

学校编码：10384

分类号_____密级_____

学 号：21620101152339

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

深海细菌 *Pseudomonas* sp.IOFA1 的全基因组分析
及其甲醛代谢途径关键酶基因的克隆表达

Analysis of complete genome sequence and cloning, expression
of key enzymes in formaldehyde metabolic pathways of the
deep-sea bacteria *Pseudomonas* sp.IOFA1

杨 敏

指导教师姓名：徐 洵 院 士

曾润颖 研究员

专 业 名 称：生物化学与分子生物学

论文提交日期：2013 年 05 月

论文答辩时间：2013 年 06 月

学位授予日期：2013 年 月

答辩委员会主席：_____

评 阅 人：_____

2013 年 06 月

深海细菌 *Pseudomonas* sp.IOFA1 的全基因组分析及其甲醛代谢途径关键酶基因的克隆表达

杨敏

指导教师：徐洵 院士
曾润颖 研究员

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈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其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室曾润颖研究员)课题(组)的研究成果,获得(“深海微生物酶在环境与食品安全中的应用潜力评价(DY125-15-T-06)”与“深海微生物分离培养与基因资源获取技术研究(2012AA092103)”)课题经费的资助,在(国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室)完成。

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要	1
1.前言	5
1.1.深海生态环境简介	5
1.2.深海微生物的研究概况	5
1.3.甲醛污染现状及其防治措施的研究	6
1.3.1.甲醛对人体健康的危害	6
1.3.2.当前现有的防止甲醛污染的措施	8
1.3.3.微生物体内的甲醛降解途经	9
1.4.醇脱氢酶的研究进展	10
1.4.1.醇脱氢酶的类型	10
1.4.2.醇脱氢酶的应用和研究进展	11
1.5.甲醛歧化酶的研究进展	13
1.6.甲酸脱氢酶的研究进展	14
1.6.1.甲酸脱氢酶基因研究进展	14
1.6.2.甲酸脱氢酶在辅酶再生系统中的应用	15
1.7.微生物基因组学的研究	15
1.7.1.微生物基因组学研究进展	15
1.7.2.基因组测序策略	16
1.8.本文研究的目的地及意义	17
2.材料与方法	18
2.1.材料	18
2.1.1.菌株和质粒	18
2.1.2.引物	18
2.1.3.主要试剂	19
2.1.4.数据库和分析软件	19

2.1.5.培养基	19
2.1.6.常用溶液	20
2.2.基本方法	24
2.2.1.常规实验方法	24
2.2.2. <i>Pseudomonas sp.</i> IOFA1 菌株的全基因组测序及其分析	28
2.2.3. <i>Pseudomonas sp.</i> IOFA1 菌株醇脱氢酶的克隆表达及纯化	31
2.2.4. <i>Pseudomonas sp.</i> IOFA1 菌株 FDM 的克隆表达	33
2.2.5. <i>Pseudomonas sp.</i> IOFA1 菌株 FDH 的克隆表达	36
2.2.6.重组酶的基本性质研究	38
3.结果与分析	39
3.1. <i>Pseudomonas sp.</i> IOFA1 菌株的全基因组测序及其分析	39
3.1.1.基因组测序与序列的组装	39
3.1.2.基因组概况	39
3.1.3.基因组注释	40
3.1.4.基因家族分析	40
3.1.5.基础代谢分析	41
3.2 <i>Pseudomonas sp.</i> IOFA1 菌株 ADH 的克隆表达以及重组酶性质的研究	46
3.2.1ADH 酶基因全长的扩增	46
3.2.2ADH 酶基因的序列分析	47
3.2.3ADH 酶的克隆和表达纯化	47
3.2.4 重组 ADH 酶的基本特征	49
3.3 <i>Pseudomonas sp.</i> IOFA1 菌株 FDM 的克隆表达以及重组酶性质的研究	51
3.3.1FDM 酶基因全长的扩增	51
3.3.2FDM 酶的克隆和表达及酶活测定	51
3.3.3 重组 FDM 酶的基本特征	53
3.4 <i>Pseudomonas sp.</i> IOFA1 菌株 FDH 的克隆表达以及重组酶性质的研究	54
3.4.1FDH 酶基因全长的扩增和序列分析	54

3.4.2 FDH 酶的克隆和表达	55
3.4.3 重组 FDH 酶的基本特征	56
4.讨论与展望	59
4.1. Zn ²⁺ 对 ADH 的激活作用	59
4.2. 伴侣蛋白对 FDM 折叠的影响以及内源结合的 NAD ⁺	60
4.3. 甲酸脱氢酶的表达情况及热稳定性	61
4.4. 展望	62
参考文献	63
附录一：乙醇脱氢酶基因 <i>adh</i> 序列及开放阅读框氨基酸序列	69
附录二：甲醛歧化酶基因 <i>fdm</i> 序列及开放阅读框氨基酸序列	70
附录三：甲酸脱氢酶基因 <i>fdh</i> β 序列及开放阅读框氨基酸序列	71
附录四 主要仪器设备列表	72
致谢	73

Contents

Chinese abstract	1
Abstract	3
1. Introductions	5
1.1.Introduction of deepsea environment	5
1.2.Genera research of deepsea microorganisms	5
1.3. Research of status and control measures of formaldehyde pollution	6
1.3.1.The dangers of formaldehyde to human health	6
1.3.2.The current measures to prevent formaldehyde pollution	8
1.3.3.Microbial metabolic pathways of formaldehyde	9
1.4.The research progress of alcohol dehydrogenase	10
1.4.1.The type of alcohol dehydrogenase	10
1.4.2. Research progress and applications of alcohol dehydrogenase	11
1.5.The research progress of formaldehyde dismutase	13
1.6.The research progress of formate dehydrogenase	14
1.6.1. Research progress of the gene coding formate dehydrogenase	14
1.6.2. The application of Formate dehydrogenase in co-enzyme regeneration system	15
1.7.Microbial genomics research	15
1.7.1.Microbial genomics research progress	15
1.7.2.Genome sequencing strategy	16
1.8.Aim and significant of this study	17
2. Material and methods	18
2.1. Material	18
2.2. Methods	24
2.2.1. Routine methods	24

2.2.2. Complete genome sequence and analysis of <i>Pseudomonas</i> sp. IOFA1	28
2.2.3. Cloning, expression and purification of alcohol dehydrogenase in <i>Pseudomonas</i> sp. IOFA1	31
2.2.4. Cloning and expression of formaldehyde dismutase in <i>Pseudomonas</i> sp. IOFA1	33
2.2.5. Cloning and expression of Formate dehydrogenase in <i>Pseudomonas</i> sp. IOFA1	36
2.2.6. Research of the characterization of the recombinant enzyme	38
3. Results and analysis	39
3.1. Complete genome sequence and analysis of <i>Pseudomonas</i> sp. IOFA1	39
3.1.1. Sequencing and assembly	39
3.1.2. Preparation of genomic DNA	39
3.1.3. Genome annotation	40
3.1.4. Analysis of gene family	41
3.1.5. Basic metabolism	41
3.2 Cloning, expression and purification of ADH in <i>Pseudomonas</i> sp. IOFA1, and the characterization of the recombinant ADH	46
3.2.1 Gene amplification of ADH	46
3.2.2 Sequence analysis of ADH	47
3.2.3 Cloning, expression and purification of ADH	47
3.2.4 Characterization of recombinant ADH	49
3.3 Cloning and expression of FDM in <i>Pseudomonas</i> sp. IOFA1, and the characterization of the recombinant FDM	51
3.3.1 Gene amplification of FDM	51
3.3.2 Cloning and expression of FDM and the activity detection	51
3.3.3 Characterization of recombinant FDM	53
3.4 Cloning and expression of FDH in <i>Pseudomonas</i> sp. IOFA1, and the characterization of the recombinant FDH	54
3.4.1 Gene amplification of FDH	54

3.4.2 Cloning and expression of FDH	55
3.4.3 Characterization of recombinant FDH	56
4. Discussion and perspectives	59
4.1 The activation of Zn²⁺ on ADH	59
4.2 The impact of the chaperone protein on folding of FDM and endogenous binding NAD⁺	60
4.3 The expression and thermal stability of the FDH	61
4.4 Perspectives	62
References:	63
Appendix I: sequence of DNA and amino acids of <i>adh</i>	69
Appendix II: sequence of DNA and amino acids of <i>fdm</i>	70
Appendix III: sequence of DNA and amino acids of <i>fdhβ</i>	71
Appendix IV: Instruments and equipment	72
Acknowledge	73

摘要

深海中蕴藏着巨大的生物资源。生境独特多样的深海沉积和洋壳环境蕴育了海底深部生物圈微生物的高度多样性，表现为物种、基因、生理生化和生态功能的多样性。海底深部生物圈已经成为生物技术开发的一个重要领域。

从深海沉积物中筛选到一株可高效降解甲醛的菌株 (*Pseudomonas* sp. IOFA1)，本文对该菌株进行了全基因组的测序，并对该菌株甲醛降解途径中的关键酶醇脱氢酶，甲醛歧化酶和甲酸脱氢酶展开研究。首先利用第二代高通量测序技术 solexa 对该菌株进行了全基因组测序以及基因预测与注释。测序结果表明，该菌株的基因组由一个环状的染色体构成，GC 含量 61.38%，预测所得 gene 数为 5361 个，Coding 区域的长度 4921410。在基因组序列上共找到 205 个串联重复区域，平均拷贝数为 3.75；转座子 59 个，67 个 tRNA 序列和 12 个 rRNA 序列。通过 KEGG 分析发现了该菌株的甲醛代谢途径。该菌属于甲基营养菌，能够同化甲烷生成甲醇，继而甲醇被氧化为甲醛，甲醛也是多条途径的中间产物。甲醛通过一定途径氧化为甲酸，最终甲酸被氧化为水和 CO₂。该途径中完整的醇醛酸氧化还原酶系统，包括醇脱氢酶系统、甲醛氧化酶系统以及甲酸脱氢酶系，这些酶都具有很高的应用价值。

醇脱氢酶 (Alcohol Dehydrogenase, ADH) 能够催化醇类脱氢氧化为醛。在菌株测序结果中发现能够编码 ADH 的 ORF。该酶由 379 个氨基酸残基组成，分子量约为 40691Da，由全长为 1140bp 的 *adh* 基因编码。通过对重组 ADH 酶性质的研究，发现该酶的最适作用温度为 42℃ 左右，在 pH 为 5 时具有最高活性，Zn²⁺ 的存在对该酶的催化有比较明显的促进作用。

甲醛歧化酶 (Formaldehyde Dismutase, FDM) 将甲醛氧化为甲酸和甲醇。我们在 *Pseudomonas* sp. IOFA1 的基因注释结果中发现了一个编码甲醛歧化酶的基因 *fdm*。该酶由 399 个氨基酸残基组成，大小约为 42914Da，由全长为 1200 的 *fdm* 基因编码。重组质粒 *pcoldII-fdm* 在 BL21 (PG-Tf) 中得到良好的可溶性表达。后期对重组 FDM 酶性质的初步研究表明，该酶的最适作用温度位 23℃ 左右，pH 为 7.5 时表现出最大酶活性。

甲酸脱氢酶 (Formate Dehydrogenase, FDH) 能够催化甲酸脱氢，氧化为水

和 CO₂，同时伴随着 NAD⁺生成 NADH。由于该酶催化的反应只产生一种副产物即 CO₂，对酶活性没有影响，而且很容易从反应体系中脱离出来，因此甲酸脱氢酶系是一个良好的辅酶再生系统。在 *Pseudomonas* sp. IOFA1 的全基因组测序结果和基因注释信息中，发现了与编码该酶有关基因 *fdh* β。该基因全长 951bp，编码 316 个氨基酸，蛋白大小约为 34481Da。重组 FDH 酶的最适作用温度为 40℃，在 pH 6 下有最高催化活性，该酶在 20-40℃表现出良好的热稳定性。

本文的研究的醇脱氢酶，甲醛歧化酶和甲酸脱氢酶属于菌株甲醛代谢途径中的醇醛酸氧化还原酶系，它们构成了完整的甲醇→甲醛→甲酸→CO₂ 的代谢途径，对该酶系的研究对于我们研究 *Pseudomonas* sp. IOFA1 的甲醛代谢机制，及其在治理甲醛污染中的应用具有重要的意义。

关键词：深海；甲醛降解菌；全基因组测序；醇脱氢酶；甲醛歧化酶；甲酸脱氢酶

Abstract

Deep sea contains huge biological resources. Unique variety of deep-sea sediments and oceanic crust environment gave birth to the high diversity of deep-sea microbial, including diversity of species, genetic, physiological, biochemical, and ecological function. Deep sea biosphere has become an important area of technology development.

A strain of bacterium(*Pseudomonas* sp. IOFA1) capable of degrading formaldehyde was isolated from the deep-sea sediments. In this paper, we sequenced the complete genome of the strain, and studied the key enzyme in the formaldehyde degradation pathway. The genome of *Pseudomonas* sp. IOFA1 was sequenced by solexa paired-end sequencing technology, and protein-coding sequences were predicted and annotated. The genome is a circular chromosome with the GC content of 61.38%, encoding 5361 genes and the length of coding sequence is 4921410. There are 67 tRNA genes, 12 rRNA genes, 59 transposons, 205 tandem repeat sequences, the average copy number is 3.75.

We find the formaldehyde metabolic pathway of the strain through the KEGG analysis. The bacterium is methyl nutritional bacteria which is able to absorb methane generated methanol, then the methanol can be oxidized to be formaldehyde, the formaldehyde oxidation into the formic acid, finally, the formic acid is degraded into CO₂ and H₂O. The methanol-formaldehyde-formic acid oxidoreductases has a high application value.

Alcohol dehydrogenase(ADH) can oxidize alcohols into aldehydes. We have found the gene coding ADH in the genome sequence. The protein is composed of 379 amino acids residues, about 40691Da, the total length of the encoding gene is 1400bp. The research of the properties shows that the optimum pH and temperature is pH 5 and 42°C. The enzyme activity is enhanced by Zn²⁺.

Formaldehyde dismutase(FDM) can catalyze formaldehyde into equal mole amount of formic acid and methanol. We have found a gene coding FDM in the gene annotation results of *Pseudomonas* sp. IOFA1. The protein is composed of 399 amino acid residues, size is about 42914Da, the total length of the gene is 1180bp. We expressed the recombinant plasmid in *Ecoli* BL21(PG-Tf), supernatant has good activity in the degradation of formaldehyde. Properties research shows that the optimum pH and temperature for reaction were pH 7.5 and 23°C.

Formate dehydrogenase (FDH) catalyze formate aid oxidized into H₂O and CO₂, with the reduction of NAD⁺ to NADH. Since CO₂ is the only by-product, which has no effect on enzyme activity and easy to escape from the reaction system. Thus formate dehydrogenase is a good co-enzyme regeneration system. We have identified the gene *fdhβ* encoding a protein containing 316 amino acid residues, size about 34481Da. The optimal reaction temperature and pH is 40°C and pH6. The enzyme showed good thermal stability in 20-40 °C .

The study of ADH, FDM and FDH in this paper, belong to the oxidoreductases of the formaldehyde degradation pathway. They constitute the complete methanol→formaldehyde→formic acid→CO₂ metabolic pathways. The study of these enzymes laid a solid foundation for learning the formaldehyde metabolism of the strain and the application of formaldehyde pollution control.

Key words: deepsea; formaldehyde degradation bacterium; alcohol dehydrogenase; formaldehyde dismutase; formate dehydrogenase

1. 前言

1.1. 深海生态环境简介

地球是目前人类所了解的宇宙中唯一存在生命的天体,而海洋被誉为孕育生命的摇篮。地球的总表面积约为 $5.1 \times 10^8 \text{km}^2$, 海洋覆盖了其中的 70.8% ($3.6 \times 10^8 \text{km}^2$), 故有人称地球是一个“大水球”。海洋即“海”和“洋”的总称。其中远离大陆且面积广阔的大洋是海洋的主体。约占海洋总面积的 90.3%, 一般大洋深度大于 2km, 盐度平均为 30‰, 且环境相对比较稳定, 不受大陆影响, 具有独立的潮汐系统和强大的洋流系统。

海洋中阳光可穿透的水体称为透光带, 一般介于 100m~200m 的深度范围内。而透光带以下到 1,000 m 的深度区域内, 由于动物和化能有机异养微生物的作用, 仍存在相当多的生物活动。相比较而言, 1,000 m 以下的水域生物活动相对较少, 这就是所说的“深海^[1,2], 深海区域占海洋总面积的 65%。在所有的海洋生态中, 深海是最神秘莫测的地方。水深 200 米以下的全部水域, 终年黑暗, 阳光完全不能透入, 盐度高 (约为 35‰) 且变化小, 压力大, 水温低而恒定, 深海水温平均为 1~3℃, 最低可达-1.8℃。

深海生态系统是最广泛的和远程的地球生态系统。由于深海的环境恶劣, 营养相对贫乏, 最初, 人们认为深海中没有生命存在, 或者是物种极为稀少的栖息地。然而, 在过去的一个世纪中, 人类向海底深部坚持不懈地进行生命探索, 发现深海存在着数量庞大的生物群落, 蕴藏着巨大的生物资源, 海水表面到 108600m 深的海底淤泥中都存在着微生物的生命活动^[3]。这使得地球上的生命生存空间由我们早起早期了解的陆地表面和海洋水体两大生存域扩展为现在的包括深部生物圈在内的三大生存域^[4]。海底深部生物圈的发现极大地扩展了地球生物圈的范围和深度, 向人们展示了一个全新的古老原始的微生物世界。

1.2. 深海微生物的研究概况

深海是人类财富的巨大宝库, 由于巨大的深度和广度, 海底沉积物和洋壳是

地球上最大的生态系统之一，蕴藏着极为丰富的生物资源，其中最主要的是深海微生物。深海生物圈细菌和古菌的数量占了全球生物圈原核生物总数的70%^[5]，同时占有1/10^[6]~1/3^[5]的地球总生物量。深海中的极端自然环境决定了深海微生物对极端环境的较强适应性。在微生物的进化过程中，“自然选择规律”决定了一些微生物对极端环境有较强的适应性，我们称这种微生物为极端微生物^[7-9]。

海底沉积物是一个巨大的全球有机碳库（~15 000 × 10¹⁸gC），深海微生物介导的有机碳的降解和转化在海洋和全球碳的生物地球化学循环中起到了巨大的作用^[4]。生境独特多样的深海沉积物和洋壳环境蕴育了海底深部生物圈微生物物种、基因、生理生化和生态功能的高度多样性，海底深部生物圈正成为生物技术开发的重要前沿。卓越的对极端环境的适应能力和新颖的代谢机理以及独特的酶系统使得深海微生物及其活性物质资源的开发日益引起国内外科研人员的重视。

当前对深海微生物资源的开发利用主要包括：深海微生物基础性研究^[10,11]，应用性基础研究^[12]，微生物资源的开发性利用研究^[13,14]，海洋污染环境的生物修复^[15]等。深海微生物种类繁多，是大自然的赠予我们一比巨大的财富。但由于对深海微生物资源的研究起步较晚，而且由于条件和技术的限制，能够分离培养的种类较少，这大大限制了对深海微生物的开发利用。目前对深海微生物的开发利用基本上处于应用研究阶段，主要集中在生物活性代谢产物和新酶开发两个方面^[3]。目前对深海微生物产生的酶已有很多研究，海洋细菌和古菌产生的酶常常具有特殊的性质，特别是在极端环境下的活性和稳定性^[16,17]。

1.3. 甲醛污染现状及其防治措施的研究

1.3.1. 甲醛对人体健康的危害

甲醛(HCHO，又名蚁醛)是一种无色、有强烈刺激性气味的气体，具有极其活泼的化学性质，能够与核酸，蛋白质，脂类产生非特异反应，因此对生物体具有极高的毒性。目前，甲醛是我国有毒化学品优先控制名单中排名第二位的有毒物质，世界卫生组织已经确定，甲醛为致癌和致畸形化学物质。甲醛对人体健康的影响主要有以下几个方面：

1.3.1.1. 对呼吸系统的影响

甲醛对呼吸道具有极强的刺激作用，长期接触低浓度的甲醛可以引起呼吸道疾病，临床症状主要表现为咳嗽，咽喉不适，打喷嚏，甚至引起咽喉炎，鼻炎，支气管痉挛等^[18]。经过呼吸道进入到体内的甲醛，可溶解于呼吸道黏膜表面的黏液中，并迅速进入血液循环，并经过血液运输到体内的各个组织^[19]。相关报道证实，长期暴露在甲醛环境中的作业工人，罹患呼吸系统疾病，例如慢性鼻咽炎，气管炎，肺部疾病，哮喘等的概率增高^[20,21]。目前甲醛的对呼吸系统的作用机制尚在研究中。

1.3.1.2. 对免疫系统的影响

目前已有相关的动物实验表明^[22]，甲醛对哺乳动物的免疫系统具有危害性。实验表明，甲醛对小鼠的体液免疫、细胞免疫以及巨噬细胞的吞噬功能具有极其明显的抑制作用^[23,24]。

通过染毒柜静式染毒的方法来观察甲醛对小鼠免疫系统的影响。结果发现甲醛能够使小鼠的免疫器官重量显著下降，高剂量和低剂量的甲醛都可以导致小鼠 T 淋巴细胞数目明显减少，而高剂量的甲醛还可引起抗体形成细胞明显减少，且引起小鼠足垫肿胀部位单核细胞浸润明显减少，表现出明显的细胞免疫毒性^[25]。由此可见，甲醛能够影响并降低动物的免疫力。有关甲醛对人体免疫系统的影响在近几年才有相关的论文发表。正常情况下，淋巴细胞亚群之间在数目和功能上保持动态平衡。当有害物质进入人体以后，通过各种方式破坏其平衡，从而导致免疫功能紊乱^[26]。

有相关研究表明，甲醛能引起过敏性哮喘，大量接触时还可引起过敏性紫癜。在装修环境中工作的人群血清中 IgG、IgA 含量与在未装修环境中工作的人群改变较大，能刺激产生 IgG 抗体和 T 淋巴细胞比例减少^[18]。

1.3.1.3. 对神经系统的影响

甲醛属于神经毒物。有相关的试验表明，甲醛可以引起神经系统的变性坏死，DNA、RNA 合成减少。对长期从事解剖工作的人员的研究表明，甲醛能够不

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.

廈門大學博碩士論文摘要庫