

蜜蜂螺原体细胞骨架相关基因 *mreB* 的克隆表达及在螺原体二种形态时的表达差异

周丹霞 危蓉萍 康昕 钱正宗 纪燕玲 于汉寿*

(南京农业大学 生命科学学院 农业部农业环境微生物重点实验室 江苏 南京 210095)

摘要:【目的】在大肠杆菌中克隆表达蜜蜂螺原体细胞骨架相关基因 *mreB* 1–5, 并预测所编码蛋白的理化性质, 分析这些基因在螺原体螺旋状和非螺旋状时的表达水平, 为进一步分析该基因的功能奠定基础。【方法】通过PCR扩增, 从 *Spiroplasma melliferum* CH-1 基因组中获得 *mreB* 1–5 基因, 构建的重组表达载体 pET*mreB* 1–5 分别在大肠杆菌 BL21 中诱导表达, 利用镍亲和树脂纯化重组蛋白, 通过在线工具预测 MreB 蛋白质的理化性质和功能域。利用 Real-Time PCR 比较螺原体 CH-1 在两种不同形态时 *mreB* 1–5 基因的表达量。【结果】成功克隆到 5 个 *mreB* 基因, 并在大肠杆菌 BL21 中高效表达。MreB 蛋白分子量分别为 36、23、23、37 和 25 kD, 可能均为疏水性的蛋白, 属于 MreB/Mbl 蛋白质家族。荧光定量 PCR 结果显示, 螺原体在非螺旋状时 *mreB* 1–5 基因的表达水平平均远低于在螺旋状时基因的表达水平。【结论】本文第一次克隆表达了螺原体细胞骨架相关基因 *mreB* 1–5, 初步表明这些基因在螺原体形态方面可能具有重要作用, 为后续研究螺原体 *mreB* 基因在其运动和形态方面的功能提供了重要信息。

关键词: 螺原体, 细胞骨架, *mreB* 基因, 生物信息学, 荧光定量 PCR

Cloning and expression of cytoskeleton-related gene *mreB* and expression differences between two shapes of *Spiroplasma melliferum*

ZHOU Dan-Xia WEI Rong-Ping KANG Xin QIAN Zheng-Zong
JI Yan-Ling YU Han-Shou*

(Key Laboratory of Microbiology of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: [Objective] *mreB* 1–5, the cytoskeleton-related genes of *Spiroplasma melliferum* CH-1 were cloned and expressed in *Escherichia coli*. Then their proteins properties were predicted. Expression levels of these genes in spiral and non-spiral shape of spiroplasma were determined. [Methods] Coding sequences of *mreB* 1–5 were amplified from the genomic DNA of *S. melliferum* CH-1. Then recombination plasmids pET*mreB* 1–5 were expressed in *E. coli* BL21 respectively after IPTG induction. Ni-NTA was used to purify the recombinant proteins. The properties of MreB proteins were predicted by online tools. Real-Time quantitative PCR method was applied to compare

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30870002); 国家大学生创新创业训练计划(No. 201310307007)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-25-84395531; ✉: yuhans@njau.edu.cn

收稿日期: 2013-11-04; 接受日期: 2014-01-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-09

the expression levels of *mreB1-5* genes between two obvious different shapes of *S. melliferum* CH-1. **[Results]** Five *mreB* genes from *S. melliferum* were cloned. The molecular weight of five MreB proteins were 36, 23, 23, 37, 25 kD, respectively. They were possibly hydrophobic proteins with no signal peptide and were identified as part of MreB/Mbl protein family. The results exhibited that the expression levels of genes *mreB1-5* in non-spiral shape of spiroplasma were relatively lower than that in spiral shape. **[Conclusion]** This is the first report of clone and expression of spiroplasma cytoskeleton-related genes *mreB1-5* which encode actin-like protein MreB. It could be inferred that these genes are closely related with spiroplasma morphology. All results contribute to further investigate the function of actin-like protein MreB in spiral shape and movement of spiroplasma.

Keywords: Spiroplasma, Cytoskeleton, *mreB*, Bioinformatics, Real-Time PCR

螺原体是原核生物中能独立生存和自主复制的最小最简单的生命形式之一,属于柔膜菌纲(Mollicutes)^[1]。真核细胞和一些原核细胞都依赖于细胞骨架聚合物和分子马达来决定它们的形态和运动性^[2]。在结构上,螺原体没有细胞壁和鞭毛,仅靠含固醇的单层膜包裹整个细胞,但它仍能维持独特的螺旋形的形态和运动性,这与其细胞内含有细胞骨架有关^[3]。螺原体中的细胞骨架是由平行的会收缩的纤维组成的平面,沿着最短的螺旋路线与细胞膜内表面相连接^[4]。经过反复冻融或利用去污剂处理螺原体后,其细胞骨架可释放^[5],主要成分是 Fib 蛋白(59 kD),该蛋白由 *fib* 基因表达,除了 Fib,与细胞运动形态有关的蛋白还有延伸因子 Tu (EF-TU)和 MreB^[6]。Tu 是分子量为 43 kD 的蛋白质,是细胞质纤维网络的一部分^[7]。MreB 蛋白广泛存在于杆状,细丝状和螺旋状的细菌之中,对于形成非球形的细胞结构非常重要^[8]。消耗 MreB 会诱导产生圆的,膨大的细胞^[9]。MreB 既连接细胞膜,又连着 Fib,它将细胞膜与 Fib 连接在一起,控制细胞形态^[2]。

螺原体是研究运动性的模式生物,研究它的运动和形态对深入了解生物学基本规律有极其重要的意义。但是由于螺原体的某些特殊性,目前国内仅南京师范大学的王文教授领导的团队通过分子生物学的方法对螺原体的形态有一定的研究^[10]。国外研究者通过电镜或其他物理方法直观研究螺原体的运动和形态^[7],对于螺原体细胞骨架蛋白相关基因的功能验证还需要继续探索。2011 年本课题

组胡冰等利用电子显微镜观察到低渗条件下在对数生长期呈螺旋形态的螺原体 CH-1 的细胞骨架微丝和微管样结构,而在延滞前期或分裂早期螺原体的螺旋特性不明显,其体内微丝未形成或长度很短^[11]。为了进一步研究引起我国蜜蜂螺原体性麻痹病的主要病原 *Spiroplasma melliferum* CH-1^[12]的形态学特性,本文在测得 CH-1 全基因组序列精细图(数据未公布)的基础上,对螺原体的细胞骨架相关基因 *mreB* 进行生物信息学分析及克隆表达,并分析螺原体 CH-1 在两种不同形态时这些基因的表达差异,为进一步验证细胞骨架相关基因对螺原体形态、运动性等的的重要作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、载体及主要试剂: *S. melliferum* CH-1,由本实验室保存;表达载体 pET-28a(+)由南京农业大学生命科学院郑会明老师馈赠;大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 和 BL21(DE3)购于百泰克公司。

限制性内切酶 *Xho* I 和 *Nde* I、T4 DNA 连接酶、RNA Extraction Kit、PrimeScriptTM Master Mix、SYBR Premix Ex *Taq*TM II 购于 TaKaRa 公司;DEPC 处理水购于南京丁贝生物科技有限公司。High Pure dNTPs、*Taq* DNA Polymerase 购于上海浦迪生物科技有限公司;PCR 引物由捷瑞公司合成,质粒 DNA 小量制备试剂盒、柱式琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购于捷瑞公司;Ni-NTA 亲和树脂由南京基蛋生物技术有限公司馈赠。其它试剂均为进口

或国产分析纯。

1.1.2 培养基和溶液：R2 培养基^[12]；LB 液体培养基(g/L)：胰蛋白胨 10，酵母提取物 5，NaCl 10；LB 固体培养基(g/L)：在 LB 液体培养基中加入 20 g/L 的琼脂，在 LB 培养基使用前加入终浓度为 50 mg/L 的卡那霉素。0.2 mol/L PB (g/L)：Na₂HPO₄·2H₂O 58，NaH₂PO₄·2H₂O 6；Binding buffer：0.05 mol/L PB，0.5 mol/L NaCl，0.02 mol/L 咪唑；Elution buffer：0.05 mol/L PB，0.5 mol/L NaCl，0.5 mol/L 咪唑。

1.2 *mreB1-5* 所编码氨基酸的序列分析

根据已测序的 *S. melliferum* CH-1 菌株的细胞骨架相关基因 *mreB1-5* 基因序列(GenBank 登录号 KF680537–KF680541)，利用 Expasy 软件包中的 ProtParam 工具(<http://web.expasy.org/protparam/>)对蛋白质的相对分子质量、氨基酸组成、等电点、疏水性等基本理化性质进行分析^[13]。信号肽预测和功能域预测在线工具网址分别为：<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>、<http://pfam.sanger.ac.uk/>^[14]。

1.3 *S. melliferum* CH-1 菌株基因组 DNA 的提取

将菌株 *S. melliferum* CH-1 接种于 2 mL 的 R2

培养基中，32℃ 培养 2 d。12 000 r/min 离心 10 min，去上清，收集菌体，利用修改过的 CTAB/NaCl 法提取基因组 DNA^[13]。

1.4 细胞骨架蛋白相关基因 *mreB1-5* 的扩增

根据基因序列，利用 Primer 5 软件设计了 5 对含保护碱基和酶切位点的引物(表 1)，用于扩增 *mreB1-5* 基因。以 *S. melliferum* CH-1 基因组 DNA 为模板，进行 PCR 扩增，反应条件为：94℃ 5 min；95℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃ 1 min，共 35 个循环；72℃ 10 min。将扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测结果，条带明亮、单一的 PCR 产物立即用胶回收试剂盒回收，回收产物检测后–20℃ 保存备用。

1.5 重组质粒 pET*mreB* 的构建

将获得的 *mreB* PCR 回收产物及 pET-28a 质粒进行 *Xho* I 和 *Nde* I 双酶切处理，酶切产物用 1% 的琼脂糖凝胶纯化回收。将双酶切处理的 *mreB* 基因与 pET-28a 线性载体进行酶连，酶连产物热激法转化到 *E. coli* 感受态 DH5α 中，活化后涂布在含 50 mg/L 的卡那霉素 LB 平板上，37℃ 过夜培养。

次日，随机挑取单菌落至 1 mL 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中，37℃ 培养 8 h。取 0.5 μL

表 1 本研究设计的引物 Table 1 Primers designed in this study				
引物 Primers	引物序列 Sequence of primers (5'→3')	酶切位点 Restriction sites	产物 Products	产物大小 Product sizes (bp)
<i>mreB1</i> -F	GGAATTCCATATGGATTTAGGAACAGCTTACACTCT	<i>Nde</i> I	<i>mreB1</i>	1 002
<i>mreB1</i> -R	CCGCTCGAGTTAATAATCTAATTCTTTTG	<i>Xho</i> I		
<i>mreB2</i> -F	GGAATTCCATATGGGAGCAAGTCACGTT	<i>Nde</i> I	<i>mreB2</i>	669
<i>mreB2</i> -R	CCGCTCGAGTTATGAAATTTTGT	<i>Xho</i> I		
<i>mreB3</i> -F	GGAATTCCATATGTGTAAAAATATCGGTGCTG	<i>Nde</i> I	<i>mreB3</i>	663
<i>mreB3</i> -R	CCGCTCGAGTTATCTATTTTCTTTTGT	<i>Xho</i> I		
<i>mreB4</i> -F	GGAATTCCATATGGCTTTATTTAATAGTGC	<i>Nde</i> I	<i>mreB4</i>	1 044
<i>mreB4</i> -R	CCGCTCGAGCTAGTAATTTAATTCTTTT	<i>Xho</i> I		
<i>mreB5</i> -F	GGAATTCCATATGGGTGCTGAATTAGTTATC	<i>Nde</i> I	<i>mreB5</i>	690
<i>mreB5</i> -R	CCGCTCGAGTTATTTCTTTTACCTAATGTTG	<i>Xho</i> I		

注：下划线为限制性酶切位点。

Note: Restriction sites are underlined.

菌液为模板,以通用引物 T7、T7 terminator 为引物(引物序列分别为 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3', 5'-TGCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'),PCR 扩增验证重组质粒。进一步用质粒制备试剂盒提取阳性克隆菌液的重组质粒,用 *Xho* I 和 *Nde* I 双酶切验证。取验证为阳性的菌液 100 μ L 至 2 mL 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 过夜培养,送至上海美吉生物公司进行测序验证。将测序正确的菌株用 30%的甘油以 1:1 比例混匀,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.6 重组质粒 pETmreB 在大肠杆菌中的原核表达

用试剂盒提取测序正确的重组质粒,热激法转化到大肠杆菌感受态 BL21(DE3)中,活化后涂布在含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。随机挑取单菌落至含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中。次日,按 1%的接种量分别转接到 1 mL 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中,各接两管,37 $^{\circ}$ C 培养 3.5 h。一管不加诱导剂做阴性对照,另一管加入终浓度为 1 mol/L 的 IPTG,于 32 $^{\circ}$ C 诱导 4 h。取全部菌液,12 000 r/min 离心 1 min,去上清,加入 100 μ L 双蒸水混匀后,沸水浴 5 min,用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测蛋白表达情况。并将成功表达蛋白的菌株命名为 pM1-5,用 30%的甘油以 1:1 比例混匀,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.7 MreB 蛋白的纯化

取表达菌液 500 μ L 接种到 5 mL 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。第二天将 5 mL 菌液接种到 500 mL 的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 3.5 h,加入终浓度为 1 mol/L 的 IPTG,32 $^{\circ}$ C 诱导 4 h。将菌液 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 10 min,除去上清,沉淀用 Binding buffer 15 mL 洗涤后,立即加入 10 mL Binding buffer,10 μ L 0.1 mol/L PMSF 悬浮菌体,超声波破碎菌体。菌体超声破碎后,4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 10 min,将上清小心移置到新的洁净的离心管中,记为上清。沉淀用含 8 mol/L 尿素的 Binding buffer 悬浮后,再次超声波

破碎,离心收集上清,标记为包涵体。

上清用 0.22 μ m 的滤器过滤后上样。加样结束后,加入 Binding buffer 洗涤杂蛋白,2 个柱体积后取滤液 2 μ L,用考马斯亮蓝检测颜色变化,一直到无色。加入 1 个柱体积 Elution buffer 后,收集蛋白,SDS-PAGE 检测纯化情况。包涵体纯化过程同上清,仅将含 8 mol/L 尿素的 Binding buffer 和 Elution buffer 代替普通的 Binding buffer 和 Elution buffer。

1.8 *S. melliferum* CH-1 菌株总 RNA 的提取与反转录反应

将螺原体 CH-1 分别接种于 2 管 5 mL 的 R2 培养基中,32 $^{\circ}$ C 培养,用暗视野显微镜观察,在延滞前期和对数期绝大多数螺原体的形态分别表现为点状(电镜观察呈各种不规则的近球状,或末端膨大的稍弯曲的杆状)和螺旋状^[11],分别取样,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min,去上清,收集菌体,用 TaKaRa 公司的 RNA Extraction Kit 试剂盒提取螺原体 CH-1 的总 RNA。将提取的 RNA 立即按 PrimeScriptTM Master Mix 反转录试剂盒的说明书进行反转录反应,产物 cDNA -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.9 实时荧光定量 PCR 检测 *mreB1-5* 基因在螺原体两种不同形态时的表达差异

采用 16S rRNA 基因为内参基因,内参基因与目的基因各设 3 个平行反应管。Real-Time PCR 反应所用引物序列见表 2。反应体系为 2 \times SYBR Premix Ex Taq II 10 μ L,上下游引物各 0.8 μ L,RT 反应液 2 μ L,加灭菌蒸馏水至 20 μ L。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 5 s,56 $^{\circ}$ C 1 min,循环 40 次。其中 60 $^{\circ}$ C 1 min 时读取荧光值,同时进行 ROX 值校正。最后根据 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 的方法处理数据, $\Delta\Delta C_T = (C_{T \text{ 目的基因}} - C_{T \text{ 内参}})_{\text{实验组}} - (C_{T \text{ 目的基因}} - C_{T \text{ 内参}})_{\text{对照组}}$,其中螺原体螺旋状时为对照组,非螺旋状时为实验组^[10]。 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法得到的数据,用 IBM SPSS Statistics 19 软件中配对样品 *t* 检验的方法进行统计分析,若实验组相对于对照组的表达量显著性水平 $P \leq 0.05$,表示差异显著。实验组相对于对照组 *mreB1-5* 基因的表达水平,用柱状图表示。

表 2 Real-Time PCR 所用引物列表 Table 2 Primers used in Real-Time PCR			
引物 Primers	引物序列 Sequence of primers (5'→3')	产物 Products	产物大小 Product sizes (bp)
RT-Fib-F	ATTACCCATAACCAATCACATCT	Δfib	186
RT-Fib-R	TGAAGGAATAAACGCTGG		
RT-mreb1-F	CGAAAAATGAAAGTTTATGGC	$\Delta mreB1$	191
RT-mreb1-R	TCGGAAAATGTCTCCTGCT		
RT-mreb2-F	ATGAAAAACCAGTTCGTGCC	$\Delta mreB2$	112
RT-mreb2-R	ATTCTTGAAAAAGGGGCTAA		
RT-mreb3-F	TGGTGATGCTGTTGCTAATG	$\Delta mreB3$	105
RT-mreb3-R	GCTACACGAACGGGAAT		
RT-mreb4-F	GCATTAGGTGGTGGGGTTG	$\Delta mreB4$	257
RT-mreb4-R	CTTCTTTCATCAGGGTATTTTG		
RT-mreb5-F	ATTACAGTTTGTGGGGGA	$\Delta mreB5$	211
RT-mreb5-R	TTCTTTTTTTACCTAATGTTGAT		
RT-16S -F	AGGCTTGACATCCAGTGC	▲ 16S rDNA	210
RT-16S -R	CATCCCCACCTTCCTCTA		

注：Δ：目的基因；▲：内参。
Note: Δ: Target gene; ▲: Reference gene.

2 结果与分析

2.1 MreB 蛋白的理化性质

经在线工具分析，螺原体 CH-1 中 *mreB1* 所编码的蛋白质预测的分子量为 36 kD，与细菌中 MreB 蛋白大小一致^[2,8]。如表 3 所示，螺原体 CH-1 中的 MreB1–4 蛋白质的平均亲水性数值(Grand average of hydrophilicity)>0，应属疏水性蛋白，不溶于水。而 MreB5 蛋白质的平均亲水性数值<0，应属亲水性蛋白。

2.2 MreB 蛋白的亲疏水性分析

蛋白质亲疏水性预测是蛋白质二级结构预测以

及功能域划分的一个必要过程，通过在线工具 ProtScale 分析了 5 种蛋白质的亲疏水性，其中 MreB1 蛋白(图 1)的多肽链第 95 位 Cys 具有最高的疏水性/亲水性分值 2.233，即疏水性最强，第 326 位有 His 具有最低分值-3.322，即亲水性最强。MreB1–4 蛋白中疏水性氨基酸总数远大于亲水性氨基酸总数，应属疏水性蛋白，MreB5 蛋白则相反，属亲水性蛋白，该结果与蛋白质化学性质预测结果一致。

2.3 MreB1–5 蛋白质的功能域分析

通过 Sanger 在线网站，预测了 MreB1–5 蛋白质的功能域，结果显示 MreB1–5 蛋白属于 MreB/Mbl 蛋白质家族。在这家族中，MreB 是一

表 3 螺原体 CH-1 <i>mreB</i> 基因编码的蛋白质的理化性质 Table 3 Predicted properties of protein translated by <i>mreB</i> of <i>S. melliferum</i> CH-1							
<i>mreB</i> 基因 <i>mreB</i> genes	开放阅读框大小 Open reading frame sizes (bp)	氨基酸数目 Number of amino acids (aa)	分子量 Molecular weight (Da)	理论等电点 Theoretical pI	不稳定性系数 Instability index	脂肪系数 Aliphatic index	总平均亲水性 Grand average of hydrophilicity
<i>mreB1</i>	1 002	333	36 610.7	6.08	34.10	111.50	0.030
<i>mreB2</i>	669	222	23 895.0	6.00	20.41	128.24	0.259
<i>mreB3</i>	663	220	23 745.6	6.64	39.04	106.00	0.051
<i>mreB4</i>	1 044	347	37 986.3	8.58	32.96	107.87	0.052
<i>mreB5</i>	690	229	25 211.1	6.00	47.65	108.60	-0.075

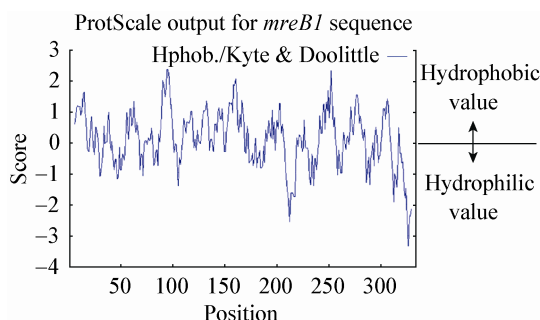


图1 MreB1的亲疏水性

Figure 1 Hydrophilicity or hydrophobicity of MreB1

个已知的决定杆状细菌形态的蛋白质,并且补充了细菌的细胞骨架,编码 MreB/Mbl 蛋白的基因仅在细长的非球形的细菌中发现,而不是球形的细菌^[15],推断 MreB 蛋白对于螺原体螺旋形的形成十分重要。

2.4 pETmreB 重组质粒的构建及验证

分别将 *mreB1-5* 基因克隆到 pET-28a 载体上,随机挑选转化子,以 T7、T7 terminator 为引物进行菌体 PCR 鉴定和 *Xho* I/*Nde* I 双酶切鉴定,1%的琼脂糖凝胶电泳显示所挑选的转化子都插入了相应大小的片段,此为阳性克隆。将获得的阳性重组子进行质粒 DNA 测序,测序结果与 *mreB* 基因相比较,结果表明克隆的目的基因核苷酸序列均无碱基突变,完整的目的基因已正确插入表达载体 pET-28a 的特定位置(图2),将带有重组子的菌株分别命名为 pM1-5,重组质粒命名为 pETmreB1-5。

2.5 重组蛋白的诱导表达及纯化

12% SDS-PAGE 分析表明,重组质粒 pETmreB1-5 的 BL21 宿主菌(pM1-5),经 IPTG 诱导后表达,纯化后目的条带清晰,分子量分别为 36、23、23、37、25 kD,均与预期理论值一致(图3)。其中 MreB1 蛋白分子量和 *Bacillus subtilis* 的 *mreB* 基因在 *E. coli* 中克隆表达所获得的重组 MreB 蛋白的大小一致,都为 36 kD^[16]。而且,将包涵体和上清所纯化的蛋白进行 SDS-PAGE 检测,发现目的蛋白在包涵体中存在(图3中泳道4、8、12、16、20),在上清中仅存在杂蛋白,不存在目的蛋白(图3中泳道3、7、11、15、19)。

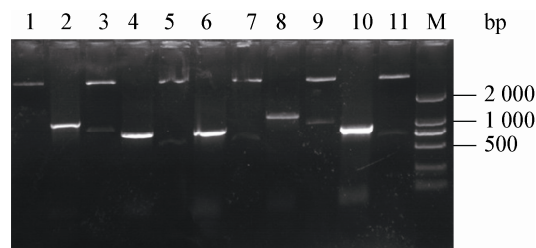


图2 重组质粒 pETmreB 验证

Figure 2 Corroboration of recombinant plasmid pETmreB

注: M: DNA marker (2 000 bp); 1: 质粒 pET-28a *Xho* I/*Nde* I 双酶切; 2、4、6、8、10: 分别为5个重组菌 pET1-5 的菌液 PCR 验证; 3、5、7、9、11: 分别为5个重组质粒 pETmreB1-5 *Xho* I/*Nde* I 双酶切验证。

Note: M: DNA marker (2 000 bp); 1: Plasmid pET-28a digested by *Xho* I and *Nde* I; 2, 4, 6, 8, 10: Colony PCR of five recombinant strains pET1-5, respectively; 3, 5, 7, 9, 11: Five recombinant plasmids pETmreB1-5 digested by *Xho* I and *Nde* I, respectively.

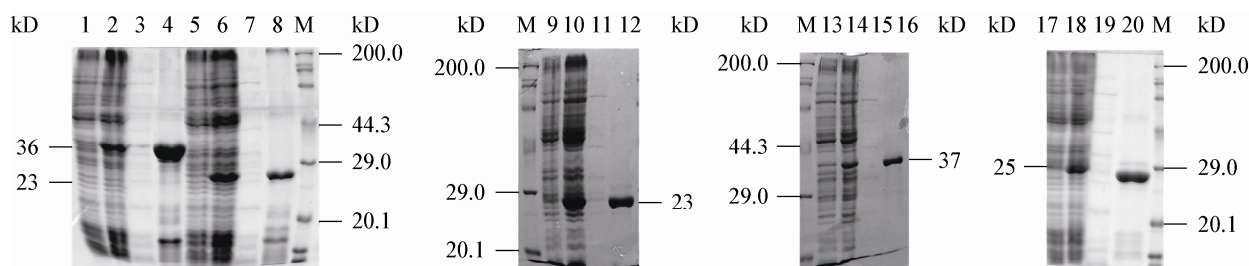


图3 重组 MreB 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Figure 3 Analysis of purification recombination MreB proteins by SDS-PAGE

注: M: 蛋白 Marker; 1、5、9、13、17: 分别为 IPTG 诱导前的 pM1-5 总蛋白; 2、6、10、14、18: 分别为 IPTG 诱导后的 pM1-5 总蛋白; 3、7、11、15、19: 纯化后的上清蛋白; 4、8、12、16、20: 纯化后的包涵体蛋白 MreB1-5。

Note: M: Marker; 1, 5, 9, 13, 17: Total proteins of pM1-5 before inducing by IPTG, respectively; 2, 6, 10, 14, 18: Total proteins of pM1-5 induced by IPTG; 3, 7, 11, 15, 19: Purified proteins of supernatant; 4, 8, 12, 16, 20: Purified proteins MreB1-5 of inclusion body.

2.6 *mreB1-5* 基因在螺原体两种不同形态时的相对表达量

细胞骨架相关基因 *mreB1-5* 在螺原体 CH-1 螺旋状和非螺旋状时的表达水平见柱形图 4。如图所示, *mreB1-5* 基因在非螺旋状时的表达量相对于螺旋状时表达量都显著减少。以螺原体螺旋状时为对照组, 非螺旋状时为实验组, 实验组相对于对照组 $*P<0.05$, 说明表达量存在显著差异。

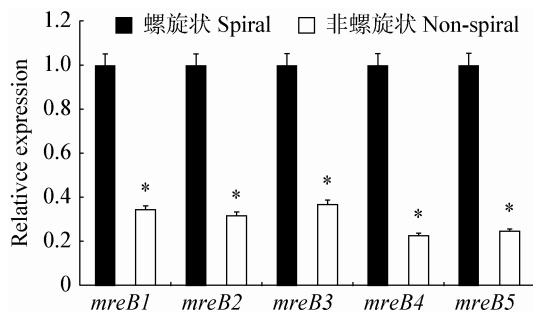


图 4 *mreB1-5* 基因在螺原体 CH-1 螺旋状和非螺旋状时表达量的显著差异

Figure 4 Significant differences of relative expression levels of *mreB1-5* genes in spiral and non-spiral shape of *S. melliferum* CH-1

注: *: 用 *t* 检验法统计分析 *mreB1-5* 基因在螺原体螺旋状和非螺旋状时表达量呈显著差异 ($P<0.05$).

Note: *: Significant differences of relative expression levels of *mreB1-5* genes in spiral and non-spiral shape of *spiroplasma* were analyzed by Student's *t*-test ($P<0.05$).

3 讨论

螺原体属于柔膜菌纲, 不似其他细菌有细胞壁, 但是它仅靠单层膜也能维持螺旋状的特殊形态和运动形式。细胞的形态和运动方式也与其细胞骨架有关, *mreB* 基因是编码细胞骨架蛋白的相关基因之一。已发现 *mreB* 基因普遍存在于厚壁菌门的基因组中, 柔膜菌纲中也发现有该基因, 但不是所有柔膜菌纲基因组中都有, 例如支原体(*Mycoplasma*)基因组中就不存在 *mreB* 基因, 而在螺原体中却发现该基因^[17]。因此研究螺原体 *mreB* 基因有重要的意义。本研究根据螺原体基因组中的细胞骨架相关基因 *mreB* 设计引物, 第一次克隆了 *mreB1-5* 基因,

在大肠杆菌中表达并纯化。革兰氏阴性细菌有单一的 *mreB* 基因, 而革兰氏阳性细菌通常有多个 *mreB* 基因, 例如 *B. subtilis* 就有 3 个 MreB 蛋白亚型^[18]。螺原体虽无细胞壁, 但在系统发育学上与革兰氏阳性菌同源^[19], 所以不难理解螺原体有 5 个 *mreB* 基因, 也进一步验证了螺原体与革兰氏阳性细菌的亲缘关系。在蛋白纯化时发现 MreB1-5 目的蛋白存在于包涵体之中, 需用含 8 mol/L 尿素的 Binding buffer 才能溶解, 属于疏水性蛋白质, 与生物信息学预测的结果 MreB1-4 为疏水性蛋白相符, 但是 MreB5 预测为亲水性蛋白, 实际纯化时却表现为疏水蛋白的性质, 可能是由于 MreB5 蛋白质的平均亲水性数值接近于 0 (-0.075), 亲水性较小, 故在纯化时表现为疏水蛋白。

Mayer 和 Amann 在 *E. coli* 中克隆表达了 *B. subtilis* 的 *mreB* 基因, 纯化的 MreB 蛋白在低盐的溶液中完全可溶^[16]。Van den Ent 等^[8]克隆表达了 *Thermotoga maritima* 中 2 个 *mreB* 基因, 其中 MreB1 蛋白是亲水性蛋白, MreB2 蛋白是疏水性蛋白, MreB1 蛋白的亲水性可能由于其与 *B. subtilis* 中 MreB 蛋白的相似性相对较高, 达到 76%。而本文螺原体中 MreB1-5 蛋白氨基酸序列与 NCBI 上 *B. subtilis* 的氨基酸序列(GenBank: AAA22397)差异较大, 相似性分别仅为 37.39%、25.94%、24.27%、37.25%和 28.53%。纯化时又发现, MreB1-5 蛋白仅存在于包涵体中, 用含 8 mol/L 尿素的 Binding buffer 才可溶解。结合生物信息学分析, 推测表达的螺原体 CH-1 中的 MreB 蛋白可能都是疏水性蛋白。生物信息学分析显示 MreB1-5 属于 MreB/Mbl 蛋白质家族, 该家族由细菌 MreB 和 Mbl 蛋白以及与此两个蛋白相关的序列组成, Mayer F.推测真核细胞骨架的成分(微管蛋白, 肌动蛋白)可能是由与细菌蛋白质 FtsZ 和 MreB/Mbl 密切相关的原核前体蛋白进化而来^[15]。

在螺原体培养过程中, 用暗视野显微镜观察在延滞前期绝大部分螺原体成点状(在电镜下观察呈

各种不规则的近球形,或末端膨大的稍弯曲的杆状),而对数生长期的形态主要为螺旋状^[11,13],利用 Real-Time PCR 的方法,相对定量螺原体 CH-1 在螺旋状和非螺旋状时 *mreB1-5* 基因的表达,结果表明 *mreB1-5* 基因在非螺旋状时的表达量相对于螺旋状时表达量存在显著差异,即螺原体在典型的螺旋形时,*mreB* 基因的表达量比螺原体在非螺旋状时表达量显著提高,初步表明螺原体 CH-1 维持螺旋形可能需要 *mreB1-5* 基因的参与,这些细胞骨架相关基因可能与螺原体的形态相关。

Mayer 和 Amann 通过聚合实验、磷酸盐的释放试验、ATP 分解实验等描述了 *B. subtilis* 的 MreB 蛋白主要的生物化学性质和聚合特点^[16]。为了研究螺原体的 MreB 蛋白是否有类似的性质,后续工作将利用纯化的 MreB 蛋白完成体外聚合实验,用电子显微镜观察聚合后 MreB 的结构特点。还需要通过基因敲除等方法进一步鉴定螺原体 *mreB* 基因的功能。但是由于螺原体的特殊性,目前国内外还没有比较完善的螺原体基因敲除等遗传操作体系,本文为研究构建螺原体基因敲除系统、进一步验证细胞骨架相关基因的功能奠定基础。

致谢:本文中 pET-28a(+)质粒由南京农业大学生命科学学院郑会明老师馈赠,蛋白质纯化技术由南京基蛋生物科技有限公司周坤先生和南京健友生化制药股份有限公司王旋先生提供指导,一并表示衷心感谢。

参 考 文 献

- [1] Trachtenberg S, Gilad R, Geffen N. The bacterial linear motor of *Spiroplasma melliferum* BC3: from single molecules to swimming cells[J]. Molecular Microbiology, 2003, 47(3): 671-697.
- [2] Trachtenberg S, Dorward LM, Speransky VV, et al. Structure of the cytoskeleton of *Spiroplasma melliferum* BC3 and its interactions with the cell membrane[J]. Journal of Molecular Biology, 2008, 378(4): 778-789.
- [3] Kürner J, Frangakis AS, Baumeister W. Cryo-electron

- tomography reveals the cytoskeletal structure of *Spiroplasma melliferum*[J]. Science, 2005, 307(5708): 436-438.
- [4] Trachtenberg S. Mollicutes[J]. Current Biology, 2005, 15(13): R483-R484.
 - [5] Townsend R, Archer D, Plaskitt K. Purification and preliminary characterization of spiroplasma fibrils[J]. Journal of Bacteriology, 1980, 142(2): 694-700.
 - [6] Williamson D, Renaudin J, Bové J. Nucleotide sequence of the *Spiroplasma citri* fibril protein gene[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(14): 4353-4362.
 - [7] Trachtenberg S, Gilad R. A bacterial linear motor: cellular and molecular organization of the contractile cytoskeleton of the helical bacterium *Spiroplasma melliferum* BC3[J]. Molecular Microbiology, 2001, 41(4): 827-848.
 - [8] Van den Ent F, Amos LA, Löwe J. Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton[J]. Nature, 2001, 413(6851): 39-44.
 - [9] Kürner J, Medalia O, Linaroudis AA, et al. New insights into the structural organization of eukaryotic and prokaryotic cytoskeletons using cryo-electron tomography[J]. Experimental Cell Research, 2004, 301(1): 38-42.
 - [10] 蒋雪娇. 螺原体细胞骨架蛋白与其细胞形态关系的研究[D]. 南京: 南京师范大学硕士学位论文, 2011.
 - [11] 胡冰, 贺子义, 李霞. 螺原体超微形态的电镜研究[J]. 电子显微学报, 2011, 30(6): 547-551.
 - [12] 阮康勤, 周秀文, 张晶, 等. 蜜蜂螺原体的分离鉴定及致病性研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(4): 695-699.
 - [13] 俞徐斌. 牛虻和家蝇螺原体的生物学特性及蜜蜂螺原体致病相关因子的探索[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2013.
 - [14] 孙理云. 用生物信息学方法预测猪链球菌2型05ZYH33株的脂蛋白[J]. 微生物学报, 2008, 48(8): 1104-1109.
 - [15] Mayer F. Cytoskeletons in prokaryotes[J]. Cell Biology International, 2003, 27: 429-438.
 - [16] Mayer JA, Amann KJ. Assembly properties of the *Bacillus subtilis* actin, MreB[J]. Cell Motility and the Cytoskeleton, 2009, 66(2): 109-118.
 - [17] Lo WS, Ku C, Chen LL, et al. Comparison of metabolic capacities and inference of gene content evolution in mosquito-associated *Spiroplasma diminutum* and *S. taiwanense*[J]. Genome Biology and Evolution, 2013, 5(8): 1512-1523.
 - [18] Muñoz-Espín D, Daniel R, Kawai Y, et al. The actin-like MreB cytoskeleton organizes viral DNA replication in bacteria[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106(32): 13347-13352.
 - [19] Weisburg W, Tully J, Rose D, et al. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification[J]. Journal of Bacteriology, 1989, 171(12): 6455-6467.