

Pseudomonas putida GM6 多聚磷酸盐激酶 (*ppk*) 基因的克隆及表达*

管莉波 蔡天明 李波 何健 李顺鹏 崔中利[†]

(南京农业大学生命科学学院微生物学系, 南京农业大学农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095)

摘要 以一株高效聚磷菌 *Pseudomonas putida* GM6 为研究材料。为获得其多聚磷酸盐激酶 (polyphosphate kinase, *ppk*) 基因, 并验证该基因在磷酸盐转运系统中的作用, 根据已报道的 *ppk* 基因保守区域设计引物, 从其总 DNA 中成功扩增到 *ppk* 基因的部分片段 (约 528 bp)。随后采用快速染色体步移方法 (Self-formed adaptor PCR, SEFA-PCR) 技术扩增片段的上下游基因序列, 将三个序列拼接, 用 OMIGA 软件分析其 ORFs, 推测 *ppk* 基因全长为 2 220 bp (GenBank accession number DQ133537)。构建的多聚磷酸盐激酶表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3) / pET29a *ppk* 经 IPTG 诱导后 3 h 时, 明显出现分子量约为 81 kDa 的表达产物。且表达菌株在 12 h 时的磷去除率高达 80% (对照菌株的磷去除率仅为 18%), 远高于已报道的 40% 的去除率。这表明 *ppk* 基因在 *E. coli* 中的过量表达, 导致了 *E. coli* 菌体中 poly-P 的大量聚集, 从而大大去除了培养基中的磷酸盐。

关键词 多聚磷酸盐激酶; *ppk* 全基因及上下游序列; 快速染色体步移方法 (SEFA-PCR)

中图分类号 S154.39 **文献标识码** A

在强化生物除磷 (Enhanced Biological Phosphorus Removal, EBPR) 工艺中, 聚磷菌 (PAB) 的厌氧释磷和好氧聚 poly-P 的能力对于 EBPR 的除磷能力是至关重要的。迄今为止, 由于对 EBPR 代谢特征, 对 PAB 中 poly-P 代谢的微生物学知识, 对 poly-P 代谢中的有关分子机理及关键基因尚不清楚, 加之活性污泥本身的复杂性, 因此, 对于 EBPR 工艺的微生物学和分子机理的本质缺少清晰的认识。近 10 年来, 已有不少研究者, 对从活性污泥中分离的 PABs 进行了分子方面的研究, 主要集中在与 poly-P 的合成和分解有关的 *ppk* 和 *ppx* 基因的克隆表达及转化菌株的聚磷特性研究等方面。一般认为, 在不同的菌株中可能存在共同的 EBPR 代谢关键基因。加大研究力度, 研究这些基因并试图发现它们在遗传学上和酶学水平上如何调控十分重要^[1,2]。

研究表明, 在多数微生物中胞内多聚磷酸盐的水平是由激酶和磷酸酯酶两种酶所调控的。Poly-P 的形成是由激酶催化的高能供体上的磷酸盐残基向 poly-P 链上转化反应, 在 *E. coli* 中 poly-P 的合成是由 PPK 负责的, 反应为 ($n\text{ATP} \rightleftharpoons n\text{ADP} + \text{poly-P}_n$)。大量的研究表明^[3,4], 理解聚磷菌磷酸盐转运和代

谢的生化机制和遗传学知识, 对于改进聚磷菌的废水除磷能力是十分必要的^[5-7]。本文旨在对 GM6 (*Pseudomonas putida*) 菌株与 poly-P 合成相关的多聚磷酸盐激酶 (*ppk*) 基因进行克隆, 并对这个基因的表达情况进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) GM6 (GenBank Accession number No. DQ133506) 从苏州城西污水处理厂的好氧池分离得到。质粒 pET29a 和表达菌株 *E. coli* BL21 由本实验室提供。

1.1.2 酶和试剂 限制性内切酶、连接酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、Lar Taq DNA 聚合酶, 4 种 dNTP 等购自 TaKaRa 公司。

1.1.3 培养基 LB 培养基参照萨姆布洛克等著的《分子克隆实验指南》^[8]。合成废水配方: 葡萄糖 0.3 g、蛋白胨 0.1 g、酵母粉 0.01 g、CH₃COONa 0.15 g、NaCl 0.05 g、K₂HPO₄ 0.05 g、MgSO₄·2H₂O 0.15 g、NH₄Cl 0.18 g、H₂O 1 000 ml^[9]。

* 江苏省环境保护厅项目 (2004007) 和江苏省社会发展项目 (BS2003028) 资助

[†] 通讯作者

作者简介: 管莉波 (1982~), 女, 硕士研究生, 研究方向为环境微生物学。E-mail: glb@njau.edu.cn

收稿日期: 2006-03-31; 收到修改稿日期: 2006-07-17

1.2 分子操作

质粒 DNA 的提取(碱裂解法)、染色体总 DNA 的提取(高盐沉淀法)、酶连、转化均按文献[8]操作,DNA 的回收参照回收试剂盒说明书进行操作。

1.3 ppk 部分基因序列片段 PCR 扩增

根据模式菌株恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) KT2440 和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) PAO1 的 *ppk* 基因序列的保守区设计了多条引物,其中两条引物扩增出特征片段,正向引物为 CGCCGGCCTGAAGAAGCAG,反向引物为 CGGAAGTGGTAGCAGCCCT;以 *Pseudomonas putida* GM6 总 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,扩增条件:94 5 min;94 1 min,59 1 min,72 1 min,30 个循环;72 10 min;PCR 反应在 MJ PT200 PCR 扩增仪中进行。

1.4 SEFA-PCR 扩增片段上下游序列

快速染色体步移方法(Self-Formed Adaptor PCR, SEFA-PCR)是由本实验室设计开发的一种新的 PCR 技术,可用来扩增一已知 DNA 序列两端很长的(最长可达 6 kb)的未知序列。

SEFA-PCR 保守序列下游(3'端)引物为:3Sp1: ACCTTTGCCCGGGAACAGGCC($T_m = 73$);3Sp2: CCTTCCCGCATCAGCGAAC($T_m = 70$);3Hemi-Sp3: CACGGCCACGTTGAC, NNN, NNN, NNN, GCGATC($T_m = 55$ 简并引物)。保守序列上游(5'端)引物为:5Sp1: TCGAGGCCGATCGGGGTGATG($T_m = 74$);5Sp2: GTCGGGAAATAGCGCCGAC($T_m = 72$);5Hemi-Sp3: GTCGTCCAGTTCCGG, NNN, NNN, NNN, AAGCGG($T_m = 50$ 简并引物)。

SEFA-PCR 第一轮扩增:PCR 反应液组成:1.5 μl 2x GC buffer I,1.5 μl 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Mg^{2+} ,2.5 μl 2.5 mmol L^{-1} dNTPs,0.4 μl 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Hemi-Sp3,0.15 μl 5 U ml^{-1} La-Taq,1 μl 模板(*Pseudomonas putida* GM6 总 DNA),总体积 15 μl 。PCR 条件为:94 1 min;94 30 s,40 3 min,以每秒增加 0.2 的速度升至 70,70 5 min。取出 PCR 管加入 0.4 μl 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Sp1 作为引物后继续进行 PCR,反应条件:94 30 s,70 5.5 min,25 个循环。接下来进行 8 轮不对称 PCR:94 30 s,70 5.5 min,2 个循环;94 30 s,50 30 s,1 个循环;8 轮不对称 PCR 完成后 70 延伸 5 min。

SEFA-PCR 第二轮扩增:PCR 反应液组成:1.5 μl 2x GC buffer I,1.5 μl 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Mg^{2+} ,2.5 μl 2.5

mmol L^{-1} dNTPs,0.4 μl 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Sp2,0.15 μl 5 U ml^{-1} La-Taq,0.25 μl 第一轮 PCR 反应产物,总体积 15 μl 。PCR 条件为:94 1 min,94 30 s,63 30 s,72 5 min,33 个循环;72 10 min^[10]。

1.5 序列测定和分析

将 SEFA-PCR 第二步扩增产物切胶回收,与 pMD18-T 进行连接,转化至 *E. coli* DH5 感受态细胞,在含有 IPTG 和 X-gal 的 LB(含 100 mg L^{-1} Amp)平板上进行蓝白斑筛选,挑取白色菌落,提取质粒验证后,交由上海英骏公司测定插入片段序列。利用 OMIGA 软件对克隆序列进行序列的拼接、同源性比较和 ORF 分析。

1.6 ppk 基因的表达

1.6.1 ppk 全基因的扩增 根据拼接的序列设计 *ppk* 全基因表达引物,即在 *ppk* 引物的两端加上 Nde 和 Hind 这两个酶切位点的碱基:正向引物: GAATTCATATGAATACCGAAGTACTACTGA;反向引物: GAATTAAAGCTTAAACCGCGGICAGGATCG。

PCR 反应液组成:2.5 μl 2x GC buffer I,1.5 μl 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Mg^{2+} ,2 μl 2.5 mmol L^{-1} dNTPs,引物对各 0.5 μl ,0.3 μl 5 U ml^{-1} La-Taq,1 μl 模板(*Pseudomonas putida* GM6 总 DNA),总体积 25 μl 。PCR 条件为:94 5 min;94 1 min;59 1 min;72 3 min;30 个循环;72 10 min。

1.6.2 ppk 表达载体的构建 将 PCR 产物切胶回收并进行 Nde 和 Hind 双酶切后和同样双酶切的载体 pET29a 连接,构建质粒 pET29a/*ppk*。酶连产物转化至 *E. coli* DH5。挑取单克隆接至 3 ml LB(含 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Kan)中 37 培养过夜,提取质粒 DNA,用 Nde / Hind 酶切筛选获得阳性克隆,并进行 DNA 全序列分析。

1.6.3 ppk 编码基因核苷酸序列的测定 从正反方向测定,得到其全序列。序列反应委托上海英骏生物有限公司完成。

1.6.4 ppk 表达菌株的诱导表达时间曲线 将序列正确的重组表达质粒 pET29a/*ppk* 转化至表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)中,构成表达菌株。从 LB(含 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Kan)平板上挑取单菌落接至 50 ml LB 培养液中,37、200 r min^{-1} 振荡培养过夜,按 3% 的接种量转接至新鲜 LB 培养液,37 培养约 3 h 后,OD₆₀₀ 增至约 0.6,加入 IPTG 至终浓度 1 mmol L^{-1} ,继续培养 4.5 h,每隔 1 h 取出 1 000 μl 培养液,离心收集菌体,用于 SDS-PAGE 分析以测定表达量,从而确定最佳表达时间。

1.6.5 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析 参照文献[11]的方法进行。

1.6.6 表达菌株的生长情况和磷酸盐吸收实验

将表达菌株 *E. coli* BL21/pET29a-*ppk* 和对照菌株 *E. coli* BL21/pET29a 接种于 LB 培养基中 37 °C 培养过夜。将它们转入合成废水中,30 °C 恒温摇床培养,间隔采样测定菌体生长量和培养基磷浓度,磷酸盐的分析方法采用抗坏血酸法^[12]。每组设 3 个重复,统计结果以其各自平均值表示。

2 结果与分析

2.1 *ppk* 部分序列片段的同源性分析

将测序结果与 *Pseudomonas aeruginosa* 的 *ppk* 基因序列进行比对,结果表明扩增出 528 bp 大小的片段(图 1 所示)与其中的 546 ~ 1 044 bp 同源,同源性为 86 %。

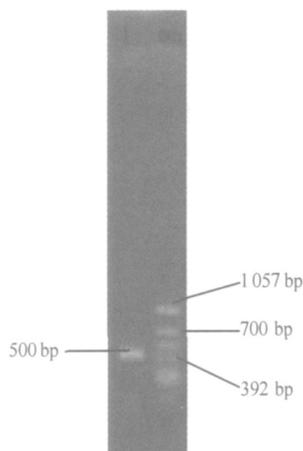


图 1 *ppk* 部分基因片段扩增结果电泳图谱

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of the *ppk* gene fragment
ma: ϕ X174-Hinc digest

2.2 *ppk* 基因片段上下游序列片段的克隆

于扩增的 *ppk* 部分基因片段已知序列中设计进行 SEFA-PCR 的引物,其中 3'端引物为 3Sp1、3Sp2 和 3Hemi-Sp3,5'端引物为 5Sp1、5Sp2 和 5Hemi-Sp3,以 *Pseudomonas putida* GM6 总 DNA 为模板分别向片段的上下游进行 SEFA-PCR 扩增,扩增结果的第一步和第二步电泳图谱见图 2 和图 3。从图上可以看出,经过两步扩增后上下游扩增结果均得到了清晰的长度在 2 kb 左右的条带(图 3 所示),其中 3'端产物大小约为 2.1 kb,5'端产物大小约为 2.2 kb,完全可以覆盖 *ppk* 基因序列上下

游各 1 000 bp 序列。经 ORF 和启动子分析,证实 3'端和 5'端产物的确分别为 *ppk* 基因的上下游序列。

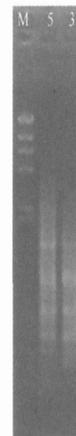


图 2 SEFA-PCR 第一步扩增产物电泳图谱

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of SEFA-PCR first step result
M: -Hinc digest DNA marker; 5 3'端第一步扩增; 3 5'端第一步扩增
M: -Hinc digest DNA marker; 5 3'端扩增 of step 1; 3 5'端扩增 of step 1

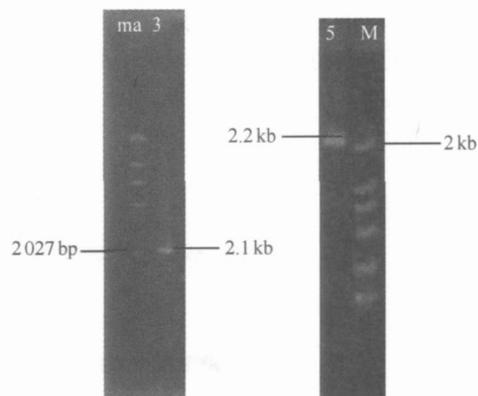


图 3 SEFA-PCR 第二步扩增产物电泳图谱

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of SEFA-PCR second step amplification product

5 5'方向第二轮扩出的片段; 3 3'方向第二轮扩出的片段。

M: DL2000 digest; ma: -Hinc digest

5 5'端扩增 of step 2; 3 3'端扩增 of step 2;

M: DL2000 digest; ma: -Hinc digest

2.3 *ppk* 基因序列分析

将 *Pseudomonas putida* GM6 *ppk* 部分片段基因及上下游基因序列拼接,用 OMIGA 软件进行开放阅读框的分析,预测 *ppk* 基因全长为 2 220 bp。其上游基因为 *HemB* 基因,长度可能为 1 119 bp。

将 *Pseudomonas putida* GM6 *ppk* 基因序列与其他已报道的 *ppk* 基因进行同源性比较,发现与 *Pseudomonas putida* KT2440 的同源性为 82%,与 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 的同源性为 79%,*Pseudomonas syringae* 为 84%,*Klebsiella aerogenes* 为 45%,*Neisseria meningitidis* 为 63%,*Acinetobacter* sp. ADP1 为 53%,与 *Escherichia coli* K12-MG1655 为 22%。

将 *ppk* 基因翻译成蛋白质,与其他报道的聚磷酸菌的同源性比较结果:与 *Pseudomonas putida* KT2440 的同源性为 89%,*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 为 80%,*Acinetobacter* sp. ADP1 为 58%,*Escherichia coli* K12-MG1655 为 33%。

2.4 *ppk* 基因在菌株 *E. coli* BL21 的表达

2.4.1 用 PCR 获得多聚磷酸盐激酶 (*ppk*) 基因

利用 OMIGA 软件对 *ppk* 基因序列的分析,预测了其可能的编码序列 (GenBank accession number DQ133537),包括起始密码及终止密码在内,共 2 220 个核苷酸,编码 740 个氨基酸。我们设计了 2 条 PCR 引物,其中 5' 端引物: 5'-GAATTCATATGAATACCGAAGIACCTCACT GA-3',并引入了酶切位点 Nde I; 3' 端引物 (5'-GAATTAAGCTTAACGCCGCGGICAGG ATCG-3',并引入了酶切位点 Hind III,使获得的多聚磷酸盐激酶编码基因能方便地克隆至表达载体 pET29a 中。

以 *Pseudomonas putida* GM6 总 DNA 为模板,经 PCR 反应获得了多聚磷酸盐激酶基因 (图 4 所示)。PCR 产物回收后经琼脂糖凝胶电泳鉴定为一条带,分子量约 2.2 kb (图 4 所示),与理论值一致。

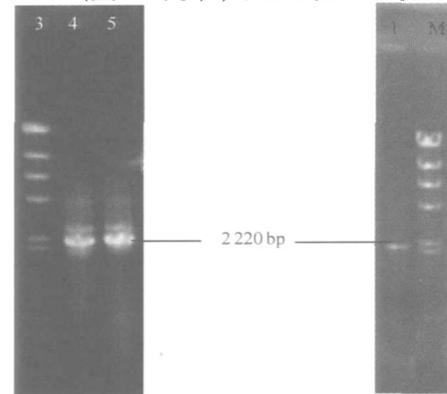


图 4 *ppk* 全基因扩增及回收产物电泳图谱

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of *ppk* gene amplified and reclaimed 1: *ppk* 基因回收产物; 3, M: Marker -Hind digest; 4, 5: *ppk* 基因 PCR 扩增片段 1: Reclaimed product of *ppk* gene; 3, M: Marker -Hind digest; 4, 5: PCR amplified fragment of *ppk* gene

2.4.2 多聚磷酸盐激酶重组表达质粒的构建和在大肠杆菌中的表达

根据酶切位点 Nde I 和 Hind III 构建多聚磷酸盐激酶重组表达质粒,质粒构建过程如图 5 所示。

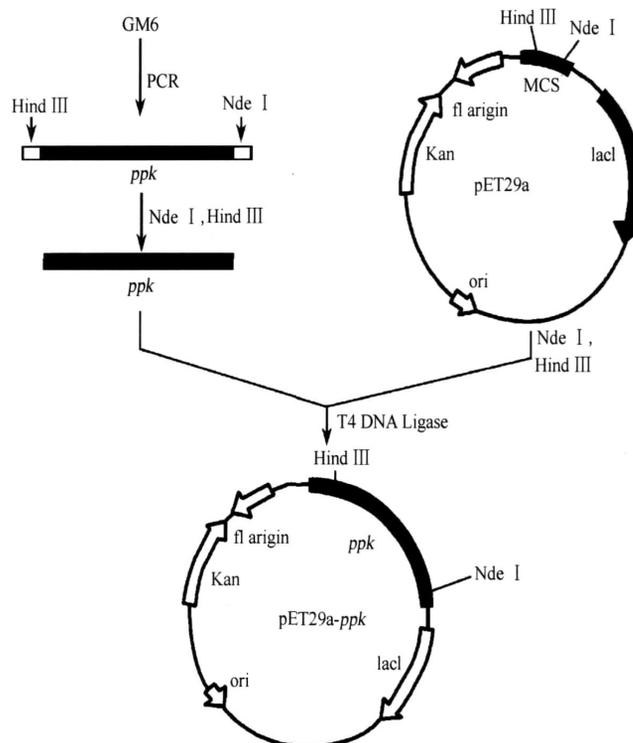


图 5 多聚磷酸盐激酶基因克隆及表达载体 pET29a-*ppk* 的构建

Fig. 5 Cloning of the coding area of *ppk* and construction of recombinant expression plasmid pET29a-*ppk*

对多聚磷酸盐激酶重组表达菌株进行诱导表达,结果如图 6 所示。图 6 表明:表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET29a-*ppk* 经 IPTG 诱导后 3 h 时,在分子量约 81 kDa 附近开始出现一条表达条带,经鉴定为多聚磷酸盐激酶基因的表达产物。

2.4.3 表达菌株的生长和磷酸盐的去除 由图 7 可知,重组菌株和对照菌株的生长几乎相同。对照菌株的磷去除率仅为 18%,而表达菌株 12 h 的磷去除率高达 80%。这表明 *ppk* 基因在 *E. coli* 中得到过量表达,导致了 *E. coli* 菌体中 poly-P 的聚集,从而使得培养基中的磷酸盐大量的去除。

3 讨 论

无机多聚磷酸盐是由无机正磷酸盐组成的线性聚合物,并以高能磷酸键相连而成。它们的链长有两到数百个正磷酸盐不等^[13]。多聚磷酸盐广泛分布于自然界,并已经在细菌、真菌、原生动物、植物和哺乳动物中检测到。然而,关于它们准确的生理作用仍然不确定。根据种类、细胞定位和生理条件,多聚磷酸盐可能有多种作用,包括作为 ATP 的替代者和能量来源,磷酸盐的提供者,作为二价阳离子的螯

合剂,RNA 降解的抑制剂,对外界压力和营养缺乏条件下的调节剂。而且,它可以成为在 DNA 进入和转运中的结构元素。

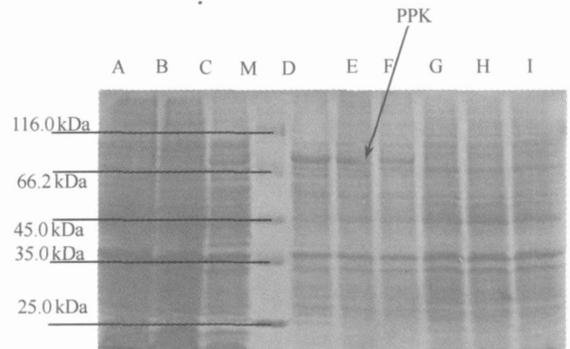


图 6 多聚磷酸盐激酶表达菌株的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 6 SDS-PAGE of the expression of *E. coli* BL21 (DE3)/pET29a-*ppk*. A,B,C 分别为: *E. coli* BL21, *E. coli* BL21/pET29a 和 *E. coli* BL21/pET29a-*ppk* 未经诱导处理; M: SM0431; D,E,F 分别为: *E. coli* BL21/pET29a-*ppk* 诱导处理 3 h, 4 h 和 4.5 h; G,H,I 分别为: *E. coli* BL21/pET29a 诱导处理 3 h, 4 h 和 4.5 h. A,B,C: *E. coli* BL21, *E. coli* BL21/pET29a and *E. coli* BL21/pET29a-*ppk* without induction; M: SM0431; D,E,F: *E. coli* BL21/pET29a-*ppk* induced for 3 h, 4 h and 4.5 h, respectively; G,H,I: *E. coli* BL21/pET29a induced for 3 h, 4 h and 4.5 h, respectively

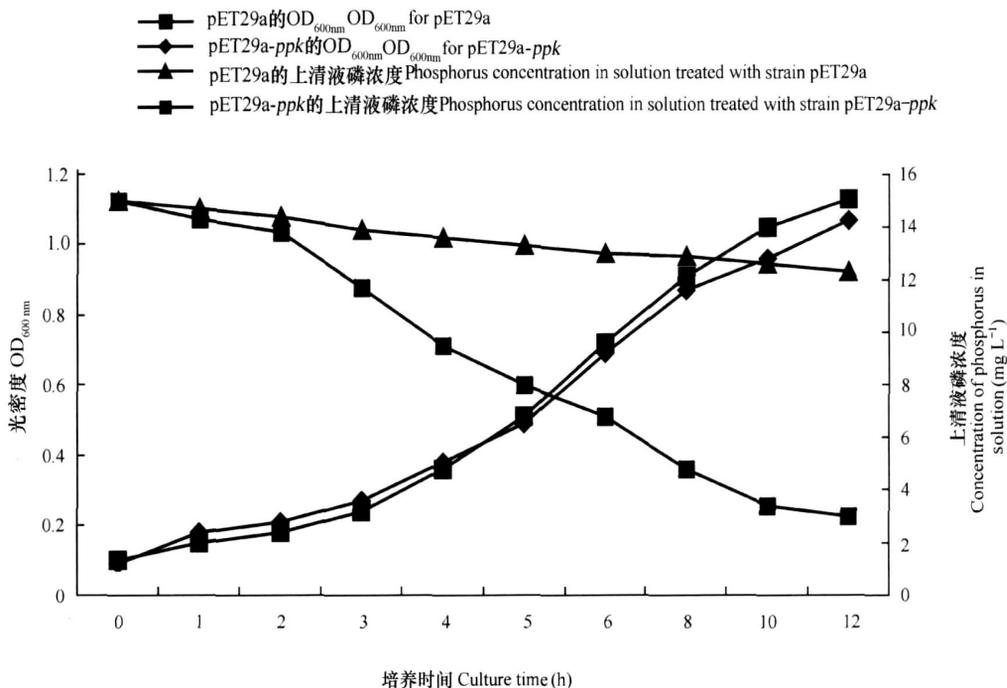


图 7 表达菌株在合成废水中培养时的生长和磷的去除能力

Fig. 7 Growth of expression strain and its capacity of removing phosphorus in synthetic wastewater

一些多聚磷酸盐代谢的酶已经被纯化,它们的基因已经被克隆。大家都知道在微生物中这种聚合体的聚集由多聚磷酸盐激酶(*ppk*)来催化。多聚磷酸盐激酶(*ppk*)基因催化由ATP形成多聚磷酸盐,多聚磷酸盐是到处存在的生物高聚物。*ppk*能催化最终的磷酸盐从ATP到多聚磷酸盐这个可逆转化。多聚磷酸盐的降解和利用由多聚磷酸盐水解酶(PPX)、多聚磷酸盐内激酶(PPN)和一些特殊的激酶来调控。

本论文从 *Pseudomonas putida* GM6 中克隆到 *ppk* 基因及其上下游调控序列,为研究多聚磷酸盐生物合成的调控机制提供了极好的材料。

含有 pET29a-*ppk* 质粒的 *E. coli* 表达菌株 BL21 磷的去除能力较对照菌株大幅增加,磷的去除率达 80%,远高于文献[14]报道的 40% 的去除率。

参考文献

- [1] Aharon O. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology*, 1999, 63(2): 334 ~ 348
- [2] Zagó A, Chugani S, Chakrabarty A M. Cloning and characterization of polyphosphate kinase and exopolyphosphatase genes from *Pseudomonas aeruginosa* 8830. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(5): 2065 ~ 2071
- [3] Cavigan J A, Leonard M M, Alan D W D. Regulation of polyphosphate kinase gene expression in *Acinetobacter baumannii* 252. *Microbiology*, 1999, 145: 2931 ~ 2937
- [4] Geibdorfer W, Ratajczak A, Hillen W. Transcription of *ppk* from *Acinetobacter* sp. Strain ADP1, encoding a putative polyphosphate kinase, is induced by phosphate starvation. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(3): 896 ~ 901
- [5] Ahn K, Kornberg A. Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 1990, 265: 11734 ~ 11739
- [6] Ault-Riche D, Fraley C D, Teng C, et al. Novel assay reveals multiple pathways regulating stress induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1998, 180: 1841 ~ 1847
- [7] Kim H Y, Schlichtman D, Shankar S, et al. Alginate, inorganic polyphosphate, GTP and ppGpp synthesis co-regulated in *Pseudomonas aeruginosa*: Implications for stationary phase survival and synthesis of RNA/DNA precursors. *Mol. Microbiol.*, 1998, 27: 717 ~ 725
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 著. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 分子克隆实验克隆指南. 第2版. 北京: 科学出版社, 1999. Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. eds. Jin D Y, Li M F. trans. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (In Chinese). 2nd Ed. Beijing: Science Press, 1999
- [9] Tomohiro M, Tomohiro Y, Junichi K, et al. A method for screening polyphosphate accumulating mutants which remove phosphate efficiently from synthetic wastewater. *J. Bioscience and Bioengineering*, 2003, 95: 637 ~ 640
- [10] 何健, 黄星, 顾立锋, 等. 盐单胞菌属 BYS-1 四氢嘧啶合成基因 *ectABC* 克隆及其盐激表达. *微生物学报*, 2006, 46(1): 28 ~ 32. He J, Huang X, Gu L F, et al. Cloning of the ectoine biosynthesis gene *ectABC* from *Halomonas* sp. BYS-1 and salt stressed expression in *Escherichia coli* (In Chinese). *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(1): 28 ~ 32
- [11] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227: 680 ~ 685
- [12] 蔡天明, 管莉莎, 崔中利, 等. 高效聚磷菌株 GM1 的分离和聚磷特性研究. *土壤学报*, 2005, 42(4): 636 ~ 641. Cai T M, Guan L B, Cui Z L, et al. Isolation and characterization of strain GM1 with high capability of accumulating poly-P (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2005, 42(4): 636 ~ 641
- [13] Zhu Y G, Howes N K, Smith S E. Phosphorus uptake and utilisation efficiencies of different wheat cultivars based on a sand-culture screening system. *Pedosphere*, 2002, 12(4): 329 ~ 337
- [14] Lee S J, Song O R, Lee Y C, et al. Molecular characterization of polyphosphate kinase (*ppk*) gene from *Serratia marcescens*. *Biotechnology Letters*, 2003, 25: 191 ~ 197

CLONING AND EXPRESSION OF POLYPHOSPHATE KINASE GENE FROM PSEUDOMONAS PUTIDA GM6

Guan Libo Cai Tianming Li Bo He Jian Li Shunpeng Cui Zhongli[†]

(Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract A strain of high-efficiency phosphorus accumulating bacteria, identified as *Pseudomonas putida* GM6, was used as research object from which polyphosphate kinase gene was cloned and its roles in the phosphate transport system verified. A 528-bp fragment of *ppk* gene was successfully amplified firstly from GM6 genomic DNA using self designed primers corresponding to the well-conserved regions of reported *ppk* gene sequences. Then, its upstream and downstream sequences were cloned with the technique of self-formed adaptor PCR (SEFA-PCR). Three amplified sequences were put together and analyzed using the OMIGA program (version 2.0), and operon of the complete *ppk* gene ca. 2 220 bp was obtained (it has been deposited in the GenBank

database under accession number DQ133537). The constructed recombinant expression strain of *ppk* gene *E. coli* BL21 (DE3) / pET29a-*ppk* was induced with IPTG for three hours, and expression product, 81 kDa in molecular weight, was observed. The strain removed 80 % of the phosphorus in the solution while the CK strain only 18 % in 12 h. Its P removing capacity, more than 40 %, the so-far reported highest rate, indicates excessive expression of *ppk* gene in *E. coli*, which would lead to accumulation of a great deal of poly-P in *E. coli in vivo*, and removal of a large amount of phosphate from the medium.

Key words Polyphosphate kinase; *ppk* upstream and downstream sequences; Self-formed adaptor PCR (SEFA-PCR)