

蓝细菌 PCC6803 染色体上的一对毒素- 抗毒素基因的鉴定

常家宁 宁德刚*

(江苏大学环境学院 江苏 镇江 212013)

摘要: 大肠杆菌细胞染色体上毒素-抗毒素系统(TA, toxin-antitoxin system)基因参与环境胁迫诱导的细胞死亡或生长抑制。在蓝细菌 PCC6803 染色体上开放阅读框 *ssr1114* 和 *slr0664* 具有与 TA 系统相同的遗传结构, *slr0664* 编码产物与 RelBE 毒素-抗毒素系统中的毒素蛋白 RelE 同源, 但没有发现有与 *ssr1114* 编码产物同源的蛋白。为证明 *slr0664* 和 *ssr1114* 表达产物的毒性和抗毒性作用, 构建了含有乳糖诱导调控的启动子和阿拉伯糖诱导调控的启动子的表达调控系统, 将 *slr0664* 基因编码序列置于 P_{lac} 启动子控制下, *ssr1114* 编码序列置于 P_{BAD} 启动子控制下, *slr0664* 诱导表达产物对细胞具有毒性作用, *ssr1114* 诱导表达产物具有抗 *slr0664* 表达产物的毒性作用。提示 *slr0664* 为毒素基因, *ssr1114* 为抗毒素基因, 二者组成一个 TA 系统, 但其有关特性和功能尚待进一步证明。

关键词: 蓝细菌 PCC6803, TA 系统, *slr0664*, *ssr1114*

Identification of a Pair of Toxin-antitoxin (TA) Gene in the Chromosome of Cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC6803

CHANG Jia-Ning NING De-Gang*

(Environmental School, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China)

Abstract: Chromosomally encoded toxin-antitoxin (TA) systems are thought to result in growth arrest and eventual cell death upon exposure to environmental stress in *E. coli*. In the chromosome of cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC6803, the genetic organization of a 360 bp open reading frame (ORF), *slr0664*, and another small ORF of 256 bp, *ssr1114*, is similar to that of TA system. The predicted protein encoded by *slr0664* is homologous to RelE, but neither homologue of *ssr1114* nor *ssr1114*-encoding protein was found in TA system. To see whether *slr0664* encodes a toxin protein, *ssr1114* encodes an antitoxin, an expressing plasmid containing promoter P_{lac} and P_{BAD} , was constructed. In this construct, Both *slr0664* and *ssr1114* were controlled by P_{lac} and P_{BAD} , respectively. Expression of *slr0664* in *Escherichia coli* results in the inhibition of bacterial growth, the expression of *ssr1114* neutralize the toxicity of *slr0664* expression. These results show that *slr0664* is toxin gene and *ssr1114* is antitoxin gene, both *ssr1114* and *slr0664* constitute a

chromosomal TA system in *Synechocystis* sp. PCC6803.

Keywords: *Synechocystis* sp. PCC6803, TA system, *slr0664*, *ssr1114*

毒素-抗毒素系统 (TA, Toxin-antitoxin system) 由位于同一操纵子中的两个基因组成, 分别编码稳定的毒素蛋白和不稳定抗毒素蛋白。毒素和抗毒素蛋白形成复合体, 毒素蛋白对细胞的毒性作用被抑制^[1]。该系统最初发现于大肠杆菌低拷贝质粒, 起分离后细胞杀伤作用, 保证质粒在细胞中的稳定性^[2]。近年来, 随着大量细菌基因组序列的公布, 生物信息学发现 TA 系统也广泛存在于细菌染色体上, 并具有与质粒上的同源系统相同的遗传特性^[3]。但仅少数细菌染色体上的 TA 系统通过试验证明, 其中研究最为清楚的是大肠杆菌染色体上的 *mazEF* 系统和 *relBE* 系统。MazF 为具有位点特异性 RNA 内切酶^[4], RelE 为依赖核糖体的 mRNA 内切酶^[4,5]。染色体上的 TA 系统可被环境胁迫诱导的上调表达蛋白酶所激活, 但它们的生理功能还不清楚。一般认为, TA 系统作为原核细胞的胁迫反应因子, 参与或介导中度胁迫条件下细胞的生长抑制或死亡^[6]。

蓝细菌 PCC6803(*Synechocystis* sp., 以下简称 PCC6803)为嗜中温性单细胞蓝细菌, 其全基因组已于 1996 年完成并公布 (<http://www.kazusa.or.jp/cyano>), 但至今尚未见蓝细菌中 TA 系统基因的研究报道。作者对 PCC6803 染色体上的 TA 系统进行了分析, 其中基因 *slr0664* 编码产物与大肠杆菌中的 *RelE* 同源, 与上游基因 *ssr1114* 紧密相连。本文通过试验证明 *slr0664* 编码产物为毒素蛋白, *ssr1114* 编码产物具有抗毒素作用, 研究结果对蓝细菌染色体

上其他 TA 系统的鉴定及其功能的研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 菌株、藻株、质粒和培养条件

PCC6803 由中国科学院水生生物研究所徐旭东研究员提供, 在 BG11 培养基中 28℃~30℃ 和光照条件下[30 μE(m²·S)]静置培养, 用于质粒克隆的宿主菌 *E. coli* DH5α 在 37℃ LB 培养基中培养, 含有质粒的大肠杆菌加入相应的抗生素(氨苄青霉素, 硫酸卡拉霉素工作浓度均为 50 μg/mL)质粒 pBAD-gfp^[7]由中国科学院水生生物研究所徐旭东研究员提供, 其他质粒均为本实验室保存。

1.2 分子生物学操作

PCC6803 基因组 DNA 提取按徐旭东等描述的方法^[8]。DNA 重组按标准操作方法进行^[9]。PCR 反应体系中含 10 mmol/L Tris·Cl (pH 8.3), 50 mmol/L MgCl₂, 引物(表 1)各 100 pmol, 200 μmol/L dNTPs, 50 ng 模板 DNA, 2.5 U DNA 聚合酶(*Taq*/*Pfu*=1/1, *U/U*)。PCR 反应程序为: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 5 min。引物中添加相应酶切位点的 PCR 产物抽提沉淀后, 直接以内切酶消化, 酶切产物用凝胶回收试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司)回收后用于克隆。DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等均购自晶美生物工程有限公司。重组质粒中的克隆片段由上海生工生物工程技术有限公司测序确定。

表 1 PCR 引物及序列(5'-3')
Table 1 Nucleotide sequence of gene-specific primers used for PCR(5'-3')

引物名称 Primers	序列(5'-3')Nucleotide sequences
pDAB-1	GAGAAAGCTTCGATGCATAATGTGCCTGTC(<i>Hind</i> III)
pDAB-2	GAGAGAGCTCCACATGTATATCTCCTTCTTAAAGTT(<i>Sac</i> I)
slr0664-A	GAGACATATGTGCAATAATCTCCATTTAGTC(<i>Nde</i> I)
slr0664-B	GAGAGGTACCTTTGGCGATCGCCGTGAG(<i>Kpn</i> I)
ssr1114-A	GAGAGAGCTCGAGAGCTTTTGAGGTAATGGC(<i>Sac</i> I)
ssr1114-B	GAGAGGTACCTTCTCTATATTCGGG(<i>Kpn</i> I)

1.3 *slr0664*、*ssr1114* 在大肠杆菌细胞中诱导表达活性分析

含有 *slr0664* 或 *slr0664-ssr1114* 重组质粒测序

确定其序列后, 分别转化 *E. coli* BL21(DE3), 以含 50 μg/mL 硫酸卡拉霉素和 0.2%葡萄糖的 LB 平板筛选转化子, 转化子中的质粒经酶切鉴定后, 接种于

含 50 $\mu\text{g/mL}$ 硫酸卡拉霉素的 M9(GAC) [0.4%甘油, 0.05%的酪蛋白水解物(BD Difco Laboratory)]液体培养基中, 37°C 培养至 $OD_{600}=0.3\sim0.6$, 含不同重组质粒的培养物浓度调整至约 $OD_{600}=0.1$, 取 5 μL 于 M9 (GAC)含 0.1 mmol/L IPTG 或 0.1 mmol/L IPTG+0.2% L-(+)-阿拉伯糖的 M9 (GAC)平板划线, 37°C 培养 20 h 后观察结果。对转化子生长的定量分析, 取在 M9(GAC)液体培养基中过夜培养的菌液, 接种于 30 mL 含 0.1 mmol/L IPTG 或 0.1 mmol/L IPTG+0.2% L-(+)-阿拉伯糖的 M9(GAC)液体培养基中, 并使接种物的起始浓度基本相同。于 37°C、200 r/min 培养, 间隔 2 h 取样测定 OD_{600} 。

1.4 同源基因的生物信息学分析

根据已鉴定的细菌染色体上的 TA 系统基因序列, 以及 TA 系统的遗传结构特点, 包括毒素基因抗毒素基因的大小、排列特征、启动子结构等, 对 Kasuza *Synechocystis* sp. 基因组数据库(www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html)进行检索, 其结果在 NCBI 基

因组数据库中进一步搜索, 利用 DNASTar, Windows 32 MegAlign 5.01(1989-2001)软件对检索结果进行网上在线分析。

2 结果

2.1 *ssr1114*、*slr0664* 基因序列分析

对 Kasuza *Synechocystis* sp. 基因组数据库(www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html)检索结果显示, PCC6803 染色体上一个 360 bp 阅读框(ORF)为 *slr0664*, 其上游为另一个 256 bp 的阅读框为 *ssr1114*, 两阅读框之间有 10 个碱基的重叠, 提示两个基因共同构成一个操纵子, 在启动子序列中有一个 9 个碱基的倒转重复序列(IR)(图 1a), 在大肠杆菌 *relBE* 系统中也有相似的序列, 为 RelB-RelE 复合体的结合位点, 并反馈抑制操纵子的转录。推测 *ssr1114* 的编码产物为 86 个氨基酸, 分子量为 9908.29, 等电点为 4.53; *slr0664* 编码产物为 120 个氨基酸, 分子量为 13678.58, 等电点为 8.32。根据在细胞内生理条件下

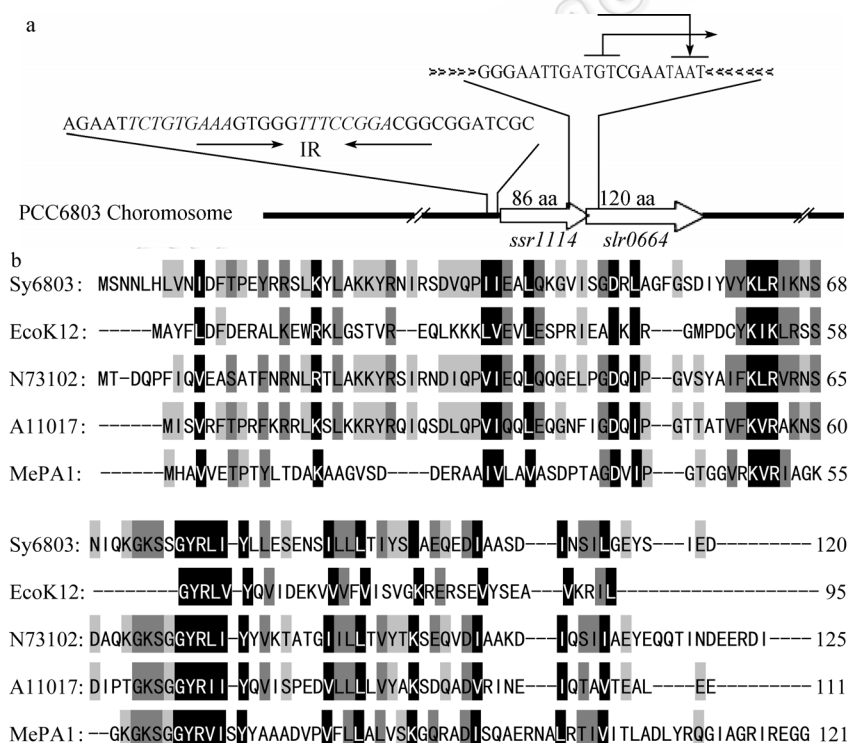


图 1 *ssr1114*、*slr0664* 在 PCC6803 染色体上的遗传结构

Fig. 1 Genetic structure of the *ssr1114*/*slr0664* locus in the chromosome of *Synechocystis* sp. PCC6803

注: a: *ssr1114*-*slr0664* 遗传结构示意图, 箭头所示 *ssr1114* 和 *slr0664* 的转录方向, 粗斜体碱基为倒转重复序列(IR); b: *slr0664* 编码产物与 RelE 蛋白序列比对, Sy6803、EcoK12、N73102、A11017、MePA1 分别表示 *Synechocystis* sp. PCC6803、*Escherichia coli* K12、*Nostoc punctiforme* PCC73102、*Acaryochloris marina* MBIC11017、*Methylobacterium extorquens* PA1。

Note: a: Schematic representation of the *ssr1114*-*slr0664* locus; b: Sequence alignment of the putative RelE proteins of *Synechocystis* sp. PCC6803 (Sy6803), *Escherichia coli* K12 (EcoK12), *Nostoc punctiforme* PCC 73102 (N73102), *Acaryochloris marina* MBIC11017 (A11017) and *Methylobacterium extorquens* PA1 (MePA1); Residues conserved in at least three homologous proteins are shaded.

的电荷特点, *ssr1114* 和 *slr0664* 编码产物之间可通过静电引力相互作用形成复合体。在 *Kasuzi Synechocystis* sp. 基因组数据库中推测 *slr0664* 和 *ssr1114* 编码产物均注释为假定蛋白。但我们的分析显示, *slr0664* 的编码氨基酸序列中存在大肠杆菌 RelE 的保守结构域, 比对结果表明 *slr0664* 编码产物与大肠杆菌中 RelE 的相似度为 30.3%, 与通过系统进化分析证明存在于其他细菌中公认的 *relE* 同源基因的编码产物具有相似性(20.4%~50.7%)(图 1b)。但 *ssr1114* 及其编码产物序列在各数据库中均未检索到具有同源性的基因和蛋白质。根据遗传结构和序列分析结果, 推测 *slr0664* 和 *ssr1114* 构成 TA 系统, *slr0664* 为毒素基因, 而上游的 *ssr1114* 为抗毒素基因。

2.2 含双诱导控制启动子的质粒构建

为证明 *slr0664* 和 *ssr1114* 构成 TA 系统, 构建了含有乳糖诱导调控的启动子(P_{lac})和阿拉伯糖诱导调控的启动子(P_{BAD})的表达调控质粒。以质粒 pBAD-GFP 为模板, 以 pBAD-1, pBAD-2 为引物, PCR 扩增含阿拉伯糖操纵子中调控基因 *araC* 和启动子 P_{BAD} 片段, 扩增片段以 *Hind* III/*Sac* 酶切后插入 pET30a *Hind* III/*Sac* 位点, 构建的重组质粒经酶切鉴定, 并测序确定序列正确后命名质粒为 pJS298(图 2)。在该重组质粒中有启动子 P_{lac} , 可在含有 T7 噬菌体 RNA 聚合酶的宿主细胞中被 IPTG 诱导表达。另一个诱导调控的启动子为 P_{BAD} , 受 L-(+)-阿拉伯糖诱导调控。在两个诱导表达的启动子之间游多克隆位点, 便于被分析基因的分子克隆。

2.3 含毒性基因、抗毒性基因的重组质粒构建

以 *slr0664*-A 和 *slr0664*-B 为引物, PCC6803 为模板, PCR 扩增 *slr0664* 编码序列片段, 扩增产物以 *Nde* 和 *Kpn* 酶切, 酶切产物与 *Nde* 和 *Kpn* 酶切 pJS298 连接所得到的重组质粒酶切鉴定和测序确定后命名为 pJS306(图 3, 图 4), 在该质粒中 *slr0664* 位于启动子 P_{lac} 的控制之下, 并受 IPTG 诱导表达。以 *ssr1114*-A 和 *ssr1114*-B 为引物, PCC6803 染色体为模板, PCR 扩增 *ssr1114* 编码序列片段, 扩增产物以 *Sac* 和 *Kpn* 酶切, 酶切产物插入 pJS306 对应的克隆位点, 鉴定后的重组质粒为 pJS321(图 3, 图 4), 该重组质粒中, *slr0664* 位于 P_{lac} 的控制之下, 受 IPTG 诱导表达; *ssr1114* 位于 P_{BAD} 控制下, 受 L-(+)-阿拉伯糖诱导表达。

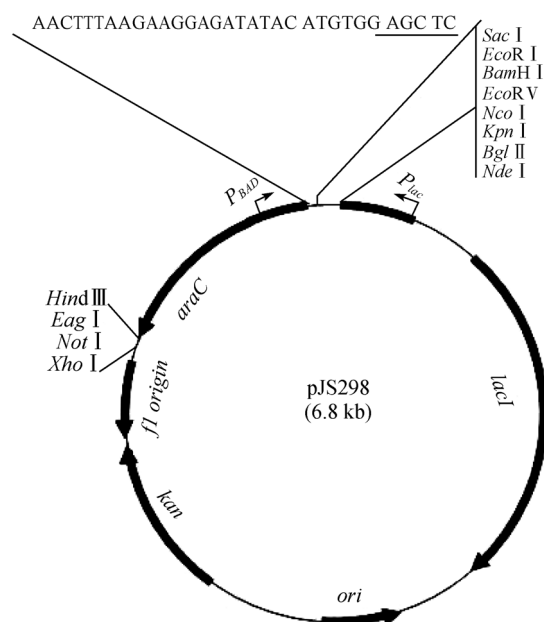


图 2 质粒 pJS298 的结构示意图

Fig. 2 Structure of plasmid pJS298

注: 粗体碱基序列表示起始密码子; 下划线碱基为 *Sac* 酶切位点; P_{BAD} 为阿拉伯糖操纵子启动子; P_{lac} 为乳糖操纵子启动子。

Note: Boldfaced bases show start codon, underlined bases show *Sac* site; P_{BAD} : Promotor of Arabinose operon; P_{lac} : Promotor of Lactose operon.

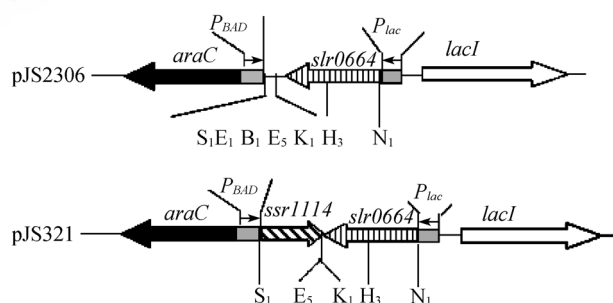


图 3 IPTG 诱导表达的重组质粒 pJS306 以及 IPTG 诱导 *slr0664* 和 L-(+)-阿拉伯糖诱导 *ssr1114* 表达的重组质粒 pJS321 结构示意图

Fig. 3 Schematic representation of recombinant plasmid pJS306 for *slr0664* expression induced by IPTG, and plasmid pJS321 for *ssr1114* expression induced by L-(+)-Arabinose

Note: S1, E1, B1, E5, K1, N1 represent *Sac* I, *EcoR* I, *EcoR* V, *Kpn* I, *Nde* I, respectively.

2.4 诱导 *slr0664* 表达产物对大肠杆菌细胞的毒性作用

由于宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)染色体上有来源于 T7 噬菌体 RNA 聚合酶基因, 表达产物可特异性控制重组质粒 pJS306 和 pJS321 中 P_{lac} 操控基因的

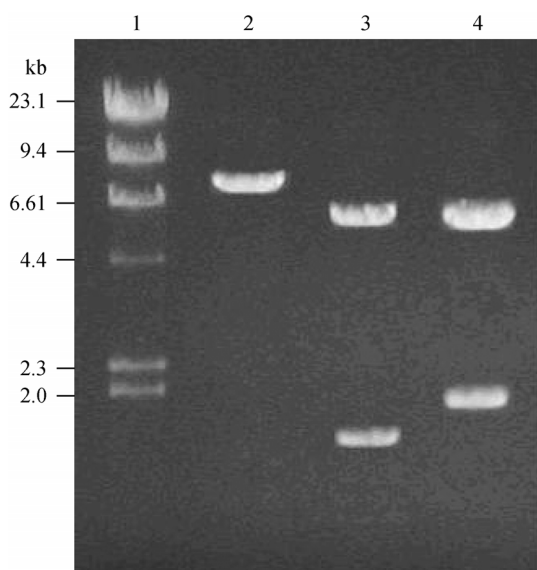


图4 重组质粒 pJS298、pJS306 和 pJS321 电泳检测

Fig. 4 Examination of plasmid pJS306 and pJS321 by a agar electrophoresis

1: λ Hind III; 2: pJS298/Hind III; 3: pJS306/Hind III; 4: pJS321/Hind III.

转录。本研究中以添加碳源和氮源的 M9 基础盐培养基分析诱导表达产物对细胞生长的影响。由于在有葡萄糖存在时 P_{lac} 和 P_{BAD} 控制基因的诱导表达受到抑制, 在分析诱导 *slr0664* 和 *ssr1114* 表达产物对大肠杆菌细胞的毒性和抗毒性作用时, 培养基中以 0.4% 甘油作为细菌生长代谢的碳源。分别将重组质粒 pJS298、pJS306 和 pJS321 转入 *E. coli* BL21(DE3) 中所得到的菌株, 在不含诱导剂的 M9(GAC) 固体培养基中都能生长; 但在含 0.1 mmol/L IPTG 的

M9(GAC) 固体培养基中, *E. coli* BL21(DE3)(pJS306) 和 *E. coli* BL21(DE3)(pJS321) 生长受到强烈抑制, 而对照转化子 *E. coli* BL21(DE3)(pJS298) 能正常生长(图 5)。在含 0.1 mmol/L IPTG 的 M9 液体培养基的细胞的生长情况分析也有相同的结果, 表明诱导 *slr0664* 表达产物对大肠杆菌细胞具有毒性作用, *slr0664* 为毒性基因。

2.5 诱导表达毒素蛋白对毒素蛋白的细胞毒性的抑制作用

为了分析 *ssr1114* 表达产物是否能抑制 *slr0664* 表达产物对细胞的毒性作用, 将带有重组质粒的菌株接种于含 0.2% 阿拉伯糖和 0.1 mmol/L IPTG 的 M9(GAC) 固体培养基中, 除 *E. coli* BL21(DE3)(pJS306) 不能生长外, 其他均能生长(图 5); 在含 0.2% 阿拉伯糖和 0.1 mmol/L IPTG 的 M9(GAC) 液体培养基的细胞的生长情况分析也显示相同结果。根据上述结果, *ssr1114* 诱导表达产物可抑制 *slr0664* 表达产物对大肠杆菌细胞的毒性作用, *ssr1114* 为抗毒素基因。同时注意到, *E. coli* BL21(DE3)(pJS321) 在含 0.2% 阿拉伯糖和 0.1 mmol/L IPTG 的培养基中的生长速度低于不含诱导剂的培养基中的生长速率, 并且在相同条件下, *E. coli* BL21(DE3)(pJS321) 的生长速度低于 *E. coli* BL21(DE3)(pJS298)。可能是由于 P_{lac} 和 P_{BAD} 均为强诱导性启动子, 并且在无诱导物存在时有渗漏表达, 导致细胞毒性作用或细胞代谢负荷增加, 生长速率降低。

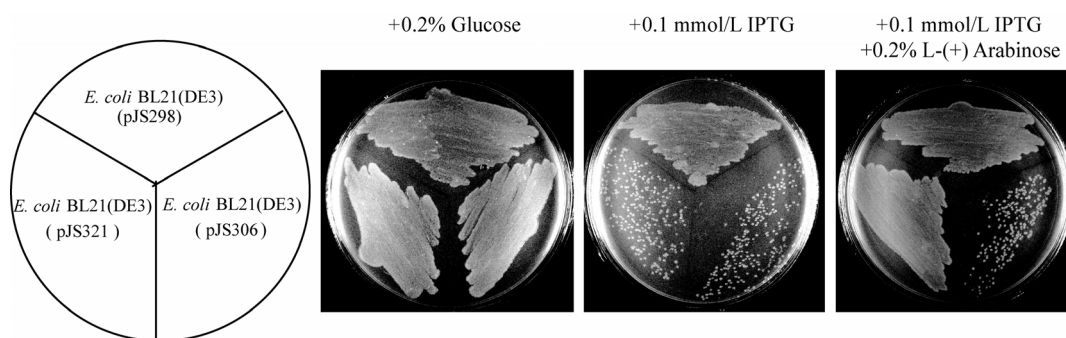


图5 在大肠杆菌中诱导表达 *slr0664* 和 *ssr1114* 对细胞生长的影响

Fig. 5 Effect of the expression of *slr0664* and *ssr1114* on growth of *E. coli* cells

注: 分别将含有质粒 pJS298、pJS306、pJS321 的 *E. coli* BL21(DE3) 接种于含葡萄糖、IPTG 或 IPTG+阿拉伯糖的 M9 (GCA) 平板, 37°C 培养过夜。

Note: *E. coli* BL21(DE3) with pJS298, pJS306 or pJS321 were streaked on M9 (GCA) plates, respectively with glucose, IPTG or both IPTG and L-(+)arabinose. The plates were incubated overnight at 37°C.

3 讨论

TA 系统广泛存在于古细菌和真细菌染色体上,不同种属来源的 TA 系统基因家族序列的同源程度各不相同甚至相差很大,但遗传结构和功能非常相似^[3]。然而,仅有极少数细菌染色体上的 TA 系统通过试验研究证明,其中大肠杆菌染色体上已发现 6 个 TA 系统,其各自的生化功能已比较清楚,但其生理功能还存在争议^[1]。因此,对其他种属来源的 TA 系统的鉴定将对其生理功能的研究尤为重要。

Zhu L 等曾借助表达毒素蛋白的体外分析,利用单一诱导调控启动子在 *E. coli* BL21(DE3)中鉴定了分支结核杆染色体上的 4 个 TA 系统中的毒素基因^[13]。本研究在此鉴定方法的基础上,通过构建含有两个诱导调控的启动子分别控制可能的毒素基因和抗毒素基因的表达式,分析表达产物对细胞生长的影响,判断毒素基因和抗毒素基因。试验结果表明 PCC6803 染色体上的基因 *slr0664* 为毒素基因,而 *ssr1114* 为抗毒素基因,结合在染色体上遗传结构特征, *ssr1114* 和 *slr0664* 组成一个 TA 系统。

序列分析结果表明, *slr0664* 编码产物与 RelE 同源。大肠杆菌中的 *relBE* 是目前研究最为清楚的一个 TA 系统之一^[10]。在营养胁迫条件下, RelE 被激活并通过降解 mRNA 抑制蛋白质合成^[4,5],从而表现出对细胞的毒性作用,抑制细胞生长或导致细胞死亡^[11]。尽管 RelE 被激活机制还没有一致结论,但公认 *relBE* 系统可介导环境胁迫诱导细胞死亡或生长抑制^[12]。由于目前对细菌染色体上的 TA 系统的认识还很有限,未发现与 *ssr1114* 编码产物同源的抗毒素蛋白或已知功能的其他蛋白。因此,尽管 *slr0664* 编码产物与 RelE 同源,但是否具有与 RelB 相同的生理功能,以及 *ssr1114*/*slr0664* 与 *relBE* 属同一或新的 TA 系统家族,还有待进一步证明。

参考文献

- [1] Gerdes K, Christensen SK, Lobner-Olesen A. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nature Rev Microbiol*, 2005, **3**(5): 371–382.
- [2] Williams DR, Thomas CM. Active partitioning of bacterial plasmids. *J Gen Microbiol*, 1992, **138**(1): 1–16.
- [3] Pandey DP, Gerdes K. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**(3): 966–976.
- [4] Christensen SK, Pedersen K, Hansen FG, et al. Toxin-antitoxin loci as stress response elements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA. *J Mol Biol*, 2003, **332**(4): 809–819.
- [5] Pedersen K, Zavialov AV, Pavlov MY, et al. The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell*, 2003, **112**(1): 131–140.
- [6] Buts L, Lah J, Dao-Thi MH, et al. Toxin-antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers. *Trends Biochem Sci*, 2005, **30**(12): 672–679.
- [7] Cramer A, Whitherhorn EA, Tate E, et al. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat Biotechnol*, 1996, **14**(3): 315–319.
- [8] 徐旭东, 王业勤, 黎尚豪. 鱼腥藻—大肠杆菌 CAT 启动子探测质粒的构建. 中国科学院研究生院报, 1993, **10**: 203–209.
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989.
- [10] Gotfredsen M, Gerdes K. The *Escherichia coli relBE* genes belong to a new toxin-antitoxin gene family. *Mol Microbiol*, 1998, **29**(4): 1065–1076.
- [11] Christensen SK, Mikkelsen M, Pedersen K, et al. RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(25): 14328–14333.
- [12] Hayes CS, Sauer RT. Toxin-antitoxin pairs in bacteria: killers or stress regulators? *Cell*, 2003, **112**(1): 2–4.
- [13] Zhu L, Zhang YL, Teh JS, et al. Characterization of mRNA Interferases from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*, 2006, **281**(27): 18638–18643.