

鼠疫菌 H-NS 蛋白的表达与纯化及其 DNA 结合活性分析

张义全^{1#}, 高鹤^{1,2#}, 王丽¹, 罗张, 谭亚芳¹, 郭兆彪¹, 杨瑞馥¹, 周冬生^{1*}

¹军事医学科学院微生物流行病学研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

²中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206

摘要:【目的】利用大肠杆菌 BL21 λ DE3 的表达系统, 表达出有活性的鼠疫耶尔森氏菌(以下简称鼠疫菌)调控子蛋白 H-NS, 为进一步研究 H-NS 的转录调控奠定基础。【方法】PCR 扩增鼠疫菌 201 株 *hns* 基因的编码区, 将其直接克隆入 pET28a 质粒中, 再将 pET28a-*hns* 重组质粒转入大肠杆菌 BL21 λ DE3 菌株中, 所得菌株经 IPTG 诱导后能表达出鼠疫菌 His-H-NS 蛋白; 通过体外的凝胶迁移实验(EMSA)和 DNase I 足迹实验对 His-H-NS 蛋白与 DNA 的结合活性进行分析。【结果】成功表达出有活性的鼠疫菌 His-H-NS 蛋白, 该蛋白对鼠疫菌 pH6 抗原基因(*psaA*、*psaE*)及 *rovA* 基因均有结合活性。【结论】鼠疫菌 His-H-NS 具有 DNA 结合活性, 说明 H-NS 能调控鼠疫菌基因的转录。

关键词: 鼠疫耶尔森氏菌, H-NS, DNA 结合活性

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 05-0615-07

鼠疫是由鼠疫菌引起的一种自然疫源性疾病。在自然界动物鼠疫流行过程中, 鼠疫菌以蚤为传播媒介, 在宿主及其他易感动物之间传播, 偶然与患病动物接触或者被带菌蚤类叮咬, 鼠疫菌能传播给人类造成人间鼠疫^[1]。鼠疫菌在传播过程中面临复杂的生存环境, 例如温度、渗透压、pH、离子浓度、氧等信号的改变, 鼠疫菌必然会组成复杂的转录调控网络, 通过相应调控子感知并快速应对各种环境变化并对特定基因的表达进行直接调控, 从而使其最终能够在宿主体内存活和在自然界中传播^[2]。

H-NS 是一个小而丰富的组蛋白样蛋白, 不仅与细菌拟核基因装配相关, 而且在基因转录调控中也起关键作用。作为全局性负调控子, H-NS 能调控大量基因的表达, 这些基因产物通常和细菌对环境改

变的适应性相关。例如, 在肠道致病菌中, H-NS 是应答渗透压、pH 和温度改变时的一个关键的调控子蛋白。另外, H-NS 也和细菌毒力及生物膜形成密切相关。在细菌进化过程中, 很多毒力基因及耐药性基因是通过基因水平转移而获得的, 但是并不是所有后天获得的基因表达产物都对细菌生长有利。H-NS 有选择地结合到这些“异源基因”启动子区富含 AT 的碱基序列上, 从而对靶基因的转录起抑制作用。这种 DNA 结合机制既避免了外源基因有害表达, 也为这些外源基因整合到细菌已有的基因组中提供了可能^[3-5]。Tendeng 等应用生物信息学, 从整体上对包括大肠杆菌、沙门氏菌和鼠疫菌在内的革兰氏阴性菌的 H-NS 蛋白进行了结构、功能和亲缘关系上的比较分析^[6]。将鼠疫菌 CO92 株与大肠

基金项目: 国家自然科学基金(30930001, 30900823, 30771179); 国家“973 项目”(2009CB522600)

* 通信作者。Tel: +86-10-66948594; E-mail: dongshengzhou1977@gmail.com

作者简介: #对本文有同等贡献。张义全(1985-), 男, 安徽省阜阳市人, 硕士研究生, 主要从事鼠疫菌调控机制的研究。E-mail: zhangyiquanq@163.com; 高鹤(1978-), 女, 吉林省通榆县人, 讲师, 博士, 主要从事病原菌致病机制的研究。E-mail: gaohe@yahoo.cn

收稿日期: 2010-12-16; **修回日期:** 2011-02-28

杆菌 K-12 株的 H-NS 蛋白进行氨基酸序列同源性比对,二者同源性高达 83.8%。在鼠疫菌中,H-NS 与 DNA 的相互作用机制还有待详细研究。

在研究分子调控机制中,获得具有活性的调控子蛋白是研究的基础。本实验就是利用大肠杆菌 BL21 为表达菌,pET28a 质粒为载体,克隆表达鼠疫菌 H-NS 蛋白。我们对鼠疫菌的 pH6 抗原相关基因 *psaA*、*psaE* 及毒力调控子 *rovA* 基因的启动子区进行 GC 含量分析,发现它们都包含低 GC 的碱基序列,这就有可能是 H-NS 的结合序列。因此本研究选择 *psaA*、*psaE* 和 *rovA* 的上游启动子区序列为靶标,通过凝胶迁移实验 (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA) 及 DNase I 足迹 (DNase I footprinting) 实验来验证 H-NS 的 DNA 结合活性,从而为深入探究鼠疫菌 H-NS 的精细调控机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:实验所用的鼠疫菌 201 株、大肠杆菌 BL21 λ DE3、大肠杆菌 DH5 α 以及质粒 pET28a (含有 His 标签,凝血酶、肠激酶酶切位点,卡那霉素抗性)均由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂:实验所用 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、DNA 分子量标准为上海生工生物工程公司产品;质粒提取试剂盒、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品;PCR 产物纯化试剂盒为 QIAGEN 生产;Core Footprinting System, Gel Shift Assay Systems,均为 Promega 公司产品。

1.2 H-NS 蛋白的克隆表达

1.2.1 表达引物设计与 PCR 扩增:用生物学软件 Array Designer 3,根据 pET28a 质粒的酶切位点及鼠疫菌 201 株的 *hns* 基因序列,设计出扩增 *hns* ORF 的引物对 *hns-p-F/hns-p-R* (分别带 *Bam*HI 和 *Sal*I 酶切位点,见表 1),并以鼠疫菌 201 株的基因组为模板扩增鼠疫菌 *hns* 的 ORF 区,扩增参数为 95 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 40 s,56 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 50 s,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min。

1.2.2 PCR 产物和质粒的酶切与连接:用质粒提取试剂盒提取 pET28a 质粒,分别用 *Bam* HI 和 *Sal*I 对 pET28a 和纯化后的 PCR 产物进行双酶切。酶切体系如下:目的 DNA 片段 10 μ L (约 100 ng/ μ L),

*Bam*HI 和 *Sal*I 各 1 μ L,100 \times 小牛血清蛋白 (BSA) 0.2 μ L,10 \times 缓冲液 2 μ L,补加去离子水至总体积 20 μ L。酶切产物用 PCR 产物纯化试剂盒回收。

酶切后的 pET28a 与 PCR 产物,按下列体系进行连接:PCR 酶切产物和 pET28a 酶切产物各 1 μ L (100 ng),DNA 连接酶 1 μ L,10 \times 连接缓冲液 1 μ L,补加去离子水至总体积为 10 μ L,4 $^{\circ}$ C 连接过夜 (约 12 h)。

1.2.3 连接产物的转化:取 90 μ L BL21 感受态细菌加入 10 μ L 连接体系中,冰浴 30 min 后于 42 $^{\circ}$ C 热冲击 90 s。再冰浴 3 min,加入 500 μ L 普通液态 LB 培养基,37 $^{\circ}$ C,200 r/min 摇床中培养细菌 1 h,取 100 μ L 涂布于含卡那霉素的肉汤培养基 (LB) 平板上,37 $^{\circ}$ C 恒温培养至出现单克隆。

1.2.4 重组克隆的鉴定:挑取重组克隆于 250 μ L 离心管中,加入 50 μ L 无菌去离子水,100 $^{\circ}$ C 作用 10 min,离心弃沉淀,用菌液上清作模板,以 *hns-p-F/hns-p-R* 为引物对 (引物见表 1),PCR 扩增 (参数同上) 鉴定,阳性克隆可见大小约为 399 bp 的条带。

1.2.5 目的蛋白 His-H-NS 的表达:将 PCR 鉴定阳性克隆送北京六合华大基因科技股份有限公司测序,测序引物为 pET28a 通用引物 (T_7/T_{7t} 见表 1),将克隆片段无突变的阳性克隆接入液态 LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养至对数中期,加入 IPTG (终浓度 1 mmol/L) 后 37 $^{\circ}$ C,200 r/min 培养,诱导表达 5 h 后,收集菌体进行全菌、菌裂解上清和沉淀的 SDS-PAGE 电泳,鉴定该诱导条件下 H-NS 的表达情况。阳性克隆在上清和沉淀中均可见诱导表达的蛋白条带。

表 1 H-NS 蛋白表达用 PCR 引物

Primer	Sequence (5'→3')	Restriction site
<i>hns-p-F</i>	CGGGATCCATGAGCGAAGCGTTAAAAAT	<i>Bam</i> HI
<i>hns-p-R</i>	CGCGTCGACTTACAACAGGAAGTCATCCAG	<i>Sal</i> I
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	-
T7t	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	-

1.2.6 His-H-NS 的纯化:将在 5 mL LB 试管中生长到对数中期的阳性克隆转接入 300 mL 的新鲜 LB 肉汤中,37 $^{\circ}$ C,200 r/min 培养至对数中期,加入终浓度 1 mmol/L 的 IPTG 诱导蛋白表达。收集菌体,超声裂解菌体,10000 \times g,4 $^{\circ}$ C 离心 30 min 取菌液上清,让上清缓慢的经 Ni-NTA 柱流下,分别用 pH8.0 的 wash buffer A 和 B (咪唑浓度分别为 20 mmol/L 和

40 mmol/L) 梯度洗去杂蛋白,最后用 pH8.0 的 Elution Buffer (含 250 mmol/L 的咪唑)洗下目的蛋白。H-NS 经透析浓缩后,用紫外分光光度计测 260 nm 和 280 nm 的吸光值,粗算出目的蛋白的浓度 ($= OD_{280} \times 1.44 - OD_{260} \times 0.74$),而后分装 -60°C 储存。取 20 μL 纯化后的产物进行 SDS-PAGE 电泳分析。

表 2 DNA 结合活性分析用引物

Table 2 Primers for the DNA-binding activity assays

Target	Primers (forward/reverse, 5'→3')
EMSA	
<i>rovA</i>	CGTTCGTTACTCTGCCATC/TGTGATTGCTCTGGTGTAAC
<i>psaA</i>	AAAGCGTCAAATAGCATTGGG/CAGCGATCATTAGTGTGTAAC
<i>psaE</i>	CCTGTTTGTCTGCTGATCC/GACTCATTGCCCTCACCTC
DNase I footprinting	
<i>rovA</i>	TGCTCCCGACGCTAAGTG/TAGAAAATTTGTTCCCTCGAC
<i>psaA</i>	TATGATGACGCTGTACTGGTG/CAGCGATCATTAGTGTGTAAC
<i>psaE</i>	GAATCATCGCGCTGTGTCAG/CAGCAGCACCTCATTCTGG

1.3 His-H-NS 活性分析

1.3.1 EMSA 实验:PCR 扩增 H-NS 靶基因 *psaA*、*psaE* 和 *rovA* (所用引物见表 2) 的启动子区并对产物纯化回收。用 T4 多聚核苷酸激酶 (T4-PNK) 对 DNA 片段末端进行 ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$ 5000 Ci/mmol, 10 mCi/mL) 标记。标记体系为: $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$ 1 μL , T4-PNK 1 μL , $10 \times \text{T4-PNK buffer}$ 1 μL , 靶基因 DNA 300–500 ng, 补加无菌去离子水至总体积 10 μL , 37°C 作用 10 min, 而后加入 1 μL 0.5 mol/L EDTA 终止反应。标记的 DNA 和不同浓度的 His-H-NS 蛋白在 10 μL 结合反应体系中 [结合缓冲液包含 1 mmol/L MgCl_2 , 0.5 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 及 0.05 mg/mL poly-(dI-dC)], 室温作用 20 min 后, 将样品加入 4% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳, -60°C 放射自显影可见相应的阻滞带^[7]。

1.3.2 DNase I 足迹实验:选择各靶基因启动子区目的 DNA 片段的上游或下游引物 (表 2), 用 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$ (5000 Ci/mmol, 10 mCi/mL) 进行标记, 标记体系为: $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$ 3 μL , T4-PNK 1 μL , $10 \times \text{T4-PNK buffer}$ 1 μL , $10 \mu\text{mol/L}$ 引物 1 μL , 补加无菌去离子水至总体积 10 μL , 37°C 反应 30 min, 70°C 5 min 终止反应。而后以鼠疫菌 201 基因组 DNA 为模板, 用被标记的引物和相应未标记的配对引物进行 PCR 扩增, PCR 产物回收后, 可作为足迹实验的探针。探针和不

同浓度梯度 H-NS 蛋白在结合体系 (结合缓冲液所含成分与 EMSA 的相同) 中共同室温孵育 30 min 后, 用合适浓度的 DNase I 消化适当的时间 (30–60 s), 消化产物配伍测序条带 [fmol[®] DNA Cycle Sequencing System (Promega)] 进行 4% 聚丙烯酰胺变性凝胶电泳, 经 -60°C 自显影可见相应的足迹带^[8]。

2 结果和分析

2.1 鼠疫菌 H-NS 蛋白的表达

2.1.1 *hns* 基因 ORF 的扩增:以鼠疫菌 201 基因组为模板用引物对 *hns*-p-F/*hns*-p-R 扩增出大小为 399 bp 的目的片段经 1% 琼脂糖电泳结果如图 1-A。

2.1.2 阳性克隆的鉴定:通过 PCR 鉴定, 我们获得了阳性单克隆菌株, 所扩增的 PCR 条带大小与理论值一致。如图 1-B 所示。

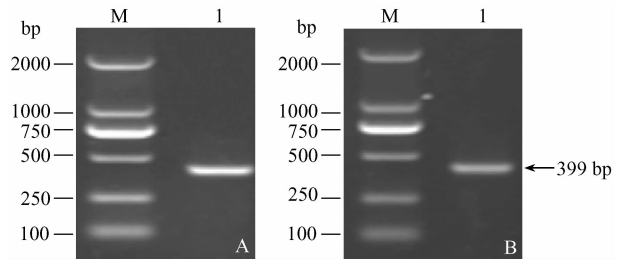


图 1 *hns*-PCR 产物 (A) 和重组克隆 PCR 鉴定 (B) 的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Electrophoresis of the PCR amplicons of *hns* from the *Y. pestis* genomic DNA (A) and from the recombinant plasmid DNA (B). M: DNA molecular weight standard; 1: PCR product.

2.1.3 目的蛋白的表达鉴定:测序正确的阳性克隆菌株进行蛋白表达。结果表明菌液上清和沉淀中均有 H-NS 表达且表达的 His-H-NS 蛋白分子量大小

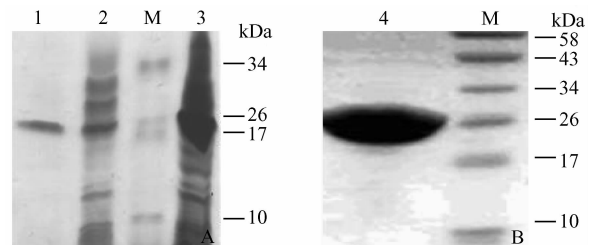


图 2 His-H-NS 蛋白预表达 (A) 与纯化后 (B) 的 12% SDS-PAGE 电泳图

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the cell lysates (A) and of the purified His-H-NS (B). M: Protein molecular weight standard; Supernatant (1), pellet (2) and whole (3) of cell lysates; 4: Purified His-H-NS.

与理论值也一致(图 2-A)。

2.1.4 H-NS 蛋白的纯化:经紫外分光光度计测得储存液中 His-H-NS 蛋白的浓度约为 0.2 mg/mL。透析浓缩后的 His-H-NS 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳(图 2-B)。由结果可以看出所得蛋白纯度较高,分子量大小也正确。

2.2 H-NS 的 DNA 结合活性分析

2.2.1 EMSA 实验:EMSA 实验结果如图 3 所示,实验设计如右下角所示,由结果可以看出:随着 His-H-NS 蛋白浓度的增加 *psaA*、*psaE* 和 *rovA* 都出现不同程度的阻滞带,而此时阴性对照 16S DNA 未出现假阳性,说明实验结果是可靠的。不同 DNA 片段出现阻滞带时所需要的 H-NS 蛋白量不同,这表明 H-NS 对靶 DNA 的结合亲和力存在差异。与 *psaE* 和 *rovA*

处于同一水平线上的阻滞条带相比,不同量的 His-H-NS 蛋白与 *psaA* 启动子区 DNA 结合的阻滞带不在同一水平上,这可能是因为反应体系中 H-NS 相对 *psaA* 探针是不足量的, His-H-NS 以不同的寡聚体形式结合到 *psaA* 启动子区上,导致 DNA-H-NS 复合物分子量大小不等所致。由结果也可以看出,当加入未标记竞争性 DNA (Cold probe, 图中第“5”孔道)后, His-H-NS 先与冷探针结合就不能再结合探针,这样阻滞带就会消失或减少;加入 16S DNA (Negative probe, 图中第“C1”孔道)时就没有此效应;鼠疫菌 F1 抗原蛋白 (Un-related protein, 图中第“C2”孔道)也不能结合到靶 DNA 上。上述结果都表明 H-NS 蛋白与这 3 个基因启动子区的结合是特异性的。

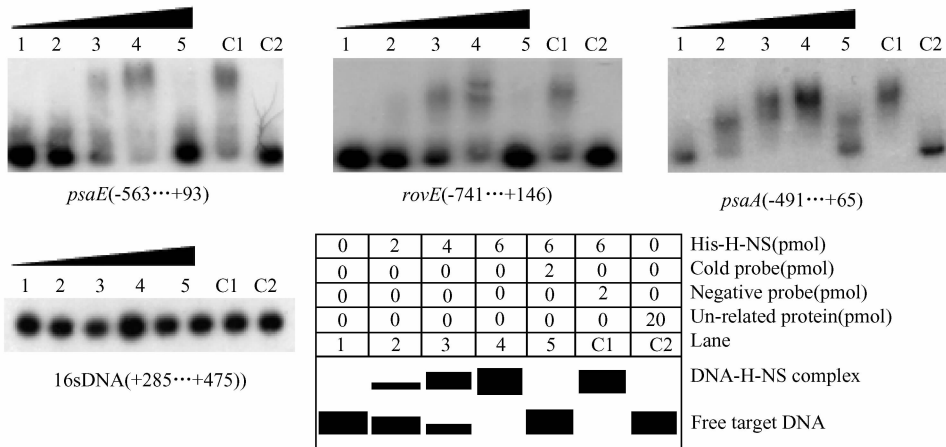


图 3 His-H-NS 对靶基因的 EMSA 放射自显影结果

Fig. 3 EMSA assay of binding of His-H-NS to target DNA fragments. The positive and minus numbers in the brackets indicated the nucleotide sites upstream and downstream of the translation start (+1), respectively. The radioactively labeled DNA fragment was incubated with increasing amounts of the purified His-H-NS protein, and then subjected to 4% (w/v) polyacrylamide gel electrophoresis. The band of free DNA disappeared with increasing amounts of His-H-NS protein, and a retarded DNA band with decreased mobility turned up, which presumably represented the DNA-H-NS complex. Shown on the lower side was the schematic representation of the EMSA design.

2.2.2 DNase I 足迹实验:EMSA 可用于对推定的启动子/增强子区域内的蛋白结合位点定位,而随后的 DNase I 足迹实验可对蛋白结合的特异区域在 DNA 序列水平上作出分析。因此通过足迹实验我们获得了 H-NS 对鼠疫菌 *psaA*、*psaE* 和 *rovA* 基因启动子区的结合序列,如图 4 所示:“1 2 3 4”为蛋白量从低到高的不同蛋白梯度,“1”为未加任何蛋白的参照。据左侧测序条带“G A T C”,我们可以直接读出 H-NS 与 *psaA*、*psaE* 和 *rovA* 启动子区的结合位置,翻译起始位点标为“+1”,它们与蛋白的结合位点分别定位于 -15 至 -191, -46 至 -230, -532

至 -604 之间的碱基,这些区域出现显著的足迹条带。其中 coding 是指被标记引物是正义链引物, non-coding 指被标记引物是反义链引物。H-NS 对 DNA 两条链结合位置的细微差异,表明 H-NS 以寡聚体形式与 DNA 的结合的这一特征。

3 讨论

我们利用大肠杆菌的表达系统成功表达并纯化了鼠疫菌的 H-NS 蛋白,获得了相对分子质量与理论值一致的目的蛋白 His-H-NS。随后通过体外

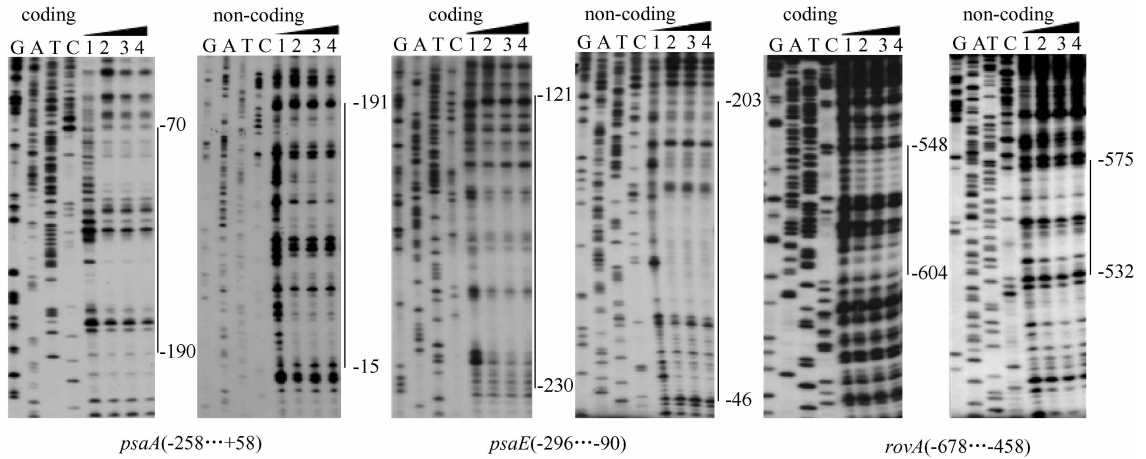


图 4 His-H-NS 与靶启动子的 DNase I 足迹实验放射自显影结果

Fig. 4 DNase I footprinting assay of binding of His-H-NS to target DNA fragments. The labeled DNA probes were incubated with increasing amounts of purified His-H-NS (lanes 1, 2, 3 and 4 contained 0, 150, 200 and 300 ng, respectively), and subjected to the DNase I footprinting assay. Lanes G, A, T and C represented the Sanger sequencing reactions. The protected regions (vertical bars) were indicated on the right-hand side. The positive and minus numbers in the brackets indicated the nucleotide sites upstream and downstream of the translation start (+1), respectively.

EMSA 实验和 DNase I 足迹实验, 证明了 His-H-NS 的 DNA 结合活性。EMSA 实验结果表明 H-NS 对鼠疫菌 *psaA*、*psaE*、*rovA* 具有直接的结合活性, 足迹实验得到 H-NS 对靶基因启动子区具体结合位点。这说明在鼠疫菌中 H-NS 可直接作用于靶基因启动子区从而可能直接调控靶基因的转录。

通常 H-NS 对具有弯曲特性且富含 AT 的 DNA 序列有较高的亲和力。有学者在 *E. coli proU* 启动子中发现一个 10bp 的碱基序列 (5'-TCGATAAATT-3') 与 His-H-NS 亲和力较高, 然而更多的研究表明 H-NS 对 DNA 启动子的结合并没有特定的基序, 且结合区域大小不等, 可以从 10 bp 到 100 多 bp^[9-10]。

本研究中鼠疫菌 H-NS 能够与 *psaA*、*psaE* 启动子区的 100 多 bp 碱基结合, 其结合位点的 AT 比例都高于 70% (图 5)。这和其他细菌中 H-NS 的 DNA 结合特点相符, 由此可以推测: H-NS 在鼠疫菌中也应有其他菌中类似的调控机制, 即 H-NS 的结合序列是具有弯曲且高 AT 含量的 DNA 序列, 以此序列为基础 H-NS 通过末端结构域相互架桥连接, 形成桥链结构阻止 RNA 聚合酶的延伸, 进而阻止了 *psaA*、*psaE* 的转录。

鼠疫菌 pH6 抗原是由位于细菌基因组上的 *psaEFABC* 操纵子编码的, 是细菌的粘附因子之一。该抗原在温度高于 36°C, pH 值低于 6.7 的环境中

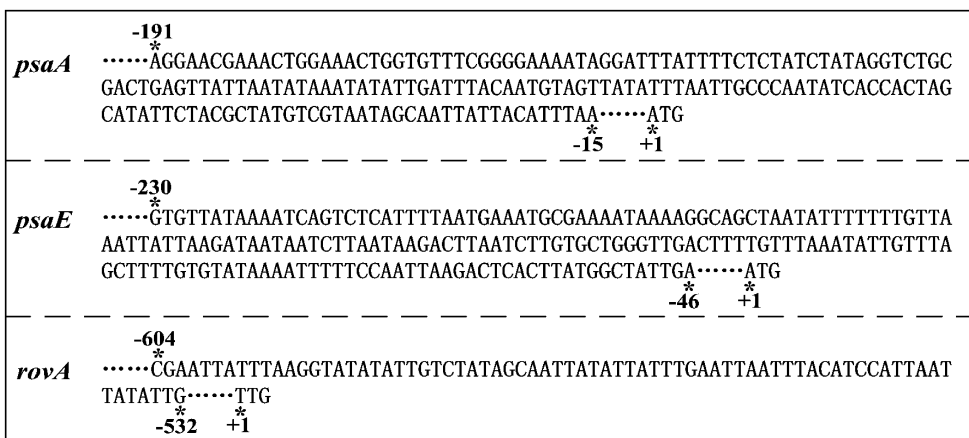


图 5 His-H-NS 对靶基因启动子区的结合位置及序列

Fig. 5 The His-H-NS-binding sites. The minus numbers indicated the nucleotide sites upstream of the translation start (+1).

高表达^[11]。pH6 抗原能够介导鼠疫菌粘附到人肺泡上皮细胞,与肺鼠疫的发病机制密切相关^[12]。RovA(或者同源蛋白)本身在很多细菌中就是一个全局性毒力调控子,在 26℃ 条件下鼠疫菌 RovA 调控子能够直接调控 pH6 抗原的表达而发挥毒力作用^[13-14]。在肠道沙门氏菌和假结核耶尔森氏菌中 RovA 对靶基因启动子的结合是解除 H-NS 对基因静默的一个重要机制^[15-16]。在本研究中,我们发现 H-NS 能够作用于 *rovA* 的启动子区,且 H-NS 对 *rovA* 的结合序列与对 *psaA* 和 *psaE* 的特点相同,AT 比例高达 80% (图 5),说明 H-NS 作为负调控子,也通过阻止 RNA 聚合酶的延伸或者其他机制来抑制 RovA 的表达。这样我们可以进行如下推测:在鼠疫菌中, H-NS 负调控 *rovA* 的表达,而 RovA 又能解除 H-NS 对某些靶基因的抑制作用,比如 *psaA*、*psaE*。但是其中的详细机制,还需要进一步详细的研究验证。本文中 H-NS 蛋白的体外表达及 H-NS 与 DNA 结合活性分析的分子生化实验平台的建立,也为后续 H-NS 调控机制的深入研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Perry RD, Fetherston JD. *Yersinia pestis*-etiologic agent of plague. *Clinical Microbiology Reviews*, 1997, 10(1): 35-66.
- [2] Zhou DS, Yang RF. Global analysis of gene transcription regulation in prokaryotes. *Cell and Molecular Life Sciences*, 2006, 63(19-20): 2260-2290.
- [3] Dorman CJ. H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(5): 391-400.
- [4] Navarre WW, McClelland M, Libby SJ, Fang FC. Silencing of xenogeneic DNA by H-NS-facilitation of lateral gene transfer in bacteria by a defense system that recognizes foreign DNA. *Genes&Development*, 2007, 21(12):1456-1471.
- [5] Bouffartigues E, Buckle M, Badaut C, Travers A, Rimsky S. H-NS cooperative binding to high-affinity sites in a regulatory element results in transcriptional silencing. *Nature Structural&Molecular Biology*, 2007, 14(5):441-448.
- [6] Tendeng C, Bertin PN. H-NS in Gram-negative bacteria: a family of multifaceted proteins. *Trends Microbiology*, 2003 Nov;11(11):511-518.
- [7] Li YL, Gao H, Qin L, Li B, Han YP, Guo ZB, Zhai JH, Du ZM, Wang XY, Zhou DS, Yang RF. Identification and characterization of PhoP regulon members in *Yersinia pestis* biovar Microtus. *BioMed Central Genomics*, 2008, 9: 143.
- [8] Gao H, Zhou DS, Li YL, Guo ZB, Han YP, Song YJ, Zhai JH, Du ZM, Wang XY, Lu JM, Yang RF. The iron-responsive Fur regulon in *Yersinia pestis*. *Journal of Bacteriology*, 190(8): 3063-3075.
- [9] Lucht J, Dersch P, Kempf B, Bremer E. Interactions of the nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS with the regulatory region of the osmotically controlled *proU* operon of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 268(9):6578-6586.
- [10] Lang B, Blot N, Bouffartigues E, Buckle M, Geertz M, Gualerzi OC, Mavathur R, Muskhelishvili G, Pon LC, Rimsky S, Stella S, Babu MM, Travers A. High-affinity DNA binding sites for H-NS provide a molecular basis for selective silencing within proteobacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(18):6330-6337.
- [11] Zav'yalov VP, Abramov VM, Cherepanov PG, Sprina GV, Chernovskaya TV, Vasiliev AM, Zav'yalova GA. pH6 antigen (PsaA protein) of *Yersinia pestis*, a novel bacterial Fc-receptor. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 1996, 14(1):53-57.
- [12] Payne D, Tatham D, Williamson ED, Titball RW. The pH6 antigen of *Yersinia pestis* binds to beta1-linked galactosyl residues in glycosphingolipids. *Infection and Immunity*, 1998, 66(9): 45-48.
- [13] Revell PA, Miller VL. A chromosomally encoded regulator is required for expression of the *Yersinia enterocolitica inv* gene and for virulence. *Molecular Microbiology*. 2000, 35(3):677-685.
- [14] Nagel G, Lahrz A, Dersch P. Environmental control of invasin expression in *Yersinia pseudotuberculosis* is mediated by regulation of RovA, a transcriptional activator of the SlyA/Hor family. *Molecular Microbiology*, 2001, 41(6):1249-1269.
- [15] Perez JC, Latifi T, Groisman EA. Overcoming H-NS-mediated transcriptional silencing of horizontally acquired genes by the PhoP and SlyA proteins in *Salmonella enterica*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(16):10773-10783.
- [16] Heroven AK, Nagel G, Tran HJ, Parr S, Dersch P. RovA is autoregulated and antagonizes H-NS-mediated silencing of invasin and *rovA* expression in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Molecular Microbiology*, 2004, 53(3):871-888.

Purification of recombinant H-NS protein of *Yersinia pestis* and characterization of its DNA-binding activity

Yiquan Zhang^{1#}, He Gao^{1,2#}, Li Wang¹, Zhang Luo, Yafang Tan¹, Zhaobiao Guo¹, Ruifu Yang¹, Dongsheng Zhou^{1*}

¹State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China

²State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Abstract: [**Objective**] The regulator protein H-NS of *Yersinia pestis* was expressed using the *Escherichia coli* BL21λDE3 protein expression system, and its DNA-binding activity was characterized. [**Methods**] The entire coding region of the *hns* gene was amplified by PCR from *Y. pestis* strain 201, and then cloned into the *Bam*HI and *Sal*I sites of the vector pET28a. The recombinant plasmid pET28a-*hns* was transformed into BL21λDE3. Over-expression of His-H-NS in the LB medium was induced by addition of 1 mM IPTG (isopropyl-b-D-thiogalactoside). The over-expressed protein was purified under native conditions with nickel loaded HiTrap Chelating Sepharose columns (Amersham). The electrophoretic mobility shift assay and DNase I footprinting experiments were carried out to analyze the DNA-binding activity of His-H-NS *in vitro*. [**Results**] The purified His-H-NS protein could bind to the upstream DNA regions of *psaA*, *psaE* and *rovA* of *Y. pestis*, and the H-NS-binding sites were determined at the single nucleotide resolution. [**Conclusion**] The purified His-H-NS protein could bind to target DNA fragments, suggesting that H-NS would regulate the transcription of relevant genes in *Y. pestis*.

Keywords: *Yersinia pestis*, H-NS, DNA binding activity

(本文责编:张晓丽)