

文章编号: 1005—8893 (2006) 03—0020—04

透明颤菌血红蛋白基因在恶臭假单胞菌中的 克隆及表达^{*}

李尔炆, 蔡志强, 史乐文

(江苏工业学院 化学工程系, 江苏 常州 213164)

摘要: 自然界存在一种革兰氏阴性, 专性好氧菌——透明颤菌 1[#] (*Vitreoscilla* 1[#]), 在微氧条件下, 可以诱导合成一种类似于血红蛋白的可溶性物质, 即透明颤菌血红蛋白 (*Vitreoscilla* Hemoglobin, VHb)。受体恶臭假单胞菌 6—81 (*Pseudomonas putida* 6—81) 具有降解 PTA 功能。VHb 基因在受体 6—81 中克隆并获得表达。研究了转化子 LEY—9 与受体 6—81 在不同供氧条件下对 PTA 降解率的差异。在供氧条件下, LEY—9 对 PTA 的降解率比 6—81 高 29.6%; 在限氧条件下, LEY—9 对 PTA 的降解率比 6—81 高 39%。转化子 LEY—9 在限氧条件下, 对 PTA 的降解率比在供氧条件下受体 6—81, 对 PTA 的降解率高出 20.6 个百分点。通过将 VHb 基因克隆入对 PTA 具有降解功能的受体菌中, 可使其在较低的溶解氧环境中, 仍具有较高的降解率。对 VHb 在污水处理系统中的应用作了初步的探索。

关键词: 透明颤菌血红蛋白; 克隆; 对苯二甲酸; 降解

中图分类号: Q 939.97

文献标识码: A

Clone and Expression of *Vitreoscilla* Hemoglobin Gene in *Pseudomonas Putida* 6—81

LI Er—yang, CAI Zhi—qiang, SHI Le—wen

(Department of Chemical Engineering, Jiangsu Polytechnic University, Changzhou 213164, China)

Abstract: The *Vitreoscilla* 1[#] was a Gram—negative obligate aerobe. Under the condition of tiny oxygen, it can be induced to synthesize one category of dissoluble material like the hemoglobin, namely the *Vitreoscilla* Hemoglobin (VHb). The receptor *Pseudomonas putida* 6—81 had the function of degrading PTA (p—Phthalic acid). The gene of VHb was cloned and expressed in the *Pseudomonas putida* 6—81. Studied the transformant LEY—9 with the receptor 6—81 under the different conditions that resulted in different PTA degradation rates. Under the condition of providing the oxygen, the rate of PTA degradation caused by the LEY—9 was 29.6% higher; under the condition of limiting the oxygen, the rate of PTA degradation caused by the LEY—9 was 39% higher than 6—81. Under the condition of limiting the oxygen, the rate of PTA degradation caused by the LEY—9 was 20.6% higher than 6—81, under the condition of providing the oxygen. The gene of VHb was cloned in 6—81 cell; it has higher rate of PTA degradation in the lower deliquescence oxygen environment.

Key words: *Vitreoscilla* Hemoglobin; clone; p—Phthalic acid; degradation

收稿日期: 2006—05—18

基金项目: 江苏省环境保护厅防污基金资助项目 (2005—2—W—16)

作者简介: 李尔炆 (1934—), 男, 江苏常州人, 研究员, 主要从事转基因技术及转基因技术在工业生产中的应用。

微生物在低溶解氧环境中会改变自身的生理状态, 并影响到细胞的代谢。在微生物发酵过程和污水生物处理系统中, 为了提高发酵产品的产量或提高污水生物处理系统的净化效率, 经常采用的方式是增加系统的细胞浓度, 由于细胞密度的加大, 会造成一个低溶解氧的环境, 为了改善系统的溶解氧状态, 在污水生物处理系统中常采用加大曝气量或用纯氧曝气, 虽能够改善溶解氧状态, 但也有限, 因为系统的溶解氧量还受到其他诸多因素, 如温度、介质的性质等的影响。由于加大曝气量这势必会增加污水处理系统的运行成本。

本文拟通过提高细胞对氧的利用率这样一个途径, 在细胞密度增加的条件下, 不增加系统的供氧量, 仍能使细胞的生长和代谢正常进行。自然界存在一种革兰氏阴性, 专性好氧菌——透明颤菌 (*Viteroscilla*), 在微氧条件下, 可以诱导合成一种类似于血红蛋白的可溶性物质, 即透明颤菌血红蛋白 (*Viteroscilla* Hemoglobin, VHb)。采用基因克隆这一策略, 将 VHb 基因克隆到受体细胞, 来提高受体细胞对氧的利用能力。

有关 VHb 的应用已有一些文献报道, 如 VHb 在 α -淀粉酶基因工程菌中的表达可将细胞密度和 α -淀粉酶产率提高为 14 和 33 倍^[1]; VHb 在链霉菌 (*Streptomyces lividans*) 中的表达可促进菌体生长; VHb 还能有效提高头孢菌素 C 在顶头孢霉菌中的产量; VHb 在金色链霉菌中的表达能提高氧气利用率, 产物合成比原始菌株提高 40% ~ 60%^[2]; VHb 基因在阿维链霉菌^[3] 和 D-阿拉伯糖醇酵母菌中的克隆与表达^[4] 及 PHB 重组大肠杆菌^[5] 中也得到广泛应用。本文报道的是关于透明颤菌血红蛋白 (VHb) 基因, 在一株恶臭假单胞菌中的表达, 并研究了在不同供氧条件下该菌对 PTA 的降解率, 拟为 VHb 在污水生物处理中的应用作初步的探索。

1 材料与方法

1.1 菌种

供体菌: 透明颤菌 1[#] (*Viteroscilla* 1[#])^[6] 和受体菌: 恶臭假单胞菌 6-81 (*Pseudomonas putida* 6-81)^[7] 均由本研究室从自然界分离。

1.2 培养基

细菌培养基 (L): 蛋白胨 10 g; 牛肉膏 5 g;

NaCl 5 g; pH 7.0 ~ 7.2。

基础培养基 (L): K_2HPO_4 5.7 g; KH_2PO_4 1.7 g; $(NH_4)_2SO_4$ 2.6 g; 盐溶液 10 mL; pH 7.0。

盐溶液 (L): $MgSO_4$ 19.5 g; $MnSO_4$ 5 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5 g; $CaCl_2$ 0.3 g。

1.3 对苯二甲酸 (PTA) 测定方法

紫外分光光度法^[8]。

1.4 转化

采用供体 DNA 转化受体原生质球^[9]。

1.5 供氧方式

供氧为摇床培养; 限氧为静止培养。

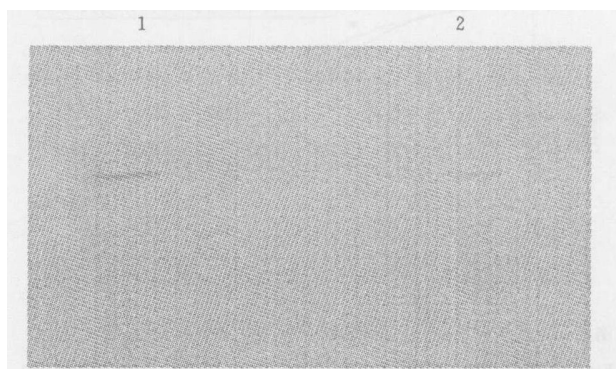
1.6 VHb 血红蛋白的鉴定

VHb 血红蛋白的鉴定采用文献 [10] 的方法。

2 结果与讨论

2.1 转化子的鉴定

使转化子 LEY-9 处于微氧条件下培养 48 h, 然后收集细胞, 提取分离纯化 VHb 蛋白, 再通过电泳与标准蛋白进行对比, 见图 1。从转化子 LEY-9 细胞中提取分离纯化所获得的蛋白样品, 与 N, N, N', N'-四甲基-对苯二胺溶液反应, 快速生成紫色物质, 标志血红蛋白的存在^[10], 证明从转化子 LEY-9 细胞中提取分离纯化所获得的蛋白质, 为透明颤菌血红蛋白 (VHb)。



1. 转化子 LEY-9 表达蛋白; 2. 透明颤菌血红蛋白标样

图 1 透明颤菌血红蛋白电泳

Fig 1 The electrophoresis of *Viteroscilla* Hemoglobin

2.2 限氧条件下受体与转化子对比

图 2 表明, 在相同的限氧条件下, 培养基中

PTA 的含量为 0.15%。在 24 h 后, 转化子 LEY-9 与受体 6-81 对 PTA 的降解显示出差别, 到 48 h, 转化子 LEY-9 对 PTA 的降解率为 90.8%, 比受体菌 6-81 高出 39%。降解率上的这种差异, 是由于转化子 LEY-9 带有透明颤菌血红蛋白基因, 提高了对氧的利用能力所致。

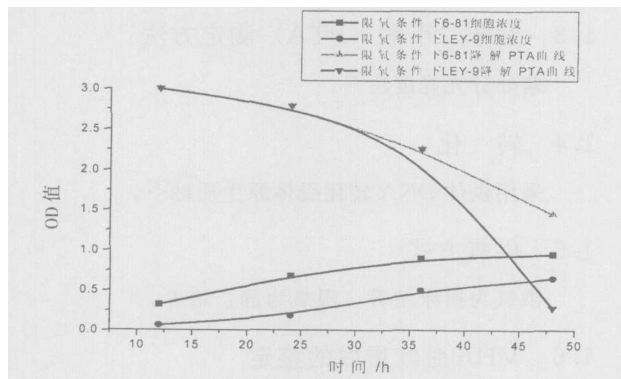


图2 限氧条件下 6-81 与 LEY-9 的细胞浓度和降解 PTA 曲线

Fig 2 Under the condition of tiny oxygen, the curve of cell growth and PTA degradation of 6-81 and LEY-9

2.3 供氧条件下受体与转化子对比

图3表明, 在相同的供氧条件下, 培养基中 PTA 的含量为 0.15%。在 24 h 后, 转化子 LEY-9 对 PTA 的降解率就明显高于受体菌 6-81, 48 h 后, 转化子 LEY-9 对 PTA 的降解率为 99.8%, 比受体菌 6-81 高出 29.6%。说明在供氧条件下, 对氧的利用率 LEY-9 比 6-81 更高。

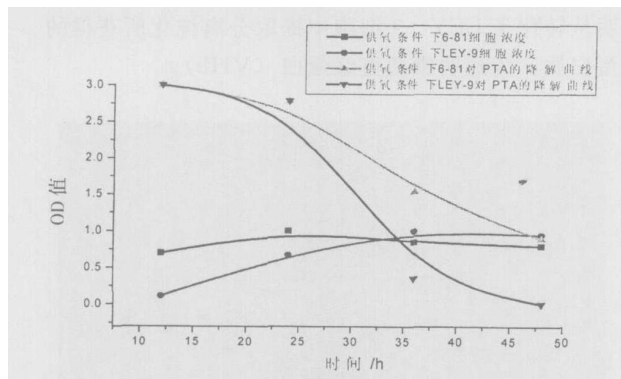


图3 供氧条件下 6-81 与 LEY-9 的细胞浓度和降解 PTA 曲线

Fig 3 Under the condition of providing the oxygen, the curve of cell growth and PTA degradation of 6-81 and LEY-9

2.4 不同氧条件下受体与转化子对比

图4表明, 在含有相同的 0.15%PTA 浓度下, 转化子 LEY-9 处于限氧条件下, 受体菌 6-81 处

于供氧条件下, 48 h 转化子 LEY-9 对 PTA 的降解率为 90.8%, 受体菌 6-81 对 PTA 的降解率为 70.2%, 另外, 从图4还可看出这一个结果, 在 LEY-9 的细胞浓度低于 6-81 的情况下 LEY-9 还比 6-81 高出 20.6%。

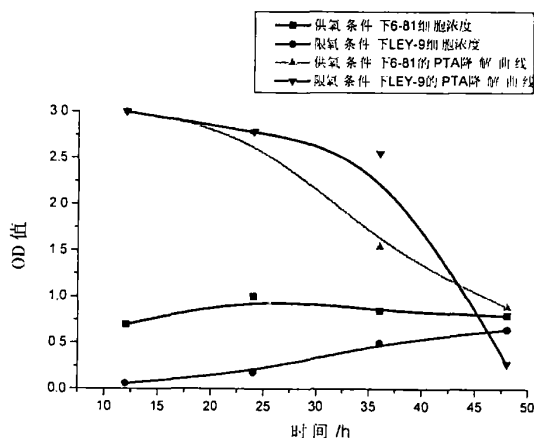


图4 供氧条件下 6-81 与限氧条件下 LEY-9 的细胞浓度和降解 PTA 曲线

Fig 4 The curve of cell growth and PTA degradation is 6-81, under the condition of providing the oxygen, and LEY-9, under the condition of tiny oxygen

2.5 不同氧条件下转化子性状对比

图5表明, LEY-9 由于携带有血红蛋白基因并在细胞内获得表达, 提高了细胞对氧的利用能力, 使得 LEY-9 对 PTA 的降解率, 在供氧和限氧两种条件下的差异不大, 仅为 9.2 个百分点。

从上述试验的结果可以看出, 通过将 VHb 基因克隆入具有降解功能的受体菌中, 可使其在较低的溶解氧环境中, 仍具有较高的降解率。这说明在污水处理系统中, 采用提高细菌对氧的利用率这条途径, 来解决系统溶解氧不足的矛盾是可行的, 并且比用加大曝气量的方法更加经济, 可以大幅度降低污水生物处理的运行成本。而增加的曝气量并不能全部溶解于水, 这样就造成了能源的很大浪费。所以采用克隆 VHb 基因这一途径, 不仅可以提高效率, 还能节约大量的能源。这项技术在生产中加以应用, 将会产生良好的经济效益。另外还可以看出, LEY-9 在试验中, 细胞的生长量相对较慢, 这样可使污水生物处理系统产生的剩余污泥量减少, 这对污水生物处理系统的运行和管理都是十分有利的。

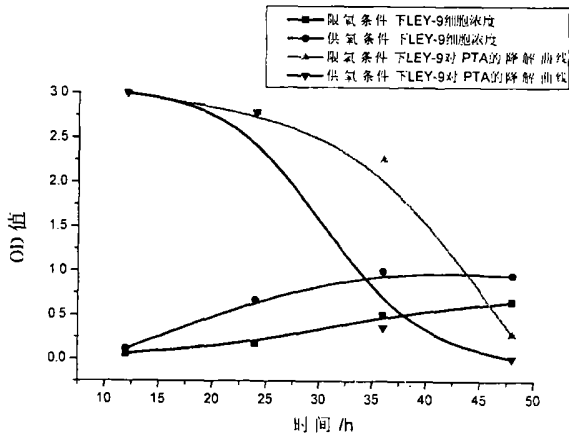


图 5 供氧与限氧条件下 LEY-9 和细胞浓度和降解 PTA 曲线
Fig 5 Under the condition of providing the oxygen and tiny oxygen, the curve of cell growth and PTA degradation of LEY-9

透明颤菌血红蛋白可以提高细胞对氧气的利用率，且不需纯氧，不需氧载体，不需要增大通气的搅拌设备费和附加的曝气和纯氧的投资。因此，利用透明颤菌血红蛋白（VHb）基因在其他菌种中的外源基因表达，这一基因策略来解决好氧生物发酵或污水好氧生物处理中的供氧问题具有很大应用价值。

参考文献:

[1] 吴奕, 杨胜利. 透明颤菌血红蛋白基因调控与功能的研究 [J] . 生物工程学报, 1997, 13 (1): 1—5.

[2] 孟春, 叶勤, 石爱贤, 等. 透明颤菌血红蛋白基因在金色链霉菌中的克隆与表达 [J] . 微生物学报, 2002, 42 (3): 305—310.

[3] 文莹, 李季伦. 透明颤菌血红蛋白基因在阿维链霉菌中的表达 [J] . 微生物学报, 2000, 40 (1): 50—56.

[4] 贺军, 卢大军, 王钦宏, 等. 细菌血红蛋白基因在大产 D-阿拉伯糖醇酵母中的克隆与表达 [J] . 微生物学报, 2001, 41 (3): 315—319.

[5] 于慧敏, 史悦, 沈忠耀, 等. 透明颤菌血红蛋白基因在产 PHB 重组大肠杆菌中的引入 [J] . 微生物学报, 2001, 41 (5): 548—552.

[6] 李尔杨, 史乐文. 透明颤菌的分离及鉴定 [J] . 江苏工业学院学报, 2003, 15 (4): 28—30.

[7] 李尔杨, 史乐文. 一株 PTA 降解菌的分离和鉴定 [J] . 江苏石油化工学院学报, 1996, 8 (2): 32—34.

[8] 孙建华, 王菊思. 紫外分光光度法同时测定工业废水中的对苯二甲酸和对甲基苯甲酸 [J] . 环境化学, 1988, 7 (1): 33—39.

[9] 李尔杨, 王淑华, 史乐文, 等. 染色体 DNA 转化原生质构建解烃工程菌 [J] . 微生物学杂志, 1990, 10 (1, 2): 58—61.

[10] William R S, Thomas M S, Nelson H L, et al. Characterization of *Vitreoscilla Beggiatoidea* and *Vitreoscilla Filiformis* sp nov, nom rew and Comparison with *Vitreoscilla stercoraria* and *Beggiatoa alba* [J] . International Journal of Systematic Bacteriology, 1986, 36 (3): 302—313.