

一种粘细菌发育相关基因的分离及敲除分析*

毛晓华 汪道涌 刘 芳

(东南大学医学院生化教研室 南京 210009)

摘 要 FruB 是与粘细菌(*Myxococcus xanthus*)发育特异性转录因子 FruA 具有亲和力的蛋白因子,协同 FruA 参与对靶基因的调控。根据 FruB 氨基端氨基酸序列,设计简并性寡核苷酸引物对染色体 DNA 进行 PCR 扩增,以扩增产物为探针自粘细菌小型基因文库筛选出同源的 4.5kb *SacI* 阳性片段。*fruB* 基因阻断分析表明,*fruB* 功能缺失延缓子实体发育并降低粘孢子产率,提示 *fruB* 与粘细菌发育分化有一定联系。

关键词 粘细菌,发育,基因克隆,基因敲除

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2002)03-0316-05

粘细菌是一种具有社会性行为(social behavior)的原核生物,在营养缺乏的应激条件下粘细菌启动复杂的生活周期,10⁵ 以上的细胞有序地向一个中心聚集,形成多细胞结构的子实体,在子实体内部分细胞程序性死亡,其它细胞渐渐分化为对环境具有抗逆性的粘孢子^[1,2]。以粘细菌为模式系统的发育调控研究领域目前有两个问题令人关注,一是细胞间的通讯,二是发育相关基因的表达调控。FruA 是粘细菌发育所必需的一种转录因子,影响着其它一些发育相关基因的表达^[3],而且 FruA 又是一种信号转导蛋白,在发育过程中作为协调细胞间信号的一个调节点^[4]。我们在研究 FruA 对靶基因的调控机制时发现 FruA 必须与其结合蛋白 FruB 一起才能与 DNA 顺式元件结合^[5]。因此克隆 *fruB* 基因,明确其编码产物的性质对进一步理解 FruA 发育调控作用的分子机制具有意义。本文报道自黄色粘细菌中分离含有 *fruB* 的 DNA 片段,并对其进行了敲除分析。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌种、培养基、试剂和酶

1.1.1 菌株和质粒 *Myxococcus xanthus* DZF1 为粘细菌野生型菌株,由 Dr. S. Inouye 赠送,*M. xanthus fruB::Tc* 为 *fruB* 阻断株,本研究构建 *pKF18k* 为大连宝生物公司产品,*pKFB* 为 *pKF18k* 克隆入 *fruB* 5'端序列,*pKFBT* 为 *pKFB* 中插入四环素抗性基因,均本研究构建。

1.1.2 培养基 TPM 固体培养基和 CYE 液体培养基均按文献^[5]配制。

1.1.3 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,非同位素 DNA 标记、杂交和检测试剂盒为 Amersham pharmacia biotech 产品。

1.2 DNA 操作

DNA 提取、纯化、酶切、电泳及杂交按常规方法^[6]和厂家推荐条件进行,DNA 序列分

* 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,研究方向:粘细菌发育调控和基因工程药物。

收稿日期:2001-06-22,修回日期:2001-09-07

析由大连宝生物公司完成。

1.3 蛋白质 N 端序列分析

FruA-FruB 蛋白复合物^[5]经 SDS-PAGE 分离,转至 PVDF 膜,丽春红(ponceau)染色(0.5% 丽春红,1% 乙酸),切取目的蛋白带,空气干燥,送美国新泽西医学和牙科大学进行 N 端部分氨基酸序列分析。

1.4 PCR 引物

PCR5'端引物为 5'-TCAAGCTT ATG CAG CAG GCG/C CTG/C CG-3',上游为 *Hind*III 酶切位点。3'端引物序列为 5'-TTGGATC CTT G/CAG G/CCC G/CAC CTG GAT-3',上游增加 *Bam*HI 位点。

1.5 子实体的发育

接种 *M. xanthus* DZF1 于 CYE 液体培养基中,30℃ 震荡培养至菌体密度达 10^9 细胞/mL,离心(4 000 × g,4℃,10min),重悬细胞于 1/15 体积的 TM 缓冲液(10mmol/L Tris-HCl pH7.6,8mmol/L MgSO₄),置冰浴中,点样于 TPM 琼脂平板(50 spots/plate,10μL/spot),30℃ 培养。为计算粘孢子含量,收集子实体,悬于 TM 缓冲液,超声裂解营养细胞并分散孢子,相差显微镜下计数^[7]。

1.6 外源 DNA 导入粘细菌

接种 *M. xanthus* DZF1 于 CYE 液体培养基,30℃ 震荡培养至菌体密度达 10^9 细胞/mL,离心收集细胞,无菌水洗涤 3 次,最后悬浮细胞于 1/100 体积的无菌水。取 40μL 细胞与 2μL LDNA(0.5~1.5μg)混匀,转至 0.2cm cuvette(Bio-Rad)。电穿孔条件为 0.65kV,400Ω,25μF,9msec,电穿孔后的细胞加 1mL CYE,30℃ 震荡培养 5h 后与半固体 CYE(0.7% 琼脂)混匀,均匀铺于含 15μg/mL 四环素的 CYE 固体平板,30℃ 继续培养 4~5d,按需要进一步筛选卡那霉素敏感的菌落。

2 结果

2.1 *fruB*5'端编码序列的扩增与克隆

对 FruB 氨基端序列分析的结果显示,前 31 个氨基酸残基依次为 MQQALRRAARHSVSGMRAPASLRAGIQVGLK。同源性检索提示这一序列与 GenBank 中蛋白序号为 AAC98489 的氨基端序列一致^[8],但该蛋白功能未知。因此虽然 FruB 可能不是一种新的蛋白,为进一步研究其生物学特性及其与转录因子 FruA 的关系,有必要克隆完整的 *fruB* 基因。根据粘细菌遗传密码子第 3 位碱基多数为 G 或 C 的特点,设计了具简并性的引物,5'端引物覆盖前 5 位氨基酸编码序列及第 6 位氨基酸密码子的第 1、2 位碱基,3'端引物覆盖第 26~31 位氨基酸残基。以粘细菌 DZF1 基因组为模板进行 PCR 扩增,图 1 是扩增产物 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果,表明能生成 ~110bp 的扩增带,与预期结果相符。从聚丙烯酰胺凝胶回收纯化扩增产物,*Bam*HI 和

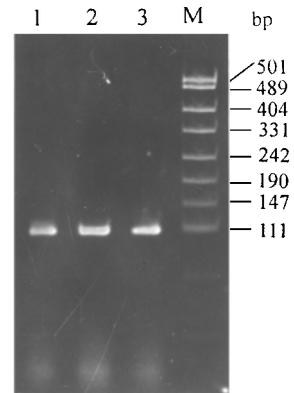


图 1 PCR 扩增产物分析

Fig. 1 PAGE analysis of PCR

product

1~3: PCR products; M: pUC19/

MspI marker.

*Hind*III 酶切后连接至 pKF19k 的相应位点 转化大肠杆菌后筛选重组菌落 大量制备插入 *fruB*5' 端编码序列的重组质粒 pKFB。

2.2 分离含 *fruB* 基因的 DNA 片段

选用不同的限制性内切酶酶切野生型粘细菌 DZF1 总 DNA 琼脂糖电泳后转膜,以 *fruB*5' 端编码序列的 PCR 扩增产物为探针对其杂交,图 2 可见 3 种内切酶产物均有阳性信号 表明 DZF1 基因组中含有与探针同源的核苷酸序列,其中 *Sac*I 阳性片段的大小约 4.5kb。据此以 *Sac*I 酶切 DZF1 总 DNA 分离 4.5kb 的 DNA 片段 将这一范围的片段与同样经 *Sac*I 酶切并脱磷酸的 pUC18 连接 转化大肠杆菌后 挑选 1500 个氨苄抗性转化子,用 PCR 扩增产物作探针进行菌落杂交。由于杂交背景欠清晰,难以明确区分阳性和阴性信号,为此选择可能的阳性菌落,抽提质粒 DNA,同时空载体 pUC18 作阴性对照,转至硝酸纤维素膜后再用上述探针行斑点杂交,图 3 清楚地显示了阳性斑点,表明质粒中所插入的外源片段覆盖 *fruB*5' 端编码序列。

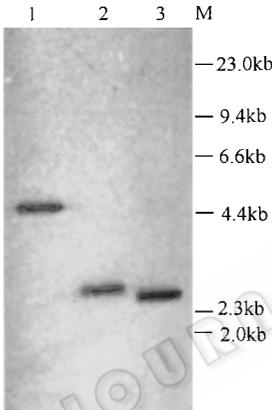


图 2 Southern 杂交分析

Fig.2 Southern analysis of genomic DNA digests probed with PCR product

M λ DNA/*Hind*III 1 :*Sac*I 2 :*Sal*I 3 :*Pst*I .

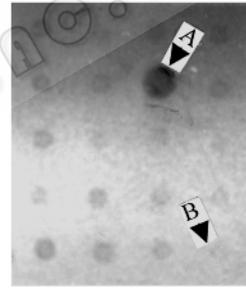


图 3 斑点杂交

Fig.3 Dot blot hybridization

A :Positive clone ;B :Negative control .

2.3 *fruB* 基因的敲除分析

在对含 *fruB* 基因的 4.5kb *Sac*I 片段进行亚克隆和序列分析前,我们首先分析了质粒 pKFB 所克隆的 *fruB*5' 端编码序列,发现从起始密码子起第 48 位存在 *Sph*I 切割位点,而此处的 *Sph*I 识别位点在重组质粒 pKFB 中是唯一的,因为原载体多克隆位点中的 *Sph*I 识别序列在插入外源片段后已消失。因此我们通过 *fruB*5' 端 *Sph*I 位点插入四环素抗性基因 (Tc) 来阻断 *fruB* 的功能。如图 4 所示,从 pBR322 用 *Eco*RI 和 *Ava*I 酶切分离 1.5kb Tc 片段, Klenow 修平后与经 *Sph*I 酶切并补平的 pKFB 连接,构建成质粒 pKFBT,用电穿孔法把 pKFBT 导入野生型粘细菌 DZF1。迄今为止在粘细菌尚未发现独立于染色体外自主复制的遗传单位, pKFBT 进入细胞后通过同源重组途径整合于染色体。通过单交叉(single crossover)方式整合时染色体 DNA 中既有 5' 端编码区被 Tc 阻断后功能缺失的突变型

fruB, 又存在野生型 *fruB*, 因此宿主菌仍有 *fruB* 的功能, 并且表现出 Km 和 Tc 抗性; 而双交叉 (double crossover) 方式整合时染色体中只有被 Tc 插入阻断的突变型 *fruB*, 表现出 Tc 抗性。所以从转化后的 CYE 固体平板进一步筛选 Km^STc^r 菌落, 它无 *fruB* 功能, 以 *fruB*::Tc 表示。

2.4 *fruB* 功能缺失对发育的影响

研究 *fruB*::Tc 菌株在缺少营养的 TPM 琼脂平板中发育状况, 发现该菌株经过约 30h 培养也能形成子实体, 但野生型粘细菌子实体的发育一般不超过 18h, 因此虽然 *fruB*::Tc 菌株可以形成大小和形态结构与野生型相似的子实体, 但其发育进程相对延缓。进一步比较 *fruB*⁻ 与 *fruB*⁺ 菌株孢子产量, 发现在发育不同时间点 *fruB*::Tc 菌株粘孢子数目均低于 DZF1, 而且 DZF1 发育 48~60h 后孢子数即处于一稳定的高峰, *fruB*::Tc 要经过 72h 孢子数才基本稳定, 此时含量约为 DZF1 的 65% (图 5)。

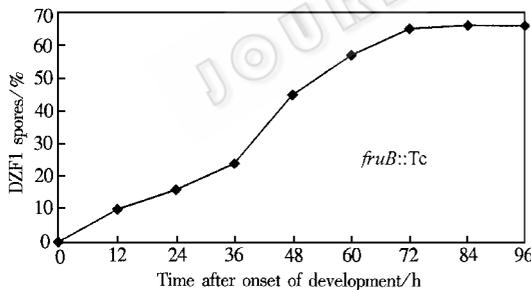


图 5 *fruB*::Tc 菌株孢子生成效率

Fig. 5 Sporulation efficiency of *fruB*::Tc compared with DZF1

细菌多细胞结构形成的分子机制, 有助于认识原核生物的发育分化, 对理解真核生物的细胞行为、发育分化及生物进化具有意义。

发育相关基因的克隆是研究粘细菌发育分子机制的必要条件, 目前已经分离了一些发育相关基因, 它们的编码产物包括蛋白激酶^[9]、DNA 结合蛋白^[3]、 σ 激活蛋白^[10] 以及代谢有关的酶如丙酰辅酶 A 羧化酶^[11] 等, 本文报道自粘细菌基因组分离含有蛋白因子 FruB 编码基因的 DNA 片段。在根据 Southern 杂交构建粘细菌小型基因文库时选择 4.5kb *Sac*I 片段, 未选用 *Bgl* II 或 *Sal*I 片段, 因为片段较小则覆盖 *fruB* 完整读框的可能性也减

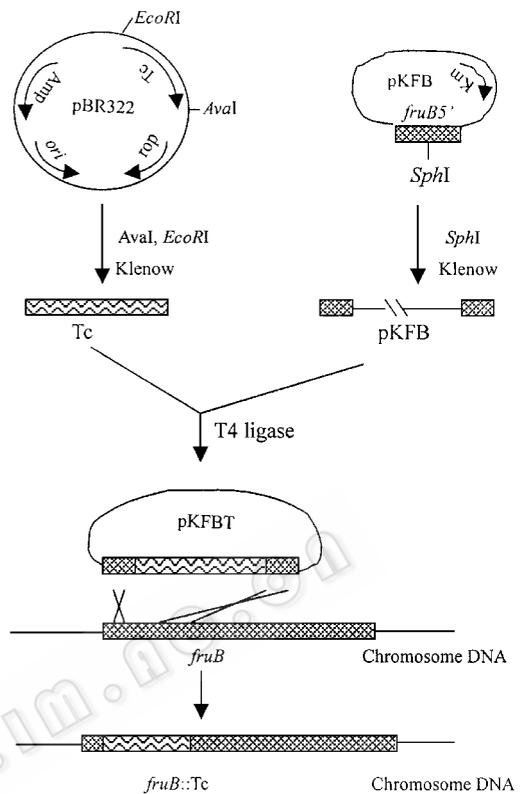


图 4 *fruB*::Tc 阻断菌株的构建

Fig. 4 Construction of insertion mutation in *fruB* coding region

3 讨论

粘细菌在系统分类上属于细菌, 有 2×10^9 年的进化历史, 但发育过程与真核生物存在某些相似性, 如定向的细胞运动, 多细胞形态发生, 细胞分化及基因的有序表达等。特别要提及的是, 正是在粘细菌中科学家发现原核生物存在真核样的与发育直接相关的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族^[9], 因此研究粘细菌

少。前期研究表明 FruB 能辅助发育特异性转录因子 FruA 参与对靶基因的调控,因此我们以 PCR 扩增得到的 *fruB* 5'端部分编码序列为基础,构建 *fruB* 基因被阻断的突变株 *fruB*::Tc,观察 *fruB* 功能缺失对粘细菌发育的影响。与野生型 DZF1 相比, *fruB*::Tc 菌株子实体发育滞后 12~16h,粘孢子产量也较低,发育后期产量最多时约为 DZF1 的 65%,说明 *fruB* 功能缺失影响子实体发育速度及子实体内营养细胞向休眠性孢子的分化。目前正在对所分离的 DNA 进行亚克隆和序列分析,以便明确 *fruB* 基因产物的功能,评价其在粘细菌发育进程中的地位和生物学作用。

参 考 文 献

- [1] Dworkin M. *Microbiol Rev*, 1996, **60**: 70~102.
- [2] Jelsbak L, Sogaard-Andersen L. *Curr Opin Microbiol*, 2000, **3**(6): 637~642.
- [3] Ogawa M, Fujitani S, Mao X, et al. *Mol Microbiol*, 1996, **22**(4): 757~767.
- [4] Ellehaug E, Norregaard-Madsen M, Sogaard-Andersen L, et al. *Mol Microbiol*, 1998, **30**(4): 807~817.
- [5] 毛晓华,丁 蕾,汪道涌. *遗传学报* 2000 **27**(6): 556~562.
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T(金冬雁等译). *分子克隆*. 北京: 科学出版社, 1992.
- [7] Lee B U, Mendez J, Shimkets L J. *Genes & Dev*, 1995, **9**: 2964~2973.
- [8] Trudeau K G, Ward M J, Zusman D R. *Mol Microbiol*, 1996, **20**(3): 645~655.
- [9] Munoz-Dorado J, Inouye S, Inouye M. *Cell*, 1991, **67**: 995~1006.
- [10] Gorski L, Gronewold T, Kaiser D. *J Bacteriol*, 2000, **182**(9): 2438~2444.
- [11] Kimura Y, Sato R, Mimura K, et al. *J Bacteriol*, 1997, **179**(22): 7098~7102.

Isolation and Disruption Analysis of a Developmental Gene of *Myxococcus xanthus**

Mao Xiaohua Wang Daoyong Liu Fang

(Department of Biochemistry, Southeast University Medical College, Nanjing 210009, China)

Abstract: FruB is an associated protein of FruA, a transcription factor essential for the development of *Myxococcus xanthus*. Degenerate oligonucleotide primers were designed based on the N-terminal amino acid sequence of FruB. Using genomic DNA as template, an approximate 110bp fragment was generated and further served as a probe to screen a small genomic library of *M. xanthus*. A 4.5kb *SacI* fragment was isolated on the basis of its homology to the probe. Disruption of *fruB* delayed the morphogenesis of fruiting bodies and depressed spore yield, suggesting that to some extent, FruB might be involved in the development of *M. xanthus*.

Key words: *M. xanthus*, Development, Gene cloning, Gene disruption

* Project of China Natural Science Fund(39800079)