

耐热嗜酸古细菌谷氨酰胺合成酶基因的克隆、诱导表达和活性测定*

殷志敏^{1)**} 闫淑珍¹⁾ 戴谷²⁾ 吴一凡¹⁾ 张双全¹⁾

(¹⁾南京师范大学生命科学学院, 南京 210097; ²⁾江苏教育学院生物系, 南京 210013)

摘要 采用 DEAE-Sephrose 及 Sephacryl S 300 柱分离纯化了耐热嗜酸古细菌 *Sulfolobus acidocaldarius* 谷氨酰胺合成酶 (E 6.3.1.2, Sac-GS). SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测分子质量为 53 ku 的单一条带. 测定其 N 端氨基酸序列为 PGLPKNEHEALEFLKSNNIKWVDLQ, 与其他古细菌谷氨酰胺合成酶的氨基酸序列进行比较后, 发现均存在 ATP 结合保守序列 TFMPKP (I/L/F) (F/P/Y) (G/R). 采用碱基的简并性设计出一对简并引物, 以 *Sulfolobus acidocaldarius* 的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 获得 780bp 的 DNA 片段, 经克隆测序后确定为谷氨酰胺合成酶基因片段, 以地高辛标记的该片段为探针, 将 *Sulfolobus acidocaldarius* 基因组 DNA 用不同的限制性内切酶分别进行单双酶组合切割, 然后进行 DNA 印迹分析, 选出了 2.4 kb 的 *Bam*H I / *Hind* III 双酶切片段, 并克隆到 pBluescript KS⁺ 质粒中, 通过菌落原位杂交获得阳性克隆, 进行 DNA 全序列测定后, 得到完整的 1.5 kb 的谷氨酰胺合成酶全基因序列, 再将其克隆到 pET3c 载体中, 在大肠杆菌 BL21 中进行诱导表达并进行相应的活性测定, 其酶活力的最适温度为 90 °C. 该酶在高温下所表现出的高活性充分说明其来源于耐热微生物.

关键词 耐热嗜酸古细菌, 谷氨酰胺合成酶, 基因克隆, 诱导表达, 活性测定

学科分类号 Q78

谷氨酰胺合成酶 (L-谷氨酸: 氨连接酶, GS) 是生物体中最古老也是最广泛存在的酶^[1]. 它在细菌和真核生物中参与了生物体碳和氮的代谢, 在多种氨基酸合成时作为氮源的供体, 是生物体必不可少的重要酶类, 因此, 该酶及其基因已被广泛研究^[2-6].

在细菌中, 来源于革兰氏阴性菌如 *Escherichia*, *Salmonella* 以及 *Klebsiella* 的 GS 的调控十分复杂, 其酶活性主要受磷酸腺苷酰化共价修饰 (adenylation/deadenylation) 的调节^[7]. 绝大多数来源于革兰氏阳性菌如 *Bacillus* 等的 GS 则不受磷酸腺苷酰化共价修饰的影响^[8].

目前根据 GS 氨基酸序列的同源性可将其分为三大类, 即 GS I, GS II 和 GS III. GS I 主要存在于原核生物中, GS II 则主要分布于真核生物和少量细菌中, GS III 与前两类差异较大, 仅在少量的细菌中发现. 根据一些调节特性和氨基酸序列的相似度, 又可将 GS I 进一步划分为 GS I- α 和 GS I- β (受磷酸腺苷酰化共价修饰) 两大亚型.

到目前为止有关古细菌 GS 的修饰与调节的报道很少^[9], 因此进行 *Sulfolobus acidocaldarius* GS (Sac-GS) 基因的克隆、序列测定以及在大肠杆菌中的诱导表达与活性测定, 为阐明古细菌 GS 调控机制研究打下了良好的基础.

1 材料与方法

1.1 试剂

Sephacryl S 300 和 DEAE-Sephrose 为 Pharmacia 公司产品, 地高辛标记试剂盒为 Boehringer Mannheim 公司产品, 其他分析纯试剂均为 Sigma 公司产品.

1.2 细菌培养

Sulfolobus acidocaldarius (DSM639) 按 Hettmann 方法^[10] 在补充有 20 mmol/L 葡萄糖, 1.5 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 极限盐 (Minimal salt) 培养基, 78 °C 条件下生长.

1.3 Sac-GS 的分离纯化

将 10 g *Sulfolobus acidocaldarius* 菌体悬浮于 20 ml 缓冲液 A (20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 0.2 mol/L NaCl, 1.5 mmol/L MgCl₂) 中, 超声破碎后, 48 000 g 离心 30 min, 取上清通过缓冲液 A 预平衡的 DEAE-Sephrose 柱 (2.5 cm × 10 cm): 用 50 ml 缓冲液 A 洗涤, 再用 90 ml 缓冲液 B

* 南京师范大学高学历人才启动基金 (2001SWXXQB914) 资助.

** 通讯联系人.

Tel: 025-3598216, E-mail: Zhiminy_2000@yahoo.com

收稿日期: 2002-02-08, 接受日期: 2002-03-06

(20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mol/L NaCl, 1.5 mmol/L MgCl₂) 进行洗脱, 将 GS 比活大于 10 U/mg 的洗脱组分进行浓缩. 4 ml 浓缩液再上样至 Sephacryl S-300 柱 (1.5 cm × 70 cm) 上, 用缓冲液 A 以 15 ml/min 洗脱.

1.4 活性测定

GS 的谷氨酰胺合成活性测定采用谷氨酸 (glutamate)、NH₄⁺ 和 ATP 合成谷氨酰胺时释放无机磷的量来进行, 参见 Bender 的方法^[11]. 由于谷氨酰胺合成酶是嗜热酶, 所以反应温度采用 40~100 °C, 反应时间为 15 min 或更少, 以不加酶的反应液作为空白对照. γ-谷氨酰转移酶 (γ-glutamyl transferase) 活性测定是在 40~100 °C 反应温度下, 参照 Shapiro 和 Stadtman 方法进行^[12].

1.5 菌落原位杂交

将转化的 DH5α 菌液均匀地涂布在含 50 mg/L 氨苄青霉素的琼脂平板上, 37 °C 培养过夜, 然后将长满菌落的平板在 4 °C 条件下放置 1 h, 用尼龙膜覆盖 1 min, 针刺标记; 将膜掀开后, 让不沾菌体的一面放在事先用变性溶液 (0.5 mol/L NaOH, 1.5 mol/L NaCl, 0.1% SDS) 饱和的 17 mm 滤纸上 5 min, 然后转移到用中和溶液 (1 mol/L Tris, 1.5 mol/L NaCl, pH 7.5) 饱和的 17 mm 的滤纸上 5 min, 随后转移到 2 × 氯化钠柠檬酸盐溶液 (SSC) 中 15 min. 将膜在室温下干燥 25 min 后进行紫外交联 (0.3 J/cm²), 再将其浸泡于 68 °C 的 3 × SSC, 0.1% SDS 溶液中 3 h, 清除膜表面的菌体残留物后, 在 68 °C 的预杂交液 (5 × SSC, 0.1% 肌氨酸 (sarcosine), 0.02% SDS, 1% 封闭液) 中 1 h, 再进行过夜杂交 (在预杂交液中加入用地高辛标记过的 GS 探针), 经洗涤后与抗地高辛抗体 (带有碱性磷酸酯酶) 孵育 2 h, 经洗涤后加入 CSPD (Boehringer Mannheim) 底物反应显色.

1.6 克隆与表达

通过 PCR 方法将 Sac-GS 基因克隆至 pET3c 表达载体中, 转化 BL21 (DE3) 进行表达, 具体方法参照《分子克隆》进行.

2 结 果

2.1 *S. acidocaldarius* 谷氨酰胺合成酶的分离纯化

将 *S. acidocaldarius* 细胞经超声破碎后离心, 取上清通过 DEAE-sepharose 及 Sephacryl S-300 柱二步分离纯化, 在整个过程中采用 γ-glutamyl transferase 活性进行酶活的跟踪测定, 最终

S. acidocaldarius GS 被纯化了 25 倍 (表 1), SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 经考马氏亮蓝染色, 纯度达到 95% 以上 (图 1).

Table 1 The purification of glutamine synthetase from *S. acidocaldarius*

Purification steps	Protein / mg	Activity / U	Specific activity / U·mg ⁻¹	Recovery / %	Purification factor
Crude extract	384	406	1.1	100	1
DEAE-sepharose	19	218	11.5	54	11
Sephacryl S-300	5	134	26.8	33	25.3

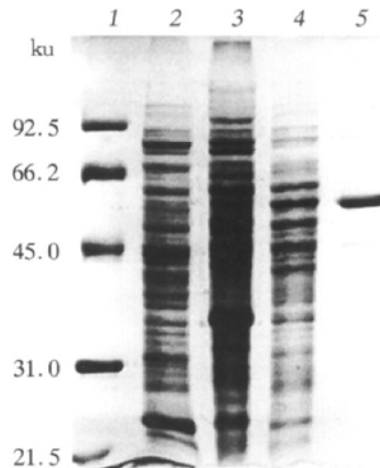


Fig. 1 SDS-PAGE of the purified GS

1: molecular mass marker; 2: 60.8 μg cytosolic protein from cells grown on glutamine; 3: 64 μg cytosolic protein from cells on glutamate; 4: 58.4 μg cytosolic protein from cells grown on sucrose and (NH₄)₂SO₄; 5: 8.8 μg purified GS protein.

2.2 Sac-GS 基因片段的 PCR 及同源序列比较

根据分离纯化的 Sac-GS 的 N 端序列 (Edman degradation 方法测定) 和来源于其他古细菌 GS 保守的 ATP 结合位点序列设计一对简并引物, 引物 1 为: 5' CCWAARAAYGARCAYGARGCNYTNGARTTT 3' 源于所测得的氨基酸序列 (PKNEHEALEF); 引物 2 为: 5' CCRWAWADWGGYTTNGGCATRAANGT 3' 源于氨基酸序列 [TFMPKP (I/L/F)(F/P/Y)(G/R)]. 以 25 ng *S. acidocaldarius* 的基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 反应, 获得了 780 bp 的 DNA 片段, 将该片段克隆到 pBluescript KS⁺ 后进行 DNA 序列测定. PCR 产物经测序后可转译成连续的蛋白质序列. 将其氨基端部分氨基酸序列与其他微生物的 GS 进行比较, 含有相同的保

守残基, 其中与 *S. solfataricus* 的 GS 同源性达 73% 的 GS 部分基因片段。
(图 2), 因此可确认该 DNA 序列为 *S. acidocaldarius*

```

1  PKNEHEALEFLKSNNIKWVDLQFTDLLGKLQHITIPSNFEDESSFKVGF-----KLDGSSIKGF
2  MPSTAEDVLKPLKENNIKWVDLQFTDVPGRLLHITIPAEFDLESIXTGFG-----KLDGSSIRGF
3  MTSLEMALEYIKINNFKLRFQFVDIHGEPXNIAYPVKLGTDGEEELMGVLENGLPFDGSSIEGF
4  MNISVSMNKFDSKIKFVQLVFDINGMPKGMIEIPASRLIE-----AVTDGISFDGSSVPGF
5  MSAEHLVTLNEHEVKFVDLRFTDTKGKEQHVITPAHQVNAEFFEFGK-----MFDGSSIGGW
      *   * * *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

```

Fig. 2 Comparison of GS protein N-terminal sequences

1: *S. acidocaldarius* (derived from the PCR product); 2: *S. solfataricus*; 3: *Methanococcus voltae*; 4: *Pyrococcus furiosus*; 5: *E. coli*. The underlined residues are identical to those determined by N-terminal protein sequencing. * represent identical amino acids.

2.3 Sac-GS 全基因的克隆和测序

将 4 μg 的 *S. acidocaldarius* 基因组 DNA 分别用限制性内切酶 *Bam*H I, *Hind* III, *Eco*R V 及其组合 *Bam*H I/*Hind* III, *Bam*H I/*Eco*R V 和 *Hind* III/*Eco*R V 进行过夜切割, 经 5 h 琼脂糖电泳, 转膜后进行 DNA 印迹, 探针为上述 PCR 产物经地高辛标记而成。杂交结果见图 3, 最后选择了 2.4 kb 左右的 *Bam*H I/*Hind* III 切割片段进行割胶纯化, 然后将纯化出的样品取 2 μl 再次进行 DNA 印迹, 确定其含有所需的 DNA 片段后, 将其克隆至 pBluescript KS⁺ 质粒中, 经转化后采用平板菌落原位杂交, 获得阳性克隆菌落后进行 DNA 测序。该基因现已存放在 EMBL 的基因库中, 接受号为 AJ224678。

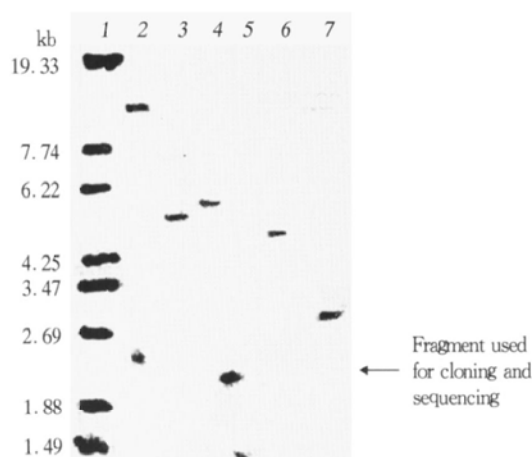


Fig. 3 Genomic Southern blot of the GS gene locus

For each lane 4 μg of genomic DNA were digested with restriction enzymes as indicated and were separated on a 0.8% agarose gel, blotted onto a nylon membrane, hybridized with the Digoxigenin-labeled probe. 1: λ Sty I marker; 2: genomic DNA digested with *Bam*H I; 3: genomic DNA digested with *Hind* III; 4: genomic DNA digested with *Eco*R V; 5: genomic DNA digested with *Bam*H I/*Hind* III; 6: genomic DNA digested with *Bam*H I/*Eco*R V; 7: genomic DNA digested with *Hind* III/*Eco*R V.

2.4 Sac-GS 基因的诱导表达及活性测定

将 Sac-GS 基因克隆至 pET3c 质粒中, 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行诱导表达, SDS-PAGE 显示该酶的单体分子质量为 53 ku 左右 (图 4), 与理论值相符; 超声破碎菌体后表明, 靶蛋白均以可

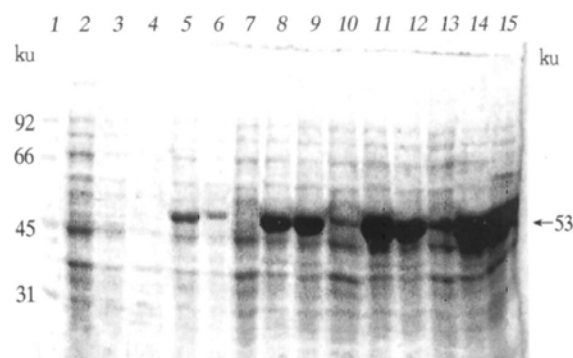


Fig. 4 The induction of *S. acidocaldarius* glutamine synthetase in *E. coli*

1: molecular mass marker; 2: BL-21 (no plasmid) with 0.5 mmol/L IPTG 4 h; 3: BL-21 (no plasmid) with 0.5 mmol/L IPTG 1 h; 4: control without IPTG; 5, 6: with 0.5 mmol/L IPTG 1 h; 7: control without IPTG; 8, 9: with 0.5 mmol/L IPTG 2 h; 10: control without IPTG; 11, 12: with 0.5 mmol/L IPTG 4 h; 13: control without IPTG; 14, 15: with 0.5 mmol/L IPTG 6 h.

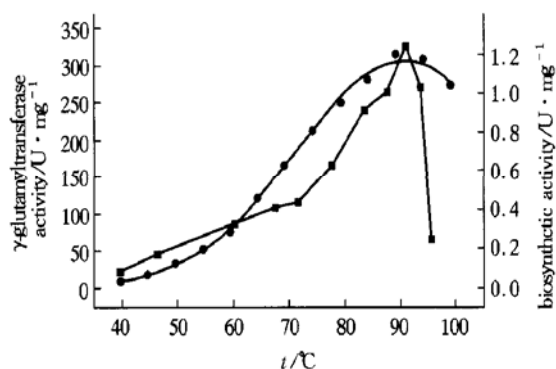


Fig. 5 Biosynthetic and γ -glutamyl transferase specific activities at different temperatures

■—■: the γ -glutamyl transferase specific activities at different temperatures; ●—●: the biosynthetic specific activities at different temperatures.

溶性形式存在, 未见包涵体存在. 将超声上清进行酶活性测定发现, 其 γ -glutamyl transferase 和催化谷氨酰胺生物合成的最适温度均在 90 °C (图 5), 比常规的大肠杆菌 GS 的最适温度 (40~50 °C) 高出很多.

3 讨 论

虽然对许多生物的谷氨酰胺合成酶及其基因已进行了广泛的研究, 并已将其划分为 3 大类, 即 GS I, GS II 和 GS III, 但对古细菌谷氨酰胺合成酶及其基因的了解很少, 对其在细胞内的活性调节和修饰知道得不多, 尤其是该酶是否通过磷酸腺苷酰化共价修饰没有定论, 经过氨基酸序列的比较发现, *S. acidocaldarius* 谷氨酰胺合成酶的基因含有一个插入序列, 因此从基因结构意义上来看, Sac-GS 的基因应该属于 GS I 类型中的 GS I- β (受磷酸腺苷酰化共价修饰) 亚型, 但通过在磷酸腺苷酰化共价修饰酪氨酸位点附近的氨基酸序列比较发现, Sac-GS 与 GS I- β 在该位点附近的特定序列差异很大, 而且对该酶用蛇毒磷酸脂酶 (通常用于研究磷酸腺苷酰化的脱磷酸腺苷酰化) 处理后酶活也不受影响 (结果另文发表), 排除了 *S. acidocaldarius* 谷氨酰胺合成酶受磷酸腺苷酰化作用影响的可能性, 目前还不清楚的是在其他古细菌中是否具有同样的现象.

另外, 我们在研究中还发现, 虽然 Sac-GS 来源于耐热微生物, 其最适温度为 90 °C, 但通过对该酶的热稳定性研究表明, Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 对其稳定至关重要: 如不加入 Mn^{2+} 或 Mg^{2+} , 该酶在 37 °C 和 72 °C 时迅速失活; 而当 1 mmol/L Mn^{2+} 存在时, Sac-GS 在 37 °C 和 72 °C 10 h 后仍能维持 95% 以上的活性, 因此我们认为 Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 等二价金属离子是维持该酶热稳定性的必要条件, 且对 *S. acidocaldarius* 的生长速度也起着十分重要的作用, 是该种古细菌在培养过程中需注意的重要因素之一 (结果另文发表).

我们纯化了 *S. acidocaldarius* 谷氨酰胺合成酶并克隆了该基因, 并在大肠杆菌中进行了诱导表达, 为今后进一步研究该酶的理化性质、调控机制及其结构分析奠定了良好的基础.

参 考 文 献

- 1 Kumada Y, Benson D R, Hillemann D, *et al.* Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (8): 3009 ~ 3013
- 2 Prusiner S, Stadtman E R. The terminal quinol oxidase of the hyperthermophilic Archaeon *Acidianus ambivalens* exhibits a novel subunit structure and gene organization. *J Bacteriol*, 1973, **179** (4): 1344~ 1353
- 3 Alef K, Burkardt H J, Horstmann H J, *et al.* Molecular characterization of the glutamine synthetase from the nitrogen fixing phototrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Z Naturforsch Sect*, 1981, **C36**: 246~ 254
- 4 Streicher S L, Tyler B. Purification of glutamine synthetase from a variety of bacteria. *J Bacteriol*, 1980, **142** (1): 69~ 78
- 5 Sampaio M J, Rowell P, Stewart W D P. Purification and some properties of glutamine synthetase from nitrogen fixing cyanobacteria *Anabaena cylindrical* and *Nostoc sp.*. *J Gen Microbiol*, 1979, **111** (1): 181~ 191
- 6 Stacey G, van Baalen C, Tabita F R. Nitrogen and ammonia assimilation in the cyanobacteria: regulation of the glutamine synthetase. *Arch Biochem Biophys*, 1979, **194** (3): 457~ 467
- 7 Mangum J H, Magni G, Stadtman E R. Regulation of glutamine synthetase adenylation and deadenylation by the enzymatic uridylylation and deuridylylation of the P II regulatory protein. *Arch Biochem Biophys*, 1973, **158** (3): 514~ 525
- 8 Deuel T F, Prusiner S. Regulation of glutamine synthetase from *Bacillus subtilis* by divalent cations, feedback inhibitors and γ -glutamine. *J Biol Chem*, 1974, **249** (1): 257~ 264
- 9 Yin Z, Purschke W G, Schaefer G, *et al.* The Glutamine synthetase from the hyperthermoacidophilic crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius*: isolation, characterization and sequencing of the gene. *J Biol Chem*, 1998, **273** (3): 1349~ 1354
- 10 Hettmann T, Schmidt C L, AnemueLLer S, *et al.* Cytochrome *b_{558/566}* from the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*: a novel, highly glycosylated, membrane bound b-type hemoprotein. *J Biol Chem*, 1998, **273** (20): 12032~ 12040
- 11 Bender R A, Janssen K A, Resnick A D, *et al.* Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol*, 1977, **141** (3): 1001~ 1009
- 12 Shapiro B M, Stadtman E R. Glutamine synthetase (*Escherichia coli*). *Methods Enzymol*, 1970, **17A**: 910~ 922

The Cloning, Induction and Activity Assay of Glutamine Synthetase Gene From Thermoacidophilic Archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius**

YIN Zhi Min^{1)**}, YAN Shu-Zhen¹⁾, DAI Gu²⁾, WU Yi-Fan¹⁾, ZHANG Shuang-Quan¹⁾

¹⁾Life Science Academy, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China;

²⁾Department of Biology Jiangsu Education College, Nanjing 210013, China)

Abstract Glutamine synthetase (E 6. 3. 1. 2) from thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius* was purified to 25 fold by DEAE-Sephadex and Sephacryl S-300 column. The N-terminal amino acids were determined as PGLPKNEHEALEFLKSNNIKWVDLQ, also one consensus sequence of a conserved region TFMPKP (I/L/F) (F/P/Y) (G/R) was found by using alignment of other glutamine synthetase sequences from archaeobacteria, a pair of primers were determined according to the above two sequences. The PCR was processed by using *S. acidocaldarius* genomic DNA as template and a DNA fragment about 780bp PCR product was achieved. After cloning and sequencing of this fragment, the DNA sequence could be translated into a continuous protein sequence which showed high identity to the *S. solfataricus* GS sequence. After Southern blot of genomic DNA digested by different combination of restriction enzymes using above DNA fragment as probe, a 2.4 kb fragment digested by *Bam*H I / *Hind* III was cloned into pBluescript KS⁺ plasmid, after colony hybridization, the positive was chosen and a 1.5 kb complete glutamine synthetase gene was sequenced, the gene was then cloned into PET3C plasmid and was induced, the activity of GS was determined. The thermostability of this enzyme showed that it is indeed from thermophilic protein.

Key words archaeobacteria, glutamine synthetase, gene cloning, induction and expression, activity assay

* This work was supported by a grant from The Nanjing Normal University (2001SWXXQB914).

** Corresponding author. Tel: 86-25-3598216, E-mail: Zhiminy_2000@yahoo.com

Received: February 8, 2002 Accepted: March 6, 2002