

# 海洋聚磷菌中核苷二磷酸激酶基因的克隆及序列分析

任世英<sup>1,2</sup>, 肖天<sup>1</sup>

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

**摘要:** 以海洋聚磷菌 *Halomonas* YSR-3 的总 DNA 为模板, 用 PCR 法扩增核苷二磷酸激酶基因, 将扩增片段克隆到 pGM-T 载体, 转化 *Escherichia coli* TOP10 菌株, 经蓝白斑筛选、菌落 PCR 得到阳性克隆, 测序后对序列进行 Blast 比对分析。得到的基因序列长度为 420 bp, 翻译后的序列与 *Loktanella vestfoldensis* SKA53, *Jannaschia* sp. CCS1, *Roseobacter* sp. CCS2 的核苷二磷酸激酶蛋白序列相似性分别为 89%, 86%, 85%。

**关键词:** 盐单胞菌属; 聚磷菌; 核苷二磷酸激酶 (NDPK)

**中图分类号:** Q78      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-3096 (2008) 09-0061-03

核苷二磷酸激酶 (nucleotide diphosphate kinase, NDPK) 的主要功能是通过催化腺苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 和核苷二磷酸 (nucleoside diphosphate, NDP) 之间的磷酸基团转移来维持生物体细胞内 NTP 的浓度, 其反应方程式为:  $ATP+NDP=ADP+NTP$ <sup>[1]</sup>。NDPK 参与细胞内信号传导<sup>[2]</sup>, 可以调节细胞增殖、分化、发育和凋亡<sup>[3-5]</sup>。因此, NDPK 对生物体的新陈代谢具有重要意义。海洋聚磷菌 *Halomonas* YSR-3 能够将水体中的磷吸收, 并在细胞内以多聚磷酸盐的形式储存<sup>[6]</sup>。多聚磷酸盐是在多聚磷酸盐激酶的催化下, 将 ATP 中的高能磷酸基团转移到较短多聚磷酸盐链上形成的<sup>[7]</sup>。由此推测, NDPK 的活性可能会影响聚磷菌对磷的吸收效率。作者利用 PCR 及分子克隆技术, 从海洋聚磷菌 YSR-3 中扩增出 NDPK 基因, 并对其序列进行分析, 为提高该菌的除磷能力进行初步研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株与试剂

海洋聚磷菌 *Halomonas* YSR-3, *Escherichia coli* TOP10 为本室保存, 质粒 pGM-T 购自北京天根生化科技有限公司。

改进的 2216 培养基<sup>[8]</sup>用来培养 YSR-3, LB 用来培养大肠杆菌。培养基中氨苄青霉素的终浓度为 100 mg/L。

PCR 用试剂、Taq DNA 聚合酶、pGM-T 克隆试剂盒购自北京天根生化科技有限公司, 引物合

成、PCR 产物纯化试剂盒均由上海生工生物工程有限公司完成, MspI 酶切试剂盒购自大连宝生物工程有限公司, 质粒抽提试剂盒购自杭州博日科技有限公司, 其他试剂为国产分析纯。

### 1.2 YSR-3 中 NDPK 基因的克隆

#### 1.2.1 YSR-3 总 DNA 的制备

海洋聚磷菌 YSR-3 接种于 2216 液体培养基, 摇床过夜培养, 常温离心, 得到菌体, 细菌总 DNA 的提取采用 CTAB 法, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

#### 1.2.2 NDPK 基因序列的 PCR 扩增

参照 Bosshard 等<sup>[9]</sup>的方法进行。利用引物 P1 (5'-ATGGCAATACAACGTACCCTGTGTC-3') 和引物 P2 (5'-TCCGACCAGTTCAAGTCCACTGA-3') 进行 PCR, 反应条件为: 94℃ 预变性 8 min, 94℃ 1 min, 52℃ 1 min, 72℃ 50 s, 25 个循环, 72℃ 延伸 10 min。扩增片段大小预测为 400 bp 左右。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 胶回收试剂盒进行回收。

#### 1.2.3 NDPK 基因的克隆

纯化后的 PCR 产物按照 pGM-T 克隆试剂盒的方案进行操作。16℃ 过夜连接, 转化 *E. coli* TOP10 感受态细胞, 在表面涂布 16 μL IPTG (50 g/L) 和

收稿日期: 2008-02-28; 修回日期: 2008-05-10

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2006CB400604); 国家自然科学基金资助项目(40376048)

作者简介: 任世英(1980-), 女, 山西五寨人, 博士研究生, 主要从事海洋生物学研究, 电话: 0532-82898584, E-mail: rsy1314@163.com; 肖天, 通讯作者, E-mail: txiao@ms.qdio.ac.cn

40 μL X-gal (20 g/L) 的 LB (含氨苄青霉素) 琼脂平板上, 选择具有氨苄青霉素抗性的白色转化子。采用 T 载体通用引物 T7 和 SP6 进行菌落 PCR。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测是否为阳性克隆。阳性克隆的 PCR 产物经过酒精沉淀纯化后用限制性内切酶 MspI 进行酶切, 把酶切图谱不同的克隆接种到液体 LB 培养基过夜, 常温离心得菌体, 送上海生工生物工程有限公司进行测序。同时将阳性克隆用质粒抽提试剂盒提取质粒, 进行保存。

### 1.2.4 NDPK 基因序列的分析

将测序后的基因序列在 NCBI 数据库中进行 Blastx 比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 获得了与该序列相似性较高的序列, 然后用 clustalw2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>) 进行分析。

## 2 结果

### 2.1 YSR-3 的总 DNA 及 NDPK 基因的 PCR 扩增结果

提取 YSR-3 的总 DNA, 用琼脂糖凝胶电泳检测, 只有单一条带。经引物进行 PCR 扩增后, 得到单一条带, 经琼脂糖凝胶电泳, 切下与预期片段大小相近的条带, 用胶回收试剂盒纯化。

### 2.2 NDPK 基因的克隆

将胶回收片段以 pGM-T 为载体克隆到 *E. coli* TOPI0, 经蓝白斑筛选, 挑取白色菌落, 用 T 载体通用引物进行菌落 PCR 扩增, 得到 9 个阳性克隆。全部阳性克隆经 MspI 酶切分析得到 1 种带型, 将阳性克隆进行测序。

### 2.3 NDPK 基因的序列分析

将测序所得序列在 Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>) 中进行分析, 得到一个以 ATG 为起始密码子, 编码 140 个氨基酸的开放阅读框。蛋白质质量为 15 ku, 含量较丰富的氨基酸为 Ala、Glu、Gly 和 Ile, 摩尔分数分别为 15%, 9.29%, 7.86% 和 7.86%, 不含 Trp。起始端具有亲水性, 末端具有较强的疏水性。在 NCBI 数据库中将序列进行 Blastx 比对, 翻译后的氨基酸序列与 *Loktanella vestfoldensis* SKA53, *Jannaschia* sp. CCS1, *Roseobacter* sp. CCS2 的 NDPK 氨基酸序列相似性分别为 89%, 86% 和 85%。将这些序列用 clustalw2 进行分析, 结果见图 1, 该酶比较保守。

对蛋白质的活性位点进行分析 (<http://www.expasy.ch/prosite/>), 在 114~122 位置有 NDPK 的活性位点: NSEHGSDAP。

<i>Jannaschia</i>	MAIQRFSII KPDATKRNL GQIAAKFEEA GLRIVASKRI QLTLAQAQAF YGVHISRPFF 60
<i>Roseobacter</i>	MAIQRFSII KPDATKRNL GQIAAKFEDA GLRIVASKRI QLTLAQAQAF YGVHAERPFF 60
<i>Loktanella</i>	MAIQRFSII KPDATKRNL GAIVAKFEEA GLRIVASKRI HLTLAQAQAF YGVHKDRPFF 60
<i>Halomonas</i>	MAIQRFSII KPDATKRNL GAIVAKFEEA GLRVIASKRI QMTLAQAQVF YGVHKDRPFF 60
	*****:* * ***** * * .***:* ***:***** :***** * **** :****
<i>Jannaschia</i>	GELCEFMISE PIVVQVLEGE DAIVKNREVM GATNPADAAP GTIRKEFALS IGENSVHGSD 120
<i>Roseobacter</i>	DELCEFMISE PIVVQVLEGE DAIKNREVM GATNPADAAP GTIRKEFALS IGENSVHGSD 120
<i>Loktanella</i>	GELCEFMISE PIVVQVLEGE DAIKNREVM GATNPADAAP GTIRKEFALS IGENSVHGSD 120
<i>Halomonas</i>	GELCDFMISE PVVQVLEGE NAIKNREIM GATNPADAAP GTIRAEFALS VGENSEHGSD 120
	.***:***** *:***** :**.****:* ***** ***** ***** :**** ****
<i>Jannaschia</i>	APETAAEEIA FFFSGLELVG 140
<i>Roseobacter</i>	APETAAEEIA FFFSGLELVG 140
<i>Loktanella</i>	APETAAEEIA FFFSGLELVG 140
<i>Halomonas</i>	APETAAEEIA YFFSGLELVG 140
	***** ***.*****

图 1 4 个核苷二磷酸激酶氨基酸序列比对结果

Fig. 1 The blast result of four nucleoside diphosphate kinase sequences

“\*”代表完全一致的序列; “:”代表保守替代; “.”代表半保守替代

“\*” indicate amino acid identity; “:” indicate bigger difference; “.” indicate difference

### 3 讨论

聚磷菌能将外界环境中的磷吸收到体内,并以多聚磷酸盐的形式储存<sup>[10]</sup>。多聚磷酸盐对于细胞的生存和生长有很重要的作用:能量储存库、重金属螯合剂(如:锰和钙)、缓冲剂等<sup>[11]</sup>,但目前对于多聚磷酸盐的形成过程以及过程调控还不是很清楚。NDPK 能够调节细胞中 NTP 的浓度<sup>[1]</sup>,从而可能影响细胞对磷的吸收能力。作者从海洋聚磷菌 *Halomonas* YSR-3 中克隆到 NDPK 基因,为提高该菌的磷吸收能力开辟了新的研究途径。可以将 NDPK 基因进行突变,构建突变株,测定其对磷的吸收量是否有变化,从而对 NDPK 的功能以及菌体形成多聚磷酸盐的途径进行深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Berg P, Joklik W K. Transphosphorylation between nucleoside polyphosphates[J]. *Nature*, 1953, **172**(4 387): 1 008-1 009.
- [2] Tee Y T, Chen C D, Lin LY, *et al.* Nm23-H1: a metastasis-associated gene[J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2006, **45**(2): 1 007-1 013.
- [3] Ma D, Xing Z, Liu B, *et al.* NM23-H1 and NM23-H2 repress transcriptional activities of nuclease-hypersensitive elements in the platelet-derived growth factor-A promoter[J]. *J Biol Chem*, 2002, **277**(2): 1 560-1 567.
- [4] Narayanan R, Ramaswami M. Regulation of dynamin by

- nucleoside diphosphate kinase[J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2003, **35**(1): 49-55.
- [5] Che G, Chen J, Liu L, *et al.* Transfection of nm23-H1 increased expression of beta-Catenin, E-Cadherin and TIMP-1 and decreased the expression of MMP-2, CD44v6 and VEGF and inhibited the metastatic potential of human non-small cell lung cancer cell line L9981[J]. *Neoplasia*, 2006, **53**(6): 530-537.
- [6] 任世英, 王子峰, 肖天, 等. 一株海洋聚磷菌 YSR-3 的分离与鉴定[J]. *海洋与湖沼*, 2006, **37**(5): 437-443.
- [7] Zago A, Chugani S, Chakrabarty A M. Cloning and characterization of polyphosphate kinase and exopolyphosphatase genes from *Pseudomonas aeruginosa* 8830[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**(5): 2 065-2 071.
- [8] Zobell C E. *Marine Microbiology*[M]. Waltham, USA: Chronica Botanica Company, 1946.240-241.
- [9] Bosshard P P, Santini Y, Grüter D, *et al.* Bacterial diversity and community composition in the chemocline of the meromictic alpine Lake Cadagno as revealed by 16S rDNA analysis[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2000, **31**(3): 173-182.
- [10] Stante L, Cellamare C M. Biological phosphorus removal by pure culture of *Lamprodedla* spp. [J]. *Water Research*, 1997, **31**(6): 1 317-1 324.
- [11] Kornberg A. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable[J]. *Journal of Bacteriology*, 1995, **177**(3): 491-496.

## Cloning and analyse of nucleoside diphosphate kinase gene sequence from marine polyphosphate-accumulating bacterium, *Halomonas* YSR-3

REN Shi-ying<sup>1, 2</sup>, XIAO Tian<sup>1</sup>

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Feb., 28, 2008

**Key words:** *Halomonas*; polyphosphate-accumulating bacterium; nucleoside diphosphate kinase (NDPK)

**Abstract:** Nucleoside diphosphate kinase (NDPK) gene was amplified from marine polyphosphate-accumulating bacterium *Halomonas* YSR-3 by PCR and molecular clone techniques and inserted into a pGM-T vector. The recombinant plasmid was transformed into an *Escherichia coli* TOP10 strain. The positive transformants with NDPK gene were obtained by blue-white selection and clony PCR method, then the positive ones were sequenced. The sequenced fragment concluded 420 pairs of bases and was analyzed by NCBI database. The similarities of translated sequence of YSR-3 NDPK gene to *Loktanella vestfoldensis* SKA53, *Jannaschia* sp. CCS1, and *Roseobacter* sp. CCS2 are 89%, 86%, and 85% respectively. (本文编辑: 张培新)