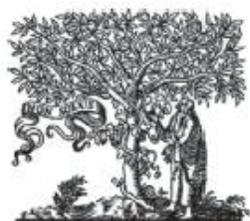


读书报告

汇报人：赵卓丽 汇报日期：2016.6.10

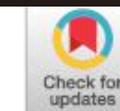


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv



Bioproduction and characterization of extracellular melanin-like pigment from industrially polluted metagenomic library equipped *Escherichia coli*

Shivani Amin ^a, Rajesh P. Rastogi ^{a,b,*}, Ravi R. Sonani ^a, Arabinda Ray ^c, Rakesh Sharma ^d, Datta Madamwar ^{a,*}

^a Post-Graduate Department of Biosciences, UGC-Centre of Advanced Study, Satellite Campus, Vadtal Road, Sardar Patel University, Bakrol, 388315, Anand, Gujarat, India

^b Ministry of Environment, Forests & Climate Change, Indira Paryavaran Bhawan, Jor Bagh Road, New Delhi 110 003, India

^c Advanced Organic Chemistry Department, P. D. Patel Institute of Applied Sciences, CHARUSAT, Changa 388421, Gujarat, India

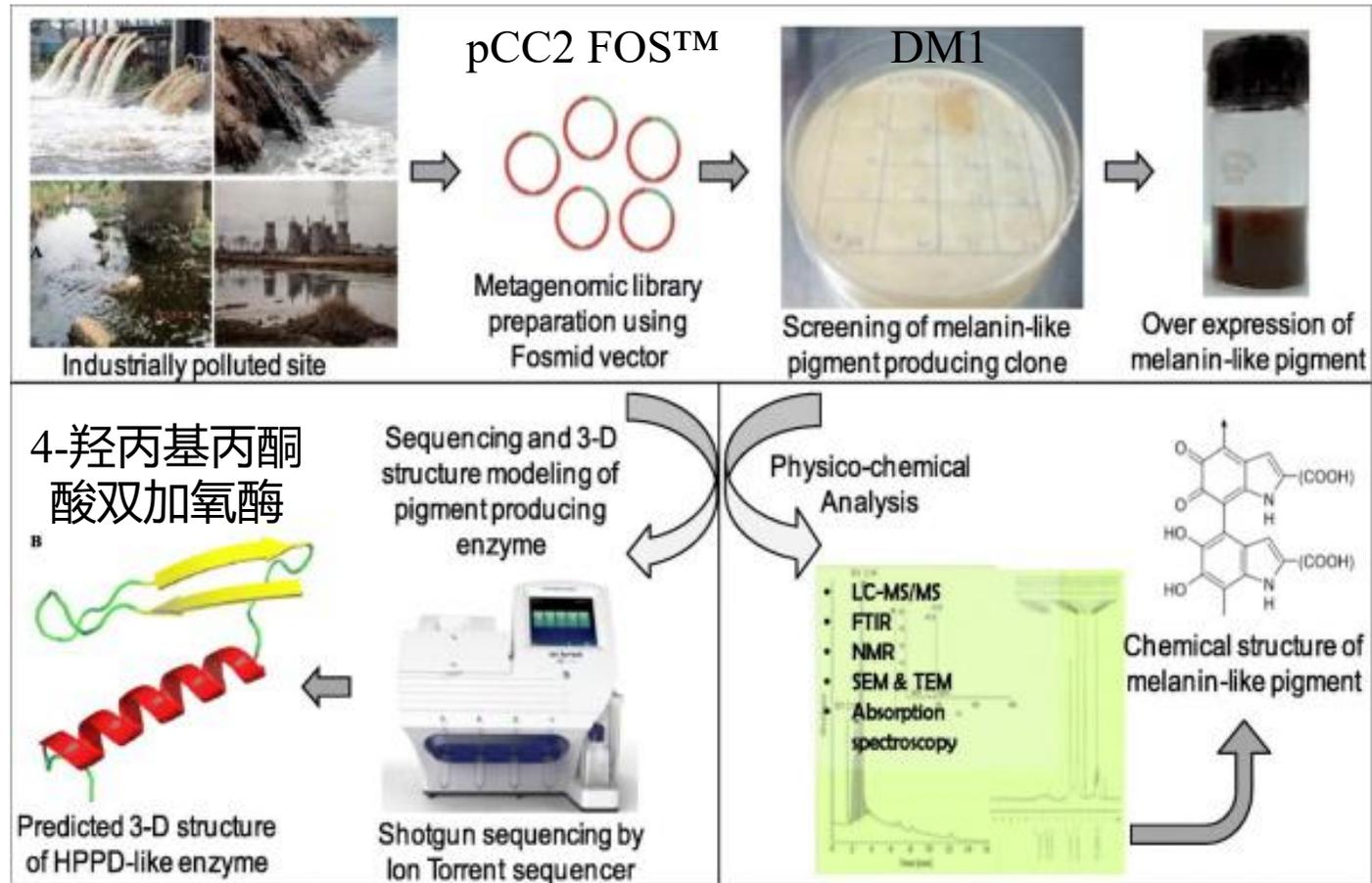
^d CSIR-Institute of Genomics and Integrated Biology (IGIB), Sukhdev Vihar, Mathura Road, New Delhi 110 020, India

来自工业污染宏基因组文库的细胞外色素的生物合成和表征

SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT IF=4.900



Abstract



Introduction

Materials and methods

Results and discussion

Conclusion



1

Introduction

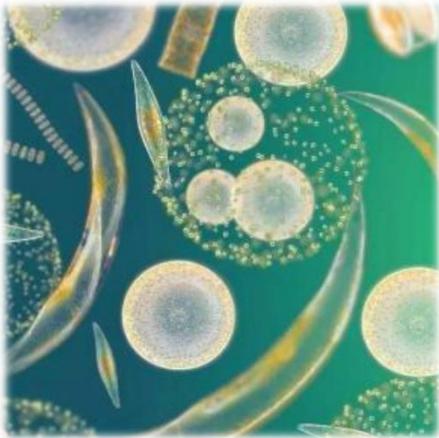


Introduction



微生物非常灵活，因此它们的种群异质性正受到它们居住环境因素的影响。
(Daniel, 2005; Freedman and Zak, 2015)

居住在工业污染环境中的微生物群体的基因组池具有多个应激反应基因。
(Devpura et al., 2017)



基因组可以选择具有缓解压力条件的独特能力的新基因。宏基因组克隆文库的构建和筛选被广泛用于鉴定编码新的应激反应、生物修复酶或第二生物活性化合物的潜在基因。(Martín et al., 2006; Desai et al., 2010; Bouhajja et al., 2017)

Introduction

研究对象

The Amlakhadi canal, Ankleshwar, Gujarat, India

被附近的化学和纺织工业污染的**水生高度污染地区**

已有研究

分离鉴定烃类降解、耐铬和其他重金属抗性生物（细菌/真菌）
Vaidya et al. (2017), Patel et al. (2014) and Pandit et al. (2013)

**研究范围限制：限于可培养的微生物与预测不可培养微生物的功能基因；
没有涉及无法研究的微生物基因的实验验证。**

由于**99%**的微生物群落不可培养，有必要在寻找潜在基因或二级生物活性化合物时考虑未培养微生物。

Introduction

Melanin: 从原核生物到真核生物的几种生物产生红褐色到黑色的色素。高分子量的多元酚杂聚物，被认为是有效的紫外线屏蔽化合物(UV-screening compounds)。

氧化应激(Rita and Pombeiro-Sponchiado, 2005)

热应激 (Madhusudhan et al., 2015)

金属应激(Gadd and de Rome, 1988; Eisenman and Casadevall, 2012)

抗炎剂(Avramidis et al., 1998)

诱导保护性免疫应答(Stappers et al., 2018)

抗氧化剂(El-Naggar and El-Ewasy, 2017; Rageh and El-Gebaly, 2018)

抗癌作用(Pombeiro-Sponchiado et al., 2017; El-Naggar and El-Ewasy, 2017)

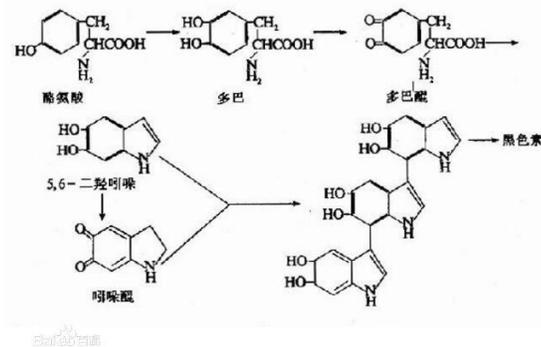
Introduction



黑色素的重组生产具有重要商业价值。其生成需要多种酶参与反应，得到产生黑色素的克隆还需要付出巨大的努力。

metagenomic: 不需要克隆多种基因，且由该方法产生的黑色素具有更高的生物活性，因为该基因簇已经在环境压力下进化。

由于高度污染的Amlakhadi运河的微生物资源很少采用宏基因组学方法进行探索，因此本研究旨在调查Amlakhadi宏基因组文库中黑色素产生克隆的构建，筛选和表征。同时探索了产生的黑色素的化学表征。





2



Materials and methods

Materials and methods

1. Chemicals and reagents

Bam HI Chloramphenicol other antibiotics enzyme β -agarase
T4 DNA ligase DMSO KBr (Potassium bromide)

2. Strains and plasmids

CopyControl™ HTP Fosmid Library Production Kit
pCC2FOS™ Vector pET-28a(+) *E. coli* EPI300™-T1^R *E. coli* BL21

3. Sampling

Amlakhadi canal (21°36'0" North, 73°0'0" East) polluted by industrial activities **Sub-surface** (5-8 cm below the surface) soil samples about 1 kg each from three distinct sites



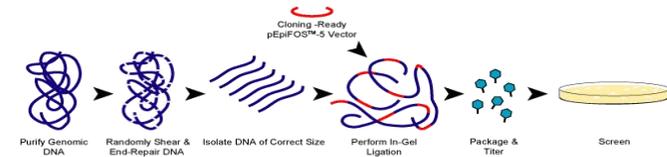
Materials and methods

4. Metagenomic DNA extraction

5g 土壤 + 2g 2-3mm 玻璃珠 + 15mL提取缓冲液(10% (w/v)蔗糖, 100mM Tris-HCl, 100mM EDTA, 100mM 磷酸钠, 0.5M NaCl, 1%(w/v)十六烷基三甲基溴化铵(CTAB), pH=8)→ shaking (75 rpm) at 37°C for 1h→ 10mg/mL PK和20%十二烷基硫酸钠裂解提取的细胞团→ 去除蛋白质、沉淀DNA → 70%乙醇洗涤→ TE缓冲液溶解DNA

每个样品设3个不同重复 将提取的DNA等摩尔混合

5. Community genomic library construction



1U/mL β -琼脂糖凝胶洗脱40kb大小的DNA→ 末端修复、5'-磷酸化→ β -琼脂糖凝胶洗脱法再次纯化5'-磷酸化的DNA→ CopyControl Fosmid Library Production Kit (Epicenter®)克隆到pCC2 FOS™ Vector→ 转化*E. coli* EPI300™-T1^R→ 12.5 μ g/mL氯霉素选择压力下选择转化的细胞

Materials and methods

6. Screening and characterization of melanin-like pigment producing clone

LB平板培养文库（稀释 10^{-1} - 10^{-8} ）→ 筛选棕色区域克隆→ 亚克隆→ 序列分析、进一步表征

亚克隆：BamHI限制酶消化质粒→ T4连接酶将目的片段连接到 pET-28a(+) → 连接产物转化*E. coli* BL21→肉眼观察棕色区域、检查黑色素生成→ 亚克隆插入质粒(10kb) 测序 (shotgun sequencing)

7. Extraction and purification of melanin

重组菌株于LB中37°C振荡培养→ 离心取上清→ 两步沉淀：5N NaOH将培养基pH增加至12.0，室温连续搅拌1小时；1N HCl将培养基pH降低至2.0，室温下孵育一周即可从水溶液中沉淀出黑色素→煮沸1小时→ 0.1N HCl反复洗涤得到的黑色素粉末沉淀物→去离子水洗涤→ 用乙醇洗涤→ 室温下干燥2小时→ 粉碎、室温储存



Materials and methods

8. Physicochemical characterization of melanin-like pigment

生化和溶解度分析

电镜: SEM (ESEM EDAX XL-30, Philips, Netherlands); TEM (Tecnai 20, Philips, Holland)

光谱分析: 黑色素粉末溶于二甲基亚砷 (DMSO) DMSO作空白对照 紫外分光光度计 900nm

LC-MS/ MS: liquid chromatography (LC) - mass spectrometry (MS)

FTIR NMR: 傅里叶变换红外光谱 核磁共振



Materials and methods

9. Homology-based structure and function prediction

分析10kb亚克隆插入序列以发现黑色素生物合成酶相关基因

使用SWISSMODEL的同源性建模来预测蛋白质的3D结构模型 (<https://swissmodel.expasy.org>)

使用PredictProtein在线工具 (<https://www.predictprotein.org>) 预测蛋白质的潜在功能

The screenshot shows the SWISS-MODEL web interface. At the top, there is a logo for BIOCENTRUM University of Basel and the text 'SWISS-MODEL'. Below the logo, there are tabs for 'Modelling', 'Repository', and 'Tools'. The main content area is titled 'Start a New Modelling Project'. It contains a 'Target Sequence' input field with a placeholder 'Paste your target sequence(s) or UniProtKB AC here'. Below the input field are two buttons: '+ Upload Target Sequence File...' and 'Validate'. There are also input fields for 'Project Title' (containing 'Untitled Project') and 'Email' (containing 'Optional'). At the bottom of the form are two buttons: 'Search For Templates' and 'Build Model'. A small disclaimer at the bottom reads: 'By using the SWISS-MODEL server, you agree to comply with the following terms of use and to cite the corresponding articles.'

```
>sp|O15105|SMAD7_HUMAN Mothers against decapentaplegic homolog 7 OS=Homo sapiens GN=SMAD7 PE=1 SV=1
MFRTKRSALVRRLLWRSRAPGGEEDEEGAGGGGGGELRGEATDSRAHGAGGGGPRAGCCLGKAVRGAKGHHHPHPPAAGAGAAGGAEADLKALTHSVLKKLKERQLELLQAVESRGGTR
TACLLLPGRDLCRLGPGAPAGAQAQPPSSYSLPLLCKVFRWPDLRHSSEVKRLCCESYGKINPELVCCNPHHL SRLCELESPPPPYSRYPMDFL KPTADCPDAVPSSAETGGTNYLAPGGLSD
SQLLLEPGDRSHWCVMAYWEEKTRVGRLYCVQEPSLDIFYDLPGNGFCLGQLNSDNKSQLVQKVRSGKIGCGIQLTRVDGWWYVYRNSYPFIKISATLNDPDSRTLLVHKVFPFGFSIKAFDYEKAY
SLQRPNDFHEFMQQPWTGFTVQISFVKGWGQCYTRQFISSCPCWLEVFNSR
```

Clear PredictProtein [Example Input 1 Example Input 2]





3

Results and discussion

为了获得高度多样化的基因，混合不同位置的3个等摩尔比的DNA，保证 metagenomic library 的质量；

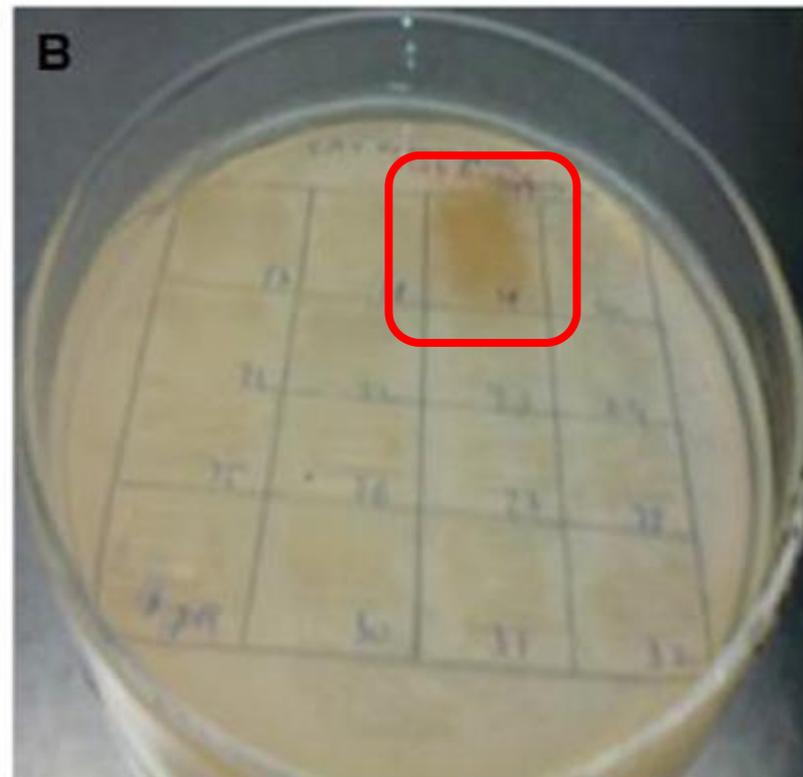
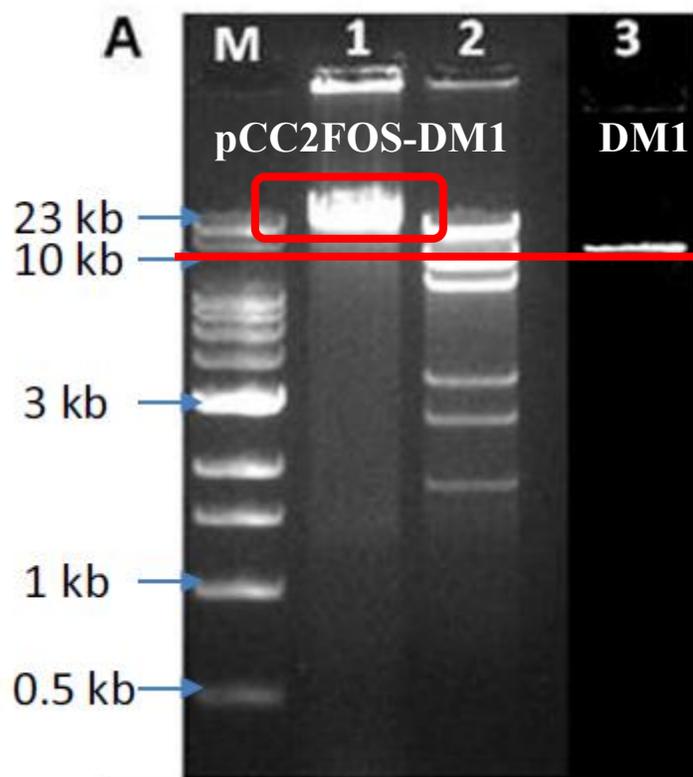
使用fosmid载体构建平均40kb DNA的 3.92×10^6 个克隆的基因组文库；

为了检查克隆的冗余性，通过限制性消化分析检查来自五个随机挑选的克隆。经消化的fosmid的琼脂糖凝胶电泳图谱清楚地排除了图书馆克隆之间冗余的存在。

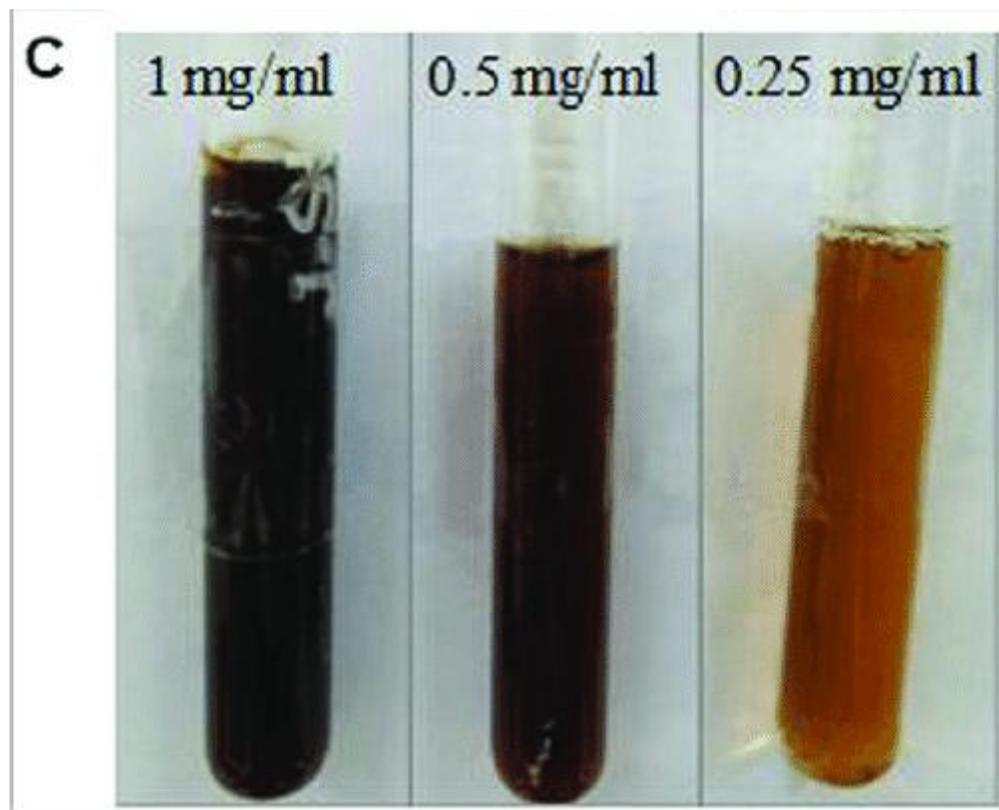
Results and discussion

Screening and sub-cloning of pigment producing clones

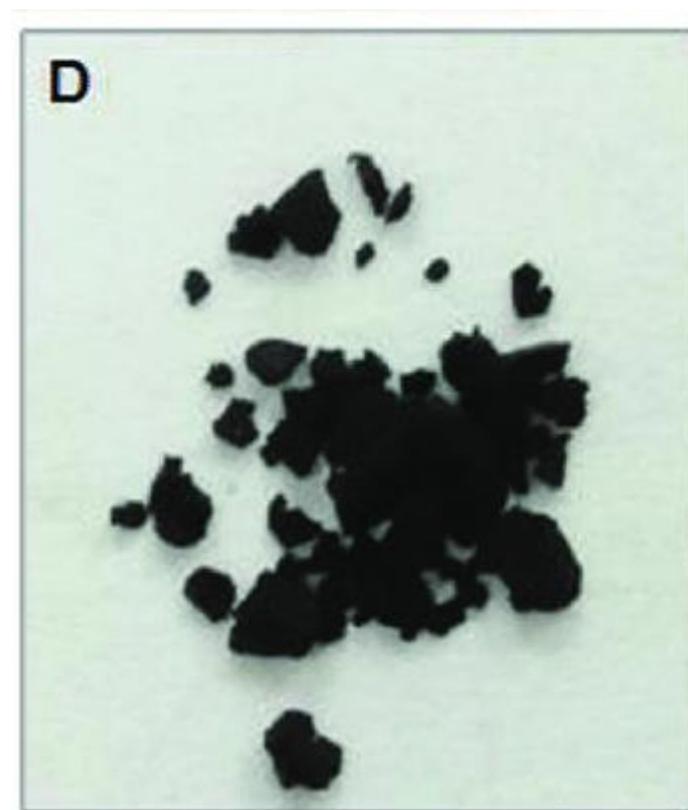
将40kb插入片段用不同的限制酶消化并克隆到BL21中。



棕色视觉区域



亚克隆产生500mg/L黑色素



干燥形式的沉淀物

Results and discussion

Characterization and structural identification of melanin-like pigment

Table 1 色素在各种溶剂中的溶解度
Solubility analysis of melanin like pigment with different solvent and at acidic and alkaline pH.

Solvents		Solubility
Deionized water	去离子水	Insoluble
1 N HCl		Insoluble
0.1% NaOH		Soluble
Ethanol	乙醇	Insoluble
Ethyl acetate	乙酸乙酯	Insoluble
Chloroform	三氯甲烷	Insoluble
Acetone	丙酮	Insoluble
Methanol	甲醇	Insoluble
Acetonitrile	乙腈	Insoluble
DMSO	二甲基亚砜	Soluble
Dichloromethane	二氯甲烷	Insoluble
Butanol	丁醇	Insoluble
Phenol	苯酚	Soluble

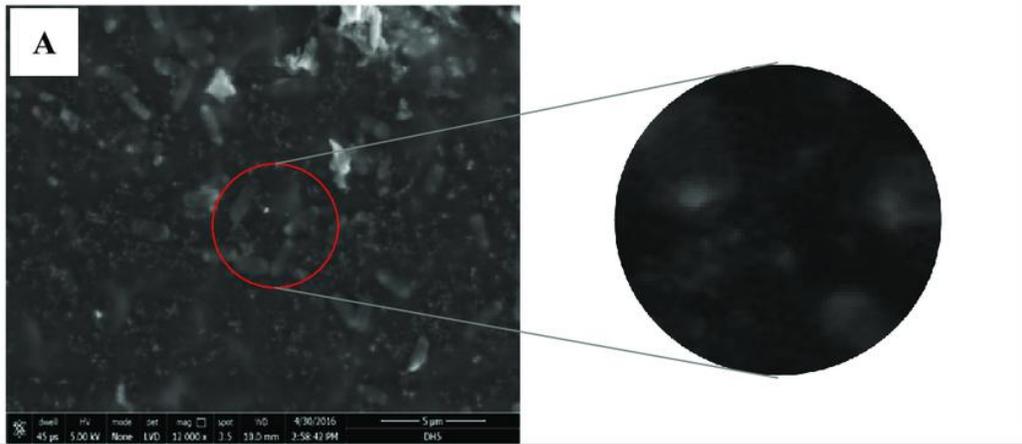
色素完全溶于二甲基亚砜 (DMSO)
DMSO可溶性色素被提取并表征

色素与1%KMnO₄的反应：从棕色变为红色；
加入1% FeCl₃：色素发生颜色变化；
与30% H₂O₂反应时：色素被漂白；
这些化学特征表明，化合物可能属于黑色素(Ravishankar et al., 1995; Sajjan et al., 2010)，使用各种方法进一步分析。

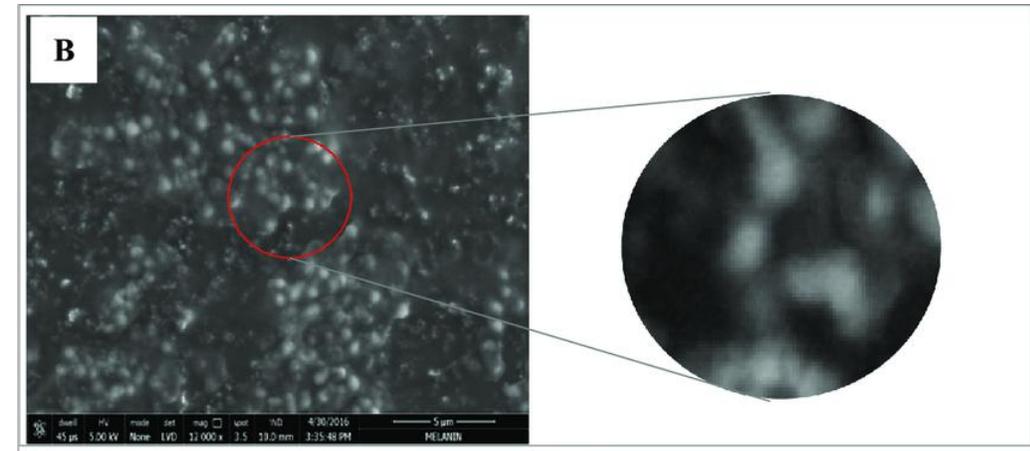
Results and discussion

Scanning and transmission electron microscopy

SEM

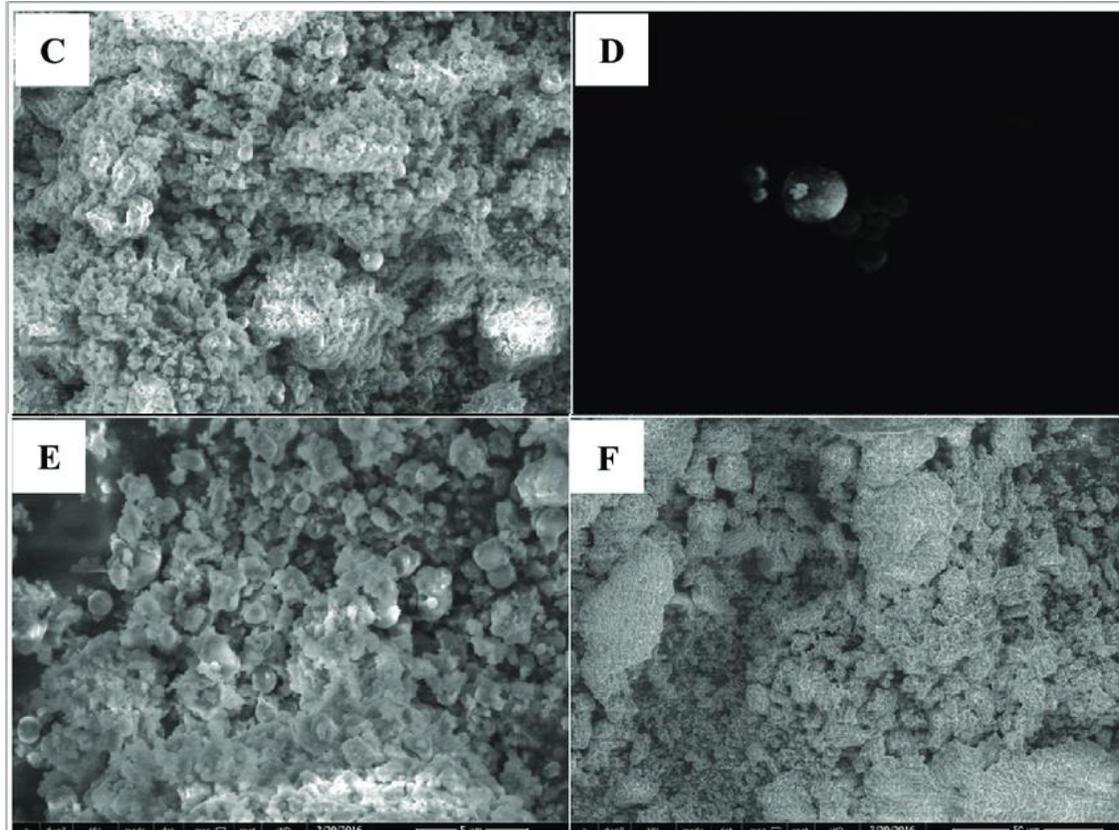


Control: *E. coli* (BL21)



pigment producing sub-clone of *E. coli* (BL21)

黑色素克隆和色素分子表面性能的改变：由于黑色素鞘的存在具有更亮的外观



SEM成像：BL21产生的纯化黑色素

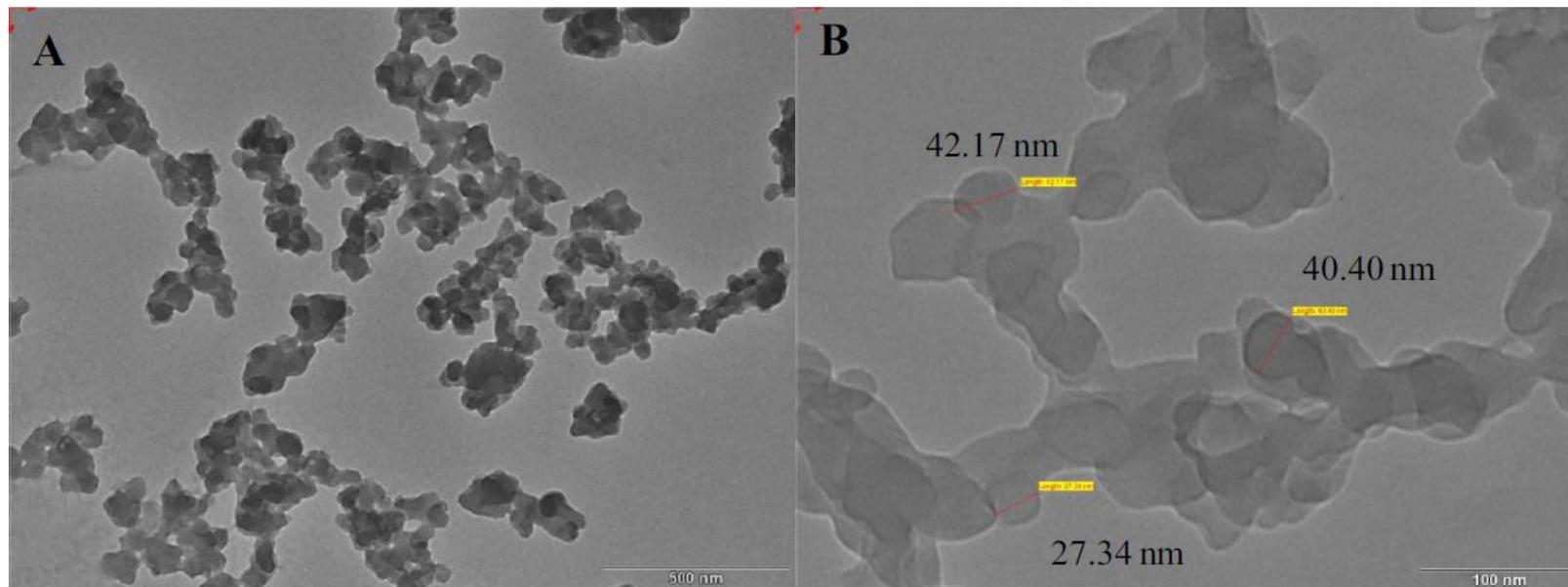
SEM、TEM 观察来自大肠杆菌(BL21)的黑色素的形态表征和粒度分布。天然黑色素呈**颗粒形式的小球形**。

(Nofsinger et al., 2000; Tarangini and Mishra, 2013; Mboniyirivuze et al., 2015; El-Naggar and El-Ewasy, 2017)

SEM下，大肠杆菌 (BL21) 合成的纯化黑色素具有确定的小颗粒 (图2C-F)。

本研究中颜料分子的SEM图像类似于黑色素的表面结构。

(Pitkänen et al., 2007; El-Naggar and El-Ewasy, 2017)

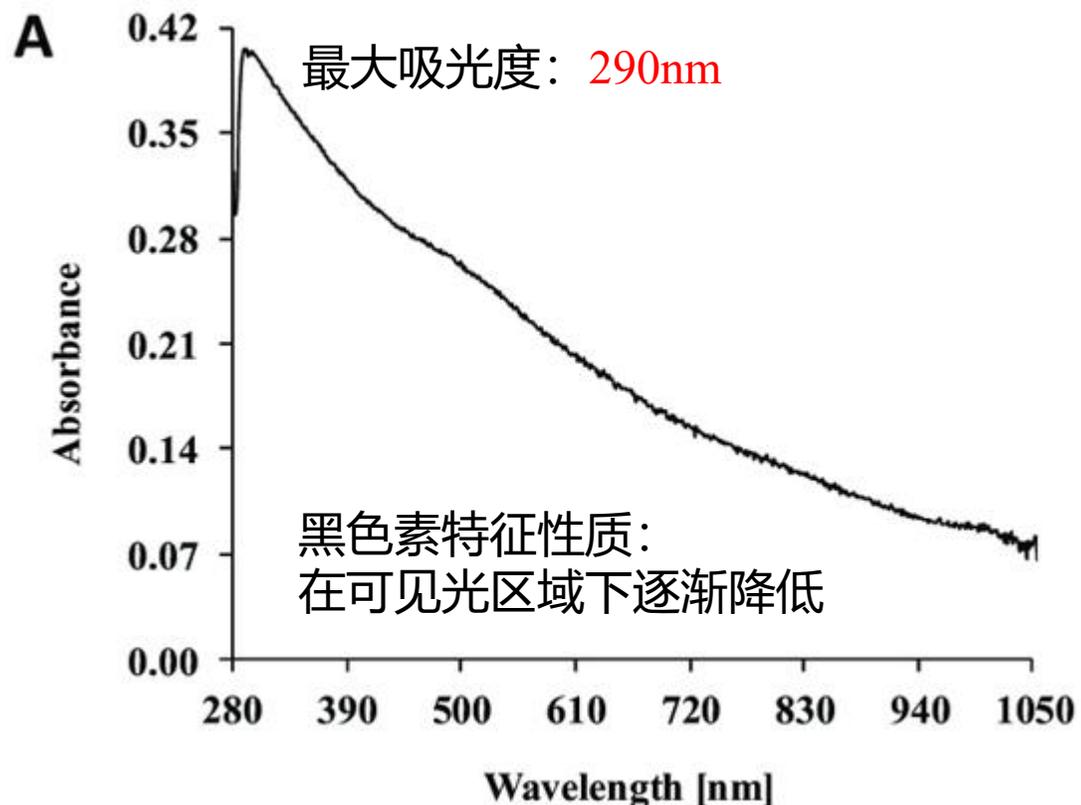


TEM表明黑色素颗粒在一定程度上是**球形**的。由TEM测得的颗粒大小约为25-50nm, 与Liu, Simon(2003)的报道一致。

电子显微镜图像分析显示获得的黑色素是**通过聚集大量特殊大小的球形颗粒分布**。

Results and discussion

UV-visible spectrophotometric analysis of the purified melanin-like pigment



紫外光吸收光谱

不同来源的黑色素显示出不同的最大紫外光吸收值

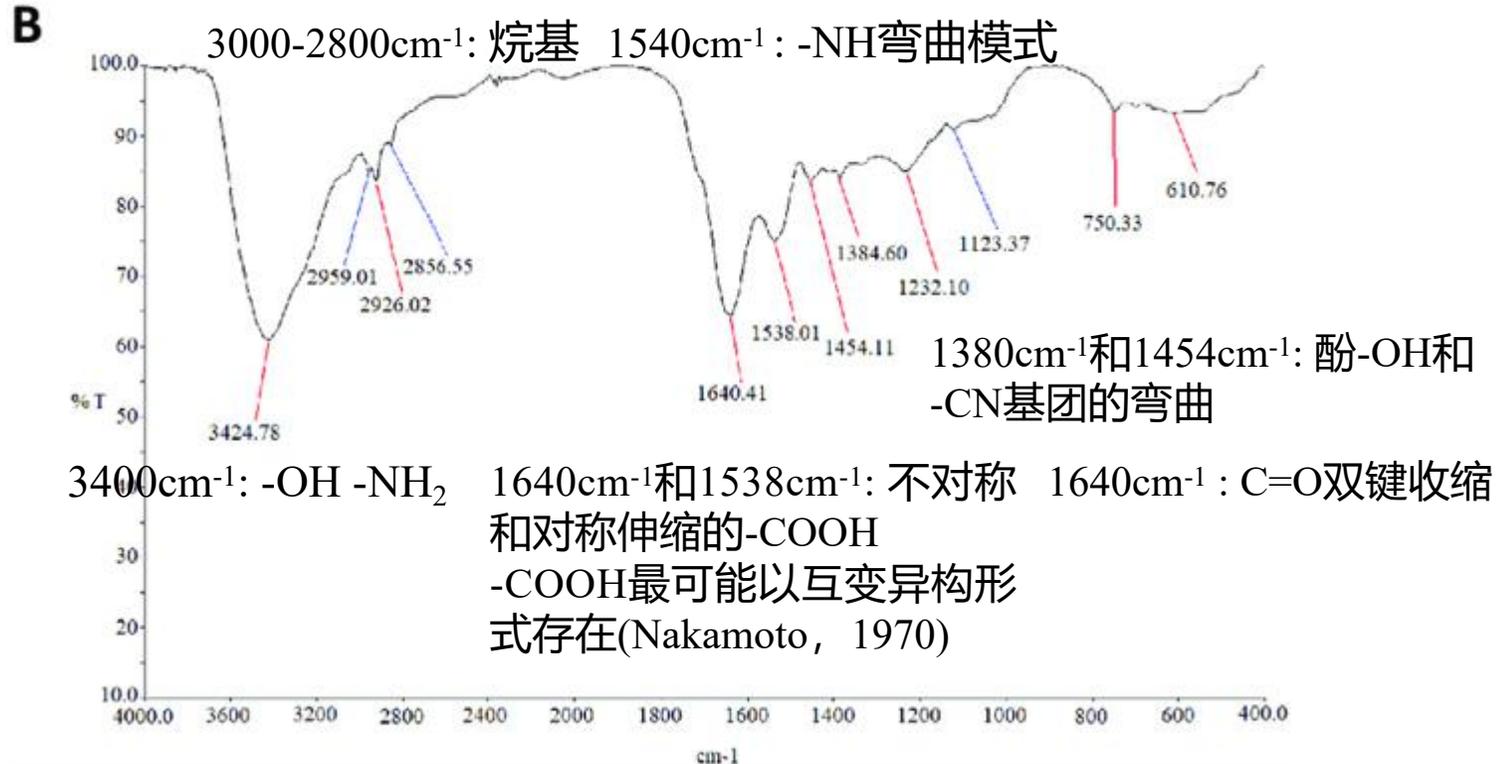
Streptomyces bikiniensis M8合成的黑色素在230nm处表现出最大的紫外吸收值(Deepthi and Rosamma, 2014);

Phyllosticta capitalensis 和淡青链霉菌菌株NEAE-H的纯化黑色素的最大吸收值为250nm(Suryanarayanan et al., 2004) (El-Naggar and El-Ewasy, 2017);

Actinoalloteichus sp. MA-32和*Chroogomphus rutilus* (血红铆钉菇) 的纯化黑色素分别在300nm和212nm处有最大吸收值(Manivasagan et al., 2013) (Hu et al., 2015)。

Results and discussion

Fourier transform-infrared spectroscopy (FTIR) analysis



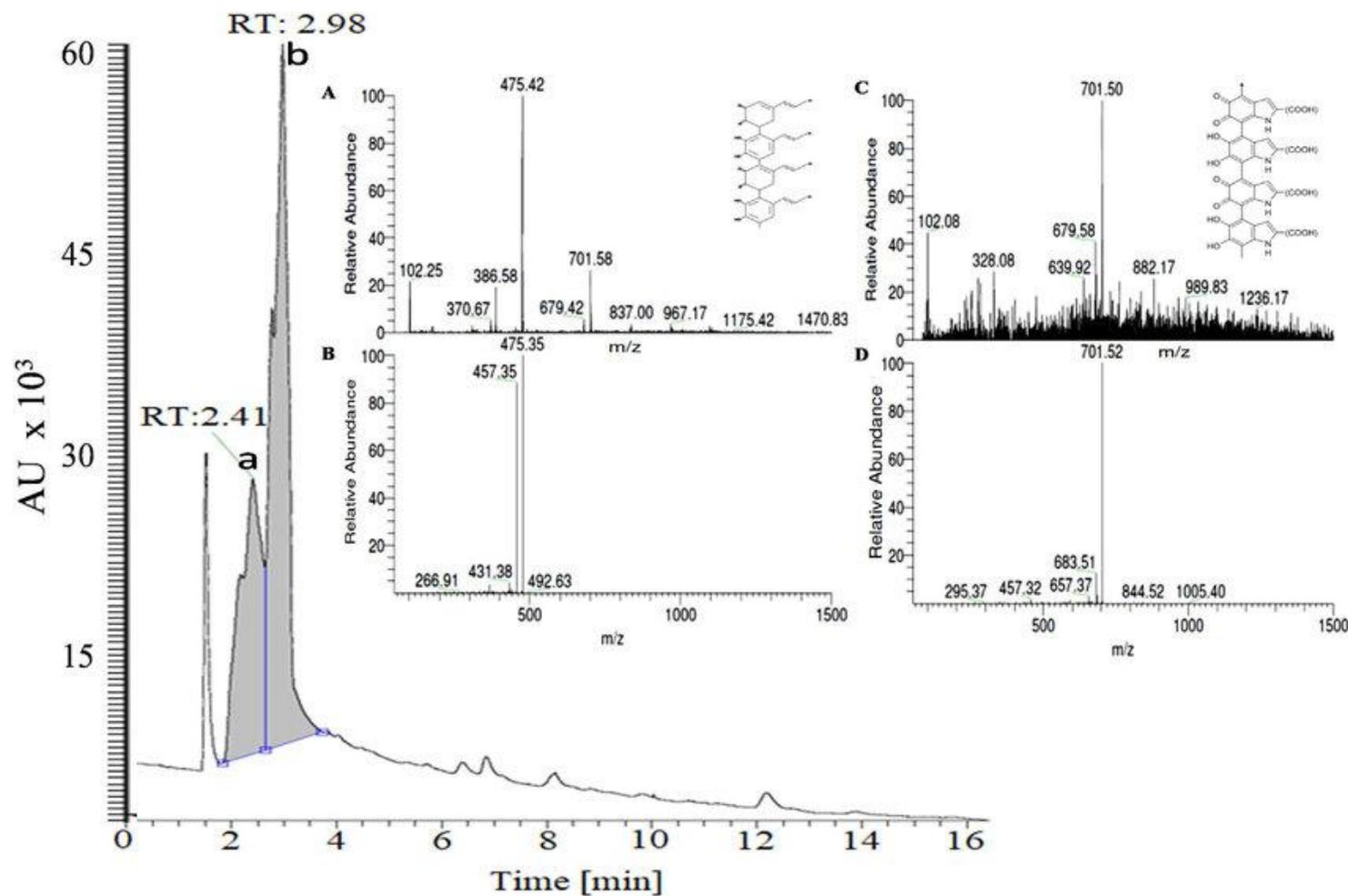
傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 分析

总体而言，从大肠杆菌 (BL21) 中提取的黑色素的 FTIR 图谱的一般模式与先前从各种生物中提取的色素一致。

(Centeno and Shamir, 2008; Hewedy and Ashour, 2009; Magarelli et al., 2010; Sajjan et al., 2010; El-Naggar and El-Ewasy, 2017; Gustavsson et al., 2016)

Results and discussion

LC-MS/MS analysis



LC-MS/MS: 液相二级质谱, LC 分离, MS检测, 分离分析复杂有机混合物的有效手段。

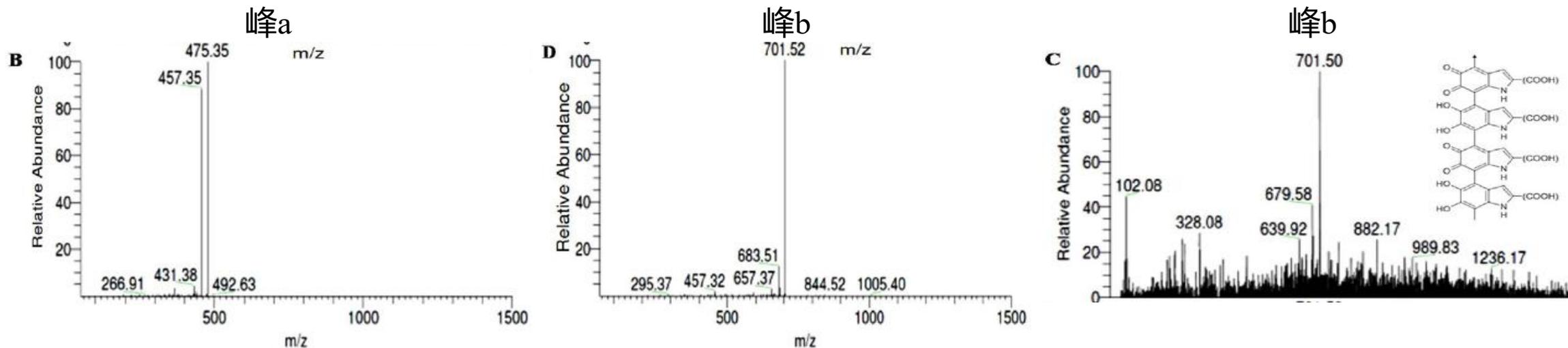
MS/MS: 将经过第一次质谱检测的离子以某种方式碎裂后再进行质谱检测。

纯化黑色素的液相色谱(LC)显示两个主峰, 保留时间为2.41min (峰a) 和2.98min (峰b)。

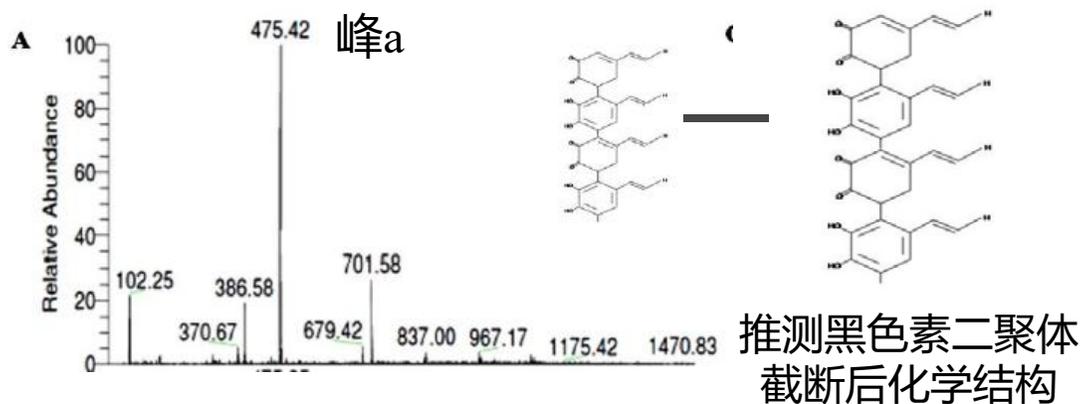
峰a和峰b的m/z值 (质荷比) 分别为475.5和701.5。

Results and discussion

LC-MS/MS analysis



峰b的m/z值比单一的黑素分子的质量大接近一倍。图C所示黑色素以二聚体形式存在的可能性最大。之前也有报道黑色素二聚体的存在。(Stark et al., 2003; Pezzella et al., 2006)

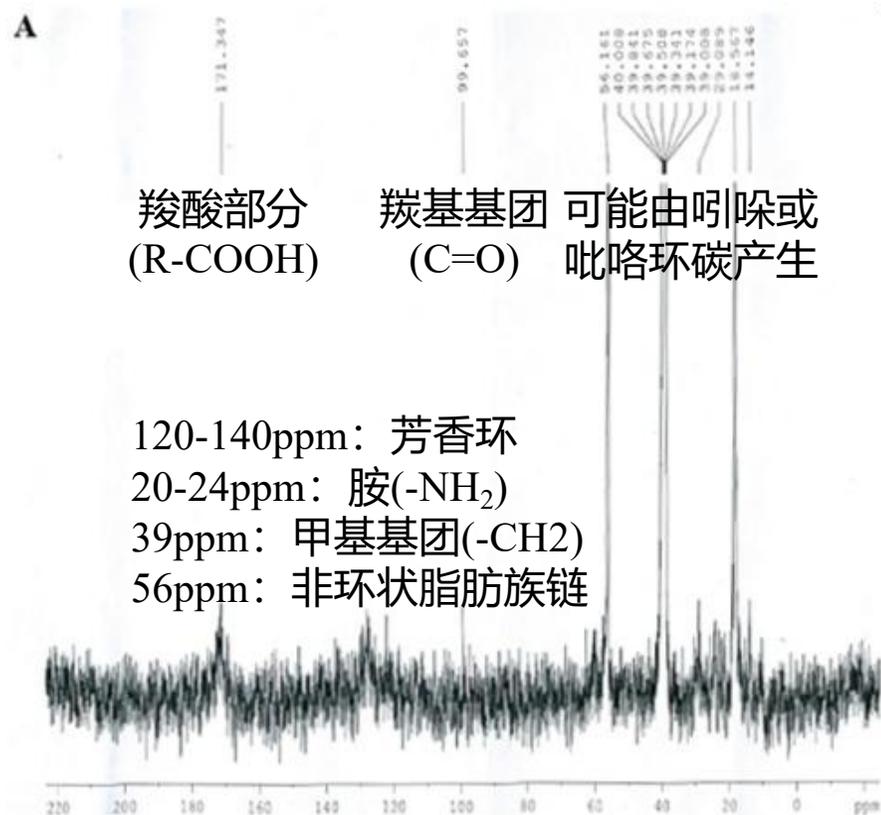


峰a的m/z值475.5可能是由于黑素二聚体的不对称碎裂而引起，丢失四个284Da的NC-COOH基团（每个黑色素分子中2个）。

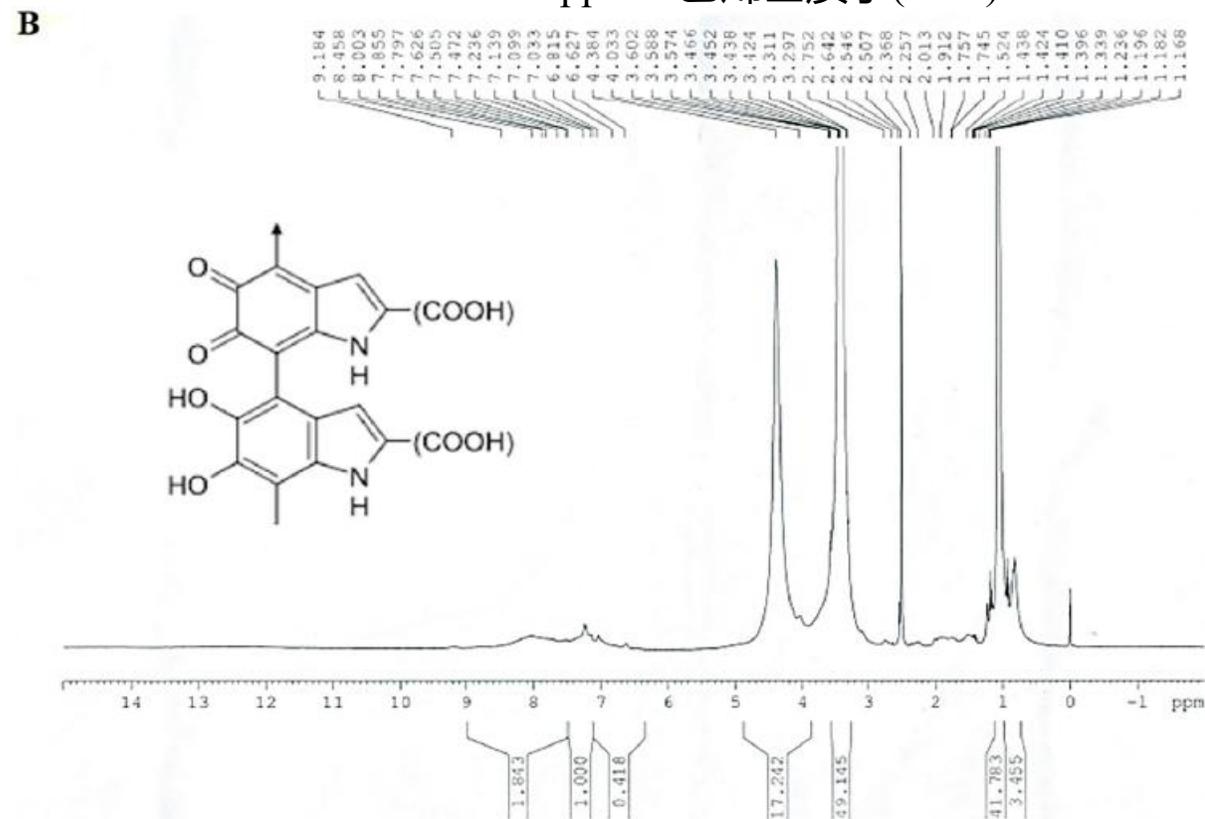
黑色素通常以不同的聚合物形式存在及其化学结构可能在不同的生物中有所不同。(Sun et al., 2016)

Results and discussion

^{13}C and ^1H NMR



纯化的黑色素的 ^{13}C 核磁共振光谱



纯化的黑色素的 ^1H 核磁共振光谱: 确认存在的结构排列

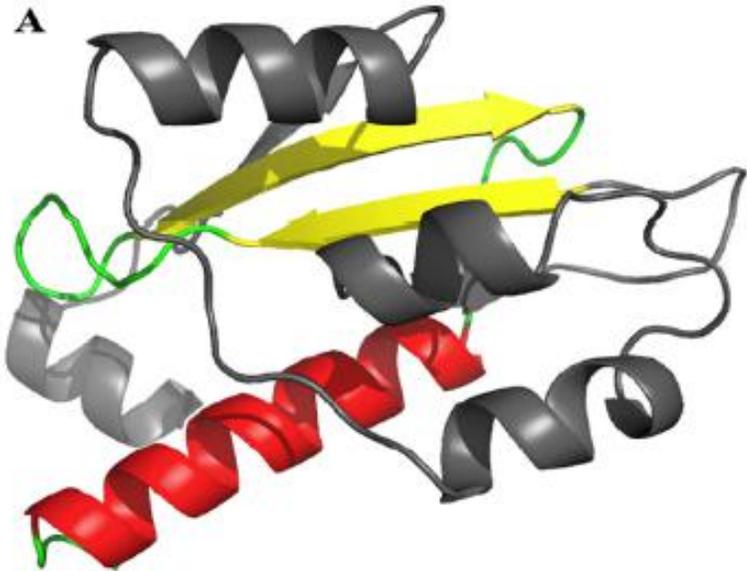
Table 2 ^{13}C 和 ^1H 分析鉴定色素官能团
 ^{13}C and ^1H analysis for the functional group identification of pigment.

Functional groups	Chemical shift (ppm)	
	^{13}C	^1H
—NH	—	9.25
Aromatic proton	130	7.22–7.5
Pyrrole ring	—	1.0
—NH ₂	40–42	9.1
—OH proton	—	3.4
—COOH carboxylic acid	171	—
—CH ₂ or C—O group of molecules	20–24	—
—C=C vinyl proton	—	6.6

预测纯化的黑色素的化学结构，其非常接近黑色素的化学结构。以前的研究也发现了类似的NMR结果。
(Song et al., 2016; Zong et al., 2017)

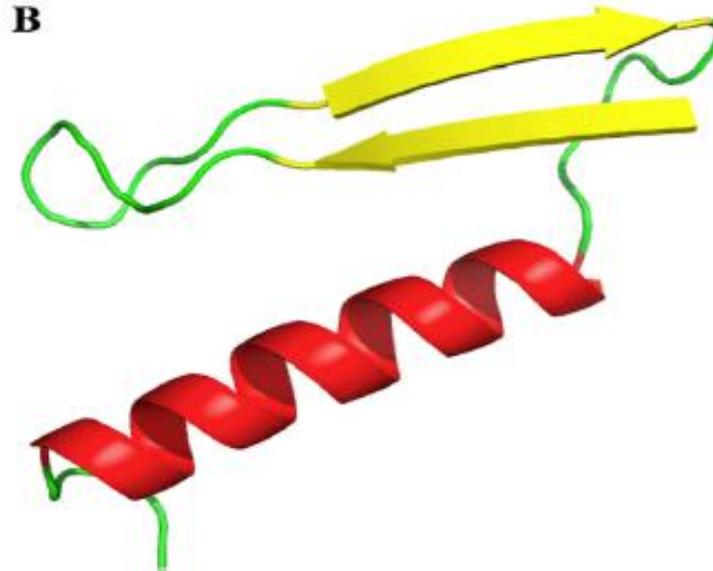
Results and discussion

Structure-modeling and analysis



类芽孢杆菌HPPD由五个螺旋和两个β折叠组成。在HPPD的可用晶体结构中，C末端结构域含活性位点，其中“铁”被向内延伸的氨基酸包围。

The cartoon diagram of predicted 3-D structure of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) of *Paenibacillus* sp. DMB20 (A) and HPPD of present 10 kb insert sub-clone (B). The figure was prepared in PyMOL 1.3.



10kb亚克隆插入物的鸟枪法测序获得参与黑色素生物合成的酶：**4-羟基苯基丙酮酸双加氧酶(HPPD)**的部分基因序列。该序列显示与类芽孢杆菌DMB20 (KKO531)的HPPD部分基因序列具有100%相似性和56%查询覆盖率。

与可能保留活性位点的类芽孢杆菌HPPD相比，当前HPPD的结构仅含有HPPD的C末端结构域。为了证实这一点，使用Predict Protein预测该HPPD的功能，证实其具有HPPD活性即双加氧酶活性。此外，结构和功能预测分析证实10kb插入片段含有HPPD样酶的基因，其可能在黑色素的产生中起积极作用。

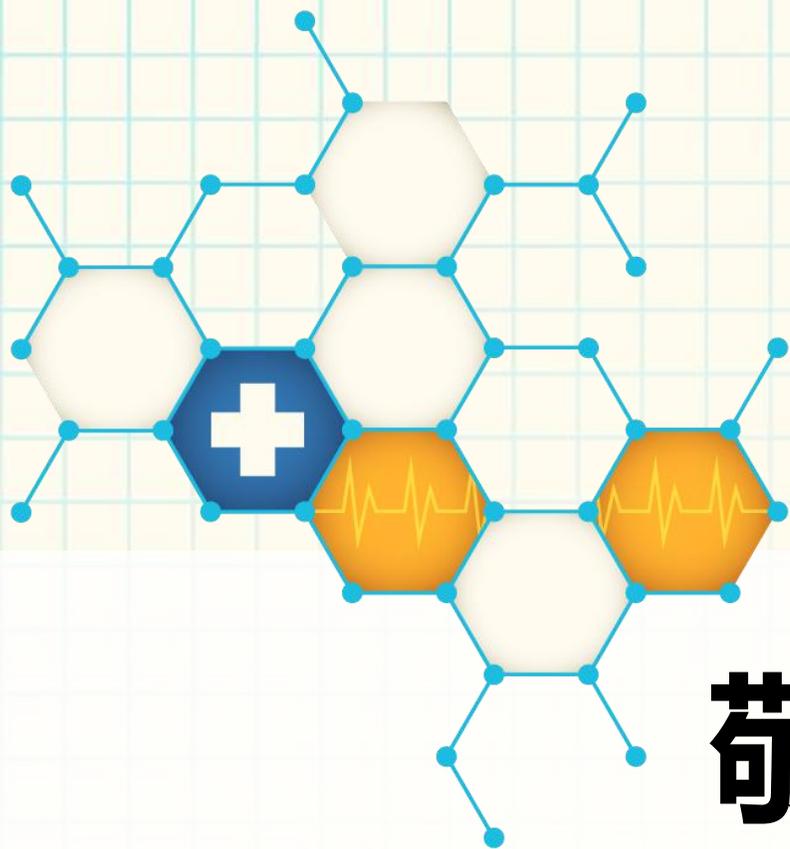


4

Conclusion

Conclusion

1. 黑色素是由几乎所有生物系统产生的最常见的生物聚合物颜料之一，其范围从原核生物和真核生物皆有。
2. 本研究根据研究对象构建了宏基因组fosmid文库。筛选产生褐色黑色素的克隆DM1并进一步亚克隆以鉴定参与黑色素合成的基因。
3. 从重组大肠杆菌(BL21)细胞中提取的纯化黑色素显示典型黑色素的物理化学性质。UV-visible spectroscopy, LC-MS/MS, ^1H -/ ^{13}C NMR, FTIR分析揭示了该色素与黑色素的相似性。
4. 4-羟基苯丙酮酸双加氧酶(HPPD)是由假定参与黑色素生物合成的基因序列推断的。探索了基于序列同源性的HPPD 3D模型。
5. 进行SEM和TEM分析以阐明提取的黑色素的形态，并且显示它是不同大小的小颗粒的聚集体。
6. 不同类型的具有不同性质的黑色素颜料已经由多种生物体报道，但其准确的结构仍不明确，需要广泛的研究来确定其结构和功能特性。
7. 总的来说，构建来自异常和极端环境的微生物宏基因组文库对于鉴定新基因是有价值的。包括黑色素在内的各种天然产物的合成在生物技术应用的工业过程中是非常重要的。



敬请各位老师批评指正!