

青岛农业大学

毕业论文（设计）

题 目： 3-氨基苯甲酸几个降解基因
的克隆与功能验证

姓 名： 范子琪

学 院： 生命科学学院

专 业： 生物技术（食用菌）

班 级： 2015 级 01 班

学 号： 20154640

指导教师： 于浩

2019 年 5 月 28 日

青岛农业大学

毕业论文（设计）诚信声明

本人郑重声明：所呈交的本科毕业论文（设计）是本人在指导老师的指导下，进行研究工作所取得的成果，成果不存在知识产权争议。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体在文中均作了明确的说明并表示了谢意。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

毕业论文（设计）作者签名：

年 月 日

目录

摘要.....	I
Abstract:.....	II
引言.....	1
1 材料与方法.....	3
1.1 实验材料.....	3
1.1.1 生化试剂和试剂盒.....	3
1.1.2 实验器具.....	3
1.1.3 主要实验仪器.....	3
1.1.4 培养基.....	4
1.2 实验方法.....	4
1.2.1 活化菌株 <i>Pseudomonas putida</i> KT2440.....	4
1.2.2 扩增 <i>mab cluster</i> 全长.....	5
1.2.3 提取 pME6032 质粒.....	7
1.2.4 一步克隆连接.....	8
1.2.5 热激转化.....	9
1.2.6 提取重组质粒并电转.....	9
1.2.7 验证 <i>mab cluster</i> 基因簇的功能.....	11
2 结果与分析.....	11
2.1 <i>P. putida</i> KT2440 验证实验.....	11
2.2 提取 QT12 基因组并检测.....	11
2.3 扩增 <i>mab cluster</i> 片段.....	12
2.4 提取 pME6032 质粒.....	13
2.5 将质粒转化进 <i>P. putida</i> KT2440.....	13
3 实验结论与展望.....	17
3.1 结论.....	17
3.2 展望.....	17
参考文献.....	19
致谢.....	20

3-氨基苯甲酸几个降解基因的克隆与功能验证

生物技术（食用菌）专业 范子琪

指导教师 于浩

摘要：丛毛单胞菌 QT12 能够以 3 氨基苯甲酸作为唯一的碳氮源和能源进行生长，前期研究发现一个与 3-氨基苯甲酸降解有关的 *mab cluster* 基因簇，并在该基因簇上面寻找到了与 3 氨基苯甲酸降解相关的两个基因。为了进一步研究该基因簇的功能，本研究将 *mab cluster* 基因簇中一个大小为 6200 bp 的片段进行了体外克隆表达和异源功能验证。首先扩增 *mab cluster* 片段，通过同源重组将 *mab cluster* 片段连接到广宿主质粒 pME6032 上，利用电转化方法转入 *Pseudomonas putida* KT2440 中，将该菌株命名为 KT2440-mab-cluster。通过休止细胞反应表明 KT2440-mab-cluster 菌株不能降解 3-氨基苯甲酸，但是 KT2440-mab-cluster 菌株可以降解 5 氨基水杨酸，进一步证实了 *mabB* 基因的功能。该研究为 *mab cluster* 其他功能基因的研究奠定了基础。

关键字：3-氨基苯甲酸；5-氨基水杨酸；丛毛单胞菌 QT12；克隆表达

Cloning and Functional Verification of Several Degrading Genes of 3-Aminobenzoic Acid

Student majoring in Biotechnology Fan Ziqi

Tutor Yu Hao

Abstract: *Comamonas* sp. Strain QT12 could use 3-aminobenzoate as the sole source of carbon, nitrogen and energy. A gene cluster, *mab cluster*, was identified in this strain, which is responsible for the transformation of 3-aminobenzoate. Two 3-aminobenzoate degrading genes were identified in this cluster. In this study, a 6200 bp fragment of the *mab cluster* gene cluster was cloned and verified in vitro. First amplify the *mab cluster* fragment, inserted into the broad-host-range plasmid pME6032, and then the recombinant plasmid was electrically transformed into *Pseudomonas putida* KT2440. The strain KT2440 containing recombinant plasmid was designated KT2440-*mab-cluster*. The resting cells reaction indicated that strain KT2440-*mab-cluster* cannot transform 3-aminobenzoate, and it could transform 5-aminosalicylate. However, the KT2440-*mab-cluster* strain can degrade 5-aminosalicylic acid, further confirming the function of the *mabB* gene. This study laid the foundation for the study of other functional genes in *mab cluster*.

Keywords: 3-aminobenzoic acid; 5-aminosalicylic acid; *Comamonas* sp. Strain QT12 ; In vitro cloned overexpression

引言

芳香族化合物中的一种重要的化合物芳香胺被广泛应用于农药、杀虫剂等多种化学品生产过程^[1,2]。许多芳香胺是各种偶氮染料和硝基取代化合物的分解产物，既具有致突变性，又具有致癌性，因此对人类有害^[3,4]。随着科技的发展和化工产品在世界范围内的广泛应用，大量的芳香胺等对环境有毒害作用的化合物被排放到环境之中，严重超过了自然环境降解有害化合物的速度，对自然环境造成了不可估量的伤害，使人类及动植物的生存环境进一步恶化。3-氨基苯甲酸和5-氨基水杨酸均是常见的单环氨基芳香酸。

氨基苯甲酸是一种有生物毒性并能够对人类和动植物产生毒害作用的化合物。3-氨基苯甲酸是染料、药物制造业的重要中间体，在工业上使用广泛。因其易溶于水并且会对环境产生巨大的污染^[5]，所以消除环境中的3-氨基苯甲酸刻不容缓。QT12菌株中的 *mab cluster* 基因簇能够将3-氨基苯甲酸转化成5-氨基水杨酸并进一步降解^[6,7]。

5-氨基水杨酸又称5-氨基-2-羟基苯甲酸，药物名称为美沙拉嗪^[6]。5-氨基水杨酸是媒介黄和媒介橙等污染物降解的中间产物，几十年来，5-氨基水杨酸主要被发现通过哺乳动物的N-乙酰化来消除。在细菌中，5-氨基水杨酸被认为是许多芳香族有机污染物异生降解的关键中间体^[8]。它是偶氮染料和取代萘磺酸盐的分解产物。5-氨基水杨酸的生物转化研究将有助于我们阐明这些污染物的微生物降解。并且5-氨基水杨酸被广泛应用于溃疡性结肠炎和克罗恩病，在医药方面有重要作用^[9,10]。对5-氨基水杨酸生物降解的研究有助于我们通过生物降解消除环境中的芳香族有机污染物^[11]。

生物降解是消除环境中氨基苯甲酸类污染物的最有效手段之一^[12]。丛毛单胞菌属的菌株能够降解许多的污染物，有很高的实用价值^[13]。由于丛毛单胞菌属的各个菌株遗传背景有差异，不同的丛毛单胞菌降解各种污染物的性质有所不同^[14]。实验室通过分离得到了一株能够以3-氨基苯甲酸或5-氨基水杨酸作为碳氮源生长的丛毛单胞属菌株QT12，通过生物信息学比对，发现了与3-氨基苯甲酸降解有关的大小约为6200 bp的基因簇，即 *mab cluster*，对基因簇上的基因进行编号，如图1所示。

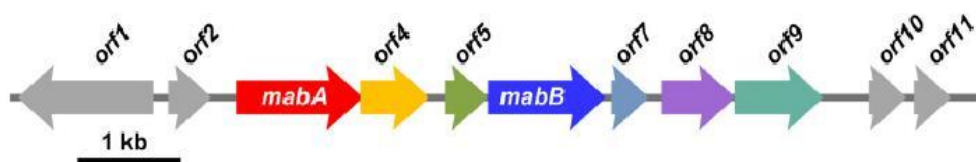


图 1 *mab cluster* 基因簇上的基因

其中，*mab cluster* 基因簇中的 *mabA* 基因可以编码 3-氨基苯甲酸 6-单加氧酶，将 3-氨基苯甲酸催化生成 5-氨基水杨酸^[7]，*mabB* 基因能够编码 5-氨基水杨酸 1,2-双加氧酶，该酶是一种双核蛋白家族的非血红素铁双加氧酶，可以将 5-氨基水杨酸芳香环在 3-氨基苯甲酸的生物降解过程中分解形成顺式-4-氨基-6-羧基-2-氧代己基-3,5-二烯酸(ACOHDA)，并将双氧源分子中的两个氧原子结合到产物中^[5]，如图 2 所示。



图 2 3-氨基苯甲酸的生物降解过程

MabA 基因编码蛋白与 *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2 的 3-羟基苯甲酸 6-羟化酶具有 39%的氨基酸序列同源性，*mabA* 突变株不能在 3-氨基苯甲酸上生长和转化。*mabB* 基因是首次报道的 5-氨基水杨酸 1，2-双加氧酶基因，它编码的酶可以转化 5-氨基水杨酸和龙胆酸盐，但其对 5-氨基水杨酸的催化效率比龙胆酸高 70 倍^[5]。基因簇中的其他基因功能也已经推测出来，预测 *orf7* 基因编码脱氨酶，*orf8* 基因编码调控蛋白，对整个基因簇的功能进行调控，*orf9* 基因编码水解酶，进一步将 3-氨基苯甲酸的产物进行降解，最后进入三羧酸循环，推测途径如图 3 所示。

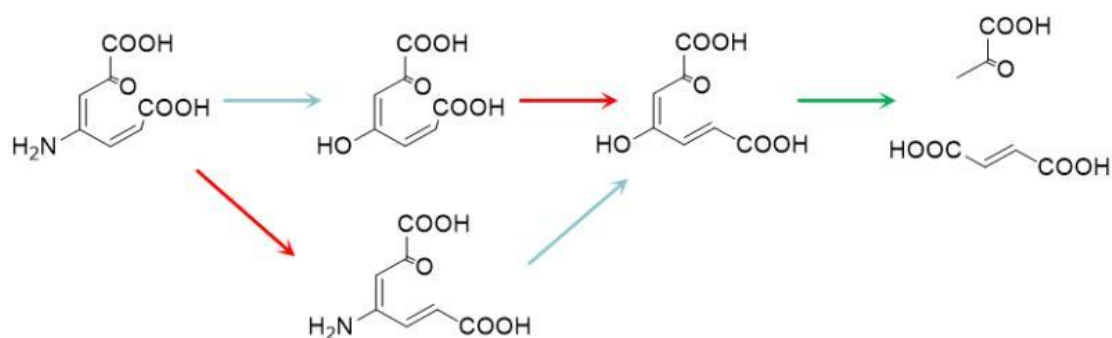


图 3 推测 3-氨基苯甲酸的代谢途径

本研究主要是通过扩增 *mab cluster* 基因簇上的所有基因进行体外功能验证，证明 *mab cluster* 基因簇能够在菌株 QT12 体外降解 3-氨基苯甲酸和 5-氨基水杨酸，为生物降解 3-氨基苯甲酸和 5-氨基水杨酸提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 生化试剂和试剂盒

2×Taq 酶 (TaKaRa)、2×ClonExpress Mix (Vazyme)、2×Q5 超保真 DNA 聚合酶 (纽英伦生物技术有限公司)、DL 5000 DNA Maker (TaKaRa)、DL 8000 DNA Marker (TaKaRa)、DL 10000 DNA Marker (TaKaRa)、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒 (生工生物工程股份有限公司)、Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒 (生工生物工程股份有限公司)、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒 (生工生物工程股份有限公司)、*EcoRI* 限制性内切酶 (TaKaRa)、*XhoI* 限制性内切酶 (TaKaRa)、10×内切酶 buffer (TaKaRa)、10×Loading Buffer (TaKaRa)。

1.1.2 实验器具

电转杯、玻璃培养皿、玻璃棒、锥形瓶、量筒、洗瓶、离心管、烧杯等。

1.1.3 主要试验仪器

表 1 实验仪器设备

仪器名称	仪器型号	仪器厂家
微型漩涡混合仪	XW-80A	上海沪西分析仪器厂有限公司
梯度混合器	TH-2000	上海沪西分析仪器厂有限公司
DNA 扩增仪	HBA-1960	北京友华照钦医疗器械有限公司
超净工作台	SW-CJ-2FD	北京东联哈尔
-20℃冰箱	BCD-252WBCS	青岛海尔股份公司
高压蒸汽灭菌锅	mLS-3750	三洋电机株式会社
电热恒温培养箱	DRP-9082	上海森信实验仪器有限公司

高速离心机	GTR22-1	时代北利离心机有限公司
医用低温箱	MDF-U54V	松下健康医疗器械株式会社
双层全温摇床	QYC 2112	上海福玛实验设备有限公司

1.1.4 培养基

1) LB 培养基

配制 LB 液体培养基的方法为：称取 LB 肉汤干粉，以 25 g/L 的使用量与蒸馏水混合均匀后分装在锥形瓶中密封，121°C，20 min 湿热灭菌。配制 LB 固体培养基时需要在 LB 液体培养基中加 2% 的琼脂（琼脂不溶于冷水，需多次按瓶称量或使之加热溶解后分装）。

2) MSM 液体培养基

以 12.6 g/L $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 、3.4 g/L KH_2PO_4 、1.0 g/L Na_2SO_4 、0.2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 0.5 mL/L 微量金属离子的使用量，与蒸馏水混匀，分装后灭菌。其中微量金属离子中所含成分加入量为（每升微量金属离子溶解于 0.1 mM HCl 中）0.05 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、0.05 g/L $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 、0.008 g/L $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、0.04 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.05 g/L $ZnSO_4$ 、0.1 g/L $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 、0.05 g/L $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ 、0.038 g/L $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 、0.02 g/L $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 和 0.0124 g/L H_3BO_3 。

3) 3-氨基苯甲酸-MSM 液体培养基

在配制好的 MSM 液体培养基中加入 1 mg/mL 的 3-氨基苯甲酸，并且用氢氧化钠将 pH 调到 7 后，将培养基于 115°C，30 min 湿热灭菌，冷却后即可使用。

4) 5-氨基水杨酸-MSM 液体培养基

在配制好的 MSM 液体培养基中加入 1 mg/mL 的 5-氨基水杨酸，并且用氢氧化钠将 pH 调到 7 后，将培养基于 115°C，30 min 湿热灭菌，冷却后即可使用。

1.2 实验方法

1.2.1 活化菌株 *Pseudomonas putida* KT2440

将由甘油管保存的 *P. putida* KT2440 菌株从 -80°C 冰箱中取出后自然融化，转接到 LB 液体培养基中，于 30°C，120 rpm 的摇床中过夜培养。

将活化好的菌株 *P. putida* KT2440 按照 1% 的接种量分别接种到 3-氨基苯甲酸液体培养基和 5-氨基水杨酸液体培养基中，于 30°C，120 rpm 的摇床中培养两天，再次分别转接于 3-氨基苯甲酸液体培养基和 5-氨基水杨酸液体培养基中于 30°C，120 rpm 的摇床培养，查看第二次接种后的结果。

1.2.2 扩增 *mab cluster* 片段

将从毛单胞菌 QT12 菌株接种于含有氨苄（Ampicillin，以下简称 Amp；终浓度 50 $\mu\text{g/mL}$ ，下同）的 LB 液体培养基中，于 30 $^{\circ}\text{C}$ ，120 rpm 的摇床中过夜培养，并参考细菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书提取基因组。进行琼脂糖凝胶电泳检测，将 4.5 μL 的基因组与 0.5 μL 的 10 $\times$ Loading Buffer 混匀后，进行琼脂糖凝胶电泳（以下简称电泳），电泳的具体步骤为：

首先配制琼脂糖凝胶，称取 2 g 琼脂糖加入 20 mL 0.5 $\times$ TAE 缓冲液，于微波炉中溶解。冷却 3 min 后加入 1 μL 核酸染料，将样品倒入插好梳子的小槽中，静置 20 min 左右等待琼脂糖凝固。放入电泳池中，点样孔与负极同方向，将上述混匀后样品点样，在另外的点样孔中加入 5 μL 的 DL 10000 DNA Marker，电泳仪设置 100 V、50 mA、50 W，电泳 20 min，在紫外灯下观察电泳结果。

以 QT12 基因组为模板，用 284-qc-F 和 284-qc-R 作为上下游引物，进行 PCR 扩增。284-qc-F 和 284-qc-R 扩增的片段是 *mab cluster* 中的一段，约为 1200 bp，既可验证 QT12 的存在，又可验证 *mab cluster* 的片段是否连接成功。用 2 $\times$ Taq 酶扩增基因组，引物序列如表 2，PCR 扩增体系如表 3，扩增程序如表 4：

表 2 引物序列

引物名称	碱基序列
284-qc-F	AGGTCATCTTCGGGAAGATCCG
284-qc-R	ACGGCGTCAGCCACTCGACTT

表 3 *mab cluster* 基因簇扩增体系

试剂	加入量 (μL)
284-qc-F	0.6
284-qc-R	0.6
菌液（模板）	1.0
2 $\times$ Taq 酶	7.5
无菌水	5.3
Total	15.0
试剂	加入量 (μL)
284-qc-F	0.6
284-qc-R	0.6

表 4 PCR 扩增程序

温度 (°C)	时间	循环数
95	5 min	1
95	30 sec	35
55	30sec	
72	1.5 min	
72	5 min	1
4	forever	1

PCR 后进行电泳检测，用紫外照射琼脂糖凝胶电泳，获得电泳结果。得到 QT12 菌株的基因组后通过 PCR 扩增构建 *mab cluster* 片段，具体步骤如下：

在构建转化载体时，首先要根据已知的 QT12 基因序列设计引物。遵循引物设计基本原则，引物 GC 含量控制在 60%左右，T_m 值大小相近，引物间不能形成二聚体，同时引物不能太长。按照这几项基本原则设计出 *mab cluster* 基因簇的引物 ME-93-F 和 ME-93-R，引物的碱基序列如下：

表 5 引物序列

引物名称	碱基序列
ME-93-F	TTGTGAGCGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAGA ATTTTATGAACTGCCCCGGTTTAAG
ME-93-R	TTGCAAACCCTCACTGATCCGCTAGTCCGAGGCCTC GAATTAGCCAGTCGAAGTACTTGT

以 QT12 基因组为模板，用引物 ME-93-F/R 和 2×Q5 超保真 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增，PCR 扩增的体系如表 6，PCR 的反应体系如表 7，运行程序如表 8。

表 6 *mab cluster* 片段扩增体系

试剂	加入量 (μL)
ME-93-F	2.5
ME-93-R	2.5
QT12 基因组 (模板)	2.0
2×Q5 超保真 DNA 聚合酶	0.5
无菌水	21.5
5×Q5 反应缓冲液	10.0
5×Q5 High GC Enhancer	10.0
10 mM dNTPS	1.0
Total	50.0

表 7 PCR 运行程序

温度 (°C)	时间	循环数
98	30 sec	1
98	10 sec	
61	20sec	35
72	5 min	
72	2 min	1
4	forever	1

将 PCR 产物电泳后进行胶回收，胶回收的具体步骤参考胶回收试剂盒的说明书。将得到的胶回收产物取 4.5 μL 做电泳检测结果，用紫外照胶观察电泳结果。胶回收产物置于 -20 °C 冰箱保存。

1.2.3 提取 pME6032 质粒

pME6032 质粒是一个大小为 9816 bp 的广宿主表达载体，它本身含有 Tet 抗性。pME6032 质粒利用 pVS1 和 p15A 复制子可以在很多宿主中存在，并利用 Tac 强启动子很好的表达目的蛋白。它是染色质外的双链共价闭合环形 DNA，可自然形成超螺旋结构。

pME6032 质粒图谱如图 4 所示。

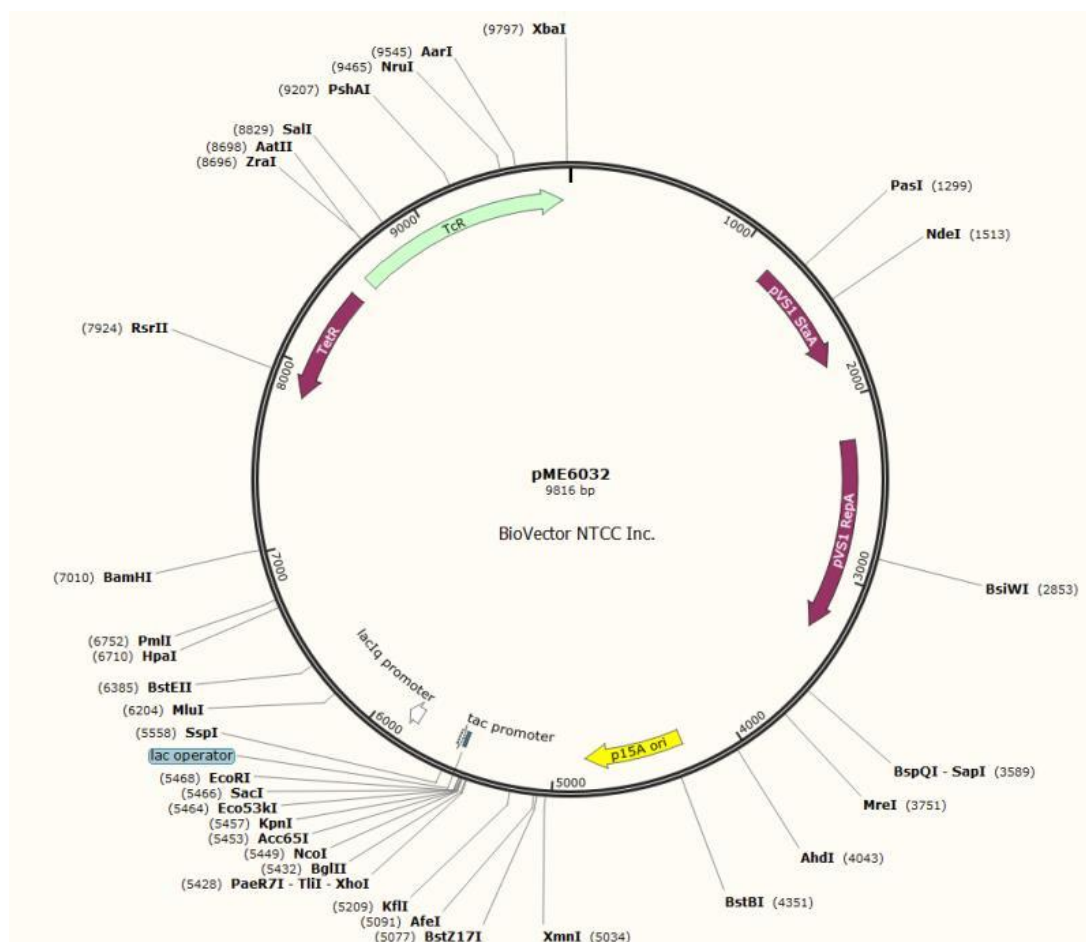


图 4 pME6032 质粒图谱

将 pME6032 的菌种接种到含有 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 Tet（终浓度 25 $\mu\text{g/mL}$ ，下同）的 LB 培养基中，于 37°C，120 rpm 摇床培养 12 到 16 个小时，然后提取质粒。提质粒的具体步骤详见试剂盒说明书。将得到的质粒进行琼脂糖凝胶电泳，观察是否提取成功。

1.2.4 一步克隆连接

提取充足的质粒，利用 *EcoRI* 和 *XhoI* 两种酶进行双酶切，酶切体系如表 8。将体系于 37°C 的水浴锅酶切 4 小时。

表 8 pME6032 酶切体系

试剂	加入量 (μL)
<i>EcoRI</i>	4.0
<i>XhoI</i>	4.0
10×H	8.0
pME6032 质粒	64.0
Total	80.0

利用 PCR 产物纯化方法对酶切体系进行纯化，不需要进行切胶回收。用 20 μL 的 TE buffer 进行洗脱，使洗脱后的线性化载体浓度尽量高。回收产物取 4 μL 进行电泳，取 2 μL 利用 nano drop 测定浓度。

然后进行一步克隆连接，将 2 μL 酶切后的 pME6032 质粒、3 μL 的 *mab cluster* 片段和 5 μL 的 2 $\times$ ClonExpress Mix 于 1.5 ml 离心管混匀，置于 50 $^{\circ}\text{C}$ 的 PCR 仪中连接，将连接产物置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存或用于后续热激实验。

1.2.5 热激转化

由于 *P. putida* KT2440 感受态细胞转化效率不高，所以先将一步克隆连接产物转化进感受态细胞 Trans-T1 中，然后重新提取重组质粒 pME6032-mab-cluster 转化进 *P. putida* KT2440 感受态细胞。

将重组质粒 pME6032-mab-cluster 转化进感受态细胞 Trans-T1 的过程为：

取 5 μL 1.2.4 中一步克隆连接产物加入 50 μL 的 Trans-T1 感受态细胞，轻微弹动混匀后于冰上放置 30 min，42 $^{\circ}\text{C}$ 热激 90 sec，冰上放置 2 min 后加入无抗性的 LB 培养基 600 μL ，于 37 $^{\circ}\text{C}$ ，120 rpm 摇床培养 45 min。

将培养一小时后的菌 8000 rpm 离心 1 min 去掉 600 μL 的上清，将菌重悬并涂布于 Tet 固体培养基上，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱倒置过夜培养。

1.2.6 提取重组质粒并电转

将含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 四环素的 LB 液体培养基分装到 1.5 mL 离心管中，每管加入 600 μL ，挑取单菌落于 1.5 mL 离心管中，于 30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床 120 rpm 培养 6 小时左右。以菌液为模板，用 ME-93-F/R 作为引物以 2 $\times$ Taq 酶进行 PCR 扩增，检测 *mab cluster* 基因簇是否连接成功，具体步骤见 1.2.2。

取电泳结果正确的菌株，将离心管中的菌液转入 100 mL 含有 Tet 抗性的 LB 液体培养基中，于 37 $^{\circ}\text{C}$ ，120 rpm 摇床过夜培养。将过夜培养的菌液提质粒。提取的重组质粒 pME6032-mab-cluster 以电转化的方式转入 *P. putida* KT2440 中，方法如下：

取 5 μL 重组质粒 pME6032-mab-cluster 转入 100 mL 的 *P. putida* KT2440 感受态细胞中混匀，将混匀后的液体转入电转杯中，使用 1800 v，5.3 ms 的电转仪电转，将电转完成的感受态用 700 μL 的 LB 液体培养基混匀，并转入无菌的 1.5

mL 离心管于 30℃，120 rpm 的摇床培养 1 h。将培养的菌液离心后去掉 600 μ L 的上清，并重新将菌体悬起来于含有 Tet 的 LB 固体培养基涂布，30℃倒置过夜培养。

将长出的单菌落挑选十个，挑取到 1.5 mL 离心管中培养，离心管中有含有 Tet 抗性的 LB 液体培养基。将离心管置于 30℃，120 rpm 摇床培养，待能观察到菌液浑浊后做一次菌液 PCR，验证重组质粒 pME6032-mab-cluster 是否转入 *P. putida* KT2440。以 2 $\times$ Taq 酶作为扩增用酶，284-qc-F/R 作为引物扩增，检测 *mab cluster* 基因簇是否存在，构建 15 μ L 的 PCR 体系，并进行电泳检测。

电泳检测后，选取得到正确结果的菌株。利用质粒 pME6032 基因序列设计的引物 6032-cuxu-F/R 进行 PCR 扩增 *mab cluster* 片段并测序，具体方法为：

用 2 $\times$ Q5 超保真 DNA 聚合酶作为扩增用酶，构建 50 μ L 的 PCR 体系。pME6032-cexu-F/R 引物的序列、扩增体系、扩增程序如下所示：

表 9 引物序列

引物名称	碱基序列
pME6032-cexu-F	TCCACACATTATACGAGCCG
pME6032-cexu-R	CACTCCCGTTCTGGATAATGTTT

表 10 pME6032 扩增体系

试剂	加入量 (μ L)
pME6032-cexu-F	2.5
pME6032-cexu-R	2.5
菌液（模板）	4.0
2 $\times$ Q5 超保真 DNA 聚合酶	0.5
无菌水	30.5
5 $\times$ Q5 反应缓冲液	10.0
Total	50.0

表 11 PCR 运行程序

温度 (°C)	时间	循环数
98	30 sec	1
98	30 sec	
61	20sec	35
72	5 min	
72	2 min	1

将 PCR 结果进行电泳检测，取扩增大小正确条带的 PCR 产物，送测序。

1.2.7 验证 *mab cluster* 片段的功能

将测序结果正确的菌株标记为 KT2440-mab-cluster，并进行扩繁。首先配制无菌的 3-氨基苯甲酸溶液和 5-氨基水杨酸溶液。将 300 mg 的 3-氨基苯甲酸加入至 30 mL 超纯水中溶解，并用氢氧化钠溶液调 pH 至 7，配制成 10 mg/mL 的 3-氨基苯甲酸溶液。将 300 mg 的 5-氨基水杨酸加入至 30 mL 超纯水中溶解，并用氢氧化钠溶液调 pH 至 7，配制成 10 mg/mL 的 5-氨基水杨酸溶液。将 3-氨基苯甲酸溶液和 5-氨基水杨酸溶液于 115°C，30 min 灭菌锅湿热灭菌。

将菌株 KT2440-mab-cluster 按照 1%接种量转接至含有 Tet 的 LB 液体培养基中，并加入 IPTG（终浓度为 0.5 mM，下同）对其进行诱导，在培养四小时时，加入 10 mL 灭过菌的 3-氨基苯甲酸溶液，标记为 1 号，加入 10 mL 灭过菌的 5-氨基水杨酸，标记为 2 号，于 30°C，120 rpm 的摇床中过夜培养。

将过夜培养的 1 号、2 号菌株各取出 1 mL，8000 rpm，1 min 离心，弃上清，并用等体积超纯水重悬。用紫外分光光度计测量菌液在 OD₆₀₀ 处的吸光值，由此确定菌液浓度。8000 rpm，5 min 离心去掉上清液，并用 30 mL 超纯水洗涤 2 次，1 号用 0.5 mg/mL 的 3-氨基苯甲酸溶液将菌重悬起来，2 号用 0.5 mg/mL 的 5-氨基水杨酸溶液将菌重悬起来，悬浮后 OD₆₀₀ 的值为 6。将重悬后的菌置于 30°C，120 rpm 的摇床中培养。每 2 小时取样 1 mL，8000 rpm，1 min 离心后收集上清，标好序号，于 -20°C 冰箱保存。

利用紫外分光光度计扫描样品的全波长，观察吸收峰的变化，由此判断菌株 KT2440-mab-cluster 对 3-氨基苯甲酸和 5-氨基水杨酸的降解情况。并测定对照组对 3-氨基苯甲酸和 5-氨基水杨酸的降解情况。

2 结果与分析

2.1 *P. putida* KT2440 验证实验

将 *P. putida* KT2440 第二次转接至 3-氨基苯甲酸或 5-氨基水杨酸液体培养基后，发现 *P. putida* KT2440 都没有生长，说明 *P. putida* KT2440 本身不能以 3-氨基苯甲酸和 5-氨基水杨酸作为唯一的碳氮源生长。

2.2 提取 QT12 基因组并检测

用试剂盒提取了丛毛单胞菌 QT12 基因组，并将提取的样品进行电泳检测，电泳检测结果如图 5 所示。

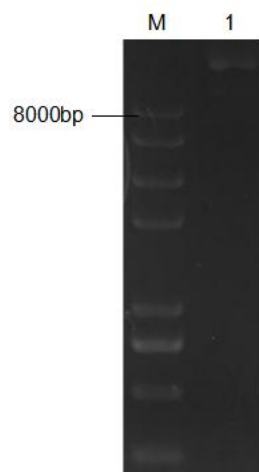


图 5 QT12 基因组

注：M，DL 8000 DNA Marker；1，QT12 基因组

以 QT12 基因组为模板，284-qc-F/R 为引物，通过 PCR 扩增 QT12 基因组上的一段基因，并进行电泳检测，得到了图 6 的结果，该片段大小为 1200 bp，与预测片段大小相同，证明提取的基因组正确。

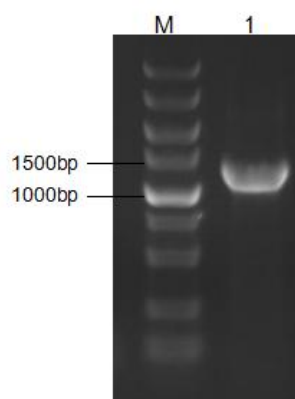


图 6 QT12 检测结果

注：M，DL 5000 DNA Marker；1，QT12 基因组

2.3 扩增 *mab cluster* 片段

以 QT12 基因组为模板，用 2×Q5 超保真 DNA 聚合酶进行 PCR，成功扩增出了 *mab cluster* 片段，PCR 扩增片段的电泳检测结果如图 7。

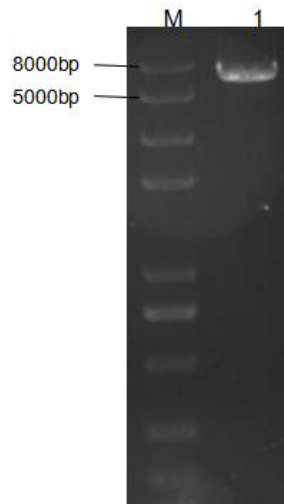


图 7 扩增 *mab cluster* 片段结果

注：M，DL 8000 DNA Marker；1，PCR 产物

2.4 提取 pME6032 质粒

将提取得到的 pME6032 质粒，进行电泳检测，结果如图 8，说明提取成功。

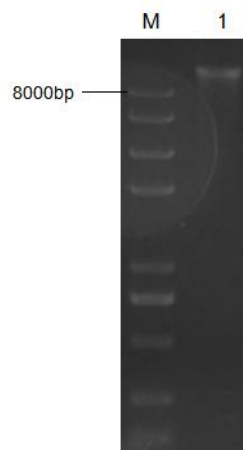


图 8 提质粒检测结果

注：M，DL 8000 DNA Marker；1，pME6032 质粒

2.5 将质粒转化进 *P. putida* KT2440

按照 1.2.4 和 1.2.5 步骤进行转化，得到的单菌落进行 PCR 验证 *mab cluster* 片段的是否连接成功。用 284-qc-F/R 作为引物进行扩增，电泳检测结果如图 9。

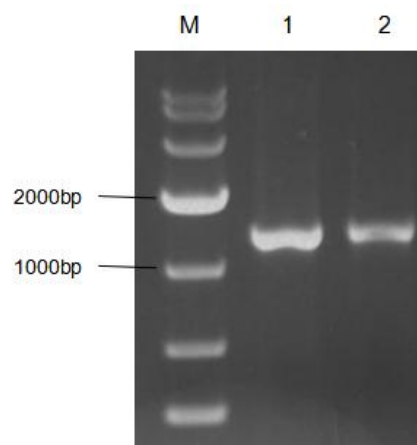


图 9 *mab cluster* 基因簇检测

注：M，DL 10000 DNA Marker；1、2，PCR 产物

将验证正确的菌株扩繁后提取重组质粒 *pME6032-mab-cluster*，并进行电泳检测。

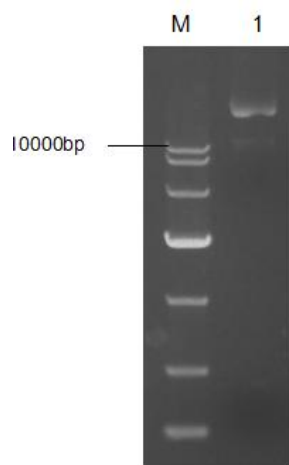


图 10 重组质粒检测结果

注：M，DL 10000 DNA Marker；1，重组质粒

将重组质粒转化进 *P. putida* KT2440 中，挑取单菌落验证 *P. putida* KT2440 中是否含有重组质粒 *pME6032-mab-cluster*，验证结果如图 10 所示，获得了正确的菌株 KT2440-*mab-cluster*，以备后续实验。

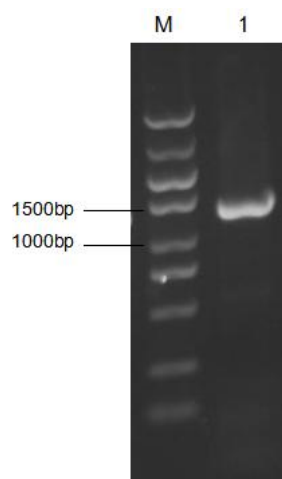


图 11 *mab cluster* 基因簇检测

注：M，DL 5000 DNA Marker；1，PCR 产物

将 1.2.7 获得的样品，稀释 20 倍进行全波长扫描，得到图 12 和表 12 结果。

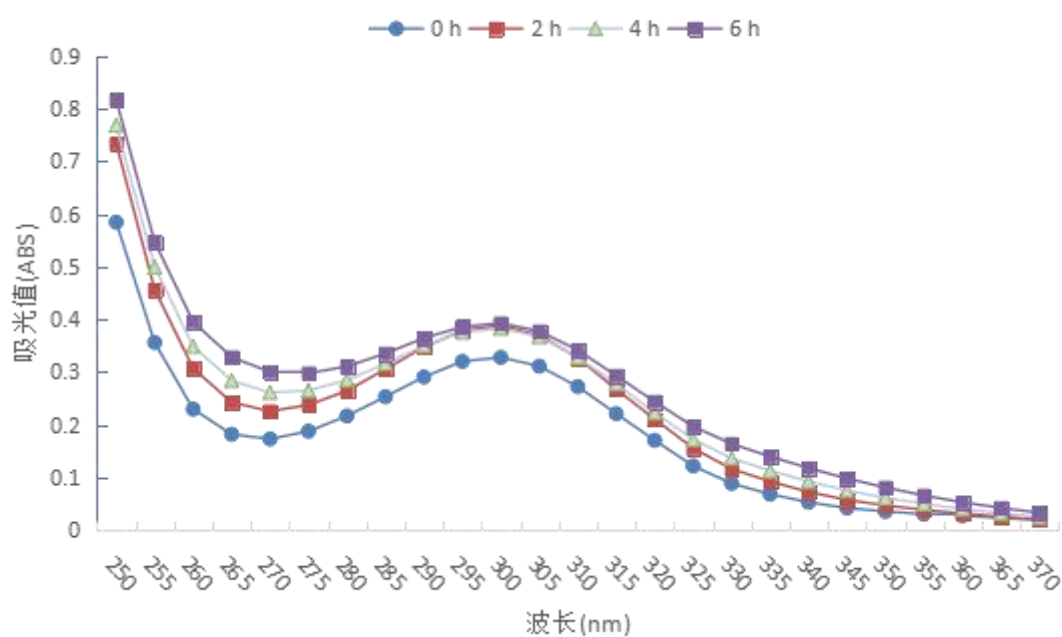


图 12 3-氨基苯甲酸休止细胞反应全波长扫描结果

表 12 全波长扫描吸收峰位置波长

	295 nm	300 nm	305 nm
0 h	0.320296407	0.327835381	0.311262935
2 h	0.378656209	0.388428122	0.369686157
4 h	0.375564665	0.383028418	0.367028385
6 h	0.385878116	0.392791331	0.377582282

由图 6 和表 12 可看出, 0 h 到 6 h 的吸收峰都在大约 300 nm 处, 并没有发生变化, 说明 KT2440-mab-cluster 不能降解 3-氨基苯甲酸。

将 1.2.7 获得的样品, 稀释 20 倍以后做全波长扫描, 得到的结果如图 13、表 13 和表 14 所示。

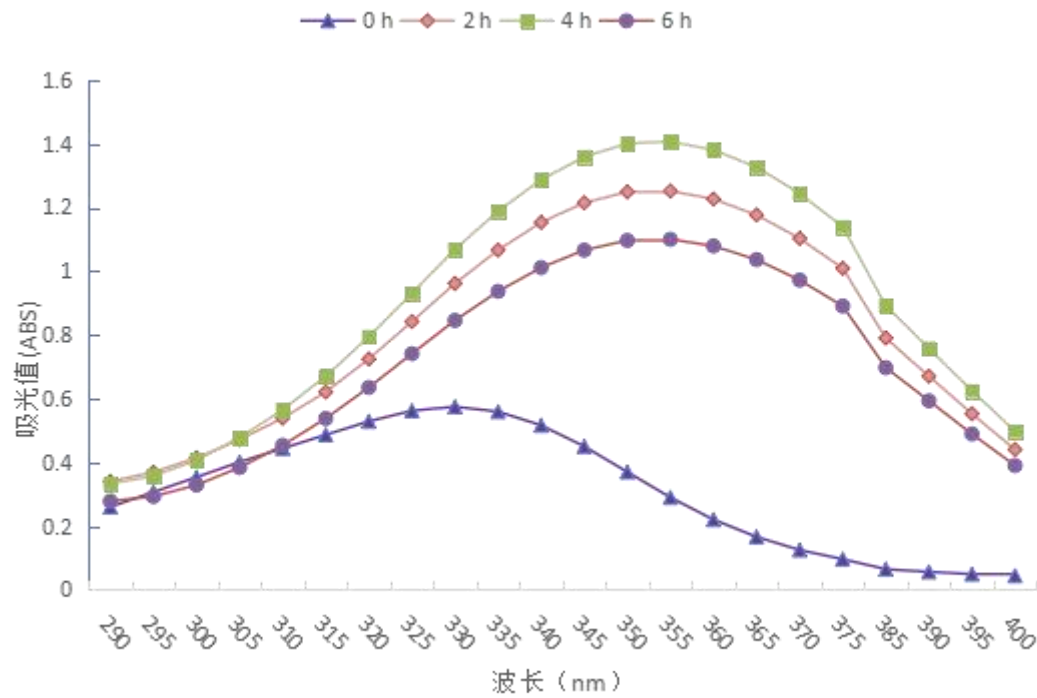


图 13 5-氨基水杨酸休止细胞反应全波长扫描结果

表 13 全波长扫描 0 h 吸收峰位置波长

	320 nm	325 nm	330 nm	335 nm	340 nm
0 h	0.52867341	0.561951518	0.574492216	0.55919373	0.522712469
2 h	0.724143207	0.841572344	0.948753476	1.066044807	1.144080162
4 h	0.793913126	0.930346966	1.053366899	1.188399911	1.275901198
6 h	0.634988666	0.740970552	0.834252417	0.936539114	1.00389111

表 14 全波长扫描 2、4、6 h 吸收峰位置波长

	350 nm	355 nm	360 nm
0 h	0.369825631	0.298353016	0.220362186
2 h	1.248417258	1.252543449	1.226166844
4 h	1.400157452	1.408085346	1.380182505
6 h	1.096280098	1.101047158	1.078840971

图 13 的零小时的吸收峰大约在 330 nm 处, 2 h、4 h、6 h 的吸收峰大约在

355 nm 处，由此可判断以 5-氨基水杨酸溶液做休止细胞反应时将 5-氨基水杨酸降解成了新的物质。所以 *mab cluster* 片段在 *P. putida* KT2440 中可以表达降解 5-氨基水杨酸的基因。

3 实验结论与展望

3.1 结论

菌株 QT12 可以将 3-氨基苯甲酸分解成 5-氨基水杨酸，然后 5-氨基水杨酸继续被降解成顺式-4-氨基-6-羧基-2-氧代己基-3,5-二烯酸。在菌株 QT12 中含有与 3-氨基苯甲酸和 5-氨基水杨酸代谢途径相关的 *mab cluster* 基因簇，本文主要通过将 *mab cluster* 基因簇中大小为 6200 bp 的片段体外克隆过表达，了解其在体外对 3-氨基苯甲酸和 5-氨基水杨酸的降解及中间产物的生成。

本实验将 *mab cluster* 片段连接到质粒 pME6032 上，形成重组质粒 pME6032-mab-cluster，并将重组质粒转入 *P. putida* KT2440 中，使 *mab cluster* 基因簇在 *P. putida* KT2440 中表达，但是通过对 KT2440-mab-cluster 的诱导和休止细胞反应实验得到的结果是 *mab cluster* 基因簇不能在 *P. putida* KT2440 中表达降解 3-氨基苯甲酸的基因，原因可能是质粒 pME6032 启动子在表达 *mabA* 时产生了突变，导致 *mabA* 基因不能正常表达，使其表达的蛋白失活。但是 KT2440-mab-cluster 可以表达 *mabB* 基因，本实验验证了 *mab cluster* 基因簇能够在体外表达 *mabB* 基因，将 5-氨基水杨酸降解成了新的物质。关于实验中生成的新物质，推测是顺式-4-氨基-6-羧基-2-氧代己基-3,5-二烯酸，但是还没有进行下一步实验证明该结果。关于 3-氨基苯甲酸的体外降解和 5-氨基水杨酸的降解产物还待进一步研究。

3.2 展望

随着现代科技的发展，工业生产和农化产品的应用日趋增多，随之而来的有机化合物的乱排乱放导致的问题也越来越多，有机工业废弃物的随意处理和人类对于生存环境需求的矛盾日益加深，处理环境中的废弃有机污染物刻不容缓。生物降解是处理环境中有机污染物的重要途径。生物降解芳香族化合物是一个重要的研究方向。芳香胺以及由硝基芳烃形成的降解产物在氧气存在下容易聚合，形成持久的大分子。虽然简单的单环氨基芳香酸本身不是诱变的，但它们的降解对于在废水和污染土壤中解毒这些污染物是必不可少的^[6]。

芳香族化合物 3-氨基苯甲酸的生物降解途径已有报道,但对相关蛋白的序列和生化性质知之甚少。2-氨基苯甲酸盐和 4-氨基苯甲酸盐的微生物降解已有广泛的研究,并对这两种氨基酸降解的基因进行了表征。然而,对 3-氨基苯甲酸的微生物降解还不完全清楚。在有氧微生物降解 3-氨基苯甲酸的途径中,3-氨基苯甲酸首先转化为 5-氨基水杨酸,5-氨基水杨酸被 5-氨基水杨酸 1,2-双加氧酶进一步氧化为顺式-4-氨基-6-羧基-2-氧代己基-3,5-二烯酸。因此,5-氨基水杨酸的微生物转化对于污染水或土壤的解毒至关重要。然而,关于 5-氨基水杨酸微生物转化的信息却很少。龙胆酸 1,2-双加氧酶能转化 5-氨基水杨酸,但这些酶对龙胆酸的催化效率远高于 5-氨基水杨酸。

随着对 3-氨基苯甲酸和 5-氨基水杨酸生物降解的不断研究,在不久的将来,关于 3-氨基苯甲酸及 5-氨基水杨酸代谢相关基因及其功能都会被完全破解。为生物降解芳香胺类化合物提供一种新方法。

参考文献

- [1] 徐克勋.精细有机化工原料及中间体手册.北京化学工业出版社,1998:3-135.
- [2] 李蒙英,张迹,陆鹏,等.3,5-二硝基苯甲酸降解菌 A3 的分离及降解特性.中国环境科学,2007,27(6):106-110.
- [3] McMullan G,Meehan C,Conneely A,etal.Microbial decolourisation and degradation of textile dyes.Appl Microbiol Biotechnol,2001,56:81-87.
- [4] Chuang KT,Stevens E.Degradation of azo dyes by environmental microorganisms and helminthes.EnvIRON Toxicol Chem,1993,12:2121– 2132.
- [5] 张睿,刘秀杰,胡涛,等.3-氨基苯甲酸的合成.天津理工大学学报,2010,26(3):38-40.
- [6] Hao Yu,Shuxue Zhao,Weidong Lu.A novel gene,encoding 3-aminobenzoate 6-monooxygenase, involved in 3- aminobenzoate degradation in Comamonas sp.strain QT12.Appl Microbiol Biotechnol,2018,102:4843-4852.
- [7] Hao Yu,Shuxue Zhao.Novel Gene Encoding 5-Aminosalicylate 1,2-Dioxygenase from Comamonas sp.Strain QT12 and Catalytic Properties of the Purified Enzyme.J Bacero,2018,200:e00395-e00317.
- [8] Haug w,Schmidt A,Nortemann B,etal. Mineralization of the sulfonated azo dye Mordant Yellow 3 by a 6-aminonaphthalene-2-sulfonate-degrading bacterial consortium. Appl Environ Microbiol,1991,57:3144-3149.
- [9] 徐勇智,史铁钧.5-氨基水杨酸的合成方法.精细化工中间体,2005,35(3):60-62.
- [10] 肖梦媛.美沙拉秦实验室合成方法的研究.科教导刊(上旬刊),2013,(12):158.
- [11] Russ R,Muller c,KnacKmuss HJ,etal.Aerobic biodegradation of 3-aminobenzoate by gram-negative bacteria involves intermediate formation of 5-mnslicylal as ingcleavage substrate FEMS Microhiol Lett,1994,122:137-143.
- [12] 赵燕,薛林贵,李琳,等.丛毛单胞菌在环境我认为降解方面的研究进展.微生物学通报,2012,39(10):1471-1478.
- [13] 崔明超.羧丸酮丛毛单胞菌降解喹啉的影响因素分析.广州大学学报,自然科学版,2005,4(15)403-406.
- [14] 李依伟,潘大仁,宫雅琴,等.羧丸酮丛毛单胞菌降解胆固醇的培养条件研究.内蒙古民族大学学报,2010,21:308-310.

致谢

毕业设计完成，首先要感谢四年来一直对我的实验进行指导的于浩老师，还有实验室的郭立忠老师。如果没有各位老师对我实验技术的指导，我不可能顺利的完成毕业设计。在于浩老师的指导下，我确立了实验的方向。在实验过程中于浩老师一直全程给与我技术指导与帮助，因为于浩老师的指导我的毕业设计才得以顺利完成。在老师的指导下，我不仅学到了实验技术，在思考、求实、认真做事等方面也有了进步。然后我要感谢实验室的赵书雪师姐、王菲师姐、高杰师姐、杨霆师兄。特别是赵书雪师姐和王菲师姐，在我实验遇到困难的时候是他们的无私帮助使我度过了一个又一个难关。还有我同级的同学们，在我的实验和论文完成上给予了很多帮助。还要感谢一下我的父母，特别是我的母亲，在我实验失败的时候给与我鼓励和支持，使我度过了心灵上的难关。最后要感谢我生活了四年的母校，不仅为我提供了学习和实验的资源，还为我带来了新的视野和无私帮助我的师长、朋友。