

文章编号 :1003-8701(2013)05-0058-04

一种新的草甘膦氧化还原酶基因的克隆 及活性蛋白表达研究

任红卫^{1,2}, 路 杨², 代春妍³, 刘相国²,
王金刚^{1*}, 郝东云^{2*}

(1. 东北农业大学, 哈尔滨 150030; 2. 吉林省农业科学院, 长春 130033; 3. 吉林大学第一医院, 长春 130021)

摘 要:本研究构建了一个草甘膦污染土壤的宏基因组文库,利用草甘膦抗性筛选方法从该文库中筛选得到一个草甘膦抗性克隆,测序结果表明,其上存在一个草甘膦氧化还原酶(glyphosate oxidoreductase,简称GOX)的编码基因,命名为 *goxA*。该基因长为 1 296 bp,编码一个由 431 aa 组成的蛋白质。*goxA* 碱基序列与已报道的 *gox* 相差 6 个碱基,编码产物 GOXA 与 GOX 蛋白质氨基酸序列相差 2 个氨基酸。为了验证 GOXA 的功能,对其进行了原核表达与纯化,活性电泳结果表明,GOXA 具有明显的草甘膦氧化还原酶活性,*goxA* 的发现为草甘膦抗性植物的研发提供具有潜在应用价值的基因资源。

关键词:宏基因组文库;草甘膦降解基因;基因克隆;蛋白质表达与纯化

中图分类号:Q789

文献标识码:A

Cloning and Active Protein Expression of a Novel Gene Involved in Glyphosate Degradation

REN Hong-wei^{1,2}, LU Yang², DAI Chun-yan³, LIU Xiang-guo²,
WANG Jin-gang^{1*}, HAO Dong-yun^{2*}

(1. *Northeast Agricultural University, Harbin 150030*; 2. *Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun, 130033*; 3. *First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China*)

Abstract: In this study, a metagenomic library of glyphosate-contaminated soil was constructed, and a glyphosate-resistant clone was obtained from the library with glyphosate resistance screening method. A novel glyphosate oxidoreductase (GOX) gene was found from the positive clone, which was designated as *gox-A*. The length of *goxA* was 1296 bp, and its encoding product composed of 431 aa. There were six bases difference between *goxA* and *gox*. In addition the encoded amino acid sequence of GOXA had two amino acids difference with GOX. Then prokaryotic expression and purification were done. The active stain result showed that GOXA had obvious glyphosate oxidoreductase activity. In short, the *goxA* identified in this study can become potential candidate genes for developing glyphosate-tolerant transgenic plants.

Keywords: Metagenomics; Glyphosate degradation gene; Gene cloning; Protein expression and purification

收稿日期:2013-03-22

基金项目:国家高技术研究发展计划“863”重点项目(2007AA020317);吉林省科技厅重大专项(20086029)

作者简介:任红卫(1986-),女,在读硕士,研究方向:园林植物遗传育种。

通讯作者:王金刚,男,教授,博士,E-mail:wangjingang99@yahoo.com.cn;

郝东云,男,研究员,博士,E-mail:dyhao@cjaas.com

目前商品化的抗草甘膦转基因作物主要采用过表达对草甘膦低敏感的 CP4 EPSPs 提高作物对草甘膦的抗性,然而这种抗性机制不能降解植物体内吸收的草甘膦,且植物对草甘膦代谢极为缓慢,造成草甘膦在植物体内不断积累,这可能会导致两方面的危害:1. 对植物繁育器官造成损害,这种损害表现为授粉不良及果实败育以致产量减少;2. 对食用者的身体健康可能会造成一定的潜在危害。因而开发无草甘膦残留的抗性机制是十分必要的。

宏基因组学技术已在微生物新功能基因挖掘方面取得了显著成果,该技术可以从某特定生境内提取所有微生物的基因组 DNA,然后构建宏基因组文库,并进行文库筛选来获得新的功能基因及其活性物质^[1]。但是目前尚无通过宏基因组文库筛选获得草甘膦氧化酶基因的相关报道。本研究拟通过宏基因组文库筛选获得新的草甘膦氧化还原酶基因,为除草剂抗性作物的研发提供具有潜在应用价值的基因资源。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

1.1.1 土壤样品来源

草甘膦污染土壤是从河北省晋州市奇峰化工厂内不同地点采集的。用镊子除去土样内的可见根系、石块等杂物,4℃保存。

1.1.2 菌种与质粒

菌株 *Escherichia coli* Trans5 α 和 *E. coli* BL21(DE3) 化学感受态细胞均购于北京全式金生物技术有限公司。质粒 pUC118 BamH I/BAP 购自宝生物工程(大连)有限公司, pET28a 购自 Novagen 公司。

1.1.3 培养基

液体 LB 培养基、固体 LB 培养基配制均参考分子克隆第二版;MOPS 无机盐培养基参考 Neidhardt 等人报道的配方进行配制^[2]。

1.2 试验方法

1.2.1 土壤总 DNA 的分离和纯化

参考 Zhou^[3]的方法分离土壤总 DNA。参考 Brady^[4]的电洗脱方法纯化土壤 DNA。

1.2.2 宏基因组文库的构建与筛选

用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离经 Sau3A I 随机酶切的土壤 DNA,胶回收 4~9 kb 大小的土壤 DNA 片段。将回收产物与 pUC118 BamH I/BAP 连接。化学转化 *E. coli* Trans5 α 中,将转化菌液

涂在含 100 μ g/mL 氨苄青霉素和 100 mg/mL 草甘膦的 MOPS 固体无机盐培养基上。30℃ 恒温培养 120 h。

1.2.3 文库插入片段的生物信息学分析

使用在线工具 bl2seq 查找测序结果中重叠序列,拼接出该插入片段的全长序列。ORF Finder 用于预测该插入片段中所有可能的开放阅读框(ORF)。使用在线工具 ProtParam 预测基因编码产物理论分子量(Mw)及等电点(pI)。SMART 用于预测蛋白质信号肽和分析保守域。BLASTP 用于氨基酸序列同源性比对。使用在线工具 ClustalW2 对同源氨基酸序列进行比对。BioEdit 用于绘制多重序列比对图。

1.2.4 *goxA* 基因原核表达载体的构建与诱导表达纯化

根据测序得到的序列,设计特异性引物 *gox*FP 和 *gox*RP 扩增 *goxA* 基因,引物序列如下:*gox*FP: 5'-GCCAGAAATTCCA TATGCGCCGAGAACCATA AGAA -3';*gox*RP: 5'- ATGGGATCCTTAGGAG-GCGGGGCCT -3'。其中,引物斜体部分分别为 *Nde* I 和 *Bam*H I 酶切位点。PCR 扩增条件:94℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 30 s;55℃ 退火 15 s;72℃ 延伸 1 min 30 s,循环 30 次;72℃ 延伸 10 min;16℃ 保温。利用胶回收 1 300 bp 左右的片段,将目的片段与经过 *Nde* I 和 *Bam*H I 酶切的 pET28a 连接,热击转化于 *E. coli* Trans5 α 化学感受态细胞中,菌落 PCR 筛选阳性转化子并测序验证。将测序验证正确的表达质粒转化表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)中,涂在含有 30 g/mL 卡那霉素抗性的固体 LB 平板上,37℃ 过夜培养。挑取单克隆于 LB 培养基中培养,当菌液 OD₆₀₀ \approx 0.5 时,加入终浓度为 0.4 mM IPTG,30℃ 诱导表达 4 h。采用 Ni 螯合层析纯化方法对重组蛋白进行纯化。

1.2.5 GOXA 电泳检测

参考 Laemmli^[5]描述的方法对纯化得到的 GOXA 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳检测。对目的蛋白进行 Western-blot 检测。按照 Gallagher 描述的方法配制不连续活性电泳凝胶。在 4℃ 进行 Native-PAGE 电泳,70V 电压下对纯化得到的蛋白进行浓缩,140 V 电压下分离活性蛋白。电泳结束后,用无菌高纯水清洗凝胶,然后将凝胶浸泡在 50 mM 焦磷酸钠缓冲液中,pH7.5。10 min 后,将凝胶转移至活性染色液中,于暗室中显色^[6]。

2 结果与分析

2.1 土壤总 DNA 的提取与纯化

采用直接提取法提取土壤样品中微生物基因组 DNA。粗提得到的土壤总 DNA 片段大部分集中在 48kb 处。采用电洗脱纯化方法对 DNA 进行纯化,最终得到无色透明的 DNA 溶液,纯化得到的 DNA 片段多集中在 9~23 kb 之间且无 RNA 污染,可以用于质粒 DNA 文库的构建。

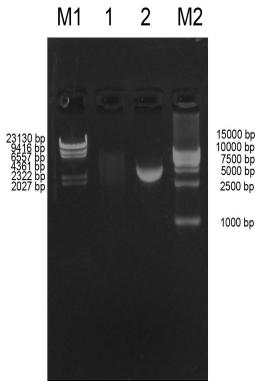


图 1 回收得到的 DNA 片段与 pUC118 BamH I/BAP 凝胶电泳结果

2.2 宏基因组文库的构建与草甘膦抗性克隆筛选

采用 *Sau3A* I 随机酶切土壤微生物基因组 DNA 回收酶切产物。将回收得到的 DNA 片段与 pUC118 *Bam*H I/BAP 载体进行连接(图 1),连接产物转化高效率 *E. coli* Trans5 α 化学感受态细胞中,转化菌液涂在含有草甘膦和氨基青霉素的 MOPS 无机盐固体筛选平板上筛选阳性克隆。经过 120 h 培养,在筛选培养基上长出一个明显的单克隆,记作克隆 Glp-1,将提取得到的阳性克隆质粒再次转入 *E. coli* Trans5 α 中,用同样的筛选方法检验转化子,转化克隆仍能在含有草甘膦和氨基青霉素的 MOPS 无机盐固体培养基上长出明显菌落,其阳性克隆所包含质粒记作 pGlp-1。

2.3 质粒 pGlp-1 插入片段的序列分析

对质粒 pGlp-1 进行测序和序列分析表明,其上存在着一个可能与草甘膦代谢相关的开放阅读框,其片段长为 1 296 bp,GC 含量为 57%,该 ORF 编码一个由 431 个氨基酸组成的蛋白质(图 2),其理论分子量为 46 124.1 Da,理论等电点为 9.59,可能是一个碱性蛋白。

BlastP 分析表明该 ORF 编码产物与源自 *Ochrobactrum* sp. G-1 的草甘膦氧化还原酶基因 GOX(GenBank 登录号:ACZ58378.1)有着 99% 同源性,两者间仅相差一个氨基酸,即氨基酸序列上第 2 位不同(图 3)。该 ORF 与美国孟山都公司专利报道的草甘膦氧化还原酶基因 *gox* 核酸序列上

相差 6 个碱基。另外,这两个基因编码的蛋白质氨基酸序列相差两个氨基酸,即第 2 位和第 55 位不同(图 3)。采用在线工具 SMART 对 ORF 编码氨基酸序列进行结构域架构(domain architecture)分析,发现该序列具有明显的 D-氨基酸氧化酶(D-amino acid oxidase,简称 DAO)结构域,其 E-value 值为 $3.6e^{-82}$ 。该 ORF 编码产物第 12~17 位发现了黄素酶特有的与 FAD 上腺嘌呤结合的 Rossman 折叠指纹基序(Rossmann fold fingerprint motif)(GxGxxG)。综合以上信息,将该 ORF 命名为草甘膦氧化还原酶基因 A(*goxA*)(Genbank 登录号:GU479462)。

```

1 ATGCCCGGAGAACCCATAAGAAGGTAGGCATCGCTGGAGCCCGGAATC
  M A E N H K K V G I A E A C I
46 GTCGGCGTATGCAOAGGCTGATGCTCAGCGCCGGGATTCAAA
  V G V C T A L M L Q R R R G F K
91 GTCACCTTCATTGACCCGAAACCTCTGCGGAAAGTGCATCGTIT
  V T L I D P N P P G E G A S F
136 GGAATGCGGATGCTTCAACGGCTCATCGCTCCCTCATCTCC
  C N A G V S S V V P M S
181 ATGCGCGGAAACTTGACGAGCGTGGCGAAGTGGCTCTTGCACCG
  M F G M L T S V F K W L L D F
226 ATGGCGCGTTCATCAATCGGCTTCAGCTATTTTCCAACCATCATG
  M G F L S I R F S Y F P T I M
271 CCTGCTGATTCCCTTTCTTTCACCGAAGACCAACAAGGTG
  F W L I R F L L A G R P N K V
316 AAGCAGCAGCGAAACCACTCCGCAATCTCATCAAGTCCACGGTG
  K E Q A K A L R N L I K S T V
361 CCTCTCATCAACTCATGCGGAGCAGGCTGATCGGACCCATCTG
  P L I K S L A E E A D A S H L
406 ATCCGCCATGAAAGTCTCTGACCGTATATCGTGGAGAACGAC
  I R H E H L T V Y R G E A D
451 TTCGCCAAGGACCGCGAGTTCGGAACTCGCGCTCTCAACCGT
  F A K D R G C W E L R L R G
496 GTTCACCGCATCTCTCCGCGCATTCGCGGATTTCCAT
  V R T Q I L S A D A L R D F D
541 CGCAACTTGTCCCATGCGTTTACCAGGCGATTCITATAGAAG
  P N L S H A F T K G I L I E E
586 AACCGTCACACGATTAATCCGCAAGGCGTTCGCAOCCCTCTTIT
  N G H T I N P Q G L V T L L F
631 CGCGCTTTTATCGGAAAGCGTGGCGAATTCGATCTCGCGCTG
  R R F I A N G C E F V S A R V
676 ATCCGCTTTGAGACTGAAGGTAGGCGCTTAAAGGCAATTCAC
  I G F E T E G R A L K G I T T
721 ACGAAACCGCTTCTGCGCGTTCATCGCGGTTGTCGCAAGCG
  T R G V L A V D A G A G
766 GCACACTCGAAATACITTCGTAATTCGCTAGCGCATGACATCCG
  A H S K S L A N S L C D D I P
811 CTCGATACGAAACGTCGATATCATATGTCATCGGAAATCGGAA
  L D T E R G Y H I V I A N P E
856 GCGCGTCCACGATTCGACGACCGATGCTCAGGAAATTCATC
  A A P R I P T T D A S G K F I
901 GCGACCGCTATGGAAATGGCGCTTCGCTCGCGCTACCGTTGAG
  A T P M E M G L R V A G T V E
946 TTCCGTTGGCTCACAGCGCTCTAACTGAAACGTCGCGCATGTG
  F A G L T A A P N W K R A H V
991 CTCTATACCGACCGTCAAAACTTCTTCAGCCCTCGCGCTCGG
  L Y T H A R K L L P A L A P A
1036 ACTTCTCAAGAACGATATTCCAAATGATGGGTTTCGCGCGAGC
  S S E E R Y S K W M G F R P S
1081 ATCCCGGATTCGCTCCCGTTCATTCGCGCGCAACCGGACACCC
  I P D S L P V I G R A T R T P
1126 GACGTAATCTATGCTTTTCGCGCATGCTATCGCGCATGACAGGG
  D V I Y A F G H G H L G M T C
1171 GCGCGATGACCGCAAGCGCTGCTCAGAGCTCTCGCAGCGCAA
  A F M T A T L V S E L L A G E
1216 AAGACCTCAATTCGCAATTCGCGCTTCACCAACCGCTTGTG
  K T S I D I S P F A P N R F G
1261 ATTTGCAAAATCCAAACAAACAGGCGCGCTCTCTAA 1296
  I G K S K Q T G P A S *

```

图 2 质粒 pGlp-1 中与草甘膦氧化还原酶基因相关序列的氨基酸编码分析

2.4 草甘膦氧化还原酶 A(GOXA)表达与活性分析

将 *goxA* 克隆进表达载体 pET28a 中。将经过测序验证的 pET28a::*goxA* 转化 *E. coli* BL21 (DE3)中进行过表达。经 30℃ 诱导 4 h 后,GOXA 多以可溶性的形式被表达出来,经过一步 Ni 亲和层析可以得到较高纯度的 GOXA 蛋白(图 4 泳道 1),采用抗 6 \times His 标签的单克隆抗体检测经 Ni 亲和层析纯化得到 GOXA 蛋白,Western-blot 实

验结果表明该蛋白即为带有 6 × His 标签的重组目的蛋白(图 4 泳道 2)。活性电泳结果显示纯化得到的 GOXA 能够催化产生蓝紫色物质,显示出明显的草甘膦氧化还原酶活性。

```

GOXA      MSENHKVGIAGAGIVGVCIALMLQRGFKVTLIDNPPPEGASFGNACFNGSSVVMFS 60
GOX_Ochrobactrum MSENHKVGIAGAGIVGVCIALMLQRGFKVTLIDNPPPEGASFGNACFNGSSVVMFS 60
GOX_Monsanto   MSENHKVGIAGAGIVGVCIALMLQRGFKVTLIDNPPPEGASFGNACFNGSSVVMFS 60
.....
GOXA      MFGNLTSVFKMLLDPMGSLIRFSYFFTIMFWLIRFLLAGRFNKVKEQAKALNLIKSTV 120
GOX_Ochrobactrum MFGNLTSVFKMLLDPMGSLIRFSYFFTIMFWLIRFLLAGRFNKVKEQAKALNLIKSTV 120
GOX_Monsanto   MFGNLTSVFKMLLDPMGSLIRFSYFFTIMFWLIRFLLAGRFNKVKEQAKALNLIKSTV 120
.....
GOXA      FLIKSLAEADASHLIRHEGHLTVYRGEADFADKRGWELRRRLNNGVTRQILSDADLRDFD 180
GOX_Ochrobactrum FLIKSLAEADASHLIRHEGHLTVYRGEADFADKRGWELRRRLNNGVTRQILSDADLRDFD 180
GOX_Monsanto   FLIKSLAEADASHLIRHEGHLTVYRGEADFADKRGWELRRRLNNGVTRQILSDADLRDFD 180
.....
GOXA      FNLSHAFTFNGLIIEENGHITINPQSLVILLFRFPIANGGEFVSARVIGFETGRALMGIT 240
GOX_Ochrobactrum FNLSHAFTFNGLIIEENGHITINPQSLVILLFRFPIANGGEFVSARVIGFETGRALMGIT 240
GOX_Monsanto   FNLSHAFTFNGLIIEENGHITINPQSLVILLFRFPIANGGEFVSARVIGFETGRALMGIT 240
.....
GOXA      TNGVLAVDAAVVAAGAHKSLANSLGDDIPLDTERGVHIVIANFEAARIPPTDASGKFI 300
GOX_Ochrobactrum TNGVLAVDAAVVAAGAHKSLANSLGDDIPLDTERGVHIVIANFEAARIPPTDASGKFI 300
GOX_Monsanto   TNGVLAVDAAVVAAGAHKSLANSLGDDIPLDTERGVHIVIANFEAARIPPTDASGKFI 300
.....
GOXA      ATPMENGVLVAGTVEFAGLTAAPNWKARHLYTHARKLLPALAPASSEERYSNMGFFPS 360
GOX_Ochrobactrum ATPMENGVLVAGTVEFAGLTAAPNWKARHLYTHARKLLPALAPASSEERYSNMGFFPS 360
GOX_Monsanto   ATPMENGVLVAGTVEFAGLTAAPNWKARHLYTHARKLLPALAPASSEERYSNMGFFPS 360
.....
GOXA      IPDSLFPVIGRARTRPDVIYAFGHGHLGMTGAMTATILVSELLAGEKTSIDISFPFNRF 420
GOX_Ochrobactrum IPDSLFPVIGRARTRPDVIYAFGHGHLGMTGAMTATILVSELLAGEKTSIDISFPFNRF 420
GOX_Monsanto   IPDSLFPVIGRARTRPDVIYAFGHGHLGMTGAMTATILVSELLAGEKTSIDISFPFNRF 420
.....
GOXA      IGKSKQTGFAS 431
GOX_Ochrobactrum IGKSKQTGFAS 431
GOX_Monsanto   IGKSKQTGFAS 431
.....

```

图 3 草甘膦氧化还原酶 A(GOXA)多重序列比对结果

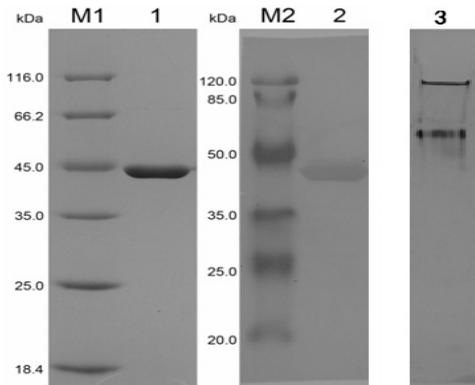


图 4 纯化得到的 GOXA SDS-PAGE、Western-blot 及活性染色电泳结果

3 结 论

本研究构建了一个草甘膦污染土壤宏基因组文库,采用草甘膦抗性筛选的方法从构建的文库中发现了 1 个具有草甘膦抗性的克隆,所含阳性

质粒命名为 pGlp-1。对该阳性质粒中插入片段测序结果分析表明其上含有一个草甘膦氧化还原酶(glyphosate oxidoreductase,简称 GOX)的编码基因,命名为 *goxA*。该基因长为 1296 bp,编码一个由 431 个氨基酸组成的蛋白质。*goxA* 碱基序列与美国孟山都公司专利报道的 *gox* 相差 6 个碱基。另外 *goxA* 编码产物 GOXA 与 *gox* 编码产物 GOX 蛋白质氨基酸序列相差 2 个氨基酸。为了验证 GOXA 功能,将 *goxA* 重组到表达载体 pET28a 上,在 *E. coli* BL21(DE3)中过表达。经 30℃ 诱导 4 h 后,GOXA 多以可溶性的形式被表达出来,经过一步 Ni 亲和层析可以得到较高纯度的 GOXA 蛋白。活性电泳结果表明,GOXA 具有明显的草甘膦氧化还原酶活性。未来将会对 GOXA 酶学性质进行分析,在此基础上构建植物表达载体,在植物中进行草甘膦抗性试验。

参考文献：

- [1] Handelsman J, Rondon M R, Brady S F, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products[J]. *Chemistry and Biology*, 1998, 5(10): 245-249 .
- [2] Neidhardt F C, Bloch P L, Smith D F. Culture medium for enterobacteria[J]. *J. Bacteriol.*, 1974,119(3): 736 .
- [3] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996,62 (2): 316 .
- [4] Brady S F. Construction of soil environmental DNA cosmid libraries and screening for clones that produce biologically active small molecules [J]. *Nat. Protoc.*, 2007,2 (5): 1297-1305 .
- [5] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
- [6] Manchenko G P. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels[M]. CRC, 2003 .

欢迎订阅《农家参谋·种业大观》

主要栏目有：本刊特稿、本刊专访、种业论坛、种业管理、种业风采、政策法规、营销讲堂、经营指南、专家介绍、良种推介、审定品种、刊中报、研究论文、实用技术、诚信种业展示等。本刊信息丰富、集知识性、权威性、前瞻性、实用性为一体,是各级农业部门领导、种子管理及农技推广人员、农业科研院校和广大农资经营者的良师益友。

《农家参谋·种业大观》刊号：CN41-1229/N, 邮发代号：36-354。月刊,16 开。每期定价 6.00 元,全年 72.00 元,全国各地(市)邮局(所)均可订阅,如错过订期,可直接与本刊编辑部联系订阅。

地址：郑州市花园路 54 号《农家参谋·种业大观》编辑部 邮编：450008

联系电话：0371-65715158 65710158 13703867119

E-mail: zhongyedaguan@126.com