

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: S200426105

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

Shewanella piezotolerans WP3 中异柠檬酸
裂解酶 ICL 基因的克隆表达, 酶学性质研究
及在不同胁迫条件下的转录翻译表达

Expression and Characterization of Isocitrate Lyase of
Shewanella piezotolerans WP3 in various environment

指导教师姓名: 肖湘研究员

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2007 年 6 月 15 日

论文答辩时间: 2007 年 7 月 24 日

学位授予日期:

答辩委员会主席: 邵宗泽研究员

评 阅 人: _____

2007 年 7 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

摘要	I
Abstract	III
缩写词表	V
1 前言	1
1.1 深海微生物研究进展	1
1.2 微生物极端环境及适应性机理研究进展	4
1.2.1 深海生态环境的特征	5
1.2.2 深海微生物极端酶适应性机理	5
1.2.3 深海微生物极端酶的研究进展	9
1.2.4 深海微生物极端酶的应用	12
1.3 WP3 异柠檬酸裂合酶 ICL 的研究背景	13
1.3.1 WP3 的研究背景	13
1.3.2 异柠檬酸裂合酶 ICL 的研究概况	16
1.4 本论文的研究思路, 目的和意义	25
2 材料与方法	27
2.1 材料	27
2.2 方法	35
3 结果与讨论	50
3.1 WP3 异柠檬酸裂解酶 ICL 的克隆及 ICL 序列分析	50
3.1.1 异柠檬酸裂解酶基因的克隆	50
3.1.2 ICL 序列分析	51
3.2 WP3 异柠檬酸裂解酶 ICL 的表达及纯化	56
3.3 WP3 异柠檬酸裂解酶 ICL 的酶活性质	57
3.3.1 重组 ICL 的酶活力和酶活最适温度的测定	57
3.3.2 离子对重组 ICL 的影响	59
3.4 异柠檬酸裂解酶 ICL 在不同环境下的转录和翻译水平上的表达	59

3.4.1 温度对 ICL 转录水平表达的影响	60
3.4.2 压力对 ICL 转录水平表达的影响	64
3.4.3 底物对 ICL 转录水平表达的影响	66
3.4.4 底物对 ICL 翻译水平表达的影响	68
3.5 WP3icl 突变体的构建和研究	69
3.5.1 WP3icl 突变体的构建	69
3.5.2 WP3icl 突变体的研究	71
总结	73
参考文献	77

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Contents

Chinese abstract -----	I
English abstract -----	III
Abbreviations -----	V
1. Introduction -----	1
1.1 the research process of deep-sea microorganism -----	1
1.2 the extreme environment of deep-sea microorganism and their adaptive mechanism study -----	4
1.2.1 the character of deep-sea ecology surroundings-----	5
1.2.2 the adaptive mechanism of deep-sea microorganism extreme enzyme-----	5
1.2.3 the research process of deep-sea microorganism extreme enzyme-----	9
1.2.4 the uses of deep-sea microorganism extreme enzyme-----	12
1.3 the research context of isocitrate lyase of WP3 -----	13
1.3.1 the research context of WP3-----	13
1.3.2 the research context of isocitrate lyase-----	16
1.4 Purpose and signification of my thesis -----	25
2. Materials and methods -----	27
2.1 Materials -----	27
2.2 Methods -----	35
3. Results and discussion -----	50
3.1 analysis and clone of isocitrate lyase gene of WP3 -----	50
3.1.1 clone of isocitrate lyase gene of WP3-----	50
3.1.2 analysis of isocitrate lyase gene of WP3-----	51
3.2 heterogenous-expression and purification of isocitrate lyase of WP3 -----	56
3.3 enzyme property of isocitrate lyase -----	57
3.3.1 enzyme activity and optimum temperature of recombinant isocitrate lyase-----	57
3.3.2 iron effect to recombinant isocitrate lyase-----	59

3.4 the transcriptional and translational level of ICL expression in various environment -----	59
3.4.1 the temperature effect to icl transcriptional expression-----	60
3.4.2 the pressure effect to icl transcriptional expression-----	64
3.4.3 the substrate effect to icl transcriptional expression-----	66
3.4.4 the substrate effect to icl translational expression-----	68
3.5 the construction and research of WP3 Δicl mutant -----	69
3.5.1 the construction of WP3 Δ icl mutant-----	69
3.5.2 the research of WP3 Δ icl mutant-----	71
4. Summary -----	73
Referenece -----	77

厦门大学博士论文摘要库

摘要

本实验研究的是 *Shewanella piezotolerans* WP3 的异柠檬酸裂解酶，它是乙醛酸循环的关键酶，在 WP3 基因组里是单拷贝的。

WP3 分离自西太平洋 1914 米的深海沉积物中，它是一株革兰氏阴性，兼性厌氧的杆状细菌，耐冷并耐压。其生长温度范围是 0-28°C，最适生长温度是 20°C，生长压力范围是 0-50Mpa。最适生长压力为 20Mpa，是研究极端微生物适应极端环境的理想材料^[1]。

基因芯片的结果表明，当 WP3 处于一些环境因子，如生长温度、压力的变化，温度，压力的短时间刺激等，很多基因都有明显的改变。本实验从 WP3 的代谢途径的关键酶出发，探索极端微生物适应胁迫条件时（特别是比较明显的低温和高压条件）异柠檬酸裂解酶的特性和表达特征，进而为研究极端微生物的极端环境适应性机理研究奠定基础。

icl 的 ORF 有 1581bp，编码 526aa，预计分子量大小为 58KDa。Icl 的序列比对分析表明了 WP3icl 基因相对于其他中温菌的 icl 基因和嗜冷菌的 *Colwellia maris* 的适冷酶基因 icl 更为相似。为了深入研究 ICL 在各种环境下的代谢中所起的作用，我们构建了 WP3Icl 基因的原核表达质粒，在 *E. coli* 中表达后纯化重组 ICL，制备抗 ICL 的多克隆抗体，而且在转录和翻译水平上运用 Real-time PCR 和 Western Blotting 研究了 icl 基因的在各水平上的表达情况。为了研究 ICL 在乙醛酸循环，甚至 WP3 整个能量与物质代谢中的地位 and 角色，我们更进一步构建了 WP3 的 icl 的缺失突变体，并研究了 icl 缺失的情况下 WP3 的生长状况和它的底物竞争酶——异柠檬酸脱氢酶的表达变化。

酶活分析表明，ICL 不仅在序列上也是在酶活性上是一个冷适应酶，它的最适酶活温度是 25°C，但它不像 *C. maris* 一样是个冷诱导酶。在各个环境变化下的 icl 基因的转录，翻译水平都有明显的变化，在冷激、热激下，icl 基因在转录水平上都出现了明显的低表达，在低温下也有一定程度的下降，但是没有冷激的反应大。而在压力刺激和高压环境下生长时，都出现了高表达。通常低温和高压对深海耐压菌的很多基因具有相似作用方式、原理，特别是与膜流动性，渗透性相关的基因上，而在 WP3 中 ICL 对低温和高压的表达出现相反的趋势，这也是一个未来感兴趣的研究方向。ICL 对于乙酸的代谢，和其他大多数菌株一样，

是必需的，在转录、翻译水平都有高表达。而在 WP3 的 *icl* 突变体中，在 20°C 和 4°C 的菌株生长状况和野生菌相比，没有什么变化，我们推测在 WP3 中，乙醛酸循环只是起辅助的作用，即使菌株在相对恶劣的环境中，而 TCA 循环一直都是主要的代谢循环。而 *icl* 的缺失并没有导致异柠檬酸脱氢酶的表达上调，而是出现了表达下调，说明 ICL 和 IDH 的关系更多的是代谢过程中中间产物上的互助，支援互补关系，而不是底物的竞争关系。

关键词：*Shewanella piezotolerans* WP3；异柠檬酸裂解酶；实时荧光 PCR；基因表达；胁迫反应

Abstract

Isocitrate lyase, the key enzyme of glyoxylate cycle of a deep sea bacterium-*Shewanella piezotolerans* WP3, is unique in genome. ICL competes with isocitrate dehydrogenase of TCA cycle for its common substrate, isocitrate.

The bacterium used in this study was isolated from deep-sea sediments of west Pacific at the depth of 1914 meter. The phylogenetic analysis and molecular study shows that the bacterium is a psychrophilic and piezotolerant microbe which may be ideal to study the adaptation mechanism of extremophiles. And the result of microarray of WP3 under various environment factors displays significant changes in the gene expression related with cold and pressure shock, adaptation. The aim of present study is to find the adaptation mechanism of extremophiles and possible role of ICL gene involved in, under the extreme condition of temperature and pressure invitro.

The ICL gene of WP3 contains an openreading frame of 1581bp, encoding a 526aa residues protein with molecular mass of 58kDa. Sequence analysis of this gene revealed that it is highly homologous to the ICL genes of *Shewanella* species and also has homology to ICL gene of cold adapted *Colwellia maris* corresponding to some other mesophilic microorganisms. We cloned the ICL gene from WP3 and purified the enzyme to investigate specificity of the enzyme and the metabolic regulation. Then we studied the ICL gene at both transcriptional and translational level using real-time PCR and western blotting, respectively. Furthermore the ICL gene was knocked out to identify the role and function of ICL in isocitrate metabolism by WP3.

The ICL of WP3 exhibits many characteristic features of cold-adapted, thermolabile enzymes revealed by enzyme activity assays and has maximum enzyme activity at 25°C. But it is not a cold-inducible enzyme like that of *C.maris*. It efficiently responses to varying environment by changing its transcription and translation level. At sharply decreases its expression level with cold, heat shock and increase for the pressuring shock, adaptation. And it suggests that ICL is important for

acetate metabolism and is induced transcriptionally and translationally by acetate similar to the ICLs from other organisms. In *icl* mutant we unexpectedly observe the *idh* gene expression that IDH-II notably reduce the RNA level expression while IDH-I has no change, which means that *idh* expression does not increase to supply the glyoxylate cycle. The growing conditions at 20°C and 4°C differ relatively little from wide type while ICL is the key enzyme in glyoxylate cycle. These results show that the proportion of glyoxylate cycle in WP3 metabolism is very tiny even at low temperature and TCA cycle is always the main path at kinds of growth conditions. Probably the glyoxylate cycle and TCA cycle in WP3 cooperate for intermedia products instead of competing for substrate.

Keywords: *Shewanella piezotolerans* WP3; isocitrate lyase; Real-time PCR; gene expression; stress response

缩写词表 (Abbreviations)

bp	base pair 碱基对
PCR	polymerase chain reaction 聚合酶链式反应
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate 脱氧核苷三磷酸
ddH ₂ O	double distilled wate 双蒸水
DNA	deoxyribonucleic acid 脱氧核糖核酸
RNA	ribonucleic acid 核糖核酸
G+C	guanine+cytosine 鸟嘌呤+胞嘧啶
M	marker 分子量标记
TAE	Tris/acetate electrophoresis buffer Tris/醋酸电泳缓冲液
Taq	Thermos aquaticus 热聚合酶
TE	Tris/EDTA Tris/EDTA 缓冲盐溶液
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane 三羟甲基氨基甲烷
DEPC	diethypyrocarbonate 焦碳酸二乙脂
AP	Ammonium Persulfate 过硫酸胺
AP	Alkaline Phosphatase 碱性磷酸酶
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine N,N,N',N'-四甲基乙二胺
SDS	sodium dodecyl sulfate 十二烷基硫酸钠
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis 聚丙烯酰胺凝胶电泳
RNasin	RNase inhibtor RNA 酶抑制剂
MP	magepa 兆帕
UP1, UP2	universal primer1,2 通用引物 1, 2
kb	kilobase 千碱基对
mM	milmolar 毫摩尔
ml	mililitre 毫升
ul	microlitre 微升
μg	microgram 微克
min	minute 分钟
ORF	open reading frame 开放读码框

rpm	revolutions per minute 转/ 分钟
sec	second 秒
aa	amino acid 氨基酸
DTT	dithiothreitol 二硫苏糖醇
EDTA	ethylene diamine-tetra-acetic acid 乙二胺四乙酸
DMSO	dimethyl sulfoxide 二甲亚砜
IPTG	isopropylthio--D-galactoside 异丙基--D-半乳糖苷
X-Gal	5-bromo-4-choro-3-indolyl- β -D—galactopyranosi 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖吡喃
mRNA	messenger ribonucleic acid 信使核糖核酸
OD	optical density 光密度
RNase	ribonuclease RNA 酶
RT-PCR	reverse transcription-PCR 反转录聚合酶链式反应
BSA	Bovine Serum Albumin 小牛血清白蛋白
cDNA	complementary DNA 互补 DNA
E.coli	Escherichia coli 大肠杆菌
ICL	isocitrate lyase 异柠檬酸裂解酶
Icl	isocitrate lyase 异柠檬酸裂解酶基因
IclR	A repressor protein of aceBAK operon aceBAK 操纵子抑制子
IDH	isocitrate dehydrogenase 异柠檬酸脱氢酶
Idh	isocitrate dehydrogenase 异柠檬酸脱氢酶
MS	malate synthetase 苹果酸合成酶
WP3	<i>Shewanella piezotolerans</i> WP3 希瓦氏菌 WP3
IHF	integration host factor 整合作用宿主因子

1 前言

海洋占地球表面的70%以上,而深海一般指1000m以下的海洋,占地球海洋总体积的75%,地球上绝大部分的深海都为1 000~6 000m深。深海环境一般为普通生物不能生存的高压、低温、黑暗、高盐、寡营养、高辐射的特殊极端环境^[2]。在微生物的进化过程中自然选择使一些微生物对极端环境有较强的适应性,这些微生物称为极端微生物,又称嗜极菌(Extremophiles)。生活在这种特殊环境下的微生物具有独特的基因类型,特殊的生理机制以及特殊的代谢产物,作为地球上的边缘生命现象,它在生命起源、系统进化等方面将给人们很多重要的启示。极端微生物的生命现象研究有力地促进极端微生物资源在环境保护和修复、人类健康、高效率低成本生物技术新工艺等方面的利用,乃至外空间的开发和利用。近年来,对极端微生物的研究很多转向大多为极端微生物的古细菌。目前,从古细菌的命名、分类到生活环境、生理结构及适应机制、应用等方面,都有了很大的发展。这方面的研究已成为在生命科学研究的一个重要部分,极端微生物已经成为发达国家竞相占有和发掘的重要资源。近年来我国综合国力的加强,对推动这方面的研究工作顺利而有效开展提供良好的平台。相比较而言,国内在菌种分离方面已有许多报道,国外研究较多的是各种极端微生物的生理结构特点和适应机制等,还有许多未弄清楚的问题;应用方面也有一些领域有待探索。进一步深入研究包括古细菌在内的极端微生物的适应机制及遗传基础,对于充分利用自然资源造福人类社会,具有重要的意义。

深海是以高压和低温为主要特征的极端环境,深海细菌是生活在这一极端环境中的主要生物类群。其基本特点是细菌细胞对环境的嗜冷或耐冷,嗜压或耐压。由于大洋深海底部的低温性,目前分离的嗜压微生物大多也是嗜冷的^[3]。

本文所研究的深海细菌分离自西太平洋1914米的深海沉积物中,菌种鉴定为 *Shewanella piezotolerans* WP3,它是一株革兰氏阴性,兼性厌氧的杆状细菌,耐冷并耐压。其生长温度范围是0-28°C,最适生长温度是20°C,生长压力范围是0-50Mpa,最适生长压力为20Mpa,生长盐度范围是1%—7%,最适生长盐度为3%—4%,生长pH为中性,是研究极端微生物适应极端环境的理想材料^[1]。

1.1 深海微生物研究进展

深海深部生物圈的发现是对“生物圈”广泛范围的进一步了解。虽然海底采集

沉积柱状样已经有近八十年的历史，大规模的系统研究开始于1968年的深海钻探计划。“深海钻探 (DSDP, 1968-1983)”，“大洋钻探(ODP, 1985-2003)”和“综合大洋钻探 (IODP, 2003-)”，这部深海研究的三部曲，是国际地球科学历时最长、规模最大，也是成绩最为突出的合作研究计划。大洋钻探计划ODP以独特的视角为我们呈现出另外一个生命世界—掩埋在洋底沉积物中和地壳中的生物圈。在数千米深海海底存在着由微小的原核生物组成，数量极大的生物群，有人估计其生物量相当全球地表生物总量的1/10。与热液口“自养”的微生物不同，深部生物圈的原核生物依靠地层里的有机物实行“异养”。深海大洋中生物圈的发现，让人类认识到地球生态系统的真正基础在于原核生物。正是这些原核生物多种多样的新陈代谢过程，产生了多种多样生物地球化学效果，在此基础上建立了地球的生态系统。

在目前已发现的各种极端环境中深海蕴藏着的生物资源极为丰富，其中最主要的是深海微生物，但这些微生物大部分还鲜为人知。深海环境下极端微生物的研究不仅是目前生命科学最前沿的领域之一，也是海底深部生物圈研究和海底流体活动研究重要的组成部分。该项研究将回答生命起源、生物进化、外太空生命探索等生命科学的重大问题并带动包括21世纪地球科学内的其它学科领域的重大发展。

几十年来，美国、德国、英国、法国、俄罗斯、日本等国家投入大量资金用于对大洋资源的勘查，谋求对世界海底资源再分配。新一轮合法、有序的“蓝色圈地”运动悄然兴起。国内对深海微生物圈的研究与开发力量还比较薄弱，研究深度也不够。在海底地质构造和矿产资源应用方面，深海微生物活性代谢产物和新酶开发等应用方面，总体上落后15-20年。其主要原因在较大程度上与技术方法和仪器设备的性能、精度有着直接的关系。但随着国家综合国力的增强，对海洋学科和生物学科的重视，特别是深海微生物研究的投入的加大，目前，在深海微生物的分离培养、多样性调查、功能基因研究和适应性机制研究（如深海嗜压菌的嗜压机理）等方面取得了一定的进展；各类极端微生物在工业用酶、工具酶、环境修复以及生物活性物质等方面的开发应用，也有了突破，使人们看到了深海微生物开发的巨大潜力和广阔的应用前景^[4]。

日本1991年开始实施了著名的深海之星（Deep-star）计划，耗资50亿日元进

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库