

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),超级恒温水槽(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,

1 mmol/L MgSO_4 , 40 mmol/L β -巯基乙醇) 悬浮, 依次加入 50 μL 的 0.1% SDS、50 μL 氯仿和 200 μL 4 mg/mL ONPG, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min 后加入 500 μL 的 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应。反应液于 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清在 420 nm 处测吸光度 $D_{420\text{ nm}}$, 用不含有藻细胞的反应液作为空白对照, 根据公式 $\text{Miller} = 1\,000 \times D_{420\text{ nm}} / (1.5\text{ mL} \times 20\text{ min} \times D_{600\text{ nm}})$ 计算 LacZ 活力。

2 结果与分析

2.1 无启动子的 lacZ 平台质粒 pJS759

以 *slr0168*-1/*slr0168*-2 为引物, 集胞藻 PCC6803 染色体 DNA 为模板, 扩增基因 *slr0168* 部分编码序列片段。扩增产物以 T_4 DNA 聚合酶补平后与 *Pvu* II 酶切 pUC18 质粒的大片段连接, 得到的重组质粒为 pJS378。该质粒中 *slr0168* 片段含 *Eco* R I 位点。以 *Dra* I 酶切 pRL57^[9], 回收含有壮观霉素 (Sp^r)/链霉素 (Sm^r) 抗性基因的 Ω 片段, 将此片段插入 pHB1117^[10] *Sal* I 酶切补平后的位点, 得到的质粒命名为 pJS759a。Xba I /Pst I 酶切 pJS759a 后回收 Ω -*lacZ* 片段, 克隆于 pJS378 *Eco* R I 酶切补平后的位点, 得到的重组质粒命名为 pJS759 (图 1)。该重组质粒中, 含有 PCC6803 染色体 *slr0168* 整合片段 (约 1.0 kb)、大肠杆菌复制起始位点 *OriV*、含壮观霉素/链霉素抗性基因的 Ω 片段、 Ω 片段两侧段的茎环结构 (用以终止该质粒上可能存在的背景转录) 以及下游的无启动子的报告基因 *lacZ* (图 1)。

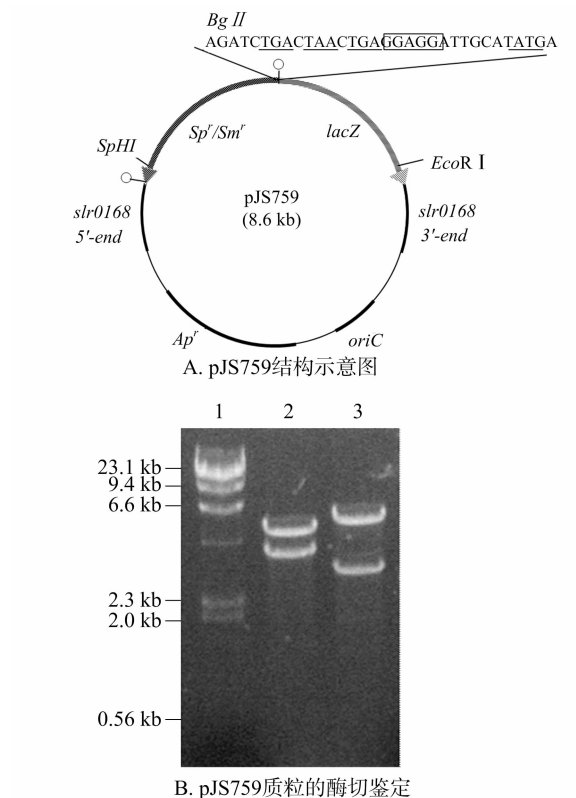
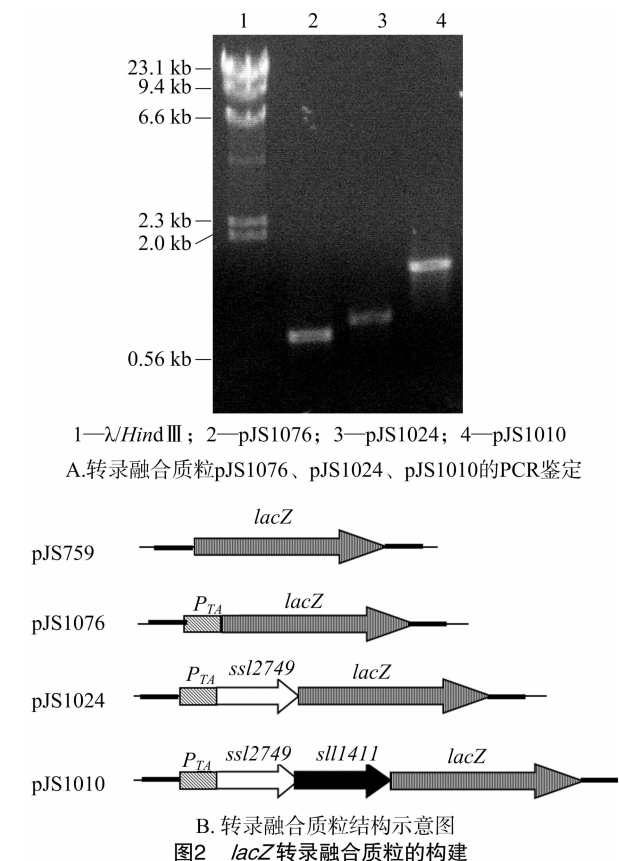


图1 含无启动子报告基因 *lacZ* 平台质粒 pJS759 的构建

2.2 ssl2749-sll1411 转录调控重组质粒的构建

以 *ssl2749*-1 和 *sll1411*-X 为引物, PCR 扩增含启动子

PTA 以及 *ssl2749*-*sll1411* 编码序列的片段, 正向克隆于 pMD-18T 中, 得到的重组质粒为 pJS988。以 *Hind* III/*Eco* R I 酶切 pJS988, 回收片段补平后插入 pJS759 *Bgl* II 位点, 以 *ssl2749*-1 和 *lacZ*-R 为引物 PCR 鉴定 *P_{TA}* 插入方向与 *lacZ* 方向相同的重组质粒, 重组质粒命名为 pJS1010。该重组质粒中导入便于克隆的酶切位点。以 *ssl2749*-1 和 *ssl2749*-2 为引物, PCR 扩增启动子 *P_{TA}* 片段, 以 *ssl2749*-1 和 *ssl2749*-B 为引物, PCR 扩增含 *P_{TA}* 与 *ssl2749* 编码序列的片段。扩增产物分别正向克隆于 pMD-18T, 得到重组质粒 pJS1055 和 pJS1005。以 *Pst* I /*Kpn* I 酶切 pJS1055 和 pJS1005, 回收片段克隆于 pJS1010 相应位点, PCR 鉴定后的重组质粒分别命名为 pJS1076 和 pJS1024 (图 2-A)。重组质粒 pJS1076、pJS1024 和 pJS1010 分别含 *P_{TA}*-*lacZ*、*P_{TA}*-*ssl2749*-*lacZ* 和 *P_{TA}*-*ssl2749*-*sll1411*-*lacZ* 的转录融合片段 (图 2-B)。因此, 在细菌细胞中, *P_{TA}* 启动子控制 *TA* 系统基因及报告基因 *lacZ* 的表达。



2.3 启动子 PTA 在大肠杆菌细胞中活性的转录调控分析

由于大肠杆菌基因组中未发现编码 *Mnt*/*Hepn* 的基因, 并且 *E. coli* DH5 α 中 *lacZ* 基因失活, 因此, 以大肠杆菌为宿主细胞分析 *mnt*/*hepn* 家族 *TA* 系统的转录调控, 可排除同源基因的干扰。含转录融合质粒 pJS1076、pJS1024、pJS1010 的重组菌株分别命名为 *E. coli* DH5 α (pJS1076)、*E. coli* DH5 α (pJS1024) 和 *E. coli* DH5 α (pJS1010)。以含空载体的重组质粒 pJS759 的菌株 *E. coli* DH5 α (pJS765) 作为对照, 测定各重组菌株细胞的 β -半乳糖苷酶活性, 结果如图 3 所示。从图 3 看出, 菌株 *E. coli* DH5 α (pJS1076) β -半乳糖苷酶活性显著

高于对照菌株 ($P < 0.05$), 表明启动子 P_{TA} 具有转录活性。 *E. coli* DH5 α (pJS1024) 的 β -半乳糖苷酶活性显著高于 *E. coli* DH5 α (pJS1076) ($P < 0.05$), 表明 Ssl2749 对 P_{TA} 启动子具有转录激活作用。菌株 *E. coli* DH5 α (pJS1010) 的 β -半乳糖苷酶活性略高于对照菌株 *E. coli* DH5 α (pJS1076) ($P < 0.05$), 但显著低于 *E. coli* DH5 α (pJS1024) ($P < 0.05$), 表明 *sll1411* 减弱了 *ssl2749* 编码产物对启动子 P_{TA} 的转录激活作用, 因此, Ssl2749 可能与 P_{TA} 中尚待证明的调控序列结合, 正调控 *ssl2749/sll1411* 操纵子的转录, 而 Sll1411 具有抑制 Ssl2749 的转录激活作用。

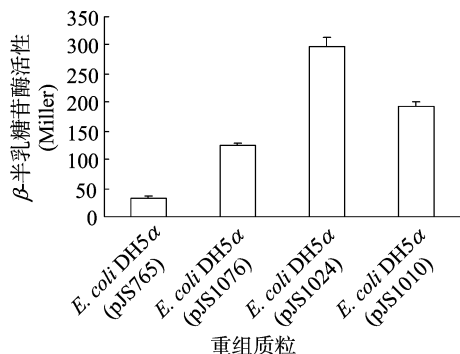


图3 含转录融合重组质粒的大肠杆菌细胞 β -半乳糖苷酶活性

3 讨论

mnt/hepn 是根据 TA 系统保守的遗传结构及其编码产物序列, 通过生物学信息学鉴定的一个新的 TA 系统家族^[6]。此前对 *H. influenza* 中 *mnt/hepn* TA 系统家族成员 *HI0073/HI0074* 的研究结果表明, 其编码产物尽管分别含有核苷转移酶 DNA 结合结构域和底物结合结构域^[8], 但通过凝胶阻滞试验和滤膜结合试验表明, *HI0073/HI0074* 编码产物都不能与非特异的 DNA 结合^[8]。本研究利用报告基因在大肠杆菌细胞中分析集胞藻染色体上的公认的 *mnt/hepn* TA 系统 *ssl2749/sll1411* 的转录调控, 证明 Ssl2749 蛋白对该操纵子的转录调控具有激活作用, 提示 Ssl2749 可直接或间接结合于 P_{TA} 中尚待证明的特异性调控序列。

在已鉴定的 TA 系统中, 抗毒素蛋白通常与启动子 DNA 序列结合, 反馈抑制操纵子的转录, 并且毒素蛋白可加强这种反馈抑制作用。*ssl2749/sll1411* 与典型的 TA 系统转录调控不同, 但与结核分枝杆菌染色体上的 TA 系统 *relBE* 和 *relFG* 的转录调控模式相似: 抗毒素蛋白分别对各自的操纵子具有正调控作用, 相应的毒素蛋白对抗毒素蛋白的转录激活活性具有抑制作用^[11]。这些结果表明, 不同家族的 TA 系统, 甚至同一家族中不同成员的转录调控模式不同。TA 系统转录调控模式的差异可能与 TA 在细胞中的生理功能差异有关。

TA 系统编码的毒素蛋白和抗毒素蛋白在细胞内相互作用形成复合体, 并抑制毒素蛋白的毒性作用^[5]。已证明 *H. influenza* 中 *mnt/hepn* TA 系统 *HI0073/HI0074* 编码产物之间能相互作用形成复合体^[8]。本研究中 Sll1411 与 Ssl2749 同时表达时, Ssl2749 对 P_{TA} 启动子的转录激活作用起到一定程度的抑制作用, 提示 Sll1411 与 Ssl2749 之间可能存在相互作用。笔者所在实验室最近的研究结果显示, 在大肠杆菌中诱导 Sll1411 过量表达时可抑制细胞生长; 在相同的表达系统中诱导 Sll1411 和 Ssl2749 共表达时, 细胞可正常生长 (结果待发表)。这些结果提示 *mnt/hepn* 基因构成真正的 TA 系统。

参考文献:

- [1] Bota D A, Ngo J K, Davies K J. Downregulation of the human lon protease impairs mitochondrial structure and function and causes cell death[J]. *Free Radic Biol Med*, 2005, 38: 665 - 77.
- [2] Yamaguchi Y, Inouye M. Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin - antitoxin systems[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9: 779 - 790.
- [3] Yamaguchi Y, Park J H, Inouye M. Toxin - antitoxin systems in bacteria and archaea[J]. *Annu Rev Genet*, 2011, 45: 61 - 79.
- [4] Buts L, Lah J, Dao - Thi M H, et al. Toxin - antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers[J]. *Trends Biochem Sci*, 2005, 30: 672 - 679.
- [5] Gerdes K, Christensen S K, Løbner - Olesen A. Prokaryotic toxin - antitoxin stress response loci[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3: 371 - 382.
- [6] Makarova K S, Wolf Y I, Koonin E V. Comprehensive comparative - genomic analysis of type 2 toxin - antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes[J]. *Biol Direct*, 2009, 4: 19.
- [7] Shao Y, Harrison E M, Bi D, et al. TADB: a web - based resource for type 2 toxin - antitoxin loci in bacteria and archaea[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: D606 - D611.
- [8] Lehmann C, Lim K, Chalamasetty V R, et al. The HI0073/HI0074 protein pair from *Haemophilus influenzae* is a member of a new nucleotidyltransferase family: structure, sequence analyses, and solution studies[J]. *Proteins*, 2003, 50: 249 - 60.
- [9] Prentki P, Krish H M. *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment[J]. *Gene*, 1984, 29: 303 - 313.
- [10] Gao H, Xu X. Construction of copper induced gene expression platform in *Synechocystis* sp. PCC6803[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31: 240 - 244.
- [11] Korch S B, Contreras H, Clark - Curtiss J E. Three *Mycobacterium tuberculosis* Rel toxin - antitoxin modules inhibit mycobacterial growth and are expressed in infected human macrophages[J]. *J Bacteriol*, 2009, 191: 1618 - 1630.