

研究报告

Research Report

绿针假单胞菌 P3 中 3-羟基苯甲酸降解基因的鉴定与分析

伏聪 崔佳佳 张雪洪*

上海交通大学生命科学技术学院,微生物代谢国家重点实验室,上海,200240

* 通信作者, xuehzhong@sjtu.edu.cn

摘要 3-羟基苯甲酸(3-hydroxybenzoic acid, 3-HBA)是一种具有工业应用价值的平台化合物,在微生物代谢中也起到重要的作用。绿针假单胞菌 P3 是一株稳定的吩嗪-1-甲酰胺高产突变株,具有良好生理生化特性,可以作为代谢工程改造的平台菌株。本研究通过探究 P3 菌株在不同浓度 3-HBA 中的生长状况,发现其对 3-HBA 的耐受性较高,能够在 3-HBA 过量积累的环境下生长。此外,绿针假单胞菌 P3 可以利用 3-HBA 为唯一碳源生长,表明 P3 菌株中存在 3-HBA 降解基因。通过序列比较分析,我们找到了 3-HBA 的降解基因,经外源表达和全细胞催化,鉴定 3-HBA 的降解产物为龙胆酸,证明了绿针假单胞菌 P3 通过龙胆酸途径降解 3-HBA。本研究揭示了绿针假单胞菌 P3 中的 3-HBA 降解途径,为研究其他芳香族化合物的降解途径和假单胞菌异源合成并积累 3-HBA 奠定了基础。

关键词 绿针假单胞菌; 3-羟基苯甲酸; 降解代谢; 龙胆酸途径

Identification and Analysis of 3-Hydroxybenzoic Acid Degradation Gene in *Pseudomonas chlororaphis* P3

Fu Cong Cui Jiajia Zhang Xuehong*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200240

* Corresponding author, xuehzhong@sjtu.edu.cn

DOI: 10.13417/j.gab.040.002649

Abstract 3-Hydroxybenzoic acid (3-HBA) is a platform chemical with high practical application value, and plays an important role in microbial metabolism. *Pseudomonas chlororaphis* P3 is a high yield of phenazine-1-carboxamide mutant strain with outstanding physiological and biochemical characteristics, which can be developed as a platform organism via metabolic engineering. In this research, the growth of P3 strain under different concentrations of 3-HBA was evaluated, finding that P3 strain showed tolerance of growing in the 3-HBA over-accumulated environment. In addition, P3 strain could be cultured when applying 3-HBA as the sole carbon source, indicating that 3-HBA can be degraded. After sequence alignment, a gene had been identified to catalyze the degradation of 3-HBA. It was certificated that 3-HBA was degraded by gentisate pathway in P3 strain through exogenous expression and whole cell catalysis. This research revealed a degradation pathway of 3-HBA in *P. chlororaphis* P3, which laid a foundation for biodegradation of other aromatic compounds as well as exogenous synthesis and accumulation of 3-HBA in *Pseudomonas*.

Keywords *Pseudomonas chlororaphis*; 3-hydroxybenzoic acid; Degradation metabolism; Gentisate pathway

羟基苯甲酸类化合物是天然的次级代谢产物,也是工业上重要的平台化合物,广泛应用于医药、环

境、日化和食品等领域(Cheng et al., 2019)。其中 3-羟基苯甲酸(3-hydroxybenzoic acid, 3-HBA)可以通过激

基金项目 本研究由国家自然科学基金项目(31670033)资助

引用格式 :Fu C., Cui J.J., and Zhang X.H., 2021, Identification and analysis of 3-hydroxybenzoic acid degradation gene in *Pseudomonas chlororaphis* P3, *Jiyinzuxue yu Yingyong Shengwuxue* (Genomics and Applied Biology), 40(7-8 combined issue): 2649-2655.

(伏聪, 崔佳佳, 张雪洪, 2021, 绿针假单胞菌 P3 中 3-羟基苯甲酸降解基因的鉴定与分析, 基因组学与应用生物学, 40(第 7-8 期合刊): 2649-2655.)

活人体内的羟羧酸受体而减少脂肪细胞的分解,帮助维持正常的血脂水平,还可以作为抗氧化剂,清除自由基,促进人体健康 (Juurink et al., 2014)。此外,3-HBA 还是其他高附加值化合物如除草剂、人工纤维、增塑剂等合成的前体。

3-HBA 在微生物次级代谢产物的合成与降解代谢中也具有重要作用。据报道,在黄单胞菌中,3-HBA 以莽草酸途径产生的中间体分支酸为前体合成,不仅参与重要的次级代谢产物菌黄素(Xanthomonadin)的生物合成,还可作为信号分子(Cao et al., 2020)。链霉菌中,分支酸裂解酶 Hyg5 催化分支酸产生 3-HBA 作为天然的萜类物质合成的前体(Andexer et al., 2011)。研究发现,3-HBA 还可以通过龙胆酸降解途径合成小分子物质龙胆酸和马来酸(Noda et al., 2017)。在微生物中,3-HBA 是萘、取代苯酚和卤代苯甲酸等有氧降解的中间体,再通过 3 种途径进入三羧酸循环,即龙胆酸途径、原儿茶酸途径和邻苯二酚途径。在龙胆酸途径中,3-羟基苯甲酸-6-羟化酶(3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase, 3HB6H)使 3-HBA 对位羟化,生成龙胆酸(Jones and Cooper, 1990)。在原儿茶酸途径中,3-羟基苯甲酸-4-羟化酶(3-hydroxybenzoate 4-hydroxylase)可以将 3-HBA 催化为原儿茶酸(Protocatechuic acid)。在氢噬菌菌中,3-HBA 形成原儿茶酸后,还可以在脱羧酶的催化下形成邻苯二酚(Fan et al., 2019)。

假单胞菌是一类好氧的革兰氏阴性菌,具有代谢和生理多样性,能够适应多种环境(Silby et al., 2011)。一些假单胞菌可以通过莽草酸途径合成吩嗪类抗生素,能拮抗多种植物病原菌,具有生物防治作用(Ali et al., 2016)。绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*) HT66 是一株分离于水稻根际的生防菌株,能够分泌吩嗪-1-甲酰胺(phenazine-1-carboxamide, PCN),是已知 PCN 产量最高的野生菌株。实验室前期,对 HT66 菌株进行多轮亚硝基胍和紫外线诱变,筛选得到 1 株 PCN 稳定高产菌株 P3。通过同位素标记定量蛋白质组学技术,发现 P3 菌株中与 PCN 合成相关的次级代谢途径得到增强(Jin et al., 2016)。因此,基于 P3 菌株高效的内源合成途径,对已知的基因位点进行改造可以异源合成其他有价值的化合物,包括多种羟基苯甲酸类物质。前期课题组通过筛选不同来源的分支酸裂解酶,优化莽草酸途径并阻断相关化合物的降解途径,成功构建了可以合成积累 4-羟基苯甲酸的菌株(Wang et al., 2018a)。

本研究探究 P3 菌株对 3-HBA 的耐受性,即 3-HBA 积累对细胞生长的影响,以确定 P3 菌株是否具有生产 3-HBA 的条件。为使 3-HBA 合成后能够积

累,我们对 P3 菌株内源的 3-HBA 降解基因进行研究。通过序列比对和基因敲除技术,鉴定 P3 菌株中的 3-HBA 降解基因,并对降解基因进行外源表达和全细胞催化,确定了 P3 菌株降解 3-HBA 的中间产物以及降解途径。本研究揭示了绿针假单胞菌 P3 中 3-HBA 的降解基因,为其他羟基苯甲酸类物质降解的研究提供借鉴,为日后绿针假单胞菌 P3 异源合成积累 3-HBA 及其衍生物奠定基础。

1 结果与分析

1.1 绿针假单胞菌 P3 对 3-HBA 的耐受性研究

通过比较不同浓度 3-HBA 对绿针假单胞菌 P3 细胞生长的影响,评估其对 3-HBA 的耐受性。摇瓶培养 P3 菌株,在对数生长期前期即培养 12 h 后向培养基中加入 3-HBA,测量各时间点的生物量,生长曲线如图 1。P3 菌株在培养 24 h 后进入平稳期,最大 OD_{600} 可以达到 32。在培养基中加入终浓度小于 2 g/L 的 3-HBA 后,实验组生物量变化趋势和对照组无显著差异,表明 P3 菌株生长没有受到抑制。当培养基中 3-HBA 浓度达到 3 g/L 时,P3 菌株的生长受到一定程度的抑制,培养至 24 h 其生物量相较对照组减少了 37.5%, OD_{600} 仅为 20。当 3-HBA 浓度升高到 4 g/L 时,培养至 36 h 过程中生物量较 12 h 的生物量无显著提高,细胞生长几乎停滞。这个结果证明过量的 3-HBA 会对细胞造成毒性,P3 菌株对 3-HBA 的耐受浓度达到 3 g/L,具有较高的耐受性。

1.2 绿针假单胞菌 P3 对 3-HBA 的降解

在 60 mL KB 培养基中加入 0.06 g 3-HBA 培养 P3 菌株,每隔 6 h 取样测量 OD_{600} ,并用高效液相色谱(high-performance liquid chromatography, HPLC)检测样品上清液,计算 3-HBA 浓度,拟合菌株生长与内源 3-HBA 降解曲线(图 2)。当细胞进入对数生长期

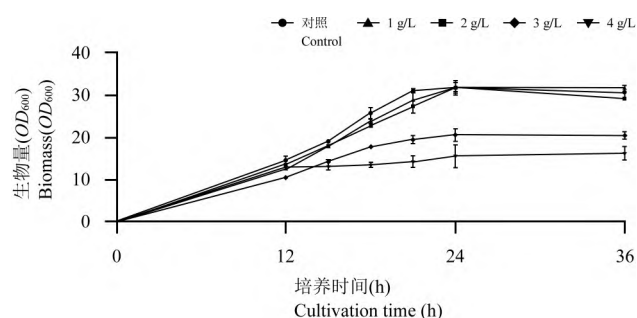


图 1 P3 菌株在不同浓度 3-HBA 影响下的生长曲线

Figure 1 Growth curve of P3 strain supplemented with different concentrations of 3-HBA

时, 3-HBA 的浓度急剧下降, 在培养 12~24 h 期间培养基中 3-HBA 的量下降了 63%, 说明 3-HBA 被快速的降解。当细胞生长进入平台期时 3-HBA 几乎被完全消耗。这个结果表明, P3 菌株能够内源降解 3-HBA, 其降解效率较高, 降解速度和细菌生物量

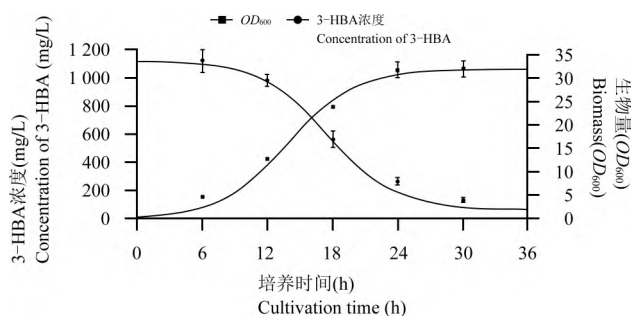


图 2 P3 菌株的生长曲线和 3-HBA 降解曲线

Figure 2 Growth curve and 3-HBA degradation curve of P3 strain

呈一定的正相关性。

1.3 3-HBA 降解基因的鉴定

P3 菌株可以利用 3-HBA 为唯一碳源生长, 说明存在 3-HBA 的氧化降解基因(图 4A)。前期实验室对绿针假单胞菌 P3 进行了全基因组测序, 并登入数据库。分别以 3-羟基苯甲酸-4-羟化酶和 3-羟基苯甲酸-6-羟化酶基因序列为模板, 在基因组数据库中 BLAST 筛选到 1 个与 *Klebsiella pneumoniae* M5a1 中 3-羟基苯甲酸单加氧酶基因 *mhbM* 同源片段相似性达 70% 以上的基因 *M217_RS0133095*, 长度为 1 206 bp, 将其命名为 *mhbM*。使用自杀质粒介导的同源重组无痕基因敲除技术, 在 P3 菌株中敲除 *mhbM*, 以基因上下游引物进行 PCR 和测序验证, 确认敲除株 P3 Δ *mhbM* 成功构建(图 3)。敲除 *mhbM* 后, 在无机盐培养基中添加 3-HBA 为唯一碳源, 并以添加甘油为唯一碳源和不添加碳源组作为对照, 发现 P3 菌株失去利用 3-HBA 为唯一碳源生长的能力(图 4B), 表明 *mhbM* 编码酶催化 3-HBA 的分解。在 *mhbM* 敲除株基因组上回补 *mhbM*, 以 *mhbM* 上游同源臂正向引物和下游同源臂反向引物进行 PCR 和测序验证, 回补株特异性条带长度约为 2 200 bp (*mhbM* 同源臂 1 000 bp)。而回补 *mhbM* 后, 菌株恢复了利用 3-HBA 为唯一碳源生长的能力(图 4C)。这项结果证明 P3 菌株内源降解 3-HBA 的途径中, *mhbM* 编码的酶催化 3-HBA 降解。

1.4 3-HBA 降解基因表达产物的催化性质

以 P3 菌株基因组为模板, PCR 扩增克隆 *mhbM*

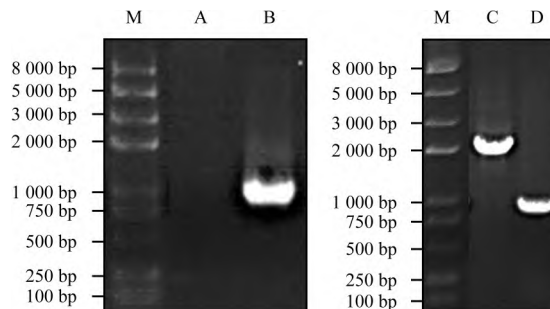


图 3 *mhbM* 敲除与回补验证电泳分析

注: M: DNA Marker; A: *mhbM* 敲除株为模板; B: P3 菌株为模板; C: *mhbM* 回补株为模板; D: *mhbM* 敲除株为模板

Figure 3 Electrophoresis analysis of *mhbM* deletion and complementation

Note: M: DNA Marker; A: *mhbM* deletion strain as template; B: P3 strain as template; C: *mhbM* complementation strain as template; D: *mhbM* deletion strain as template

基因片段, 连接 pET-28a 表达载体, 转入 BL21 (DE3) 大肠杆菌(*Escherichia coli*)中进行外源表达。在静息细胞悬液中加入 3-HBA 至终浓度为 500 mg/L, 反应 12 h 后取样进行 HPLC 检测(图 5)。处理的样品的色谱图中, 除 3-HBA 的吸收峰外, 出现了新化合物的吸收峰, 其保留时间与龙胆酸标准品一致, 推测产生的物质为龙胆酸。

通过超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)对处理的样品进一步分析(图 6)。样品和龙胆酸标准品色谱峰保留时间一致, m/z 为 153.019 0。因采用负离子模式检测, m/z 和龙胆酸离子质荷比吻合, 可以确定 3-HBA 被降解为龙胆酸。3-HBA 在 *mhbM* 编码的 3-羟基苯甲酸-6-羟化酶催化下形成龙胆酸, 经由龙胆酸途径降解。

2 讨论

随着人们对能源危机和环境污染问题的日益关注, 对微生物代谢途径进行合理设计及遗传修饰, 改造细胞特性应用于实际生产中变成一大研究热点。实验室前期对绿针假单胞菌的内源途径进行改造, 以 4-羟基苯甲酸为前体合成了黏糠酸和熊果苷(Wang et al., 2018b)。在此工作的基础上, 我们设想引入外源的分支酸裂解酶基因, 可使 3-HBA 在绿针假单胞菌 P3 中合成积累。代谢工程改造大肠杆菌异源合成 3-HBA 产量可达 2 180 mg/L, 是现阶段报道 3-HBA 生物合成的最高水平(Noda et al., 2016)。由于酚酸类物质过量积累会对细胞造成毒害, 本研究首先探究了 P3 菌株对 3-HBA 的耐受性, 发现 P3 菌株对 3-HBA

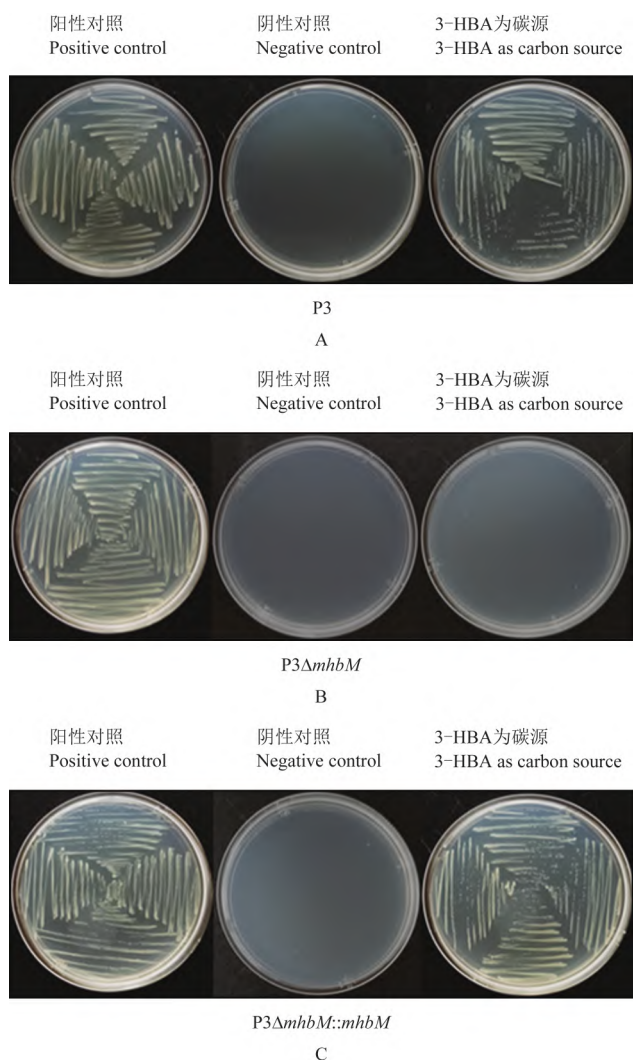


图 4 P3 菌株在无机盐培养基上的生长情况
注: A: P3 菌株; B: *mhbM* 敲除株; C: *mhbM* 回补株
Figure 4 Growth of P3 strain on inorganic salt medium
Note: A: P3 strain; B: P3 with *mhbM* deletion; C: *mhbM* complemented strain

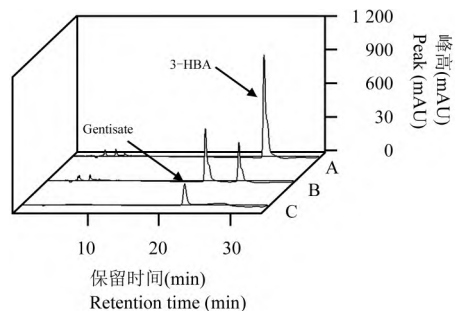


图 5 外源表达 *mhbM* 的产物降解 3-HBA 色谱图
注: A: 空载体对照; B: 表达 *mhbM* 全细胞处理样品; C: 龙胆酸标准品
Figure 5 Chromatogram for degradation of 3-HBA by cells expressing *mhbM*
Note: A: Blank vector control; B: Whole cell treated sample expressing *mhbM*; C: Gentisate standard

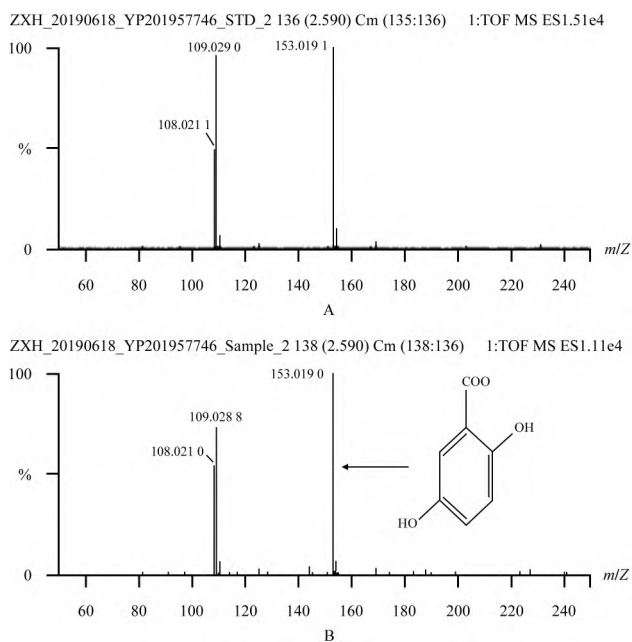


图 6 表达 *mhbM* 全细胞处理样品的质谱检测峰图
注: A: 龙胆酸标准品; B: 全细胞处理样品
Figure 6 UPLC-MS/MS spectrum of whole cell treated sample expressing *mhbM*
Note: A: Gentisate standard; B: Whole cell treated sample

的耐受浓度达到 3 g/L。因此,在 P3 菌株中合成 3-HBA 具有天然的生理优势,其耐受性还可以通过改造进一步提高。

本研究发现 P3 菌株可以利用 3-HBA 为唯一碳源生长,存在 3-HBA 的内源降解途径。我们基于绿针假单胞菌 P3 全基因组数据,通过序列比对找到了 3-羟基苯甲酸-6-羟化酶基因 *mhbM*,对其进行敲除后发现 P3 菌株失去利用 3-HBA 为唯一碳源生长的能力,证明 *mhbM* 为 3-HBA 的降解基因。将 *mhbM* 进行外源表达和催化后,鉴定得 3-HBA 的降解产物为龙胆酸。通过同源性比对,我们发现 *mhbM* 上游还存在 3 个龙胆酸降解相关基因和 1 个转运子基因,共同组成了龙胆酸途径基因簇。因此,我们推测 3-HBA 在绿针假单胞菌 P3 中的完整降解过程如下: 3-HBA 在 *mhbM* 的催化下形成龙胆酸,龙胆酸在双加氧酶 MhbD 的作用下开环形成顺丁烯二酸-单酰丙酮酸,然后在异构酶的催化下发生异构作用,最后水解为反丁烯二酸和丙酮酸进入 TCA 循环(图 7)。假单胞菌因其适应性强和代谢多样化常被用于降解有害物质的研究,如 4-苯甲酸乙酯、三氯乙烷、尼古丁的生物降解等(Wang et al., 2007)。由于化感作用,羟基苯甲酸在土壤中积累会对植物的生长产生抑制,限制一些经济作物的连作(Khadem and Marles, 2010)。利用

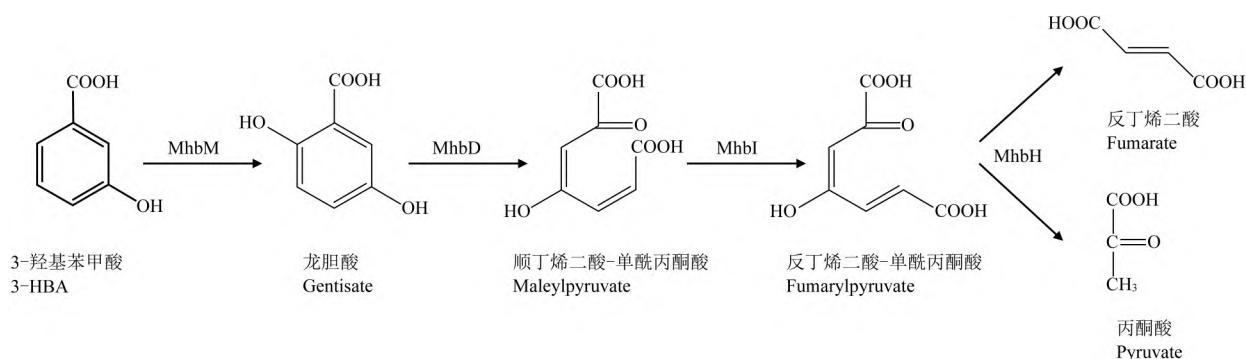


图7 P3 菌株中的龙胆酸降解途径

Figure 7 Gentisate degradation pathway in P3 strain

绿针假单胞菌的根际促生作用降解羟基苯甲酸类物质,是修复土壤提高作物生产力的有效途径。

本研究对重要的平台化合物 3-HBA 在绿针假单胞菌 P3 中的降解代谢进行了研究,探究了 P3 菌株对 3-HBA 的耐受性,揭示了 3-HBA 的降解途径。本研究展现了绿针假单胞菌 P3 的环境适应性以及代谢改造的可操作性,为假单胞菌异源合成积累 3-HBA 及其衍生物奠定了基础,同时为植物根际促生菌生物降解芳香族化合物提供了线索。

3 材料与方法

3.1 3-HBA 定量分析方法建立

3-HBA 的 HPLC 检测方法:使用安捷伦 1260 Infinity HPLC 系统,色谱柱为 C18 反相柱,柱温 30 °C,1 mL/min 恒定流速。紫外灯检测波长设置为 235 nm,进样量为 20 μ L。流动相为甲醇(溶液 A)和含 0.1% 甲酸的超纯水(溶液 B),用 5% 甲醇、95% 甲酸水的比例平衡色谱柱 30 min 后,通过梯度洗脱分离代谢物。检测样品中 3-HBA 浓度时,取 1 mL 样品,12 000 r/min 离心 2 min 后,使用孔径为 0.2 μ mol/L 的尼龙过滤器过滤上清液作为检测样品。

3-HBA 标准曲线制作:精确称取 3-HBA 标准品,计算后加入超纯水使其充分溶解配置成母液,再分别稀释成不同浓度的 3-HBA 溶液。HPLC 检测各浓度的 3-HBA 标准溶液样品,以 3-HBA 的浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,在 Origin 8 中绘制散点图进行线性拟合后,即可得到 3-HBA 的标准曲线方程。

3.2 菌株、质粒及培养条件

绿针假单胞菌 P3 在 King's B (KB)培养基或 LB 培养基中 28 °C 培养,大肠杆菌在 LB 培养基中 37 °C 培养。KB 培养基:20 g 胰蛋白胨,18.92 g 甘油,

0.514 g K_2HPO_4 , 0.732 g $MgSO_4$, 用蒸馏水溶解,定容至 1 000 mL 即为液体 KB 培养基。在液体培养基中加入 1.5% 的琼脂粉即为固体培养基。培养时根据需要按 0.1% 比例加入抗生素母液。

研究所使用的菌株和质粒列于表 1。

3.3 基因敲除和回补

找到 *mhbM* 序列,选取该基因序列的上下游同源臂各 500 bp,设计引物 PCR 扩增上游同源臂和下游同源臂。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,将正确的、清晰的条带切下,用凝胶回收试剂盒纯化 *mhbM* 上下游同源臂片段,随后进行融合 PCR。将 pK18mob-sacB 质粒后用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Bam*HI 双酶切,将酶切过的质粒和 *mhbM* 上下游同源臂融合片段一起,用同源重组酶进行连接。将酶连反应产物转化 DH5 α 感受态细胞。将验证正确的 DH5 α 菌落接种至 LB 液体培养基中过夜培养,使用试剂盒抽提质粒,将 pK18- Δ *mhbM* 质粒转化 *E.coli* S17-1 感受态细胞,获得 S17 Δ *mhbM* 菌株。

将 P3 菌株与 S17 Δ *mhbM* 菌株分别接种于 5 mL LB 液体培养基中培养过夜后,取菌液 5 mL 离心收集菌体,用 LB 培养基洗涤 3 次后混合菌体置于 28 °C 恒温培养箱孵育 1 h。将混合菌液倾倒在 LB 固体培养基上,28 °C 静置培养 36 h,使两种菌接合。刮取平板上的菌体,用 150 μ L LB 液体培养基重悬,均匀涂布于 LB 双抗(50 mg/L Kan 和 100 mg/L Amp)固体平板上,28 °C 静置培养 36 h。挑取单克隆,重悬于 100 μ L LB 液体培养基中,稀释到合适的浓度后涂布于含有 15% 蔗糖的 LB 平板上,28 °C 静置培养 36 h。用无菌牙签挑取蔗糖平板上的单菌落,分别影印在 Amp LB 平板和 Kan LB 平板上,28 °C 恒温倒置培养。对能在 Amp 平板上生长却不能在 Kan 平板上生长的菌落

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒 Strains and plasmids	特征 Characteristics	来源或参考文献 Source or references
菌株 Strains		
<i>P. chlororaphis</i> P3	来源于 <i>P. chlororaphis</i> HT66 的高产 PCN 突变株 A mutant from <i>P. chlororaphis</i> HT66 with a high PCN production	实验室库存 Lab stock
P3 Δ <i>mhbM</i>	<i>P. chlororaphis</i> P3 <i>mhbM</i> 缺失突变体 <i>mhbM</i> deletion mutant of <i>P. chlororaphis</i> P3	本研究 This study
P3 Δ <i>mhbM</i> :: <i>mhbM</i>	P3 Δ <i>mhbM</i> 回补 <i>mhbM</i> 突变体 <i>mhbM</i> complementation mutant of P3 Δ <i>mhbM</i>	本研究 This study
<i>E. coli</i> S17-1 (λ pir)	用于向 <i>P. chlororaphis</i> 转移质粒 Used for incorporating constructs into <i>P. chlororaphis</i>	实验室库存 Lab stock
BL21- <i>mhbM</i>	BL21 (DE3)含有质粒 pET- <i>mhbM</i> , Kan ^r BL21 (DE3) harboring pET- <i>mhbM</i> , Kan ^r	本研究 This study
BL21-control	BL21 (DE3)含有质粒 pET-28a(+), Kan ^r BL21 (DE3) harboring pET-28a(+), Kan ^r	本研究 This study
质粒 Plasmids		
pk18mobsacB	基因替换载体, Kan ^r Broad-host-range gene replacement vector, Kan ^r	Schäfer et al., 1994
pk18 Δ <i>mhbM</i>	pk18mobsacB 含有 <i>mhbM</i> 上下游各 500 bp 序列, Kan ^r pk18mobsacB harboring 500 bp upstream and 500 bp downstream fragments of <i>mhbM</i> , Kan ^r	本研究 This study
pk18 Δ <i>mhbM</i> :: <i>mhbM</i>	pk18mobsacB 含有 <i>mhbM</i> 基因和上下游各 500 bp 序列, Kan ^r pk18mobsacB harboring <i>mhbM</i> gene, 500 bp upstream and downstream fragments of <i>mhbM</i> , Kan ^r	本研究 This study
pET-28a(+)	表达载体, T7 启动子, Kan ^r Expression vector, T7 promoter, Kan ^r	Sarmitha et al., 2012
pET- <i>mhbM</i>	pET-28a(+)含有 <i>mhbM</i> 基因全长, Kan ^r pET-28a(+)harboring entire <i>mhbM</i> gene, Kan ^r	本研究 This study

进行 PCR 验证。挑取适当的克隆子过夜培养,用试剂盒提取基因组作模板,进行 PCR 扩增测序验证产物,确保 *mhbM* 敲除成功。保种于终浓度 30%的甘油后 -80 °C 低温保藏备用。

回补 *mhbM* 时以 P3 菌株基因组为模板,同时扩增 *mhbM* 上游同源臂, *mhbM* 基因片段和 *mhbM* 下游同源臂为一个片段,连接质粒构建回补载体转化 S17 菌株。其他操作和基因敲除一致。

3.4 全细胞催化

从 P3 菌株基因组中扩增 *mhbM*, 获得纯化片段后连接到用限制性酶 *Nde* 和 *Hind* 处理过的 pET-28a 载体上,转化 BL21 (DE3)菌株。进行体外催

化实验时,挑取单菌落接种于 5 mL LB 液体培养基中,培养 6~8 h 后取 0.6 mL 菌液转接于含 60 mL LB 液体培养基的摇瓶中,加入 60 μ L Kan, 37 °C 振荡培养 2 h 后 OD_{600} 为 0.2~0.6 时加入 60 μ L 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)并置于 16 °C 培养箱振荡诱导过夜。诱导完成后,离心收集细胞。用 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH=8.0)重悬细胞,离心,重复洗涤 3 次,最后将细胞重悬至 OD_{600} 约为 5。取 30 mL 细胞悬浮液,向其中添加 15 mg 3-HBA, 28 °C 振荡孵育,每隔 6 h 采集 1 次样品进行分析。

作者贡献

伏聪是本研究实验设计和实验研究的执行人,

并完成数据分析、论文初稿的写作, 崔佳佳参与实验与结果分析, 张雪洪是项目的构思者及负责人, 指导实验设计、数据分析、论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金项目(31670033)资助。感谢上海交通大学仪器分析中心高分辨质谱分析的技术支持。

参考文献

- Ali H.M., El-Shikh M.S., Salem M.Z.M., and Muzaheed M., 2016, Isolation of bioactive phenazine-1-carboxamide from the soil bacterium *Pantoea agglomerans* and study of its anti-cancer potency on different cancer cell lines, *J. Aoac. Int.*, 99 (5): 1233-1239.
- Andexer J.N., Kendrew S.G., Nur-e-Alam M., Lazos O., Foster T. A., Zimmermann A.S., Warneck T.D., Suthar D., Coates N. J., Koehn F.E., Skotnicki J.S., Carter G.T., Gregory M.A., Martin C.J., Moss S.J., Leadlay P.F., and Wilkinson B., 2011, Biosynthesis of the immunosuppressants FK506, FK520, and rapamycin involves a previously undescribed family of enzymes acting on chorismate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(12): 4776-4781.
- Cao X.Q., Ouyang X.Y., Chen B., Song K., Zhou L., Jiang B.L., Tang J.L., Ji G.H., Poplawsky A.R., and He Y.W., 2020, Genetic interference analysis reveals that both 3-hydroxybenzoic acid and 4-hydroxybenzoic acid are involved in xanthomonadin biosynthesis in the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Phytopathology*, 110 (2): 278-286.
- Cheng H.M., Gao X.W., Zhang K., Wang X.R., Zhou W., Li S.J., Cao X.L., and Yan D.P., 2019, A novel antimicrobial composite: ZnAl-hydroxalcalite with p-hydroxybenzoic acid intercalation and its possible application as a food packaging material, *New J. Chem.*, 43(48): 19408-19414.
- Fan X., Nie L., Shi K.X., Wang Q., Xia X., and Wang G.J., 2019, Simultaneous 3-/4-hydroxybenzoates biodegradation and arsenite oxidation by *Hydrogenophaga* sp. H7, *Front. Microbiol.*, 10: 1346.
- Jin X.J., Peng H.S., Hu H.B., Huang X.Q., Wang W., and Zhang X.H., 2016, iTRAQ-based quantitative proteomic analysis reveals potential factors associated with the enhancement of phenazine-1-carboxamide production in *Pseudomonas chlororaphis* P3, *Sci. Rep.*, 6: 27393.
- Jones D.C.N., and Cooper R.A., 1990, Catabolism of 3-hydroxybenzoate by the gentisate pathway in *Klebsiella pneumoniae* M5a1, *Arch. Microbiol.*, 154(5): 489-495.
- Juurlink B.H.J., Azouz H.J., Aldalati A.M.Z., Altinawi B.M.H., and Ganguly P., 2014, Hydroxybenzoic acid isomers and the cardiovascular system, *Nutr. J.*, 13: 63.
- Khadem S., and Marles R.J., 2010, Monocyclic phenolic acids; hydroxy- and polyhydroxybenzoic acids: occurrence and recent bioactivity studies, *Molecules*, 15(11): 7985-8005.
- Noda S., Shirai T., Mori Y., Oyama S., and Kondo A., 2017, Engineering a synthetic pathway for maleate in *Escherichia coli*, *Nat. Commun.*, 8(1): 1153.
- Noda S., Shirai T., Oyama S., and Kondo A., 2016, Metabolic design of a platform *Escherichia coli* strain producing various chorismate derivatives, *Metab. Eng.*, 33: 119-129.
- Sarmitha S., Shin J.A., and Dipankar C., 2012, Boundaries of the origin of replication: creation of a pET-28a-derived vector with p15A copy control allowing compatible coexistence with pET vectors, *PLoS ONE*, 7(10): e47259.
- Schäfer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G., and Pühler A., 1994, Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: Selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*, *Gene*, 145(1): 69-73.
- Silby M.W., Craig W., Godfrey S.A.C., Levy S.B., and Jackson R. W., 2011, *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable, *FEMS Microbiol. Rev.*, 35(4): 652-680.
- Wang S.N., Liu Z., Tang H.Z., Men J., and Xu P., 2007, Characterization of environmentally friendly nicotine degradation by *Pseudomonas putida* biotype A strain S16, *Microbiology*, 153(Pt 5): 1556-1565.
- Wang S.W., Bilal M., Zong Y.N., Hu H.B., Wang W., and Zhang X.H., 2018a, Development of a plasmid-free biosynthetic pathway for enhanced muconic acid production in *Pseudomonas chlororaphis* HT66, *ACS Synth. Biol.*, 7(4): 1131-1142.
- Wang S.W., Fu C., Bilal M., Hu H.B., Wang W., and Zhang X.H., 2018b, Enhanced biosynthesis of arbutin by engineering shikimate pathway in *Pseudomonas chlororaphis* P3, *Microb. Cell Fact.*, 17(1): 174.

(责任编辑 蹇慧)