

野生型与突变型钝齿棒杆菌生物合成精氨酸基因簇 *arg* JBDFR 的生物信息学比较

陈雪岚¹, 熊勇华², 陶文沂³, 王正祥³, 许正宏³

(1. 江西师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330002

2. 南昌大学中德联合研究院, 江西 南昌 330047; 3. 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 本文设计四对特异性引物分别扩增了野生型和突变型钝齿棒杆菌精氨酸生物合成基因簇 *arg* JBDFR, 对其中发生突变的基因 *argJ*、*argB* 及 *argF* 的变化进行了生物信息学比较, 并分析了这些突变可能对精氨酸产量提高的贡献, 为采用基因工程手段改良菌种提供有益的信息和指导。

关键词: 钝齿棒杆菌; 精氨酸; 生物信息学

Informatics Comparisons of Arginine Biosynthetic *arg* JBDFR Gene Cluster
from *C. crenatum* A. S. 1.542 and *C. crenatum* A. S. M2

CHEN Xue-lan¹, XIONG Yong-hua², TAO Wen-yi³, WANG Zheng-xiang³, XU Zheng-hong³

(1. College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang 330002, China

2. Sino-Germany Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China

3. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: In this paper, four pairs of primers were designed for the arginine biosynthetic *arg* JBDFR gene clusters amplification from *C. crenatum* A. S. 1.542 and *C. crenatum* A. S. M2, respectively. The mutation genes *argJ*, *argB* and *argF* from *C. crenatum* A. S. M2 were compared with those from *C. crenatum* A. S. 1.542 on bioinformatics, and were analyzed for the possible contribution to enhance the arginine production. These results will offer useful information and instruction to improve strains by gene engineering.

Key words *Corynebacterium crenatum*; arginine(Arg); bioinformatics

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)03-0219-04

本文采用诱变育种和定向培育技术相结合获得产精氨酸的钝齿棒杆菌(*Corynebacterium crenatum*)突变株, 其中诱变剂为直接对核酸进行化学修饰, 不影响核酸复制的体外诱变剂: 烷基化合物——亚硝基胍; 根据微生

物产生抗药性的原理^[1], 用精氨酸(Arg) 结构类似物(代谢拮抗物)——高精氨酸来筛选抗代谢拮抗物的突变株。野生型 *C. crenatum* A. S. 1.542 有可能产生了可以分解高精氨酸的酶类, 也可能是通过合成更高浓度的精氨酸来克

收稿日期: 2006-01-17

作者简介: 陈雪岚(1970-), 女, 副教授, 研究方向为生物制药。

- [3] 松浦一雄. 超声波の酒类酿造への利用[J]. 日本酿造协会, 1994, 89 (1): 13-17L.
- [4] 李文权, 王宪, 陈清花, 等. 超声波对湛江等鞭金藻生长和脂肪酸组成的影响[J]. 海洋学报, 2002, 24(3): 94-100.
- [5] 应崇福. 超声学[M]. 北京: 科学出版社, 1990: 513.
- [6] 李柏林, 储炬, 李友荣, 等. 在线超声波处理庆大霉素生物合成的影响[J]. 中国抗生素杂志, 1997, 22(4): 250-257.
- [7] 梁宏. 超声波作用对固定化酶活力及发酵过程的影响[D]. 广州: 华

南理工大学, 1997.

- [8] 高大维, 雷德柱, 高文宏, 等. 多波性超声波辅助啤酒酵母细胞生长的影响[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2000, 28(7): 37-39.
- [9] 梁宏. 超声波作用对固定化酶活力及发酵过程的影响[D]. 广州: 华南理工大学, 1997.
- [10] 王华. 葡萄与葡萄酒实验技术操作规范[M]. 西安: 西安地图出版社, 1996.

服高精氨酸的竞争性抑制作用。实践证明,多数突变株是因发生了后一类的突变才获得抗性。

棒杆菌以循环途径合成精氨酸,在此途径中受精氨酸反馈抑制的关键酶为 *argB* 基因编码的乙酰谷氨酸激酶 (AGKase),此酶不仅被 Arg 反馈抑制亦被其反馈阻遏^[2];同时, *argJ* 基因编码的乙酰鸟氨酸转移酶 (OATase) 根据其是否具有转乙酰能力来决定精氨酸的代谢途径^[3-4]; *argD* 基因编码乙酰鸟氨酸转氨酶 (AOATase), *argF* 基因编码鸟氨酸转氨甲酰酶 (OCATase), *argR* 基因编码蛋白参与精氨酸的调控。因此,本实验采用 PCR 的方法扩增了野生型和经亚硝基胍诱变的产精氨酸量约为 2.0mg/ml 的突变型 *C. crenatum* (命名为 *C. crenatum* A. S. M2), 包括 *argB*、*argJ* 和 *argR* 基因在内的串联基因 *argCJBDFR*。为了解精氨酸产量得以提高的可能原因,在基因水平上了解生产菌株的变化,本文分别对野生菌和突变菌的 *argJ*、*argB*、*argD*、*argF* 和 *argR* 这五段完整的基因进行了比较,为基因改造提供理性指导。

1 材料与方法

1.1 菌种、试剂和仪器

1.1.1 菌株

C. crenatum A. S1.542、*C. crenatum* A. S. M2 本实验室保存菌。

1.1.2 试剂

Taq DNA 聚合酶 上海生工; 溶菌酶 Sigma公司; 蛋白酶K 大连宝生物有限公司; WizardTM Plus Minipreps DNA Purification Systems Promega公司; 引物由北京三博远志生物公司合成; 其他试剂均为分析纯。

1.1.3 仪器

PCR扩增仪 (Gene Amp PCR System 2400型) PE公司; 凝胶成像仪 (FR2000型) 上海复日公司; 电泳仪及电泳槽 北京六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 菌株的培养

将野生型和突变型 *C. crenatum* 接种至种子液体培养基中, 30℃, 150r/min 恒温培养 16h。

1.2.2 *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^[5]。

1.2.3 引物设计

根据 Southern blotting 实验结果, 获知钝齿棒杆菌与谷氨酸棒杆菌的 *argB* 基因之间同源性非常高^[6]。本实验在设计引物时, 即以谷氨酸棒杆菌生物合成精氨酸基因簇 *argCJBDFR* 的序列^[2]为主, 同时比对已报道的 *Corynebacterium diphtheriae gravis* NCTC13129^[7]、

Corynebacterium efficiens YS-314^[8]和 *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551^[9]生物合成精氨酸基因簇 *argCJBDFR* 的保守序列, 设计了四对特异引物, 具体见表 1。

表 1
Table 1 引物名称及其序列
Primers used for PCR

引物名称	引物序列
Sense-1	TCAAGGTTGCAATCGCAGGAGCC
Antisense-1	GCAACTCACCAATAAGACCAAGTGG
Sense-2	CCGCAGCGGCCGTGTTTACACGTAACC
Antisense-2	GACAAGATTGTTGTCGTGAAATATG
Sense-3	ATCTTTGGAATCATGCCGGAATC
Antisense-3	TCTTCGTCGGTGATCACCAGCGG
Sense-4	CATGCCAGATTCTGGCTGATCTGCAG
Antisense-4	GCAAGAACGATGCGGTTAGTCATG

1.2.4 PCR 及其产物的回收

PCR 反应体系为: 10 × Pfu 缓冲液 (2.5 μl), dNTP (10mmol/L, 0.5 μl), Mg²⁺ (25mmol/L, 2 μl), 上游引物 (10 μmol/L, 1 μl), 下游引物 (10 μmol/L, 1 μl), 模板 DNA (1 μl, 约 10ng), 双蒸水 (16.5 μl), *Taq* 酶 (1U/μl, 1 μl)。

根据各引物的 T_m 值, 通过温度梯度 PCR 确定了最佳退火温度。扩增 1 片段 PCR 程序为: 95℃, 3min; 95℃ 1min, 50℃ 0.5min, 72℃ 2min, 30 个循环; 72℃ 10min。扩增 2 片段 PCR 程序为: 95℃, 3min; 95℃ 1min, 59℃ 0.5min, 72℃ 2min, 30 个循环; 72℃ 10min。扩增 3 片段 PCR 程序为: 95℃, 3min; 95℃ 1min, 55℃ 0.5min, 72℃ 2min, 30 个循环; 72℃ 10min。扩增 4 片段 PCR 程序为: 95℃, 3min; 95℃ 1min, 50℃ 0.5min, 72℃ 1.5min, 30 个循环; 72℃ 10min。预计各扩增产物的长度分别约为 2.0、1.95、1.6 和 1.3kb。

扩增产物在 1% 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。

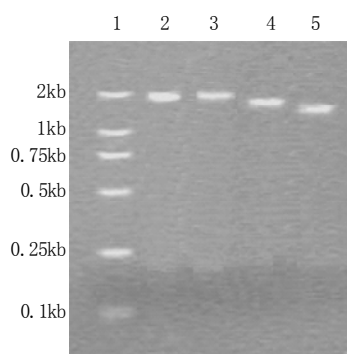
1.2.5 序列测定

来源于野生型和突变型的各 4 段 PCR 扩增产物的测序工作由上海生工公司完成。这 4 段序列都有部分重叠, 测序结果采用 DANStar 软件中 SeqMan 程序进行拼接。DNA 及其推测蛋白质序列分析采用 DNAMAN 4.0。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增基因簇 *argCJBDFR*

利用特异性引物, 分别以野生型和突变型 *C. crenatum* 基因组 DNA 为模板, 采用 DNA *Taq* 酶进行 PCR 扩增, 结果如图 1 所示, 获得预期的 DNA 长度。测序完成后经 DNASTAR 软件中 SeqMan 功能进行拼接, 野生型获得长为 6080bp 序列, 突变型获得长为 6083bp 序列。在



泳道1. DL2000Marker; 泳道2、3和4分别为 *argCJ*、*argJBD*、*argDF* 和 *argFR*。

图1 各对引物PCR扩增串联基因结果

Fig.1 Results of tandem arginine biosynthetic genes amplified by PCR

NCBI 中通过 Blast 比对, 发现获得的全长与谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 生物合成精氨酸的基因簇 *argCJBDFR* 高度同源, 确认该序列为野生型和突变型 *C. crenatum* 精氨酸生物合成基因 *argC*、*argJ*、*argB*、*argD*、*argF* 和 *argR*, 我们将获得的基因提交 GenBank 登录, 登录号为 AY509864。

通过比较发现, *argJ*、*argB*、*argD*、*argF* 和 *argR* 这五个完整的开放阅读框的长度在 *C. crenatum* A. S. 1. 542 中分别为 1167、954、1178、960 和 516bp, 在 *C. crenatum* A. S. M2 中分别为 1170、954、1178、960 和 516bp。其中, 野生型和突变型的 *argD* (1178bp) 基因序列完全一致, 以下分别比较各突变基因。

2.2 *argJ* 基因

以起始密码子为 1 计, 比较二菌株在 *argJ* 基因编码区发生的核苷酸序列变化。与 *C. crenatum* A. S. 1. 542 相比, *C. crenatum* A. S. M2 在 313 位发生了一个碱基的突变, 即由 T 突变为 C, 从推测的氨基酸序列观察, 此

碱基的改变导致 Ser 突变为 Pro; 在 580、610 和 653 位分别插入了一个碱基, 它们依序为 C、G 和 T, 使 193 至 218 位氨基酸(除 212 和 215 位氨基酸)都发生了变化, 具体见图 2。由于正好是插入了三个碱基, 因此, 虽然使局部 *argJ* 基因编码的 OATase 的氨基酸残基发生了变化, 但并未导致后面所有的密码子发生移码突变。*C. crenatum* A. S. M2 和 *C. crenatum* A. S. 1. 542 的氨基酸有 6.06% 的不同。

2.3 *argB* 基因

对野生型和突变型的 *argB* 基因序列进行比较, 此序列未发生插入和缺失现象, 仅是野生型菌的 *argB* 基因在 84 位和 163 位发生了碱基突变见图 3, 分别由 T、G 突变为 C、T。由于密码子的简并性, 84 位的碱基置换引起同义突变, 未导致氨基酸的变化; 163 位的碱基置换导致了错义突变, 使氨基酸序列表现为 55 位的 Val 突变为 Phe。*argB* 结构基因的上游启动子序列未见任何变化。

2.4 *argF* 基因

野生型和突变型 *argF* 基因序列比较, 有较多碱基发生了置换突变, 但未发生插入和缺失现象。*argF* 基因第 412 位碱基由 C 取代 T, 第 864 位由 A 取代 T, 第 874、895、898 和 918 位均由 C 取代 G, 第 923 和 935 位分别由 G 取代 C 和 T 取代 G。第 412 和 864 位碱基突变由于是同义突变而未引起氨基酸的变化, 第 874 和 895 位碱基的突变均使 292 和 299 位氨基酸由 Ala 变为 Pro, 第 898、918、923 和 935 位碱基的突变分别使 300、306、308 和 312 位氨基酸由 Glu 突变为 Gln、Gln 突变为 His、Ala 突变为 Gly、Trp 突变为 Leu。图 4 显示了 *argF* 基因编码的鸟氨酸转氨甲酰酶 (OATase) 氨基酸残基发生的突变。

2.5 *argR* 基因

C. crenatum A. S. M2 *argR* 基因与野生型相比, 在第

OAT-Wild	DASvtqemaqialanatavtfdTIdIdGSTSTNDTVFLLASG	232
OAT-Induced	DASRYSGNGSDRAGLMLRPLRLTPWILGSTSTNDTVFLLASG	233
Consensus	das t i gststndtvfllasg	

图2 钝齿棒杆菌 A.S. 1.542 的野生型与诱变型的 *argJ* 基因编码的氨基酸比较

Fig.2 Comparisons of amino acids coded by *argJ* gene from *C. crenatum* A.S. 1.542 and *C. crenatum* A.S.M2

<i>C. crenatum</i> -AGKase	40	AMVDDDLKAAFAADMVFLRTVGAKPVVVHGG	70
		↓	
		F	

图3 AGKase 氨基酸残基发生的突变

Fig.3 Mutation of amino acids of AGKase

<i>C. crenatum</i> -OATase	277	AYRGKEVAASVIDGAPSKVFDEAENRLHAQKALLVWLL	314
		↓ ↓ ↓ ↓ ↓	
		P PQ H G L	

图4 OATase 氨基酸残基发生的突变

Fig.4 Mutations of amino acids of OATase

108 位碱基发生了突变, 由 C 置换为 T, 但发生的是同义突变, 氨基酸序列未受影响。

3 讨论

C. crenatum A. S. M2 的 *argJ* 基因相对原始菌株而言在中部插入了 3 个碱基, 导致其编码的 OATase 的 β 亚基的 N 端连续发生了 23 个氨基酸的突变。原始的这 23 个氨基酸中, 4 个强酸性氨基酸(1 个 Glu, 3 个 Asp)降为 1 个, 同时增加了 4 个强碱性氨基酸(Arg); 8 个疏水性氨基酸降为 7 个, 6 个极性氨基酸降为 3 个。这些变化导致 β 亚基的 N 端碱性相对增强, 同时亲水性相对减弱。*C. crenatum* 的 OATase 接收的底物是 N-乙酰鸟氨酸提供的疏水性的乙酰基团^[9-10], 突变型菌 β 亚基 N 端 23 个氨基酸的突变导致其 β 亚基 N 末端梢碱性增强、疏水性也增强的结果可能使单功能 OATase 接收乙酰基团的能力提高, 从而对提高 Arg 的合成有所帮助。

argB 基因编码的 AGKase 的氨基酸序列仅有一个氨基酸的突变, 即第 55 位脂肪族氨基酸 Val 突变为芳香族氨基酸 Phe, 二氨基酸均为疏水性氨基酸。这个氨基酸残基的变化对精氨酸产量的贡献目前难以分析, 必须通过比较分别携带突变 *argB* 基因和原始 *argB* 基因的表达载体在宿主(*argB* 基因失活)体内的表现来加以判断。

argF 基因编码的 OCATase 仅在 C 端发生了 6 个氨基酸残基的变化, 这 6 个氨基酸都位于 OCATase 与底物鸟氨酸结合的结构域之内, 且在结构域的尾部, 与 OCATase 的信号相关^[13]。这 6 个氨基酸中, 1 个强酸性氨基酸增加为两个, 同时减少了 4 个疏水性氨基酸, 这些变化导致 OCATase 的 C 末端酸性相对增强的同时, 亲水性也相对增强。鸟氨酸属非蛋白质氨基酸, 呈碱性, 溶于水, 而 C 末端结合结构域之内的 OCATase 信号氨基酸残基的这些变化可能使 OCATase 有更强的识别和捕获鸟氨酸的能力, 促使鸟氨酸与 OCATase 的结合结构域结合, 从而对提高 Arg 的合成有所贡献。

从自然界分离有特殊品质的野生型微生物菌种以及利用传统诱变程序筛选遗传性状优良的物种, 是途径设计和靶点选择的重要信息资源和理论依据。在 *C. crenatum* A. S1. 542 的精氨酸代谢途径中, *argJ*、*argB* 及 *argF* 基因发生突变的碱基所导致其编码的蛋白酶某些性状的变化将给采用基因工程手段改良菌种提供有益的信息和指导。

4 结论

4.1 *C. crenatum* A. S. M2 的 *argJ* 基因编码的 OATase 的

β 亚基 N 端 23 个氨基酸的突变导致其 β 亚基 N 末端梢碱性增强、疏水性也增强的结果可能使单功能 OATase 接收乙酰基团的能力提高。

4.2 *C. crenatum* A. S. M2 的 *argF* 基因编码的 OCATase 的 C 末端结合结构域之内的 OCATase 信号氨基酸残基的变化可能使 OCATase 有更强的识别和捕获鸟氨酸的能力。

4.3 *C. crenatum* A. S. M2 的 *argB* 基因编码的 AGKase 的 55 位氨基酸残基的变化对精氨酸产量的贡献目前难以分析。

参考文献:

- [1] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 1996.
- [2] SAKANYAN V, PETROSYAN P, LECODQ M, 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.
- [3] SAVCHENKO A, WEIGEL P, DIMOVA D, et al. The *Bacillus stercorophilus argCJB* operon harbours a strong promoter as evaluated in *Escherichia coli* cells[J]. Gene, 1998, 212: 167-177.
- [4] MARC F, WEIGEL P, LEGARIN C, et al. Characterization and kinetic mechanism of mono- and bifunctional ornithine acetyltransferases from thermophilic microorganisms[J]. Euro J Biochem, 2000, 267(16): 5217-5227.
- [5] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 2版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999.
- [6] 陈雪岚, 陶文沂, 许正宏, 等. 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[J]. 无锡轻工大学学报, 2004, 23(5): 1-5.
- [7] CERDENO-TARRAGA A M, EFSTRATIOU A, DOVER L G, et al. The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(22): 6516-6523.
- [8] NISHIO Y, NAKAMURA Y, KAWARABAYASI Y, et al. Comparative complete genome sequence analysis of the amino acid replacements responsible for the thermostability of *Corynebacterium efficiens*[J]. Genome Res, 2003, 13(7): 1572-1579.
- [9] COLE S T, BROSC R, PARKHILL J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence[J]. Nature, 1998, 393(6685): 537-544.
- [10] MARC F, WEIGEL P, LEGRAN C, et al. Characterization and kinetic mechanism of mono- and bifunctional ornithine acetyltransferases from thermophilic microorganisms[J]. Euro Biochem, 2000, 267(16): 5217-5227.
- [11] MARC F, WEIGEL P, LEGRAN C, et al. An invariant threonine is involved in self-catalyzed cleavage of the precursor protein for ornithine acetyltransferase[J]. Biol Chem, 2001, 276(27): 25404-25410.
- [12] CERDENO-TARRAGA A M, EFSTRATIOU A, DOVER L G, et al. The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(22): 6516-6523.