

南极嗜冷假单胞菌 7197 S-腺苷同型半胱氨酸水解酶 (SAHH) 基因的克隆与序列分析*

张金伟 曾润颖

(国家海洋局第三海洋研究所海洋生物遗传资源重点实验室 福建 厦门 361005)

摘要: 从南极普利兹湾深海沉积物中筛选到一株耐冷菌株 7197, 其 16S rDNA 序列分析表明该菌株属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。作者通过设计引物, 从该菌的全基因组 DNA 中克隆到编码 S-腺苷-L-高半胱氨酸 (SAHH) 的完整 ORF, 全长为 1424bp。使用 DNAMAN(5.1) 软件对全长 ORF 为 1424bp 的 SAHH 基因进行分析, SAHH 基因编码一个由 474AA 残基组成、分子量预计为 52523 Da 的 SAHH 蛋白质, 与 *Psychrobacter* sp. 273-4 的 SAHH 有 96.84% 的相似性; 与 *Acinetobacter* sp. ADP1 的 SAHH 有 79% 的相似性; 与 *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 的 SAHH 有 75% 的相似性。

关键词: 嗜冷假单胞菌; S-腺苷同型半胱氨酸水解酶; 克隆; 序列分析

Analysis and Gene Cloning of the S-adenosylhomocysteine Hydrolase from Antarctic Psychrotrophic *Pseudomonas* sp. 7197 Strain

ZHANG Jin-wei, ZENG Run-ying

(Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

ABSTRACT: A strain 7197, which produces S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, was isolated from the deep sea sediment of Prydz Bay, Antarctic. The morphology identification and 16S rDNA sequence analysis showed that it belonged to genus *Pseudomonas*. The S-adenosylhomocysteine hydrolase gene was cloned by PCR according to the primers. Nucleotide sequence analysis revealed an open reading frame of 1424 bp encoding the SAHH. The amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence of the SAHH gene corresponded to a protein of 474 amino acid residues with a molecular weight of 52,523 kDa. The SAHH shows a high sequence similarity to the SAHH gene from *Psychrobacter* sp. 273-4 and *Acinetobacter* sp. ADP1, with homologies of 96.84% and 79%, respectively. also show some sequence similarity to the SAHH gene from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 with 75% homologies.

Key words: Psychrotrophic *Pseudomonas*; S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase; gene cloning; sequence analysis

S-腺苷-L-高半胱氨酸 S-adenosyl-L-homocysteine (SAH) 水解酶 [EC 3.3.1.1] (以下简称 SAHH) 能可逆地水解 SAH 为腺苷和 L-高半胱氨酸^[1]。是许多微生物在生命过程中的关键酶。

本研究主要报道了从南极普利兹湾深海沉积物中筛选菌株 7197 (*Pseudomonas* sp.) 的全基因组中克隆到 S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶基因并对其序列进行分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源: 菌株 7197 筛选自南极普利兹湾深海沉积物 (74°25' E, 66°55' S, 水深 900 m), 样品于 2001 年 11 月~2002 年 4 月中国第十八次南极考察航次期间采集, 采用多管采样器采集, 在超净台中去除表层后, 将内层样品保存于 -20℃ 条件下带回。

1.1.2 菌种和质粒: 大肠杆菌 *E. coli* Top10 F⁻ 为本实验室保

存, T-载体购自 Promega。

1.1.3 试剂: GENECLEAN II Kit 购自 BIO101 公司; 限制性内切酶购自 Promega, Taq 酶等 PCR 用品购自 MBI, 其他化学试剂均为国产分析纯。

1.1.4 培养基

改良的 2216E 培养基: 蛋白胨 1%, 酵母膏 0.2%, 用福建沿海处取的陈海水(放置一个星期以上的海水, 用 0.22μm 滤膜过滤后使用) 配制, 室 pH 7.0~8.0。固体培养基另加 1.5% 琼脂粉。生长培养基 5 倍稀释的改良 2216E 培养基。

2.2 方法

2.2.1 菌种分离: 将样品稀释^[2] 后涂布于改良 2216E 培养基上, 于 15℃ 培养 3~7d, 取单菌落镜检后接种于液体改良 2216E 培养基中, 培养 3~7d 后加入 15% (终浓度) 甘油, 于 -80℃ 超低温冰箱中保存。

2.2.2 总 DNA 提取及核酸操作参考文献^[3,4]。

2.2.3 16S rDNA 的扩增和克隆: 以基因组 DNA 为模版, 使用

* 基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助 (No. 40406029)

Supported by the National Natural Science Youth Foundation of China (No. 40406029)

作者简介: 张金伟, 在读硕士研究生, E-mail: jinweizhang@21cn.com

通讯作者: 曾润颖, E-mail: runyingzeng@yahoo.com.cn

(收稿日期: 2006-04-07 接受日期: 2006-04-21)

通用引物^[5,6] 27F: 5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3' 和 1492R: 5' - GGTTACCTTGTTACGACTT- 3' (上海生工合成) 扩增细菌 16S rDNA。扩增参数为: 96℃ 2min, 然后 94℃ 30s, 55℃ 90s, 72℃ 90s 为一个循环, 共进行 30 个循环。PCR 产物经凝胶电泳回收后, 按 T 载体试剂盒标准方法将得到的产物连接到 T 载体上, 转化 E. coli Top10 F⁺, 重组质粒经鉴定正确后保存于 -20℃。

2.2.4 以基因组 DNA 为模板, 参考文献^[6] 设计 PCR 引物, 扩增 SAHH 引物: SAHHF(forward primer): 5' - ATGGACGCAGT-GTCTAACACCCCATC- 3' 和 SAHHR(reverse primer): 5'- ' TTAG-TATTATAAGCGTCAGGCCTAA- 3', 由上海生工合成。PCR 反应体系为: Buffer 10 μL, dNTP 10μL, 引物各加 10pmol, Mg2+ 浓度为 1mmol/L, Taq 酶 2u/100μL, 补 ddH2O 到 100μL。反应条件为: 95℃ 2min, 94℃ 1min, 52℃ 1min, 72℃ 1.5min 为一个循环, 共进行 35 个循环。产物由 U- gene 的 PCR- Pure Kit 纯化后按 3:1 连接到 TaKaRa 的 pMD18- T 载体, 转化 E. coli Top10 F⁺, 菌落 PCR 筛选含有 SAHH 基因的克隆。

2.2.5 核酸测序及同源性分析: 上海生工完成所有测序及拼接工作, 序列同源性分析采用 NCBI 的 BLASTn 完成。

3 结果

3.1 嗜冷菌的分离

在 1.5 mL 灭菌离心管中将样品与灭菌 dd H2O 按 1:100 比例混合, 稀释后接种于 5mL 生长培养基中, 分别在 4、10、20、30℃ 水浴下培养 5~15d; 菌体生长后稀释涂布在分离平板培养基上, 15℃ 培养 3~5d。挑平板上长出的单菌落, 接种于 5 mL 生长培养基, 15℃ 培养至 OD600 为 3.0 时, 保种备用。

3.2 7197 菌株 16S rDNA 序列分析

将 7197 菌株的 16S rDNA 序列与 EMBL 数据库中的序列进行同源性比较, 发现与其同源性较高的菌株均为假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。一般认为, 16S rDNA 序列同源性小于 98% 可

以认为属于不同的种, 同源性小于 95%, 可以认为属于不同属^[7], 因此 7197 菌株属于假单胞菌属 (*Pseudomonas* genera), 命名为 *Pseudomonas* sp. 7197, 其 16S rDNA 的 EMBL 注册号为 AM111052。该菌株与一株假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*) 的 16S rDNA 序列同源性最高, 为 98.134%。

从 EMBL 数据库中选取与 7197 菌株 16S rDNA 序列同源性较高的 11 株假单胞菌。对这 12 株细菌的 16S rDNA 全序列进行遗传距离计算, 并根据遗传距离计算结果绘制系统发育树 (图 1)。

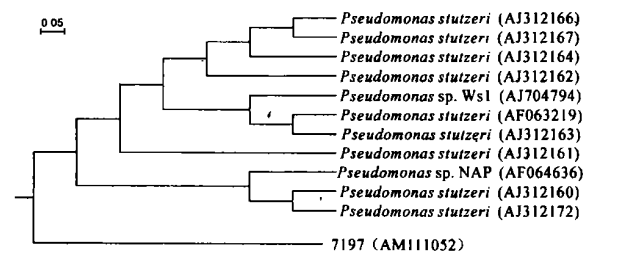


图 1 7197 菌株的系统发育树(括号内为各菌株 16S rRNA 序列在 EMBL 数据库中的注册号)

Fig. 1 Phylogenetic tree of strain 7197 (The numbers in the bracket was the accession number of each 16S rRNA sequence in EMBL database)

3.3 PCR 扩增 SAHH 基因及其克隆

以基因组 DNA 作为模板, PCR 扩增的产物大小在 1.4K 左右 (图 2), 纯化后连接到 T 载体 (3KB) 上, 转化 E. coli Top10 F⁺, 培养过夜。提取的重组 T 载体质粒, 经 BamHI 和 NheI 双酶切后, 得到两条大小分别是 850 bp 和 550 bp 左右的片段, 说明重组 T 载体质粒中插入的片段大小约为 1400bp, 确实为 PCR 扩增的产物 (图 3), 鉴定正确后测序, 获得 SAHH 的核酸全长 ORF 序列为 1424bp, 在 EMBL 数据库中注册号为 AM229329。

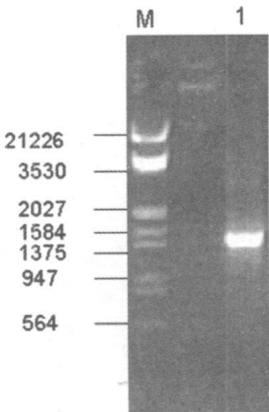


图 2 PCR 扩增 SAHH 基因
Fig. 2 PCR amplification of SAHH gene
M: λDNA/EcoRI+ HindIII
1: PCR 产物

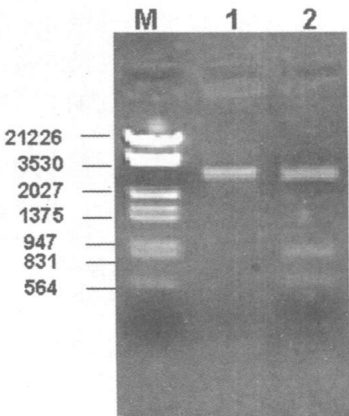


图 3 PCR 扩增 SAHH 基因
Fig. 3 PCR amplification of SAHH gene
M: λDNA/EcoRI+ HindIII
1: T 载体
2: 重组 T 载体经 BamHI 和 NheI 双酶切产物

3.4 氨基酸序列分析

使用 DNAMAN(5.1) 软件对全长 ORF 为 1424 bp 的 SAHH 基因进行分析。SAHH 基因编码一个由 474AA 残基组成、分子量预计为 52523 Da 的 SAHH 蛋白质 (EMBL 注册号为:

CAJ76167), 与 *Psychrobacter* sp. 273-4 (ZP-00146375) 的 SAHH 有 96.84% 的相似性 (图 4)。与 *Acinetobacter* sp. ADP1 (YP-046892) 的 SAHH 有 79% 的相似性; 与 *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 (YP-262856) 的 SAHH 有 75% 的相似性。

```
CLUSTAL multiple sequence alignment
Identity=96.84%
CAJ76167      MDAVSNTPSAHTIDPSFTDYKVADISLADYGRREITLAEAEHPALHGLRRRYEADQPLKG
ZP_00146375   MDAVSNTPSAHTIDPSFTDYKVADISLADYGRREITLAEAEHPALHGLRRRYEADQPLKG
*****
CAJ76167      AKIAGCIHNTIQTAVLIETLVALGAEVRTSCNIFSTQDHAAAAIAAAGISVYAWKGETE
ZP_00146375   AKIAGCIHNTIQTAVLIETLVALGAEVRTSCNIFSTQDHAAAAIAAAGISVYAWKGETE
*****
CAJ76167      EYEWCLRQQIHVGGEESGQLWDANLILDDGGDLTALIHNDYAQMLDNIHGISEETTTGV
ZP_00146375   EYEWCLRQQIHVGGEESGQLWDANLILDDGGDLTALIHNDYAQMLDNIHGISEETTTGV
*****
CAJ76167      HRLVEHLKGKTLKVPAINVNDAVTKSKNDNKYGRHSLNDAIKRATDHFLAGRRALVIGY
ZP_00146375   HRLVEHLKGKTLKVPAINVNDAVTKSKNDNKYGRHSLNDAIKRATDHFLAGRRALVIGY
*****
CAJ76167      GDVGKGSTQSLRQEGHIVRVSEVDPICAMQACNDGYEVLSPYINGDNTGGAENINTRLLE
ZP_00146375   GDVGKGSTQSLRQEGHIVRVSEVDPICAMQACNDGYEVLSPYINGDNTGGAENINTRLLE
*****
CAJ76167      DTDLIVTTTGNHYVCDKHLAALKPGAVVCNIGHFDTEIDTQFNRDNWRWVEIKPQVHQV
ZP_00146375   DTDLIVTTTGNHYVCDKHLAALKPGAVVCNIGHFDTEIDTQFNRDNWRWVEIKPQVHQI
*****
CAJ76167      FRSDDENLYLILAEGLRVNLGNATGHPSRVNDGSFANQVLAQNYLFEEKFAELPVDERF
ZP_00146375   FRSDDENLYLILAEGLRVNLGNATGHPSRVNDGSFANQVLAQNYLFEDKFAELPADKRT
*****
CAJ76167      DNLVYKVLPPKLLDEEVAAAHVAGFNGTLTKLTEKQAEYLGVPVEGPFKPDATKY
ZP_00146375   DNLVYKVLPPKLLDEEVAAAHVAGFNGTLTKLTEKQAEYLGVPVEGPFKPDATKY
*****
```

图 4 7197 和 ZP-00146083 的 SAHH 氨基酸序列比较

Fig. 4 Comparison of SAHH amino acid sequences between 7197 and ZP-00146083

CAJ76167: SAHH 来片 *Pseudomonas* sp. 7197;

ZP-00146375: SAHH 来片 *Psychrobacter* sp. 273-4

4 讨论

SAHH 与文献报道的来自 *Psychrobacter* sp. 273-4 的 SAHH 相比较, 两者的氨基酸序列相似性虽然为 96.84%, 但在系统发育树上, 与 *Pseudomonas* sp. 7197 亲缘关系最近的是 *Pseudomonas stutzeri*, 而不是 *Psychrobacter* sp. 273-4。而且二者属于不同的种。而与同种的 *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 的 SAHH 相比较, 两者的氨基酸序列相似性仅为 75%。说明 SAHH 作为生物代谢途径中的一个水解酶, 在微生物各种属的生命过程中具有一定的保守性; 同时也说明了种属进化与具体某一分子进化并不同步, 具体功能基因的分子进化与其生存环境关系更为密切。

蛋氨酸在腺苷转移酶催化下与 ATP 反应生成的 S-腺苷蛋氨酸 (S-adenosyl methionine, SAM), 可在不同甲基转移酶的催化下, 转出甲基后形成 S-腺苷同型半胱氨酸 (S-adenosyl homocysteine, SAH), SAH 水解释出腺苷变为同型半胱氨酸 (homocysteine, hCys)。由于 SAH 能强烈抑制甲基转移酶, SAHH 受到抑制引起了依赖 S-腺苷蛋氨酸的转甲基反应受到抑制, 同时导致了 SAH 的累积^[8]。许多 SAHH 抑制剂已被设计为药物作用的靶位点用于抑制病毒和肿瘤的增殖^[9,10]。

SAHH 在调节细胞内 S-腺苷同型半胱氨酸 (SAH) 和同型半胱氨酸 (Hcy) 扮演重要角色, 研究者对该酶感兴趣的是, SAH 可以作为所有的腺苷甲硫氨酸 (SAM) - 依赖转甲基酶的有效抑制物, 因此该酶在治疗靶位点上具有潜在应用。多年来, 也正是 SAHH 因为可以作为药物设计的靶位点而吸引人。该酶的抑制剂的作用表现为抗滤过性病原体, 抗寄生物的 (药剂), 治风湿药, 免疫力等特点。有的研究者正通过研究抗寄生物潜在抑制剂和探明人类和寄生物 SAHH 在生物化学上的不同点, 来设计新型的抑制剂^[11]。

参考文献

- [1] Cantoni JL. Biological methylation: selected aspects[J]. Annu. Rev. Biochem., 1975, 44: 435-451
- [2] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 1996: 69-73
- [3] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [4] Fred A, Roger B, Robert EK, et al. Short Protocols in Molecular Biology, 3rd ed[M]. John Wiley & Sons Inc., 1995
- [5] 林念炜, 张锐, 赵晶, 等. 南极产低温蛋白酶菌株 *Marinobacter* sp. R2 的发酵条件及酶学性质研究[J]. 厦门大学学报, 2004, 43(6): 865-869
- [6] 张金伟, 曾润颖. 南极产低温脂肪酶菌株 *Psychrobacter* sp. 7195 的选育. 发酵条件及酶学性质研究. 生物磁学, 2006, 6(1): 6-10
- [7] Sganga MW, Aksami RR, Cantoni GL, et al. Mutational and nucleotide sequence analysis of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from *Rhodobacter capsulatus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89: 6328-6332
- [8] (英) W. 费迪南德. 酶分子[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 102-127
- [9] De Clercq E. S-Adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors as broad-spectrum antiviral agents[J]. Biochem. Pharm., 1987, 36: 2567-2575
- [10] Chian PK. Biological effects of inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase[J]. Pharmacol. Ther., 1998, 77: 115-134
- [11] Kitade Y, Nakanishi M, Yatome C. 9-[(2'S, 3'S) - 3' - fonyl-2, 3' - dihydroxypropyl] adenine: A facile affinity-labeling probe of human S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase[J]. Bioorg. Med. Chem. Lett., 1999, 9: 2737-2740
- [12] Lee JE, Comell KA, Riscoe MK, et al. Structure of *E. coli* MTA/AdHcy nucleosidase inhibitor complexes provide insight into the conformational changes required for substrate binding and catalysis[J]. J. Biol. Chem., 2003, 278: 8761-8770