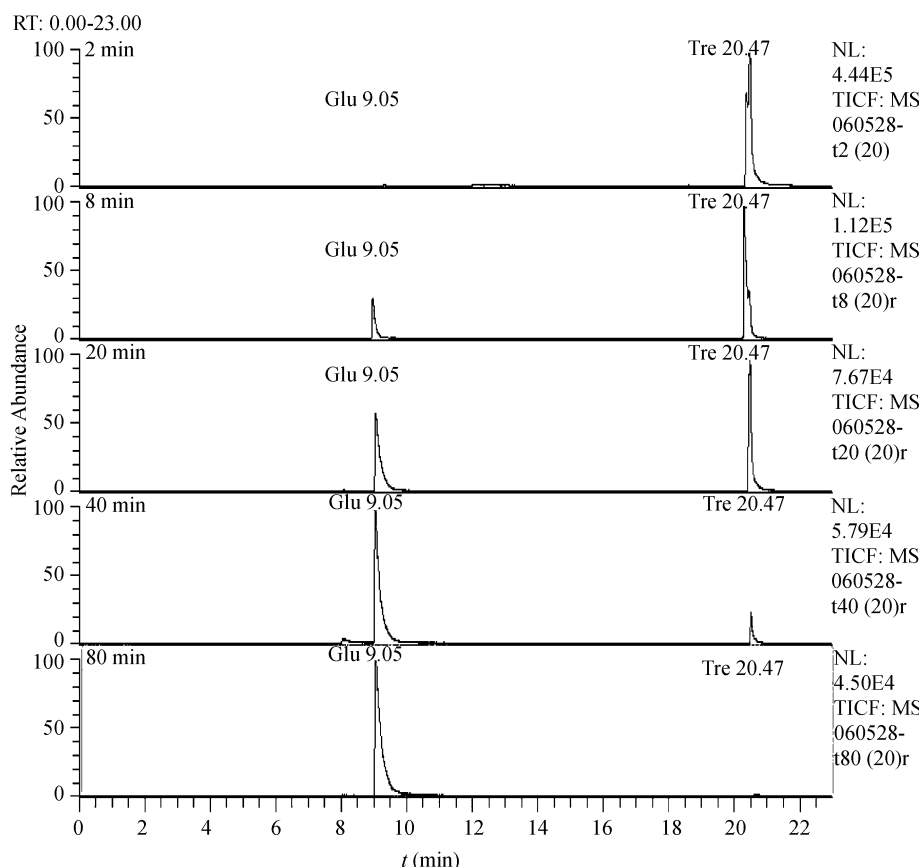


图 7 海藻糖和葡萄糖含量随时间变化的色谱图

Fig.7 Chromatogram of change between trehalose and glucose as time

从色谱检测结果可以明显的看出:在海藻糖酶的作用下海藻糖被分解为葡萄糖。随着酶反应时间的延长,海藻糖的含量不断消减直至消失;相反,葡萄糖从无到有含量逐渐增加,呈现出强烈的消长变化趋势。

通过海藻糖和葡萄糖的标准曲线,将质谱图上各反应时间葡萄糖、海藻糖的峰面积转换为浓度($\text{ng}/\mu\text{L}$),由此得到二者之间的消长关系曲线(图 8)。

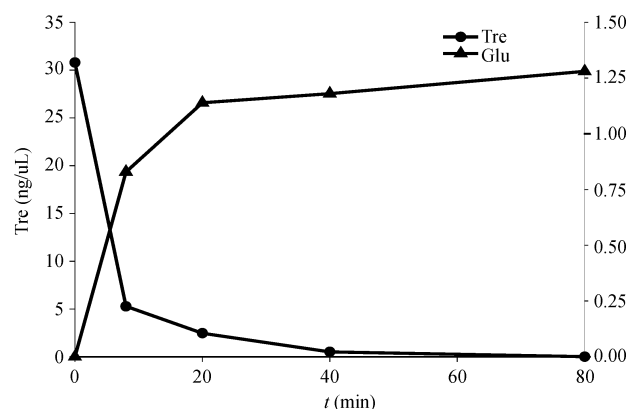


图 8 葡萄糖和海藻糖含量消长曲线

Fig.8 Curve of quantity change between trehalose and glucose

3 讨论

通过上述实验我们可以看出,从拟南芥中克隆的植物海藻糖酶基因能够在体外很好地完成表达,并且在离体条件下表现出较高的酶活性;通过常规的酶学研究,发现海藻糖酶的最适反应温度为 45°C ,当酶用量为 $100\ \mu\text{L}$ (约 $0.6\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$) 时,最适底物量为 $700\ \mu\text{L}$ 海藻糖($2\ \text{mmol/L}$);利用气相色谱检测,清晰地看到在海藻糖酶反应的各个时间段内,底物海藻糖与产物葡萄糖的含量发生了极其明显的消长变化。这一过程说明,从拟南芥幼苗中克隆得到的海藻糖酶基因能够在异源的原核生物大肠杆菌中完整表达,并且经过一步法纯化后依然具有很好的活性。由此证明克隆的海藻糖酶基因在体外不仅能够正常表达,而且可以执行其正常的生理功能。

在以往的研究中,人们通常是将克隆得到的目的基因直接转化到受体中,很少在转入受体之前检测克隆基因是否能够执行其正常的生理功能,这样当目的基因不能在受体中完成功能表达时,就无法准确判断出是克隆基因本身存在问题,还是该基因在受体环境中遗传信息传递受阻。本实验对克隆的

拟南芥海藻糖酶基因不仅检测了其表达情况,而且证实它能够执行正常的生理功能。这一研究结果无疑为该基因的转化及其表达调控等后续研究提供了充分的前提保障,同时也为植物海藻糖酶的进一步开发与利用奠定了良好的基础。

参 考 文 献

- [1] 戴秀玉,王忆琴,杨波,等. 大肠杆菌海藻糖合成酶基因对提高烟草抗逆性能的研究. 微生物学报, 2001, 41(4): 427-431.
- [2] Schluepmann H, Pellny T, van Dijken A, et al. Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. PNAS, 2003, 100(27): 6849-6854.
- [3] 赵恢武,陈杨坚,胡鸾雷,等. 干旱诱导性启动子驱动的海藻糖-6-磷酸合酶基因载体的构建及转基因烟草的耐旱性. 植物学报, 2000, 42(6): 616-619.
- [4] 王自章,张树珍,杨本鹏,等. 甘蔗根癌农杆菌介导转化海藻糖合酶基因获得抗渗透胁迫能力增强植株. 中国农业科学, 2003, 36(2): 140-146.
- [5] 韦宇拓,朱绮霞,罗兆飞,等. 耐放射异常球菌海藻糖合成酶基因的克隆及功能鉴定. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31(11): 1018-1023.
- [6] Goddijn OJM, Verwoerd TC, Voogd E, et al. Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. Plant Physiology, 1997, 113: 181-190.
- [7] Garg AK, Kim JK, Owens TG, et al. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. PNAS, 2002, 99(25): 15898-15903.
- [8] Jang IC, Oh SJ, Seo JS, et al. Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. Plant Physiology, 2003, 131(2): 516-524.
- [9] Blázquez MA, Santos E, Flores CL, et al. Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis TPS1* gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. The Plant Journal, 1998, 13(5): 685-689.
- [10] Vogel G, Fiehn O, Jean-Richard-dit-Bressel L, et al. Trehalose metabolism in *Arabidopsis*: occurrence of trehalase and molecular cloning and characterization of trehalose-6-phosphate synthase homologues. Journal of Experimental Botany, 2001, 52(362): 1817-1826.
- [11] Eastmond PJ, van Dijken AJ, Spielman M, et al. Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step

- in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis embryo* maturation. *The Plant Journal*, 2002, **29**(2): 225–235.
- [12] Vogel G, Aeschbacher RA, Müller J, *et al.* Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast tps2 mutant. *The Plant Journal*, 1998, **13**(5): 673–683.
- [13] 钟国华, 胡美英, 林进添, 等. 闹羊花素 III 对菜青虫海藻糖含量及海藻糖酶活性的影响. 华中农业大学学报, 2000, **19**(2): 119–123.
- [14] 胡 磊, 郭 蓓, 蒋湘宁. 分析植物组织中糖与糖醇乙酰化及毛细管气相色谱分析. 植物学通报, 2004, **21**(6): 689–699.
- [15] 胡 磊, 郭 蓓, 蒋湘宁. 分析植物组织中海藻糖的气质联用及毛细管气相色谱法. 植物生理学通讯, 2004, **40**(4): 474–478.
- [13] 钟国华, 胡美英, 林进添, 等. 闹羊花素 III 对菜青虫

主编点评

硫酸盐还原菌与油田金属管道腐蚀

赫荣乔

(《微生物学通报》编委会 北京 100101)

硫酸盐还原菌 (sulfate-reducing bacteria, SRB) 是一类利用硫酸盐和其他氧化态硫化物, 或利用元素硫作为电子受体, 并将其还原成 S^{2-} 的原核生物。在长时间开采原油过程中, 地层需要通过金属管道注水来维持油气输出压力, 而输水管壁上很容易形成生物膜垢。该生物膜垢的形成是微生物腐蚀发生的必要条件, 也是微生物对金属腐蚀问题难以解决的主要原因。

陈悟、余龙江等^[1]根据金属管道腐蚀微生物的分类学特征和腐蚀特点, 从油田回注水系统金属管道管壁生物膜垢中分离得到了一株脱硫肠状菌, 为兼性厌氧, 产孢子, 能够利用的硫氧化酸盐较多, 其生长温度和 pH 范围相对较宽。通过 16S rDNA 基因序列分析, 该菌株属于脱硫肠状菌属中的 *Desulfotomaculum aeronauticum*。脱硫肠状菌的分离, 生长代谢特性的研究和相关防治方法的探索, 对于进一步了解油田金属管道微生物腐蚀及其综合防治都具有重要的参考价值。

关键词: 硫酸盐还原菌, 脱硫肠状菌属, 金属管道腐蚀, 生物膜垢

参 考 文 献

- [1] 陈 悟, 汪文俊, 向 福, 等. 腐蚀生物膜垢中硫酸盐还原菌的系统进化分析. 微生物学通报, 2008, **35**(2): 161–165.

One of Sulfate-reducing Bacteria in the Corrosion Biofilm on Metal Pipeline

HE Rong-Qiao

(The Editorial Board of Microbiology, Beijing 100101)

Keywords: Sulfate-reducing bacteria, *Desulfotomaculum*, Metal pipeline corrosion, Biofilm dirtiness