

研究报告

Research Report

恶臭假单胞菌 KT2442 中新型 *phaC1* 基因的鉴定

Jamshid Raheb , Saeed Saadat , Fatemeh Nazari 

国家遗传工程和生物技术研究所, 德黑兰, 伊朗;

 通讯作者: jamshid@nigeb.ac.ir;  作者

计算分子生物学, 2013 年, 第 2 卷, 第 11 篇 doi: 10.5376/cmb.cn.2013.02.00011

本文首次以英文发表在 Computational Molecular Biology 上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 用中文再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。如果读者对中文含义理解有歧义, 请以英文原文为准。

推荐引用:

Raheb et al., 2013, Identification of a Novel *phaC1* Gene from Native *Pseudomonas putida* KT2442 as a Key Gene for PHA Biosynthesis, Computational Molecular Biology, Vol.3, No.3 16-23 (doi: 10.5376/cmb.2013.03.0003)



摘要 经济活动在过去一个世纪的增长导致了我们需要迫切思考的相互关联的问题。近年来, 由于塑料的过度消费, 开发生物可降解聚合物成为经济进步的重要因素。另外, 纳米珠的应用激发了工业和生物医学应用方面的兴趣。这些可生物降解的聚合物, 聚羟基链烷酸酯(PHAs)是广泛细菌在细胞质中碳过量的极限生长条件下产生的 3、4、5 和 6 羟基链烷酸多羟基酯家族中的一员。这些碳和能量存储聚合物是可降解的并且不溶于水的, 体现出一定的热塑性, 并且它们可以由可再生碳源生产。在本研究中, 由天然恶臭假单胞菌产生的 PHA 通过甲醇分解和 FTIR 方法进行验证, 结果表明该菌能产生 PHA。然后, 使用适当的引物和聚合酶进行链反应, 对 PHA 合酶基因进行扩增、测序并与 NCBI 登记的序列进行比较。

关键词 纳米珠, 聚羟基链烷酸酯, 恶臭假单胞菌

Identification of A Novel *phaC1* Gene from *Pseudomonas putida* KT2442

Jamshid Raheb , Saeed Saadat , Fatemeh Nazari 

National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran;

 Corresponding author, jamshid@nigeb.ac.ir;  Authors

Abstract Economic activities have increased over the past century which leads to inter-related problems that require immediate consideration. Today, due to the excessive consumption of plastics, development of bio-degradable polymers is an important element for the economic progress. In addition nano-beads application is developed that are of interest for industrial and biomedical applications. These biodegradable biopolymers, polyhydroxyalkanoates (PHAs) are a family of polyhydroxyesters of 3, 4, 5 and 6 hydroxyalkanoic acids produced by a wide range of bacteria as granules in the cytoplasm of the cells under growth limiting conditions with carbon excess. These carbon and energy storage polymers are bio-degradable and insoluble in water, show thermoplastic properties and they can be produced from renewable carbon sources. In this study, PHA produced by native *Pseudomonas putida* strain was investigated by Methanolysis and FT-IR methods. The results showed that the bacterium is capable of producing PHA. Then, using appropriate primers and the polymerase chain reaction, PHA synthase gene of the organism was amplified, sequenced and compared to NCBI registered sequences.

Keywords Nano-beads, Polyhydroxyalkanoates, *Pseudomonas putida*

塑料产生的烃类废物在其较长的分解期内会

产生有毒的化合物, 现代生活方式和人口过剩导致的自然资源消耗殆尽需要全世界合理、有效和可持续地利用环境资源, 生产环保、降解周期短的塑料, 例如聚羟基链烷酸(PHA)可以减少不利的废物和排放(Koller et al., 2010; Levis and Barlaz, 2013)。

在营养有限的条件下, 各种细菌利用这些碳和

收稿日期: 2013 年 11 月 06 日

接受日期: 2013 年 12 月 05 日

发表日期: 2013 年 12 月 26 日

基金项目: 本研究由国家遗传工程和生物技术研究所(NIGEB)资助

能量产生聚酯(Liu et al., 2013)。当提供过量的碳并且限制一种基础生长营养物质时, 这些聚合物作为颗粒在细菌细胞质中积累(Tanamool et al., 2013)。PHA是由(R) 3-羟基脂肪酸组成的光学活性生物聚酯, 代表一类复杂的生物聚合物(Martínez et al., 2012)。羟基链烷酸(Has)和聚羟基链烷酸酯单体都是R-enantiomerically纯化学品(Adkins et al., 2012)。由于PHA在物理性质上类似于石化聚合物, 这些可生物降解的热塑性塑料被认为是用于石油化学衍生塑料的有前景的替代品(Poli et al., 2011)。由于PHA在物理性质上类似于石化聚合物, 这些可生物降解的热塑性塑料被认为是用于石油化学衍生塑料的有前景的替代品(Poli et al., 2011)。根据单体单元的碳链长度, 分为两类PHA。含有3至5个碳原子的重复单元单体的PHA被分类为短链长(SCL-) PHAs, 中链长度(MCL-)PHA由6至14个碳原子组成(Gangoiti et al., 2012)。聚羟基链烷酸酯单体的手性结构单元可用于合成类似抗生素、维生素、芳烃和信息素的精细化学品(Guo-Qiang, 2009), 据报道, 一些聚羟基链烷酸具有抗微生物活性(Shuping, 2013; Ruth, 2007)。不同的产生PHA的生物体中, PHA生物合成基因也有所不同, PHA的生物合成基因座分为三大类, 在I型系统中, PHA合酶编码基因(phb)与phbA和phbB相邻, 例如真菌*Ralstonia eutropha* (以前的*Alcaligenes eutrophus*)的pha基因座, 这两个基因分别编码与scl-PHA的生物合成密切相关的b-酮硫解酶和乙酰乙酰辅酶A还原酶。通过PHA解聚基因(phaZ)分离两个合酶基因(phaC1和phaC2)的基因座的轨迹是II型PHA遗传组织系统, mcl-PHA产生的假单胞菌具有II型系统。在III型PHA生物合成遗传组织中, 合酶由phoebE和phbC基因编码的两个多肽亚基组成。phbA和phpbB基因也位于该基因座, 但通常从phbE和phbC基因分散地转录, 这种类型已在酒色着色菌、集胞藻属和紫囊硫菌中观察到, 后来, 巨大芽孢杆菌的pha基因座被定性为IV型PHA生物合成遗传系统(Hernandez-Eligio et al., 2011; Poirier et al., 1995)。在本文中, 我们报道了用于在天然假单胞菌菌株中分离和扩增PHA合酶基因hdaC1的快速、灵敏的PCR程序。因为PHA合酶是细菌合成聚羟基链烷酸生物可降解聚酯所必需的关键酶, 我们的主要目的是克隆天然假单胞菌中的hdaC1基因, 然后在适当的宿主中表达产生可生

物降解塑料, 因此代替石油衍生的聚合物。

1 结果与分析

1.1 PHA产物的FTIR分析和确认

纯化的PHB, mcl-PHA和P (HB + mcl-HA)分别在FT-IR光谱1728 / cm, 1740 / cm和1732 / cm处有最强峰(Shamala et al., 2009)。mcl-PHA谱图中最强的谱带是2928 / cm附近亚甲基C-H的振动。在光谱1165 / cm附近可以看到mcl-PHA的其他特征谱带(图1)。证明1728 / cm和1744 / cm之间的带是PHA的特征带(Shamala et al., 2009)。

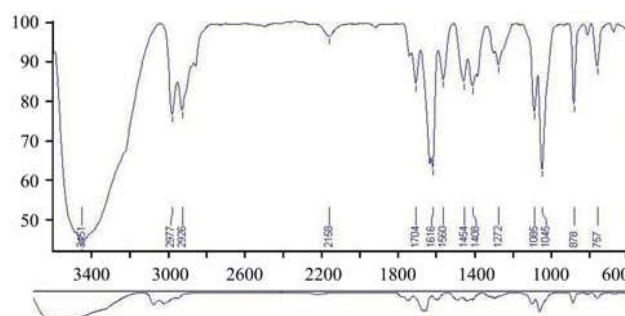


图1由天然假单胞菌产生的PHA的FTIR分析

Figure 1 FT-IR analysis of PHA produced by native *Pseudomonads*

1.2 hdaC1基因的PCR扩增

使用从恶臭假单胞菌中纯化的基因组DNA制定PCR方案。据报道, 该生物体可以产生mcl-PHA。本研究获得了一个独特的540 bp的PCR产物(图2)。PCR产物的大小与侧翼为I-179L / I-179R引物对的phaC1和phaC2基因的长度一致。使用由其制造商配制用于长PCR扩增的延长酶, 观察到另一个ca. 3.4kb, 在phaC1和phaC2基因中侧翼分别为I-179L和I-179R并且包括整个pha Z基因退火位点DNA序列的扩增子, 通过加热细菌菌落的悬浮液制备的phaC基因序列检测使用纯化的基因组DNA制定的PCR方案, 结果显示甚至含有phaC1和phaC2基因的微生物的粗细胞裂解物中都可以产生特征为540 bp的PCR产物(Steinbuchel and Schlegel, 1991)。

1.3 phC1基因扩增子的序列分析

对来自天然恶臭假单胞菌样品的540 bp PCR产物进行纯化和测序(图3)。使用正向和反向引物分别对540 bp PCR片段进行纯化和测序(图4; 图5)。BLASTX使用选择的190 bp的恶臭假单胞菌pha 1基因序列作为查询产生与多于20个PHA合酶匹配的氨基酸序列(数据未显示)。与具有PHA合酶1和2的

铜绿假单胞菌、恶臭假单胞菌等的比对具有最高的同源性。如此看来，选择用于序列分析的特定的细菌克隆含有恶臭假单胞菌 *phaC1* 基因的扩增片段。在 Mega5 应用中使用 FASTA 格式的序列构建系统发育树。

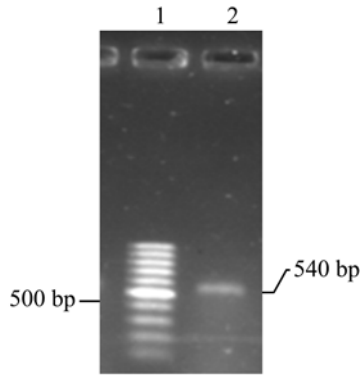


图2从 *phaC1* 基因高保守区域产生 540 个片段的 PCR 产物凝胶电泳

注：泳道 1 和 2，50 bp 分子量，泳道 3、8，来自恶臭假单胞菌 KT2442 的 *phaC1* 基因的高保守序列的 540 个片段的 PCR 产物 (不同反应)

Figure 2 Gel electrophoresis of PCR production of 540 fragment from high conservative area in *phaC1* Gene

Note: Lane 1 and 2, 50 bp molecular weigh, Lane 3-8, 540 fragment PCR product from high conservative sequences in *phaC1* gene in *pseudomonas putida* KT2442, (different reaction)

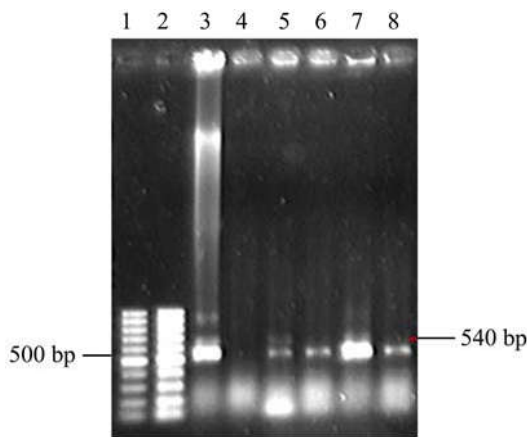


图3从恶臭假单胞菌 KT2442 中获得的 540 bp PCR 片段的纯化

注：第 1 行，分子量为 50 bp，第 2 行为 540 bp PCR 产物

Figure 3 The purification of 540 bp PCR fragment from *P. putida* KT2442

Note: Line 1, 50bp molecular weigh and line 2, 540 bp PCR product

1.4 系统发育树

Mega5 应用中的 ClustalW 方法用于构建系统发生树，“Phylip Tree” 部分给出了 newick 格式的系统发育树 (图 6)。

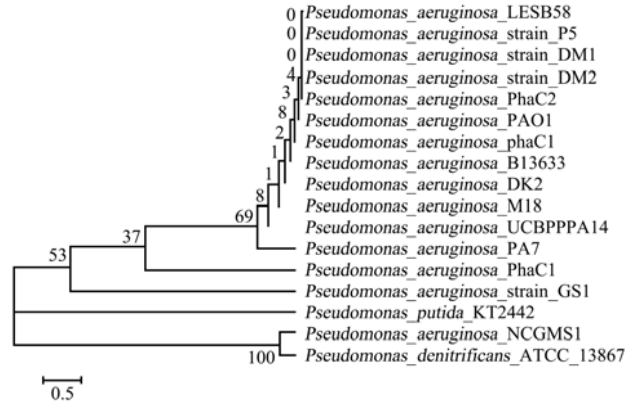


图6恶臭假单胞菌 KT2442 *hdaC1* 基因的系统发育树

Figure 6 The phylogenic tree of *phaC1* gene from *pseudomonas putida* KT2442

2 讨论

因为 PHA 在工业、医药和农业上有众多应用，因此，对涉及生产的基因进行广泛研究是非常必要的。世界上塑料的重复使用日益增加使得全球市场到 2010 年为止可生物降解聚合物达到 1.14 亿磅。出于这样的原因，PHAs 的生产是受到高度认可的科学，对聚合物的重要研究主要流向欧洲和日本，一定程度上流向美国 (European Bioplastics, 2007)。具体的应用吸引了大量行业兴趣，具有物理和化学性质的新型聚合物可以仅通过控制碳源的组成来合成。重要的是要注意生物聚合物科学 PHAs 和跨学科性质的几个生产的经济和技术障碍使得在一领域的大规模研究充满挑战，导致科学家以一种可负担的方式生产可生物降解的聚合物。由于 PHA 生产的成本高，威胁到商业开发的迅速进展 (Pandey et al., 2005)。最后，使得 PHAs 具有广泛和多样化的应用，其中医疗应用是最经济可行的。现在，随着越来越多的兴趣和在这一领域的广泛研究正在进行，PHA 作为下一代具有广泛应用的潜力的环保材料出现。由于涉及 PHA 合成的基因和 *hdaC1* 基因的潜力在世界范围内的研究还很少，所以生产 PHA 和该基因是新颖的，然后将该基因转移到合适的表达载体中并在大肠杆菌中进行转化以便表达也是非常重要的。该基因与 *phaD* 和 *phaG* 基因转移到几种不同的细菌中是一个作为更多的效率和研究来增加基因表达

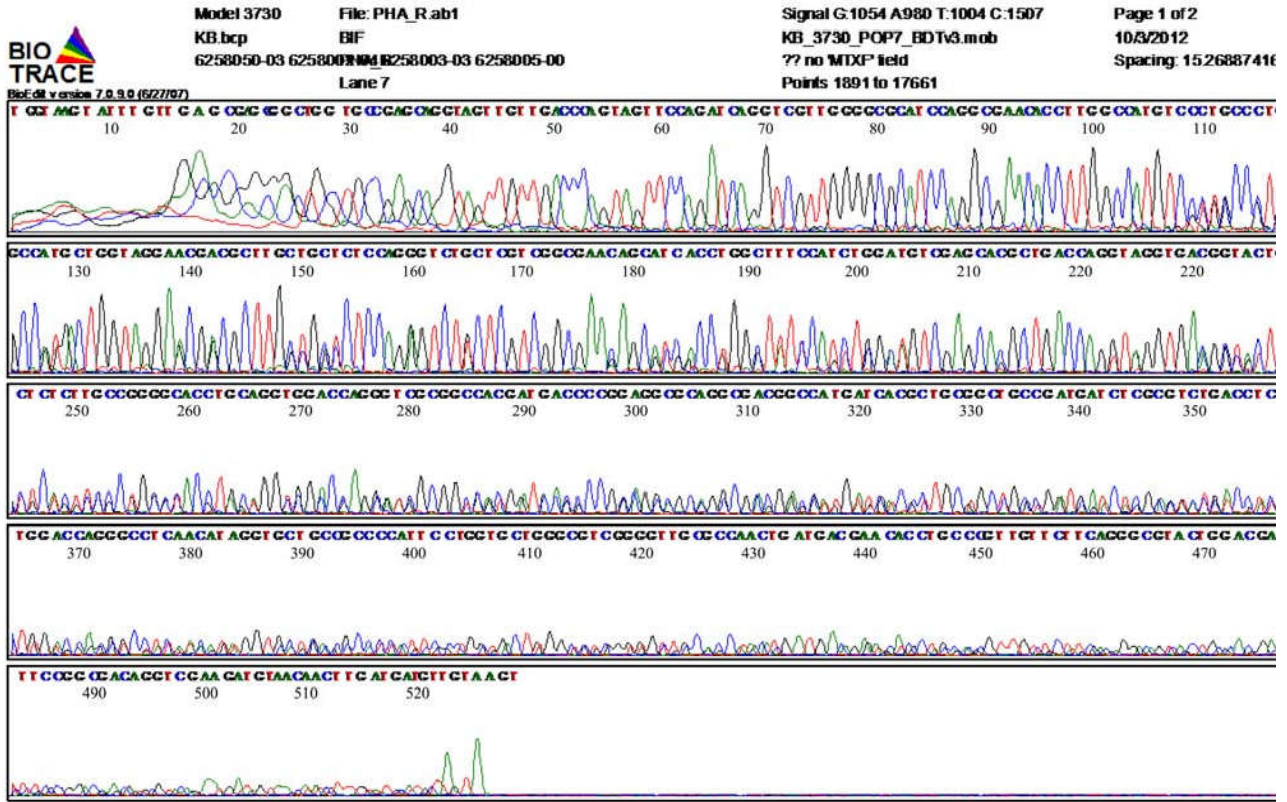


图5恶臭假单胞菌中 $phC1$ 基因反向引物的序列的跟踪元文件结果

Figure 5 The result of trace metafile of sequences from reverse primer for *phaC1* gene in *P. putida*

(Sambrook et al., 1989)。PCR在购自fermentas的Techne PCR热循环仪(Techne, England)中进行，测序引物由PCR预混合物合成，所有操作根据制造商的说明书进行。为了从恶臭假单胞菌的基因组DNA中扩增PHA合酶基因 $pha1$ ，使用两种特异性引物进行PCR，正向引物：ACAGATCAACAAGTTCTACATCTTCGAC，反向引物：GGTGTGTCGTTGTTCCAGTAGAGGATGTC。PCR条件如下：30个循环94℃变性30秒，60℃退火30秒，72℃延伸1分钟。通过1×TBE(Tris-Borate-EDTA)缓冲液中的琼脂糖凝胶电泳分析PCR产物，并用0.5 ug / mL溴化乙锭染色凝胶。

3.4核苷酸序列分析

通过正向和反向引物PCR扩增得到的 $phC1$ 基因通过310遗传分析仪所述的修饰的双脱氧链终止方法测序(Tomris et al., 2007) (Perkin Elmer)。用遗传信息处理软件Bioedit分析得到核苷酸序列。扩增序列的生物信息学内容通过NCBI BLAST程序得到(Wiese et al., 2011)。

3.5系统发育树的生物信息学方法

一组同源DNA序列构建树。将来自PCR扩增的 $phC1$ 基因的序列送入blastn网络中，在NCBI处将其粘贴到主搜索框中。在blastn中应用以下序列：

恶臭假单胞菌KT2442

aagagcttggtccgctgtgctggagaacagctggcagactttcatcatcattgggggcaccccgacaactaccacgccaatggggcctgaccacatgtcg

aggccctcaacgaggccatcgaggtcatcctgtagatcaccggcagccacgactgaacctggcggcctgctccggcg

获得匹配列表，其中选择十七个序列以构建(部分 $phaC1$ 基因)的系统发生树

- Pseudomonas_putida_KT2442,
- Pseudomonas_aeruginosa_LESB58,
- Pseudomonas_aeruginosa_PAO1,
- Pseudomonas_aeruginosa_phaC1,
- Pseudomonas_aeruginosa_B136-33,
- Pseudomonas_aeruginosa_DK2,
- Pseudomonas_aeruginosa_M18,
- Pseudomonas_aeruginosa_UCBPP-PA14,
- Pseudomonas_aeruginosa_strain_GS1,

Pseudomonas_aeruginosa_NCGM2.S1,
Pseudomonas_denitrificans_ATCC_13867,
Pseudomonas_aeruginosa_strain_DM2,
Pseudomonas_aeruginosa_strain_DM1,
Pseudomonas_aeruginosa_PA7,
Pseudomonas_aeruginosa_PhaC2,
Pseudomonas_aeruginosa_PhaC1,
Pseudomonas_aeruginosa_strain_P5

致谢

这项工作部分得到国家遗传工程和生物技术研究所(NIGEB)的资助。

参考文献

- Adkins J., Pugh S.h., McKenna R., and Nielsen D.R., 2012, Engineering microbial chemical factories to produce renewable “biomonomers”, *Front Microbiol*, 3: 313-318
- Akhavan Sepahy A., Ghazi Sh., and Akhavan Sepahy M., 2011, Cost-Effective Production and Optimization of Alkaline Xylanase by Indigenous *Bacillus mojavensis* AG137 Fermented on Agricultural Waste, *Enzyme Res.*, 20: 1-11
- Gangoiti J., Santos M., Prieto M.A., Mata I.D., Serra J.L., and Llama M.J., 2012, Characterization of a Novel Subgroup of Extracellular Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Depolymerases from Actinobacteria, *Appl Environ Microbiol*, 78: 20-28
- Guo-Qiang C.H., 2009, A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio and materials industry, *Chem Soc Rev.*, 38: 2434-2446
- Hernandez-Eligio A., Castellanos M., Moreno S., and Espin G., 2011, Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes *phbBAC* by *PhbR* and *RpoS*, *Microbiology*, 157(Pt 11): 3014-3023
- Hume A.R., Nikodinovic-Runic J., and O'Connor K.E., 2009, *FadD* from *Pseudomonas putida* CA-3 Is a True Long-Chain Fatty Acyl Coenzyme A Synthetase That Activates Phenylalkanoic and Alkanoic Acids, *J Bacteriol.*, 191(24): 7554-7565
- Koller M., Salerno A., Dias M., Reiterer A., and BrauneGG G., 2010, Modern biotechnological polymer synthesis: A review, *Food Technol Biotechnol*, 48(3): 255-269
- Levis J.W, and Barlaz M.A., 2011, Is Biodegradability a Desirable Attribute for Discarded Solid Waste? Perspectives from a National Landfill Greenhouse Gas Inventory Model, *Environ Sci Technol.*, 45: 5470-5476
- Liu H., Luo Y., Han J., Wu J., Wu Z., and Feng D., 2013, Proteome reference map of *Haloarcula hispanica* and comparative proteomic and transcriptomic analysis of polyhydroxyalkanoate biosynthesis under genetic and environmental perturbations, *J Proteome Res*, 12(3): 1300-1315
- Mai M., Hoyer J.D., McClure R.F., 2004, Use of multiple displacement amplification to amplify genomic DNA before sequencing of the α and β haemoglobin genes, *J Clin Pathol*, 57(6): 637-640
- Martínez V., Peña F., García-Hidalgo J., Mata I., García J., and Prieto M.R., 2012, Identification and Biochemical Evidence of a Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Depolymerase in the *Bdellovibrio bacteriovorus* Predatory Hydrolytic Arsenal, *Appl. Environ Microbiol.*, 78(17): 6017-6026
- Poirier Y., Nawrath C., and Somerville C., 1995, Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants, *BioTechnology*, 13: 142-150
- Poli A., Donato P.D., Abbamondi G.R., and Nicolaus B., 2011, Synthesis, Production, and Biotechnological Applications of Exopolysaccharides and Polyhydroxyalkanoates by Archaea, *Archaea*, Article ID 693253
- Ruth K., Grubelnik A., Hartmann R., Egli T., Zinn M., and Ren Q., 2007, Efficient production of (R)-3-hydroxycarboxylic acids by biotechnological conversion of polyhydroxyalkanoates and their purification, *Biomacromolecules*, 8: 279-286
- Shuping Wu, Yumin Du, Yunzi Hu, Xiaowen Sh., and Lina Z., 2013, Antioxidant and antimicrobial activity of xylan-chitooligomer-zinc complex, *Food Chemistry*, 138(2-3): 1312-1319
- Tanamool V., Imai T., Danvirutai P., and Kaewkannetra P., 2013, Biopolymer generation from sweet sorghum juice: screening, isolation, identification, and fermentative polyhydroxyalkanoate production by *Bacillus aryabhatai*, *Turk J Biol*, 37: 259-264
- Watcharakul S., Umsakul K., Hodgson B., Chumeka W., Tanrattanakul V., 2012, Biodegradation of a blended starch/natural rubber foam biopolymer and rubber gloves by *Streptomyces coelicolor* CH13, *Electron J Biotechnol.*, 15: 1-8