

## 嗜盐菌素 HalC8 基因簇克隆与分析

梅双双\*\* 厉云\*\* 陆秋鹤 向华\*

(中国科学院微生物研究所 微生物资源国家重点实验室 北京 100080)

**摘 要** 采用基因组部分文库及锚定 PCR 技术,克隆了嗜盐菌素 HalC8 编码基因及其上下游可能的相关基因共约 9.3kb 的 DNA 序列。序列分析表明已知序列至少含有 6 个 ORF,包括上游编码跨膜蛋白的 *halU* 基因、编码可能的调节蛋白的 *halR* 基因、编码嗜盐菌素 HalC8 及其免疫蛋白 Hal I 的 *proC8* 基因、以及位于 *proC8* 基因下游的编码可能的转运蛋白的 *halT1*, *halT2* 和 *halT3* 基因。这是国际上首次对嗜盐菌素基因簇可能的相关基因的克隆。

**关键词** 嗜盐菌素 Halocin C8; 基因克隆; 序列分析; 基因功能

中图分类号: Q81, Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)02-0318-05

嗜盐菌素(Halocin)是由极端嗜盐古菌(Extremely halophilic archaea)分泌到胞外的对其相近属或种的极端嗜盐古菌具有抑制或致死作用的蛋白类抗生素<sup>[1]</sup>。最早的嗜盐菌素是由 Rodriguez-Valera 及其同事于 1982 年发现的<sup>[2]</sup>。Torreblanca<sup>[3]</sup>于 1994 年分析了 68 株极端嗜盐古菌之间的相互作用,发现 67 株极端嗜盐古菌可以产生嗜盐菌素,而且它们的抑菌谱存在差异,不同的抑菌谱可能代表不同的嗜盐菌素。由此,他们得出结论:“产生嗜盐菌素是极端嗜盐古菌杆菌的一个普遍特征。”目前已发现有上百株极端嗜盐古菌可以产生嗜盐菌素,并已有 6 个嗜盐菌素 HalH1、HalH4、HalH6、HalR1、HalS8 和 HalC8 的蛋白被纯化<sup>[4-9]</sup>,但其中仅有 HalH4<sup>[5]</sup>、HalS8<sup>[8]</sup>和本实验室分离纯化的 HalC8<sup>[10]</sup>的编码基因已被克隆和测序。作为嗜盐菌素研究的最新进展,本实验室近期在国际上还首次报道了嗜盐菌素 HalC8 的抗性(免疫)基因及抗性机制,这也是在三域生命中首次发现一个基因(*proC8*)同时编码蛋白类抗生素(HalC8)及其免疫蛋白(HalI)的新机制<sup>[10]</sup>。

但是参与嗜盐菌素表达调控、加工转运等的相关基因至今还知之甚少。例如,嗜盐菌素大都是在从对数末期向稳定期过渡时开始产生的<sup>[5,8,10]</sup>,但可能的调控基因尚未克隆。已完成序列分析的嗜盐菌素 HalH4、HalS8 及 HalC8 均被证明是由一个前体蛋白经剪切加工而成,并推测其前体是由极端嗜盐古菌常用的双精氨酸转运途径(Twin-arginine translocation pathway,简称 Tat pathway)进行跨膜转运<sup>[10]</sup>,但参与嗜盐菌素剪切加工的基因,以及成熟肽向细胞外转运的机制还不清楚。嗜盐菌素正是由于其其在表达调控、免疫抗性、加工成熟及作用机制等方面的特殊性及多样性,以及在极端嗜盐古菌遗传操作体系等方面的应用前景<sup>[10,11]</sup>,现已成为研究极端嗜盐古菌基本生命过程最重要的模型之一。目前已知的蛋白

类抗生素(如细菌素等)的合成相关基因通常都排列成基因簇<sup>[12,13]</sup>,因此本研究开展了 HalC8 编码基因及上下游基因的克隆和分析,有望为研究 HalC8 表达调控以及翻译后加工转运的分子机制提供新的突破口。本研究将报道嗜盐菌素 HalC8 编码基因及上下游基因共约 9.3kb 序列的克隆和分析。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒** 极端嗜盐古菌 AS7092 为嗜盐菌素 C8 的产生菌株,采用 AS-169 培养基于 37℃ 培养<sup>[9]</sup>。大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$  为基因克隆的宿主,采用 LB 或 SOB/SOC 培养基于 37℃ 培养<sup>[14]</sup>,在需要时添加终浓度为 100 $\mu$ g/mL 的氨苄青霉素作为抗性选择。pUCm-T 载体购自上海生工,将其用 DNA Blunting Kit(TaKaRa)平滑化后自身环化成可复制型式,命名为 pUCm-T 载体,并用 *E. coli* DH5 $\alpha$  进行扩增。质粒 pUCB03 是本实验室先前构建的质粒,该质粒携带有包括 HalC8 编码基因(*proC8*)及其上下游部分序列共 6.3kb 的片段<sup>[10]</sup>,本研究将首次报道其全序列测定、分析,及其下游基因的进一步克隆。

**1.1.2 主要试剂和仪器** 常用的缓冲液均按照《分子克隆实验指南》进行配制。常用限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DL15000 Marker、DNA Blunting Kit 等购自 TaKaRa 公司。*Taq* DNA 聚合酶购自华美公司。KOD-plus DNA 聚合酶购自 ToYoBo 公司,经该酶扩增出的 PCR 产物为平末端。DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I、尼龙膜购自 Roche 公司。RNase、蛋白酶 K、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)和 5-溴-4-氯-3-吡啶- $\beta$ -D-半乳糖苷(X-Gal)购自欣经科公司。T-Gradient 96 PCR 仪(Biometra 公司)杂交炉(Hybrid 公司)

基金项目: 国家 973 项目(2004CB719603)、国家 863 计划(2004AA626010)、国家自然科学基金项目(30570029)

\* 通讯作者。Tel/Fax: 86-10-62656916; E-mail: xiangh@sun.im.ac.cn

\*\* 作者简介: 两位作者对本文有同等贡献。梅双双(1975-),女,河北沧州人,博士研究生,主要从事微生物分子遗传学研究。E-mail: mssrw2002@yahoo.com.cn; 厉云(1975-),女,山东人,现在美国 Kentucky 大学从事分子生物学博士后工作。

收稿日期: 2005-08-09; 接受日期: 2005-10-25; 修回日期: 2005-12-23

## 1.2 Southern blot 分析

根据已测序的 C8 基因序列<sup>[10]</sup>设计一对引物 C8gcPF 5'-CCCCTTCGTACACCTTG-3' 和 C8gcPR :5'-GTCCTCACGGCGG TATC-3' 该引物通过 PCR 反应可扩增出已知基因下游序列 3'端 450bp 的片段,以此作为探针,用地高辛进行标记,方法参照产品使用说明书进行。按文献<sup>[15]</sup>的方法提取 AS7092 的总 DNA,分别用 *Stu* I、*Sac* I、*Bgl* II、*Pvu* II、*Nsi* I 酶切,37℃过夜。电泳检测酶切完全后,取 10μg 酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳分离后,转移至尼龙膜<sup>[14]</sup>,以上述标记好的探针进行杂交,方法参照 Roche 公司 kit 使用说明书进行。

## 1.3 锚定 PCR 反应

根据 Southern blot 的结果,取经 *Bgl* II 酶切的 AS7092 的总 DNA 与经 *Bgl* II 酶切后的 pUCm-T 载体 16℃连接过夜,从而将 HalC8 基因下游未知序列锚定在 pUCm-T 载体上。以该连接产物作为模板进行 PCR 扩增。正向引物为 C8gcF :5'-CAGGATACCGCCGTGAG-3',是根据已测序的 pUCB03 质粒中 HalC8 基因下游序列设计的;反向引物用 pUCm-T 载体上的通用引物 M13/pUC direct :5'-GTAACACGACGGCCAGT-3'。反应体系(25μL):10 × KOD-plus DNA 聚合酶缓冲液 2.5μL, dNTP (2.0mmol/L) 2.5μL, MgSO<sub>4</sub> (25mmol/L) 1μL, C8gcF (10μmol/L) 1μL, M13/pUC direct (10μmol/L) 1μL, KOD-plus DNA 聚合酶 0.5U。反应条件:94℃ 5min, 94℃ 1min, 58℃ 1min, 72℃ 3min, 25 个循环, 72℃ 10min。

## 1.4 PCR 扩增产物的酶切、连接与转化

回收 3kb 的 PCR 扩增产物用 *Bgl* II 酶切去除其中扩增的载体序列,酶切产物与经 *Bgl* II、*Eco*RV 酶切过夜的 pUCm-T 载体连接,因 KOD-plus DNA 聚合酶扩增出的 PCR 产物为平末端,该末端可与 *Eco*RV 酶切产生的平末端连接。22℃反应过夜后转化 *E. coli* DH5α,将菌液涂于已涂有 40μL X-Gal (20mg/mL)和 40μL IPTG (20mg/mL)的氨苄平板,37℃培养过夜后,挑取白色菌落筛选阳性克隆。

## 1.5 核酸序列的测定及序列验证

将筛选到的阳性克隆命名为 pB04 送交上海生工生物工程技术服务有限公司测序,所测序列用 SeqMan 软件与质粒 pUCB03 中已测得的序列进行拼接。

根据新测得的序列设计一条反向引物 RW0402 :5'-TCCGCCTGTACTGTGC-3',其距引物 C8gcF 约 1kb,用该引物与正向引物 C8gcF 分别以 pB04 质粒及 AS7092 的总 DNA 作为模板进行 PCR 反应,对克隆序列进行验证。

## 1.6 序列分析

运用 GeneTool 软件并结合极端嗜盐古菌基因的特点寻找开放阅读框(ORF);用美国国家生物技术信息中心(The National Center for Biotechnology Information, NCBI)的 Blast 系列软件与 GenBank 中的基因进行比对,寻找其保守的结构域,判断其可能的功能;运用 TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)和 Compute pI/Mw tool(<http://ca.expasy.org/tools/pi-tool.html>)软件对各个蛋白序列进行分析,了解各个蛋白的性质,运用 TMPred program(<http://www.ch.emblnet.org/software/TMPRED-form.html>)软件对蛋白的跨膜区进行预测。

## 2 结果

### 2.1 Southern blot 分析

Southern blot 结果显示(图 1):AS7092 总 DNA 经 *Bgl* II 酶切后一大小为 6kb 的片段可与探针杂交,因 *Bgl* II 酶切位点位于已知序列中 3'末端上游 3kb 处,所以该 6kb 片段下游的未知片段大小应为 3kb 左右,该片段大小适合进行 PCR 反应。

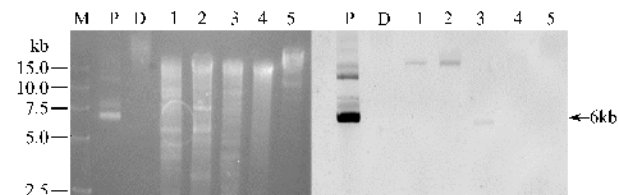


图 1 Southern blot 分析结果

Fig. 1 Southern blot assay. A: Agarose gel electrophoresis of total genomic DNA from the haloarchaeal strain AS7092 digested with *Stu* I (lane 1), *Sac* I (lane 2), *Bgl* II (lane 3), *Pvu* II (lane 4) and *Nsi* I (lane 5); B: The corresponding Southern blot of the panel A, using a probe (450bp) downstream of the halocin C8 gene. M. DL15000 Marker, P. The plasmid pUCB03; D. The total genomic DNA from the haloarchaeal strain AS7092 without digested.

### 2.2 PCR 扩增结果

根据 Southern blot 分析结果,采用引物 C8gcF 和 M13/pUC direct 进行 PCR 反应,预期可扩增出大小为 3kb 左右未知片段。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测大小约为 3kb,与预期大小相一致(图略)。

### 2.3 测序测定及验证

将克隆的未知序列进行全序列测定后,根据新测得的序列设计一条反向引物 RW0402,以 C8gcF 作为正向引物,分别以 pB04 质粒及 AS7092 的总 DNA 作为模板进行 PCR 反应,均扩增出与预期大小相一致的约 1kb 的片段(图略),证明所测得序列为已知序列 3'端下游序列。

### 2.4 序列分析结果

2.4.1 HalC8 基因上下游序列中各开放阅读框确定:新测得的序列经 SeqMan 软件与质粒 pUCB03 中已测得的序列进行拼接,得到大小为 9.3kb 的序列,该序列已申请 GenBank 号为 DQ137141。采用 GeneTool 1.0(<http://www.biotechtools.com/products/genetool.html>)分析已克隆的 HalC8 编码基因及上下游序列,发现至少包含 6 个开放阅读框,经序列比对和部分基因功能分析后分别将其命名为: *halU* 基因、*halR* 基因、*proC8* 基因、*halT1*、*halT2* 和 *halT3*(图 2 和表 1)。其中 *proC8* 基因编码的原蛋白已证明可加工为嗜盐菌素 HalC8 成熟肽及其免疫蛋白 Hal I<sup>[10]</sup>。

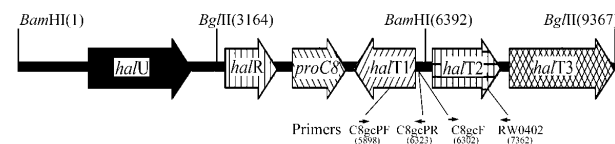


图 2 嗜盐菌素 C8 编码基因上下游序列中各开放阅读框

Fig. 2 Halocin C8 encoding gene (*proC8*) and the ORFs in its context sequences. The locations of the primers were also indicated.

表1 嗜盐菌素 C8 编码基因及上下游序列中各开放阅读框编码蛋白的性质

Table 1 Analysis of the deduced proteins of proC8 and the ORFs in its context sequences

ORFs	Start and stop codon	Residue number(aa)	Theoretical Mw/Da	Theoretical pI	Predicted function
<i>halU</i>	1158 ~ 2762	534	55504.02	11.34	Predicted transmembrane protein
<i>halR</i>	3293 ~ 4102	269	30487.18	4.94	Predicted transcriptional regulator
<i>proC8</i>	4330 ~ 5181	283	29379.34	4.25	Halocin C8 precursor
<i>halT1</i>	6250 ~ 5282	322	34069.73	4.40	Predicted permease protein
<i>halT2</i>	6512 ~ 7591	359	39927.50	4.02	Predicted periplasmic protein
<i>halT3</i>	7722 ~ 9372	550	57810.95	9.29	Predicted ABC transporter (transmembrane)

2.4.2 *halU* 基因的结构及其编码的蛋白的性质: 经序列分析, 发现在 *halU* 基因的上游距其起始密码子(ATG) 27 个碱基处可能为一个典型的 TATA box 及 BRE, 因此 *halU* 可能受

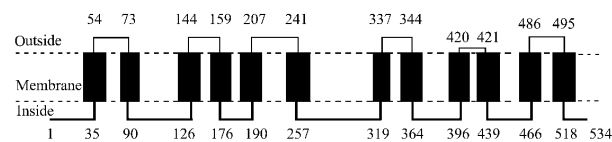


图3 HalU 各跨膜区的预测

Fig.3 The predicted membrane-spanning regions of HalU. The locations of inside regions (thick line), membrane-spanning regions (black block) and outside region (thin line) of HalU are labeled by the number of the amino acids.

自身启动子调控。通过 TMHMM 软件对其蛋白 HalU 序列进行分析发现其有 12 个跨膜区(图 3) 推测该蛋白可能定位在膜上, 是一个典型的膜蛋白。但目前未发现其与任何已知功能蛋白存在同源性, 而 Northern 杂交可检测到该基因呈组成性表达。因此作为一个新的古菌蛋白, 研究其生物学功能将具有重要意义。

2.4.3 *halR* 基因的功能分析: *halR* 基因位于紧邻 *proC8* 基因的上游, 通过同源性比较我们发现, *HalR* 与古菌的 *ArsR* 家族的调控蛋白有着较高的相似性( *MmArsR1*, *MmArsR2* 和 *MmArsR3* 图 4), 提示我们 *HalR* 可能是 *HalC8* 的调控蛋白。在 *HalR* 的氨基酸序列中我们找到了较为保守的 HTH motif, 这表明 *HalR* 可能是通过直接与 DNA 序列结合来调节 *HalC8* 的转录。

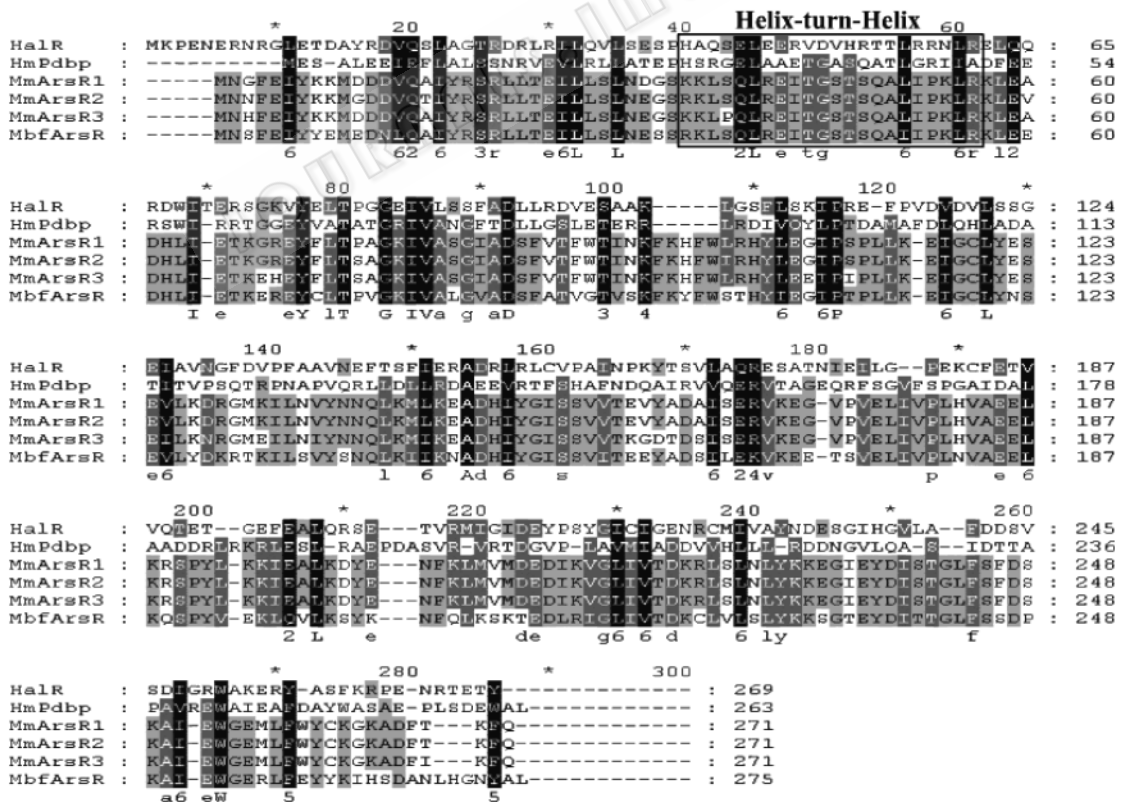


图4 HalR 氨基酸序列与其它古菌调控蛋白的同源性比较及 HTH motif 预测

Fig.4 Amino acid sequence alignment of HalR with archaeal transcriptional regulator and prediction of HTH motif. Amino acid sequence of HalR is aligned with archaeal transcriptional regulators using the programme GeneDoc (version 2.6.02). Helix-turn-Helix motif is predicted by the HTH programme [16] and boxed. Black-shaded symbols indicate completely conserved amino acid residues. HmPdbp, *Haloarcula marismortui* ATCC 43049 putative DNA binding protein.

**2.4.4** *halT1*, *halT2* 和 *halT3* 基因的结构及其编码的蛋白的性质:*halT1* 基因位于 *proC8* 基因的下游,其编码蛋白方向与其他基因相反。在其起始密码子上游有可能的启动子结构,但并不典型。其编码的蛋白经同源性比对发现与 *Haloarcula marismortui* ATCC 43049 基因组中的未知功能蛋白 *rnAC2127* 蛋白同源性最高,同源性达 63%。其有一个保守的推测的透性酶结构域,推测其可能为转运相关蛋白(图 5)。*halT2* 基因在其上游距其起始密码子(ATG)25 个碱基处可能具有一个较为典型的启动子结构,没有发现该基因有典型的终止子结构。经同源性比对发现其与 *Haloarcula marismortui* ATCC 43049 基因组中的推测的类似 *thiamine-binding periplasmic protein* 前蛋白同源性最高,同源性达 64%。其编码的蛋白具有保守的 ABC 蛋白转运系统中的周质蛋白保守结构域,推测该蛋白可能参与转运(图 5)。*halT3* 基因的上游没有发现典型的启动子结构,而 *halT2* 基因的下游没有发现典型的终止子结构,推测这两个基因可能为共转录,须进一步作转录起始位点加以确定。经同源性比对发现其与 *Haloarcula marismortui* ATCC 43049 中的 *sulfate transport system permease protein* 同源性最高,同源性达 72%。该基因编码的蛋白具有保守的 ABC 转运系统中的透性酶相关蛋白结构域,推测其功能可能是参与转运的(图 5)。

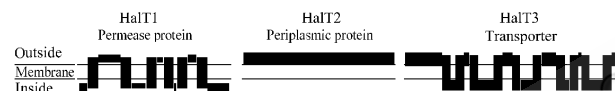


图 5 *HalT1*、*HalT2* 和 *HalT3* 可能的功能及其在细胞中的可能定位

Fig. 5 The probable function of *halT1*, *halT2* and *halT3* and their predicted localization in the cell wall.

### 3 讨论

本研究在已克隆的包含有 *HalC8* 基因及其上下游基因共 6.3kb 基因序列的基础上,进一步运用锚定 PCR 的方法成功克隆了其下游 3kb 的序列,使嗜盐菌素 *HalC8* 基因上下游已知序列达 9.3kb 并完成了全序列测定及 GenBank 注册,这是国际上首次对嗜盐菌素编码基因上下游基因的克隆和分析。由于已知蛋白类抗生素如: *nisin*<sup>[12]</sup>、*subtilin*<sup>[12]</sup> 和 *Mersacidin*<sup>[13]</sup> 等的合成、调控、加工、转运及免疫等的相关基因通常均排列成基因簇,因此本文首次报道的嗜盐菌素上下游可能的相关基因对于研究这种古菌来源的蛋白类抗生素的分子生物学将具有极其重要的意义。针对克隆序列运用生物信息学软件进行分析,预测出已知 *HalC8* 基因上下游序列具有六个开放阅读框,分别命名为 *halU* 基因、*halR* 基因、*proC8* 基因、*halT1*、*halT2* 和 *halT3* 基因。

*HalR* 的编码基因位于 *proC8* 基因临近的上游位置,是所克隆 9.3kb 范围内唯一的调控因子。因此 *HalR* 可能通过与 *proC8* 启动子区的调控序列结合来调节其转录,这一序列可能就是 *proC8* 启动子区已发现的正向重复序列<sup>[10]</sup>。先前的研究已经发现<sup>[9,40]</sup>,*proC8* 在菌体从对数末期向稳定期过渡

时才开始转录,这可能正是由 *HalR* 调控的。一些细菌素的转录激活正是采用类似调控因子实现的<sup>[12]</sup>。在 *halR* 基因之后为 *proC8* 基因,该基因的功能和特点在文献[10]中已论述得较为详细。紧随其后的为 *halT1* 基因,其转录方向与 *proC8* 基因转录方向相反。在用 NCBI 中的 Blast 系列软件进行序列分析之后发现,*HalT1* 存在一个较为保守透性酶蛋白的 motif,由于透性酶一般与细胞中物质运输相关,所以预测 *halT1* 基因可能编码转运相关蛋白。*halT2* 基因编码的蛋白有一个 ABC 转运系统中的周质蛋白结构域,*halT3* 基因编码的蛋白具有 ABC 转运系统中透性酶的保守结构域。而在 *halT2* 与 *halT3* 基因之间没有明显的终止子结构也无明显的启动子结构,推测这两个基因可能共转录,在转录后分别翻译为 ABC 转运蛋白系统的两个组份。这种情况类似于 *Nisin* 和 *Subtilin* 基因簇<sup>[17]</sup>,*Nisin* 和 *Subtilin* 基因簇中均有三个相连的 ABC 转运相关蛋白,其功能与免疫相关,是将意外进入或作用于细菌素产生菌的细菌素转运到胞外,以免被其损伤。由此推测 *HalT1*、*T2* 和 *T3* 可能是与转运相关的蛋白,其可能的功能是将意外渗透入 AS7092 胞内的 *HalC8* 转运至胞外,协助 *Hal I* 起免疫作用。

综合以上序列分析信息,推测嗜盐菌素 *HalC8* 表达调控的分子机制可能为:在菌体的生长到了对数生长期末期,菌体数量增长到了一定程度,从而启动群感效应系统,通过一定机制激活调节蛋白 *HalR*,使其具有转录调节活性,启动 *HalC8* 的转录。*HalC8* 转录子翻译成 *ProC8*,*ProC8* 经极端嗜古菌常用的 *Tat pathway* 实现跨膜转运<sup>[10,48]</sup>,并通过其 N 端的一段跨膜区锚定在膜上。可能的特异的蛋白酶这时将 *ProC8* 水解成 *HalI* 和 *HalC8*,*HalC8* 即释放至胞外,而 *Hal I* 则保留在膜上<sup>[10]</sup>。一旦 *HalC8* 靠近菌体细胞膜,*Hal I* 即将其捕获,如果尚有 *HalC8* 渗漏入胞内,*HalT1*、*T2* 和 *T3* 就将其转到胞外,以保护菌体免受 *HalC8* 的杀伤。其中,*HalC8* 的诱导表达因子及膜受体可能为群感效应所通用的,其相关基因未必位于 *HalC8* 基因上下游序列中,但跨膜蛋白 *HalU* 是否起信号传导途径中的受体作用值得关注,而 *Tat pathway* 也是在嗜盐古菌中大部分胞外蛋白所广泛采用的转运模式<sup>[18]</sup>,所以该途径相关基因可能也不在 *HalC8* 基因上下游序列中。但是目前不能排除尚有参与 *HalC8* 表达调控及生物合成的部分基因可能仍未克隆到,如编码特异剪切 *ProC8* 生成 *HalI* 和 *HalC8* 的蛋白酶基因等。所以,应进行进一步的基因克隆,以便发现更多的与 *HalC8* 合成相关的基因。同时我们将采用基因破坏、基因互补和生化分析等技术确定已克隆基因的确切功能,以期全面了解 *HalC8* 表达、合成、加工、转运和免疫等的分子机制。

### 参 考 文 献

- [1] 厉云,向华,谭华荣. 极端嗜盐古菌蛋白类抗生素 - 嗜盐菌素的研究. 微生物学报, 2001, 42(4): 502 - 505.
- [2] Rodriguez-Valera F, Juez G, Kushner DJ. Halocins: salt-dependent bacteriocins produced by extremely halophilic rods. *Can J Microbiol*. 1987, 28: 151 - 154.

- [ 3 ] Torreblanca M, Meseguer I, Ventosa A. Production of halocin is a practically universal feature of archaeal halophilic rods. 1994, *Lett. Appl. Microbiol.* **19** :201 – 205.
- [ 4 ] Platas G, Meseguer I, Amils R. Purification and biological characterization of halocin HI from *Haloflex mediterranei* M2a. *Int Microbiol* 2002 **5** :15 – 19.
- [ 5 ] Cheung J, Danna KJ, Q' Connor EM, *et al.* Isolation, sequence, and expression of the gene encoding halocin H4, a bacteriocin from the halophilic archaeon *Haloflex mediterranei* R4. *J Bacteriol*, 1997, **179** :548 – 551.
- [ 6 ] Torreblanca M, Meseguer I, Rodriguez-Valera F. Halocin H6, a practically bacteriocin from *Haloflex gibbonsii*. *J Gen Microbiol*, 1989, **135** :2655 – 2661.
- [ 7 ] Hazeltine C, Hill T, Montalvo-Rodriguez R, *et al.* Secreted euryarchaeal microhalocins kill hyperthermophilic crenarchaea. *J Bacteriol* 2001, **183** :287 – 291.
- [ 8 ] Price LB, Shand RF. Halocin S8: a 36-amino-acid microhalocin from the haloarchaeal strain S8a. *J Bacteriol*, 2000, **182** :4951 – 4958.
- [ 9 ] Li Y, Xiang H, Liu J, *et al.* Purification and biological characterization of halocin C8, a novel peptide antibiotic from Halobacterium strain AS7092. *Extremophiles* 2003 **7** :401 – 407.
- [ 10 ] Sun C, Li Y, Mei S, *et al.* A single gene directs both production and immunity of halocin C8 in a haloarchaeal strain AS7092. *Molecular Microbiology* 2005 **57** (2) :537 – 549.
- [ 11 ] O' Connor EM, Shand RF. Halocins and sulfolobocins: the emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2002 **28** (1) :23 – 31.
- [ 12 ] Siezen RJ, Kuipers OP, de Vos WM. Comparison of lantibiotic gene clusters and encoded proteins. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1996, **69** (2) :171 – 184.
- [ 13 ] Karsten A, Andre G, Claudia C, *et al.* Biosynthesis of the Lantibiotic Mersacidin: Organization of a type B lantibiotic gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66** (6) :2565 – 2571.
- [ 14 ] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [ 15 ] DasSarma S, Fleischmann EM. *Halophiles*, ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995, :179 – 180.
- [ 16 ] Dodd IB, Egan JB. Improved detection of helix-turn-helix DNA-binding motifs in protein sequences. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18** :5019 – 5026.
- [ 17 ] Torsten S, Stefan H, Irina S, *et al.* Function of *Lactococcus lactis* Nisin immunity genes nisl and nisFEG after coordinated expression in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biological* 2003, **278** (1) :89 – 94.
- [ 18 ] Rose RW, Bruser T, Kissinger JC, *et al.* Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway. *Mol Microbiol*, 2002, **45** (4) :943 – 950.

## Cloning and analysis of genes in the Halocin C8 gene cluster

MEI Shuang-shuang, LI Yun, LU Qiu-he, XIANG Hua\*

(State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract** : Halocin C8 (HalC8), produced by a halophilic archaeon strain AS7092, is a gene-coded peptide microhalocin and has a wide inhibitory spectrum against the members of haloarchaea. To investigate the mechanisms of the gene expression regulation, the peptide processing and transportation of this halocin, a 9.3kb DNA gene cluster containing the halocin C8 encoding gene (proC8) and other possible involved genes was cloned, by screening of a genomic library of AS7092 as well as anchoring PCR technique. Sequence analysis indicated that it contained at least six open reading frames, including halU, halR, proC8, halT1, halT2 and halT3. The gene halU encodes a membrane-spanning protein HalU, but its function is unknown. The gene halR encodes a putative regulator protein HalR, its function was deduced to regulate the transcription of proC8 gene, which encodes the precursor for halocin C8. The gene halT1, halT2 and halT3 likely encode the transporters HalT1, HalT2 and HalT3, the functions of which were speculated to transport the halocin C8 out of the cellular membrane. This is the first report of gene cluster cloning for any halocin.

**Keywords** : Halocin C8; Gene cluster cloning; Sequence analysis; Gene function

Foundation items: Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2004CB719603); National Programs for High Technology Research and Development of China (2004AA626010); National Natural Science Foundation of China (30570029)

\* Corresponding author. Tel/Fax: 86-10-62656916; E-mail: xiangh@sun.im.ac.cn

Received: 9 August 2005/Accepted: 25 October 2005/Revised: 23 December 2005