

粘细菌转录因子 FruA 的表达、纯化及调控作用*

毛晓华 丁 蕾

(南京铁道医学院生化教研室 南京 210009)

提 要: FruA 是粘细菌(*Myxococcus xanthus*)发育所必需的转录因子,影响着一系列发育特异性基因的表达。在大肠杆菌中表达了带组氨酸标记的 FruA,并用镍离子层析进行快速分离纯化。凝胶阻滞试验提示 FruA 对靶基因的调控可能需要其它因子的参与。

关键词: FruA, 表达, 纯化, 调节

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2000) 02-0121-25

粘细菌(*Myxococcus xanthus*)是革兰氏阴性的土壤菌。它的一个鲜明的特点是在营养缺乏时经历一种多细胞发育阶段^[1],多达 10^7 个细胞相互作用向一个中心聚集,最终形成子实体(fruiting body)。在粘细胞聚集并形成子实体的过程中,细胞渐渐变短,最终变为圆形的粘孢子(myxospore)。当恢复营养的供给时,粘孢子重新萌发开始营养性生长的过程。正由于粘细菌具有这种多细胞的发育周期,它成为研究原核生物发育的良好模型。*fruA* 是从粘细菌中分离的发育特异性表达基因^[2],它的编码产物是一种粘细菌发育所必需的转录因子,影响着其他一系列发育特异性基因的表达。本文报道 *fruA* 完整的编码基因在大肠杆菌的表达与纯化,并对其生物学功能作一些初步的分析,为进一步研究 FruA 在粘细菌发育进程中的地位和作用,明确其对靶基因的调控机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌种、培养基、试剂和酶

1.1.1 质粒: pSI00, pMFA05, pUC9NdeI 由 Dr. Inouye. S 赠送。其中 pSI003 含粘细菌 S 蛋白编码基因 *tps*, pMFA05 含基因 *fruA*, pUC9NdeI 从 pUC9 衍生而来,其多克隆位点中引入了 NdeI 识别序列。质粒 pET16b 为本室保存。

1.1.2 菌株: *E. coli* BL21(DE3)为本室保存。

1.1.3 培养基: LB 按文献[3]配制。M9-酪蛋白水解物-氨苄青霉素培养基(1000 mL): 酪蛋白水解物 2g, 琼脂 15g, 去离子水 872mL, 灭菌后加入下列无菌成份: $10\times$ M9 盐溶液 100mL, 0.81mol/L MgSO_4 1.0mL, 40% 葡萄糖 10mL, 0.5mg/mL 维生素 B1 4.0 mL, 冷却后加入氨苄青霉素至终浓度 $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。

1.1.4 试剂和酶: 限制性内切酶、连接酶为华美公司产品, Klenow 大片段酶为 Boehringer 公司产品, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 为 DuPont 公司产品。DNA 测序试剂盒 US Biochemical 公司产品。

* 国家自然科学基金资助项目(39800079)

作者简介: 毛晓华(1965-), 男, 博士, 副教授, 现任南京铁道医学院生化教研室副主任, 主要从事基因调控方面的研究

收稿日期: 1998-11-26, **修回日期:** 1999-02-26

1.2 DNA 的提取、纯化、酶切、电泳

按文献报道^[3]进行。

1.3 PCR 扩增 *fruA* 基因

PCR 5'端引物为 5'-CCCATATGGCAACCAATCAAGCA-3', 它从 *fruA* 起始密码子开始, 并在 ATG 处设计 *NdeI* 酶切位点。3'端引物采用 pUC 系列载体的通用引物, 序列为 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'。反应总体积 100 μ L, 其中模板 (pMFA05) 0.2 μ g, dNTPs 各 0.2mmol/L, 引物 0.2mmol/L, Taq DNA 聚合酶 2u。反应依下列程序进行: 变性 95 $^{\circ}$ C 1min; 退火 48 $^{\circ}$ C 1min; 延伸 72 $^{\circ}$ C 1.5min。完成 5 次循环后将退火温度升至 55 $^{\circ}$ C, 再循环 20 个周期。

1.4 DNA 序列分析

采用双脱氧链终止法。双链质粒 DNA 作测序模板。

1.5 FruA 的表达纯化

接种含 pET16b-*fruA* 的大肠杆菌单菌落于 30mL M9/酪蛋白水解物/氨苄青霉素培养基培养过夜, 取 20mL 转移至 1000mL M9/酪蛋白水解物/氨苄青霉素培养基, 培养至 OD₆₀₀ 达 0.4 后加 IPTG 至终浓度为 1mmol/L, 继续培养 2 h, 离心收集菌体, 重悬于含 100mmol/L Tris-HCl, 50mmol/L KCl, 1mmol/L PMSF, 1mmol/L DTT, 0.5mmol/L EDTA 的 A 缓冲液, 超声破碎菌体, 离心 (20 000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 20min) 去除细胞碎片, 再离心 (100 000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 1h) 去除细胞膜即为菌体的可溶性蛋白部分。可溶性蛋白经 0.2 μ m 的滤器过滤后, 用 50mL Superloop (Pharmacia) 上样于与 FPLC 系统相连的镍离子层析柱, 以含 0 ~ 800mmol/L Imidazole 线性梯度的缓冲液 B (10% 甘油, 50mmol/L pH8.0 Tris-HCl, 50mmol/L KCl, 1mmol/L PMSF, 0.5mmol/L DTT) 连续洗脱 (流速 1mL/min), 每管收集 2mL, 经 SDS-PAGE 检测后合并纯化的 FruA。用缓冲液 B 透析除去 Imidazole, 透析后的样品 (电泳纯) 加甘油至终浓度 20%, -20 $^{\circ}$ C 冻存。

1.6 凝胶阻滞试验

蛋白-DNA 结合反应含 50mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 0 ~ 160 μ g FruA, 1 μ g poly [dI-dC], 0.8ng DNA 探针, 10% 甘油。总体积 15 μ L。反应在冰浴中进行 30min。反应产物上样于经预电泳的 5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶, 电泳缓冲液为 0.5 $\times$ TBE (50mmol/L pH8.0 Tris-borate, 1mmol/L EDTA)。电泳毕, 干胶, 压片, -70 $^{\circ}$ C 曝光过夜。

2 结果

2.1 *fruA* 表达质粒 pET16b-*fruA* 的构建

质粒 pMFA05 是 pUC19 携带 1.6kb *HincII* 片段而来, 该片段含有 *fruA* 的编码基因, 以 pMFA02 为模板通过 PCR 获得 1.2kb 的片段, 它从 *fruA* 的翻译起始密码子开始, 一直延续到终止密码子 TGA 的下游区域。其 5'端带 *NdeI* 位点, 3'端带 *BamHI* 位点 (是多克隆位点被扩增的结果)。把此 1.2kb 片段克隆至质粒 pUC9*NdeI*, 挑选 5 个克隆进行 *fruA* 5'端的部分序列分析, 选择 *ClaI* 位点上游区域中无突变的克隆 pUCF1 进行后续操作。把 pUCF1 中 *ClaI* 至下游 *BamHI* 之间的扩增序列去除, 代以从 pMFA02 经 *ClaI* 和 *BamHI* 双酶切而来的野生型序列。这样构建成质粒 pUCF2, 以上操作确保了 pUCF2 中 *fruA* 整个编码序列的正确性。从 pUCF2 中用 *NdeI* 和 *BamHI* 切下 1.2kb 含 *fruA* 的

DNA 片段,与经相同内切酶酶切的 pET16b 连接,构建成表达质粒 pET16b-*fruA*(图 1)。

2.2 FruA 的表达与纯化

质粒 pET16b-*fruA* 按常规方法导入 *E. coli* BL21(DE3),携带质粒的大肠杆菌经 IPTG 诱导后表达出了带组氨酸标签的 FruA,表达水平以 IPTG 诱导后 2h 最高(图 2)。预试验表明,表达的 FruA 小部分以包涵体形式存在,大部分存在于细胞的可溶性部分。因此具有生物活性的 FruA 可直接自重组菌株的可溶性蛋白部分提取。由于表达的 FruA 氨基端带组氨酸标签,因此可以用比较简便的镍离子层析柱一次性地纯化出 FruA(图 3)。

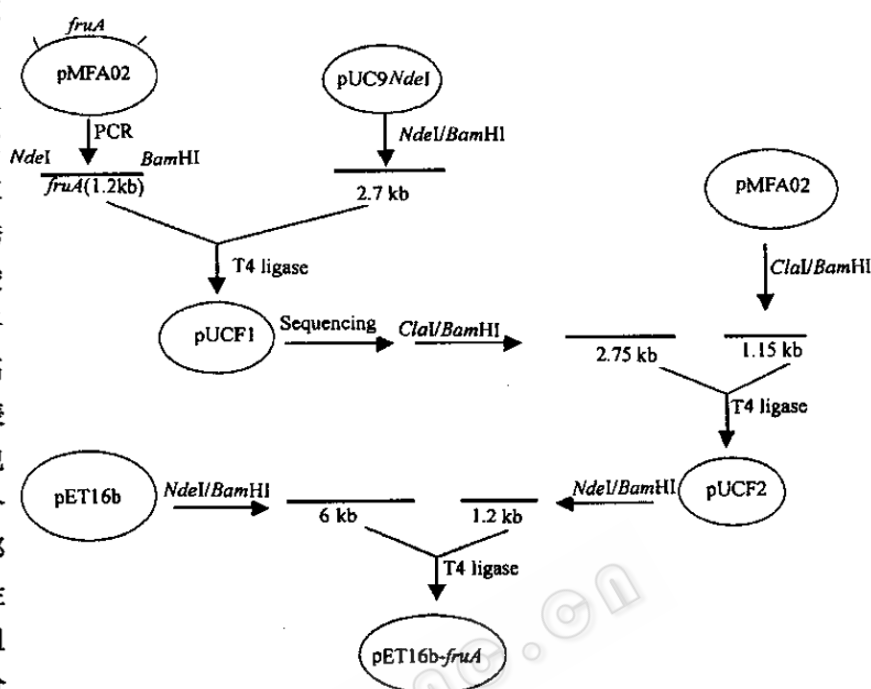


图 1 *fruA* 表达质粒 pET16b-*fruA* 的构建

Fig.1 Construction of *fruA* expression plasmid pET16b-*fruA*

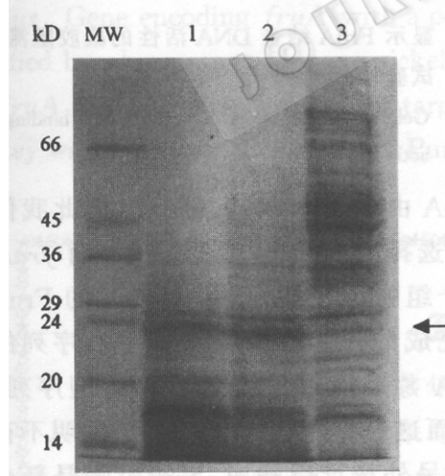


图 2 FruA 在大肠杆菌中的表达分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of *fruA* expression in *E. coli*

1. 1h after IPTG induction;
2. 2h after IPTG induction;
3. Without IPTG induction.

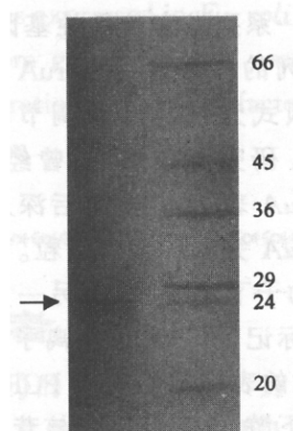


图 3 纯化后 FruA 的 SDS-PAGE 图谱

Fig.3 SDS-PAGE pattern of purified FruA

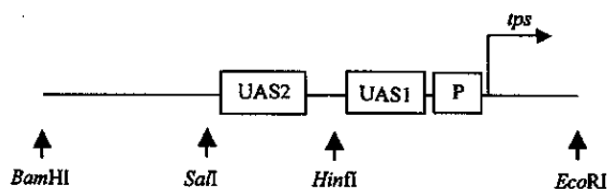


图4 *tps* 基因上游结构及限制性图谱

Fig. 4 Structure and restriction map of *tps* upstream region

的 *HinfI*-*EcoRI* 片段含上游激活序列 1 及启动子,最小的 *SalI*-*HinfI* 片段含上游激活序列 2,大小居中的 *BamHI*-*SalI* 片段不含调控元件(图 4)。三种不同片段酶切混合物在 Klenow 大片段酶催化下用 [α - 32 P]dATP 同时进行末端标记。从图 5 可以看出,随着 FruA 浓度的升高,三个片段均能与 FruA 结合而被阻滞。显然,这种结合是非特异性的,因为 *BamHI*-*EcoRI* 片段不含有调控元件却同样能与 FruA 结合。

3 讨论

fruA 基因首先由日本学者从粘细菌中克隆出来并完成了它的核苷酸序列分析,它是粘细菌发育所必需的。进一步的研究表明,*fruA* 的突变影响着其它一系列发育特异性基因的表达,结合其氨基酸序列的特点,推测 FruA 是一种转录因子,通过与顺式元件的结合调节靶基因的表达^[2]。在 *fruA* 研究工作初期,曾经构建过 172

个氨基酸的 *fruA* 表达质粒,以后深入的研究发现,FruA 由 229 个氨基酸组成,因此我们重新构建了 *fruA* 完整的表达质粒。为便于纯化,我们选择了载体 pET16b,一方面 *fruA* 可以在 T7 启动子下高效表达,另一方面该质粒含多个组氨酸密码子,因此表达的 FruA N 端带组氨酸标记,可以通过镍离子层析法一次性地完成纯化工作。为保证蛋白序列的正确性,所构建的表达质粒中由 PCR 扩增得到的 *fruA* 片段大部分代之以野生型序列,仅起始密码子下游 30 个左右的核苷酸是扩增而来的,而这部分序列又经过测序证明不存在突变,这样就保证了整个 *fruA* 编码基因的正确性。另外设计引物时,5' 端引物是新合成的,而 3' 端引物直接采用 mp/pUC 系列的通用引物,未设计专门的引物,因此扩增的片段从起始密码子一直延续到终止密码子以外的下游区域。这样节省了费用,但不影响表达产物的正确性。

S 蛋白是粘细菌孢子外壳的主要结构蛋白,它有两个具有同源性的编码基因, *ops* (gene 1) 和 *tps* (gene 2)^[4,6]。现在认为 S 蛋白主要是 *tps* 的编码产物。在 *fruA* 突变株中,S 蛋白的表达明显受抑^[2]。因此我们选择 S 蛋白的编码基因 *tps* 作为模式来研究

2.3 FruA 与 DNA 的相互作用

从质粒 pSI003 中分离纯化出 1.3kb 的 *BamHI*-*EcoRI* 片段,它覆盖粘细菌 S 蛋白编码基因 *tps* 的调控元件,包括启动子、上游激活序列 1 (UAS1) 和上游激活序列 2 (UAS2)^[4,5]。此片段再用 *SalI* 和 *HinfI* 切为三个更小的片段,其中最大

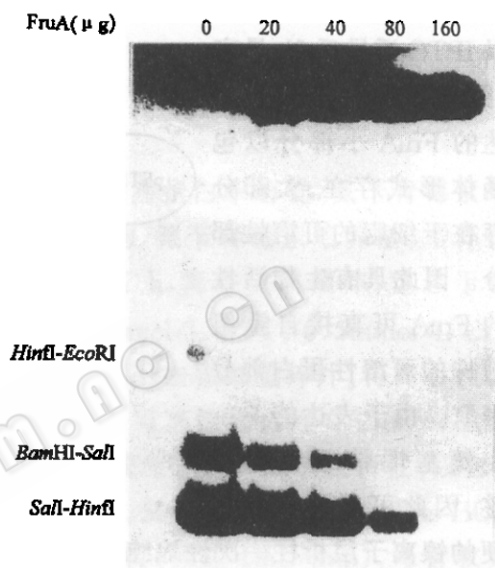


图5 显示 FruA 结合 DNA 活性的凝胶阻滞试验

Fig. 5 Gel retardation assay depicting DNA binding activities of FruA

FruA 与 DNA 的相互作用。作为一种转录因子, FruA 应通过与 *tps* 顺式元件特异地相互作用来实现其调控作用。然而凝胶阻滞试验表明, FruA 既能与 DNA 调节序列结合, 又能与非调节序列结合, 我们推测, 粘细菌中可能存在另一种因子, 在它的参与下 FruA 才能与靶基因的调控元件特异地结合而发挥调节作用。事实上, 用 FruA 抗血清进行免疫沉淀分析已经发现粘细菌中存在 FruA 相关蛋白。

致谢: 本室柳宁老师在工作中给予了多方面的帮助与支持。

参 考 文 献

- [1] Shimkets L J. *Microbiol Rev*, 1990, 54:473~501.
- [2] Ogawa M, Fujitani S, Mao X, *et al.* *Mol Microbiol*, 1996, 22(4):757~767.
- [3] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T 著(金冬雁等译). 分子克隆. 北京: 科学出版社, 1992.
- [4] Downard J S, Kim S H, Kil K S, *et al.* *J Bacteriol*, 1988, 170:4931~4938.
- [5] Dworkin M. *Microbiol Rev*, 1996, 60:70~102.
- [6] Inouye S, Franceschini T, Inouye M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80:6829~6833.

EXPRESSION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF FruA, A TRANSCRIPTION FACTOR IN MYXOCOCCUS XANTHUS

Mao Xiaohua Ding Lei

(Department of Biochemistry, Nanjing Railway Medical College, Nanjing 210009)

Abstract: FruA is a transcription factor essential for the development of *Myxococcus xanthus*. Gene encoding *fruA* with a poly-histidine tag was expressed in *E. coli* and simply purified by chromatography on nickel column. Data from gel retardation assay suggest that FruA regulates transcription of target genes in collaboration with other factors.

Key words: FruA, Expression, Purification, Regulation

致 读 者

感谢广大作者、读者多年来对《微生物学报》的关心和支持。为了适应改革开放的需要, 使科研成果尽快得到交流, 本刊自 2000 年 40 卷第 1 期开始扩版, 双月刊, 每册 112 面。全部道林纸印刷, 内附进口铜版纸印制的黑白图版和彩色图版。内容丰富翔实, 能及时反映我国微生物学科前沿和最新研究水平。

欢迎投稿! 欢迎订阅! 欢迎提出宝贵意见!

《微生物学报》编辑部