

# 盐生盐杆菌 DNA 片段 RM07 的 -35、-10 区缺失分析\*

王 茵 黄玉屏 段珍红 沈萍\*\*

(武汉大学生命科学学院 武汉 430072)

**摘要:** RM07 DNA 片段分离自嗜盐古菌——盐生盐杆菌 R1, 该片段不仅在嗜盐古菌内具有启动子功能, 而且在大肠杆菌中也具有启动子活性。序列分析表明其上确实含有细菌启动子的-35、-10 保守区。进一步通过缺失分析证实该片段就是在大肠杆菌中具启动功能的 DNA 片段: 仅含-10 区而缺失-35 区的 RM07a 片段基本上无启动活性; 而含-35 和-10 区的 0.1kb 片段 RM07b 具有高于 RM07 的启动活性。研究结果还表明, RM07 片段在大肠杆菌中的启动活性是受环境因素调节的, 尤其是对氯化钠浓度的提高具有明显的相关性。因此 RM07 片段有可能成为构建双功能表达载体的新启动子资源, 同时对进一步揭示古菌的融合特征及水平基因转移具有特殊意义。

**关键词:** 盐生盐杆菌, 启动子活性, 大肠杆菌, 缺失分析, RM07 片段

**中图分类号:** Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 01-0069-06

## DELETION ANALYSIS OF DNA FRAGMENT RM07 FROM *HALOBACTERIUM HALOBIVM*

WANG Yin HUANG Yu-Ping DUAN Zhen-Hong SHEN Ping

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

**Abstract:** The DNA fragment RM07 was isolated from halophilic archaea *Halobacterium halobium*, which can function as promoter not only in halophilic archaea, but also in *Escherichia coli* as eubacterial promoter. Sequencing analysis indicated that it possessed the typical consensus sequences (-35 and -10) of bacterial gene promoter, which was confirmed by further deletion analysis: With its -35 sequence deleted and -10 sequence left, DNA fragment RM07a nearly cannot initiate transcription; With its both -35 and -10 sequences, RM07b DNA fragment could be active as promoter at a level even higher than RM07. Our research also showed that the promoter function of RM07 fragment in *Escherichia coli* was under the control of environmental factors, especially its positive correlation with the increasing concentration of sodium chloride. Therefore, RM07 DNA fragment may be potential novel promoter source for constructing double-function vectors. It also has special significance in elucidating the issues of the fusing characteristics of archaea and lateral gene transfer between archaea and bacteria.

**Key words:** *Halobacterium halobium*, Promoter function, *Escherichia coli*, Deletion analysis, RM07 DNA fragment

盐生盐杆菌 (*Halobacterium halobium*) 是一类只能在高盐浓度 (15% ~ 30%) 下才能正常生长并维持其结构稳定性与完整性的极端嗜盐古菌<sup>[1]</sup>。古菌 (Archaea) 是一类被称之为第三生命形式的特殊生命体<sup>[2]</sup>, 与细菌、真核生物一起组成生命系统发育的

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39770009, 29973030)

Project Grant by Chinese National Natural Science Fund (No. 39770009, 29973030)

\*\* 联系人 E-mail: pingshen@whu.edu.cn

收稿日期: 2003-03-24, 修回日期: 2003-05-10

三大域(即古菌域、细菌域和真核生物域)。它兼具有细菌、真核生物的融合特征以及自身的特性,目前一般认为古菌的形态结构、生长繁殖、代谢、基因组特征均类似于细菌;而转录、翻译、复制等信息传递系统则类似于真核生物<sup>[3-6]</sup>。但近来也有报道认为古菌虽具有类似于真核生物的RNA聚合酶的基本转录装置,但其某些转录因子却和细菌更类似<sup>[7]</sup>。因此,古菌的这些独特性质和分类地位已使其成为研究生命起源、进化以及开发利用新的微生物资源的极其有价值的生命类群。

我们以前报道了盐生盐杆菌的质粒极其物理图谱<sup>[8,9]</sup>以及从该菌质粒上分离到能在大肠杆菌中具有启动子活性的DNA片段<sup>[10]</sup>。近年来,我们又从该菌的染色体上分离到20多个这样的DNA片段<sup>[11]</sup>,这是否暗示古菌中除了某些转录因子类似于细菌外,负责转录起始的某些启动子也类似于细菌而并非完全类似于真核生物呢?为了进一步证实这一新的现象,本文将对其中的RM07片段通过缺失分析作进一步的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 HB101 (*E. coli* HB101, Amp<sup>r</sup>, Cm<sup>r</sup>), 质粒 pKK232-8 均由本室保存和提供; 盐生盐杆菌 R1 (*Halobacterium halobium* R1) 由中国典型培养物保藏中心提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 大肠杆菌质粒 DNA 的提取、琼脂糖凝胶电泳、限制性酶切分析、感受态细胞的制备及转化反应:** 均按文献<sup>[12]</sup>进行。DNA 片段分离纯化采用 Omega Bio-tek 公司的 E.Z.N.A. 凝胶回收试剂盒, 回收方法按试剂盒说明书进行。

**1.2.2 PCR 扩增:** 采用 PCR 方法特异性扩增 RM07 片段上保留-35 区和-10 区的 344bp~446bp 区域, 结合载体的多克隆位点, 在其上游引物 P1 导入 *Bam*H I 识别位点, 为 5'-GCG GGA TCC AAC TCC TCA CCC AGC GTC, 而其下游引物 P2 则导入 *Hind* III 识别位点: 5'-GCG AAG CTT ACA TCA ACC TCA GCA AAT CC。

**1.2.3 DNA 序列测定:** 将测序片段亚克隆于 pUC18 载体, 送由上海博亚生物技术有限公司进行测序。

**1.2.4 转录启动活性的测定:** CAT ELISA 购自 Boehringer Mannheim 公司, 用于测定大肠杆菌表达的氯霉素乙酰基转移酶, 测定方法按试剂盒说明书进行。

**1.2.5 不同的生长条件对启动活性的影响:** 分别将 ERM07 菌株接种至含有不同浓度葡萄糖(0.2%、0.5%、1.0%、1.5%)、氯化钠(0.2%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%) 和不同 pH 值(pH5.0、pH5.5、pH6.0、pH6.5、pH7.0、pH7.5、pH8.0、pH8.5) 的液体 LB 培养基中过夜培养, 然后分别在加有不同浓度氯霉素的一系列平板上划线, 检测该菌株在不同条件下的可生长的最大氯霉素水平。

## 2 结果

### 2.1 RM07 片段的序列特征

RM07 片段是用以前报道的方法<sup>[10]</sup> 将用 *Sal* I 部分酶切的盐生盐杆菌 R1 染色体 DNA 与用 *Sal* I 完全酶切的启动子探测质粒 pKK232-8 (Amp<sup>r</sup> Cm<sup>r</sup>, Cm 上游的启动子缺失, 代之以多克隆位点) 经体外连接后转化大肠杆菌 HB101 (Amp<sup>r</sup> Cm<sup>r</sup>), 并在含氨基青霉素和氯霉素的平板上筛选转化子(抗性水平为 250mg/L) 而获得, 含 RM07 片段的

质粒称为 pRM07 (图 1)。将 RM07DNA 片段亚克隆到 pUC18 质粒上进行序列测定, 结果如下:

RM07: (G + C) % = 60.2%

1 G ↓ TCGACTGTC GATCAGTCCC GTTCACCGCC AGCACGTGCC ACAGTCAACC ACGCACCTGA CAGACCGCCG GCTAC- /  
CAACG GGTGCCAGCT ACACACGAAA

101 GAAACCGCGA TTGGGAGAAT CTACCGCCCG TCITACAGCT TGACCG ██████████ ACGGATTCAG GGACGT-  
TCGC CCAGTAGGT ██████████

201 CGTACTGCGT GGTACCGTTC AACTGCACCT CGTCACCAGC GCGAGCTTG GAGCTGACGC CGCCGGCGTA CATCAT-  
GACC TTGATGCGGT CGGACTGCTG

301 GACCAGCAGC TTGTGCTGTG TCCCCTTGAT CGAGGT ██████████ CACCCAGCGT CGTC <sup>-35</sup> TGTGCA G ↓ CT-  
CGGTGG CGTGGT <sup>-10</sup> TAG GGT GGTGGCT

401 TTGTCCGGCG CGATCCACTG GATCGTGGAT TTGCTGAGGT TGATCTGTC GGCTCCGGCG GCCTGGCCCA CGGTGAGGT  
CACGTAG ↓ TCG AC

注: G ↓ TCGAC 为 *Sal* I 酶切位点; CAG ↓ CTG 为 *Pvu* II 酶切位点。黑体字母部分 (372bp ~ 392bp) 为 RM07a 片段;  
下划虚线的斜体字母部分 (344bp ~ 446bp) 为 RM07b 片段。

从测序结果可以看出, RM07 片段除了含有 3 个分布的嗜盐古菌启动子的特征序列 DPE (*distal promoter element*) (显示嗜盐菌启动子特征区域 DPE) 外, 确实发现该片段上还具有典型的细菌启动子的 -35 和 -10 保守序列 (□ 示原核启动子共同序列 -35 区和 -10 区), 其间相隔 17 个碱基。

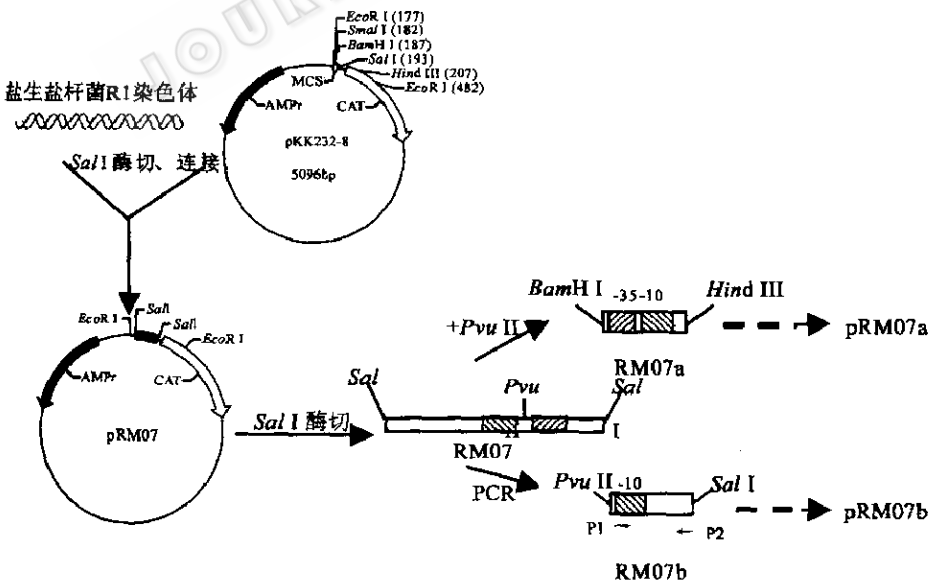


图 1 质粒 pRM07 的构建和 RM07 片段缺失分析的示意图

## 2.2 RM07 片段上的 -35 和 -10 保守区的缺失分析

2.2.1 pRM07a、pRM07b 的构建: 利用 -35 区和 -10 区之间的单一酶切位点 *pvu* II (平端) 切割 RM07 片段, 获得只有 -10 区而缺乏 -35 区的 RM07a 片段 (372bp ~ 492bp,

0.12kb); 以 RM07 片段为模板, 由引物 P1、P2 经 PCR 特异性扩增得到保留有-35 和-10 区, 大小为 0.1 kb 的 RM07b 片段 (344bp ~ 446bp)。启动子探针载体 pKK232-8 分别用 *Sma* I (平端) 和 *Sal* I、*Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切后与 RM07a 和 RM07b 进行连接, 所得连接产物转化大肠杆菌 HB101 后获得的转化子重组质粒, 分别命名为 pRM07a 和 pRM07b。整个构建过程显示在图 1 中。

**2.2.2 pRM07a 和 pRM07b 重组质粒的酶切分析、PCR 鉴定及序列确证:** 由于重组质粒 pRM07a 和 pRM07b 上的插入片段大小均约 0.1kb, 与载体质粒 pKK232-8 相差不明显, 因此我们利用 pKK232-8 质粒上多克隆位点两侧的 *Eco*R I 酶切位点分别切割 pRM07a、pRM07b、pRM07 以及 pKK232-8, 并进行凝胶电泳比较分析。结果表明载体质粒 pKK232-8 显示大小分别为 4.8kb 和 0.3kb 的二条带; pRM07 所显示其中一条与载体质粒酶切后的大片段相平齐的 4.8kb 的带, 另一条约为 0.8kb (载体酶切后的小片段 0.3kb + RM07 的 0.5kb); 而重组质粒 pRM07a 和 pRM07b 除了有相同的一条大小为 4.8kb 的带外, 还分别有 0.42kb (0.3kb + 0.12kb) 和 0.4kb (0.3kb + 0.1kb) 带, 均与理论值相符 (图 2)。

为进一步区分 pRM07a 和 pRM07b, 用特异性扩增出 RM07b 片段的引物 P1、P2 进行 PCR 检测, pRM07 以及 pKK232-8 分别作为对照。PCR 产物的凝胶电泳 (图 3) 显示: pRM07b 可见有大小为 0.1kb 的 DNA 带, 而 pRM07a 不能扩增出相应的产物。

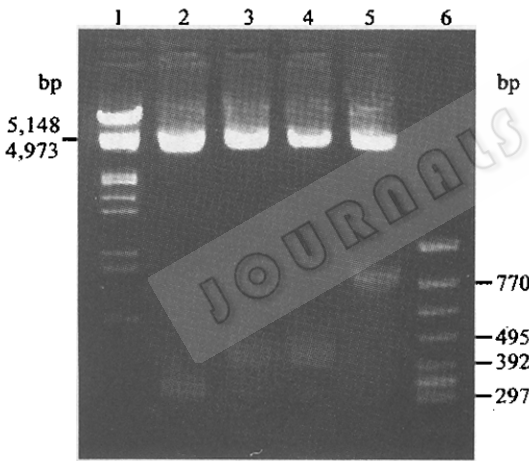


图2 pRM07a 和 pRM07b 酶切电泳分析图谱

1  $\lambda$ DNA/ *Hind*III + *Eco*R I, 2 pkk232-8 / *Eco*R I,  
3 pRM07a / *Eco*R I, 4 pRM07b / *Eco*R I,  
5 pRM07 / *Eco*R I, 6  $\phi$ X174-*Hinc*II

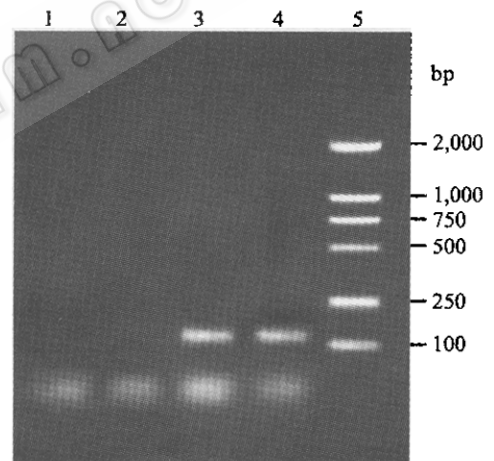


图3 PCR 方法检测 pRM07a 和 pRM07b 的外源启动子 DNA 片段

1 pkk232-8, 2 pRM07a, 3 pRM07b,  
4 pRM07, 5 DL2000 marker

对片段 RM07b 进行序列测定, 将 pRM07b 上的插入片段 RM07b 经 *Bam*H I 和 *Hind*III 亚克隆到 pUC18 上进行测序的结果证实片段 RM07b 与原片段 RM07 上相应部分的序列完全一致。

**2.2.3 重组质粒抗性水平的检测和氯霉素乙酰基转移酶活性的测定:** 将分别含有 pRM07a、pRM07b、pRM07 以及 pKK232-8 的大肠杆菌菌株分别命名为 ERM07a、ERM07b、ERM07 和 E232-8。通过涂布在含有浓度从零依次增大的氯霉素 LB 平板上检测其抗性水平。结果表明 ERM07a (缺失-35 区) 的抗性水平为 5mg/L; ERM07b (含-35 区和-10 区) 的抗性水平为 280mg/L; ERM07 为 250mg/L; 对照 E232-8 在含有氯霉素的

平板上不能生长(表1)。

将重组菌株 ERM07a、ERM07b 和对照菌株 ERM07 和 E232-8 分别接种至含氨基青霉素的 LB 液体培养基, 37℃ 培养 16h, 超声破碎后用 CAT ELISA 试剂盒测定细胞裂解液中 cat 基因的表达量。结果表明 E232-8 和 ERM07a 的氯霉素乙酰基转移酶的表达产量为零; ERM07 的 CAT 产量为 1.78ng/mL; 而 ERM07b 的产量为 2.04ng/mL (表 1)。

从表 1 可以看出, 无论是平板上的抗性水平检测还是用 CAT ELISA 试剂盒测定 CAT 的表达量, 其结果都表明含有完整的-35 区和-10 区的 RM07b 片段(0.1kb) 的启动活性不仅明显高于片段 RM07a, 而且也高于 RM07 片段(0.5kb)。

表 1 重组转化子的抗性水平及 CAT ELISA 测定

	重组转化子		对照菌株	
	ERM07a	ERM07b	ERM07	E232-8
抗性水平 (mg/L)	5	280	250	0
CAT (ng/mL)	~ 0	2.04	1.78	0

2.3 不同生长条件对 RM07 片段启动活性的影响

2.3.1 葡萄糖浓度的影响: 将 ERM07 接种至葡萄糖浓度为 2g/L、5g/L、10g/L、15g/L 的液体 LB 培养基中过夜培养, 再分别在加有氯霉素浓度从零逐渐增高的上述葡萄糖浓度 LB 平板上检测其抗性水平, 结果依次为 250mg/L、275mg/L、300mg/L、300mg/L (图 4-a), 即增加 LB 培养基中的葡萄糖浓度能一定程度地提高 ERM07 菌株的氯霉素抗性水平。

2.3.2 氯化钠浓度的影响: 将 ERM07 接种至氯化钠浓度为 2g/L、5g/L、10g/L、15g/L、20g/L、25g/L 的液体 LB 中过夜培养, 再分别在加有氯霉素浓度从零逐渐增高的上述不同氯化钠浓度的 LB 平板上检测其抗性水平, 结果依次为 125mg/L、250mg/L、275mg/L、300mg/L、350mg/L、350mg/L (图 4-b)。这表明培养基中氯化钠的浓度对 ERM07 菌株的氯霉素抗性水平的影响更明显, 低浓度下 ERM07 菌株仍能生长, 但其氯霉素抗性显著减小, 而随着氯化钠浓度提高, 该菌株的抗性水平有较大的增强。

2.3.3 pH 值的影响: 将 ERM07 接种至 pH 值为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 的液体 LB 培养基中过夜培养, 然后分别在加有氯霉素浓度从零逐渐增高的上述各 pH 值的 LB 平板上检测其抗性水平, 结果依次为 300mg/L、275mg/L、250mg/L、250mg/L、250mg/L、250mg/L、200mg/L、175mg/L (图 4-c), 说明 pH 值变化时, 酸性培养条件下的该菌较碱性培养条件下具有更高的氯霉素抗性水平。

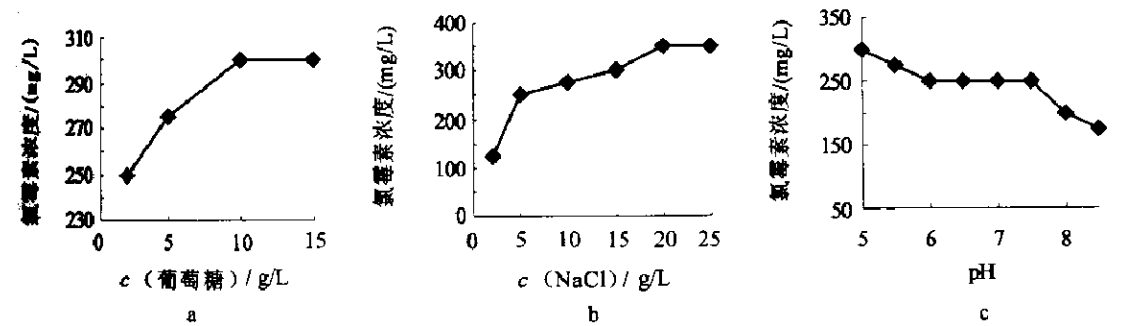


图 4 不同生长条件下 RM07 片段的启动活性

a 不同的葡萄糖浓度, b 不同的氯化钠浓度, c 不同的 pH 值

### 3 讨论

我们从盐生盐杆菌染色体上分离到的在大肠杆菌中具有启动子活性的 DNA 片段 RM07, 通过进一步的缺失分析, 证实该序列上的-35 区和-10 区的完整性确为其在在大肠杆菌中具启动活性所必需: 其中酶切缺失了-35 区只保留-10 区的 DNA 片段 RM07a 的启动子活性大大降低近于零, 说明-35 区对于保证启动子的活性具有不可或缺的重要作用; 而保留了-35 区和-10 区保守序列的 DNA 片段 RM07b, 该片段大小显著减小, 而其启动活性不但未受影响, 还有所提高, 从而证实 0.1kb 的 RM07b 片段上、下游部分为非必需区, 甚至可能在一定程度上是具有抑制作用的区域。这一研究结果无疑为构建双功能(在古菌和大肠杆菌中均具启动功能)表达载体提供了一种新的启动子来源。此外, 对不同生长条件下 RM07 片段启动活性的变化检测的结果表明一定的葡萄糖浓度、酸性 pH 值和高于通常的氯化钠浓度的培养条件下可提高 RM07 片段在大肠杆菌中起始 CAT (氯霉素乙酰基转移酶基因) 转录的活性; 低于通常的氯化钠浓度和碱性 pH 值的条件下, 即使菌落的生长未受显著地抑制, 而 RM07 片段的启动活性大大下降了。这些结果表明 RM07 片段在大肠杆菌中的启动活性是受环境因素调控的, 特别是氯化钠浓度的提高具有明显的促进作用, 这是否与该片段来源于极端嗜盐菌有关, 尚需进一步证实。但是这一特征也许更适合构建在高盐环境下高效表达的载体, 以适应于某些环境污染处理的应用。

至于为什么嗜盐古菌的染色体上会含有能在大肠杆菌中具有启动活性 DNA 片段或转录因子<sup>[7]</sup>, 这除了古菌本身的特性仍然还是一个未解的谜之外, 自然界中频繁发生的水平基因转移无疑是重要的原因<sup>[13-14]</sup>, 因此我们在嗜盐古菌中发现的双功能启动子片段, 对进一步完善三域系统发育树和进一步揭示水平基因转移的实质也具有特殊的意义。

### 参 考 文 献

- [1] Woese C R, Kandler O, Wheelis M L. PNAS, 1990, 87: 4576 ~ 4597.
- [2] Gray M W. Nature, 1997, 383: 299 ~ 300.
- [3] David E G, Overbeek R, Olsen G J, *et al.* PNAS, 2000, 97: 3304 ~ 3308.
- [4] Gray J O, Woese C R. 1997, 89: 991 ~ 994.
- [5] Terry G. Current Opinion in Microbiology, 1999, 2: 542 ~ 547.
- [6] Eloranta J J, Kato A, Teng M S, *et al.* Nucleic Acids Research, 1998, 26: 5562 ~ 5567.
- [7] Aravind L, Koonin E V. Nucleic Acids Res, 1999, 27: 4658 ~ 4670.
- [8] CHEN Y J, SHEN P. Acta Genetica Sinica, 1994, 21 (5): 409 ~ 416.
- [9] Xuecheng Y, Jianhong O, Ping S, *et al.* FEMS Microbiology Letters, 2003, 221: 53 ~ 57.
- [10] SUN G X, JIANG A M, SHEN P. Acta Genetica Sinica, 1997, 179: 7135 ~ 7155.
- [11] HUANG Y P, DUAN Z H, SHEN P, *et al.* Wuhan University Journal of Natural Sciences, 2001, 47: 456 ~ 462.
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989.
- [13] Howard O, Jeffrey G. Lawrence, Eduardo A. Groisman. Nature, 2000, 405: 299 ~ 304.
- [14] Karen E N, Rebecca A C, Steven R G, *et al.* Nature, 1999, 399: 323 ~ 328.