

文章编号:1009-038X(2004)05-0001-05

钝齿棒杆菌产精氨酸代谢途径中 $argB$ 基因的扩增及其序列分析

陈雪岚¹, 陶文沂^{1*}, 王正祥², 许正宏¹

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学 工业微生物研究中心, 江苏 无锡 214036)

摘要:根据 GenBank 报道的谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 序列,设计并合成一对引物,获得了全长 $argB$ 基因片段. 将其克隆到 pGEM-T-Easy 载体中,经测序鉴定后,以其为 DIG 标记探针,通过 Southern Blot 分析钝齿棒杆菌 A. S1. 542 与谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032, $argB$ 基因核苷酸同源性高达 99%,氨基酸序列 95% 相同.

关键词:谷氨酸棒杆菌;钝齿棒杆菌; $argB$ 基因;克隆;探针

中图分类号:Q 78

文献标识码:A

Amplification and Sequence Analysis of the $argB$ Gene from *Corynebacterium crenatum* A. S1. 542

CHEN Xue-lan¹, TAO Wen-yi^{1*}, WANG Zheng-xiang², XU Zheng-hong¹

(1. Key Laboratory of Industry Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. The Research Central of Industry Microbiology, Southern Yangze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The $argB$ sequence was obtained by the designing and synthesizing a pair of primer, based on the report of GenBank about the sequence of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. The $argB$ gene was cloned into plasmid pGEM-T-Easy. The recombinant strain harboring the pGEM- $argB$ plasmid was verified by PCR reaction, plasmid extraction with alkaline method, digestion with restriction endonuclease BamHI and EcoRI, and DNA sequencing. The result of Southern blot indicated that the homology of $argB$ between *C. crenatum* A. S1. 542 and *C. glutamicum* ATCC13032 was more than 90% by the DIG- $argB$ probe to screen the genomic libraries. The nucleotide sequence and the predicted amino acid sequence of $argB$ from *C. crenatum* were 99% and 100% identical with those of the $argB$ from *C. glutamicum*.

Key words: *Corynebacterium glutamicum*; *C. crenatum*; $argB$ gene; probe

L-精氨酸(L-Arginine,简称 L-Arg)是一种非必需氨基酸,是生物体尿素循环中一种重要的中间

收稿日期 2003-09-26; 修回日期 2004-05-31.

基金项目 江苏省“十五”攻关项目(编号:BE20011041)资助课题.

作者简介:陈雪岚(1970-),女,江西南昌人,生物工程博士研究生;*通讯作者.

代谢产物,具有多种独特的生理和药理作用。在正常情况下,机体能自身合成 L-Arg,但在饥饿、损伤、疾病、应急状态及生长阶段时,机体对 L-Arg 的需求超过了自身合成的能力,因此及时补充外源性 L-Arg 有利于提高机体的免疫能力。此外,研究发现, L-Arg 对氨中毒性肝昏迷及病毒性肝炎有显著疗效。随着 L-Arg-NO(一氧化氮)途径在临床上研究的不断深入,发现 L-Arg 还具有抗动脉粥样硬化、防治高血压及心力衰竭等作用^[1-3]。传统生产 L-Arg 的高产菌株大多采用诱变筛选的方法获得,但此法盲目性高、工作量大,且存在突变株生理失调、易退化等局限性。DNA 重组技术出现以后,人们开始探索利用 DNA 重组技术调控 L-Arg 合成代谢途径,以达到提高 L-Arg 产量的目的。

L-Arg 的生物合成是通过细胞内的代谢网络进行的,该代谢网络由众多的酶催化相互关联的一系列化学反应以及特异性的膜转移系统所构成。目前研究 L-Arg 生产的主要工程菌为棒杆菌,1996 年 Sakanyan 等^[4]报道谷氨酸棒杆菌 ATCC13032(*Corynebacterium glutamicum*)被 Arg 抑制的关键酶是 *argB* 基因编码的乙酰谷氨酸激酶,此酶不仅被 Arg 反馈抑制亦被其反馈阻遏,而且是 Arg 生产过程中被精氨酸抑制的惟一限速酶。本研究通过 PCR 扩增获得了 *C. glutamicum* 菌株的 *argB* 基因全长,并以此基因作为探针,通过 Southern Blot 分析本实验室保存菌株——钝齿棒杆菌 A1.542(*Corynebacterium crenatum*)与 *C. glutamicum argB* 基因的同源性,从而为研究未见报道的 *C. crenatum* 产精氨酸的 *argB* 串联基因序列奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 限制性核酸内切酶 BamHI、Hind III 和 EcoRI, T_4 DNA 连接酶等工具酶:购自大连宝生物有限公司; ρ fu DNA 聚合酶:购自上海生物工程科学技术公司;溶菌酶:购自 Sigma 公司; WizardTM Plus Minipreps DNA purification Systems:购自 Promega 公司; DIG-labeling Kit:购自 Promega 公司,引物由上海生物工程科学技术公司合成。

1.1.2 实验用菌株及质粒来源 *C. glutamicum* 菌株:购自北京菌种保藏中心; ρ GEM-T-Easy 载体:购自 Promega 公司;大肠杆菌 JM109:本实验室保存菌株。

1.2 方法

1.2.1 谷氨酸棒杆菌及钝齿棒杆菌的培养 将两种菌分别接种至牛肉汁液体培养基中,30 °C, 150 r/min 恒温培养 48 h。

1.2.2 谷氨酸棒杆菌及 *C. crenatum* 基因组 DNA 的提取 采用溶菌酶和蛋白酶 K 结合的方法提取基因组 DNA;质量分数 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 完整性,紫外法测定其含量。

1.2.3 引物设计、PCR 及其产物的回收 根据 GenBank 中 *C. glutamicum* ATCC 13032 *argB* 基因全序列,通过 Oligo6.0 引物设计软件获得了一对引物。在上下游引物 5' 端分别加入 EcoR I, Bam HI 酶切位点及保护性碱基。引物序列如下:上游引物 5' TTAGGATCCGATTTAGGCTCTGAGGTGCG 3' (下划线处为 EcoR I 酶切位点),下游引物为 5' GGCGAATTCGGTCTCATTACAGTCCCC3' (下划线处为 Bam HI 酶切位点)。

PCR 反应体系为:10 × Pfu Buffer(2.5 μ L), dNTP(10 mmol/L each, 2 μ L),上游引物(25 μ mol/L 0.5 μ L),下游引物(25 μ mol/L 0.5 μ L),模板 DNA(1 μ L),双蒸水(16.5 μ L),Pfu 酶(1 U/ μ L 0.5 μ L),Taq 酶(1 U/ μ L 0.5 μ L)。

根据引物设计软件 Oligo6.0 推荐 PCR 反应条件,经实验确定具体 PCR 程序如下:95 °C 预变性 3 min,95 °C 变性 1 min,61 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。扩增产物在质量分数 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳中检测。

PCR 产物的回收纯化按照回收试剂盒说明书进行操作。

1.2.4 *C. glutamicum argB* 基因的克隆、鉴定 将纯化的 PCR 产物与 pGEM-T-Easy 载体按 3:1 摩尔比通过 T_4 连接酶 16 °C 连接过夜。热激转化 DH 5 α 感受态细胞,蓝白斑筛选阳性克隆子。阳性克隆子通过菌落 PCR 以及酶切进行鉴定。通过鉴定的阳性克隆子送上海生物工程科学技术公司测序。

1.2.5 *C. crenatum* 基因组的酶切及 Southern Blot 分析 *C. crenatum* 基因组分别经 BamHI、EcoRI 及 Hind III 3 种限制性酶完全酶切,酶切体系按说明书进行。

分别取 4.8 μ g 酶切产物进行琼脂糖电泳,将凝胶在 5 kPa 真空条件下转膜 1 h,将尼龙膜取出,置 120 °C 干烤 30 min 以固定 DNA;处理好的尼龙膜放入 10 mL 离心管中,加入 8 mL 预杂交液,42 °C 预杂交 2 h,加入 2 μ L 经 100 °C 变性的 DIG 标记的 *C. glutamicum argB* 探针,42 °C 杂交过夜;杂交膜分别在室温以及 68 °C 洗膜数次,再加入 1 μ L

抗 DIG 的酶标抗体,室温孵育 30 min,杂交膜经显色液(内含 50 mg/mL BCIP,75 mg/mL NBT)显出所需条带,蒸馏水漂洗数次终止显色反应。

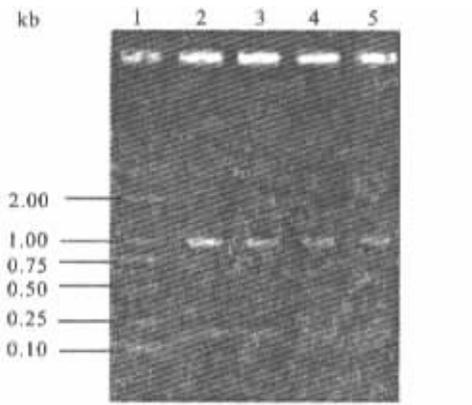
1.2.6 引物设计及 PCR 扩增 *C. crenatum* *argB* 序列 根据 *C. crenatum* 与 *C. glutamicum* 的高度同源性,参照 *C. glutamicum* 在 GenBank 上报道的 *argB* 序列,设计了一对特异引物.引物序列如下:上游引物为 5' GTTGGCTGCAGTCGGCATGGCTGATG 3',下游引物为 5' GTGACGGTTGCGCCCTTGCCG-GACA 3'.采用 PCR 扩增,PCR 体系及 PCR 反应与 *C. glutamicum* 的 *argB* 基因的扩增相同,仅退火温度降为 55 °C. PCR 扩增产物送上海生物工程科学技术公司测序。

1.2.7 序列分析 DNA 及其蛋白质序列分析采用 DNAMAN 4.0 软件。

2 结果

2.1 PCR 扩增 *argB* 基因

采用 Pfu + Taq DNA 聚合酶扩增 *C. glutamicum* *argB* 基因,结果见图 1.从图中可以看出,PCR 扩增产物的长度约为 1 kb,与预期的 *argB* 基因大小相符。



泳道 1. DL2000 DNA Marker,其它泳道为 PCR 产物

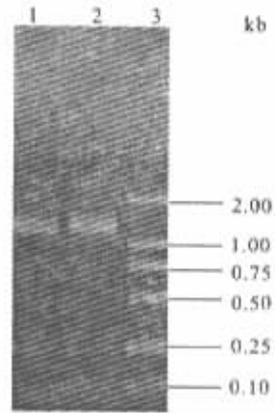
图 1 *C. glutamicum* *argB* 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 1 The result of PCR amplifying *argB* gene from *C. glutamicum*

2.2 克隆质粒的菌落 PCR 及酶切鉴定

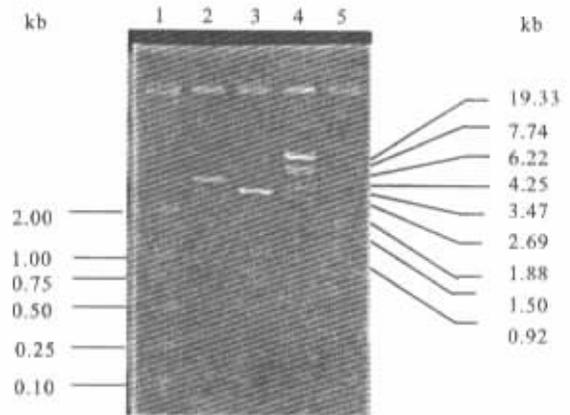
pGEM-T-*argB* 载体菌落 PCR 所用的引物为 pUC 系列载体的通用引物 B0014(5' AGCGGATA-ACAATTTACACACAGGA-3')和 B0012(5' CGC-CAGGTTTTCCAGTCACGAC-3'),这对引物在 pGEM-T 多克隆位点序列 277 bp 之外,因此扩增目的片段长度约为 1.3 kb,具体见图 2.同时提取质粒采用 EcoRI 和 BamHI 双酶切鉴定,从图 3 可见

长约为 1 kb 的 *argB* 基因片段。



泳道 3. DL2000 DNA Marker,其它泳道为 PCR 产物

图 2 *C. glutamicum* *argB* 基因的菌落 PCR 扩增结果
Fig. 2 The result of PCR amplifying *argB* gene from pGEM-T-*argB*



1. DL2000 DNA Marker; 2. pGEM-T-*argB* 质粒用 EcoRV 单酶切; 3. pGEM-T-*argB* 质粒 DNA 用 EcoRI 和 BamHI 双酶切; 4. *argB*; 5. λ /EcoT14I

图 3 pGEM-T-*argB* 质粒的酶切鉴定结果

Fig. 3 Analysis of the recombinant plasmid pGEM-T-*argB* with restriction enzymes

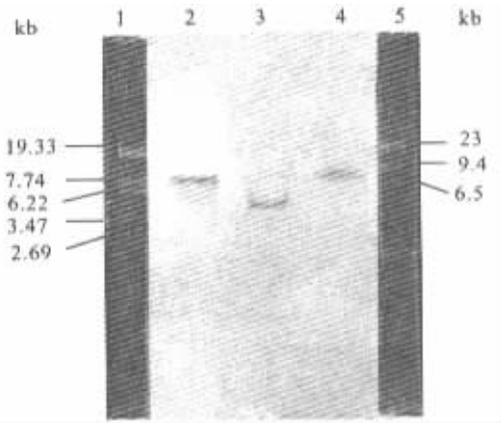
2.3 Southern Blot 分析

C. crenatum 基因组 DNA 分别用 BamHI、EcoRI 及 HindIII 3 种限制酶完全酶切后,以 *C. glutamicum* 的 *argB* 基因片段为探针进行 Southern Blot 分析(见图 4).图 4 显示分别约在 7.9,4.0,6.5 kb 处获得杂交条带。

2.4 PCR 扩增 *C. crenatum* 的 *argB* 基因

PCR 扩增 *C. crenatum* 的 *argB* 基因,结果见图 5.根据 *C. glutamicum* 的 *argB* 基因保守序列设计的引物扩增 *C. crenatum* 的相关产物,其长度与预期相符,约为 1.3 kb,进一步说明 *C. crenatum* 的 *argB* 基因与 *C. glutamicum* 的 *argB* 基因同源关系

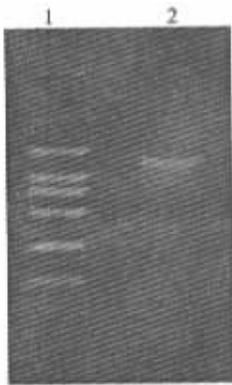
密切。



1. λ /EcoT141 2. BamHI 酶切 *C. crenatum* 基因组杂交条带 3. EcoRI 酶切 *C. crenatum* 基因组杂交条带 4. Hind III 酶切 *C. crenatum* 基因组杂交条带 5. λ /Hind III

图4 Southern Blot 分析

Fig. 4 Southern blot analyzes the homology of *argB* between *C. crenatum* and *C. glutamicum*



泳道 1. DL2000Marker 泳道 2. *argB* 基因

图5 PCR 扩增 *C. crenatum argB* 基因扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 5 PCR amplifying *argB* gene from *C. crenatum*

2.5 *C. crenatum* 的 *argB* 基因序列分析

测序结果分析显示,仅含有一个开放阅读框(ORF),此ORF的长度为954 bp,起始密码子为ATG,终止密码子为TAA.核酸序列编码为由318

参考文献:

- [1] 胡圣望,胡望平,胡松林.中脑导血管周围灰质微量注射N-硝基左旋精氨酸和硝普纳对大鼠血管的影响[J].解剖学研究,2002,24(1):43-45.
- [2] Li W, Jia G, Guo W, et al. Nitric oxide opens second window of protect in ischemic preconditioning via indication of heat-shock protein 72[J]. Chin Med J 2003, 116(2): 258-262.
- [3] Jaroszewski JJ, Skarzynski DJ, Blair RM, et al. Influence of nitric oxide on the secretory function of the bovine corpus luteum: dependence on cell composition and cell-to cell communication[J]. Exp Biol Med, 2003, 228(6): 741-748.
- [4] Vehary Sakanyan, Pavel Petrosyan, Michele Lecocq, et al. Genes and enzymes of the acetyl cycle of arginine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*: enzyme evolution in the early steps of the arginine pathway[J]. Microbiol, 1996, 142: 99-108.

个氨基酸组成的34.6 ku的蛋白酶——乙酰谷氨酸激酶.在此基因中稀有的甘氨酸密码子在28个甘氨酸密码子中有7个,占甘氨酸密码子的25%.核苷酸序列分析发现,在起始密码子上游-8 bp有一个典型的核糖体结合位点:AGG. BLAST比较结果显示 *C. crenatum* 的 *argB* 基因编码的乙酰谷氨酸激酶多肽序列与 *C. glutamicum* 的序列同源性高达95%. *C. crenatum* 的 *argB* 基因上游与 *C. glutamicum* 相比,第-2, -19, -35位碱基分别由A取代G, G取代A及C取代G. *C. crenatum* 的 *argB* 基因序列及其推导的氨基酸序列见图6.

3 讨论

由于Taq酶在扩增过程中具有一定的错配率,为了能够有效地保证扩增产物中 *ArgB* 基因的真实性,本实验PCR反应体系中,采用了2种DNA聚合(Pfu + Taq)进行扩增.其中Pfu DNA聚合酶具有3~5'的校正功能,能降低扩增过程中的错配率,但此酶的扩增量较低,而Taq DNA聚合酶虽不具备校正功能,但其扩增量高,与Pfu共同使用可以弥补Pfu DNA聚合酶扩增量不高的缺陷.同时Taq酶在反应过程中能在扩增片段3'端自动加上一个碱基A,这为构建pGEM-T-*argB*载体提供了方便.

原核细胞每套基因都是单拷贝,根据标记探针的检测极限及对 *C. crenatum* 基因组大小的估计(约 3×10^7 bp),基因组DNA上样量至少需0.8 μ g.本实验上样量均为4.8 μ g,分别约在7.9, 4.0, 6.5 kb处获得清晰的杂交条带,这说明 *C. crenatum* A. S1. 542与 *C. glutamicum* ATCC13032二者的 *argB* 基因存在高度同源性.据此设计了一对特异引物,扩增了包含 *argB* ORF在内的长1332 bp的序列,该序列已提交GenBank登记,序列号为AY509864. *C. crenatum* A. S1. 542的 *argB* 基因序列的测通,为我们进一步了解 *C. crenatum* 精氨酸生物合成途径的串联基因 *argCJBDF* 奠定了基础.

GTTGGCTGCAGTCGGCATGGCTGATGCTGATATGGAACCAGAGAAG	46
ATTTCTGTGTTCTTCAATGATAAAGCTGTATGCCTTGATTCCACTGGTGCCCTGGTGCT	106
CGTGAGGTGGATCTTTCCGGCGCTGACATTGATGTCCGAATTGATTTGGGCACCAGTGGG	166
GAAGGCCAGGCAACAGTTTCGAACCACTGACCTGAGCTTCTCCTACGTGGAGATCAACTCC	226
RBS	
CGGTACAGCACTTAAAAAGAAACAACACTCCAACCTAACGAGCAGGGAAAA <u>AGGG</u> CACAGCC	286
└─ <i>argB</i>	
ATGAATGACTTGATCAAAGATTTAGGCTCTGAGGTGCGCGCAAATGTCCTCGCTGAGGCG	346
M N D L I K D L G S E V R A N V L A E A	
TTGCCATGGTTGCAGCACTTCCGTGACAAGATTGTTGTCGTGAAATATGGCGGAAACGCC	406
L P W L Q H F R D K I V V V K Y G G N A	
ATGGTGGATGATGATCTCAAGGCTGCTTTTGTGCCGACATGGTCTTCTTGGCGACCCTG	466
M V D D D L K A A F A A D M V F L R T V	
GGCGCAAAACCAGTGGTGGTGCACGGTGGTGGACCTCAGATTTCTGAGATGCTAAACCGT	526
G A K P V V V H G G G P Q I S E M L N R	
GTGGGTCTCCAGGGCGAGTTCAAGGGTGGTTTCCGTGTGACCACTCCTGAGGTGATGGAC	586
V G L Q G E F K G G F R V T T P E V M D	
ATTGTGCGCATGGTCTCTTTGGTCAGGTCGGTCCGATTTAGTTGGTTTGATCAACTCT	646
I V R M V L F G Q V G R D L V G L I N S	
CATGGCCCTTACGCTGTGGGAACCTCCGGTGTGAGGATGCCGGCCTGTTACCGCGCAGAAG	706
H G P Y A V G T S G E D A G L F T A Q K	
CGCATGGTCAACATCGATGGCGTACCACTGATATTGGTTTGGTTCGGAGACATCATTAAT	766
R M V N I D G V P T D I G L V G D I I N	
GTCGATGCCTCTCCTTGATGGATATCATCGAGGCCGGTTCGCATTCTCTGTGGTCTCTACG	826
V D A S S L M D I I E A G R I P V V S T	
ATTGCTCCAGGCGAAGACGGCCAGATTTACAACATTAACGCCGATACCGCAGCAGGTGCT	886
I A P G E D G Q I Y N I N A D T A A G A	
TTGGCTGCAGCGATTGGTGCAGAACGCCTGCTGGTTCTACCAATGTGGAAGGTCTGTAC	946
L A A A I G A E R L L V L T N V E G L Y	
ACCGATTGGCCTGATAAGAGCTCACTGGTGTCCAAGATCAAGGCCACCGAGCTGGAGGCC	1006
T D W P D K S S L V S K I K A T E L E A	
ATTCTTCCGGGACTTGATTCCGGCATGATTCCAAAGATGGAGTCTTGCTTGAACGCGGTG	1066
I L P G L D S G M I P K M E S C L N A V	
CGTGGGGGAGTAAAGTCTGCTCATGTCAATTGACGGCCGCATCGCGCACTCGGTGTTGCTG	1126
R G G V S A A H V I D G R I A H S V L L	
GAGCTTTTGACCATGGGTGGAATTGGCACGATGGTGTGCCGATGTTTTTGATCGGGAG	1186
E L L T M G G I G T M V L P D V F D R E	
AATTATCCTGAAGCACCGTTTTTGA AAAAGACGACAAGGATGGGGAACTGTAAATGAGC	1246
N Y P E G T V F R K D D K D G E L.	
ACGCTGGAAACTTGGCCACAGGTCATTATTAATACGTACGGCACCCACCAGTTGAGCTG	1306
GTGTCGGCAAGGGCGCAACCGTCAC	1332

图6 *C. crenatum* 的 *argB* 基因序列及氨基酸序列

Fig. 6 Nucleotide sequence of the 1.38 kb DNA region of *C. crenatum* A. S1.542 with the predicated amino acid sequence encoded by the *argB* gene. The potential ribosome-binding site (RBS) is showed by underline

(责任编辑 杨勇)