

沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*) 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/氧化酶基因克隆 及其在大肠杆菌中的表达*

杜翠红¹ 刘静雯¹ 周集体²

(1. 集美大学生物工程学院 厦门 361021; 2. 大连理工大学环境与生命学院 大连 116023)

摘要 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/氧化酶(RubisCO)(EC 4.1.139)是光合细菌通过卡尔文循环固定二氧化碳的关键酶。本文采用 PCR 方法,从沼泽红假单胞菌株 No.9 中克隆到 RubisCO 基因(*cbbM*)序列(该序列已提交 GenBank, 登录号: GU061327)。采用同源建模法,建立了该 RubisCO 蛋白的三维结构模型,预测其活性位点。将 *cbbM* 基因亚克隆到表达载体 pTV118N 上,构建表达质粒 pTV-CBBM,转化大肠杆菌 BL21(DE3),获得表达菌株 BL21(DE3)/pTV-CBBM,该菌株经 IPTG 诱导表达后,进行 SDS-PAGE 检测。采用气相色谱法测定破菌上清中的 RubisCO 酶活。结果表明: *cbbM* 基因编码 461 个氨基酸,与沼泽红假单胞菌株 DCP3 和 DH1 的 RubisCO 蛋白序列相似性分别为 98%和 99%;推测沼泽红假单胞菌 No.9 中 RubisCO 蛋白的活性中心由 Asn112、Lys192、Asp194、Glu195、His288、Arg289、His322、Gly424、Ser369、Gly370 和 Gly394 等氨基酸残基组成;重组蛋白分子量约为 50kDa 左右,与预测相符;破菌上清中的 RubisCO 酶比活高于原始菌株中的酶活,说明目的基因在大肠杆菌中得到了有效表达。

关键词 沼泽红假单胞菌,核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/氧化酶(RubisCO),基因克隆,大肠杆菌,重组表达

中图分类号 Q943

随着工农业的不断发展,环境污染越来越严重,其中,大气污染已引起全球气候的变化。目前,“温室效应”已成为全球关注的热点,而 CO₂ 是对其影响最大的气体。为了解决“温室效应”这一重大的环境污染问题,世界各地都注重对 CO₂ 固定的研究。利用自养微生物将 CO₂ 转化为有机碳,在环境、资源和能源等方面具有极其重要的意义。沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*, *Rps. palustris*)属于紫色非硫杆菌,它是一种适应能力很强的光合细菌,可以在好氧和厌氧条件下固定二氧化碳(Du *et al.*, 2003a),其主要的生化机制为卡尔文循环,其中关键酶为核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(RubisCO) (EC 4.1.139)

(Falcone *et al.*, 1993)。关于其它紫色非硫杆菌(如: *Rhodopseudomonas sphaeroides* 和 *Rhodopseudomonas capsulatus* 等)的 RubisCO 的特性、基因结构及基因表达已有不少报道(Quivey *et al.*, 1984; Larimer *et al.*, 1997),但关于沼泽红假单胞菌的 RubisCO 的研究报道的并不多(周集体等, 1999; Du *et al.*, 2003b)。为了考察沼泽红假单胞菌与其它紫色非硫杆菌的 RubisCO 基因结构和表达的差异性,首先需将沼泽红假单胞菌 RubisCO 基因进行克隆、测序和表达,并建立一套快捷而又高效的表达系统。

本研究根据 GeneBank AF355197(源于 *Rps. palustris* DCP3)和 AY155466(源于 *Rps. palustris* DH1)报

* 福建省科技重点项目资助, 2009N0042 号; 集美大学中青年创新团队专项基金资助, 2006A002 号。通讯作者: 杜翠红, 副教授, E-mail: cuihongdu@jmu.edu.cn

收稿日期: 2009-11-25, 收修改稿日期: 2009-12-23

道的 RubisCO 基因(*cbbM*)序列设计特异性引物, 通过 PCR 技术, 从沼泽红假单胞菌株 No.9 的基因组 DNA 中扩增到 *cbbM* 基因。DNA 测序后推测其氨基酸序列, 采用同源建模法, 建立了该 RubisCO 蛋白的三维结构模型, 从而预测其活性位点。并将其在大肠杆菌中得到了有效表达, 为进一步研究其基因结构和基因工程改造奠定了基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

沼泽红假单胞菌(*Rps. palustris* NO.9)由日本地球环境产业技术研究所惠赠; 大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 和 BL21(DE3)、载体 pMD18-T 和 pTV118N 均购自 TaKaRa(大连)公司; 所用的各种限制性内切酶、连接酶、DNA 片段回收试剂盒及 *Taq* DNA 聚合酶等均为 TaKaRa 公司产品; 用于琼脂糖电泳和 SDS-PAGE 电泳的有关试剂购自华美生化试剂公司; 用于 RubisCO 酶活测定的有关试剂购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 沼泽红假单胞菌基因组 DNA 的提取 基因组 DNA 的提取是在文献(孙克非等, 2000)的基础上加以改进。将厌氧培养的沼泽红假单胞菌液离心后, 用 tris-EDTA(TE)缓冲液洗涤三次, 分别在 -20℃ 冰箱和 37℃ 水浴中冻融两次(因该菌的细胞壁较厚), 将其悬浮在 TE 溶液中(pH 8.0), 然后加入溶菌酶(终浓度为 1mg/ml), 37℃ 水浴 30min, 加入 10% 的 SDS 至终浓度 1.6%, 65℃ 轻摇 30min, 冷却到室温后, 加入 5mol/L KAc 至终浓度 0.5mol/L, 置于冰浴 2h, 加入等体积的氯仿(除去大部分色素), 低温离心, 取上清, 用苯酚/氯仿、氯仿各抽提一次, 上清加入 2 倍体积的冷乙醇, -20℃ 放置 1h, 离心取沉淀, 晾干后加适量 TE 溶解, 加入 Rnase 至终浓度 10mg/L, 37℃ 水浴 1h, 即为基因组 DNA 的提取液。取 10μl 作琼脂糖电泳检测。

1.2.2 RubisCO 基因(*cbbM*)片段的扩增 根据 GeneBank AF355197 和 AY155466 报道的 RubisCO 基因(*cbbM*)序列, 设计特异性引物: 上游引物 F 序列为 5'-TACCATGGACCAGTCGAACCGCTAC-3'(引入 *Nco* I 酶切位点, 以下划线标注); 下游引物 R 序列为 5'-TCAGGATCCTTACGCCGCTGCGGCTTCAGC-3'(引入 *Bam*H I 酶切位点, 以下划线标注), 引物由大连宝生物(TaKaRa)有限公司合成。以 1.2.1 所得的基因组 DNA 为模板, 在 50μl 反应体系中(无菌 ddH₂O

33.75μl, 10×缓冲液 5μl, dNTP 4μl, 模板 5μl, 引物 F 1μl (20pmol/μl), 引物 R 1μl (20pmol/μl), *Taq* 酶 0.25μl)进行 PCR, 反应条件为: 94℃ 预变性 3min; 94℃ 30s, 55℃ 60s, 72℃ 90s, 扩增 30 个循环; 72℃ 延伸 7min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶检测、回收。

1.2.3 重组克隆质粒的构建及测序 取以上 PCR 产物 2μl 与 1μl 的载体 pMD18-T 用 DNA 连接试剂盒 16℃ 连接过夜。连接产物转化感受态大肠杆菌 JM109。在含 4μl IPTG(浓度为 200mg/ml)、40μl X-gal(浓度为 20mg/ml)及 100μg/ml 氨苄青霉素的 LB 平板上挑选白色菌落, 37℃ 过夜培养后, 用快速质粒小量提取试剂盒提取重组克隆质粒(pMD18-T-CBBM), 经 PCR 鉴定后, 送上海英俊生物技术有限公司测序。

1.2.4 沼泽红假单胞菌 RubisCO 蛋白的生物信息学分析 利用 GeneDoc、Blast 等软件对测序结果进行分析并与 GeneBank 上发表的序列进行相似性比较, 应用互联网相关蛋白分析软件及生物信息学网站对所获得的该 RubisCO 蛋白的理化参数及二级结构进行预测(孙之荣, 2006)。利用 Swiss PdbViewer 软件, 选择 Project Mode, 以基于 SWISS-MODEL 服务器的同源建模方法(Arnold *et al*, 2006), 构建沼泽红假单胞菌 RubisCO 蛋白的三级结构模型, 利用 PyMol 软件对模型进行相关分析及显示。

1.2.5 RubisCO 基因(*cbbM*)在大肠杆菌中的表达 将重组克隆质粒 pMD18-T-CBBM 和表达载体 pTV118N 分别用 *Nco* I 和 *Bam*H I 双酶切, 用 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化后, 取 *cbbM* 基因片段 2μl 与 1μl 的表达载体 pTV118N, 16℃ 连接过夜。连接产物转化感受态大肠杆菌 BL21(DE3)后, 涂布于含 100μg/ml 氨苄青霉素的 LB(LA)平板上, 采用菌落 PCR 筛选阳性克隆。挑取阳性单菌落于 LA 培养基中, 37℃ 过夜培养后, 按 1:100 接种于新鲜 LA 培养基中, 37℃ 培养至 A₆₀₀ 为 0.6 左右, 加入终浓度为 0.5mmol/L 的 IPTG 在 25℃ 下诱导表达 8h。4℃ 下, 以 8000r/min, 离心 10min, 收集菌体。加 20 倍体积的 TEMM 缓冲液(20mmol/L Tris.HCl (pH 8.0), 1mmol/L EDTA, 10mmol/L MgCl₂, 5mmol/L 2-巯基乙醇)悬浮菌体, 在冰浴中超声波破碎 10min。4℃ 下, 以 12000r/min, 离心 10min, 收集上清(即为粗酶液), 进行 12% SDS-PAGE 分析及 RubisCO 酶活测定。

1.2.6 RubisCO 酶活测定 采用气相色谱法(曾福礼等, 1995)测定 RubisCO 酶活。取以上粗酶液 1.2ml

和 147.89mmol/L NaHCO₃ 溶液 0.5ml, 在“青霉素”小瓶中密封, 30 °C 保温 15min 活化, 然后加入 50mmol/L 的 RuBp 0.1ml (以不加 RuBp 的样品作为对照组), 开始反应。反应 3min 后, 注入 6mol/L 的 HCl 1ml, 充分振荡, 置 -20 °C 冰箱中, 使溶液结冻。用注射器取顶气 1ml 上柱分析, 测定 CO₂ 浓度。对照组所测定顶气中 CO₂ 的量减去加 RuBp 反应体系顶气中 CO₂ 的量, 以此计算出酶反应所消耗的 CO₂ 的量。以单位粗酶量 (mg 蛋白), 在单位时间 (min) 中所消耗的 CO₂ 的量来表示 RubisCO 酶的比活。采用考马斯亮蓝 G-250 染色法 (Marshak *et al*, 1996) 测定粗酶液中蛋白质的总含量, 牛血清白蛋白作为标准蛋白。

2 结果与分析

2.1 沼泽红假单胞菌基因组 DNA 提取与 PCR 扩增

从沼泽红假单胞菌中提取的基因组 DNA, 经 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测 (图略) 表明无明显断裂和裂解。以该基因组 DNA 为模板, 用以上设计的扩增 *cbbM* 基因片段的特异引物 F 和 R 进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测可见一条约 1.4kb 的片段 (图 1), 与文献 (Oda *et al*, 2004; Du *et al*, 2003b) 报道的 *cbbM* 基因大小类似。

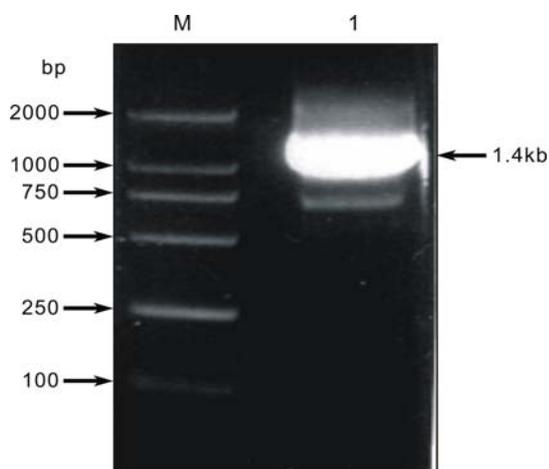


图 1 PCR 产物琼脂糖凝胶 (1.0%) 电泳检测图

Fig.1 Agarose gel (1.0%) electrophoresis of the PCR product
注: M 为 DL2000 DNA Marker, 1 为 PCR 产物

2.2 RubisCO 基因重组克隆质粒鉴定及测序

重组克隆质粒 pMD18-T-CBBM, 经过 PCR 验证后 (图略), 进行测序。测序结果表明, 该 PCR 产物长度为 1386bp, 具有完整的阅读框架, 编码 461 个氨基酸。将测序结果递交 GeneBank 数据库, 获得登录号

为 GU061327, 对应的氨基酸序列号为 ACY35993。

2.3 沼泽红假单胞菌 RubisCO 蛋白的生物信息学分析

利用 Genedoc 软件将本实验菌株沼泽红假单胞菌 No.9 的 RubisCO 蛋白序列与 GeneBank 上登录的其它来源的 RubisCO 蛋白序列进行序列比对。比对结果 (表 1) 发现, 测序结果与来自同一菌属的菌株 *Rps. palustris* DCP3 (AF355197) 和 *Rps. palustris* DH1 (AY155466) 的相似性分别为 98% 和 99%; 而与其它菌属的光合细菌 *Rhodospirillum rubrum* (PDB code: 9RUB) 的相似性为 74%。

表 1 源于 *Rps. palustris* No.9 的 RubisCO 蛋白氨基酸序列与其它菌株相似性比对结果

Tab.1 Comparison of the deduced amino acid sequence of RubisCO from *Rps. palustris* No.9 with those from other strains

<i>Rps. palustris</i> No.9 (GenBank code GU0613227)	氨基酸序列的相似性 (%)
<i>Rps. palustris</i> DH1 (GenBank code AY155466)	99
<i>Rps. palustris</i> DCP3 (GenBank code AF355197)	98
<i>R. rubrum</i> (PDB code 9RUB)	74

利用网络上的一些工具对该 RubisCO 蛋白进行一些预测, 希望获取更多关于该酶家族信息, 为其基因改造提供有益参考。

ProtParam (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>) 预测该蛋白分子量为 50.45kDa; 等电点 pI 6.12; 理论推导半衰期为大于 10h, 推算不稳参数为 35.0, 属于稳定蛋白。

GOR IV (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gor4.pl) 预测该蛋白二级结构中包含螺旋 (Alpha helix)、延伸带 (Extended strand) 和随机卷曲 (Random coil) 三种形式, 分别占 36.88%、15.40% 和 47.72% 比例。

为了进一步获得该 RubisCO 蛋白的结构与功能的信息, 从该蛋白的氨基酸序列 (ACY35993) 出发, 在蛋白数据库 (PDB) 中进行 BLAST 搜索, 结果表明, 该 RubisCO 蛋白与来自 *Rhodospirillum rubrum* 的 RubisCO 蛋白 (PDB 编码为 9RUB) 具有 74% 的序列一致性。利用 Swiss PdbViewer 软件和 SWISS-MODEL 服务器开展模型构建工作。采用 9RUB 作为模板序列, 构建了沼泽红假单胞菌 RubisCO 蛋白的三级结构模型。结果表明, 所预测的 RubisCO 蛋白三级结构 (图 2A) 与模板蛋白 (图 2B) 的非常相似, 因此, 可根据模板蛋白的活性位点 (Lundqvist *et al*, 1991), 推测沼泽红假单胞菌 RubisCO 蛋白的活性中心由 Asn112、

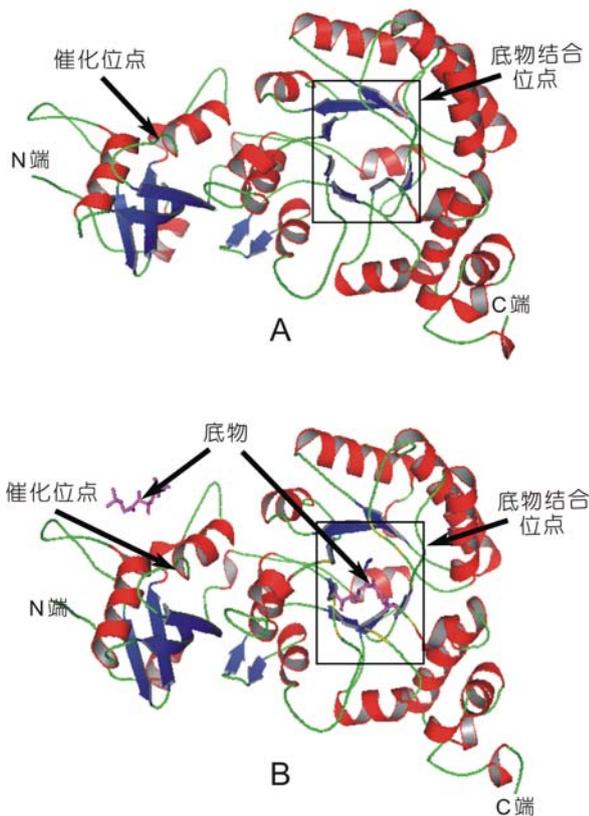


图2 利用 9RUB 蛋白三级结构(B)为模板构建菌株 *Rps. palustris* NO.9 的 RubisCO 三级结构模型(A)

Fig.2 The predicted three-dimensional structure of RubisCO from *Rps. palustris* NO.9 (A) was constructed using the three-dimensional structure of RubisCO from *R. rubrum* (PDB code, 9RUB) as a template (B)

Lys192、Asp194、Glu195、His288、Arg289、His322、Gly424、Ser369、Gly370 和 Gly394 等氨基酸残基组成。
2.4 沼泽红假单胞菌 RubisCO 基因在大肠杆菌中的表达

将沼泽红假单胞菌 RubisCO 基因(*cbbM*)从重组克隆质粒 pMD18-T-CBBM 中克隆到表达载体 pTV118N 上, 构建重组表达质粒 pTV-CBBM(图3)。将重组表达质粒 pTV-CBBM 转化感受态大肠杆菌 BL21(DE3)中, 采用菌落 PCR 筛选阳性克隆(图4), 获得表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3)/pTV-CBBM。将该菌株接种于 LB 培养基中(含 100 μ g/ml 氨苄青霉素), 37 $^{\circ}$ C 培养至 A_{600} 至 0.6 左右, 加入终浓度为 0.5mmol/L 的 IPTG, 25 $^{\circ}$ C 下诱导表达 8h, 离心收集菌体, 超声波破碎后, 收集上清进行 SDS-PAGE 分析。结果表明, 经 IPTG 诱导表达的重组蛋白分子量为 50kDa 左右(图5), 与 2.3 中预测的分子量大小一致, 经凝胶自动扫描分析, 表达的重组蛋白占菌体总蛋白的 10%左右。

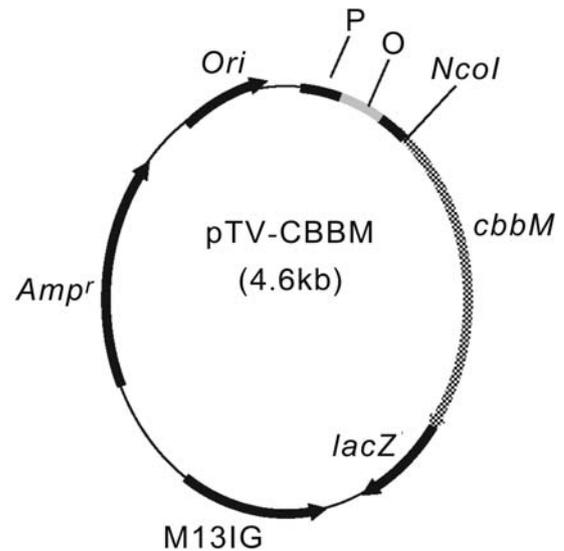


图3 表达质粒 pTV-CBBM 示意图

Fig.3 Expression plasmid pTV-CBBM

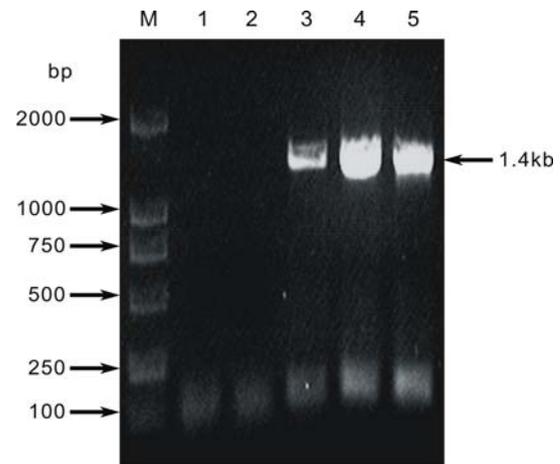


图4 菌落 PCR 筛选 pTV-CBBM 阳性克隆琼脂糖凝胶 (1.0%)电泳检测图

Fig.4 Agarose gel (1.0%) electrophoresis of PCR products for screening positive clone of pTV-CBBM

注: M 为 DL2000 DNA Marker, 1 为阴性对照, 3—6 为 PCR 产物

2.5 重组 RubisCO 酶活测定

为了进一步确定上述表达蛋白为 RubisCO 酶, 将大肠杆菌菌株 DL21(DE3)/(pTV-CBBM)和 BL21 (DE3), 在 25 $^{\circ}$ C 培养, 分别进行诱导和不诱导, 提取粗酶后, 采用气相色谱法测定其 RubisCO 酶活(表2)。从表 2 中可以看出大肠杆菌菌株 DL21(DE3)/(pTV-CBBM)经 IPTG 诱导表达后获得的重组蛋白中含有 RubisCO 酶, 该酶的比活高于原始菌株中 RubisCO 比活, 即重组蛋白中的 RubisCO 酶含量大于原始菌株, 从而说明目的基因在大肠杆菌中得到了有效表达。

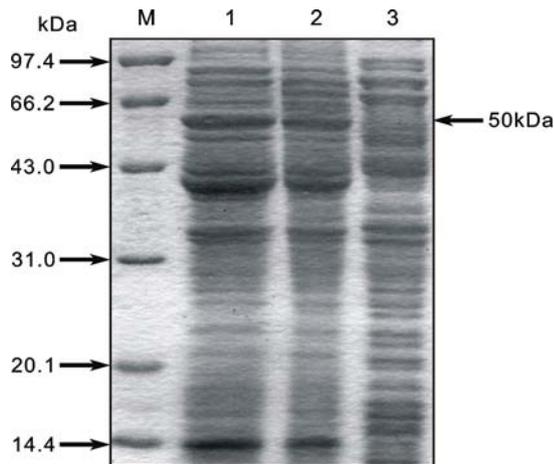


图5 大肠杆菌表达重组蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (12%, W/V)电泳检测图

Fig.5 SDS-PAGE (12%, W/V) analysis of recombinant proteins expressed in *E. coli*

注: M 为 Protein MW marker, 1 为 IPTG 诱导菌株

BL21(DE3)/pTV-CBBM 后的破菌上清, 2 为 IPTG 诱导之前菌株 BL21(DE3)/pTV-CBBM 的破菌上清, 3 为菌株 BL21(DE3) 的破菌上清

3 讨论

近年来, 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶 (RubisCO) 基因的克隆和表达方面已取得了不少进展, 其中包括高等植物 (Thomas-Hall *et al.*, 2007)、藻类 (孙雪等, 2008) 和微生物 (Stoner *et al.*, 1993)。由于 RubisCO 同时具有羧化酶和氧化酶的功能, 它对 CO_2 的固定能力很低, 为此, 有必要借助基因工程的手段改变 RubisCO 基因结构提高其羧化与加氧反应的比值。作为基因工程改造的前提, 需要获得大量不同来源的 RubisCO 基因序列和氨基酸组成的信息, 通过同源性比较, 推测其活性中心, 为定点突变奠定基础。

本研究是在已报道的 *cbbM* 基因序列的基础上, 采用 PCR 技术克隆得到来自沼泽红假单胞菌株 No.9 的 *cbbM* 基因, 该基因序列与文献报道的同一菌属的相应序列相比, 相似性为 96%, 对应的氨基酸的相似

性为 98%—99%, 这可能反映了菌种之间的个体差异。另外, 将来自沼泽红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas palustris*) 与其它光合细菌 (如 *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodospirillum rubrum* 和 *Rhodospseudomonas capsulatus* 等) (Stephen *et al.*, 1988; Nargang *et al.*, 1984; Larimer *et al.*, 1997) 的 RubisCO 氨基酸序列相比, 相似性为 74%—90% (Du *et al.*, 2003b); 与高等植物相比, 相似性只有 40% 左右 (Thomas-Hall *et al.*, 2007; Du *et al.*, 2003b)。因此, 可以根据同源性较高的基因序列, 找出最保守基因片段, 设计 PCR 引物, 采用 PCR 技术克隆到更多的其它来源的 *cbbM* 基因; 另一方面, 可以通过比较同源性较低的氨基酸序列, 找到最保守的氨基酸区域, 推测 RubisCO 酶的活性中心位点。另外, 随着生物信息学这一新兴交叉学科的出现, 人们可根据蛋白质的氨基酸序列, 利用相关蛋白分析软件及生物信息学数据库和网站对某蛋白的理化参数及其结构进行预测 (孙之荣, 2006)。本文对该沼泽红假单胞菌的 RubisCO 蛋白进行了相关生物信息学分析, 预测了其理论分子量大小、等电点及二级结构组成等, 采用同源建模方法, 以源于 *Rhodospirillum rubrum* (*R. rubrum*) 的 RubisCO 蛋白的三级结构为模板, 构建了沼泽红假单胞菌 RubisCO 蛋白的三级结构模型。而来自 *R. rubrum* 的 RubisCO 酶已被纯化, 通过 X-衍射得到了其空间结构, 其活性中心由 Asn111、Lys191、Asp193、Glu194、His287、Arg288、His321、Gly423、Ser368、Gly379 和 Gly393 等氨基酸残基组成 (Lundqvist *et al.*, 1991) (图 2B), 由此可以推测沼泽红假单胞菌 RubisCO 蛋白的活性中心所对应的氨基酸残基组成 (图 2A), 从而为研究其结构与功能及定点突变提供了有用的信息。

为进一步研究 RubisCO 的基因结构、酶学特性及进行基因工程改造, 需要建立一套快捷而又高效的表达系统。本研究选择了培养条件简单、生长速度快的大肠杆菌作为受体, 在表达载体 pTV118N 的基

表2 不同大肠杆菌菌株的 RubisCO 酶活比较
Tab.2 Specific activities of RubisCOs expressed in different strains *E. coli*

菌株	IPTG 诱导下的 RubisCO 酶活* (IU/mg 蛋白)	无 IPTG 诱导下的 RubisCO 酶活* (IU/mg 蛋白)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) / (pTV-CBBM)	0.215±0.004	0.020±0.002
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	0.0	0.0
<i>Rps. palustris</i>	0.159**	

* RubisCO 酶的比活是指每 mg 粗酶在每 min 内所消耗的 CO_2 的 μmol 数;

** 该数据来源于文献 (Du *et al.*, 2003a)

基础上, 构建了表达质粒 pTV-CBBM, 使 *cbmM* 基因在大肠杆菌 DL21 中得到了有效的表达, 表达量高于原始菌株中的 RubisCO 酶量。其中, 表达载体 pTV118N 是在载体 pUC118 基础上改造的, 即在其启动基因(P)和操纵基因(O)的下游引入了一个特殊的酶切位点 *Nco* I(CCATGG)。当外源基因通过酶切位点 *Nco* I 插入到载体 pTV118N 上时, 起始密码子(ATG)与核糖体结合位点之间距离为 7 个碱基, 有利于外源基因的表达, 且得到的外源蛋白为非融合蛋白, 不需对重组蛋白进行纯化即可测得其粗酶活性, 可作为基因突变筛选的快捷而又高效的表达系统。

另外, 针对光合细菌(包括沼泽红假单胞菌)细胞壁较厚、色素含量高等特点, 本研究对光合细菌基因组 DNA 提取方法进行了一些改进: (1) 采用多次冻融、加大溶菌酶用量和 SDS 升温处理共同作用, 使细胞壁充分裂解; (2) 在离心分离 DNA 之前, 加入氯仿可除去大量的色素, 有利于 DNA 的纯化, 并能提高 DNA 的收率。这对细胞壁较厚及色素含量高的其它菌株基因组 DNA 的提取也提供了有益的参考。

参 考 文 献

- 孙 雪, 马 斌, 周成旭, 2008. 蛋白核小球藻核酮糖 1, 5 二磷酸羧化/加氧酶小亚基部分基因序列的克隆与分析. 海洋科学, 32(3): 40—43
- 孙之荣, 2006. 生物信息学与功能基因组学. 北京: 化学工业出版社, 223—296
- 孙克非, 郑 平, 钱新民等, 2000. 沼泽红假单胞菌染色体的提取. 生物技术, 10(3): 47—48
- 周集体, 王 竞, 杨凤林等, 1999. 红假单胞菌 R18 二氧化碳固定基因的序列测定及其表达. 大连理工大学学报, 39(6): 741—745
- 曾福礼, 浦铜良, 刘复权, 1995. 气相色谱法测定 RuBp 羧化酶活性的研究. 西北植物学报, 15(5): 38—44
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J *et al*, 2006. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics*, 22(2): 195—201
- Du C H, Zhou J T, Wang J *et al*, 2003a. Construction of a genetically engineered microorganism for CO₂ fixation using a *Rhodospseudomonas/Escherichia coli* shuttle vector. *FEMS Microbiol Lett*, 225(1): 69—73
- Du C H, Zhou J T, Yan B *et al*, 2003b. Subcloning and sequencing of the form II ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Rhodospseudomonas palustris*. *High Technology Letters*, 9(3): 54—59
- Falcone D L, Tabita F R, 1993. Complementation analysis and regulation of carbon dioxide fixation gene expression in a ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase deletion strain of *Rhodospirillum rubrum*. *J Bacteriol*, 175(16): 5066—5077
- Larimer F W, Lu T Y, Buley D M, 1997. Sequence and expression of the form II ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase gene from *Rhodoseudomonas capsulatus*. *FASEB J*, 9: A1275—A1278
- Lundqvist T, Schneider G, 1991. Crystal structure of activated ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase complexed with its substrate, ribulose-1,5-bisphosphate. *J Biol Chem*, 266(19): 12604—12611
- Marshak D R, Kadonaga J T, Burges R R *et al*, 1996. Strategies for purification and characterization: a laboratory course manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 158—159
- Nargang F, Mcintosh L, Somerville C, 1984. Nucleotide sequence of the Ribulosebisphosphate carboxylase from *Rhodospirillum rubrum*. *Mol Gen Genet*, 193: 220—224
- Oda Y, Meijer W G, Gibson J L, 2004. Analysis of diversity among 3-chlorobenzoate-degrading strains of *Rhodospseudomonas palustris*. *Microb Ecol*, 47(1): 68—79
- Quivey R G J, Tabita F R, 1984. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the form II ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase gene from *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Gene*, 31(1): 91—101
- Stephen J W, Stevens S E, Nixon B T *et al*, 1988. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *Rhodobacter sphaeroides* gene encoding form II ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and comparison with other deduced form I and form II sequences. *FEMS Microbiol Lett*, 55: 217—222
- Stoner M T, Shively J M, 1993. Cloning and expression of the D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase form II gene from *Thiobacillus intermedius* in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 107(2): 287—292
- Thomas-Hall S, Campbell P R, Carlens K *et al*, 2007. Phylogenetic and molecular analysis of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit gene family in banana. *J Exp Bot*, 58(10): 2685—2697

CLONING AND EXPRESSION OF THE *RHODOPSEUDOMONAS PALUSTRIS* RIBULOSE-1,5-BISPHOSPHATE CARBOXYLASE/OXYGENASE GENE IN *ESCHERICHIA COLI*

DU Cui-Hong¹, LIU Jing-Wen¹, ZHOU Ji-Ti²

(1. College of Bio-Engineering, Jimei University, Xiamen, 361021; 2. School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian, 116023)

Abstract Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) (EC 4.1.139) is one of key enzymes of the Calvin cycle. In order to further study the gene structure, enzyme characteristics and site-directed mutagenesis of RubisCO, it is necessary to establish a fast, efficient expression system. In this study, the *cbbM* gene encoding RubisCO was cloned from *Rhodopseudomonas palustris* No.9 genomic DNA by PCR. The result of sequencing indicates that the *cbbM* gene encodes 461 amino acid residues and its homology with those of *Rps. palustris* DCP3 and DH1 are 98% and 99%, respectively. The *cbbM* gene has been deposited in the GenBank Data Libraries under the accession number GU061327. The three-dimensional structure of *Rps. palustris* RubisCO was constructed by homology modeling to predict its active sites. Expression plasmid pTV-CBBM was constructed by inserting the *cbbM* gene into plasmid pTV118N. The expression plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) to express recombinant RubisCO (rRubisCO). SDS-PAGE analysis revealed that a protein of about 50kDa was expressed, which was consistent with the predicted molecular mass. The specific activity of rRubisCO was higher than that from wild *Rps. palustris*, indicating that *cbbM* gene was efficiently expressed in *E. coli*.

Key words *Rhodopseudomonas palustris*, RubisCO, Gene clone, *Escherichia coli*, Recombinant expression