

链霉菌 *DDE* 转座酶基因的克隆及生物信息学分析

苏爱珍, 薛永常*

(大连工业大学生物工程学院, 辽宁大连 116034)

摘要: 从实验室保藏的菌株中筛选出一株产 *DDE* 转座酶的菌, 经形态及生理生化、16S rDNA 及建树分析比对, 该菌株属链霉菌属灰褐类群, 暂将其命名为 *Streptomyces labedae* sp. X1。从 *Streptomyces labedae* sp. X1 基因组 DNA 扩增一 401 bp 的 *DDE* 转座酶基因, 通过 Blast 和 ISfinder 数据库进行序列比对, 结果显示其与 *ISAz13* 家族转座酶的基因有 88% 的相似度。通过对其进行生物信息学分析, 发现该基因可编码 133 个氨基酸, 且该 *DDE* 转座酶的保守的氨基酸三联体分别位于 Asp⁴³、Asp⁴⁹、Glu⁹¹ 上, 理化性质结果显示编码产物为稳定的亲水蛋白; 二级结构以 α -螺旋和无规则卷曲为主, 不存在信号肽和跨膜结构域, 为非分泌蛋白; 有 14 个磷酸化位点且仅有一个糖基化位点; 高级结构以 α -螺旋为主; 通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 结果显示在 27 ku 处出现条带。该研究结果为研究链霉菌 *DDE* 转座酶基因的表达机制提供了重要信息, 对以后鉴定 *DDE* 转座酶活性以及它的结构和功能奠定基础。

关键词: 链霉菌; *DDE* 转座酶; 菌种鉴定; 基因克隆; 生物信息学

文章编号: 1673-9078(2021)11-167-174

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.11.0274

Cloning and Bioinformatics Analysis of *DDE* Transposase Gene from *Streptomyces*

SU Aizhen, XUE Yongchang*

(School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

Abstract: In this paper, a *DDE* transposase-producing strain was selected from the strains preserved in the laboratory and identified as *Streptomyces labedae* sp. X1 by morphology, physi-biochemistry and 16S rDNA. One 401 bp *DDE* transposase gene was amplified from the *Streptomyces labedae* sp. X1 genomic DNA, Blast and ISfinder results showed that it had 88% similarity with *ISAz13* family transposase genes. Bioinformatics analysis showed that the gene encoded 133 amino acids with stable hydrophilic structure, and the conserved amino acid triplet of Asp⁴³, Asp⁴⁹, Glu⁹¹ were found in the amplified *DDE* transposase; Based on the results of its α -spiral and irregular crimp, absence of signal peptides and transmembrane domains, it was a non-secreting protein with 14 phosphorylation and only one glycosylation site; and α -helix was the main composition in its advanced structure; SDS-polyacrylamide gelelectrophoresis showed that the molecular weight of the proposed protein was 27 ku. The results provide important information for the study of the expression mechanism of *Streptomyces* *DDE* transposase gene, and lay a foundation for the identification of *DDE* transposase activity, its structure and function in the future.

Key words: *Streptomyces*; *DDE* transposase; identification of strains; gene cloning; bioinformatics

引文格式:

苏爱珍,薛永常.链霉菌 *DDE* 转座酶基因的克隆及生物信息学分析[J].现代食品科技,2021,37(11):167-174

SU Aizhen, XUE Yongchang. Cloning and bioinformatics analysis of *DDE* transposase gene from *streptomyces* [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(11): 167-174

链霉菌 (*Streptomyces*) 属于革兰氏阳性菌, 是自然界中数量最多、最普遍的放线菌之一^[1], 具有复杂的生活周期和次生代谢途径, 产生大量具有重要价值

收稿日期: 2021-03-15

基金项目: 辽宁省自然科学基金项目 (20180550858)

作者简介: 苏爱珍 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 微生物分子生物学, E-mail: 2547320957@qq.com

通讯作者: 薛永常 (1966-), 男, 教授, 研究方向: 植物及微生物分子生物学, E-mail: xueych@dipu.edu.cn

的天然代谢物, 是研究微生物形态分化和化学多样性的良好研究材料^[2,3]。链霉菌代谢产物独特的化学支架和巨大的代谢潜力使其成为生物勘探研究中最有前途的候选材料^[4]。而插入序列是细菌中一种普遍存在的转座元件, 结构非常简单, 两侧有两个反向重复序列, 发生转座需转座酶基因编码的转座酶参与^[5,6]。它是细菌和古细菌中发现的可自我移动的 DNA, 形式简单, 仅包含其自身转座所需的基因^[7-9]。在细菌中, 插入序列可根据其催化区域的折叠和关键的结构相似性分为

DDE 转座酶、DEDD 转座酶、HUH 转座酶和丝氨酸转座酶^[10]。

自 1950 年由 McClintock^[11]发现转座子以来, 先后在细菌、真菌及动植物中也被陆续发现, 且被广泛研究。近年来, 在原核转座子, 如 Tn5、Tn10、噬菌体 MuA^[12,13], 真核转座子家族, 如 hAT^[14]、Tc1/Mariner^[15]中的 DDE 转座酶已被广泛研究, DDE 转座酶是由天冬氨酸(D)、天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)三个保守的氨基酸三联体组成, 显示了较好的应用前景。*Halomonas* sp.中的 ZM3 转座酶可以使细菌适应恶劣环境条件的遗传信息^[16]。*Streptococcus agalactiae* 中 DDE 转座酶可通过改变整合位点上相邻基因的表达或促进基因组重排来改变其行为, 能动态调节毒力基因, 提高了它的适应能力^[17]。TN 转座子家族可以使用 DDE 转座酶进行复制转座, 以产生共整合结构, 在稳定相关转座子方面发挥作用^[18]。Philippe 等^[19]通过计算机辅助比对和定点突变技术, 发现并证明了在 DDE 转座酶上有一个螺旋-转角-螺旋 (HTH) 潜在的 DNA 结合域与催化结构域, 可以使 DDE 转座酶蛋白形成聚合体, 负责 DNA 结合的序列特异性, 在调控基因表达中起着重要的作用。本文从 X1 链霉菌中克隆出 DDE 转座酶基因, 并对其进行了生物信息学分析研究, 以期研究该转座酶的结构和功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

本文链霉菌是由实验室保藏菌株^[20], 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、BL21, pET-32a(+)质粒均为实验室保存, pMD19-T 载体购自大连宝生物有限公司。

1.1.2 培养基

LB 培养基 (g/L), 高氏一号培养基 (g/L), 生理生化培养基配置方法见《微生物学实验技术》^[21]。

1.1.3 酶与试剂

柱式 DNA 胶回收试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自生工生物工程 (上海) 有限公司, DNAMarker、FastPure 质粒提取试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司, QuickCutTMEcoRI (15 U/ μ L)、QuickCutTMHind III (15 U/ μ L) 均购自大连宝生物工程有限公司, Taq DNA polymerase (5 U/ μ L) 购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 海洋放线菌的生理生化鉴定

形态观察: 采用平皿插片法, 用美蓝染液染色后油镜下观察菌株的形态特征。碳源的利用、硫化氢产生等生理生化试验参考《微生物学实验技术》^[21]。

1.2.2 放线菌 16S rDNA 鉴定^[22]

将培养 3~4 d 的链霉菌用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株基因组 DNA, 以其为模板, 采用 16S rDNA 通用引物 (27F, 1492R) 进行 PCR 扩增。将得到的序列用柱式 DNA 胶回收试剂盒回收后进行测序。将测序后的序列用 SeqMan 进行序列拼接后, 利用 EzTaxon 数据库进行序列比对, 初步得到该菌种属, 利用 MEGA 5.0 软件构建 NJ 系统进化树, 得到亲缘关系最近的菌种。

1.2.3 DDE 转座酶基因扩增及蛋白表达

参考 GenBank 核酸数据库中已发布 DDE 转座酶基因序列 (登录号: CP047144.1), 设计上下游引物, 并在 5'端增加 Hind III 和 EcoR I 的酶切位点及保护碱基:

D1: 5'-CCGGAATTCATGCCCCGAACCAGCGC
TG-3'

D2: 5'-CCCAAGCTTAACTCGTTAGGGCTCGC
AG-3'

将扩增后的产物进行回收后, 与 pMD19-T 载体连接转化 DH5 α 感受态细胞, 提取阳性重组质粒, 将其送至北京六合华大基因科技有限公司进行测序。

用 HindIII 和 EcoR I 双酶切阳性重组质粒及 pET32a(+)质粒, 回收目的片段及 pET32a(+)酶切大片段, 连接并转入 BL21 感受态细胞, 挑取单菌落进行 16 °C 诱导 16~20 h 后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

1.2.4 DDE 转座酶基因的生物信息学分析

通过 Blast 和 ISfinder 数据库确定该扩增序列为 DDE 转座酶基因片段; 通过 NCBI 的 ORF finder 及 ExPASy 数据库对基因的 ORF 及氨基酸序列进行预测; 通过蛋白质性质预测网站对其拟翻译的蛋白质理化性质预测与分析; 通过 CBS Prediction Servers 数据库提供的 SignalP、TMHMM、DictyOGlyc、NetPhos 等在线网站对其信号肽、跨膜结构区域、糖基化位点和磷酸化位点进行预测和分析; 通过 Sopma.html 网站预测蛋白的二级结构; 通过 phyre2 软件对蛋白质进行建模。

2 结果与分析

2.1 链霉菌的形态观察和生理生化试验鉴定

将筛选菌株 X1 涂布在高氏一号培养基上培养 4 d, 培养基表面呈灰褐色, 菌落生长丰满, 表面不光滑, 呈

馒头形, 基内菌丝体的颜色为白色, 且无可溶性色素产生。油镜 (10×100) 下观察可以看到菌株基内菌丝生长茂盛, 呈直线不断裂, 分枝多; 孢子丝丛生、弯曲, 孢子球形或椭圆形, 表面光滑, 形成孢子链 (图 1)。

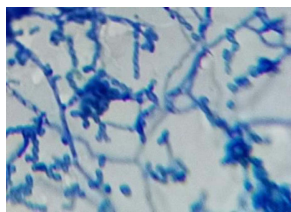


图 1 油镜 (10×100) 下 X1 的形态

Fig.1 Morphology of X1 under oil immersion lens (10×100)

不同的链霉菌能利用不同的糖, 对 X1 进行不同碳源的利用实验时发现, X1 可以利用葡萄糖、果糖、木糖、菊糖、甘露醇、麦芽糖、淀粉等糖, 但不能利用蔗糖、乳糖、阿拉伯糖、壳聚糖和柠檬酸。NaCl 浓度低于 10% 时, 菌体正常生长; NaCl 浓度在 10%~12.5% 之间, 菌体生长缓慢; NaCl 浓度大于 12.5% 时, 菌体受到抑制, 不生长, 由此看出, 该菌对盐度的耐受性较强。其他生理生化实验结果显示, 菌株 X1 可明胶液化; 葡萄糖发酵实验中将紫色培养基变黄, 说明菌株可以利用葡萄糖, 但是在乳糖发酵培养基上没有颜色变化, 则该菌不能利用乳糖; 淀粉水解培养基上滴加卢戈氏碘液后有透明圈出现, 说明可以水解淀粉; 牛奶酪化实验中, X1 能将牛奶先凝固后酪化; 黑色素产生试验培养基上, 28 °C 培养 7 d, 可发现培养基表面产生黑色物质, 证明该菌可产生黑色素; 但不产生硫化氢、不能将硝酸盐还原、不能将酪蛋白分解, 也不能将纤维素进行水解。综合 X1 形态特征和生理生化特征, 参考《伯杰细菌鉴定手册》^[22]和《链霉菌鉴定手册》^[23], 初步判断 X1 为链霉菌属灰褐类群。

2.2 16S rDNA 扩增及进化树的建立

以提取菌株的基因组 DNA 为模板, 用 16S rDNA 的通用引物进行 PCR 扩增, 得到单一且清晰的条带, 该目的条带回收后测序。将测序结果用 EzTaxon 数据库比对, 进行同源性搜索, 结果发现, 菌株 X1 与 *Streptomyces griseoincarnatus* (AJ781321, 99.93%)、*Streptomyces labedae* (AB184704, 99.93%) 以及 *Streptomyces violaceochromogenes* (AB184312, 98.86%) 等有较高的相似性。在此基础上, 选取与 X1 同源性较高的多条已知标准菌株的 16S rDNA 序列, 利用 MEGA5.0 软件构建 NJ 系统进化树 (图 2), 结果表明, 在所选择的 13 个物种序列中, X1 的 16S rDNA 与 *Streptomyces labedae* 相似度达到 98%。从系

统进化树分析, X1 与 *Streptomyces labedae* 处于同一分支, 同源性较高, 这与生理生化结果一致, 证明 X1 属于链霉菌属灰褐类群, 并命名为 *Streptomyces labedae* sp. X1。

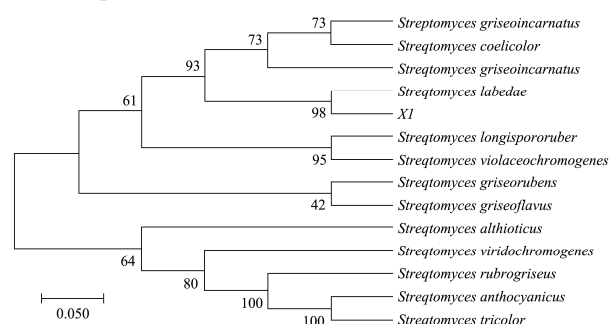


图 2 构建 16S rDNA 进化树

Fig.2 Construction of 16S rDNA evolutionary tree

2.3 DDE 转座酶基因序列分析

以 X1 基因组 DNA 为模板, 特异引物 D1、D2 进行 PCR 扩增。当退火温度为 61 °C 时能够扩增出一条单一清晰条带 (图 3), 胶回收后, 与 pMD19-T 载体连接转化 DH5 α 感受态细胞, 提取阳性重组质粒, 酶切验证后, 送北京六合华大基因科技有限公司进行测序。

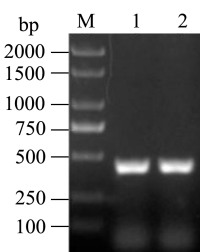


图 3 目的片段 PCR 电泳图

Fig.3 PCR electrophoretogram of target fragment

注: M: DNA maker; 1、2: DDE 转座酶基因扩增片段。

2.4 DDE 转座酶氨基酸结构分析

测序结果表明, 该扩增片段为 401 bp。利用 Blast 和 ISfinder 数据库进行序列比对 (图 4), 发现其与 ISAzol3 家族转座酶基因有 88% 的相似度。

利用 BlastX 比对发现, 该序列拟编码 DDE 转座酶, 该区域中还包含一个 Helix-turn-helix (HTH, 螺旋-转角-螺旋) 结构域, 结果如图 5。

转座酶的种类有很多, 是生物体发生转座发生反应必不可少的作用元件, 一直在被不断的探索^[24]。Harmer 等^[9]在研究 IS6/IS26 家族时发现, 该家族中的 DDE 转座酶具有三个保守的氨基酸三联体: 天冬氨酸 (D)、天冬氨酸 (D)、谷氨酸 (E) 用于协调二价金属阳离子, 这些阳离子在链断裂和重新结合期间发生

的亲核攻击中起着至关重要的作用。此外还发现该 DDE 转座酶中有个 HTH 结构域，是具有二聚作用的结合结构，可以使 DDE 转座酶蛋白形成聚合体，是转座酶可能的 DNA 结合区^[25,26]。Zou 等^[27]对金鱼 Tgf2 转座酶进行研究时，得到了三个保守的位点 DDE (228aa、295aa、648aa)，可以影响 Tgf2 转座酶的转座效率；DDE 转座酶上的 HTH 结构域，是一个具有二聚作用的结合结构，除了起到结合 DNA 的作用外还起到了聚合作用，可以使 Tgf2 转座酶蛋白形成聚合体。结合对现有 DDE 转座酶的了解，对本研究的 DDE 转座酶的氨基酸序列进行分析，发现该 DDE 转座酶保守的氨基酸三联体分别位于 Asp⁴³、Asp⁴⁹、Glu⁹¹。通过图 5 可以看出，该氨基酸序列中含有一个 HTH 结构域，且分析结果显示该结构域是转座酶可能的 DNA 结合区，是有效 DNA 转座所必需的。

2.5 生物信息学分析

2.5.1 DDE 转座酶基因的 ORF 预测

用 NCBI 的 ORF finder 检测这段序列的开放阅读框，结果表明该 DDE 转座酶基因的最大的 ORF 从第一个碱基开始，到第 378 个碱基终止，即所有序列基

本都为编码区，可表达 125 个氨基酸。

2.5.2 DDE 转座酶的理化性质分析

利用 ProtParam 软件，分析链霉菌 DDE 转座酶的理化性质。该蛋白的氨基酸数量是 125 个，理论等电点 pI：10.01，为碱性蛋白，分子式为 C₆₃₄H₁₀₅₀N₁₉₂O₁₈₇S₃，在 280 nm 波长下，所有半胱氨酸形成胱氨酸 (cystines) 时的消光系数为 3105 L/(mol·cm)，对应的吸光度为 0.215；所有半胱氨酸均不形成胱氨酸时的消光系数为 2980 L/(mol·cm)，对应的吸光度为 0.206；脂肪族氨基酸指数为 91.74，GRAVY 值为-0.283，不稳定指数为 28.97 小于 40，表明该基因翻译出来的 DDE 转座酶为稳定蛋白。

2.5.3 DDE 转座酶的亲/疏水性、跨膜结构分析

通过 ProtScale 在线分析，预测 DDE 转座酶基因编码氨基酸序列的亲/疏水性 (图 6)。多肽链的第 54 位具有最大值 1.944，疏水性最强；第 25 位存在最小值-2.900，为亲水性氨基酸。平均疏水性通过理化性质分析显示为-0.8645，在整条肽链中，亲水氨基酸数量较多，表明整条多肽链表现为亲水性，推测该蛋白为可溶性蛋白。

Streptomyces sp. HF10 chromosome, complete genome
 Sequence ID: CP047144.1 Length: 7814787 Number of Matches: 1
 Range 1: 6928672 to 6929071 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼Next N

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
462 bits(250)	7e-126	350/400(88%)	0/400(%)	Plus/Minus
Query 1	ATGCCCGAACCCAGCGCTGGACGAACTCGTCGACCAACTGGCCGCGAACTAGACGAGTTA			60
Sbjct 6929071	ATGCCCGAACCCAGCGCTGGACGAACTCATCAACCAACTGGCCGCGTGAATTTGGACGAGTTA			6929012
Query 61	CGGGAGCGAGGACGGCTCCGGCAGCGAGGAGGCGAACGCATCCGTGCGCGGGTGTGGA			120
Sbjct 6929011	CGTGAACAAGGACGGCTCCAGCAGCGAGGAGGCGAACGCATCCGTGCTCGCGGTGCAGGG			6928952
Query 121	GCCAAGGACAAGCTGACCACCGCCGACAGACTCCTGGTCAACCGTCTACCTGCGCAAA			180
Sbjct 6928951	GCCAAGGACAAGCTGACCACCGCCGACAGAGTCTGGCCACCGTCTACCTGCGCAAA			6928892
Query 181	CTCGGCACCCGCTACCTCCTCGCCAGCTCTTCGGAGTCAACACCGACTCTCACCAAGG			240
Sbjct 6928891	CTCGGCACCCAGAGATCTGCTCGCCAACTCTTCGGAGTCAACCGGACGACCCCTTACCAGG			6928832
Query 241	GCCGTTACCAAGTCCAGCCCTCCTGGCCGAACACGGCTGCACCATTCACCCCTCGACA			300
Sbjct 6928831	GCCGTTACCAAGTTCAGCCCGCTGGCCGCGCACGGCTACACGATCCCGCCCTCGACA			6928772
Query 301	GCCAGATTCCGGACACCCGCTGACGTCACCGCATTCCTCGCCAACAGCAGCCCAAGG			360
Sbjct 6928771	GCCAGATTCCGGACACCCGCTGACGTCACAGCGTTCCTCGGAACACAGCCCGCGGAG			6928712
Query 361	ATCAAACCAGCATGTTGATTTCTCTGCGAGCCCTAACGAGT	400		
Sbjct 6928711	ATCAAATCGGCATGTTGATTTCTCTGCGAGCCCTAAAAGAGT	6928672		

图 4 DDE 转座酶基因序列比对

Fig.4 Sequence alignment of DDE transposase gene

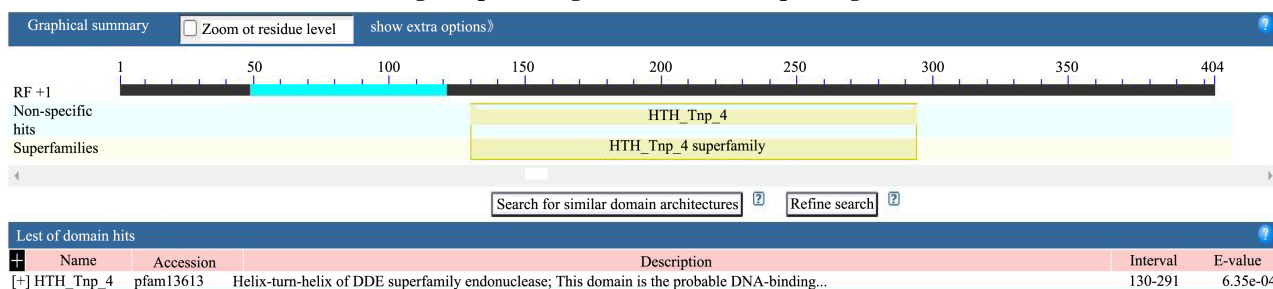


图 5 氨基酸结构域分析

Fig.5 Amino acid domain analysis

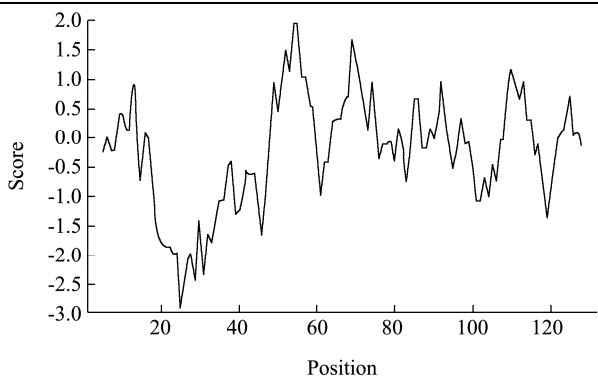


图6 DDE转座酶基因编码蛋白的疏水性和亲水性

Fig.6 The hydrophobicity/hydrophilia of DDE transposase gene coding protein

跨膜区必须由强疏水的氨基酸组成,才能使膜蛋白穿过膜的磷脂双分子层。通过蛋白亲、疏水性分析发现,该蛋白为亲水性蛋白,推测不存在跨膜区^[28]。进一步利用 TMHMM 程序对该蛋白跨膜区进行了分析,结果如图7所示,表明确实不存在跨膜区,这与亲水性的分析的结果是一致的。

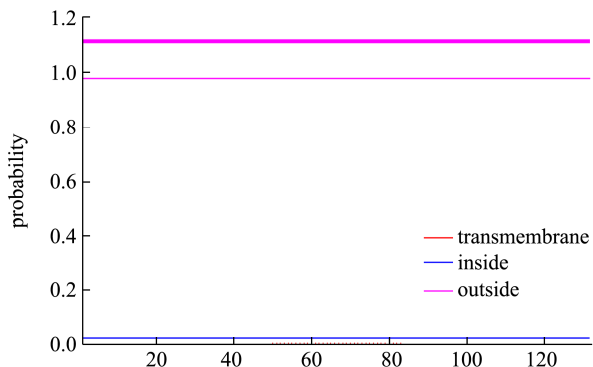


图7 DDE转座酶基因编码蛋白的跨膜区预测结果

Fig.7 The transmembrane domain of DDE transposase gene coding protein

2.5.4 信号肽分析

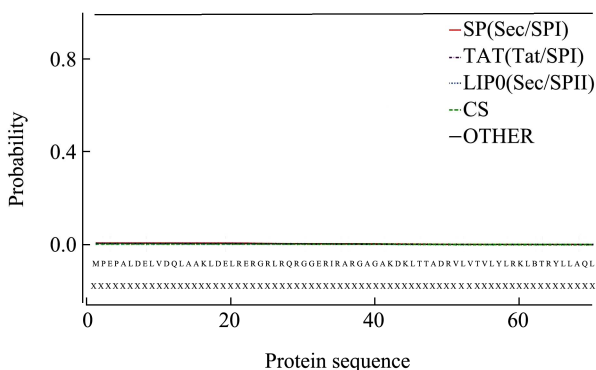


图8 DDE转座酶基因编码蛋白的信号肽预测结果

Fig.8 The signal peptide of DDE transposase gene coding protein

信号肽是引导前体蛋白质通过细胞膜分泌到胞外的一段序列,对其预测和分析有助于了解蛋白质的细

胞定位并区分蛋白质的功能域^[29]。信号肽预测结果如图8,分析发现该拟表达的蛋白中信号肽、TAT信号肽、脂蛋白信号肽存在的可能性分别为0.0058、0.0025和0.0026,说明该蛋白不存在信号肽,为非分泌蛋白。

2.5.5 糖基化与磷酸化位点分析

蛋白的糖基化与磷酸化一样都是最为普遍的一种蛋白质翻译后的修饰方式,肽链中的酪氨酸、丝氨酸、苏氨酸是蛋白质磷酸化最容易形成的三种氨基酸^[30],利用 NetPhos 在线软件对该基因编码的蛋白磷酸化位点进行预测和分析(图9)。结果表明,该蛋白可以发生磷酸化的位点有14个,其中丝氨酸有四个,苏氨酸10个,且在多肽链中分布不均匀。

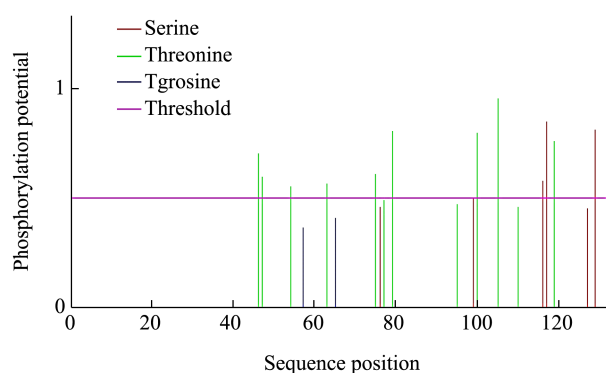


图9 DDE转座酶磷酸化位点预测与分析

Fig.9 Phosphorylation site prediction and analysis of DDE transposase amino acid

糖基化有调节蛋白质功能作用,它是在酶的控制下,在蛋白质上加上糖类的过程。糖基化是对蛋白的重要的修饰,有调节蛋白质功能作用^[31]。利用 DictyOGlyc 在线工具预测和分析 DDE 转座酶基因拟表达蛋白糖基化位点,结果如图10。

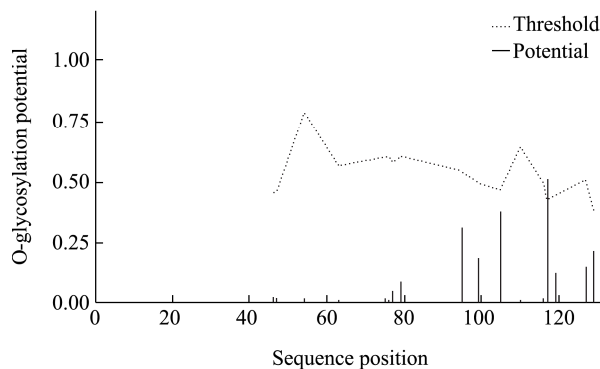


图10 DDE转座酶蛋白糖基化位点预测

Fig.10 The prediction protein glycosylation site of DDE transposase

从分析结果可以看出,DDE转座酶基因拟表达蛋白上潜在的糖基化位点有1个,在第117位的丝氨酸上,说明该分析说明糖基化位点较少。

2.5.6 二级结构与三级预测

DNA 序列翻译成氨基酸之后, 可通过折叠和盘绕, 形成比较稳定的空间结构, 具有特有的生物活性和理化性质^[32]。因此, 蛋白质二级结构的预测和分析对我们了解蛋白的空间结构有重要的意义。对其空间结构的了解有着重要意义预测。常见的二级结构元件主要有结果如图 11 所示, 该蛋白中存在 68 个 α -螺旋占 51.52%、15 个 β 转角占 11.36%、5 个伸展占 3.79%、44 个无规则卷曲占 33.33%。

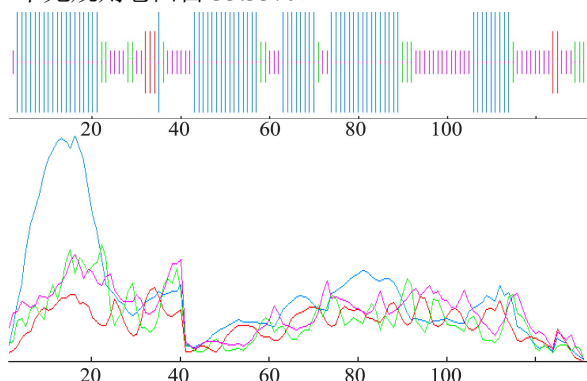


图 11 DDE 转座酶基因编码蛋白的折叠盘绕方式

Fig.11 The folded and coiled ways of DDE transposase gene coding protein

用蛋白质预测软件 phyre2 对氨基酸序列同源建模得到蛋白质的三维结构, 如图 12 所示。该蛋白结构主要以 α -螺旋和无规则卷曲为主, 该结构较为简单, 从图中可以看出, 整体的结构是螺旋-转-螺旋 (HTH) 结构, 预测其为 DDE 转座酶超家族, 与已发现的 HTH 结构域基本一致^[19], 这些结构对其生物学功能的发挥有重要作用。

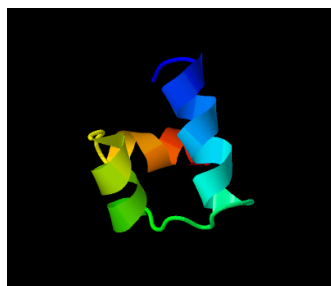


图 12 DDE 转座酶基因编码蛋白的三级结构

Fig.12 The tertiary structure of DDE transposase gene coding protein

2.6 DDE 转座酶基因的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

选取成功构建的 pET32a(+)-DDE 阳性表达质粒的单克隆菌接种到低盐培养基进行培养, 当 OD₆₀₀=0.6 时, 停止培养。加入 IPTG 使反应终浓度到达 0.5 mmol/L 时, 培养 17 h 后取样, 样品处理后用

SDS-PAGE 进行检测, 结果如图 13。

由图 13 可知, 作为对照的 pET32a(+)-DDE 的菌株在未加入 IPTG 时, 没有目的蛋白的表达; 在加入 IPTG 低温诱导表达 17 h 后, 在 27 ku 左右出现明显的条带, 这与先前在线分析得到的预测的理论值相似, 对以后鉴定 DDE 转座酶活性以及它的结构和功能奠定基础。

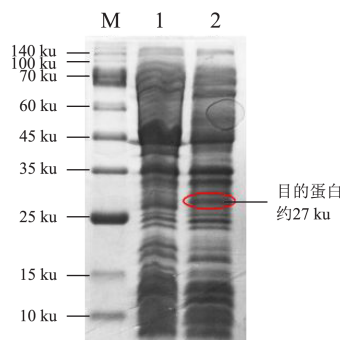


图 13 DDE 转座酶表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.13 SDS-PAGE analysis of DDE transposase expressed product

注: M: 蛋白 Marker; 1: 含 pET32a(+)-DDE 载体菌体未诱导蛋白; 2: 含 pET32a(+)-DDE 载体菌体诱导 17 h 总蛋白。

3 结论

3.1 本研究主要从实验室保藏菌株中筛选了一株产 DDE 转座酶的菌株, 通过形态及生理生化鉴定, 发现该菌与 *Streptomyces labedae* 有很近亲缘关系, 相似度高达 98%, 将其命名为 *Streptomyces labedae* sp. X1。从该链霉菌中克隆了 DDE 转座酶基因, 该基因片段为 401 bp, 通过 Blast 和 ISfinder 数据库进行序列比对, 结果显示其与 ISAzo13 家族转座酶的基因有 88% 的相似度。通过用 ISfinder 等软件对其氨基酸序列进行研究, 发现该 DDE 转座酶的三个保守氨基酸分别位于 Asp⁴³、Asp⁴⁹、Glu⁹¹, 而且还存在一个 HTH 结构域, 分析结果显示该结构域是转座酶可能的 DNA 结合区, 是有效 DNA 转座所必需的。

3.2 研究发现已知蛋白的新功能, 对蛋白的开发利用有巨大意义。本文通过对 DDE 转座酶基因进行生物信息学分析, 理化性质结果显示, 该基因拟编码蛋白的不稳定指数为 28.97 小于 40, 所以该蛋白为稳定蛋白, 平均疏水性分析结果为 -0.8645, 所以是亲水蛋白。二级结构以 α -螺旋和无规则卷曲为主, 不存在信号肽和跨膜结构域, 为非分泌蛋白; 有 14 个磷酸化位点且仅有一个糖基化位点; 该蛋白三级结构较为简单, 主要为无规则卷曲和螺旋结构, 而这些结构对其生物学功能的发挥有重要作用。通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 结果显示在 27 ku 处出现条带, 说明该基因可以

表达成蛋白质。这些性质及结果分析对研究该基因及其家族的结构和生物学功能奠定了理论基础。但是为了获取更准确的研究结果,仍须克隆验证以及酶学鉴定,因此关于该基因的分子克隆和功能鉴定,我们还在进行更深层次的试验和研究。

参考文献

- [1] Jiao J, Paterson J, Busche T, et al. Draft genome sequence of *Streptomyces* sp. strain DH-12, a soilborne isolate from the Thar desert with broad-spectrum antibacterial activity [J]. *Genome Announc*, 2018, 6(9): 108-118
- [2] 朱志炎,田志宏,李建雄.链霉菌的功能及其在农业上的应用[J].热带亚热带植物学报,2019,27(5):580-590
ZHU Zhiyan, TIAN Zhihong, LI Jianxiong. Function of *Streptomyces* and its application in agriculture [J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2019, 27(5): 580-590
- [3] 田新朋,张偲,李文均.海洋放线菌研究进展[J].微生物学报, 2011,51(2):161-169
TIAN Xinpeng, ZHANG Jian, LI Wenjun. Advances in marine *Actinomycetes* [J]. *Microorganism Journal*, 2011, 51(2): 161-169
- [4] Cimermancic P, Medema M, Claesen J, et al. Insights into secondary metabolism from a global analysis of prokaryotic biosynthetic gene clusters [J]. *Cell*, 2014, 158(2): 412-421
- [5] Fayad N, Kallassy Awad M, Mahillon J. 982IS and kin: new insights into an old IS family [J]. *Mobile DNA*, 2020, 11(1): 24-36
- [6] Shiga Y, Sekine Y, Kano Y, et al. Involvement of *H-NS* in transpositional recombination mediated by IS1 [J]. *J Bacteriol*, 2001, 183(8): 2476-2484
- [7] 张孟思,朱德康,汪铭书.细菌插入序列中的转座酶和转座机制[J].中国生物化学与分子生物学报,2018,34(10):1057-1064
ZHANG Mengsi, ZHU Dekang, WANG Mingshu. Transposase and transposition mechanism in bacterial insertion sequences [J]. *Chinese Journal Biochemistry and Molecular Biology*, 2018, 34(10): 1057-1064
- [8] 周倩倩.转座酶的人工改造与修饰[J].生物工程学报,2014, 30(10):1504-1514
ZHOU Qianqian. Modification and decoration of transposase [J]. *Chinese Journal of Bioengineering*, 2014, 30(10): 1504-1514
- [9] Harmer C, Hall R. An analysis of the IS6/IS26 family of insertion sequences: is it a single family [J]. *Microbial Genomics*, 2019, 5(9): e000291
- [10] Muşat M, Niţulescu G, Surleac M, et al. HIV-1 integrase inhibitors targeting various DDE transposases: retroviral integration versus RAG-mediated recombination (review) [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2019, 20(6): 4749-4762
- [11] McClintock B. The origin and behavior of mutable loci in maize [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1950, 36(6): 344-355
- [12] Montañó S, Pigli Y, Rice P. The μ transpososome structure sheds light on DDE recombinase evolution [J]. *Nature*, 2012, 491(7424): 413-417
- [13] Fuller J, Rice P. Target DNA bending by the Mu transpososome promotes careful transposition and prevents its reversal [J]. *Elife*, 2017, 6(13): e21777
- [14] Jesus E M, Cruz E A, Cruz G M, et al. Diversification of hAT transposase paralogues in the sugarcane genome [J]. *Mol Genet Genomics*, 2012, 287(3): 205-219
- [15] Zong W, Gao B, Diaby M, et al. Traveler, a new DD35E family of Tc1/Mariner transposons, invaded vertebrates very recently [J]. *Genome Biology*, 2020, 12(3): 66-76
- [16] Dziejewit L, Pyzik A, Matlakowska R, et al. Characterization of *Halomonas* sp. ZM3 isolated from the zelazny most post-flotation waste reservoir, with a special focus on its mobile DNA [J]. *BMC Microbiology*, 2013, 13(1): 59-72
- [17] Flechard M, Gilot P. Physiological impact of transposable elements encoding DDE transposases in the environmental adaptation of *Streptococcus agalactiae* [J]. *Microbiology*, 2014, 160(7): 1298-1315
- [18] Lima-Mendez G, Oliveira Alvarenga D, Ross K, et al. Toxin-antitoxin gene pairs found in tn3 family transposons appear to be an integral part of the transposition module [J]. *Molecular Biology*, 2020, 11(2): e00452-20
- [19] Rousseau P, Gueguen E, Duval-Valentin G, et al. The helix-turn-helix motif of bacterial insertion sequence IS911 transposase is required for DNA binding [J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(4): 1335-1344
- [20] 薛永常,蔡宏明,唐婧媛,等.大连海域海洋放线菌多样性及分类鉴定初探[J].微生物学杂志,2013,33(4):30-33
XUE Yongchang, CAI Hongming, TANG Jingyuan, et al. Diversity and identification of marine *Actinomycetes* in Dalian [J]. *Journal of Microbiology*, 2013, 33(4): 30-33
- [21] 杜连祥,路福平.微生物学实验技术[M].北京:中国轻工业出版社,2008
DU Lianxiang, LU Fuping. *Microbiology Experimental Technology* [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2008
- [22] R E 布坎南.伯杰细菌鉴定手册[M].北京:科学出版社,1984
R E Buchanan. *Berger's Handbook of Bacterial Identification*

- [M]. Beijing: Science Press, 1984
- [23] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组.链霉菌鉴定手册[M].北京:科学出版社,1975
Actinomycete Taxonomic Group, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. Manual for Identification of *Streptomyces* [M]. Beijing: Science Press, 1975
- [24] Roman Y, Oshige M, Lee Y J, et al. Biochemical characterization of a SET and transposase fusion protein, metnase: its DNA binding and DNA cleavage activity [J]. *Biochemistry*, 2007, 46(40): 11369-11376
- [25] Park H T, Park H E, Jung Y H, et al. An ISMap02-like insertion sequence in *Mycobacterium* spp. interferes with specific detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* [J]. *Vet Microbiol*, 2018, 216: 1-6
- [26] Hickman A B, Ewis H E, Li X, et al. Structural basis of hAT transposon end recognition by Hermes, an octameric DNA transposase from *Musca domestica* [J]. *Cell*, 2014, 158(2): 353-367
- [27] Shen X D, Hou F, Zou S M, et al. Identification of nuclear localization signal within goldfish Tgf2 transposase [J]. *Gene*, 2016, 593(1): 21-27
- [28] 赵小芳,庄莹,樊伟平,等.泛癌症分析跨膜蛋白 81 的表达及预后意义[J].黑龙江医药科学,2020,43(3):23-26
ZHAO Xiao-fang, ZHUANG Ying, FAN Wei-ping, et al. Pan cancer analysis of transmembrane protein 81 expression and prognostic significance [J]. *Heilongjiang Medical science*, 2020, 43(3): 23-26
- [29] 樊丹,马萱,麻云莲,等.链霉菌 MY0504 纤溶酶 YG4 基因的克隆及生物信息学分析[J].现代食品科技,2019,35(3):65-72, 147
FAN Dan, MA Xuan, MA Yunlian, et al. Cloning and bioinformatics analysis of fibrinolytic enzyme YG4 gene of *Streptomyces* MY0504 [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2019, 35(3): 65-72, 147
- [30] 崔冉亮,胡海燕,吕朴,等.神经丝蛋白质糖基化与磷酸化的相互调节和神经退行性疾病[J].生命的化学,2009,29(6): 812-816
CUI Ranliang, HU Haiyan, LYU Pu, et al. Regulation of glycosylation and phosphorylation of neurofilament proteins and neurodegenerative diseases [J]. *Chemistry of Life*, 2009, 29(6): 812-816
- [31] 赵神保,藤田盛久.酵母 Dop1 及其同源蛋白 DOPEY 对细胞糖基化和囊泡运输影响的研究[J].中国细胞生物学学报, 2020,42(4):94-105
ZHAO Shenbao, Fujita Morihisa. Effects of yeast Dop1 and its homologous protein DOPEY on cell glycosylation and vesicle transport [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2020, 42(4): 94-105
- [32] 张伟,姚斌,王磊,等.来源于 *Aspergillus candidus* 的乳糖酶基因的克隆及序列分析[J].生物工程学报,2002,18(5):566-571
ZHANG Wei, YAO bin, WANG Lei, et al. Cloning and sequence analysis of lactase gene from *Aspergillus candidus* [J]. *Chinese Journal of Bioengineering*, 2002, 18(5): 566-571

(上接第 378 页)

- [27] 覃志英,唐振柱,吴祖军,等.广西主要农产品铅、镉污染状况分析[J].中国公共卫生,2006,22(10):1261
QIN Zhiying, TANG Zhenzhu, WU Zujun, et al. Analysis on pollution of lead and cadmium in main agricultural products in Guangxi [J]. *Chinese Journal of Public Health*, 2006, 22(10): 1261
- [28] 闫兆凤,赵健,于京平.2015-2016 年威海市售海产品重金属污染状况分析[J].实用预防医学,2019,26(2):226-228
YAN Zhaofeng, ZHAO Jian, YU Jingping. Heavy metal pollution of seafood sold in markets in Weihai city, 2015-2016 [J]. *Practical Preventive Medicine*, 2019, 26(2): 226-228
- [29] 霍苗苗.沿海地区居民摄入水产品中重金属安全风险评估[D].天津:天津科技大学,2016
HUO Miaomiao. Risk assessment of heavy metal ingestion in aquatic products by residents in coastal areas [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2016
- [30] 联合国粮农组织,世界卫生组织.食品中化学物风险评估原则和方法[M].北京:人民卫生出版社,2012
United Nations Food and Agriculture Organization, World Health Organization. Principles and Methods for Risk Assessment of Chemicals in Food [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2012