

假单胞菌中聚羟基脂肪酸酯合成酶基因的克隆与分析

丘远征, 张 广, 季星来, 陈国强
(清华大学 生物科学与技术系 北京 100084)

摘 要:大多数二型聚羟基脂肪酸酯(Polyhydroxyalkanoates, PHA)合成酶(PhaC)发现于假单胞菌中,其基因组成形式为两个 PhaC 基因中间有一个 PHA 降解酶 PhaZ 基因.根据已知的假单胞菌 PHA 合成酶基因区域的特殊结构,设计了采用 PCR 方法从假单胞菌中克隆 PHA 合成酶基因的克隆方案,并成功地对一株硝基还原假单胞菌(*Pseudomonas nitroreducens*)和一株石竹伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia caryophylli*)中的 PHA 合成酶基因进行了克隆.将克隆得到的 *phaC1*, *phaZ* 和 *phaC2* 3 个基因所编码的氨基酸序列与其他 6 株已知 PHA 合成酶基因的假单胞菌的相应序列进行比较,发现这 3 个蛋白质在假单胞菌中的相似性很高,由 *phaC1*, *phaZ* 和 *phaC2* 3 个基因所组成的基因区域在假单胞菌中非常保守.从对 PhaC1, PhaZ 和 PhaC2 的系统进化树分析可以发现,这 3 个蛋白质与整个 PHA 合成酶基因区域的系统进化树有着一致的结构.这表明假单胞菌中的 PHA 合成酶基因区域可能起源于共同的祖先,而其形成可能经历了一次 PHA 合成酶基因加倍的过程.

关键词:聚羟基脂肪酸酯 PHA;假单胞菌;系统进化树

中图分类号:Q 754

文献标识码:A

Cloning and Analysis of Genes Encoding Polyhydroxyalkanoate Synthases

QIU Yuan-zheng, ZHANG Guang, JI Xing-lai, CHEN Guo-qiang

(Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Most type II polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases (PhaC) were found in *Pseudomonas* strains, and their genes are co-localized with PHA depolymerase (PhaZ) genes. Recently, two similar PHA biosynthesis gene clusters were cloned and analyzed from *Pseudomonas nitroreducens* and *Burkholderia caryophylli* in our lab. The deduced amino acid sequences of the three genes (*phaC1*, *phaZ* and *phaC2*) in the clusters were compared with those from six other *Pseudomonas* strains (*Pseudomonas* sp. 61-3, *P. aeruginosa*, *P. aureofaciens*, *P. oleovorans*, *P. putida* and *P. resinovorans*) containing the homologous *pha* clusters. The results showed that the three proteins PhaC1, PhaZ and PhaC2 shared high similarity. The *pha* clusters were conserved in the eight strains. The phylogenetic trees for PhaC1, PhaZ and PhaC2 of the eight strains were compared and same topology as that of the whole *pha* clusters (*phaC1-phaZ-phaC2* DNA sequence) from the eight strains was found. This result implied that the *pha* cluster in *Pseudomonas* spp. may arise from same ancestor. An ancient duplication event of PHA synthase genes to form the *pha* cluster may happen earlier than *Pseudomonas* strains. A hypothetical evolution history was proposed based on the

收稿日期 2002-06-10; 修订日期 2002-08-28.

基金项目 国家自然科学基金(30170017)和清华大学 985 基金资助课题.

作者简介 丘远征(1976-),男,广东梅州人,生化与分子生物学博士研究生.

analysis.

Key words : polyhydroxyalkanoates ; *Pseudomonas* ; phylogenetic tree

聚羟基脂肪酸酯 (Polyhydroxyalkanoates , PHA) 是一种细菌合成的生物可降解聚酯^[1]. PHA 在体内形成不溶的包涵体 , 起到贮存物的作用. 到现在为止已经有超过 120 种不同的 PHA 单体被发现^[2-3]. 细菌合成的分子基础在最近的综述中已详细地探讨过^[2-4], 其中 PHA 生物合成基因的组成方式在不同的细菌中有所不同, 而根据 PHA 合成酶的性质和相关基因的组织方式, 可以将 PHA 合成基因区域分为 3 大类^[4]. 一型 *pha* 区域包含有具有短链羟基脂肪酸单体 (short chain length (scl) hydroxyalkanoate (HA)-CoA) 专一性的 PHA 合成酶组成, 而三型 *pha* 区域包含有两个 PHA 合成酶亚基基因, *phaE* 和 *phaC* 这两个基因在 *pha* 区域中排列在一起, 其底物专一性与一型 PHA 合成酶是一致的. 二型 *pha* 区域一般发现于中长链 (medium chain length , mcl) PHA 合成菌中, 主要是假单胞菌 (*Pseudomonas*) 和最近从假单胞菌中分出来的伯克霍尔德氏菌中, 由两个类似的 PHA 合成酶基因和它们中间的 PHA 降解酶基因组成.

现在已经有超过 53 种不同的 PHA 合成酶被克隆和鉴定^[5-6], 使用了 8 种不同的克隆方案^[4]. 对 36 种 PHA 合成酶的氨基酸序列的比较发现, 其相似性为 14.3% ~ 87.3%^[6]. 其中, 有 6 个完整的二型 *pha* 基因区域被克隆出来, 其组成方式为 *phaC1*-*phaZ*-*phaC2*, 这 6 种菌为 *Pseudomonas* sp. 61-3^[7], 铜绿假单胞菌 *P. aeruginosa*^[8], 致金假单胞菌 *P. aureofaciens*^[9], 食油假单胞菌 *P. oleovorans*^[10], 恶臭假单胞菌 *P. putida*^[11] 和食树脂假单胞菌 *P. resinovorans*^[12]. 它们之间的相似性很高, 大约为 79.2% ~ 91.9% (*PhaC1* 之间), 73.2% ~ 85.9% (*PhaC2* 之间) 以及 53.2% ~ 58.6% (*PhaC1* 与 *PhaC2* 比较). 最近根据二型 *pha* 区域的保守区域设计了一种新的 PCR 克隆方案^[13,14]. 研究表明 PHA 的合成在假单胞菌中是一种很普遍的现象^[15], 所以该 PCR 克隆方案被应用于假单胞菌和伯克霍尔德氏菌中以克隆出其 PHA 合成酶基因, 并对它们的 PHA 合成酶的同源关系进行了分析.

1 材料与方法

1.1 菌种与培养条件

硝基还原假单胞菌 *P. nitroreducens* 0802 和

石竹伯克霍尔德氏菌 *B. caryophylli* YS13 由中国科学院微生物研究所鉴定, 在 LB 培养基、30 ℃ 条件下摇床培养 18 h.

1.2 二型 PHA 合成酶基因的克隆

将培养的细菌离心收集破壁后用 RNA 酶处理, 并用酚仿抽提的方法提取基因组 DNA. 具体的克隆条件与步骤参照文献^[13,14]. 测序方法使用四色荧光末端测序法 (Big Dye Terminator Sequencing Kit , Perkin Elmer , USA).

1.3 系统进化分析

相关序列及其 GenBank 登录号见表 1. 氨基酸序列的同源分析采用的方法为 BLAST^[16], 遗传距离的计算采用的是 K_{nuc} 值^[17]. 系统进化树分析采用 neighbor-joining 方法^[18], 使用的软件为 PHYLIP 程序包.

表 1 所用到的 PHA 合成酶基因区域的 GenBank 登录号
Tab.1 GenBank accession numbers of the PHA biosynthesis gene clusters

菌种	简称	登录号
假单胞菌 61-3	<i>Psp</i>	AB014758
铜绿假单胞菌	<i>Pae</i>	X66592
致金假单胞菌	<i>Pau</i>	AB049413
恶臭假单胞菌	<i>Ppu</i>	AF150670
食树脂假单胞菌	<i>Pre</i>	AF129396
食油假单胞菌	<i>Pol</i>	M58445
硝基还原假单胞菌	<i>Pni</i>	AF336849
石竹伯克霍尔德氏菌	<i>Bca</i>	AF394660

2 结果与分析

利用对二型 *pha* 区域建立的 PCR 克隆方案成功地克隆出硝基还原假单胞菌 0802 和石竹伯克霍尔德氏菌 YS13 中的 PHA 合成酶基因. PCR 扩增出的 DNA 片段中包括了 3 个编码框, 即 *phaC1*, *phaZ* 和 *phaC2*, 分别编码 PHA 合成酶 1 (*PhaC1*), PHA 降解酶 (*PhaZ*) 和 PHA 合成酶 2 (*PhaC2*), 见图 1. 实验结果表明, 这种以基因组为模板的降落 PCR 克隆方案可以成功地运用到假单胞菌和伯克霍尔德氏菌中, 从中克隆出 PHA 合成酶基因. 比较而言, 这种克隆方案简单准确, 适合于大多数假单

胞菌.

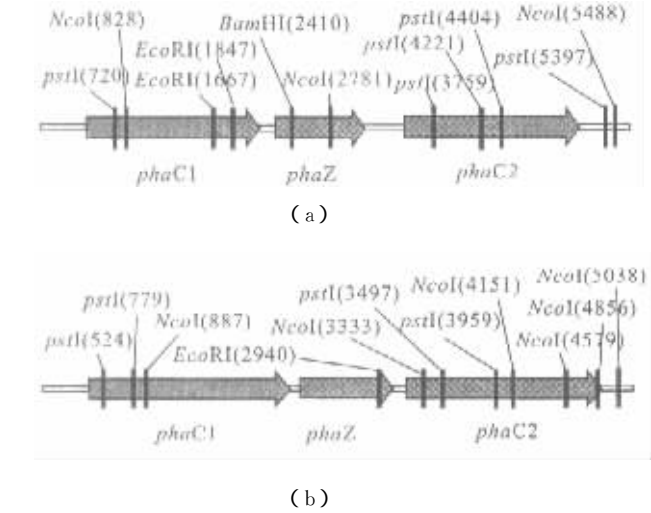


图 1 硝基还原假单胞菌 0802 (a) 和石竹伯克霍尔德氏菌 YSB 中的 PHA 合成酶基因区域

Fig. 1 *pha* locus of *p. nitroreducens* 0802 and *B. caryophylli* YS

类似的 *phaC1*-*phaZ*-*phaC2* PHA 合成基因区域出现在许多能够合成中长链 PHA 的假单胞菌中. 将克隆出的相应基因所编码的氨基酸序列与已经克隆的假单胞菌中的相应序列进行比较, 可以发现这个区域中 3 个蛋白质的同源性是非常高的(见表 2). 其中, PHA 合成酶 1 的同源性 (Identities $\geq$ 74%, Positives $\geq$ 83%) 和 PHA 合成酶 2 的同源性 (Identities $\geq$ 67%, Positives $\geq$ 79%) (表 2a) 相对来说比同一菌种之中两个 PHA 合成酶的同源性 (Identities $\geq$ 53%, Positives $\geq$ 68%) (表 2b) 要高. 而一个菌种中 PHA 合成酶 1 与另一菌种中 PHA 合成酶 2 的同源性 与同一菌种两个合成酶的同源性基本一致 (Identities $\geq$ 52%, Positives $\geq$ 67%). 这种高相似性以及二型 PHA 合成酶在假单胞菌中的广泛分布, 表明在假单胞菌中所有的 PHA 合成酶均具有相同的祖先.

根据 PHA 合成酶之间的相似性, 对 17 个 PHA 合成酶进行了系统进化树的分析 (包括 8 个 PHA 合成酶 1, 8 个 PHA 合成酶 2, 以及罗氏真养菌 *Ralstonia eutropha* 中的 PHA 合成酶) (图 2a). 从图中可以看到, PHA 合成酶 1 可以很清楚地与 PHA 合成酶 2 分开而单成一簇, 这与前面的同源性分析的结果是一致的, 而且与这两个基因在细菌基因组中位置的隔离相对应. 这一结果与以前的报导相符^[6]. 从进化树中还可以看到, *PhaC1* 和 *PhaC2* 的拓扑结构基本一致 (图 2a). 这一现象, 连同 *PhaC1* 和 *PhaC2* 之间具有很高的相似性, 可以认为在二型 PHA 合成酶基因进化过程中, 可能发生了

一次 PHA 合成酶基因的加倍事件, 使得在一个 PHA 合成酶基因加倍变成了两个 PHA 合成酶基因, 并与 PHA 降解酶基因一起形成了二型 *pha* 区域. 由于假单胞菌中二型 *pha* 区域的普遍存在, 所以这一加倍事件可能发生在进入假单胞菌之前, 这才使得二型 *pha* 区域在假单胞菌中有着相似的结构.

表 2 对二型 PHA 合成酶的 BlastP 分析
Tab. 2 BlastP analysis of type II PHA synthases
a. 克隆得到的 PHA 合成酶与已知的二型 PHA 合成酶的比较
Analysis of the cloned PHA synthases with the known type II PHA synthases

序 列		匹配度/%	
查询	目标	相同性	相似性
<i>PhaC1/Pni</i>	<i>PhaC1/Pae</i>	82	91
	<i>PhaC1/Pau</i>	83	90
	<i>PhaC1/Pol</i>	81	90
	<i>PhaC1/Ppu</i>	80	89
	<i>PhaC1/Pre</i>	84	91
	<i>PhaC1/Psp</i>	80	89
<i>PhaC1/Bca</i>	<i>PhaC1/Pae</i>	74	83
	<i>PhaC1/Pau</i>	83	89
	<i>PhaC1/Pol</i>	84	89
	<i>PhaC1/Ppu</i>	82	88
	<i>PhaC1/Pre</i>	79	86
	<i>PhaC1/Psp</i>	82	89
<i>PhaC2/Pni</i>	<i>PhaC2/Pae</i>	72	82
	<i>PhaC2/Pau</i>	75	86
	<i>PhaC2/Pol</i>	68	80
	<i>PhaC2/Ppu</i>	67	79
	<i>PhaC2/Pre</i>	78	87
	<i>PhaC2/Psp</i>	74	86
<i>PhaC2/Bca</i>	<i>PhaC2/Pae</i>	67	80
	<i>PhaC2/Pau</i>	76	86
	<i>PhaC2/Pol</i>	78	85
	<i>PhaC2/Ppu</i>	77	85
	<i>PhaC2/Pre</i>	73	84
	<i>PhaC2/Psp</i>	75	86

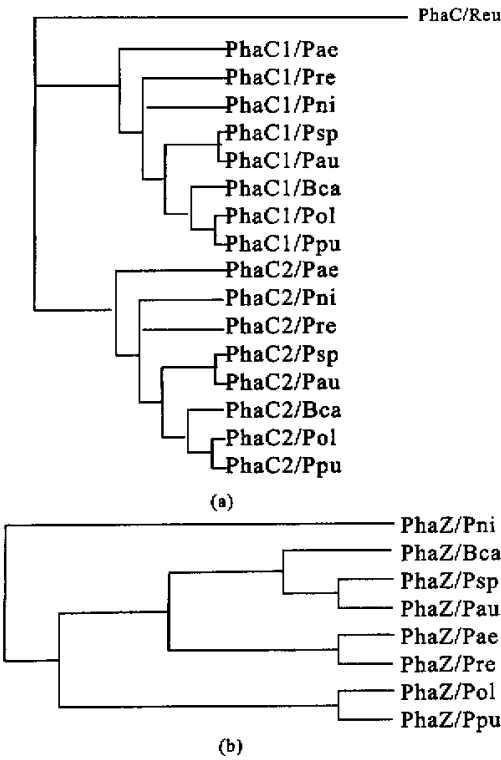
b. 同一菌种中两个 PHA 合成酶的比较

Analysis of the two PHA synthases from the same pha clusters

序 列		匹配度/%	
查询	目标	相同性	相似性
PhaC1/ <i>Pae</i>	PhaC2/ <i>Pae</i>	58	74
PhaC1/ <i>Pau</i>	PhaC2/ <i>Pau</i>	55	71
PhaC1/ <i>Pol</i>	PhaC2/ <i>Pol</i>	55	72
PhaC1/ <i>Ppu</i>	PhaC2/ <i>Ppu</i>	53	69
PhaC1/ <i>Pre</i>	PhaC2/ <i>Pre</i>	61	75
PhaC1/ <i>Psp</i>	PhaC2/ <i>Psp</i>	53	70
PhaC1/ <i>Pni</i>	PhaC2/ <i>Pni</i>	59	74
PhaC1/ <i>Bca</i>	PhaC2/ <i>Bca</i>	53	68

PhaC1 : PHA 合成酶 1 ; PhaC2 : PHA 合成酶 2 .

同样地 ,可以认为在三型 *pha* 区域的形成中发生了一个 PHA 合成酶基因演变为两个具有互补功能的不同基因(即 PhaC 和 PhaE)的事件. 由此可以认为 PHA 合成酶基因的进化历史具有图 3 的方式 ,即一型 PHA 合成酶基因是由共同祖先直接进化而来的 ,二型 PHA 合成酶基因是由共同祖先发生了加倍的事件形成的 ,而三型 PHA 合成酶基因是由共同祖先发生不对等加倍或者分裂而形成的.



注: 标尺表示 0.1 的遗传距离.

万方数据

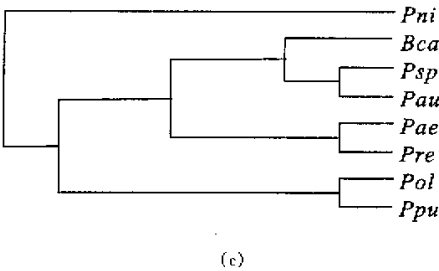


图 2 基于 neighbor - joining 方法的二型 PHA 合成酶 (a)、PHA 降解酶(b)、*phaC1-phaZ-phaC2* DNA 完整序列(c)的系统进化树分析.(c)中的 DNA 序列从 *phaC1* 的起始密码子开始 ,到 *phaC2* 的终止密码子结束

Fig.2 Phylogenetic tree of type II PHA synthases(a) , PHA depolymerases(b) and *phaC1-phaZ-phaC2* DNA sequences(c) from type II *pha* gene clusters by neighbor-joining method. The DNA sequences of (c) were analyzed from the start codons of *phaC1* to the stop codons of *phaC2*. The bootstrap values were significant enough (most ≥ 75) to ensure that the phylogenetic trees are robust. The root was PHA synthase of *Ralstonia eutropha*

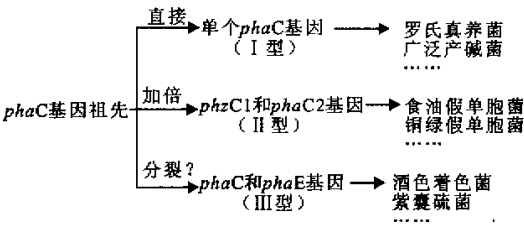


图 3 假设的 PHA 合成酶基因进化途径

Fig.3 Hypothetic evolution pathways for PHA synthase genes

在分析中发现在假单胞菌中 PHA 降解酶 (PhaZ) 也具有非常高的相似性 (Identities $\geq 52\%$, Positives $\geq 67\%$). 而对 PhaZ 以及完整 *phaC1-phaZ-phaC2* DNA 序列的系统进化分析发现 ,它们的拓扑结构是一致的 (图 2b 和 2c) ,而与其其中 PHA 合成酶的进化树比较 (PhaC1 或者 PhaC2) ,也是非常相似的. 这表明在二型 *pha* 区域中 ,相连的 3 个基因 *phaC1-phaZ-phaC2* 经受了相同的进化压力并一起协同进化.

应该指出在 PhaC1 和 PhaC2 的系统进化树拓扑结构中有一些不同 ,即硝基还原假单胞菌和食树脂假单胞菌的 PhaC1 和 PhaC2 位于进化树的不同位置 (图 2a). 这一差异可能是由于 PhaC1 和 PhaC2 功能上的区别而在进化上的体现. 研究表明 ,当将

食油假单胞菌的 *phaC1* 和 *phaC2* 基因分别表达在恶臭假单胞菌的 PHA 合成缺失突变株中时,发现 *PhaC2* 对 3-羟基己酸单体具有更高的亲和性^[19]。这两个酶在体内的功能可能会有所互补,这就可能使得它们在进化上略有变化。

3 结 论

利用二型 PHA 合成酶基因区域的保守区域设

计了 PCR 克隆方案,从一株假单胞菌和一株伯克霍尔德氏菌中克隆出完整的 PHA 合成酶基因区域,并与已知的假单胞菌 PHA 合成酶基因区域进行了比较。二型 PHA 合成酶基因区域中的 PHA 合成酶 1、PHA 降解酶和 PHA 合成酶 2 在假单胞菌中均很保守,并在进化过程中可能经历了 PHA 合成酶基因加倍的过程。根据系统进化树分析发现,区域中的 3 个基因经历了类似的进化过程。

参考文献:

- [1] ANDERSON A J, DAWES E A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates[J]. **Microbiol Rev**, 1990, 54 :450 – 472.
- [2] SUDESH K, ABE H, DOI Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters[J]. **Prog Polym Sci**, 2000, 25 :1504 – 1555.
- [3] CHEN G Q, WU Q, ZHAO K, *et al.* Functional polyhydroxyalkanoates synthesized by microorganisms[J]. **Chinese J Polym Sci**, 2000, 18 :389 – 396.
- [4] REHM B H A, STEINBUCHER A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis[J]. **Intl J Biol Macromol**, 1999, 25 :3 – 19.
- [5] ZINN M, WITHOLT B, EGLI T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoates[J]. **Adv Drug Delivery Rev**, 2001, 53 :5 – 21.
- [6] STEINBUCHER A, HEIN S. Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganism[J]. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, 2001, 71 :81 – 123.
- [7] MATSUSAKI H, MANJI S, TAGUCHI K, *et al.* Cloning and molecular analysis of the Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas sp.* strain 61-3[J]. **J Bacteriol**, 1998, 180 :6459 – 6467.
- [8] TIMM A, STEINBUCHER A. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAOI[J]. **Eur J Biochem**, 1992, 209 :15 – 30.
- [9] NISHIKAWA T, OGAWA K, KOHDA R, *et al.* Cloning and molecular analysis of poly(3-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas aureofaciens*[J]. **Curr Microbiol**, 2002, 44 :132 – 135.
- [10] HUISMAN G W, WONINK E, MEIMA R, *et al.* Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans*[J]. **J Biol Chem**, 1991, 266 :2191 – 2198.
- [11] GARCIA B, OLIVERA E R, MINAMBRES B, *et al.* Novel biodegradable aromatic plastics from a bacterial source: Genetic and biochemical studies on a route of the phenylacetyl-CoA catabolor[J]. **J Biol Chem**, 1999, 274 :29228 – 29241.
- [12] SOLAIMAN D K Y. PCR cloning of *Pseudomonas resinovorans* polyhydroxyalkanoates biosynthesis genes and expression in *Escherichia coli*[J]. **Biotechnol Lett**, 2000, 22 :789 – 794.
- [13] ZHANG G, HANG X, GREEN P, *et al.* PCR cloning of type II polyhydroxyalkanoates biosynthesis genes from two *Pseudomonas* strains[J]. **FEMS Microbiol Lett**, 2001, 198 :165 – 170.
- [14] HANG X, ZHANG G, WANG G, *et al.* PCR cloning of polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes from *Burkholderia caryophylli* and their functional expression in recombinant *Escherichia coli*[J]. **FEMS Microbiol Lett**, 2002, 210 :49 – 54.
- [15] HUISMAN G W, LEEUW O, EGGINK G, *et al.* Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseduomonads[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1989, 55 :1949 – 1954.
- [16] GALPERIN M Y, KOONIN E V. Who's your neighbor? New computational approaches for functional genomics[J]. **Nature Biotechnol**, 2000, 18 :609 – 613.
- [17] KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. **J Mol Evo**, 1980, 16 :111 – 120.
- [18] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree[J]. **Mol Biol Evol**, 1987, 4 :406 – 425.
- [19] HUISMAN G W, WONINK E, KOING G J M, *et al.* Synthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) by mutant and recombinant *Pseudomonas* strains[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1992, 38 :1 – 5.