

短短芽孢杆菌 GZDF3 嗜铁素合成酶基因 *Gene5693* 的生物信息学分析及原核表达*

袁林^{1,2,3,4}, 贾化可^{1,2,4}, 盛淼淼^{1,4}, 王兵^{1,2,4}, 曾丽娜^{1,2,3,4}, 刘红美^{1,2,3,4}, 隆耀航^{1,2,4**}

(1. 贵州医科大学 医药生物技术研究中心, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学 生物与医学工程重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州省教育厅 免疫细胞与抗体工程研究中心, 贵州 贵阳 550025; 4. 贵州医科大学 生物与工程学院, 贵州 贵阳 550025)

[摘要] 目的: 从短短芽孢杆菌 GZDF3 菌株中克隆嗜铁素合成酶基因 *Gene5693*, 构建其原核表达载体并进行重组表达。方法: 利用 antiSMASH 软件对 *GZDF3* 全基因组序列进行次级代谢物预测分析, 然后采用 ExPASy 在线分析预测嗜铁素合成酶基因 *Gene5693* 的基本理化性质并进行重组表达。结果: 生物信息学分析结果显示, 短短芽孢杆菌 *GZDF3* 全基因组序列与 *Petrobactin* 嗜铁素基因簇的相似性为 83%, *Gene5693* 基因编码的蛋白与 *Petrobactin* 嗜铁素编码的蛋白 AsbE 的相似性为 51.06%; *Gene5693* 编码蛋白氨基酸长度为 327 个氨基酸, 分子量为 39.05 kDa, 等电点 (pI) 为 4.94, 为酸性亲水性蛋白; *Gene5693* 基因的 PCR 扩增成功获得预测的 *Gene5693* 基因片段, 菌落 PCR 及重组 DNA 分子的双酶切电泳结果显示成功构建重组质粒; SDS-PAGE 结果表明 *Gene5693* 编码的蛋白大小与生物信息学预测的结果一致。结论: 成功克隆了嗜铁素合成酶基因 *Gene5693*, 并进行了重组表达。

[关键词] 嗜铁素; 短短芽孢杆菌; 生物信息学; 原核表达

[中图分类号] R34-33; S476 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2019)08-0916-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.08.010

Bioinformatics Analysis and Prokaryotic Expression of Ferritin Synthase *Gene5693* of *Bacillus brevis* Strain GZDF3

YUAN Lin^{1,2,3,4}, JIA Huake^{1,2,4}, SHENG Miaomiao^{1,4}, WANG Bing^{1,2,4},
ZENG Lina^{1,2,3,4}, LIU Hongmei^{1,2,3,4}, LONG Yaohang^{1,2,4}

(1. Research Center of Medical Biotechnology, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2 Key Laboratory of Biology and Medical Engineering, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 3 Research Center of Immunocyte and Antibody Engineering, Department of Education, Guizhou Province, Guiyang 550025, Guizhou, China; 4 Biological and Engineering School, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To clone the ferritin synthase *Gene5693* from *Bacillus brevis* strain GZDF3 and construct its prokaryotic expression vector. Methods: AntiSMASH software was used to analyze GZDF3 genome sequence to predict secondary metabolites, then basic physicochemical properties of the ferromycin synthase *Gene5693* were predicted using ExPASy online analysis. Results: Bioinformatics analysis revealed that the similarity between the whole genome sequence of *Bacillus brevis* GZDF3 and the *Petrobactin* ferritin gene cluster was 83%, and the similarity between *Gene5693*-encoded protein and *Petrobactin* ferritin-encoded AsbE protein was 51.06%. *Gene5693*-encoded protein contains 327

*[基金项目] 贵州省科技支撑计划[黔科合支撑(2017)2833]; 贵州医科大学医药生物技术工程研究中心(2016002); 贵阳市联合基金[(2017)5-33]; 贵州省科技计划项目[黔科合基础(2019)1253]
** 通信作者 E-mail: longhy6411@163.com
网络出版时间: 2019-08-27 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190827.1841.010.html>

amino acids, and its molecular weight is 39.05 KDa, and its isoelectric point (pI) is 4.94, so it is acidic hydrophobic. Predicted *Gene5693* gene fragment was successfully amplified by PCR. The size of amplified *Gene5693* fragment was verified using colony PCR. Double enzyme digestion showed the cloning of the amplified *Gene5693* fragment into prokaryotic expression vector was correct. SDS-PAGE analysis showed that the amplified *Gene5693* fragment was expressed and its size was the same as predicted one. **Conclusion:** *Gene5693* was successfully amplified, cloned and expressed in prokaryotes.

[**Key words**] ferritin; *Bacillus brevis*; bioinformatics; prokaryotic expression

在微生物生命活动中,铁元素参与多种生化代谢过程。铁在地壳中含量较多,但多以 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 形式存在,溶解性差,很难被生物吸收利用^[1-2],因此微生物进化过程中形成了多种途径来获取铁,合成嗜铁素(Siderophore)就是其中一种非常重要的途径^[3-6]。嗜铁素是微生物在低铁或缺铁应激条件下合成的一种能够高效结合 Fe^{3+} 、并将其转运到细胞内的小分子有机化合物^[7]。短短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*)是革兰阳性菌,有较强蛋白分泌能力,是一种产芽孢的生物防治菌^[8-12]。短短芽孢杆菌 GZDF3 从半夏根际土壤分离获得^[13],该菌株对半夏病原菌及多种其它病原菌均具有较强的拮抗作用,在植物病虫害的防治上具有较好的应用前景,其抗菌成分值得深入研究^[14]。本课题组前期的研究发现 GZDF3 基因组中没有与 Bacillibactin 嗜铁素合成基因簇相似的基因簇,但存在一个与 Petrobactin 嗜铁素相似性高达 83% 的合成基因簇。Petrobactin 嗜铁素合成基因簇 *asbABCDEF*, 分别与短短芽孢杆菌 GZDF3 的 *Gene5689*、*Gene5690*、*Gene5691*、*Gene5692*、*Gene5693*、*Gene5694* 的 6 个基因相对应^[15]。目前 Petrobactin 嗜铁素相关研究多集中于炭疽芽孢杆菌。2004 年,有学者通过定向基因敲除研究了 *asbA* 基因的功能,缺铁条件下,*asbA* 缺失突变体表现为嗜铁素产量降低,长势变弱^[16]。而且,*asbA* 缺失突变体对老鼠的致病力也显著降低^[16],Nusca 等^[17]利用柠檬酸、亚精胺、3,4-二羟基苯甲酸底物成功实现了 Petrobactin 嗜铁素的异源表达,发现 *AsbA* 合成酶的功能可以由 *AsbB* 进行补偿,即缺失 *AsbA* 合成酶,其余 5 个基因也能合成部分 Petrobactin;但是 *asbE* 基因缺失,不能合成 Petrobactin 嗜铁素,意味着 *asbE* 基因是 Petrobactin 嗜铁素合成途径中的关键基因。目前,已经对 Petrobactin 嗜铁素合成基因簇中的 *asbB*^[12]、*asbD*^[13]、*asbF*^[14] 进行了功能与结构研究。但对短短芽孢杆菌嗜铁素的研究尚未见报道,因此,基于 *asbE* 在嗜铁素合成过程中的重要作用,本研究对短短芽孢杆菌 GZDF3 菌株 Petrobactin 嗜铁

素合成基因 *Gene5693* (*asbE*) 进行分析,为后续嗜铁素合成基因簇的功能及体外合成研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

pET-28a 质粒的菌种由本课题组保存;表达菌株 BL21 由生物与工程学院王兵副教授馈赠;短短芽孢杆菌 GZDF3 由本课题组分离获得,其全基因组序列登录号 LVYG000000000。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 (1)嗜铁素合成酶蛋白的预测,在 AntiSMASH (<http://antismash.secondarymetabolites.org/>) 软件里输入短短芽孢杆菌 GZDF3 全基因组序列(登录号 LVYG000000000),利用 AntiSMASH(Ver 3.0.5)预测其代谢产物合成基因簇^[18];利用序列分析软件 BioEdit 7.0.9.0 构建本地短短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*) GZDF3 蛋白质序列数据库,以 NCBI 中检索到的 *asbE* (登录号 WP_132131835) 蛋白质序列作先导序列,blastp 搜索 *Brevibacillus brevis* GZDF3 本地蛋白质序列数据库;(2)嗜铁素合成酶蛋白基本性质分析,用 ExPASy (<http://www.expasy.org/>) 分析预测嗜铁素合成酶蛋白的等电点(pI)和相对分子质量(MW)、亲水性及疏水性,用 TMpred 软件进行跨膜区域分析,用 SignalP 进行信号肽分析。

1.2.2 引物设计 利用 DNAMAN 软件设计目的基因的引物序列,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,上游引物序列为 5'-CGTGGATCCATGGTTAAGGTTTC-3',下游引物序列为 5'-CGTAAGCTTTTACCTCCACCC-3',其中下划部分分别为 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶的识别切割位点。

1.2.3 目的基因的扩增及纯化 从 -80℃ 冰箱取出菌种 GZDF3 划线培养,从过夜培养的平板中挑取边缘清晰的单菌落放入 LB 液体培养基中,在摇床中 37℃ 振荡培养过夜;按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒操作步骤,提取 GZDF3 菌株的基因组;

以其为模板进行 PCR 扩增,产物用 3 mol/L NaAc 和无水乙醇进行纯化。

1.2.4 重组质粒的构建及鉴定 将含有 pET-28a 质粒的 *E. coli* 接种于含卡那霉素的 LB 液体培养基中 37 ℃ 振荡培养过夜,使用 OMEGA 公司 Plasmid Mini KIT 按说明书提取 pET-28a 质粒并纯化;将纯化后的 PCR 产物 *Gene5693* 与 pET-28a 质粒用酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切,随后电泳检测并回收酶切产物,16 ℃ 连接过夜;将连接后的质粒转化到大肠杆菌 *BL21* 感受态细胞中培养过夜,随机挑取 5~10 个单菌落进行菌落 PCR 鉴定,选取电泳条带大小与目的基因一致的菌液进行扩大培养,并进行双酶切鉴定,将经菌落 PCR 和双酶切鉴定的菌液保存并送深圳华大基因进行测序验证。

1.2.5 重组 DNA 分子的诱导表达及表达产物的纯化 (1)重组 DNA 分子的诱导表达,将过夜培养的菌液以 1% 的接种量进行扩大培养,振荡培养至 OD_{600} 为 0.5 左右,取 1 mL 作为诱导前对照;加入异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷 IPTG 进行诱导表达,于 30 ℃ 培养 4 h;将诱导表达后菌液低温离心 10 min,取上清 1 mL 作为诱导后对照;将离心后菌体用适量 PBS 溶液进行重悬,在冰水浴中进行超声破碎,破碎后离心收集上清;将诱导前、诱导后,破碎后的样品与蛋白上样缓冲液按 4:1 混合,煮沸并冷却后点样;通过考马斯亮蓝染色、脱色后观察重组蛋白的表达情况。(2)表达产物的纯化,将诱导表达并进行菌体超声破碎后离心收集的上清,通过 Ni-NTA. His 纯化柱进行纯化,加入洗杂液,收集液体 B1、B2、B3(杂蛋白);加入洗脱液,收

集洗脱液为 C1、C2、C3(目的蛋白);将目的蛋白通过 SDS-PAGE 电泳检测。

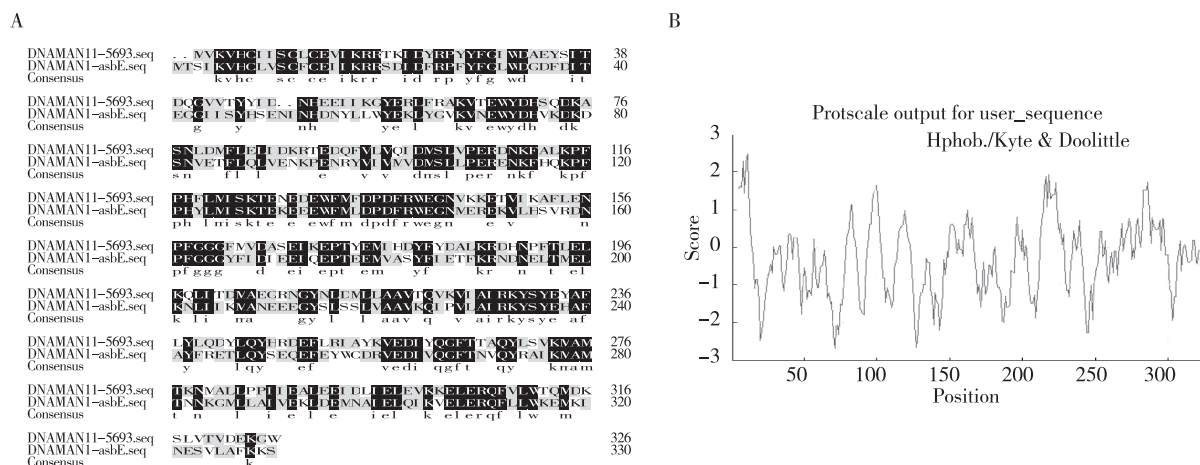
2 结果

2.1 嗜铁素合成酶的生物信息学分析

结果显示,短短芽孢杆菌 *GZDF3* 基因组中存在多种编码次级代谢产物的基因簇,其中一种基因簇编码产物为嗜铁素,与文献[15]报道的 Petrobactin 嗜铁素相似性达 83%。以炭疽芽孢杆菌 Petrobactin 嗜铁素生物合成基因 *asbE* (NCBI 登录号 WP_132131835)与本地 *GZDF3* 蛋白质序列数据库比对,发现其与短短芽孢杆菌基因组的 *Gene5693* 基因相对应,通过 DNAMAN 中的多序列比对结果如图 1A 所示,发现 *Gene5693* 与 *AsbE* 蛋白的氨基酸序列一致性达到 51.06%。

2.2 嗜铁素合成酶 *Gene5693* 的基本性质

利用 ExpASy 数据分析系统 ProtParam 分析,发现嗜铁素合成酶基因 *Gene5693* 所编码氨基酸的分子式为 $C_{1787}H_{2719}N_{439}O_{511}S_{16}$,长度为 327 个氨基酸;分子量为 39.05 kDa,理论等电点 $pI = 4.94$,为酸性蛋白;不稳定指数为 38.04,半衰期为 30 h,可初步判定为稳定蛋白。*Gene5693* 有 40 个正电荷氨基酸残基(Arg + Lys),57 个负电荷氨基酸残基(Asp + Glu),脂肪系数为 88.23;亲水性预测结果如图 1B 所示,平均亲水性为 -0.336,初步判定 *Gene5693* 蛋白是亲水性蛋白质,不含有信号肽和跨膜区域。



注:A为 *Gene5693* 与 *asbE* 的序列比对结果,B为 *Gene5693* 蛋白的亲疏性分析。

图 1 *Gene5693* 与 *asbE* 的序列比对及蛋白的亲疏性结果

Fig. 1 The alignment between *Gene5693* and *asbE* sequences

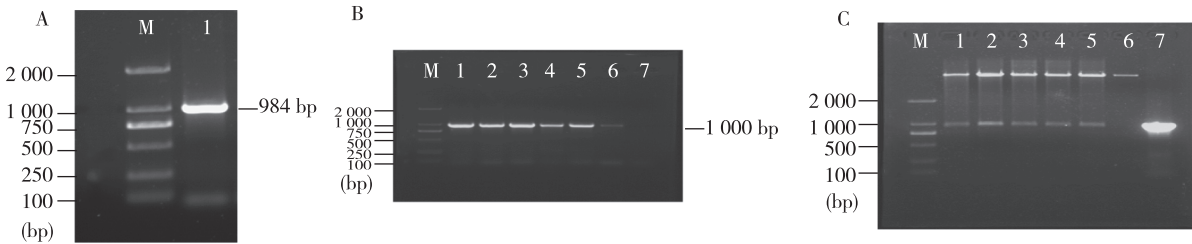
2.3 目的基因扩增和酶切

以 GZDF3 菌株的基因组 DNA 为模板,经 PCR 扩增得到目的基因 *Gene5693*,琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 2A,在 1 000 bp 处有一条特别明亮的条带,大小与预测的相符。

2.4 重组 DNA 分子的筛选与鉴定

2.4.1 菌落 PCR 鉴定 菌落 PCR 鉴定结果如图 2B 所示,泳道 1 ~ 5 在 1 000 bp 处都有明亮的条带,与泳道 6 (阳性对照) 大小一致,初步确定 *Gene5693* 基因成功连接到质粒上并转化成功。

2.4.2 双酶切鉴定及测序验证 将经菌落 PCR 检测阳性的单菌落扩大培养,提取质粒双酶切后电泳结果如图 2C,泳道 1 ~ 5 为重组质粒双酶切后电泳条带,其两条片段大小分别与空载体 pET-28a (泳道 6) 和 *Gene5693* 基因 (泳道 7) 一致,表明 *Gene5693* 基因成功连接到载体 pET-28a 上;同时,测序结果经比对分析表明克隆序列与原序列相同,没有发生突变,说明重组质粒构建成功,可用于下一步的诱导表达。



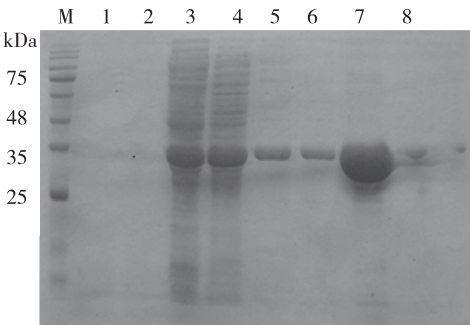
注:M:DL2000 Marker,A 为 *Gene5693* 基因的 PCR 扩增、1 为 PCR 产物,B 为菌落 PCR、1 ~ 5 为随机挑选的单菌落、6 为阳性对照、7 为阴性对照,C 为重组 DNA 分子的双酶切、1 ~ 5 为质粒双酶切产物、6 为 pET-28a、7 为酶切后的 *Gene5693*。

图 2 *Gene5693* 基因的 PCR 扩增、菌落 PCR 及重组 DNA 分子的双酶切电泳结果

Fig. 2 Amplification ,colony PCR and double enzymatic digestion of recombinant of *Gene5693*

2.4.3 嗜铁素合成酶 *Gene5693* 的原核表达及纯化 将菌株接种于含 0.1 mol/L IPTG 的培养基中,30 ℃ 诱导表达 4 h,SDS-PAGE 结果如图 3 所示,诱导前后上清 (泳道 1 ~ 2) 均无目的条带,诱导表达破碎后上清 (泳道 3 ~ 4) 含目的条带。进一步纯化后的目的蛋白 (泳道 5 ~ 8) 与预测的理论大小 (39.05 kD) 一致。

在医学、农业、工业及环境保护中都有重要意义。在生物防治方面,嗜铁素对多种病原菌具有抑制作用,为开发生物农药具有潜在价值。短短芽孢杆菌 GZDF3 分离自半夏根际土壤,对尖孢镰刀菌等多种病原菌有拮抗作用。本课题组通过 AntiSMASH 对短短芽孢杆菌 GZDF3 全基因组序列进行分析,发现 *GZDF3* 基因组中没有 Bacillibactin 嗜铁素合成基因簇,但存在一个与 Petrobactin 嗜铁素相似性高达 83% 的合成基因簇。相关文献报道 Petrobactin 嗜铁素合成基因家族中 *asbE* 基因缺失,不能合成 Petrobactin 嗜铁素,证实 *asbE* 基因是 Petrobactin 嗜铁素合成途径中的关键基因。目前, Petrobactin 嗜铁素合成基因簇中的 *asbB*^[12]、*asbD*^[13]、*asbF*^[14] 基因已有相关的功能与结构研究,而对 *asbE* 基因的报道很少,因此本研究对 *Gene5693* (*asbE*) 基因进行生物信息学分析并构建原核表达载体进行重组表达,发现其与 *AsbE* 蛋白序列一致性达到 51.06%,可认为其同源。利用 ExpASy 数据分析系统 ProtParam 程序分析预测嗜铁素合成基因的氨基酸序列和相关的理化性质,初步判定 *Gene5693* 蛋白是亲水性稳定蛋白质。2009 年,余贤美等^[19]在枯草芽孢杆菌 CAS15 嗜铁素基因的表达实验中,用 IPTG 在 30 ℃ 诱导 4 h 实现高效表达,并进行了功能实验验证。目前,还未见短短芽孢杆菌中



注:M 为 Marker,1 为诱导前上清,2 为诱导后上清,3 ~ 4 为诱导破碎上清,5 ~ 8 为纯化后的目的蛋白。

图 3 表达产物的 SDS-PAGE 电泳检测

Fig. 3 The expression of amplified *Gene5693*

3 讨论

嗜铁素作为微生物次级代谢产物的其中一种,

嗜铁素合成基因的研究。

本研究采用 PCR 方法克隆了短短芽孢杆菌 GZDF3 嗜铁素合成基因 *Gene5693*, 进行生物信息学和理化性质分析, 短短芽孢杆菌 GZDF3 基因组中存在多种编码次级代谢产物的基因簇, 其中一种基因簇编码产物为嗜铁素, 并且与 Petrobactin 嗜铁素相似性达到 83%, *Gene5693* 与 AsbE 蛋白的氨基酸序列一致性达到 51.06%, 编码的蛋白为酸性蛋白。进一步构建原核表达载体并成功分离纯化获得 *Gene5693* 蛋白。

综上所述, 本研究成功克隆了短短芽孢杆菌 GZDF3 嗜铁素合成基因 *Gene5693* 并构建重组表达载体, 并成功诱导表达。这将为进一步研究短短芽孢杆菌 GZDF3 中嗜铁素合成基因簇的功能及体外合成研究奠定一定的理论基础, 从而为短短芽孢杆菌 GZDF3 在促进植物生长和植物病害生物防治中的应用提供参考。

4 参考文献

- [1] 赵玉玲, 董奉鑫, 李素俭, 等. 生防菌 Act12 铁载体合成酶 Ser 基因的功能[J]. 微生物学通报, 2017, 44(1): 79–85.
- [2] 龙云川, 陈轩, 周少奇. 高产铁载体根际菌的筛选鉴定及硒活化特性评价[J]. 生物技术进展, 2017, 7(5): 402–408.
- [3] 杨廷雅, 孙亮, 周婷婷, 等. 短短芽孢杆菌 *Brevibacillus brevis* HAB-5 主要抑菌活性成分的分析及其特性研究[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(2): 222–231.
- [4] 张莹, 张文莉, 陈小贝, 等. 细菌产铁载体的结构、功能及其研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2012(9): 2249–2251.
- [5] 梁建根, 竺利红, 吴吉安, 等. 土壤中分泌嗜铁素细菌的筛选及影响其分泌因素的研究[J]. 园艺学报, 2007, 34(4): 1023–1028.
- [6] 张利, 刘马峰, 程安春. 铁载体-抗生素耦合剂: 一种新型的抗菌制剂[J]. 微生物学通报, 2016, 43(7): 1598–1604.
- [7] 梁建根, 郝中娜, 王连平, 等. 嗜铁素功能研究概述[J]. 中国农学通报, 2011, 27(5): 284–287.
- [8] 车建美, 刘波, 蓝江林. 短短芽孢杆菌 JK-2 的 GFP 标记及其抑菌作用[J]. 中国生物防治学报, 2010, 26(2): 230–234.
- [9] ZHU X H, LI Y Q, TAO X M, et al. Screening and identification of antagonistic bacteria against soft rot of *Pinellia ternata* in Guizhou Province [J]. Microbiology China, 2017, 44(2): 438–448.
- [10] SHI J L, LI Y Q, HU K M, et al. Isolation and identification of pathogens from rotted root of *Pinellia ternata* in Guizhou province [J]. Microbiology China, 2015, 42(2): 289–299.
- [11] LEE J Y, JANES B K, PASSALACQUA K D, et al. Biosynthetic analysis of the petrobactin siderophore pathway from *Bacillus anthracis* [J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(5): 1698–1710.
- [12] NUSCA T D, KIM Y, MALTSEVA N, et al. Functional and structural analysis of the siderophore synthetase AsbB through reconstitution of the petrobactin biosynthetic pathway from *Bacillus anthracis* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(19): 16058–16072.
- [13] SCHMELZ S, KADI N, MCMAHON S A, et al. AcsD catalyzes enantioselective citrate desymmetrization in siderophore biosynthesis [J]. Nature Chemical Biology, 2009, 5(3): 174–182.
- [14] PFLEGER B F, KIM Y, NUSCA T D, et al. Structural and functional analysis of AsbF: origin of the stealth 3,4-dihydroxybenzoic acid subunit for petrobactin biosynthesis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(44): 17133–17138.
- [15] AHOTUPA M, SAXELIN M, KORPELA R. Probiotic properties of *Brevibacillus brevis* and its influence on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval rearing [J]. African Journal of Microbiology Research, 2012, 6(35): 6487–6495.
- [16] CENDROWSKI S, MACARTHUR W, HANNA P. *Bacillus anthracis* requires siderophore biosynthesis for growth in macrophages and mouse virulence [J]. Molecular Microbiology, 2004, 51(2): 407–417.
- [17] NUSCA T D, KIM Y, MALTSEVA N, et al. Functional and structural analysis of the siderophore synthetase AsbB through reconstitution of the petrobactin biosynthetic pathway from *Bacillus anthracis* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(19): 16058–16072.
- [18] WEBER T, KAI B, DUDELA S, et al. antiSMASH 3.0 – a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters [J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(W1): 237–243.
- [19] 余贤美, 林超, 郑服丛, 等. 枯草芽孢杆菌 CAS15 嗜铁素基因 *dhbC* 的克隆、表达及功能鉴定[J]. 生物工程学报, 2009, 25(6): 819–825.

(2019-04-28 收稿, 2019-07-26 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 张启芳