

doi: 10.7541/2015.47

青海湖盐单胞菌 Ectoine 合成基因簇 *ectABC* 的重组共表达

朱德锐^{1,2} 韩睿³ 沈国平² 龙启福² 李丹丹¹ 刘建¹ 刘德立¹

(1. 华中师范大学生命科学院湖北省遗传调控与整合生物学重点实验室, 武汉 430079;

2. 青海大学医学院基础医学研究中心, 西宁 810016; 3. 青海大学农林科学院, 西宁 810016)

摘要: 盐单胞菌属(*Halomonas*)通过胞内积聚有机相容溶质(Compatible solutes)来抵抗胞外的高盐渗透压。为了探究相容溶质 Ectoine 合成代谢相关基因的结构特征和异源共表达的可能性,以青海湖盐单胞菌 *Halomonas* sp. QHL1 为材料,通过高效液相色谱(HPLC)分析不同盐梯度下 QHL1 胞内 Ectoine 的积聚量,并借助于染色体步移技术(Genome walking)捕获 QHL1 菌株的 Ectoine 生物合成基因簇 *ectABC*,利用分子克隆技术分析 *ectABC* 基因簇的异源重组表达(*E. coli* BL21)。研究结果表明:胞内 Ectoine 的积聚量随着培养基中 Na⁺浓度的增加而增加,最大积聚量为 167.1 mg/g 细胞干重(1.0 mol/L Na⁺),但菌体生长却受到高浓度 Na⁺的强烈抑制作用。QHL1 的 *ectABC* 操纵子全长序列为 3580 bp,结构基因 *ectA*(579 bp)、*ectB*(1269 bp)与 *ectC*(390 bp)串联排列。基于生物信息学预测分析,两个启动子(δ^{70} 与 δ^{38} 因子控制)和若干未知功能的保守模序(Motifs)存在于 QHL1 的 *ect* 操纵子上游。构建重组表达载体 pET-28-*ectABC*,并在 *E. coli* BL21 中异源表达 *ectABC* 基因簇(2438 bp)。SDS-PAGE 结果显示 EctA、EctB 和 EctC 分别为 27.2、52.5 和 20.8 kD,与预测结果一致,表明 *ectA*、*ectB* 和 *ectC* 基因能在 *E. coli* BL21 中实现异源共表达,为构建 Ectoine 合成代谢基因整合的系统代谢工程,并实现低盐发酵控制和过量化生产提供了重要的理论基础。

关键词: 盐单胞菌属; Ectoine; *ectABC* 基因簇; 结构基因; 共表达

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2015)02-0358-10

盐单胞菌属(*Halomonas*)是中度嗜盐菌的重要代表菌群,革兰阴性、需氧、杆状,多分布于盐湖、盐场、海洋或海洋极端环境之中。通常,盐单胞菌属采用吸收转运和生物合成相容溶质的策略(Compatible solute strategy)来平衡高盐渗透压^[1]。相容溶质 Ectoine 是一类具有亲水性和两性离子特征的有机小分子,可视为氨基酸的环化衍生物或部分氢化的嘧啶衍生物,广泛存在于嗜盐或耐盐菌胞内。细胞中大量积聚,可抵抗高渗透压的冲击,亦可作为生物大分子和整个细胞的稳定剂以及压力保护剂,有助于细胞抵抗冷冻、高温高压、高盐干旱、酸碱辐射等各种逆境因素的影响^[1,2]。

经过二十多年的研究, Ectoine 合成途径的研究在基因水平、酶水平和调控水平上已较为深入。

Halomonas 作为 Ectoine 生物合成研究的模式种群,最早报道了延长盐单胞菌株 *H. elongate* DSM 2581 与 DSM 3043 的合成代谢途径^[1]。截止到目前, Ectoine 合成基因簇已在海球菌属(*Marinococcus*)、芽胞杆菌属(*Bacillus*)、喜盐芽胞杆菌属(*Halobacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、涅斯捷连科氏菌属(*Nesterenkonia*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、普劳塞氏菌属(*Prauserella*)、枝芽胞菌属(*Virgibacillus*)、甲基盒菌属(*Methylarcula*)、色盐杆菌属(*Chromohalobacter*)、甲基微菌属(*Methylomicrobium*)等^[3-13]属种中被成功克隆。在上述 Ectoine 的合成代谢途径中,以 L-lysine 生物合成途径中的天冬氨酸半醛(L-aspartate- β -semialdehyde)为前体,依赖于进化高度保守的连锁 *ectABC* 或 *ectABCD-ask* 基因簇操纵

收稿日期: 2014-04-09; 修订日期: 2014-06-15

基金项目: 国家自然科学基金(No.31060013); 青海省基础研究计划项目(No.2013Z725)资助

作者简介: 朱德锐(1979—), 男, 湖北鹤峰人; 博士; 主要研究方向极端盐湖环境微生物。E-mail: zhuderui2005@126.com

通信作者: 刘德立(1959—), 男, 湖北荆门人; 教授, 博士生导师; 主要研究方向环境微生物与分子生物学。Tel: +86-027-67867221; E-mail: deliliu2013@163.com

子, 结构基因 *ectB*、*ectA* 和 *ectC* 分别编码 L-二氨基丁酸转氨酶(EctB)、L-二氨基丁酸乙酰转移酶(EctA)和四氢嘧啶合酶(EctC)联合作用合成 Ectoine^[3-13]。此外, 基因 *ectD* 编码四氢嘧啶羟化酶(EctD), 可将 Ectoine 转化为 Hydroxyectoine^[11,13]。

在生物医学行业中, Ectoine 可提高皮肤的再生能力、延缓其老化和抑制黑色素的生成, 可作为安全的化妆品保湿剂与增白剂^[14]。随着 Ectoine 在生物医药行业的广泛应用和巨大的商业需求, 导致各个研究机构努力改善和提高细菌的 Ectoine 生产能力。尽管许多细菌能合成 Ectoine, 但在合成能力、合成途径的进化和组织方式上, 存在着较大的差异。为此, 本研究以青海湖盐单胞菌株 *Halomonas* sp. QHL1 为材料, 分析不同盐梯度下 QHL1 胞内的 Ectoine 积聚量, 并探究 Ectoine 合成代谢相关基因的结构特征和实现了 *ectABC* 基因簇的异源共表达, 为后期构建系统代谢工程菌和工业应用奠定了重要的理论基础。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源与培养基

野生嗜盐菌株 *Halomonas* sp. QHL1 分离来源于青海湖。菌株 *E. coli* DH5 α 与 *E. coli* BL21 (DE3) 由本实验室保存, 克隆载体 pMD18-T 购于 TaKaRa 公司, 表达载体选取质粒 pET-28a(+). OSM 培养基(g/L)^[7]: NaCl 可调, MgSO₄ 9.7 g, 柠檬酸钠 3.0 g, KCl 2.0 g, CaCl₂ 0.2 g, 细菌蛋白胨 10.0 g, 酵母抽提物 2.0 g,

调节 pH 为 7.5。细菌 LB 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0 g, 酵母提取物 5.0 g, NaCl 10.0 g, 用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0。固体培养基加琼脂 15.0 g, 1 \times 10⁵ Pa 灭菌 15 min。

1.2 主要试剂与仪器

Ectoine 标准品, HPLC 级 \geq 95% 购自德国 Fluka Analytical 公司; 色谱级甲醇与乙腈购自天津康科德公司; 针筒式膜过滤器, 水系(0.45 μ m), 购自上海德里安公司; 细菌 DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒和质粒提取试剂盒分别来自上海赛百盛公司、爱思进生物公司和北京博大泰恒公司; 引物由上海捷瑞生物公司合成; *Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶以及 Genome walking Kit (D316) 均购自 TaKaRa 公司; 氨苄青霉素(Amp)、卡那霉素(Kan)与 IPTG 购自北京鼎国昌盛公司; HPLC 仪(Aligent Technologies 1200 Series, USA); Eclipse XDB-C18 色谱柱(5 μ m, 4.6 mm \times 150 mm)。

1.3 引物设计与合成

根据 NCBI 上公开的 *Halomonas* sp. NJ223 (Accession No. DQ886907)、*Halomonas* sp. TNB I20 (AB119507) 和 *Halomonas* sp. BY5-1(DQ017757) 的 *ectB* 基因序列, 设计合成了 *ectB* 基因保守区段的简并引物(*ectB* CSF 与 *ectB* CSR), 见表 1。根据已知的 QHL1 *ectB* 基因保守区段测序结果, 设计染色体步移扩增 *ectB* 上游和下游序列的引物(SPF1/2/3 与 SPR1/2/3), 用于巢式 PCR 扩增 *ectB* 基因保守区的侧翼序列。根据测序获得的 QHL1 Ectoine 合成基因簇

表 1 本实验中使用的引物序列
Tab. 1 The primers used in this study

引物 Primer	目的基因 Gene targeting	核苷酸序列 Sequence (5'-3')	酶切位点 Cleavage site
<i>ectB</i> CSF	<i>ectB</i> conserved sequence	ATGCAGACCCAGAYKCTYGAACGC	
<i>ectB</i> CSR	<i>ectB</i> conserved sequence	CGCTMACRTCRGCTCRAAGGTGTC	
SPF1	<i>ectB</i> downstream	ATAACGGCACTTTCCTGGTTTCAG	
SPF2	<i>ectB</i> downstream	GCGTAAAGGACGCATTGTAGAAGAG	
SPF3	<i>ectB</i> downstream	ATCGACGTAGTGTCTGGTGACATCG	
SPR1	<i>ectB</i> upstream	CAGATGCACTTTGTAGTCAAGCCC	
SPR2	<i>ectB</i> upstream	TGAACAACACCGTCAGTCGACAG	
SPR3	<i>ectB</i> upstream	GAGGAAATCAATGTACTCACGGCC	
<i>ectABC</i> F	<i>ectABC</i>	<u>GGGATCC</u> ATGAGCACGCCGACACAACC	<i>Bam</i> H I
<i>ectABC</i> R	<i>ectABC</i>	<u>GGAGCTC</u> TATTGAGAAGGTGCGTATGAGCC	<i>Sac</i> I

注: 下划线为限制性内切酶位点; 简并碱基突出显示, 如 Y(C/T), K (G/T), M (A/C), R (A/G)

Note: The base sequences underlined are the restriction sites. The highlighted base corresponds to degenerate bases as follows: Y (C/T), K (G/T), M (A/C), R (A/G)

ectABC, 设计基因簇 PCR 扩增的上、下游引物 (*ectABC* R 与 *ectABC* F)。引物设计采用 Primer 5.0 软件设计, 由上海捷瑞生物有限公司合成。

1.4 盐梯度诱导培养

菌株活化: 将 QHL1 菌株接种于 4 mL OSM 低盐培养基, 120 r/min, 37°C 恒温振荡培养 12h 活化, 至 A_{600} 值达 1.20 左右, 批量接种备用。NaCl 诱导实验: 设置不同 NaCl 浓度梯度(0、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 mol/L)的 OSM 培养液(pH7.5), 150 mL 培养体系, 1%接种量接种, 150 r/min、37°C 恒温振荡培养 12h 后取出。测定 A_{600} 值。50 mL 发酵液测其干重, 50 mL 发酵液抽提 Ectoine。细胞干重(Cellular dry weight)的测定: 取发酵液, 4°C、12000 r/min 离心 15min, 菌体用含有等渗缓冲溶液(NaCl 浓度与培养基浓度相同)洗涤, 离心后沉淀 90°C 烘干至恒重, 称量。

1.5 HPLC 检测 Ectoine

细菌胞内 Ectoine 的抽提采用乙醇抽提法^[15]。Ectoine 标准曲线的绘制: 配制含有 2.5 mg/mL 的 Ectoine 标准品母液, 倍比稀释梯度浓度, 备用检测。采用高效液相色谱检测, 采用外标法计算谱图的峰面积, 制作标准曲线。Ectoine 检测波长是(200—215) nm, 流动相采用乙腈/超纯水(v/v, 80/20), Eclipse XDB-C18 柱, 150 mm×4.6 mm, 柱温 20°C, 压强 400 bar, 进样量 10 μ L, 流速 1.0 mL/min, 运行时间 8min^[16]。

1.6 基因 *ectB* 保守区的 PCR 扩增

总 DNA 提取按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行。以 QHL1 的基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增。反应体系(50 μ L): 模板 DNA(约 250 ng) 1 μ L; 引物 *ectB*-CSR (10 nmol/L) 1 μ L; 引物 *ectB*-CSF (10 nmol/L) 1 μ L; 10×PCR 缓冲液 5 μ L; Mg^{2+} (25 mmol/L): 7 μ L; dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 1 μ L; *Taq* 聚合酶(1.25 U/ μ L) 1 μ L; 去离子 H_2O 33 μ L。PCR 扩增条件: 95°C 预变性 5min; 95°C 变性 40s, 58°C 退火 40s, 72°C 延伸 60s, 30 个循环, 最后 72°C 延伸 10min。以琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒纯化 PCR 产物, 克隆至 pMD18-T, 转化 *E. coli* DH5 α , 酶切鉴定阳性克隆, 并由南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

1.7 扩增 *ectB* 基因的侧翼序列与基因簇 *ectABC* 结构分析

根据测序得到的 *ectB* 基因序列, 分别设计了扩

增 *ectB* 基因上游和下游序列的特异性引物各 3 条 (SPF1/2/3 与 SPR1/2/3 Primer, 见表 1), 用于染色体步移, 具体原理及操作步骤见试剂盒 TaKaRa Genome walking Kit (D316)。反应体系: 基因组 DNA 1 μ L, dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 8 μ L, 10×LA PCR Buffer (Mg^{2+} plus) 5 μ L, LA *Taq* 酶 (5 U/ μ L) 0.5 μ L, SP 引物 1 μ L, AP 引物 1 μ L, 加灭菌去离子水至 50 μ L。取第 1 轮、第 2 轮、第 3 轮 PCR 反应液各 5 μ L 进行 1% (w/v) 的琼脂糖凝胶电泳检测。以琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒纯化第 3 轮 PCR 特异性产物, 连接 pMD18-T 后, 转化至 *E. coli* DH5 α 菌株, 酶切鉴定阳性克隆, 并进行 DNA 测序。通过 DNAMAN 软件对克隆得到的 *ectABC* 基因簇序列与 GenBank 中选取的邻近序列进行核酸和氨基酸序列同源性分析, 并利用 DNASTAR 软件进行 ORF (Open reading frame) 分析, 在线软件 (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) 预测分析启动子。

1.8 基因簇 *ectABC* 的克隆表达分析

以 QHL1 的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 *ectABC* 基因簇。PCR 产物纯化后克隆至 pMD18-T, 通过 TA 互补连接后转化 *E. coli* DH5 α , 酶切鉴定阳性克隆。BamHI 和 SacI 双酶切 pMD18-*ectABC*, 并亚克隆到表达载体 pET-28a, 构建重组表达载体 pET-28-*ectABC*, 转化 *E. coli* BL21(DE3) 并筛选阳性克隆子, 测序分析。基因的诱导表达与 SDS-PAGE 具体方法参考《精编分子生物学实验指南》进行^[17]。将鉴定正确的阳性重组菌接种于含 Kan (50 μ g/mL) 的 LB 培养基中, 37°C、150 r/min 培养至对数期 (A_{600} 约为 0.6), 加入 1 mmol/L IPTG, 37°C 诱导培养 24h, 间隔 2h 取样。在相同条件下, 以不诱导的含表达载体的宿主菌作为对照。诱导培养的菌液 8000 r/min、10min 离心收集沉淀, 重悬于 1×SDS 凝胶加样缓冲液中, 煮沸 10min, 8000 r/min 离心 2min, 取上清进行 SDS-PAGE 分析^[18]。

1.9 重组工程菌的耐盐测试

通过 OSM 培养基, 培养重组工程菌 *E. coli* BL21 (pET-28-*ectABC*), 以未重组的菌株 *E. coli* BL21 为参照, 检测其耐盐能力。盐梯度设置为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2 mol/L NaCl, 按 1% 接种量接种, 150 r/min、37°C 恒温振荡培养 12h, 测定 A_{600} 值。

2 结果

2.1 盐单胞菌 QHL1 的 Ectoine 生物合成特性

嗜盐菌 *Halomonas* sp. QHL1 的生长盐度范围为 (0.04—2.74) mol/L NaCl, 最适生长盐度为 0.86 mol/L NaCl, 隶属中度嗜盐菌。通过乙醇法抽提菌株 QHL1 的胞内 Ectoine, 并进行 HPLC 定量分析。Ectoine 属于亲水性、兼性离子的氨基酸环化衍生物, 因此

HPLC 分析时极易分离, 出峰时间短。通过比对分析 QHL1 菌株胞内抽提物与 Ectoine 的标准图谱 (39.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (图 1), 结果显示 QHL1 菌株的细胞抽提物 (1.0 mol/L NaCl) 出峰时间为 1.189—1.195 min, 峰形特征和出峰时间与标准品基本一致, 说明 QHL1 菌株胞内含有相容溶质 Ectoine, 亦预示着 QHL1 菌株内存在有 Ectoine 生物合成的 *ectABC* 基因簇。

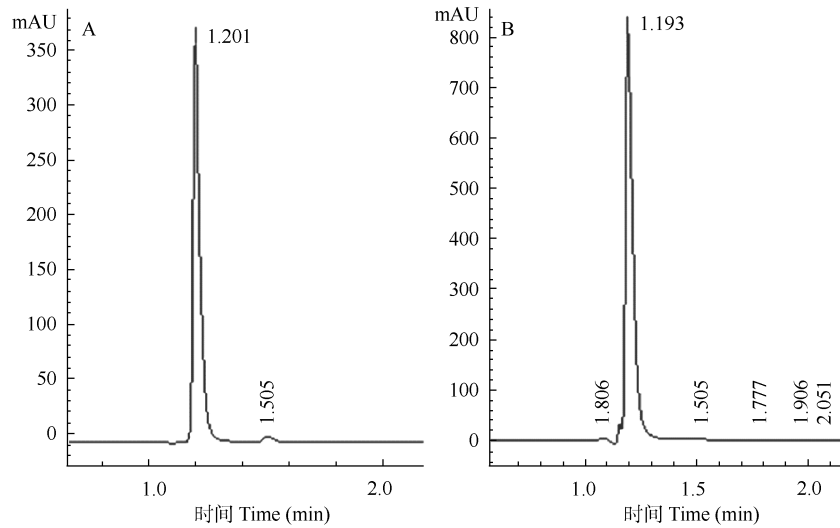


图 1 QHL1 菌株胞内 Ectoine 与标准 Ectoine HPLC 检测图谱

Fig. 1 The map of intracellular ectoine from strain QHL1 and authentic ectoine by HPLC

A. HPLC 检测标准品 Ectoine (39.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$); B. HPLC 检测 QHL1 菌株胞内抽提物, 采用改良的 OSM 培养基培养 QHL1 菌株, 培养盐度 1.0 mol/L NaCl

A. The spectra of authentic ectoine by HPLC (39.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$); B. The map of intracellular ectoine extracted from strain QHL1 by HPLC. QHL1 was cultivated at 1.0 mol/L of NaCl in the improved Oesterhelt-Stoeckenius medium

设置不同 Na^+ 浓度梯度的 OSM 培养基, 在生长优化条件下培养 QHL1, 采用 HPLC 测定其菌体提取物中的 Ectoine 含量。以 Ectoine 质量浓度 (mg/L) 和 A_{600} 为纵坐标, Na^+ 浓度 (mol/L) 为横坐标, 绘制 Ectoine 浓度-离子浓度关系曲线图, 如图 2 所示。分析表明: 低浓度的 Na^+ (≤ 1.0 mol/L) 对 QHL1 菌株的生长没有明显的影响, 而当 Na^+ 浓度高于 1.0 mol/L 以后, 菌体生长量明显受到强烈的抑制作用; 胞内 Ectoine 的积聚量严格受到 Na^+ 的影响作用, 极低浓度的 Na^+ (0.25 mol/L) 没有刺激 Ectoine 的大量积聚, 但当盐度从 0.25 mol/L 增加至 1.0 mol/L 时, Ectoine 的积聚量维持较高的水平, 至 1.0 mol/L 时可高达 121.14 mg/L (12h), 此时 Ectoine 的细胞干重比亦最大 (167.1 mg/g CDW), 此后随 Na^+ 浓度的增加而减少, 菌体生长明显受到抑制, 由此表明 Ectoine 积聚量主要依赖 Na^+ 存在, 但又受到高浓度 Na^+ 对其生长的强烈抑制作用。

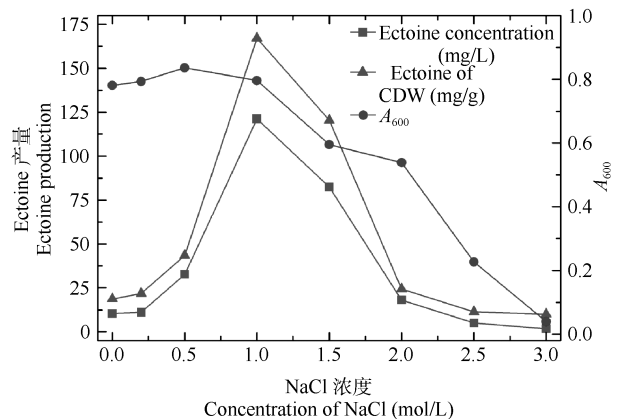


图 2 NaCl 浓度对 QHL1 的生长和 Ectoine 积累影响

Fig. 2 The effects of NaCl concentrations on growth and synthesized ectoine in strain QHL1

细胞干重: Cellular dry weight (CDW, mg/g)

2.2 盐单胞菌 QHL1 基因簇 *ectABC* 的克隆

Ectoine 的合成途径依赖于进化高度保守的 *ectABC* 或 *ectABCD* 或 *ectABCD-ask* 基因簇, 在染色

体上连锁构成 *ectABC* 操纵子(图 3A), 结构基因中以 *ectB* 基因最为保守, 其中盐单胞菌属的相似度 >84%。采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 QHL1 的总 DNA。以基因组 DNA 为模板, 采用简并引物(表 1)进行 *ectB* 基因保守序列的 PCR 扩增。PCR 产物纯化回收后, 连接至克隆载体 pMD18-T, 转化 *E. coli* DH5 α , 提取质粒进行酶切鉴定分析, 阳性克隆子测序, 获得 *ectB* 基因保守序列 977 bp。利用上游引物 SPR1/SPR2/SPR3 与下游引物 SPF1/SPF2/SPF3 (表 1), 通过染色体步移扩增 *ectB* 基因保守区段的上游和下游序列(图 3B)。经三轮巢式 PCR 扩增 *ectB* 基因上游序列, 获得上游序列约 1500 bp, 下游序列约 1200 bp。将上、下游巢式 PCR 扩增产物纯化, 克隆至 pMD18-T 载体, 并转化至 *E. coli* DH5 α 菌株, 酶切鉴定分析并测序。

经过染色体步移扩增 *ectB* 基因上下游序列, 测

序比对拼接 3580 bp。DNAStar 软件分析表明: 结构基因 *ectA*、*ectB* 与 *ectC* 串联排列; *ectA* 与 *ectB* 间隔 109 bp, *ectB* 与 *ectC* 间隔 91 bp; *ectA* 上游调控序列 635 bp, 应全部含盖启动系列元件和操纵子元件。QHL1 的 *ectA* 基因长度为 579 bp, 编码 192 个氨基酸的肽链, 预测 pI 为 4.78, 与 *Halomonas* 的 *ectA* 基因相似性为 74%—80%, 与 EctA 蛋白相似性为 58%—98%, GenBank Accession No. JX312790; 基因 *ectB* 长度为 1269 bp, 编码 422 个氨基酸的肽链, 预测 pI 为 5.98, 与 *Halomonas* 的 *ectB* 基因相似性为 78%—91%, 与 EctB 蛋白相似性为 85%—98%, GeneBank Accession No. JX312791; 基因 *ectC* 长度为 390 bp, 编码 129 个氨基酸的肽链, 预测 pI 为 5.30, 与 *Halomonas* 的 *ectC* 基因相似性为 72%—96%, 与 EctC 蛋白相似性为 75%—96%, GenBank Accession No. JX312792。

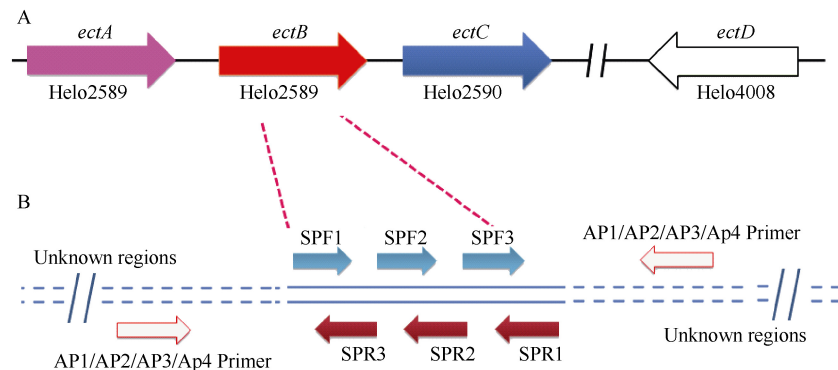


图 3 巢式 PCR 扩增 *ectB* 基因侧翼序列策略

Fig. 3 Strategy of nested PCR and amplification of flanking sequence from conserved *ectB* sequence

A. *H. elongate* DSM 2581^T 菌株 *ect* 基因簇的结构与组成; B. 巢式 PCR 扩增保守序列策略; 中心实线区域为 977 bp 的 *ectB* 基因保守序列; 引物 AP1/2/3/4 来自 Genome Walking Kit D316

A. The gene composition and organization of the *ect*-cluster in *H. elongate* DSM 2581^T; B. Strategy of amplification of the flanking sequence by nested PCR. Solid lines in the center represent 977 bp known conservative sequence of *ectB*. Primers AP1/2/3/4 were provided by the Genome Walking Kit D316

2.3 启动子预测比对和 *ect* 操纵子的结构分析

通过采用在线软件伯克利大学 Neural Network Promoter Prediction (<http://fruitfly.org.9005/seq.tools/promoter.html>)预测分析 *ectA* 基因上游序列中的启动子。根据预测结果和结构基因位置, 初步认定 *Halomonas* sp. QHL1 *ectA* 基因上游序列 28 bp 处应为转录起始位点(+1), 典型的保守特征有: 转录起始位点(TSS, 以 A 为起始点)、-10 区序列(TATAAT)、-35 区序列(TTGAAT)以及-10 区和-35 区序列的间隔距离(17 bp), 此与 *E. coli* 的 δ^{70} 启动子序列核心区域保守模式一致。*ectB* 与 *ectC* 基因上游的间隔序列,

未发现具有明显特征的启动子序列, 初步认定串联排列的 *ectABC* 基因簇是一个转录单元。

利用 MEGA 4.0 比对分析 *Halomonas* sp. NJ223 (GeneBank Accession No. DQ886907)、*Halomonas* sp. BY5-1(DQ017757)、延长盐单胞菌 *H. elongata* DSM 2581 (FN869568)和 DSM 3043(AJ011103)的 *ectA* 基因的上游序列, 确定其可能的启动子序列及位置(图 2)。比对结果显示: *Halomonas* 的代表性菌株中可能普遍存在两个启动子, 即 δ^{70} 因子控制启动子与 δ^{38} 因子控制启动子, 与已有报道一致^[19-20]。通常, 典型的 δ^{70} 因子控制启动子具有-10 区与-35 区间隔序

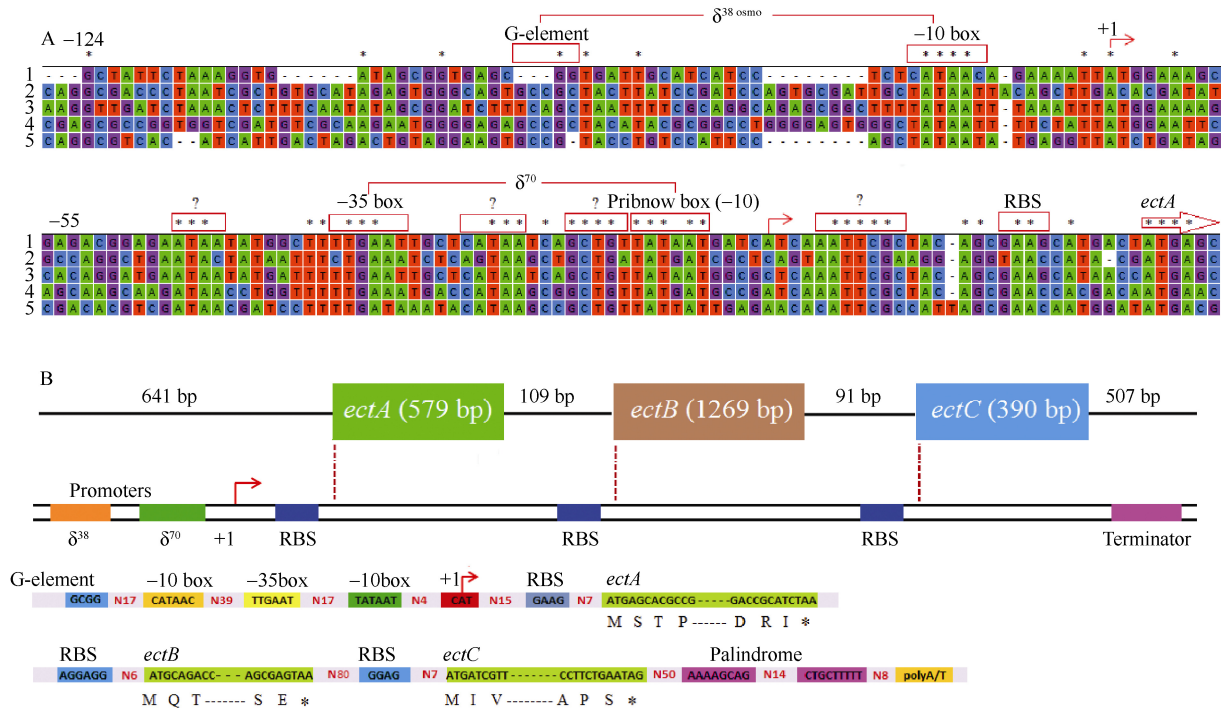


图 4 比对 *ectA* 基因上游序列与 *ectABC* 基因簇物理图谱

Fig. 4 Sequence alignment of upstream *ectA* and putative promoter of the ectoine synthesis genes *ectABC*

A. 基于 MEGA 4.0 软件比对分析 *ectA* 基因上游启动子序列. 1 为本研究中的 QHL1 上游序列; 2 为 *Halomonas* sp. NJ223; 3 为 *Halomonas* sp. BY5-1; 4 为 *H. elongata* DSM2581; 5 为 *H. elongata* DSM3043. RBS 代表核糖体结合位点; 箭头为转录起始位点(+1); B. QHL1 菌株 *ectABC* 基因簇启动子与终止子的结构特征与组成

A. The upstream *ectA* promoter region was shown based on the sequence alignment by MEGA4.0 software. 1. QHL1 in this study; 2. *Halomonas* sp. NJ223; 3. *Halomonas* sp. BY5-1; 4. *H. elongata* DSM2581; 5. *H. elongata* DSM3043. RBS: ribosome-binding site, and arrows indicated the transcription initiation sites (+1); B. Putative structural features of the promoter and terminator was predicted in *ectABC* genes cluster of QHL1

列为 17 bp 的特征。在 QHL1 菌株中, δ^{70} 因子控制启动子的-10 区与-35 区(TTGAAT [17nt] TATAAT)结构类似于 *E. coli* 的 δ^{70} 因子控制启动子。 δ^{38} 因子控制启动子(渗透压调控)位于 *ectA* 基因上游约 91 bp 处, -10 区与-35 区分别为保守的 CATAAC 序列与 GCCGC 序列(G-elements)。此外, 若干保守的、未知功能的 Motifs 存在于 *ectA* 基因的上游, 诸如: 在转录起始点(+1)与核糖体结合位点(RBS)之间存在 7 nt 的 AATTTCG 序列; 紧邻 Pribnow box (-10)处存在 5 nt 的 GCTGT 序列; 在-35 区的两侧翼分别存在 5 nt 的 CATAA 序列和 6 nt 的 AATAAT 序列。

2.4 基因簇 *ectABC* 的克隆表达分析

以 QHL1 的基因组 DNA 为模板, 利用引物 (*ectABC*-F/*ectABC*-R)进行 *ectABC* 基因簇的 PCR 扩增, 经琼脂糖凝胶电泳可见特异性的目的条带, 其分子量大小与预期结果一致, 表明成功克隆 *ectABC* 基因簇。PCR 产物纯化回收, 克隆至 pMD18-T, 转

化 *E. coli* DH5 α , 酶切鉴定阳性克隆并测序, 目的基因簇为 2438 bp。将 *ectABC* 基因簇的 PCR 扩增产物亚克隆至表达载体 pET-28a, 构建重组表达载体 pET-28a-*ectABC*。经 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切分析, 目的条带约 2500 bp, 与预期的结果一致。经测序验证, 结果表明其目的基因的插入位置、大小和读码框均正确, 未发生错配及移码。将重组表达载体 pET-28-*ectA* 转化至 *E. coli* BL21(DE3)中, 成功构建重组菌株。

在 *E. coli* BL21 中, 采用 IPTG(1 mmol/L, 37 $^{\circ}$ C)诱导, 异源表达 *ectABC* 基因簇(图 5)。SDS-PAGE 结果显示 EctA、EctB 和 EctC 分别为 27.2、52.5 和 20.8 kD, 与预测结果一致, 表明 *ectA*、*ectB* 和 *ectC* 基因能在 *E. coli* BL21 中实现异源表达, 且 *ectABC* 基因簇能同时翻译表达, 但 *ectC* 的表达量略小于 *ectA* 和 *ectB* 基因的表达量, 可能因为 *ectC* 受到宿主 *E. coli* BL21 的蛋白水解酶降解, 亦或受到 *ectA* 和 *ectB* 基因转录后的抑制作用^[19]。

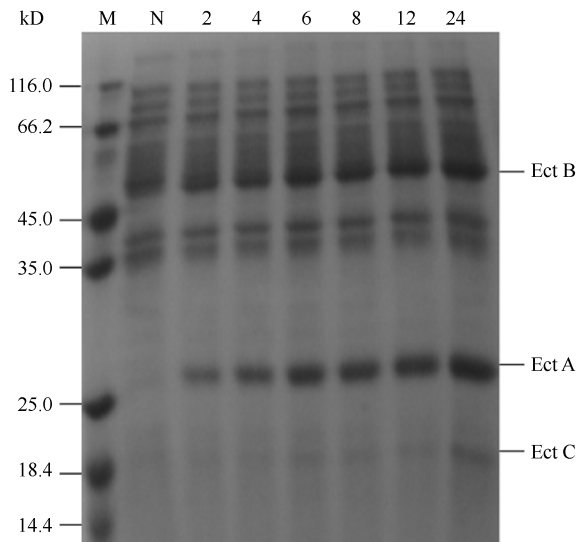


图5 SDS-PAGE 分析 *ectABC* 基因簇共表达

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the co-expressed *ectABC* gene cluster

M 为标准蛋白质 Marker; N 为未诱导的重组菌株; 泳道 2、4、6、8、12 与 24 分别代表不同的诱导时间(h); 重组菌株 *E. coli* BL21/pET-28a-*ectABC* 在 T7 强启动子诱导表达, 表达产物 EctA, EctB 与 EctC 均为单体酶蛋白

M. protein marker. N: recombination strain not induced. Number 2, 4, 6, 8, 12 and 24. different induction time (h). Recombinant strain *E. coli* BL21(pET-28a-*ectABC*) was induced and expressed with a strong promoter T7, and expression products EctA, EctB and EctC were monomer enzyme proteins

2.5 重组菌株 *E. coli* BL21/pET-28a-*ectABC* 的耐盐适应性

设置不同盐浓度梯度(0—1.2 mol/L NaCl)的 OSM 培养基, 检测 *ectABC* 基因簇是否影响 *E. coli* BL21 和重组菌株的生长量, 结果显示: *E. coli* BL21 能生长的盐度范围为(0—0.8) mol/L NaCl; 而 *E. coli* BL21 (pET-28a-*ectABC*)能耐受的盐度为 1.0 mol/L NaCl, 且生长量要略大于其对照菌株(图 6)。由此, 表明重组菌株在盐度耐受上, 要优于未重组菌株, 能抵抗一定的渗透压冲击。

3 讨论

本研究采用 HPLC 定量分析 *Halomonas* sp. QHL1 菌株胞内 Ectoine 的积聚情况, 结果表明 QHL1 菌株胞内可积聚单一组分的 Ectoine。当培养基的 Na^+ 浓度为(0.25—1.0) mol/L 时, Ectoine 的积聚量随盐度的升高而逐渐增大; 当 Na^+ 浓度为 1.0 mol/L 时, Ectoine 的细胞干重比最大(167.1 mg/g CDW, 12h); 此后随 Na^+ 浓度的增加而减少, 菌体生长明显受到抑制, 由此表明: 在环境渗透压胁迫下, 培养基中的 Na^+ 浓度对 Ectoine 的合成具有重要

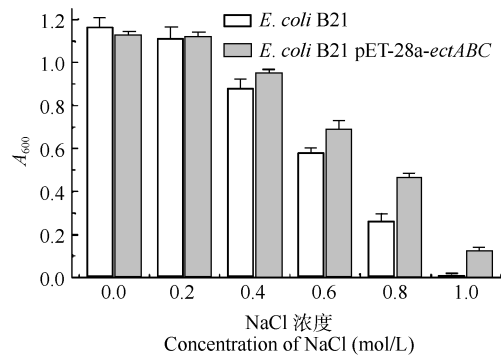


图6 重组菌株与对照菌株生长盐度耐受实验

Fig. 6 The salt tolerance of the native *E. coli* and engineered *E. coli*

生长量的检测通过测定 A_{600} 值, 培养时间 12h (37°C); 误差分析表示为平均值±标准方程($n=3$), $P < 0.05$

The growth rate was checked by measuring the A_{600} after 12h incubation at 37°C. Error bars were expressed as means±standard deviation ($n=3$). Statistical significance was set at $P < 0.05$

的影响。在一定的 NaCl 浓度范围内, Ectoine 的合成量随培养基中 Na^+ 浓度的升高而增加, 但是高浓度的 Na^+ 亦能降低细胞生长速度和生物量^[1]。

利用染色体步移技术, 本研究克隆获得 QHL1 菌株的 Ectoine 生物合成基因簇 *ectABC*。目前, NCBI 数据库中有关盐单胞菌属不同菌株的 *ectABC* 基因簇全序列的提交数据相对较少。本研究共收集获得 7 株盐单胞菌属菌株的 *ectABC* 基因簇全序列, 如 *Halomonas* sp. NJ223 (DQ886907)、*Halomonas* sp. BY5-1(DQ017757)、*H. elongata* DSM 3043(AJ011103)、*H. elongata* DSM 2581(FN869568)、*H. elongate* (D88359)、*H. elongate*(AF031489)以及原隶属盐单胞菌属的 *C. salexigens* DSM 3043(NC007963), 且以延长盐单胞菌 *H. elongate* 居多。基于多序列分析, 部分菌株的 *ectABC* 基因簇全序列数据完全相同。截止目前, 在 NCBI 数据库中, 盐单胞菌属实际上仅有 5 株菌株有效的 *ectABC* 基因簇全序列数据(包括本研究中的 QHL1)。

基因组中完整的 *ectABC* 基因簇序列广泛存在于嗜盐细菌与耐盐细菌之中。在 30 株革兰阴性细菌中, 基因簇 *ectABC* 与天冬氨酸激酶基因 *ask*, 采用 *ectABC-ask* 串联的操纵子模式; 而在革兰阳性细菌中, 仅以 *ectABC* 操纵子模式存在^[19]。目前, 典型 *ect* 操纵子模式有以下几种^[20]: (1) 在延长盐单胞菌 *H. elongata*、需盐色盐杆菌 *C. salexigens*、泊库岛食烷菌 *Alcanivorax borkumensis*、克劳氏芽胞杆菌 *B. clausii* 与 *Saccharophagus degradans* 之中, 结构基因

ectA、*ectB* 与 *ectC* 串联形成 *ectABC* 操纵子; (2) 在菌株耐盐芽胞杆菌 *B. halodurans*、鲁杰氏菌 *Ruegeria* sp. TM1040 以及所有的弧菌属 (*Vibrio*) 种成员之中, 由 *ectABC* 基因簇与 *ask* 基因形成 *ectABC-ask* 操纵子; (3) 在海洋泉古菌 *Nitrosopumilus maritimus*、海洋芽螺旋菌 *Blastospirellula marina*、天蓝色链霉菌 *S. coellcolor* A3 及 β -变形纲成员之中, 则以 *ectABCD* 操纵子存在; (4) 在阿拉斯加鞘氨醇单胞菌 *Sphingopyxis alaskensis*、海单胞菌 *Marinomonas* sp. MWYL1 与施氏假单胞菌 *P. stutzeri* A1501 等菌株之中, *ectABCD* 基因簇与 *ask* 基因形成 *ectABCD-ask* 操纵子。在本研究中, *Halomonas* sp. QHL1 的 *ect* 操纵子隶属上述第一种类型, 属于 *ectABC* 操纵子, 其内部结构具有 δ^{70} 因子控制启动子与 δ^{38} 因子控制启动子, 此与先前的报道一致^[20]。

本研究成功构建了重组菌株 *E. coli* BL21/pET-28a(+)-*ectABC*, 经 1 mmol/L IPTG 的诱导后, SDS-PAGE 结果分析表明: EctA, EctB 和 EctC 分别为 27.2、52.5 和 20.8 kD, 与预测结果一致, 表明 *ectA*、*ectB*、*ectC* 基因能在 *E. coli* BL21 中实现异源共表达, 且重组菌株在耐盐能力上有明显提高。在 Ectoine 合成代谢相关基因的克隆表达与代谢工程菌构建方面^[21], 诸多研究已取得系列技术上的突破, 为后期工业应用提供了重要的技术思路。早期 Zhao 等^[5]、Reshetniko 等^[6]、Zhang 等^[7]、Rajan 等^[10]和 Bestvater 等^[22]分别从达坂喜盐芽胞杆菌 *Halobacillus dabanensis* D-8^T、嗜碱产甲烷菌 *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z、耐盐芽胞杆菌 *B. halodurans*、正喜盐涅斯捷连科氏菌 *Nesterenkonia halobia* DSM 20541 和嗜盐海球菌 *Marinococcus halophilus* 中克隆了 *promoter+ectABC* 基因簇, 实现了 *E. coli* 异源表达; Seip 等^[13]和 Stöveken 等^[23]分别从施氏假单胞菌 *P. stutzeri* DSM 5190^T 和 *P. stutzeri* A1501 菌株中, 克隆了 *ectABCD+ask* 基因簇并实现了 *E. coli* 异源表达, 且 Ectoine/Hydroxyectoine 的产量高于以 *ectABCD* 基因簇构建的工程菌; Eilert 等^[24]和 Moya 等^[25]采用系统整合的方法, 分别将延长盐单胞菌 *H. elongata* ATCC33173 与需盐色盐杆菌 *C. salexigens* 的 *ectABCD* 基因簇重组整合至多形汉逊酵母 *Hansenula polymorpha* 和 *E. coli* DH5 α 菌株, 实现 Hydroxyectoine 的过量化生产; Becker 等^[26]基于系统代谢工程, 成功将 *P. stutzeri* A1501 菌株的 *ectABCD* 基因

簇, 系统整合至谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum*, 实现了 Ectoine 的过量化生产。本研究以青海湖盐单胞菌株 *Halomonas* sp. QHL1 为材料, 分析不同的盐梯度下 QHL1 胞内的 Ectoine 积聚量, 并探究 Ectoine 合成代谢相关基因的结构特征和实现了 *ectABC* 基因簇的异源共表达, 为后续构建 Ectoine 合成代谢相关基因系统代谢工程菌株、实现低盐发酵控制和大规模应用开发奠定基础。

参考文献:

- [1] Pastor J M, Salvador M, Argandoña M, et al. Ectoines in cell stress protection: uses and biotechnological production [J]. *Biotechnology Advances*, 2010, **28**(6): 782—801
- [2] Long Q F, Zhu D R, Han R, et al. Recent progress in researches on synthesis and transportation mechanism of compatible solutes in halophilic bacteria [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, **34**(9): 63—66 [龙启福, 朱德锐, 韩睿, 等. 嗜盐菌相容物质合成与转运调节机制. 环境科学与技术, 2011, **34**(9): 63—66]
- [3] Louis P, Galinski E A. Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli* [J]. *Microbiology*, 1997, **143**(4): 1141—1149
- [4] Cánovas D, Vargas C, Calderón M I, et al. Characterization of the genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043 [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 1998, **21**(4): 487—497
- [5] Zhao B, Lu W, Yang L, et al. Cloning and characterization of the genes for biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus dabanensis* D-8^T [J]. *Current Microbiology*, 2006, **53**(3): 183—188
- [6] Reshetnikov A S, Khmelina V N, Trotsenko Y A. Characterization of the ectoine biosynthesis genes of haloalkalotolerant obligate methanotroph *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z [J]. *Archives of Microbiology*, 2006, **184**(5): 286—297
- [7] Zhang B, Bao X, Wang L, et al. Cloning and characterization of the gene cluster for biosynthesis of ectoine from *Nesterenkonia halobia* DSM 20541 [J]. *Journal of Microbiology*, 2008, **46**(3): 309—318
- [8] He J, Huang X, Gu L F, et al. Cloning of the ectoine biosynthesis gene *ectABC* from *Halomonas* sp. BYS-1 and salt stressed expression in *Escherichia coli* [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, **46**(1): 28—32 [何健, 黄星, 顾立锋, 等. 盐单胞菌属 BYS-1 四氢嘧啶合成基因 *ectABC* 克隆及其盐激表达. 微生物学报, 2006, **46**(1):

- 28—32]
- [9] Zhang W, Wei H L, Gao H W, *et al.* Cloning and Characterization of *ectABC* Cluster from *Bacillus alcalophilus* DTY1 [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, 25, 24(3): 395—400 [张薇, 魏海雷, 高洪文, 等. 中度嗜盐菌四氢嘧啶合成基因的克隆与功能分析. 生物工程学报, 2008, 24(3): 395—400]
- [10] Rajan L A, Joseph T C, Thampuran N, *et al.* Characterization and phylogenetic analysis of ectoine biosynthesis genes from *Bacillus halodurans* [J]. *Archives of Microbiology*, 2008, 190(4): 481—487
- [11] Bursy J, Kuhlmann A U, Pittelkow M, *et al.* Synthesis and uptake of the compatible solutes ectoine and 5-hydroxyectoine by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in response to salt and heat stresses [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(23): 7286—7296
- [12] Reshetnikov A S, Khmelenina V N, Trotsenko Y A. Identification of ectoine synthesis genes in a moderate halophilic alphaproteobacterium *Methyloarcula marina* [J]. *Microbiology*, 2010, 79(6): 856—857
- [13] Seip B, Galinski E A, Kurz M. Natural and engineered hydroxyectoine production based on the *Pseudomonas stutzeri* *ectABCD-ask* gene cluster [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(4): 1368—1374
- [14] Kunte H J, Lentzen G, Galinski E A. Industrial production of the cell protectant ectoine: protection mechanisms, processes, and products [J]. *Current Biotechnology*, 2014, 3(1): 10—25
- [15] Jörg-Kunte H, Galinski E A, Trüper H G. A modified FMOC-method for the detection of amino acid-type osmolytes and tetrahydropyrimidines (ectoines) [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1993, 17(2): 129—136
- [16] Li Y D, Long Q F, Li W J, *et al.* Detection of intracellular compatible solute ectoine in halophilic bacteria from Qinghai Lake by a high performance liquid chromatography (HPLC) [J]. *Environmental Chemistry*, 2013, 32(9): 1687—1692 [李耀东, 龙启福, 李文军, 等. 高效液相色谱检测青海湖嗜盐菌胞内积聚的相溶物质四氢嘧啶. 环境化学, 2013, 32(9): 1687—1692]
- [17] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, *et al.* Short Protocols in Molecular Biology [M]. Beijing: Science Press. 2001, 378—397
- [18] Yang H, Li F G, Lan Q J, *et al.* Cloning, identification and expression of ferritin heavy chain from chinese giant salamanders, *Andrias davidianus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(1): 27—34 [杨辉, 李锋刚, 蓝青景, 等. 大鲵铁蛋白重链 *FTH* 基因的克隆、鉴定及表达分析. 水生生物学报, 2014, 38(1): 27—34]
- [19] Reshetnikov A S, Khmelenina V N, Mustakhimov I I, *et al.* Diversity and phylogeny of the ectoine biosynthesis genes in aerobic, moderately halophilic methylotrophic bacteria [J]. *Extremophiles*, 2011, 15(6): 653—663
- [20] Schwibbert K, Marin-Sanguino A, Bagyan I, *et al.* A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581^T [J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(8): 1973—1994
- [21] Ma R, Xu H, Ding R, *et al.* The strategy of gene coexpression in *Escherichia coli* [J]. *China Biotechnology*, 2012, 32(4): 117—122 [马蓉, 徐昊, 丁锐, 等. 大肠杆菌多基因共表达策略. 中国生物工程杂志, 2012, 32(4): 117—122]
- [22] Bestvater T, Louis P, Galinski E A. Heterologous ectoine production in *Escherichia coli*: by-passing the metabolic bottle-neck [J]. *Saline Systems*, 2008, 4(1): 12—14
- [23] Stöveken N, Pittelkow M, Sinner T, *et al.* A Specialized aspartokinase enhances the biosynthesis of the osmo-protectants ectoine and hydroxyectoine in *Pseudomonas stutzeri* A1501 [J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(17): 4456—4468
- [24] Eilert E, Kranz A, Hollenberg C P, *et al.* Synthesis and release of the bacterial compatible solute 5-hydroxyectoine in *Hansenula polymorpha* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 167(2): 85—93
- [25] Rodríguez M J, Argandoña M, Iglesias G F, *et al.* Temperature-and salinity-decoupled overproduction of hydroxyectoine by *Chromohalobacter salexigens* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(3): 1018—1023
- [26] Becker J, Schäfer R, Kohlstedt M, *et al.* Systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of the chemical chaperone ectoine [J]. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12(1): 110—112

RECOMBINANT CO-EXPRESSION OF THE ECTOINE BIOSYNTHESIS GENE CLUSTER *ectABC* IN *HALOMONAS* FROM QINGHAI LAKE

ZHU De-Rui^{1, 2}, HAN Rui³, SHEN Guo-Ping², LONG Qi-Fu², LI Dan-Dan¹, LIU Jian¹ and LIU De-Li¹

(1. Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, School of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079, China; 2. Research Center of Basic Medical Sciences, Qinghai University Medical College, Xining 810016, China; 3. Qinghai Academy of Agricultural Forestry Sciences, Qinghai University Medical College, Xining 810016, China)

Abstract: *Halomonas* is capable of synthesizing organic compatible solutes ectoine in response to high osmotic pressure. To reveal the possibility of heterologous co-expression of ectoine biosynthesis genes, intracellular ectoine in *Halomonas* sp. QHL1 strain was determined by HPLC under different salt gradients. The entire *ectABC* gene cluster for ectoine synthesis was cloned using genome walking and expressed in the heterologous recombinant *E. coli* BL21. The results showed that the concentration of ectoine accumulated in the cells had a positive correlation with the extracellular Na⁺ concentration and reached a maximum value (167.1 mg/g cell dry weight) at 1.0 mol/L Na⁺, and high concentration of Na⁺ strongly inhibited the bacteria growth. The entire *ectABC* gene cluster in QHL1 strain was 3580 bp, containing structural gene *ectA* (579 bp), *ectB* (1269 bp) and *ectC* (390 bp). Based on bioinformatics prediction analysis, two putative promoters (δ^{70} and δ^{38} -controlled promoter) and several conserved motifs with unknown function were identified in the upstream of *ect*-operon. The recombinant plasmid pET-28a (+)-*ectABC* was successfully constructed, and the results of heterologous expression indicated that these three genes could be simultaneously translated to protein EctA (27.2 kD), EctB (52.5 kD) and EctC (20.8 kD). These results contribute further improvements in ectoine high yield and hypohaline biotechnological process optimization, and also provided a framework for future genetic manipulation of systems metabolic engineering.

Key words: *Halomonas*; Ectoine; Gene cluster *ectABC*; Structural gene; Co-expression