

孙亮华,刘帅兵,赵卫飞. 集胞藻 PCC6803 染色体上 *relNEs* (*ssr1114/slr0664*) TA 系统的反馈调控作用[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):40-42.

集胞藻 PCC6803 染色体上 *relNEs* (*ssr1114/slr0664*) TA 系统的反馈调控作用

孙亮华, 刘帅兵, 赵卫飞
(江苏大学环境与安全工程学院, 江苏镇江 212013)

摘要:细菌染色体上的毒素-抗毒素(toxin-antitoxin,TA)系统通过转录水平和转录后水平调控毒素活性,从而控制细胞的生长速度和死亡,使细菌适应各种环境胁迫。为了证明集胞藻 PCC 6803 染色体上 *relNEs* TA 系统的转录调控,构建了以无启动子的 β -半乳糖苷酶(*lacZ*)基因为报告基因的重组质粒,并测定含转录融合重组质粒的大肠杆菌细胞的 β -半乳糖苷酶活性。结果表明,抗毒素 RelN 能显著抑制 *relNEs* 启动子的转录活性,而毒素 RelEs 能部分减弱这种抑制作用,提示 *relNEs* 系统的编码产物对该操纵子具有反馈调控作用。

关键词:集胞藻;染色体;毒素-抗毒素系统;*relNEs*;转录调控;转录融合重组质粒; β -半乳糖苷酶活性
中图分类号: Q756 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0040-03

毒素-抗毒素系统(toxin-antitoxin system,TA)由位于同一操纵子中的抗毒素基因和毒素基因构成,二者共同表达^[1]。其中抗毒素基因编码不稳定的抗毒素蛋白,毒素基因编码稳定的毒素蛋白;抗毒素基因编码的毒素蛋白可被依赖 ATP 的蛋白酶降解成不稳定的抗毒素蛋白,与毒素蛋白相互作用形成 TA 复合体,可抑制毒素的细胞毒性。TA 蛋白复合体可以通过抗毒素蛋白结合于 TA 系统中启动子的调控序列上,从而反馈调控 TA 系统的转录^[1]。细菌染色体上的 TA 系统通过转录水平和转录后水平调控毒素活性,从而控制细胞的生长速度和死亡,使细菌适应各种环境胁迫^[2]。蓝藻是一类古老的放氧光合细菌,具有独特的环境适应能力能和极强的生态竞争优势。集胞藻(*Synechocystis*) PCC6803 染色体上的基因 *ssr1114/slr0664* 构成 TA 系统,其中 *slr0664* 为毒素基因(*relEs*),*ssr1114* 为抗毒素基因(*relN*)^[1]。抗毒素蛋白 RelN 与 RelEs 相互作用形成复合体,能够抑制毒素的毒性作用^[2]。目前 *relNEs* TA 系统编码产物对其操纵子是否具有转录调控作用尚不清楚。本研究以来源于大肠杆菌的 β -半乳糖苷酶基因(*lacZ*)为报告基因,构建了 *relNEs* 操纵子与 *lacZ* 的转录融合质粒,通过对含有这些质粒的重组菌株的 β -半乳糖苷酶活性的分析,确定了该系统的转录调控。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌株与质粒 试验菌株为 *Escherichia coli* DH5 α ,质粒为笔者所在实验室构建并保存。

1.1.2 试剂 主要试剂有:邻硝基苯 β -D-半乳糖苷糖苷

(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。

1.1.3 仪器 主要仪器有:Mastertycler 型 PCR 仪(Eppendorf),722 型分光光度计,DY-6025 型稳流稳压电泳仪,THZ-82 B 型气浴恒温振荡器,HSS-1 数字式超级恒温浴槽等。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株、质粒的培养条件 将用于质粒克隆的宿主菌 *Escherichia coli* DH5 α 在 37℃、LB 培养基中培养,在含有质粒的大肠杆菌培养基中加入相应的抗生素(硫酸卡拉霉素的工作浓度为 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)。

1.2.2 重组质粒的构建 重组质粒的构建按分子克隆的标准方法进行。以 T₄ DNA 聚合酶获得平末端化重组 DNA。以集胞藻 PCC 6803 染色体为模板,用特异性引物(表 1)通过 PCR 扩增相应的 DNA 片段。PCR 反应体系按产品的说明设定,所用程序依反应对象设置。

表 1 本试验所用引物

引物名称	序列(5'→3')
<i>lacZ</i> -R	CTGCGCAACTGTTGGAAGG
<i>ssr1114</i> -1	CCAAAGCCGCTGCCCCAG
<i>ssr1114</i> -2	CTTGACTCGGCTGCTATTCC
<i>ssr1114</i> -B	GAGAGGTACCCTTCTCTATATTCGGG
<i>slr0664</i> -X	CTCGAGTCTTCTATGGAGTACTCCCC

1.2.3 大肠杆菌中 *LacZ* 活性的测定方法 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,并调节 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.3。各取 200 μ L 菌液,离心收集后用 1 mL Z Buffer(含 60 mmol/L Na₂HPO₄,4 000 mmol/L NaH₂PO₄,10 mmol/L KCl,1 mmol/L MgSO₄,40 mmol/L β -巯基乙醇)悬浮,依次加入 50 μ L 0.1% SDS、50 μ L 氯仿、200 μ L 4 mg/mL ONPG,在 30℃ 反应 20 min 后加入 500 μ L 1 mol/L Na₂CO₃ 以终止反应。将反应液于 12 000 r/min 离心 2 min,取上清在 420 nm 处测吸光度 $D_{420\text{ nm}}$,以不含有藻细胞的反应液作为空白对照,

收稿日期:2013-12-09
基金项目:国家自然科学基金(编号:30771176)。
作者简介:孙亮华(1987—),男,河南信阳人,硕士研究生,主要从事环境微生物(蓝藻)方面的研究。E-mail:slhyspa@163.com。
通信作者:刘朝莹,博士,主要从事环境微生物学的教学研究工作。E-mail:melinka@163.com。

根据下列公式计算 *LacZ* 活力:

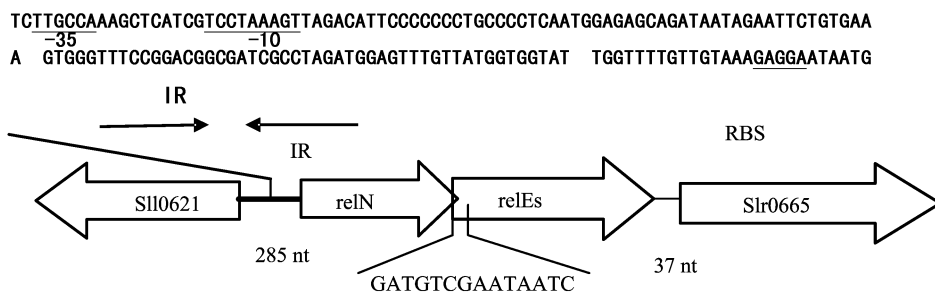
$$\text{Miller} = 1\,000 \times D_{420\text{ nm}} / (1.5\text{ mL} \times 20\text{ min} \times D_{600\text{ nm}})。$$

2 结果与分析

2.1 *relNEs* 操纵子启动子结构分析

在 *relNEs* 操纵子中,抗毒素基因 *relN* 位于毒素基因 *relEs* 上游,二者有 11 个核苷酸序列的重叠 (ATGTCGAATAA),提示二者可能构成一个二元操纵子,在同一启动子控制下共转录。对 *relNEs* 操纵子可能的启动子区域进行分析发现,*relN*

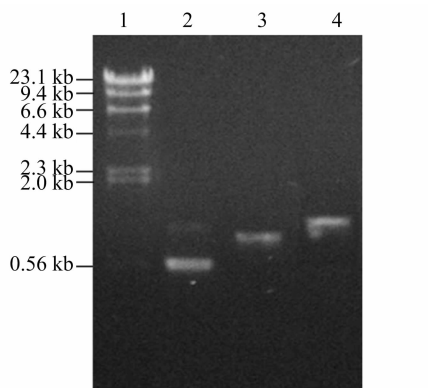
起始密码子 (ATG) 上游 2 个核苷酸处有公认的核糖体结合位点 (RBS, GAGGAA); 上游 40 个核苷酸处有方向重复序列 (IR, 5' - TTCCGGACGGC - 4N - GCCTAGATGGA - 3'); 上游 126 个核苷酸处有启动子公认的 -10 序列 (TCCTAAAGT), 145 个核苷酸处存在公认的 -35 序列 (TTGCCA) (图 1)。因此, *relNEs* 启动子区域 (P_{relNEs}) 含有启动子的所有组分, P_{relNEs} 可能是具有活性的启动子。此外, P_{relNEs} 含有转录调控因子结合的 IR 序列, *relNEs* 操纵子编码产物可能具有反馈调控活性。



IR—反向重复序列; RBS—核糖体结合位点
图1 *relNEs* 操纵子启动子遗传结构示意图

2.2 *relNEs* 操纵子与 *lacZ* 转录融合质粒的构建

为了构建 *relNEs* 操纵子与 *lacZ* 转录融合质粒, 将含 *relNEs* 启动子和 *relNEs* 编码序列的片段克隆于报告质粒 pJS759^[2] 中无启动子的报告基因 *lacZ* 上游。分别以 *ssr1114* - 1/*ssr1114* - 2, *ssr1114* - 1/*ssr1114* - B, *ssr1114* - 1/*slr0664* - X 为引物, PCR 扩增启动子含 P_{relNEs} 、 $P_{relNEs} - relN$ 、 $P_{relNEs} - relN - relEs$ 片段。将扩增产物分别正向克隆于 pMD - 18T 中, 将得到的重组质粒分别命名为 pJS370、pJS396、pJS963。用 *Pvu* II 酶切重组质粒后, 回收 P_{relNEs} 、 $P_{relNEs} - relN$ 、 $P_{relNEs} - relN - relEs$ 片段, 并将这些回收产物分别与 *Bgl* II 酶切后 *T*₄ DNA 聚合酶补平末端的 pJS759 载体连接。以 *ssr1114* - 1/*lacZ* - R 为引物, 筛选 P_{relNEs} 插入方向与 *lacZ* 相同的克隆 (图 2), 所得的重组质粒命名为 pJS768、pJS769、pJS978, 这些重组质粒分别含转录融合片段 $P_{relNEs} - lacZ$ 、 $P_{relNEs} - relN - lacZ$ 、 $P_{relNEs} - relN - relEs - lacZ$ (图 3 - A)。



1— λ /Hind III; 2—pJS768; 3—pJS769; 4—pJS978

图2 *lacZ* 转录融合质粒 pJS768、pJS769 和 pJS978 的 PCR 鉴定

2.3 *relNEs* 启动子转录活性的调控

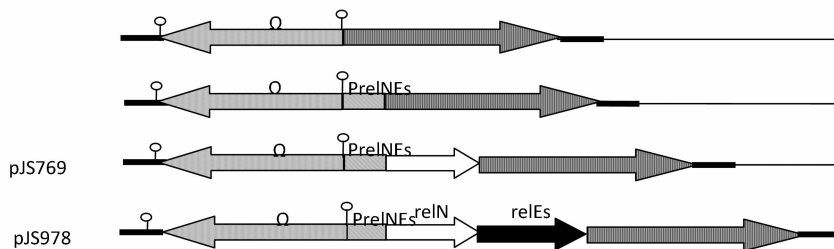
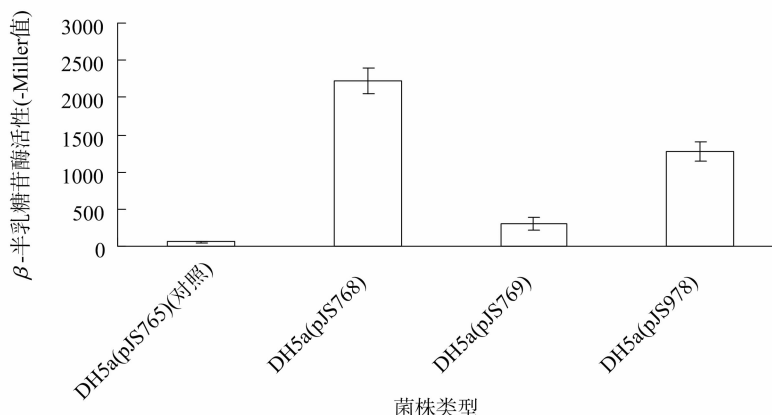
分别用转录融合质粒 pJS768、pJS769 和 pJS978 转化

E. coli DH5 α , 重组菌株分别命名为 *E. coli* DH5 α (pJS768)、*E. coli* DH5 α (pJS769)、*E. coli* DH5 α (pJS978)。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。图 3 - B 结果显示, 菌株 *E. coli* DH5 α (pJS768) 的 β -半乳糖苷酶活性显著高于对照菌株, 表明启动子 P_{relNEs} 具有转录活性; *E. coli* DH5 α (pJS769) 的 β -半乳糖苷酶活性显著低于 *E. coli* DH5 α (pJS768) 的 β -半乳糖苷酶活性, 表明 *RelN* 对启动子 P_{relNEs} 具有负调控作用; 但重组菌株 *E. coli* DH5 α (pJS978) 的 β -半乳糖苷酶活性高于 *E. coli* DH5 α (pJS769), 提示 *RelEs* 可能抑制 *RelN* 的转录抑制活性。

3 讨论与结论

TA 系统在转录水平和转录后水平通过降低抗毒素水平并释放毒素来激活毒素蛋白活性^[1-2]。在正常的生长条件下, 连续合成的抗毒素蛋白与毒素蛋白形成 TA 蛋白复合物, 与操纵子序列结合从而抑制 TA 操纵子的转录。在胁迫条件下, 依赖 ATP 的蛋白酶被激活, 抗毒素被降解, TA 系统的转录水平增加^[1-2]。如大肠杆菌中, 氨基酸饥饿激活 *Lon* 蛋白酶, 并降解 *relBE* TA 系统的抗毒素蛋白, 从而激活该 TA 系统^[3-7]。已证明集胞藻 PCC 6803 染色体上的操纵子 *relNEs* 编码 *relBE* 家族 TA 系统, 其中 *relEs* 为毒素基因, *relN* 为抗毒素基因, 分别编码毒素蛋白 *RelEs* 和抗毒素蛋白 *RelN*^[1]。抗毒素蛋白 *RelN* 与 *RelEs* 相互作用形成复合物, 抑制毒素的毒性作用^[2]。但与大肠杆菌中的 *relBE* 同源系统不同, *relNEs* 系统中的抗毒素可被集胞藻中的 *Lon* 和 *ClpXP2s* 降解, 从而激活该系统的细胞毒性作用。

TA 系统抗毒素的 DNA 结合结构域包括 4 个不同的家族: *Helix - Turn - Helix* (HTH)、*Ribbon - Helix - Helix* (RHH)、*AbrB*、*Phd/YefM*^[1]。RelN 与已知抗毒素无序列同源性, 但二级结构分析显示, 其 N 末端含有类似于 *AbrB* 结构域的

A. *relNEs*与*lacZ*转录融合质粒的结构示意图B. 含转录融合重组质粒的大肠杆菌菌株 β -半乳糖苷酶活性图3 含转录融合重组质粒的大肠杆菌菌株 β -半乳糖苷酶活性

β - α - β 结构域,因此属于 AbrB 家族的转录调控因子^[8-10]。本研究通过转录融合分析了 *relNEs* 操纵子的转录调控,结果显示,RelN 可反馈抑制 *relNEs* 启动子的转录活性,但 RelEs 能抑制 RelN 的转录抑制活性;在 *relNEs* 启动子区域存在一个回文序列 5'-TTCCGGACGGC-4N-GCCTAGATGGA-3',推测抗毒素蛋白 RelN 可能通过其 N 末端的类-AbrB 结构域与该序列结合,从而反馈抑制 *relNEs* 启动子的转录活性。由于在细胞内 RelN 与 RelEs 相互作用形成复合体^[2],推测 RelN-RelEs 可能部分抑制 RelN 与启动子中的调控序列结合的能力,从而降低 RelN 的转录抑制活性。但 RelN 与 *relNEs* 的调控序列结合活性、特异性以及蛋白酶 Lon 和 ClpXP2s 介导环境胁迫因子激活该 TA 系统的过程仍需进一步通过研究证明。

参考文献:

- [1] 常家宁, 宁德刚. 蓝细菌 PCC6803 染色体上的一对毒素-抗毒素基因的鉴定[J]. 微生物学通报, 2009, 36(1): 31-36.
- [2] 叶森, 宁德刚. 蓝细菌 PCC6803 染色体上的毒素蛋白 Slr0664 与抗毒素蛋白 Ssr1114 的相互作用[J]. 微生物学报, 2010, 50(6): 743-748.
- [3] 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.

- [4] Gerdes K, Christensen S K, Lobner-Olesen A. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. [J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(5): 371-382.
- [5] Yamaguchi Y, Inouye M. Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin-antitoxin systems[J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(11): 779-790.
- [6] Christensen S K, Mikkelsen M, Pedersen K, et al. RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(25): 14328-14333.
- [7] Christensen-Dalsgaard M, Jorgensen M G, Gerdes K. Three new RelE-homologous mRNA interferases of *Escherichia coli* differentially induced by environmental stresses[J]. Molecular Microbiology, 2010, 75(2): 333-348.
- [8] Christensen S K, Pedersen K, Hansen F G, et al. Toxin-antitoxin loci as stress-response elements; ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA[J]. Journal of Molecular Biology, 2003, 332(4): 809-819.
- [9] Gotfredsen M, Gerdes K. The *Escherichia coli relBE* genes belong to a new toxin-antitoxin gene family[J]. Molecular Microbiology, 1998, 29(4): 1065-1076.
- [10] Magnuson R, Lehnerr H, Mukhopadhyay G, et al. Autoregulation of the plasmid addiction operon of bacteriophage P1[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(31): 18705-18710.