

# 钩端螺旋体聚 Beta 羟基丁酸(PHB) 生物合成途径分析

薛峰<sup>1,2\*</sup> 刘媛<sup>1</sup> 洪彩玲<sup>1</sup> 孙岚<sup>1,2</sup> 辛德莉<sup>1,2</sup> 温艳<sup>1,2</sup> 黄敏君<sup>1,2</sup> 谷俊朝<sup>1,2</sup>

(1. 首都医科大学附属北京友谊医院 北京热带医学研究所 北京 100050)

(2. 热带病防治研究北京市重点实验室 北京 100050)

**摘要:** 【目的】致病型问号钩端螺旋体(问号钩体, *Leptospira interrogans*)和腐生型双曲钩体(*L. biflexa*)能够大量合成菌体内贮藏物,这可能是钩体在营养贫瘠环境中长时间存活的主要原因之一。本研究对钩体聚 Beta 羟基丁酸(PHB)贮藏物进行定性定量测定,通过基因组分析补充定义 PHB 合成主要功能基因,并采用分子生物学方法初步证明 PHB 合成途径的完整性,为进一步研究 PHB 合成与钩体抗逆能力的关系奠定基础。【方法】采用脂类特异性尼罗红染色法和浓硫酸氧化-紫外分光光度计测定法,对问号钩体和双曲钩体的 PHB 贮藏物进行定性定量测定;采用生物信息学方法(BLAST 和 InterProscan/InterPro2Go),通过同源性分析和功能结构域搜索寻找钩体基因组中的 PHB 合成相关基因;最后采用克隆测序和定量 RT-PCR 技术检测相关基因表达情况,初步验证生物信息学预测结果。【结果】尼罗红染色和氧化后比色定量实验证明钩体合成细菌常见贮藏物 PHB,问号钩体合成量为菌体干重的 42%–45%,双曲钩体合成量为 64%–68%。尽管已公布的多个钩体基因组中均没有定义完整的 PHB 合成途径,但本研究通过综合生物信息学分析,在问号钩体和双曲钩体中鉴定了 PHB 合成途径的主要功能基因(*phbC*)。克隆测序和定量 RT-PCR 证实钩体转录表达大部分 PHB 合成相关基因(*phbA/B/C*),说明钩体内该生物途径基本完整,且部分高水平表达基因可能是钩体主要的 PHB 合成相关基因。【结论】问号钩体和双曲钩体均可合成 PHB 贮藏物,且具有基本完整的 PHB 合成生物途径。

**关键词:** 钩端螺旋体, 聚 Beta 羟基丁酸(PHB), 生物途径分析, 抗逆能力

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(No. 81301404, 81071375); 首都医科大学附属北京友谊医院科研启动基金项目(No. 2011\_30yykyqd); 首都医科大学基础-临床科研合作基金项目(No. 13JL16); 热带病防治研究北京市重点实验室开放基金项目(No. 100017031017); 北京市自然科学基金项目(No. 7132042)

\*通讯作者: Tel: 86-10-63138560; ✉: fong.hsueh@gmail.com

收稿日期: 2012-12-13; 接受日期: 2013-01-23

## Pathway analysis of the leptospiral polyhydroxybutyrate (PHB) synthesis

XUE Feng<sup>1,2\*</sup> LIU Yuan<sup>1</sup> HONG Cai-Ling<sup>1</sup> SUN Lan<sup>1,2</sup> XIN De-Li<sup>1,2</sup>  
WEN Yan<sup>1,2</sup> HUANG Min-Jun<sup>1,2</sup> GU Jun-Chao<sup>1,2</sup>

(1. Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing Tropical Medicine Research Institute, Beijing 100050, China)

(2. Beijing Key Laboratory for Research on Prevention and Treatment of Tropical Diseases, Beijing 100050, China)

**Abstract:** [Objective] *Leptospira* spp., including the pathogenic *Leptospira interrogans* and the saprophytic *L. biflexa*, can synthesise abundant bacterial storage in cell bodies, which may be one of the primary reasons why *Leptospira* spp. can survive in barren environments for a long time. In this study, the leptospiral polyhydroxybutyrate (PHB) storage was examined qualitatively and quantitatively. The major functional genes for PHB synthesis were complementarily annotated by the genome analysis. The integrity of the PHB synthesis pathway was verified by the molecular biology methods. This study laid foundation for further research on the relationship between the leptospiral storage synthesis and the stress tolerance. [Methods] The leptospiral PHB storage was determined qualitatively and quantitatively by the lipid-specific Nile Red dyeing and the concentrated sulfuric acid oxidation-ultraviolet spectrophotometer method. The storage synthesis genes were identified by the bioinformatics methods (BLAST and InterProscan/InterPro2Go) through the homolog analysis and the functional domain search. The expression of the predicted PHB synthesis genes were verified by gene cloning, sequencing and quantitative RT-PCR. [Results] By the Nile Red dyeing and the oxidation-colorimetric assay method, *Leptospira* spp. was proved to synthesise PHB, a common bacterial storage. The synthetic amounts of *L. interrogans* and *L. biflexa* were 42%–45% and 64%–68% of their dry weights, respectively. Though no integrated PHB synthesis pathways were defined in the leptospiral genomes, the homologs of the major functional genes for PHB synthesis (*phbC*) were identified in the genomes of *L. interrogans* and *L. biflexa* by the comprehensively bioinformatics analysis in this study. By cloning, sequencing and qRT-PCR, most of the PHB synthesis genes (*phbA/B/C*) were proved to be transcribed in *Leptospira* spp., which suggested that the leptospiral PHB synthesis pathways were primarily integrated, and some highly-expressed genes may be the main functional genes involved in the leptospiral PHB synthesis. [Conclusion] *L. interrogans* and *L. biflexa* all can synthesise PHB storage and have primarily integrated PHB synthesis pathways.

**Keywords:** *Leptospira* spp., Polyhydroxybutyrate (PHB), Pathway analysis, Stress tolerance

钩端螺旋体(钩体, *Leptospira* spp.)属于钩端螺旋体科(Leptospiraceae), 包括致病型、中间型和腐生型三大类<sup>[1-2]</sup>。致病型钩体(Pathogenic *Leptospira*)所导致的钩端螺旋体病(钩体病, Leptospirosis)是世界范围内广泛分布的人兽共患热带病<sup>[3-4]</sup>, 也是我国法定乙类传染病<sup>[5]</sup>。问号钩端螺旋体(问号钩体, *L. interrogans*)是其主要致病菌种, 属于强致病型钩体。问号钩体通过慢性感染的储存性宿主(主要为啮齿类动物和家畜等)的尿液排泄到自然环境中, 可在水体和湿润土壤中长时间存活, 经粘膜或者伤口感染宿主后, 迅速进入血流并扩散到肺、肝、肾和其他组织器官<sup>[6]</sup>。该急性感染能导致严重的器官损伤, 其中严重肺出血的致死率高达 15%。腐生型钩体在自然水体和湿润土壤中广泛存在并长期繁殖存活, 不感染动物和人类, 其代表菌种是双曲钩端螺旋体(双曲钩体, *L. biflexa*)<sup>[7]</sup>。

钩体对大多数常见化学试剂敏感, 因此一般在无化学污染的自然环境中存活。双曲钩体可以在营养贫瘠的清洁水体中长期繁殖存活。问号钩体也能适应不同的宿主和体外环境, 且在贫瘠环境中长时间存活。研究表明纯水中的问号钩体在 100 h 后仍有感染能力<sup>[8]</sup>。这说明双曲钩体和问号钩体都有较强的抗逆能力, 且问号钩体抗逆能力与其传播能力相关, 也可能与其感染宿主的毒力相关。近期研究表明钩体可以合成大量菌体内贮藏物, 且双曲钩体合成量大于问号钩体<sup>[9]</sup>。细菌贮藏物通常为糖原、多聚磷酸、脂肪及聚羟基脂肪酸酯(PHA, 亚类如聚 Beta 羟基丁酸 PHB 等)等几大类, 往往与细菌的物质能量代谢和抗逆能力等性状密切相关<sup>[10]</sup>。本研究通过尼罗红染色实验和浓硫酸氧化-紫外分光光度计测定法定性定量测定了钩体内 PHB 贮藏物成分, 并确定问号钩体内 PHB 合成量为菌体干重的 42%–45%, 双曲钩体内

PHB 合成量为 64%–68%。

PHA (包括 PHB)是在微生物受到某种基本营养成分(如 N, P, S, O 或 Mg 等)的浓度限制, 碳源相对过量时合成的胞内颗粒状聚酯类贮藏物。PHB 合成能力往往受 C/N 比调控, 且正常生长状态下不合成或很少合成<sup>[11]</sup>。合成 PHB 的微生物种类繁多, 但大部分菌种合成量不高, 只有产碱杆菌属 (*Alcaligenes*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、甲基营养菌属 (*Methylobacter*)、固氮菌属 (*Azotobacter*) 和红螺菌属 (*Rhodospirillum*)等菌属的部分菌种(或菌株)的 PHB 合成量较高。细菌 PHB 合成途径已经基本清楚, 即以 2 分子乙酰辅酶 A 作为底物, 依次在乙酰辅酶 A 转乙酰酶(又名 Beta-酮硫解酶或酮基硫酯酶, *phbA*)、以 NADH 为辅酶的乙酰乙酰辅酶 A 还原酶(*phbB*)、PHB 合酶(*phbC*)等 3 个酶的作用下合成 PHB 长链分子。采用同源克隆的方法, 目前已经从 *Zoolea ramigera*、*Pseudomonas oleovorans*、*Rhodococcus ruber*、*Alcaligenes eutrophus*、*Methylobacterium extorquens* 和 *Rhodobacter sphaeroides* 等菌种中克隆鉴定了这 3 个关键酶基因(*phbA/B/C*)。

近年来, 多个问号钩体和双曲钩体模式菌株完成了全基因组测序<sup>[7,12]</sup>。这两种钩体为基因组相似的近缘物种, 比较基因组学研究揭示了一系列生物学和医学相关的基因和生化途径<sup>[2,13]</sup>, 为钩体生物学和钩体病感染免疫研究奠定了基础。尽管有研究初步推断问号钩体含有 *phaA* 和 *phaB* 基因同源序列<sup>[14-15]</sup>, 但已公布的问号钩体和双曲钩体多个全基因组中均未完整定义 PHB 合成途径。本研究采用 NCBI-BLAST 和 InterProscan/InterPro2Go 等生物信息学分析方法, 通过同源性分析和蛋白功能结构域搜索, 补充定义了钩体的 PHB 合成主要功能基因(*phbC*)。并采用常规分子生物学方法证实钩体转录表达大部分预测的

PHB 合成相关基因。本研究结果为进一步深入研究钩体 PHB 合成能力与其抗逆能力,传播机制,以及感染能力的关系奠定了基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株和培养基

问号钩体赖型赖(56601)株和双曲钩体 Patoc 型 Patoc I (651505)株购自中国食品药品检定研究院中国医学细菌保藏管理中心,本实验室液体 EMJH 培养基传代保存。

### 1.2 主要试剂

TaKaRa 高保真 Ex *Taq* 酶, pUC19 载体, T4 DNA 连接酶, DNase I (RNase-free)酶, SYBR Premix Ex *Taq* 定量 PCR 试剂购自宝生物工程(大连)有限公司。其中 pUC19 载体改造为测序 T 载体 pFX-T19a 备用;细菌基因组提取试剂盒,快速质粒小提试剂盒,快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司;Trizol 试剂和 Superscript III 逆转录酶购自 Invitrogen 公司;吐温 80, BSA V 组分,尼罗红(Nile Red), PHB 标准品均购自 Sigma-Aldrich 公司;其他化学试剂为国产分析纯。

### 1.3 钩体培养

钩体采用 EMJH 标准培养基于 28 °C 条件下静置培养 100 h 至对数生长期,传代接种比例为 1:10,即 1 mL 对数生长期钩体接种至 10 mL EMJH 培养基。以下 PHB 检测及基因表达水平检测均设置 3 个生物学平行培养物。

### 1.4 钩体 PHB 合成量检测

尼罗红染色参照文献[16]的方法,略有修改。将尼罗红染色液溶于二甲基亚砜(DMSO)中,梯度稀释至 1 g/L。钩体加热固定后经尼罗红染液染色 30 min,采用 Olympus BX51 荧光显微镜观察照相,激发波长为 543 nm,散发波长为 598 nm。浓硫酸氧化-紫外分光光度计测定法参照文献

[17-18]的方法,冻干菌体或 PHB 标准品梯度样品在浓硫酸中加热,PHB 转化为巴豆酸,以紫外分光光度计在 235 nm 波长下检测,标准品绘制标准曲线,钩体 PHB 参照曲线换算定量。

### 1.5 生物信息学分析

根据参考文献[14]和 NCBI-GenBank 已公布的 PHB 合成相关基因(U47026、AF004933、AB009273、AF422800、U78047 等),采用 BLASTX 在 Leptospiraceae (Taxid:170)中搜索同源序列<sup>[19]</sup>,初步检索同源基因并识别功能结构域;同时从 SwissProt/TrEMBL 数据库中全面收集 PHB 合成相关基因(*phbA/B/C*)的功能结构域信息,采用 BLASTP 和基于 HMM 的 hmmpfam 程序搜索钩体基因组。初步鉴定的同源基因采用 InterProscan 程序搜索蛋白功能结构域,最后采用 InterPro2Go 程序定义基因本体(GO)信息<sup>[20]</sup>。氨基酸序列比对采用 ClustalX 1.83 软件,参考序列为 NCBI-BLASTP 搜索得到的 12 个最相似基因序列。

### 1.6 分子生物学操作

根据预测的 PHB 合成相关基因设计全长克隆引物(略),分别以钩体基因组 gDNA 和 cDNA 为模板,采用 TaKaRa Ex *Taq* 酶高保真 PCR 扩增,连接入 pFX-T19a 测序 T 载体,由上海生工生物工程公司测序;根据预测基因设计定量 PCR 引物(略),以钩体 cDNA 为模板,以钩体持家基因(16S rRNA 组装蛋白基因 *rimM*)为内参,采用 SYBR 染色法在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪上进行相对定量。引物设计采用 DNASTar 软件,核酸序列比对采用 ClustalX 1.83 软件,定量数据分析采用 Microsoft Excel 软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 钩体 PHB 定性和定量测定

问号钩体和双曲钩体分别经尼罗红染色后,采用荧光显微镜 400 倍观察,菌体发散红黄色荧

光, 初步确定钩体合成脂类贮藏物(图 1)。采用 PHB 特异性的浓硫酸氧化-紫外分光光度计测定法测定可知, 问号钩体内 PHB 合成量为菌体干重的 42%–45%, 双曲钩体内 PHB 合成量为 64%–68%。

2.2 钩体 PHB 合成途径分析

本研究采用 BLAST 同源性比较和 InterProscan/InterPro2Go 蛋白功能结构域搜索等

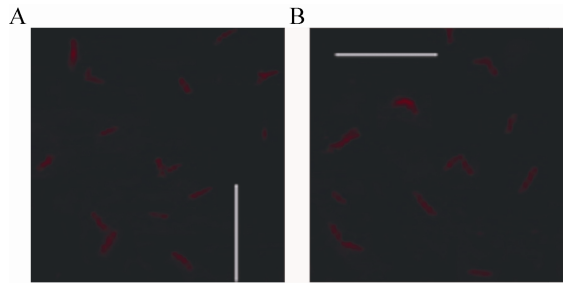


图 1 问号钩体(A)和双曲钩体(B)尼罗红荧光染色定性检测结果(400×)

Fig. 1 The Nile Red dyeing of *L. interrogans* (A) and *L. biflexa* (B) cells (400×)  
注: 图中白线为 25 μm 比例尺。  
Note: The white bars in the figures were 25 μm.

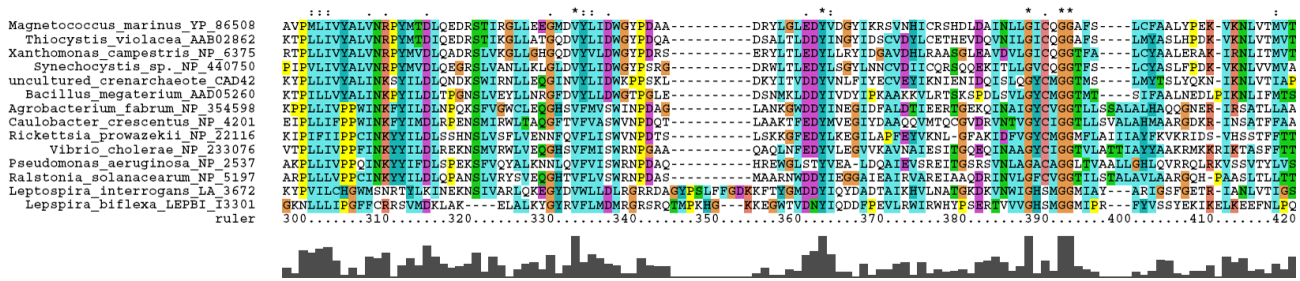
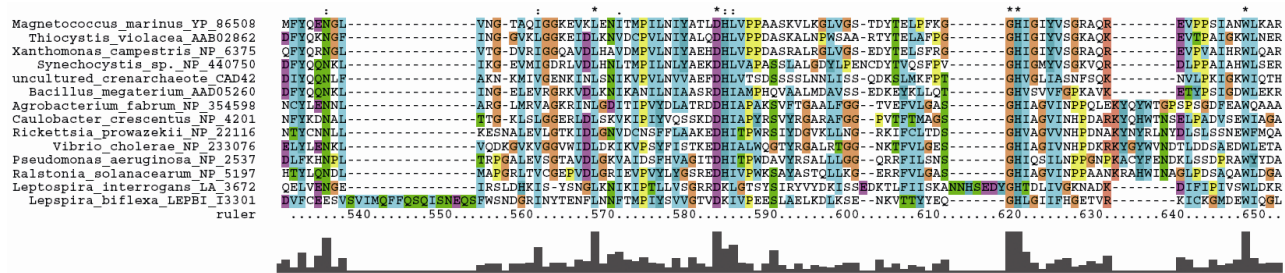
两类生物信息学方法, 在已公布的问号钩体赖型(56601)株和双曲钩体 Patoc 型 Patoc I 株(Paris)(即 651505 株, 自法国巴斯德研究所引进菌株)基因组中均检索到 PHB 合成限速酶基因 *phbC* 的同源序列。2 种钩体的 *phbC* 都仅有 1 个拷贝, 含有 PhaC (中段), PHA\_synth\_I (中段)和 PHA\_synth\_III\_C (后段)等功能结构域<sup>[21]</sup>(表 1, 图 2 和图 3)。预测基因的序列比对结果显示, 通过 NCBI-BLASTp 搜索得到的 *phaC* (*phbC*)基因的 14 个近缘氨基酸序列(包括 2 个钩体 *phbC* 序列)相互之间差异较大, 中段和后段含有的功能结构域序列相似度也较低(图 2 和图 3)。

2.3 钩体 PHB 合成相关基因的验证

分别以问号钩体和双曲钩体 gDNA 和 cDNA 为模板, 采用全基因克隆测序引物扩增得到基因全长并测序, 进一步以 cDNA 为模板采用定量 PCR 技术对 PHB 合成相关基因的转录表达水平进行相对定量。结果表明问号钩体 PHB 合成相关

表 1 问号钩体和双曲钩体的 PHB 合成相关基因			
Table 1 The PHB synthesis genes of <i>L. interrogans</i> and <i>L. biflexa</i>			
基因 Genes	问号钩体赖型赖(56601)株 <i>L. interrogans</i> serovar Lai strain Lai (56601)	双曲钩体 Patoc 型 Patoc I 株(Paris) <i>L. biflexa</i> serovar Patoc strain Patoc I (Paris)	主要功能结构域 Main functional domains
<i>phbA</i>	<i>paaJ</i> (LA_0457)	<i>thiL1</i> (LEPBI_I0355)	Thiolase_N
	<i>paaJ</i> (LA_3135)	<i>fadA1</i> (LEPBI_I3403)	Thiolase_C
	(LA_4139) (LA_2689)	<i>fadA2</i> (LEPBI_I0598) (LEPBI_I1790)	Ketoacyl-synt
<i>phbB</i>	(LB_082)	<i>fabG</i> (LEPBI_I2590)	KR
	<i>fabG</i> (LA_3484)	<i>fabG1</i> (LEPBI_I0209)	Epimerase
	<i>fabG</i> (LA_2324)	<i>fabG2</i> (LEPBI_I0126)	Eno-Rase_NADH_b
	<i>fabG</i> (LA_1427)	<i>fabG</i> (LEPBI_I1980)	
	<i>fabG</i> (LA_0020)	<i>fabG3b</i> (LEPBI_I0050)	
		<i>fabG4</i> (LEPBI_I0016) <i>fabG5</i> (LEPBI_I2647)	
<i>phbC*</i>	(LA_3672)	(LEPBI_I3301)	PhaC PHA_synth_I PHA_synth_III_C

注: 斜体基因名为问号钩体和双曲钩体基因组原注释信息, 括号内为基因编号. \*标记的 PHB 合酶基因 *phbC* 为本研究鉴定的钩体可能的 PHB 合成限速酶基因。  
Note: The italics were the original annotation in the published genomes of *L. interrogans* and *L. biflexa*, and the locus tags were listed in the brackets. The PHB synthase gene, *phbC*, labeled by asterisk in the table, was the possible rate-limiting enzyme gene for the PHB synthesis identified in this study.

图2 钩体 *phbC* 基因中段 PhaC 和 PHA\_synth\_I 功能结构域比对结果Fig. 2 The amino acid alignment of the PhaC and PHA\_synth\_I functional domains in the middle parts of the leptospiral *phbC* genes图3 钩体 *phbC* 基因后段 PHA\_synth\_III\_C 功能结构域比对结果Fig. 3 The amino acid alignment of the PHA\_synth\_III\_C functional domains in the back ends of the leptospiral *phbC* genes

基因均表达且序列与预测的开放阅读框(ORF)相符,但双曲钩体 *phbB* 基因中 LEPBI\_10209 (*fabG1*)和 LEPBI\_10126 (*fabG2*)在 EMJH 标准培养基上不表达,其余基因均表达且测序结果与基因组定义的 ORF 相同。这一结果说明 2 种钩体的 PHB 合成途径基本完整,且部分高水平表达基因可能是钩体主要的 PHB 合成相关基因(图 4 和图 5)。

问号钩体 *phbA* 基因中 LA\_3135 (*paaJ*)表达量最高, *phbB* 基因中 LB\_082 表达量最高。双曲钩体 *phbA* 基因中 LEPBI\_13403 (*fadA1*)和 LEPBI\_10598 (*fadA2*)均较高, *phbB* 基因中 LEPBI\_12590 (*fabG*)表达量最高。双曲钩体的 *phbB* 基因的拷贝较多,但 LEPBI\_10209 (*fabG1*)和 LEPBI\_10126 (*fabG2*)在标准 EMJH 培养基上不转录表达。因此,基因拷贝数差异和表达量差异均无法直接揭示双曲钩体 PHB 合成量高于问

号钩体的原因。

### 3 讨论

钩体病具有起病急、损伤重、易误诊、容易传播和造成疫情等特点,因此被列为我国法定乙类传染病,也是国家级计划免疫项目之一。该病以预防为主,以及及时准确诊断为重<sup>[22]</sup>。问号钩体的传播和感染与钩体的抗逆能力有直接或者间接的关系,研究钩体抗逆能力有助于了解钩体的传播机制,从而找到控制钩体通过自然环境传播的方法。本研究测定了钩体内 PHB 贮藏物,参照细菌 PHB 合成的一般途径(图 6),预测了钩体的 PHB 生物途径和合成相关基因,并通过常规分子生物学方法初步验证了预测结果,为今后采用分子细菌学方法,通过基因敲除和表型分析等方法,深入研究钩体抗逆能力与传播感染的关系奠定了基础。



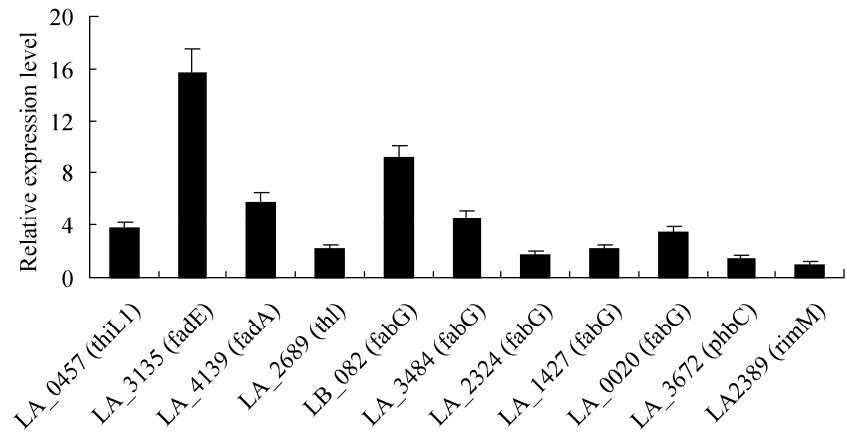


图 4 问号钩体 PHB 合成相关基因表达水平相对定量结果

Fig. 4 The relative expression levels of the PHB synthesis genes in *L. interrogans*

注: 问号钩体持家基因 *rimM* 平均值设定为 1, 纵坐标为问号钩体 PHB 合成相关基因表达量与该值的比值。  
Note: The expression level of the house-keeping gene *rimM* of *L. interrogans* was set as 1; The ratios (PHB synthesis gene/*rimM*) shown in the vertical coordinate indicated the relative expression levels of the PHB synthesis genes in *L. interrogans*.

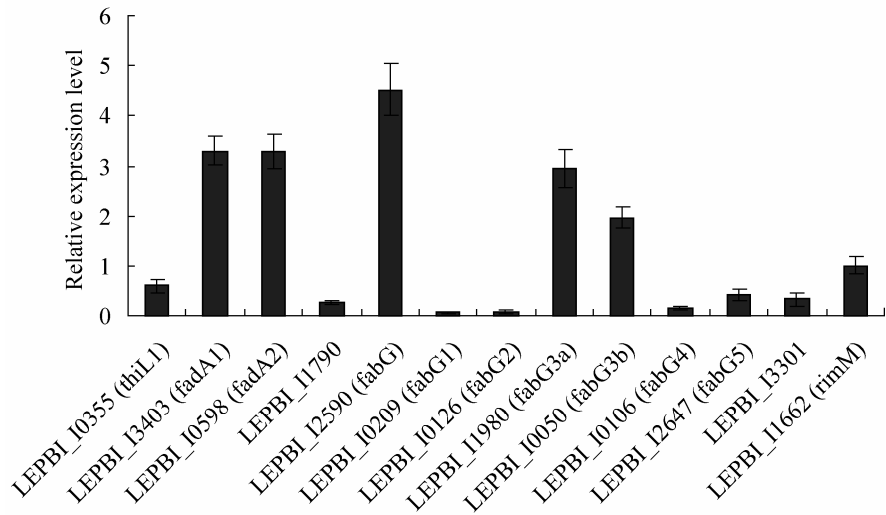


图 5 双曲钩体 PHB 合成相关基因表达水平相对定量结果

Fig. 5 The relative expression levels of the PHB synthesis genes in *L. biflexa*

注: 双曲钩体持家基因 *rimM* 平均值设定为 1, 纵坐标为双曲钩体 PHB 合成相关基因表达量与该值的比值。  
Note: The expression level of the house-keeping gene *rimM* of *L. biflexa* was set as 1; The ratios (PHB synthesis gene/*rimM*) shown in the vertical coordinate indicated the relative expression levels of the PHB synthesis genes in *L. biflexa*.

另外, 细菌 PHB 成分是重要的生物可降解塑料原料之一。PHB 除了具有化学合成塑料(聚乙烯、聚丙烯)相似的理化性质(拉丝、压膜、注塑等)外, 还具有生物可降解性, 生物相容性, 高结

晶性、压电性、光学活性等优良特性, 最重要的是它取代了不可再生的化石资源, 可以节约能源, 保护环境<sup>[23]</sup>。目前通过细菌生产 PHB 技术已经形成完整产业链, 主要方法有产碱杆菌发酵<sup>[24]</sup>,

*phbCAB* 操纵子转基因大肠杆菌发酵<sup>[25]</sup>, 活性污泥诱导生产<sup>[26]</sup>等。本研究所用 EMJH 准合成标准培养基为目前国际通用的钩体最佳培养条件, 在此条件下钩体 PHB 合成能力低于产碱杆菌。但该合成量不一定为最大合成量, 钩体在其他生境中的 PHB 合成能力尚待测定。另外, 有必要进一步研究钩体 PHB 合成相关酶类的酶活和稳定性等特点, 从而为转基因生产 PHB 筛选新的高效合成酶类。

钩体 PHB 合成具有 4 个特点: (1) 目前已报

道的细菌在正常生长状态下往往仅产生少量 (1%–3%) PHB 成分, 只有在生长受限制时才大量合成 PHB。而钩体却是在正常生长状态下大量合成 PHB。(2) 钩体不能利用糖类, 仅代谢脂类, 且利用小分子量脂类的能力较差, 在 EMJH 培养基上只能利用大分子量脂类(吐温 80)作为唯一的碳源和能源<sup>[27]</sup>。因此, 与其他产 PHB 细菌消耗糖类、甲醇和挥发性小分子脂肪酸等合成 PHB 的原理不同, 钩体可以代谢大分子量脂类合成 PHB。

(3) 与 PHB 合成研究模式生物的合成相关基因

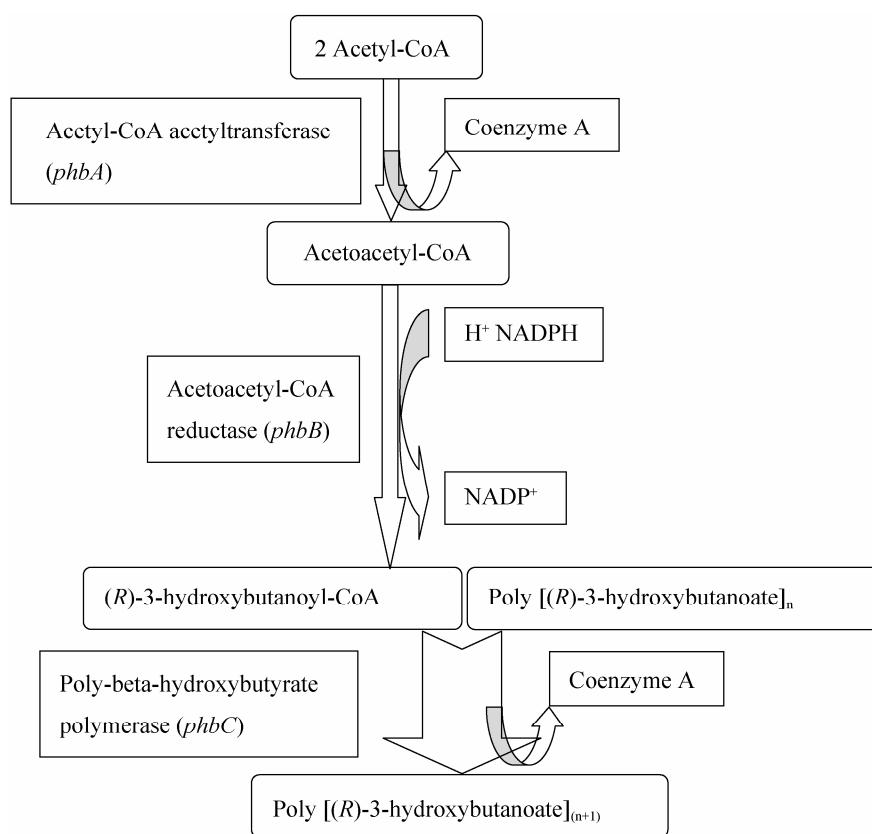


图 6 细菌 PHB 生物合成的一般途径(根据 KEGG 生物途径数据库修订)

Fig. 6 The common synthesis pathway of bacterial PHB (Redrawn according to the original KEGG pathway database)

注: 2 分子乙酰辅酶 A (2C) 合成 1 分子乙酰乙酰辅酶 A (4C), 再经还原反应成为 1 分子 (R)-3-羟基丁酰辅酶 A (4C), 再经聚合反应形成聚[(R)-3-羟基丁酸]大分子; PHB 合成研究模式生物中, 这 3 个 PHB 合成必需基因(*phbA/B/C*)往往形成操纵子。

Note: Two moleculars of acetyl-CoA (2C) synthetise 1 molecular of acetyl-acetyl-CoA (4C), the latter is then reduced to be 1 molecular of (R)-3-hydroxyl-butyl CoA; Lots of (R)-3-hydroxyl-butyl CoA moleculars can be polymerized into a long-chain Poly-hydroxybutyrate (PHB) molecular; These 3 essential genes (*phbA/B/C*) for the PHB synthesis always form 1 operon in the type research models of PHB synthesis.



形成操纵子不同(图 6), 钩体的 PHB 合成相关基因不形成操纵子, 2 种钩体相关基因拷贝数量及染色体分布也有所不同: *phbA* 同源基因各有 4 个拷贝; 问号钩体 *phbB* 同源基因仅有 5 个拷贝, 而双曲钩体有 7 个拷贝; 2 种钩体 PHB 合成限速酶基因 *phbC* 都仅有 1 个拷贝(表 1)。这初步说明钩体 PHB 合成相关基因可能来自基因水平转移(HGT)<sup>[14]</sup>。(4) 钩体 *phbC* 基因后段含有 PHA\_synth\_III\_C 功能结构域, 但序列相似度较低, 因此钩体 *phbC* 可能不是严格意义上的 III 类 PHA 合酶基因。另外, III 类 PHA 合酶往往与 PhaE 等形成杂聚性分子<sup>[28]</sup>, 但基因组分析显示钩体中无 PhaE 同源序列。

上述这些特点初步说明, 与钩体独特的进化地位相对应, 其 PHB 合成机理具有一系列独有的特点。阐明钩体 PHB 贮藏物合成与其抗逆生存能力的关系是钩体感染免疫及监控防疫研究的重要组成部分。另外, 对类似于钩体的 PHB 合成细菌进行深入研究也可能开辟 PHB 生物可降解塑料生物合成和生产的新途径。

## 参 考 文 献

- [1] Adler B, de la Pena Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis[J]. Veterinary Microbiology, 2010, 140(3/4): 287–296.
- [2] Xue F, Yan J, Picardeau M. Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: lessons learned from the genomes[J]. Microbes and Infection, 2009, 11(3): 328–333.
- [3] Levett PN. Leptospirosis[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2001, 14(2): 296–326.
- [4] Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance[J]. Lancet Infectious Diseases, 2003, 3(12): 757–771.
- [5] 刘波, 丁凡, 蒋秀高, 等. 2006–2010年中国钩端螺旋体病流行病学分析[J]. 疾病监测, 2012, 27(1): 46–50.
- [6] Xue F, Dong H, Wu J, et al. Transcriptional responses of *Leptospira interrogans* to host innate immunity: significant changes in metabolism, oxygen tolerance, and outer membrane[J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2010, 4(10): e857.
- [7] Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, et al. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis[J]. PLoS One, 2008, 3(2): e1607.
- [8] Trueba G, Zapata S, Madrid K, et al. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water[J]. International Microbiology, 2004, 7(1): 35–40.
- [9] Raddi G, Morado DR, Yan J, et al. Three-dimensional structures of pathogenic and saprophytic *Leptospira* species revealed by cryo-electron tomography[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(6): 1299–1306.
- [10] Sun J, Peng X, Van Impe J, et al. The *ntxB* and *ntxC* genes are involved in the regulation of poly-3-hydroxybutyrate biosynthesis by ammonia in *Azospirillum brasilense* Sp7[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(1): 113–117.
- [11] 刘宝全, 蒋本国. 聚  $\beta$  羟基丁酸(PHB)的研究进展[J]. 大连民族学院学报, 2000, 2(4): 15–20.
- [12] Ren SX, Fu G, Jiang XG, et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing[J]. Nature, 2003, 422(6934): 888–893.
- [13] Nascimento AL, Ko AI, Martins EA, et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(7): 2164–2172.
- [14] Kalia VC, Lal S, Cheema S. Insight into the phylogeny of polyhydroxyalkanoate biosynthesis: horizontal gene transfer[J]. Gene, 2007, 389(1): 19–26.
- [15] Dellomonaco C, Fava F, Gonzalez R. The path to next generation biofuels: successes and challenges in the era of synthetic biology[J]. Microbial Cell Factories, 2010, 9: 3.
- [16] Kacmar J, Carlson R, Balogh SJ, et al. Staining and quantification of poly-3-hydroxybutyrate in *Saccharomyces cerevisiae* and *Cupriavidus necator* cell populations using automated flow cytometry[J]. Cytometry. Part A: the Journal of the International Society for Analytical Cytology, 2006, 69(1): 27–35.
- [17] Hong K, Sun S, Tian W, et al. A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by fourier transform infrared spectroscopy[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 51(4): 523–526.
- [18] 魏大巧, 陈国强. 聚羟基脂肪酸酯的鉴定及检测方

- 法研究进展[J]. 云南化工, 2007, 34(4): 83–86.
- [19] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(17): 3389–3402.
- [20] Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, et al. InterProScan: protein domains identifier[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(Web Server issue): W116–120.
- [21] McCool GJ, Cannon MC. PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(14): 4235–4243.
- [22] 贺洁, 马永康, 杨向东. 钩端螺旋体病研究进展[J]. *医学动物防制*, 2010, 26(12): 1110–1113.
- [23] Madison LL, Huisman GW. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, 63(1): 21–53.
- [24] 于平, 励建荣. 真养产碱杆菌发酵生产 PHB 的培养条件优化[J]. *中国食品学报*, 2007, 7(1): 59–63.
- [25] Shi H, Nikawa J, Shimizu K. Effect of modifying metabolic network on poly-3-hydroxybutyrate biosynthesis in recombinant *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1999, 87(5): 666–677.
- [26] 曲波, 刘俊新. 活性污泥合成可生物降解塑料 PHB 的工艺优化研究[J]. *科学通报*, 2008, 53(13): 1598–1604.
- [27] Phibbs PV Jr, Vaneseltine WP. Nutritional requirements of *Leptospirae*. 3. Minimal nitrogen requirements of a strain of *Leptospira pomona*[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 1968, 118(2): 197–205.
- [28] Stubbe J, Tian J. Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of the PHA synthase[J]. *Natural Product Reports*, 2003, 20(5): 445–457.

## 稿件书写规范

### 论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N (当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 *OD* (斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如: *t* (h) (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 跟数字之间加一空格(%除外), 例如: 20 cm×0.3 cm, 不能写成 20×0.3 cm; 3 °C–5 °C 不可写成 3–5 °C; 3%–6%不可写成 3–6%等。