

杨正久,钱 静,张连英,等. 野油菜黄单胞菌葡萄糖激酶基因的克隆与表达[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):14-18.

野油菜黄单胞菌葡萄糖激酶基因的克隆与表达

杨正久¹, 钱 静¹, 张连英¹, 董红梅¹, 陆光涛²

(1. 遵义医药高等专科学校医学技术系, 贵州遵义 563000; 2. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530005)

摘要:葡萄糖激酶催化葡萄糖磷酸化生成葡萄糖-6-磷酸,是糖酵解的第一步反应,在野油菜黄单胞菌(*Xcc*)利用碳源代谢及其致病性中起重要作用。为了初步鉴定 *Xcc* 葡萄糖激酶基因功能,为研究其利用碳源相关代谢及致病性提供理论依据,以 pQE30 为表达载体,采用常规 PCR 技术对野油菜黄单胞菌 *Xcc*8004 基因组上注释为葡萄糖激酶的 3 个基因(*XC_1166*、*XC_1223* 和 *XC_1976*)进行了克隆与表达,该 3 个基因在大肠杆菌 JM109 中有较高表达量,经 Ni²⁺ 金属层析柱纯化后分别得到带有 3 个 His 的融合蛋白 *XC_1166*-His₆、*XC_1223*-His₆ 和 *XC_1976*-His₆,分析表明仅 *XC_1976* 的表达产物具有葡萄糖激酶活性,为 *Xcc*8004 葡萄糖激酶基因,经测定 *XC_1976*-His₆ 的最适反应温度为 45℃,最适 pH 值为 7.1,最适反应条件下比活力为 (380.6 ± 1.123) U/mg。

关键词:野油菜黄单胞菌;葡萄糖激酶;克隆;表达

中图分类号: Q75 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0014-04

野油菜黄单胞菌致病变种 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xcc*) 是十字花科植物黑腐病的病原菌,它的寄主包括许多重要农作物,如甘蓝、白菜、芥菜、油菜、萝卜和模式植物拟南芥等。野油菜黄单胞菌产生的胞外多糖 (extracellular polysaccharide, EPS) 又称黄原胶,被认为是 *Xcc* 的重要致病因子^[1],又因它具有独特的流变性、良好的水溶性、对热及酸碱的稳定性、与多种盐类有很好的相容性,而广泛应用于轻工、食品、石油、医药等 20 多个行业,具有巨大应用价值^[2]。葡萄糖激酶被认为在 *Xcc* 的胞外多糖 EPS 合成及其致病性中起着重要作用^[3],在 *Xcc* 利用葡萄糖及蔗糖的代谢途径中,催化葡萄糖磷酸成葡萄糖-6-磷酸进入 ED 途径,ED 途径产生 3-磷酸甘油醛和丙酮酸进而进入糖异生途径或三羧酸循环途径^[4]。

*Xcc*8004 为目前已公布完成全基因组序列测定的 3 株 *Xcc* 之一^[5],基因组中有 3 个基因 (*XC_1166*、*XC_1223* 和 *XC_1976*) 被注释为葡萄糖激酶基因,生物信息学分析表明这 3 个基因编码的蛋白均含有葡萄糖激酶结构域。为了初步鉴定这 3 个基因的功能,本研究以 pQE30 为表达载体,采用常规 PCR 对这 3 个基因进行了克隆及诱导表达,并对纯化后的融合蛋白进行酶学特性分析,以期研究 *Xcc* 利用葡萄糖等碳源相关代谢及其致病性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

本研究所用菌株和质粒见表 1。

表 1 菌株和质粒

菌株和质粒	特征	来源
<i>Xcc</i>		
<i>Xcc</i> 8004	野生型, Rif ^r	Daniels, et al
<i>E. coli</i>		
JM109	recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi D(lac ± proAB)1985 F' [traD36 proAB + lacIq lacZDM15]	Yanisch - Perron, et al
JM109/pQE - <i>XC_1166</i>	JM109 containing pQE - <i>XC_1166</i> , Amp ^r	本研究
JM109/pQE - <i>XC_1223</i>	JM109 containing pQE - <i>XC_1223</i> , Amp ^r	本研究
JM109/pQE - <i>XC_1976</i>	JM109 containing pQE - <i>XC_1976</i> , Amp ^r	本研究
Plasmids pQE30	Express plasmid containing six - his purification tag, Amp ^r	Qiagen
pQE - <i>XC_1166</i>	pQE30 containing a 1044 - bp Glucokinase ORF fragment of <i>XC_1166</i> , Amp ^r	本研究
pQE - <i>XC_1223</i>	pQE30 containing a 1026 - bp Glucokinase ORF fragment of <i>XC_1223</i> , Amp ^r	本研究
pQE - <i>XC_1976</i>	pQE30 containing a 1017 - bp Glucokinase ORF fragment of <i>XC_1976</i> , Amp ^r	本研究

收稿日期:2013-01-11

基金项目:国家自然科学基金重点项目(编号:30130010);国家自然科学基金面上项目(编号:30470944)。

作者简介:杨正久(1975—),男,苗族,湖南泸溪人,硕士,讲师,主要从事生物化学的教学和研究, E-mail: yang282@163.com。

通信作者:陆光涛,博士,主要从事微生物多糖的生物合成机理、植物病原菌致病的分子机理。 E-mail: lugt@gxu.edu.cn。

1.2 PCR 引物的设计

以 *Xcc*8004 基因组为模板,根据待扩增 *XC_1166*、*XC_1223* 和 *XC_1976* 基因 DNA 序列,用 Vector NTI 软件设计引物,并插入 *Bam*H I、*Hind* III 的酶切位点序列(表 2)。

1.3 DNA 提取

质粒及 *Xcc*8004 染色体 DNA 的提取参照 Sambrook 等所述方法进行^[6]。

表 2 本研究所用引物

引物名称及引物序列(5'→3')	扩增片段
O1166F(5' - AAGCTTCGACACCTCGGTGTGCTG - 3');O1166R(5' - GGATCCGTGGCTGCAACCTCGCAC - 3')	1032 bp of the <i>XC_1166</i> ORF
O1223F(5' - GGATCCGTGAGCGCAAGCAGCCCA - 3');O1223R(5' - AAGCTTGGCGCCGTGCTGCAGGAA - 3')	1 014 bp of the <i>XC_1223</i> ORF
O1976F(5' - AAGCTTTCGCTGCTCTCCCGCAA - 3');O1976R(5' - GGATCCATGACTGCTCC TTCCAAG - 3')	1 005 bp of the <i>XC_1976</i> ORF

1.4 表达重组子的构建

采用常规 PCR 方法, *Pfu* polymerase 扩增 *XC_1166*、*XC_1223* 和 *XC_1976* 基因全长 ORF, 产物经琼脂糖凝胶电泳验证后与质粒 pQE30 经限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind*Ⅲ作双酶切处理, 再用 *T*₄ 连接酶连接, 构建表达重组子 pQE - *XC_1166*、pQE - *XC_1223*、pQE - *XC_1976*。然后将表达重组子导入宿主大肠杆菌 JM109, 获得重组表达菌株 JM109/pQE - *XC_1166*、JM109/pQE - *XC_1223*、JM109/pQE - *XC_1976*。Amp^r 平板筛选并培养重组表达菌株, 提取表达重组子作 *Bam*H I、*Hind*Ⅲ双酶切验证及 DNA 测序确定插入的片段正确与否。

1.5 目的基因的诱导表达与融合蛋白纯化

分别将重组表达菌株 JM109/pQE - *XC_1166*、JM109/pQE - *XC_1223*、JM109/pQE - *XC_1976* 接种到基本培养基中进行摇瓶培养至吸光度 *D*_{600 nm} 约 1.0 时, 按 5% 的接种量转接到 100 mL 含 Amp 基本培养基 (Amp - LB) 中, 37 ℃、200 r/min 振荡培养 1 ~ 2 h, 至 *D*_{600 nm} ≈ 0.5 时, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 37 ℃、200 r/min 继续诱导培养 4 ~ 5 h 后, 于 4 ℃、4 000 g 下离心 10 min, 收集菌体, 悬浮于 Lysis Buffer 液 (10 mmol/L 咪唑, 300 mmol/L NaCl, 50 mmol/L NaH₂PO₄, pH 值 8.0), 进行超声破碎。取上清液用 Ni²⁺ 金属螯合层析柱纯化带有 6 × His 的融合蛋白, 经含咪唑的洗脱液洗脱融合蛋白, 4 ℃、3 700 r/min 超滤去除对酶有抑制作用的高浓度咪唑及小分子杂蛋白, 得到 3 个重组蛋白 XC_1166 - His₆、XC_1223 - His₆ 和 XC_1976 - His₆, SDS - PAGE 电泳检测纯化后的融合蛋白。

1.6 葡萄糖激酶活性的分析

分别用 XC_1166 - His₆、XC_1223 - His₆、XC_1976 - His₆ 催化葡萄糖磷酸化反应, 以 Mg²⁺ 为激活剂, 反应体系为 50 mmol/L Tris - HCl (pH 值 7.4)、50 mmol/L 葡萄糖、7.5 mmol/L MgCl₂、50 mmol/L ATP, 37 ℃反应 1 h。选用涂布有硅胶 G60 的玻璃板 (GF254 硅胶板, 青岛海洋化工厂) 作为载体, 105 ℃活化后, 直接取 8 μL 反应液, 等距点在硅胶板下端距底边 1.5 cm 处的平行线上, 自然干燥后, 用喷雾器将显色剂 (含 5% 浓硫酸的甲醇) 均匀喷在薄层板上, 于 150 ℃的烘箱中显色 8 min 左右, 至颜色显现即可。

1.7 葡萄糖激酶比活力的测定方法

采用 6 - 磷酸葡萄糖脱氢酶偶联比色法测定葡萄糖激酶的比活力。反应体系总体积 2 mL, 组成为: 100 mmol/L 葡萄糖、0.5 mmol/L NADP、7.5 mmol/L MgCl₂、5 mmol/L β - 巯基乙醇和 0.5 U 6 - 磷酸葡萄糖脱氢酶。首先用分光光度计 (Beckman DU 700) 测定并绘制 NADPH 在 340 nm 的标准吸光曲线, 然后取 0.2 g/L 的纯化蛋白液 5 μL 催化反应体系, 分别测定反应体系含 ATP 浓度为 10 mmol/L 和不含 ATP 时的吸光度 *D*_{340 nm} 之差 (Δ*D*_{340 nm}), 根据标准吸光曲线计算 NADPH 生成量。1 个酶活力 (U) 定义为: 每 min 催化产生 1 μmol/L NADPH 所需的酶量。

1.8 XC_1976 - His₆ 最适反应条件测定

最适 pH 值: 在 37 ℃条件下测定 pH 值分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 条件下的 XC_1976 - His₆ 的葡萄糖激酶比活力, 以测得的最高比活力为 100%, 换算各 pH 值条件下的相对酶活力。最适温度: 在已测得的最适 pH 值条件下, 以葡萄糖为底物, 分别测定 22、25、32、37、42、45、48、52 ℃ 温度下 XC_1976 - His₆ 的比活力, 以测得的最高比活力为 100%, 换算各温度条件下的相对酶活力。

2 结果与分析

2.1 演绎蛋白的生物信息学分析

XC_1166、*XC_1223* 和 *XC_1976* 基因演绎的蛋白质分别含 344、338、335 个氨基酸残基数, 分子量分别为 36.02、35.52、35.61 ku。使用 Vector NTI 9.0 对其氨基酸序列与 *Salmonella* 及 *E. coli* 葡萄糖激酶蛋白序列作多序列比对, 表明 3 种演绎蛋白 XC_1166、XC_1223 和 XC_1976 仅含 24% 的相同残基, 且只有 XC_1976 与 *Salmonella*、*E. coli* 葡萄糖激酶蛋白序列同源性最高, 分别达 54%、38.4%。用 SMART 服务器分析演绎蛋白的结构域, 结果表明均具有葡萄糖激酶结构域。

2.2 表达重组子的构建

琼脂糖凝胶电泳图谱显示 *XC_1166*、*XC_1223* 和 *XC_1976* 基因全长 ORF 扩增片段与预期大小相符合 (图 1 - A), 为 1 030 bp 左右。将 PCR 扩增片段与 pQE30 分别经 *Bam*H I、*Hind*Ⅲ作双酶切后, 再经 *T*₄ 连接酶连接, 得到表达重组子 pQE - *XC_1166*、pQE - *XC_1223*、pQE - *XC_1976*, 并转化至大肠杆菌 JM109 中, 得到重组表达菌株 JM109/pQE - *XC_1166*、JM109/pQE - *XC_1223*、JM109/pQE - *XC_1976*, 从重组表达菌株中提取表达重组子 pQE - *XC_1166*、pQE - *XC_1223*、pQE - *XC_1976*, 经 *Bam*H I、*Hind*Ⅲ双切酶及 DNA 测序分析, 表明已构建成功 (图 1 - B)。

2.3 目的基因的诱导表达与融合蛋白纯化

将重组表达菌株 JM109/pQE - *XC_1166*、JM109/pQE - *XC_1223*、JM109/pQE - *XC_1976* 接种至大肠杆菌基本培养基中, 培养至 *D*_{600 nm} 约 1.0 时, 再按 5% 的接种量接种到 Amp - LB 培养基中, 培养 1 ~ 2 h, 加入 IPTG 继续诱导培养 4 ~ 5 h 后, 分别取 1 mL 菌液的菌体用超声波破碎菌体, 进行 SDS - PAGE 检测, 结果表明目基因在大肠杆菌 JM109 中有较高的表达量 (图 2 的 3 至 5 泳道)。离心收集诱导表达后的菌体, 超声波破碎细胞后离心去除细胞碎片, 用 QIAGEN 公司的 Ni - NTA 金属螯合层析凝胶吸附蛋白, 纯化得到的 3 个带 6 × His 标志的融合蛋白 XC_1166 - His₆、XC_1223 - His₆ 和 XC_1976 - His₆, 且未发现包涵体及沉淀的形成, SDS - PAGE 检测 (图 2 的 6 至 8 泳道) 结果显示融合蛋白的纯度较高, 蛋白大小与预期相符合。

2.4 纯化蛋白葡萄糖激酶催化活性

分别用融合蛋白 XC_1166 - His₆、XC_1223 - His₆ 和

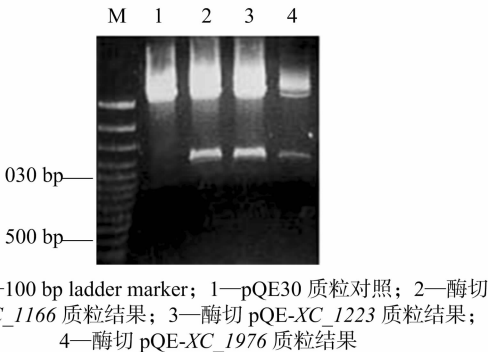
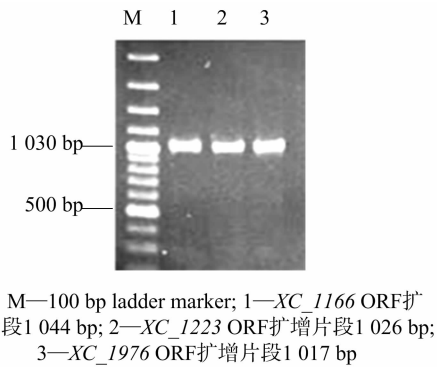


图1 葡萄糖激酶基因全长ORF片段PCR扩增及表达重组子的酶切验证

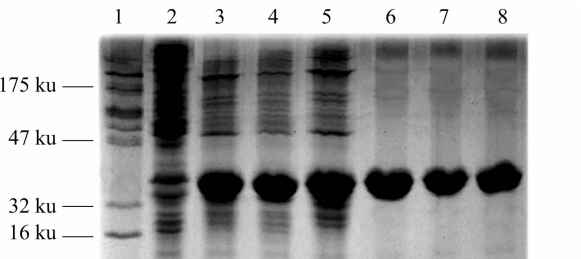


图2 融合蛋白表达与纯化的SDS-PAGE电泳分析

XC_1976 - His₆ 催化葡萄糖磷酸化反应, 在 37 ℃ 条件下反应 1 h, 直接取 8 μL 反应液点样层析 (图 3)。表明在 3 个纯化的融合蛋白中, 仅 XC_1976 - His₆ 能以 Mg²⁺ 为激活剂, ATP 为磷酸基供体, 催化葡萄糖磷酸化反应, 具有葡萄糖激酶活性。而 XC_1166 - His₆ 和 XC_1223 - His₆ 无葡萄糖激酶活性。

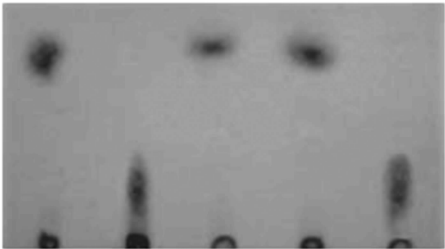


图3 纯化蛋白葡萄糖激酶活性鉴定

2.5 XC_1976 - His₆ 最适反应条件

由图 4 - A 可知, XC_1976 - His₆ 在偏酸或偏碱条件下几

乎没有活性, pH 值 7.1 左右时比活力达到最高值, 之后酶活力迅速下降, 据此判断 XC_1976 - His₆ 的最适 pH 值约为 7.1。在上述最适 pH 值 7.1 条件下, 测定了 22 ~ 52 ℃ 温度范围内的 XC_1976 - His₆ 的葡萄糖激酶活性, 结果 (图 4 - B) 表明, 酶活力随温度的上升逐渐提高, 45 ℃ 时达最大值, 当温度超过 47 ℃ 时, 酶活力均迅速下降, 推断 XC_1976 - His₆ 的最适温度约为 45 ℃。

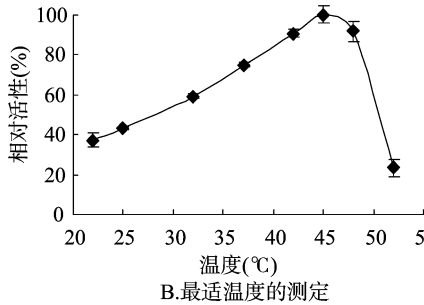
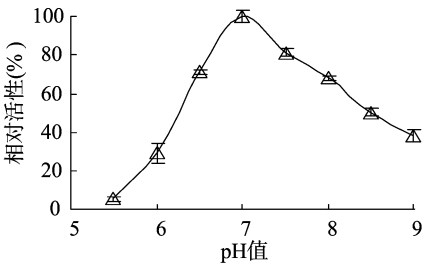


图4 XC_1976-His₆最适pH值和最适温度的测定

2.6 XC_1976 - His₆ 葡萄糖激酶比活力的测定

采用 6 - 磷酸葡萄糖脱氢酶偶联比色法进行测定, 首先测定并绘制 NADPH 在 340 nm 的标准吸光曲线 (图 5)。然后取 0.2 g/L 新纯化的 XC_1976 - His₆ 蛋白液 5 μL, 按“1.7”节的方法测定 ΔD_{340 nm}, 并根据 NADPH 在 340 nm 的标准吸光曲线, 换算每分钟 NADPH 的生成量。结果 (表 3) 表明, XC_1976 - His₆ 在最适条件下的酶活力为 (380.6 ± 1.123) U/mg。

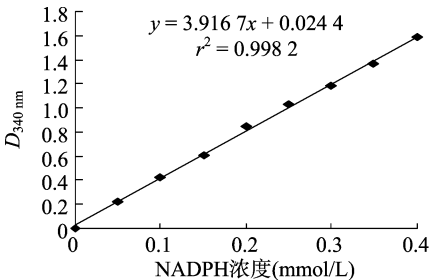


表 3 XC_1976 - His₆ 的比活力

管号	ΔD _{340 nm}	比活力 (U/mg)
1	0.758	380.8
2	0.761	382.5
3	0.754	378.6
均值	0.758 ± 0.002	380.6 ± 1.123

3 讨论

葡萄糖激酶是己糖激酶家族成员之一, 它以 ATP 为磷酸

基供体,催化葡萄糖磷酸化为葡萄糖-6-磷酸,是糖酵解的第一步反应,除少数物种外,大多数细菌及真核生物的葡萄糖激酶具有己糖激酶活性^[7],对底物葡萄糖的亲合力较低。人类葡萄糖激酶为单体调控酶,在肝细胞内促进糖原合成和糖酵解,受葡萄糖调节蛋白(GKRP)调控,葡萄糖对其具有一定的协同效应^[8-9]。在某些原核生物体内发现葡萄糖激酶具有二聚体及四聚体结构^[10-11],且不同物种的葡萄糖激酶生化特性差异较大^[4]。

葡萄糖激酶在对 Xcc 碳源利用代谢及碳流分配调节上起着关键作用,其活性强弱直接关联到黄原胶生成量的多少,进而影响到 Xcc 的致病力^[12-13],虽然 Xcc8004 基因组中 XC_1166、XC_1223 和 XC_1976 等 3 个基因被注释为葡萄糖激酶,其演绎蛋白均含有葡萄糖激酶结构域,但是从它们在基因组上的位置看,XC_1976 位于 ED 途径的 5 个酶基因组成的基因簇中^[14],且生物学信息学分析结果表明这 3 个基因演绎蛋白的同源性较小,与 *Salmonella* 及 *E. coli* 葡萄糖激酶蛋白序列比对结果也表明,仅 XC_1976 演绎蛋白与其葡萄糖激酶的同源性最高。为了鉴定其基因功能,了解其编码蛋白产物的特征,本研究采用常规 PCR 技术,成功地对野油菜黄单胞菌 Xcc8004 基因组上注释为葡萄糖激酶的 3 个基因进行了克隆表达,并对表达产物进行了纯化与初步分析。结果表明以 IPTG 为诱导物,XC_1166、XC_1223 和 XC_1976 基因在大肠杆菌 JM109 细胞内有较高的表达量,经 Ni^{2+} 金属螯合层析柱纯化后得到 3 个带 6 个组氨酸标志的融合蛋白 XC_1166-His₆、XC_1223-His₆ 和 XC_1976-His₆,且这 3 种融合蛋白未形成包涵体或沉淀。葡萄糖激酶活性分析显示,在这 3 个融合蛋白中仅 XC_1976-His₆ 具有催化葡萄糖磷酸化激酶活性,能以 Mg^{2+} 为激活剂,ATP 为磷酸基供体,催化葡萄糖磷酸化为葡萄糖-6-磷酸(图 5)。结合生物学信息学分析结果,初步认为 Xcc8004 基因组中注释为葡萄糖激酶的 3 个基因中,仅 XC_1976 为葡萄糖激酶基因,而 XC_1166 和 XC_1223 的基因功能有待进一步鉴定。

本研究采用 6-磷酸葡萄糖脱氢酶偶联比色法对 XC_1976-His₆ 的葡萄糖激酶活性进行测定,该方法已被国际上许多研究者用来测定葡萄糖激酶及己糖激酶活性^[15-17]。测定结果显示 XC_1976-His₆ 的最适反应温度为 45 ℃,最适反应 pH 值为 7.1,高于 *Bacillus subtilis* 葡萄糖激酶最适反应温度 32 ℃,与 Imriskova 等研究^[15]的 *Streptomyces peucetius* var. *caesius* 葡萄糖激酶最适反应温度 42 ℃和最适反应 pH 值 7.5 较接近,而 Liao 等研究^[18]的 *Thermobifida fusca* YX 葡萄糖激酶最适反应温度 55 ℃及最适 pH 值 9.0,与 XC_1976-His₆ 的最适反应温度及最适 pH 值相差较大,这可能与微生物的生存环境有关。在最适反应条件下,测得 XC_1976-His₆ 葡萄糖激酶的比活力为 $(380.6 \pm 1.123) \text{ U/mg}$,而其他酶学特征尚需进一步研究。

参考文献:

[1] Chatterjee A K, Vidaver A K. Genetics of pathogenicity factors: application to phytopathogenic bacteria[M]//Ingram D S, Williams P H. Advances in plant pathology[M]. London: Academic Press, 1985:1-224.

[2] Becker A, Katzen F, Pühler A, et al. Xanthan gum biosynthesis and application: A biochemical/genetic perspective[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, 50(2):145-152.

[3] Volksch B, Weingart H. Toxin production by pathovars of *Pseudomonas syringae* and their antagonistic activities against epiphytic microorganism[J]. Basic Microbiol, 1998, 38:135-145.

[4] Zagallo A C, Wang C H. Comparative glucose catabolism of *Xanthomonas species*[J]. Bacteriol, 1967, 93:970-975.

[5] 姚秋阳, 杨玉芹, 崔柳苏, 等. 野油菜黄单胞菌 6-磷酸果糖激酶基因的初步分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(6):1047-1054.

[6] Sambrook J, Fritsche D, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989:49-55.

[7] Bork P, Sander C, Valencia A. The purification and characterization of glucokinase from the thermophile *Bacillus stearothermophilus*[J]. Biochem, 1993, 237:415-420.

[8] Inedjian P B. Molecular physiology of mammalian glucokinase[J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66(1):27-42.

[9] Magnuson M A, Matschinsky F M. Glucokinase as a glucose sensor: past, present, and future[M]//Matschinsky F M, Magnuson M A. Glucokinase and glycemic disease: From basics to novel therapeutics. Basel: S Karger AG Switzerland, 2004:31-41.

[10] Pimentel-Schmitt E F, Thomae A W, Amon J, et al. A glucose kinase from *Mycobacterium smegmatis*[J]. Microbiol Biotechnol, 2007, 12(1/2):75-81.

[11] Imriskova I, Arreguín-Espinosa R, Guzmán S, et al. Biochemical characterization of the glucose kinase from *Streptomyces coelicolor* compared to *Streptomyces peucetius* var. *caesius*[J]. Res Microbiol, 2005, 156(3):361-366.

[12] Yun M H, Torres P S, Eloirdi M, et al. Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition[J]. Plant Physiol, 2006, 141:178-187.

[13] Bertero M G, Bessieres P, Bolotin A, et al. The complete genome sequence of the grampositive bacterium *Bacillus subtilis*[J]. Nature, 1997, 390:249-256.

[14] Katzen F, Ferreira D U, Oddo C G, et al. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: Effects on xanthan biosynthesis and plant virulence[J]. Bacteriology, 1998, 180(7):1607-1617.

[15] Imriskova E, Langley R, Arreguín-Espinosa G, et al. Rapid purification and biochemical characterization of glucose kinase from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2001, 394:137-144.

[16] Goward C R, Hartwell R, Atkinson T, et al. The purification and characterization of glucokinase from the thermophile *Bacillus stearothermophilus*[J]. Biochem, 1986, 237(2):415-420.

[17] Helga K, Stephan O, Boris S. Differences in substrate specificity and kinetic properties of the recombinant hexokinases HXK1 and HXK2 from *Entamoeba histolytica*[J]. Molecular and Biochemical Parasitology, 1999, 105:71-80.

[18] Liao H, Myung S, Zhang Y H. One-step purification and immobilization of thermophilic polyphosphate glucokinase from *Thermobifida fusca* YX: glucose-6-phosphate generation without ATP[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 93(3):1109-1117.

汪牧西,刘朝莹,宁德刚. 集胞藻 PCC6803 染色体上抗毒素-毒素基因 *ssl2749-sll1411* 的转录调控[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):18-20.

集胞藻 PCC6803 染色体上抗毒素-毒素基因 *ssl2749-sll1411* 的转录调控

汪牧西, 刘朝莹, 宁德刚
(江苏大学环境与安全工程学院, 江苏镇江 212013)

摘要:细菌染色体上的 *mnt/hepn* 操纵子构成毒素-抗毒素系统(TA, toxin-antitoxin system)新家族,但该家族成员的生化及遗传特征有待阐明。为了证明集胞藻 PCC6803 染色体上基因 *ssl2749/sll1411* 的转录调控作用,以无启动子的 β -半乳糖苷酶基因(*lacZ*)为报告基因,构建了 *lacZ* 转录融合重组质粒,通过测定含重组质粒的大肠杆菌细胞的 β -半乳糖苷酶活性,确定 *ssl2749/sll1411* 编码产物对其启动子活性的调控作用。结果表明,蛋白 Ssl2749 使 β -半乳糖苷酶活性显著增加,提示 Ssl2749 可激活 P_{Ta} 启动子转录活性,蛋白 Sll1411 抑制 Ssl2749 的转录激活作用。因此, Ssl2749 可能与 P_{Ta} 中的调控序列结合调控 *ssl2749/sll1411* 操纵子的转录, Sll1411 对 Ssl2749 转录激活活性的抑制作用提示二者之间存在相互作用。

关键词:集胞藻;染色体;*ssl2749-sll1411* 基因;转录调控
中图分类号: Q75 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0018-03

细菌毒素-抗毒素(toxin-antitoxin, TA)系统由位于同一操纵子中分别编码毒素蛋白和抗毒素的 2 个基因构成。染色体上的 TA 系统通过调控细胞的生长使细胞适应环境胁迫^[1-2]。已鉴定的 TA 系统毒素蛋白通过作用于重要的细胞结构,调控细胞生长^[3]。抗毒素为不稳定的蛋白,与毒素蛋白形成复合体抑制其毒性作用;抗毒素或毒素-抗毒素复合体反馈调控 TA 系统表达^[4-5]。根据编码产物的序列相似性,将已证明的 II 型 TA 系统分为 *relBE*、*mazEF*、*vapBC* 等 8 个家族^[5];但近来生物信息分析发现了更多的 TA 系统家族^[6-7],如 *mnt/hepn*。*mnt/hepn* 家族 TA 系统由分别编码含核苷酸转移酶结构域蛋白(Mnt)和核酸结合蛋白结构域蛋白(Hepn)的 2 个基因构成^[6]。对流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenza*)染色体上的 *mnt/hepn* 家族 TA 系统 HI0073/HI0074 基因编码的 Hepn 蛋白结构分析显示, Hepn 含有 4 个螺旋折叠的核苷转移酶底物结合结构域^[8]。因此,推测该系统编码的毒素蛋白可能作为核酸或蛋白修饰酶作用于 RNA 或蛋白质,抑制细胞生长^[6]。但对该系统编码产物的 DNA 结合能力分析显示, Hepn 和 Mnt 对非特异的 DNA 没有结合能力,推测可能结合于序列特异的 DNA^[8],集胞藻(*Synechocystis*) PCC6803 染色体上的 *ssl2749-sll1411* 操纵子构成 *mnt/hepn* 家族 TA 系统^[6]。本研究以无启动子的大肠杆菌的 β -半乳糖苷酶基因(*lacZ*)为报告基因,证明了 *ssl2749-sll1411* 编码产物对其启动子的反馈调控作用。

1 材料与方法

1.1 供试材料

收稿日期:2012-11-29
基金项目:国家自然科学基金(编号:30771176)。
作者简介:汪牧西,男,湖南湘潭人,硕士研究生,主要从事环境微生物(蓝藻)方面的研究。E-mail:wang_mu_xi@126.com。

1.1.1 试剂和仪器 邻硝基苯 β -D-半乳糖苷(ONPG)、溴化乙锭(EB)、各类抗生素、分子生物学试剂等均购自宝生物(大连)有限公司,引物合成及 DNA 测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。PCR 仪(Eppendorf, Mastertycler 型),分光光度计(722 型),稳流稳压电泳仪(DY-602S 型),气浴恒温振荡器(THZ-82B 型),超级恒温浴槽(HSS-1 数字式)等。

1.1.2 菌株、质粒和培养条件 用于质粒克隆的宿主菌 *Escherichia coli* DH5 α 在 37℃ 下 LB 培养基中培养,含有质粒的大肠杆菌加入相应的抗生素(硫酸卡拉霉工作浓度为 50 μ g/mL,壮观霉素的工作浓度为 100 μ g/mL,双抗时则各自减半),所用质粒均为笔者所在实验室构建并保存。

1.2 试验方法

1.2.1 重组质粒的构建 重组质粒的构建按分子克隆标准方法进行。以 T₄ DNA 聚合酶获得平末端化重组 DNA。以集胞藻 PCC6803 染色体为模板,以特异性引物(表 1)通过 PCR 扩增相应的 DNA 片段。PCR 反应体系按产品说明设定,所用程序依反应对象设置。

表 1 本试验所用引物

引物名称	引物序列(5'→3')
<i>shr0168-1</i>	GATATCGTTCCATCGCCGCCAC
<i>shr0168-2</i>	GATTGGTGGCTAACCAGAGG
<i>ssl2749-1</i>	GAGAGGATCCTTACCCTGGCCGATGCCC(<i>Bam</i> H I)
<i>ssl2749-2</i>	CAGTGCTAACTGGGTAACACC
<i>ssl2749-B</i>	GATGCCATTCCCGATTGGGAG
<i>sll1411-X</i>	CTCGAGTGGAGATAGACAAGGAAAAAGGG(<i>Xho</i> I)
<i>lacZ-R</i>	CTGCGCAACTGTTGGGAAGG

1.2.2 大肠杆菌中 LacZ 活性测定方法 将待测菌株在含相应抗性的 LB 培养基中培养至 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.6,并调 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.3。各取 200 μ L 菌液,离心收集后用 1 mL 的 Z Buffer (60 mmol/L Na₂HPO₄, 40 mmol/L NaH₂PO₄, 10 mmol/L KCl,