

青島农业大学

毕 业 论 文 (设计)

目： 菌株 P156 中烟酸羟化酶基因片段 的克隆与功能研究

姓 名: 王倩倩

学 院： 生命科学学院

专 业: 生技(食用菌)

班 级: 2015 级 01 班

学 号: 20154693

指导教师: 于浩

2019 年 5 月 29 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 材料.....	3
1.1.1 实验菌株和载体.....	3
1.1.2 实验仪器和用具.....	3
1.1.3 实验试剂.....	3
1.1.4 培养基.....	3
1.2 方法.....	4
1.2.1 试剂的配制.....	4
1.2.2 产碱杆菌 P156 基因组的提取（手提细菌基因组法）.....	4
1.2.3 PCR 扩增目的基因 2914-1516.....	5
1.2.4 PCR 产物回收.....	6
1.2.5 提取大肠杆菌 pME6032 质粒.....	6
1.2.6 双酶切.....	7
1.2.7 一步克隆连接.....	8
1.2.8 热激转化.....	8
1.2.9 菌液 PCR 验证.....	8
1.2.10 电转化.....	9
1.2.11 菌液 PCR 验证.....	10
1.2.12 休止细胞反应验证功能.....	10
2 结果.....	11
2.1 目的基因 PCR 验证和质粒验证.....	11
2.2 热激转化后菌液 PCR 验证.....	12
2.3 电转化后菌液 PCR 验证.....	13
2.4 样品全波长扫描图.....	13
3 讨论.....	14
4 展望.....	15
参考文献.....	16
致谢.....	18

菌株 P156 中烟酸羟化酶基因片段的克隆与功能研究

生物技术（食用菌）专业 王倩倩

指导教师 于 浩

摘要：烟酸羟化酶基因在产碱杆菌 P156 中表达后可将烟酸羟基化生成 6-羟基烟酸，该步骤反应是烟酸降解的关键步骤，对吡啶类化合物降解具有重要作用。本研究前期通过生物信息学比对分析发现在菌株 P156 中存在三个基因片段（2914-14、2914-15、2914-16）可能编码烟酸羟化酶。用 *EcoRI* 和 *XhoI* 内切酶对 pME6032 载体酶切后，将其与目的基因 2914-1516 采用一步克隆连接，转化得到 S16-pME6032-2914-1516 菌株，利用休止细胞反应发现 S16-pME6032-2914-1516 菌株不能降解烟酸，进一步说明 2914-1516 基因片段不能编码烟酸羟化酶，对烟酸的降解不起作用，由此推测 2914-1415 基因片段可能有降解烟酸的功能。第二阶段 2914-1415 基因片段的功能尚在验证中。本研究为验证 P156 中烟酸羟化酶基因的功能及吡啶类化合物的降解的相关研究提供一定的理论依据。

关键词：产碱杆菌属；烟酸；羟化酶

Cloning and functional study of nicotinic acid hydroxylase gene fragment in strain P156

Biotechnology (edible fungi) Qianqian Wang

Tutor

Hao Yu

Abstract: After the expression of nicotinic acid hydroxylase gene in alkali-producing bacillus P156, the nicotinic acid hydroxyl can be synthesized into 6-hydroxynicotinic acid, which is a key step in the degradation of nicotinic acid and plays an important role in the degradation of pyridine compounds. In the early stage of this study, bioinformatics analysis revealed that three gene fragments (2914-14, 2914-15, 2914-16) may encode nicotinic acid hydroxylase in strain P156. Using *EcoRI* and *XhoI* endonuclease enzyme of pME6032 carrier, with the 2914-1516 connected by step cloning, gene transformation get S16 - pME6032-2914-1516 strains, using the resting cells reaction found S16 pME6032-2914-1516 strains can't degradation of niacin, further illustrate nicotinic acid hydroxylase, 2914-1516 genes can't coding for the degradation of niacin, suggesting 2914-1415 genes may have the function of the degradation of nicotinic acid. The function of the second phase 2914-1415 gene fragment is still under verification. This study provides certain theoretical basis for verifying the function of nicotinic acid hydroxylase gene in P156 and the degradation of pyridine compounds.

Key words: *Alcaligenes*; nicotinic acid; hydroxylase

引言

吡啶类化合物广泛应用于化工、农业、医药、食品等行业。吡啶及其衍生物是已知有机化学物质中最大的一类，氮原子使吡啶环更亲电，对其生物生理起着重要作用，使吡啶化合物具有优异且重要的生物生理活性^[1]。有机合成吡啶衍生物的生产需要严格的高产条件，因而需要较高的成本，而生物催化技术合成吡啶衍生物具有选择性高、反应条件温和等优点，对化学工业来说是一项有用的补充技术。然而，生物催化技术在吡啶类化合物生产中由于缺乏酶而受到限制^[2-5]。

在自然界中，吡啶环主要存在于辅酶、植物生物碱及其次生产物中^[6-8]，就像它的同环类似物一样，吡啶化合物被认为是持久性污染物，其中大部分对人体和其他生物有害，吡啶及其衍生物在环境中易扩散，被联合国列为重点污染物^[9-11]。因此，从环境中去除吡啶类化合物十分必要。吡啶类化合物可以被生物、物理和化学方法除去，物理方法如生物活性炭吸附法，化学方法如高级氧化技术。微生物降解可以在不产生二次污染的情况下高效地去除这些化合物，因此，微生物在吡啶衍类化合物的降解中起着重要作用，是一种吡啶类化合物生物催化的重要生物资源^[12-15]。

烟酰胺为吡啶衍生物，是烟酸的酰胺化合物，又称尼克烟酰胺，别名维生素B3^[16]。烟酰胺酶是一种几乎普遍存在的酶，它通过回收途径将烟酰胺转化为烟酸，生成 NAD^+ ， NAD^+ 是代谢中重要的氧化还原载体。P156 菌株降解烟酰胺的第一步是脱氨生成烟酸，烟酸的降解途径与 *P. putida* KT2440 相似，烟酸可以通过 2,5-DHP 途径进一步降解，如图 1^[1]。

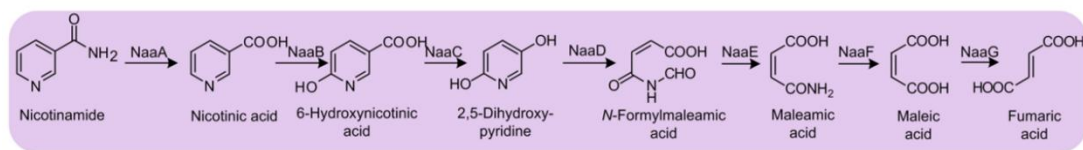


图 1 烟酰胺降解途径图

已有研究报道说明，从固体废物处理厂的土壤中分离出了以烟酰胺和烟酸为唯一碳氮源和能源的新型 P156 菌株。研究对烟酰胺的好氧生长和降解进行了表征。通过对 P156 菌株基因组序列进行序列比对，获得了 7 个烟酰胺降解相关基因，并克隆其中四个基因 *naaA*、*naaD*、*naaE* 和 *naaF*，进行了体外表达。烟酰胺的降解是由脱氨反应引发的，由烟酰胺酶 NaaA 催化的脱氨反应的产物是烟酸。

如图 2、3，烟酸转化为 6-羟基烟酸再进一步氧化为 2,5-二羟基吡啶(2,5- DHP)。2,5- DHP 转化为 N-甲酰基马来酸，该产物由一个二价铁离子依赖的双加氧酶 NaaD 合成。N-甲酰基马来酸转化成马来酰胺酸，马来酰胺酸转化成马来酸，马来酸再转化成富马酸^[1]。

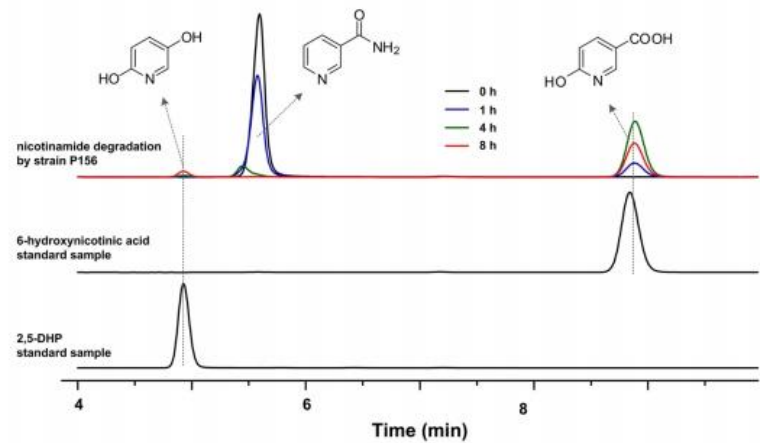


图 2 烟酰胺在 P156 菌株中的降解分析图

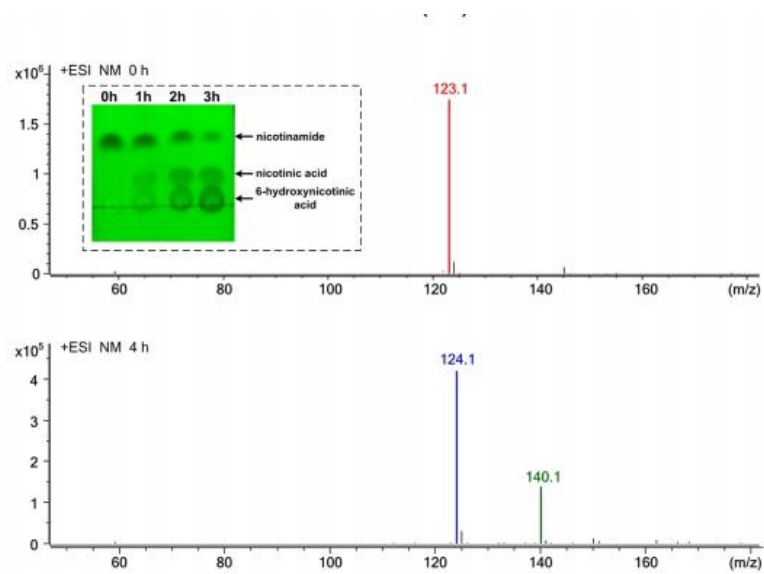


图 3 烟酰胺在 P156 菌株中的降解分析图

烟酸（NA）是一种最常见的吡啶类化合物，可以作为底物为微生物生长提供碳源和氮源，是研究吡啶类化合物代谢的模式生物^[16,17]。目前已经在假单胞菌，产碱杆菌，芽孢杆菌等多个菌株中报道了烟酸代谢的途径。目前已经发现了多条烟酸降解途径，其中好氧细菌主要通过 2,5-二羟基吡啶（2,5-DHP）途径对烟酸进行降解。该途径中，烟酸首先由烟酸羟化酶催化生成 6-羟基烟酸（6HNA），随后生成 2,5-DHP。

本研究主要目的是通过克隆、异源表达的方式来验证产碱杆菌 P156 中烟酸羟化酶基因的功能，为吡啶类化合物的降解的相关研究提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株和载体

产碱杆菌 P156、恶臭假单胞菌 S16、大肠杆菌 Trans1-T1 感受态、pME6032 质粒（以上均为本实验室保存）

1.1.2 实验仪器和用具

制冰机、微波炉、紫外可见分光光度计、超低温冰柜、离心机、电转仪、超微量分光光度计、电子天平、超纯水系统、恒温震荡培养箱、超净工作台、电热恒温培养箱、通风柜、梯度 PCR 仪、数显恒温水浴锅、不同规格的移液器以及相应的枪头、电泳仪、凝胶成像系统、蓝光切胶仪、质粒回收试剂盒（生工生物工程股份有限公司）、PCR 产物纯化试剂盒（生工生物工程股份有限公司）、胶回收试剂盒（生工生物工程股份有限公司）

镊子、手术刀、接种环、纱布、注射器、药匙、记号笔、标签纸、滤膜（0.22 μm ）、高压灭菌锅、灭菌桶、培养皿、试管、烧杯、玻璃棒、锥形瓶、酒精灯、量筒、离心管

1.1.3 实验试剂

5×Loading Buffer、氯仿：异戊醇（24:1）、琼脂糖、异丙醇、70%乙醇、TE Buffer、10%SDS、蛋白酶 K、氯化钠、RNase A、ddH₂O、*EcoRI* 内切酶、*XhoI* 内切酶、IPTG、四环素（Tetracycline, 50 mg/mL）、DNA Maker（DL5000）、0.5×TAE 缓冲液、2×Pfu PCR Master Mix、CTAB/NaCl 溶液、无水乙醇、Tris-HCl（50 mM）、GoldView I 型核酸染料、酚：氯仿：异戊醇（25:24:1）、2×ClonExpress Mix

1.1.4 培养基

LB 液体培养基配方如表 1：

表 1 LB 培养基配方

药品	质量 (g/L)
胰蛋白胨	10.0
酵母浸粉	5.0
氯化钠	10.0

1.2 方法

1.2.1 试剂的配制

CTAB/NaCl 溶液：在烧杯中放入 4.1 g 氯化钠，加入 80 mL 蒸馏水搅拌融化，缓慢加入 10 g CTAB，然后加蒸馏水定容至 100 mL。

酚：氯仿：异戊醇（25:24:1）：取 6.5 mL 饱和酚加入到 6.5 mL 氯仿：异戊醇（24:1）中，剧烈震荡，取下层液体使用。

IPTG 保存液：将 1 g IPTG 溶于蒸馏水中，定容至 5 mL，在超净台中，用 0.22 μ m 的滤膜过滤除菌，-20℃保存。

Tris-HCl（50 mM）：称取 0.60 g Tris-HCl 溶解于 80 mL 蒸馏水中，浓盐酸调 pH=7.4，定容至 100 mL。

四环素（50 mg/mL）：称取 0.5 g 四环素溶于 10 mL 的蒸馏水中，在超净台中用灭过菌的孔径为 0.22 μ m 的滤膜过滤除菌，分装到 1.5 mL 的离心管中，保存到-20℃冰箱中。

70%无水乙醇：取 70 mL 无水乙醇加蒸馏水定容至 100 mL，现配现用。

LB 液体培养基：称取 LB 肉汤 25 g 溶于 1000 mL 蒸馏水，通过滴加 NaOH 将 pH 调至 7.0，于 121℃高压灭菌 20 min。

1.2.2 产碱杆菌 P156 基因组的提取（手提细菌基因组法）

活化菌种，取 200 μ L 的-80℃保存的产碱杆菌 P156 菌种于 50 mL 的 LB 液体培养基中 30℃过夜振荡至浑浊。

将产碱杆菌 P156 的菌种转接到 500 mL 的 LB 液体培养基中，将 LB 液体培养基放于 30℃恒温培养箱过夜震荡培养。取过夜培养的大肠杆菌分装到离心管中，5000 rpm 离心 10 min，弃上清收集菌体。

向离心管中加入 4.75 mL 的 TE Buffer 将菌体沉淀彻底重悬，集中于同一离心管，并加 0.25 mL 的 10%的 SDS、25 μ L 的 20 mg/mL 的蛋白酶 K，充分混匀，将离心管放于 37℃保温箱保温 1 h，使细胞裂解，充分去除蛋白杂质。

加 0.75 mL 的 5 mol/L 的 NaCl，充分混匀。

向离心管中加入 0.75 mL 的 CTAB/NaCl 溶液,充分混匀,将离心管放于 65℃ 的水浴锅中保温 20 min。

向离心管中加 5 μ L 的 RNaseA (10 μ g/ μ L), 将离心管放于 37℃的水浴锅中保温 10 min, 降解 RNA, 去除 RNA 污染。

用移液器取 6.5 mL 的酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1) 对离心管中的液体反复抽提 (反复震荡, 但不要涡旋震荡), 离心机转速设置 5000 rpm 温度设置 4℃ 离心 10 min, 使 DNA 充分溶解于有机相中, 将上层有机相转移至干净的离心管中 (可以将枪头去尖避免吸取下层液体)。

用移液器取 6.5 mL 的氯仿: 异戊醇 (24:1) 对离心管中的液体反复抽提 (反复震荡, 但不要涡旋震荡), 使得 DNA 充分溶解于有机相中, 将上层有机相转移至干净的离心管中 (可以将枪头去尖避免吸取下层液体)。

向离心管中加入等体积的异丙醇, 颠倒离心管将溶液混合, 室温下静置 10 min, 使 DNA 充分沉淀。将离心机设置 5000 rpm 离心 5 min, 弃上清。

再加入 5 mL 的 70%的乙醇漂洗(不要悬浮 DNA), 离心机参数设置 5000 rpm 离心 3 min, 轻轻倒掉上清, 注意不要倒掉 DNA。

重复步骤 (9)。

将乙醇轻轻倒掉, 吹干 (一定要吹干, 否则乙醇会影响后续实验, 如果发白就表明没有吹干, 吹干后呈透明状)。然后将基因组溶于 0.5 mL 无菌水, 做好标记并将其放于-20℃冰箱保存。

1.2.3 PCR 扩增目的基因 2914-1516

引物设计: 在进行构建转化载体时, 首先要根据已知的 2914-1516 基因序列设计引物。在设计引物时应遵循引物的设计基本原则, 控制 Tm 值相近, 引物间不要形成二聚体, 同时要保证引物 GC 含量在 60%左右且不能太长。按照这几项基本原则设计出本次载体构建所使用引物如表 2, 利用引物 2914-1516-F 和 2914-1516-R 以 P156 基因组作为模板, 利用 2 $\times$ Pfu PCR MasterMix 酶扩增, 扩增片段长度为 3000 bp, 如表 3 配置反应体系, 如表 4 设定参数, 进行 PCR 扩增。

表 2 引物序列

名称	序列 (5'-3')
2914-1516-F	ATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGAATTC
2914-1516-R	GGGAGCAGAAGGGGCATCTGTAGCGAGCTCCCGGGTACCATGGCA

表 3 PCR 反应体系

体系	体积 (μL)
引物 2914-1516-F	1.5
引物 2914-1516-R	1.5
P156 基因组	1.5
2×Pfu PCR MasterMix	15.0
ddH ₂ O	10.5
总计	30.0

表 4 PCR 反应程序

温度 ($^{\circ}\text{C}$)	时间 (s)
95	180
95	30
56	30
72	180
72	600
4	∞

} 30 个循环

1.2.4 PCR 产物回收

产物验证。称量 0.25 g 琼脂糖于 25 mL 的 0.5×TAE 中，加热至琼脂糖完全融化。待冷却至 55°C~60°C，加入 1 μL 的 I 型核酸染色剂，混匀后倒入检测胶模板中，冷却成型。取 5 μL 的 PCR 产物与 5 μL 的 Marker (DL5000) 一起进行电泳检测，电泳仪设置 100 V、50 mA、50 W，电泳 18 min。用 UVP software 照射凝胶成像。

称量 0.25 g 琼脂糖于 25 mL 的 0.5×TAE 中，加热直至琼脂糖完全融化。待冷却至 55°C~60°C，加入 1 μL 的 I 型核酸染色剂，混匀后倒入回收胶模板中，冷却后成型。将剩余的 115 μL 扩增产物均匀的点入两边胶孔中，然后与 5 μL 的 Marker (DL5000) 一起进行电泳检测，电泳仪设置 100 V、50 mA、50 W，电泳 18 min。用 UVP software 照射凝胶成像。

用生工柱式 DNA 胶回收试剂盒对 PCR 产物胶回收。

跑琼脂糖凝胶电泳验证，用 UVP software 照射凝胶成像。

1.2.5 提取大肠杆菌 pME6032 质粒

活化菌种，取 200 μL 的 -80°C 保存的大肠杆菌 pME6032 菌种于 50 mL 的含 Tet 的 LB 液体培养基中 37°C 过夜振荡至浑浊。

将大肠杆菌 pME6032 的菌种转接到含有 Tet 的 LB 液体培养基中, 50 mL 的 LB 液体培养基中加入 50 μ L 的 50 mg/mL 的 Tet 和 200 μ L 的菌种, 终浓度为 50 μ g/mL, 将三角瓶放于 37°C 恒温震荡培养箱过夜培养。

离心机设置 8000 g 离心 2 min, 重复四次收集菌体于同一 1.5 mL 离心管中, 提高菌体浓度。

在菌体沉淀中加 300 μ L 的 Buffer P1 吸打震荡菌体至彻底悬浮, 随后放在冰上静置 3 min。再加入 300 μ L 的 Buffer P2, 即刻颠倒混匀管中液体 10 次, 室温下静置 4 min。再加入 400 μ L 的 Buffer P3, 即刻颠倒混匀管中液体 10 次至充分混匀。

放入离心机中用 13000 rpm 离心 5 min, 取上清 700 μ L 于吸附柱中, 离心机设置 9000 g 离心 30 s。将收集管中的液体重新倒回吸附柱, 吸附柱重新放回收集管中, 再次 9000 g 离心 30 s, 提高收集效率。

向吸附柱中加 500 μ L 的 Wash Solution, 离心机设置 9000 g 离心 30 s, 将收集管中的液体倒掉, 吸附柱重新放回, 此步骤重复两次。

将空的吸附柱和收集管重新离心, 离心机设置 9000 g 离心 1 min。将吸附柱放在超净台中吹风 5 min 吹干膜上残留液体, 使乙醇彻底挥发不影响后续实验。

将吸附柱放在新的 1.5 mL 离心管中, 取 60 μ L 的 60°C 灭菌的超纯水加入到吸附柱中, 再将离心管和吸附柱放于 60°C 的水浴锅复浴 2 min。然后放在离心机中 9000 g 离心 1 min。将离心管中的液体重新倒回吸附柱中, 再次 9000 g 离心 1 min (提高收集效率)。吸附柱扔掉, 标记离心管并放置于 -20°C 保存。

跑琼脂糖凝胶电泳验证, 用 UVP software 照射凝胶成像。

1.2.6 双酶切

利用 *EcoRI* 和 *XhoI* 内切酶对 pME6032 质粒进行双酶切, 按如下表 5 配制酶切体系, 放入 37°C 水浴锅中, 酶切 4 h。

表 5 酶切体系

体系	体积 (μ L)
10 $\times$ Buffer	8.0
pME6032 质粒	68.0
<i>EcoRI</i>	2.0
<i>XhoI</i>	2.0
总计	80.0

跑琼脂糖凝胶电泳验证已经酶切开 pME6032 的质粒并回收目标片段（具体操作步骤可见生工柱式 DNA 胶回收试剂盒），回收完毕再次电泳检测，获得 pME6032 质粒酶切片段。

1.2.7 一步克隆连接

将酶切后的线性化载体和纯化后的 PCR 片段连接，按照如下表 6 配制体系并加入到 0.5 mL 离心管内，混匀后置于 50°C 水浴保温 15 min。

表 6 连接体系

体系	体积 (μL)
片段 2914-1516	2.0
载体 pME6032	3.0
2×ClonExpress Mix	5.0
总计	10.0

1.2.8 热激转化

在超净台中取 50 μL 在冰浴中融化的 Trans1-T1 大肠杆菌感受态于 1.5 mL 灭过菌的离心管中，向其中加 5 μL 的 DNA 连接产物，轻轻混匀后再将离心管冰浴 30 min。

将离心管放在 42°C 的水浴锅中热激 90 s，再使离心管快速冰浴 2 min，期间不要晃动离心管。

在超净台中向离心管内加入 500 μL 的无菌的 LB 液体培养基(不含抗生素)，将离心管中的液体混匀，然后将其放置于 37°C 的转速 200 rpm 的摇床培养 1 h，使大肠杆菌复苏。

将 LB 固体培养基加热融化，待冷却至 55°C~60°C，加入 Tet 至终浓度 50 μg/mL，混匀后倒入灭过菌的平板中，冷却至凝固。

将离心管称重配平放入离心机中，离心机设置 8000 rpm 离心 1 min，然后在超净台中弃 450 μL 上清，离心管内只留 100 μL 上清。用移液器将大肠杆菌的沉淀重悬，然后涂布到含有 Tet 抗生素的 LB 固体平板上，用封口膜封口。做好标记后将平板倒置于 37°C 的恒温培养箱中过夜培养。

1.2.9 菌液 PCR 验证

在转化后的含 Tet 的 LB 固体平板上，挑取白色单菌落进行验证。在超净工作台中，用灭过菌白枪头挑取 6 个单菌落分别放到含有 800 μL 的含 Tet 的 LB 液体培养基的无菌离心管中，标上相应的编号，放到 37°C 摇床温和摇震直至培养

基变浑浊后，再取出 1.2 μL 菌液进行菌液 PCR 验证，PCR 反应体系及程序如表 7 和表 8。

表 7 菌液 PCR 反应体系

体系	加入量 (μL)
菌液	1.2
2 $\times$ Pfu PCR MasterMix	15.0
验证引物-F	1.2
验证引物-R	1.2
ddH ₂ O	11.4
总计	30.0

表 8 PCR 反应程序

温度 ($^{\circ}\text{C}$)	时间 (s)
95	180
95	30
56	30
72	40
72	600
4	∞

} 30 个循环

将 PCR 产物，跑琼脂糖凝胶电泳，取出 25 μL 条带验证正确（约 600 bp）的 PCR 产物送测序，将序列正确的 PCR 产物对应的菌液取出 200 μL 加入 10 mL 的含 Tet 的 LB 液体培养基中，放到 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床温和摇震直至培养基变浑浊后，提取重组质粒 pME6032-2914-1516。

1.2.10 电转化

在超净台中取 50 μL 在冰浴中融化的恶臭假单胞菌 S16 感受态于灭过菌的 1.5 mL 离心管中，向其中加入 2 μL 的 pME6032-2914-1516 重组质粒，再将混合物加到 1 mm 宽的电转杯中，电转仪设置 1800 V 进行电击，电转时间 5.3 ms。

在超净台中向电转杯中添加 1 mL 不含抗生素的 LB 液体培养基，用移液器吸打重悬菌体，并将混合物转移到 1.5 mL 的灭菌的离心管中。将离心管放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的摇床培养菌体 1 h。

将 LB 固体培养基加热融化，待冷却至 55 $^{\circ}\text{C}$ ~60 $^{\circ}\text{C}$ ，加入 Tet 至终浓度 50 μg /mL，混匀后倒入灭过菌的平板中，冷却至凝固。

将离心管称重配平放入离心机中，离心机设置 8000 rpm 离心 1 min，然后在

超净台中弃 900 μL 上清。用移液器将大肠杆菌的沉淀重悬，然后涂布到含 Tet 抗生素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LB 固体平板上，用封口膜封口。做好标记后将平板倒置于 37°C 的恒温培养箱中过夜培养。

1.2.11 菌液 PCR 验证

在电转化后的含 Tet 的 LB 固体平板上，挑取白色单菌落进行验证。在超净工作台中，用灭过菌白枪头挑取 5 个单菌落放到灭过菌的加入 800 μL 的含 Tet 的 LB 液体培养基的 1.5 mL 离心管中，标上相应的编号，放到 37°C 摇床温和摇震直至培养基变浑浊后，再取出 1.2 μL 菌液进行菌液 PCR 验证，PCR 反应体系及程序如表 9 和表 10。

表 9 菌液 PCR 反应体系

体系	加入量 (μL)
菌液	1.2
2 $\times$ Pfu PCR MasterMix	15.0
验证引物-F	1.2
验证引物-R	1.2
ddH ₂ O	11.4
总计	30.0

表 10 PCR 反应程序

温度 ($^{\circ}\text{C}$)	时间 (s)
95	180
95	30
56	30
72	40
72	600
4	∞

将反应后的 PCR 产物，跑琼脂糖凝胶电泳，找出条带大小正确（约 600 bp）的样品对应的菌液取出 400 μL 加入到 200 mL 的含 Tet 的 LB 液体培养基中，放到 37°C 摇床温和摇震培养直至变浑浊，然后将其保存于 4°C 冰箱作为菌种。

1.2.12 休止细胞反应验证功能

在超净台中取 2 mL 的 S16-pME6032-2914-1516 菌株转接到 200 mL 的 LB 液体培养基中，然后加入 200 μL 的浓度为 50 mg/mL 的 Tet，标记为 1 号；同时在超净台中取 2 mL 的 S16-pME6032 菌种转接到 200 mL 的 LB 液体培养基中，

然后加入 200 μL 的浓度为 50 mg/mL 的 Tet，作为对照组，标记为 2 号。将 1 号 2 号三角瓶都放到 37°C 摇床一起震荡培养。

用紫外可见分光光度计分别测量菌液在 600 nm 处的吸光值，由此确定菌液浓度，当 OD₆₀₀ 达到 0.6-0.8 时，在超净台中分别向 1 号 2 号三角瓶加 100 μL 的 IPTG 诱导菌体，然后放到 25°C 的摇床一起过夜震荡培养。

用紫外可见分光光度计分别测量 1 号 2 号菌液在 600 nm 处的吸光值，当 OD₆₀₀ 达到 2.0 时，大肠杆菌的生长已经达到稳定期，将剩余的菌液以 6000 rpm 离心 5 min，去掉上清液，并用 30 mL 的超纯水洗涤两次，并用 27 mL 的超纯水重悬菌体沉淀。

称量 100 mg 的烟酸加入 10 mL 的超纯水中溶解，并用 5 M 的氢氧化钠溶液调 pH 至 7.0，最终配制成 10 mg/mL 烟酸溶液。

向盛有 27 mL 菌液的三角瓶中加入 3 mL 的 10 mg/mL 烟酸溶液，终浓度为 1 mg/mL。

分别在 1 号 2 号三角瓶中依次取反应 0 h、8 h 的样品，8000 rpm 离心 1 min，离心后将上清转移至新的离心管中，做好标记，保存于 -20°C 冰箱。利用紫外可见分光光度计扫描两份样品在 220-340 nm 处的波长，观察吸收峰的变化，由此判断含有 2914-1516 基因的恶臭假单胞菌 S16 菌株对烟酸的降解情况。

2 结果

2.1 目的基因 PCR 验证和质粒验证

根据 1.2.3 的体系和程序扩增 2914-1516 片段，得到大小为 3000 bp 的目的条带，并进行胶回收操作，进行电泳检测验证，结果如图 4，条带大小验证正确。

根据 1.2.5 的步骤提取大肠杆菌 pME6032 的质粒，并进行酶切，胶回收，进行电泳检测验证，结果如图 4，有明显的大于 5000 bp 的条带，说明质粒酶切成功。

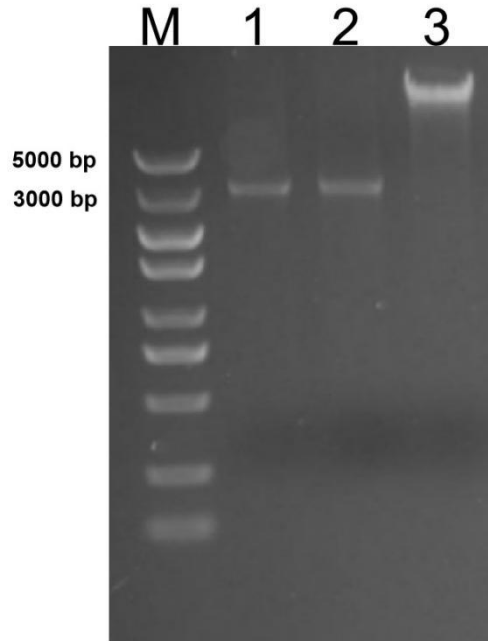


图 4 目的基因 2914-1516 和 pME6032 质粒

注： M： DNA Marker 1、 2： 3000 bp 的 2914-1516 基因

3： pME6032 质粒

2.2 热激转化后菌液 PCR 验证

根据 1.2.8 中的步骤将连接好的重组质粒 pME6032-2914-1516 热激转化进入 Trans1-T1 感受态细胞中, 经过菌液 PCR 和琼脂糖凝胶电泳验证后, 结果如下(见图 5)：

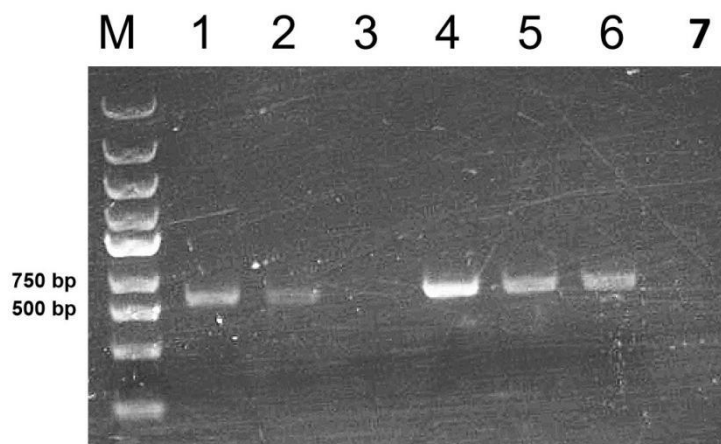


图 5 转化子琼脂糖凝胶验证图

注： M： DNA Marker 1-6： 不同转化子

7： 阴性对照

如图，菌液 PCR 扩增验证菌株结果显示，1、2、4、5、6 号样品有大小正

确的条带，结合测序结果证明以上菌株中已经含有 pME6032-2914-1516 质粒。

2.3 电转化后菌液 PCR 验证

根据 1.2.10 中的步骤将连接好的重组质粒 pME6032-2914-1516 电转化进入恶臭假单胞菌 S16 感受态细胞中，经过菌液 PCR 和琼脂糖凝胶电泳验证后，结果如下（见图 6）：

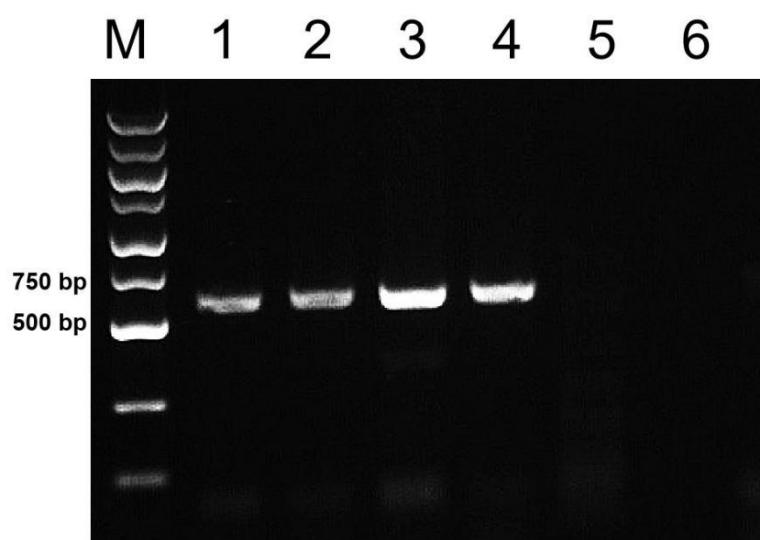


图 6 转化子琼脂糖凝胶验证图

注： M： DNA Marker 1-5： 不同转化子

6： 阴性对照

如图，菌液 PCR 扩增验证菌株结果显示，1、2、3、4 号样品有大小正确的条带，证明以上菌株中已经含有 pME6032-2914-1516 质粒。由此获得菌株 S16-pME6032-2914-1516。

2.4 样品全波长扫描图

根据 1.2.12 中的步骤分别对 S16-pME6032-2914-1516 菌株做休止细胞反应实验，分别在反应 0 h、8 h 时取样测全波长，结果如下（见图 7）：

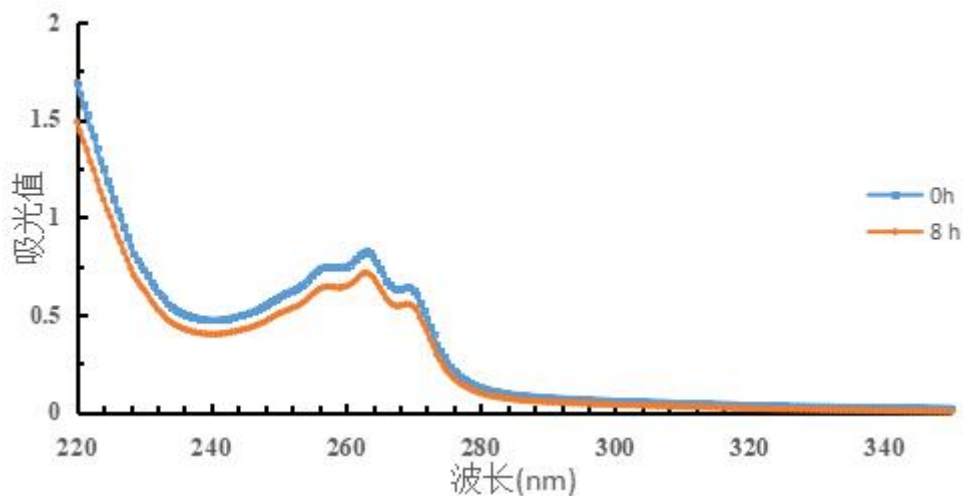


图 7 样品降解烟酸的波长图

由图可以看出，S16-pME6032-2914-1516 菌株在烟酸溶液中反应 0 h 和 8 h 时，吸收峰的峰型没有太多的变化，在 260 nm 处烟酸没有被降解，其他波长处也没有出现新的产物及其吸收峰，这说明了 2914-1516 基因并不是编码烟酸羟化酶的关键基因，不能降解烟酸。

3 讨论

本研究以产碱杆菌 P156 为研究对象，对 2914-1415、2914-1516 两段预测基因进行克隆体外表达，通过对菌株降解烟酸的能力来判断这两段基因的功能。

本次实验采用一步克隆的方法，将扩增得到的目的基因与 *EcoRI* 和 *XhoI* 内切酶双酶切的 pME6032 质粒进行连接，构建出 pME6032-2914-1516 重组质粒，用电转化法将重组质粒转入表达宿主恶臭假单胞菌 S16 中获得 S16-pME6032-2914-1516 菌株。通过休止细胞反应推测出 2914-1516 基因不是编码烟酸羟化酶的关键基因，不能降解烟酸。

推想 2914-1415 该段基因也许是编码烟酸羟化酶的关键基因。目前已经扩增出 2914-1415 片段，pME6032 的质粒也已经通过 *EcoRI* 和 *XhoI* 内切酶酶切成功，但是始终在连接、热激转化后筛选出不恰当的单菌落，对此我们进行了两个猜想，第一，在热激转化后的菌落验证时用的是验证引物，可能验证引物的特异性不高，所以会在 PCR 时扩增了菌体中或者载体其他部分的 DNA，以致于琼脂糖凝胶的紫外照射结果下，除了有目标条带外，还有许多杂条带。相对应的后续检测方法

是用验证引物 PCR 扩增 P156 的基因组，如果能扩增出单一片段，则证明并非是验证引物特异性不高；反之，则证明验证引物的特异性不高，需要重新设计。第二，猜想 2914-1415 基因片段确实未连接到 pME6032 载体上，需要测一下各部分浓度，必要时用冷冻离心浓缩干燥程序仪进行浓缩，更改一步克隆时的配制体系，再多次实验一下。

4 展望

本实验以克隆烟酸羟化酶基因片段和研究其功能为目的展开。本研究利用了产碱杆菌 P156 能以烟酸为唯一碳源和能源进行生长的特点，克隆和研究了其表达烟酸氢化酶的基因片段，确定 2914-1516 基因没有编码烟酸羟化酶的功能，为进一步研究 P156 降解烟酸的关键基因奠定了基础，为进一步研究烟酸在微生物中的降解途径提供了理论依据，也为微生物高效降解吡啶及其衍生物提供了铺垫。

参考文献

- [1] Jiménez José I, Canales Angeles, Jiménez-Barbero Jesús, Ginalski Krzysztof, Rychlewski Leszek, García José L, Díaz Eduardo. Deciphering the genetic determinants for aerobic nicotinic acid degradation: the nic cluster from *Pseudomonas putida* KT2440 [J]. Proceedings of the National Academy of Science, 2008, 105: 32.
- [2] Hill, M D. Recent strategies for the synthesis of pyridine derivatives [J]. Chemistry, 2010, 16: 12052–12062.
- [3] Movassaghi, M., Hill, M D. Direct synthesis of pyridine derivatives [J]. Am Chem Soc, 2007, 129: 10096–10097.
- [4] Yu, H., Tang, H. & Xu, P. Green strategy from waste to value-added-chemical production: efficient biosynthesis of 6-hydroxy-3-succinoyl-pyridine by an engineered biocatalyst [J]. Sci Rep, 2014, 4: 5397.
- [5] Schmid, A. et al. Industrial biocatalysis today and tomorrow [J]. Nature, 2001, 409: 258–268.
- [6] Maga, J. A. Pyridines in foods [J]. Agr Food Chem, 1981, 29: 895–898.
- [7] O'Hagan, D. Pyrrole, pyrrolidine, pyridine, piperidine and tropane alkaloids [J]. Nat Prod Rep, 2000, 17: 435–446.
- [8] Scriven, E. F. & Murugan, R. Pyridine and pyridine derivatives Kirk-Othmer Encyclopedia [J]. Chemical Technology, 2005, (vol 20).
- [9] Sims, G. K., O'Loughlin, E. J. & Crawford, R. L. Degradation of pyridines in the environment [J]. Crit Rev Environ Control, 1989, 9: 309–340.
- [10] Richards, D. J. & Shieh, W. K. Biological fate of organic priority pollutants in the aquatic environment [J]. Water Res, 1986, 20: 1077–1090.
- [11] Kuhn, E. P. & Suflita, J. M. Microbial degradation of nitrogen, oxygen and sulfur heterocyclic compounds under anaerobic conditions: studies with aquifer samples [J]. Environ Toxicol Chem, 1989, 8: 1149–1158.
- [12] Kaiser, J. P, Feng, Y. & Bolla, J. M. Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine, and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions [J]. Microbiol Rev, 1996, 60: 483–498.
- [13] Zalati, O. A. & Elsayed, M. A. A study on microwave removal of pyridine from wastewater

- [J]. Engineering,2013, 1: 137–143.
- [14] Agrios, A. & Pichat, P. Recombination rate of photogenerated charges versus surface area: Opposing effects of TiO₂ sintering temperature on photocatalytic removal of phenol, anisole, and pyridine in water [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry,2006, 180: 130–135.
- [15] Fetzner, S. Bacterial degradation of pyridine, indole, quinoline, and their derivatives under different redox conditions [J]. Appl Microbiol Biotechnol,1998, 49: 237–250.
- [16] Kaiser JP, Feng Y, Bollag JM (1996) Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine, and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions [J]. Microbiol Rev,1996, 60: 483–498.
- [17] Fetzner S. Bacterial degradation of pyridine, indole, quinoline, and their derivatives under different redox conditions [J]. Appl Microbiol Biotechnol,1998, 49: 237–250.

致谢

本次实验是在于浩老师的指导下完成的。虽然已经在实验室进行了一年多的学习，但是我仍然有很多需要学习的地方。面临毕业，在做实验的过程中各种问题接踵而至，老师不仅耐心地教会了我如何做实验，如何操作仪器，让我掌握了基本的实验技能，还在其他的一些方面对我提供了很大帮助。此外，老师还帮助我选实验方向，告诉我实验中应该注意的重点难点，对我的实验过程进行监督。于老师想法多，拥有很强的创新能力，诲人不倦的教学精神以及勇于探索研究的科研精神，是我们学习的榜样。

此外，我还要感谢赵书雪师姐、王菲师姐在我遇到问题时帮我解答，让我的实验更加顺利，还要感谢 6033 实验室提供实验材料、仪器和试剂以及实验室中良好的实验氛围，帮助我顺利完成本次毕业论文。最后，再次对关心、帮助我的家人、老师、师姐师兄和同学们表示衷心地感谢。