

集胞藻 PCC6803 中 *relA/spoT* 同源基因 *syn-rsh* (*slr1325*) 的鉴定

缪小刚, 刘惠玲, 宁德刚*

江苏大学环境学院, 镇江 212013

摘要: 【目的】四磷酸或五磷酸鸟苷 (Guanosine 3', 5'-bispyrophosphate, (p) ppGpp) 是细菌在遭遇环境胁迫时细胞产生应激反应的信号分子, (p) ppGpp 由其合成酶 RelA 或具有合成酶或水解酶双重催化功能的 RelA/SpoT 合成。本文证明了集胞藻 PCC6803 (*Synechocystis* sp.) 中唯一编码 RelA/SpoT 同源蛋白 (命名为 Syn-RSH) 的基因 *slr1325* (*syn-rsh*) 的功能。【方法】通过互补试验证明 *syn-rsh* 表达产物的生物学功能; 以纤维素薄层层析检测不同条件下 *Escherichia coli* (p) ppGpp 合成缺陷突变株及集胞藻 PCC6803 细胞中的 (p) ppGpp。【结果】诱导 Syn-RSH 表达可使 (p) ppGpp 合成酶和水解酶基因缺失的 *E. coli* 突变株回复野生型表型, 并在细胞中积累一定水平的 ppGpp; 在实验室培养条件下, 集胞藻 PCC6803 细胞中可检测到低水平的 ppGpp, 氨基酸饥饿可诱导 ppGpp 水平升高并维持在相应水平。【结论】Syn-RSH 具有 (p) ppGpp 合成酶和水解酶的双重功能, (p) ppGpp 是集胞藻 PCC6803 在实验室生长条件下细胞生长所必需的。

关键词: 集胞藻 PCC6803, *syn-rsh* (*slr1325*), (p) ppGpp, RelA/SpoT 同源蛋白

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 07-0898-08

在营养缺乏和环境胁迫条件下, 细菌细胞产生应激反应的信号分子四磷酸或五磷酸鸟苷 (Guanosine 3', 5'-bispyrophosphate, (p) ppGpp)^[1]。(p) ppGpp 通过与细菌 RNA 聚合酶结合, 抑制核糖体或其他大分子的合成, 诱导胁迫反应基因表达, 调节细胞的生理状态等多种途径, 使细胞适应不利环境以维持细菌的生存^[2]。(p) ppGpp 合成缺陷导致细菌多型性表型, 如细胞分化异常, 细菌毒性下降, 细菌细胞程序性死亡消失, 次生代谢产物积累、细胞形态异常等^[3]。因此, (p) ppGpp 介导的细菌细胞对环境胁迫反应是细菌适应环境胁迫的策略之一。

(p) ppGpp 介导细菌应激反应普遍存在于细菌中, 在多数革兰氏阴性细菌如大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 中, (p) ppGpp 主要由 *relA* 基因编码

(p) ppGpp 合成酶催化 RelA 合成, RelA 将 ATP 的焦磷酸转移到 GTP 或 GDP 的 3' 位点生成 pppGpp 或 ppGpp。当胁迫条件解除后, 细胞中的 (p) ppGpp 可迅速被 *spoT* 基因编码的 ppGpp 水解酶 SpoT 降解, 从而终止细胞应激反应^[4]。在自然条件下如碳源或磷源缺乏时, SpoT 也表现出微弱的 ppGpp 合成酶活性, 以维持氨基酸生物合成最低水平^[5-6]。但有些细菌基因组中只有一个 *relA/spoT* 同源基因。如枯草芽胞杆菌中的 *relA/spoT* 基因的编码产物 RelA/SpoT 既有 ppGpp (p) 合成酶活性又有水解酶活性, 并通过控制相反功能的催化活性调控细胞中 (p) ppGpp 水平^[7]。

蓝藻染色体上存在 *relA/spoT* 同源基因, 如集胞藻 PCC6803 (*Synechocystis* sp. PCC6803, 以下简称

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30771176); 江苏大学高级人才专项 (1283000072)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-511-88790955; E-mail: 306502@ujs.edu.cn

作者简介: 缪小刚 (1985-), 男, 江苏泰州姜堰人, 硕士研究生, 主要从事蓝藻功能基因的研究。E-mail: xgmiao_2009@163.com

收稿日期: 2010-12-26; 修回日期: 2011-03-03

PCC6803) 染色体上 *slr1325* (命名为 *syn-rsh*) 基因编码产物为 760 个氨基酸多肽 (<http://www.kazusa.or.jp/cyano>), 序列与枯草芽胞杆菌 *RelA/SpoT* 同源 (命名为 *Syn-RSH*), 但迄今未见蓝藻中 *RelA/SpoT* 同源基因功能研究的报道。本文通过互补试验证明 *syn-rsh* 编码产物具有 (p) ppGpp 合成酶和水解酶活性。在试验培养条件下不能得到 PCC6803 *syn-rsh* 缺失突变株, 但可检测到低水平的 ppGpp, 提示 *syn-rsh* 是 PCC6803 在试验条件下细胞正常生长所必需的。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株(藻株)、质粒: PCC6803 由中国科学院水生生物研究所徐旭东研究员提供, 用于互补试验野生型菌株 *E. coli* CF1648 及其 *relA* 突变株 CF1652 (*relA::kan, relA⁻/spoT⁺*) 和 *relA* 和 *spoT* 双突变株 CF1693 (*relA::kan, spoT::cam, relA⁻/spoT⁻*)^[8] 由 M. Cashel 教授赠送 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), 质粒 pBV220 购自中国预防医学科学院病毒研究所, 含有来源于 λ 噬菌体受温度诱导调控的启动子 P_{LP_R} 和温度敏感型调控蛋白 (*CIts*) 基因 (*cIts*)。质粒 pJS723 和 pJS728 由本试验室构建并保存。

1.1.2 主要试剂和仪器: DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、pMD-18T 等均购自宝生物 (大连) 有限公司, DNA 凝胶回收试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司, L-丝氨酸胍氨酸 (L-serine hydroxamate, SHX) 和其他氨基酸购自 Sigma 公司, $H_3^{32}PO_4$ 购自北京福瑞达生物工程公司, 引物合成和来源于 PCR 的克隆片段由上海生工生物工程技术有限公司测序确定。聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine, PEI) 纤维素薄层层析板购自 *Selecto Scientific* 公司。主要仪器有高速冷冻离心机 (Eppendorf, Centerifuge 5804R 型), PCR 仪 (Eppendorf, Mastertycler 型), 超声波细胞粉碎机 (中国宁波新芝生物科技股份有限公司, JY92-II DN 型)。

1.2 *E. coli* 与 PCC6803 的培养

PCC6803 在 BG11 培养液中, 28 - 30°C 光照条件下 ($30 \text{ Es} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 静置培养。用于重组质粒克

隆的 *E. coli* DH5 α 和用于互补的 *E. coli* 菌株在 37°C LB 培养基中培养, 含有质粒的 *E. coli* 菌株加入氨基青霉素 (工作浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。互补试验时 *E. coli* 菌株在含 0.4% 葡萄糖的 M9 基础盐平板或 SMG 选择性培养基中 (含 0.4% 葡萄糖、L-丝氨酸、L-蛋氨酸、L-甘氨酸各 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的 M9 基础盐培养基), 于 30°C 或 42°C 培养。

1.3 DNA 操作方法

DNA 重组按标准操作方法进行^[9], PCC6803 的基因组 DNA 按文献^[10]描述的方法提取。PCR 反应体系中含 10 mmol/L Tris-Cl (pH8.3), 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 引物各 100 pmol, 200 mmol/L dNTPs, 50 ng 模板 DNA, 2.5 U DNA 聚合酶 (Taq/Pfu = 1/1, U/U, MBI)。PCR 反应程序如下: 首先是 94°C 变性 5 min, 接下来是 30 个循环反应 (94°C 变性 1 min, 60°C 复性 1 min, 72°C 延伸 1 min), 最后是 72°C 延伸 10 min。PCR 产物和酶切克隆片段用 DNA 凝胶回收层析柱纯化。

1.4 重组质粒的构建

为便于克隆, 在引物 *slr1325-1*: 5'-GGTACCGTCGCCGCTCTGCCACCG-3' 和 *slr1325-2*: 5'-GGATCCGTTATACCCGACGCAGGTCCATCAC-3' 中分别添加 *KpnI* 和 *BamHI* 酶切位点。以 *slr1325-1* 和 *slr1325-2* 为引物 PCR 扩增 *syn-rsh* 编码序列片段 (约 2.2 kb)。扩增产物克隆于 pMD-18T, 测序确定序列正确后命名为 pJS723。以 *KpnI/BamHI* 酶切 pJS723, 回收 *syn-rsh* 片段, 克隆于 pBV220 的衍生质粒 pJS691 中, 得到的重组质粒为 pJS728。

1.5 *syn-rsh* 在 *E. coli* 中的互补试验

以质粒 pBV220、pJS728 分别转化 *E. coli* CF1648、CF1652 和 CF1693, 转化子涂布于含氨基青霉素 LB 平板上于 37°C 培养约 20 h。鉴定后的重组菌株接种于 LB 液体培养基中, 培养至 OD_{600} 约 0.6。取 1 mL 的菌液 $6000 \times g$ 离心收集细胞, 用适量的 M9 基础盐液体培养基洗涤 2 次, 重悬于 1 mL 的 M9 液体培养基中, 取 5 μL 菌液分别接种在 0.4% 葡萄糖的 M9 基础盐平板或 SMG 选择性培养基中, 于 30°C、37°C 或 42°C 培养约 30 h, 观察重组菌株的生长。

1.6 ppGpp(p) 的检测

E. coli 中 (p) ppGpp 的检测根据文献^[11]描述的方法操作, 但略有改进。含 pJS728 的 *E. coli*

CF1693 在含 0.4% 葡萄糖的 MOPS 培养基 (40 mmol/L MOPS, 4 mmol/L Tricine 缓冲液 (pH7.4), 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L NH_4Cl , 0.2 mmol/L KH_2PO_4 , 0.5 mmol/L MgSO_4 , 0.01 mmol/L FeCl_3) 中于 30℃ 培养至 OD_{600} 为 0.1 时, 加 $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ 至终浓度为 100 mCi/L 继续培养 3 h。将培养物分成两部分, 一部分转移至 42℃ 诱导 *syn-rsh* 表达, 分别取 50 μL 诱导 0、20、40 和 60 min 后标记的培养物, 加等体积的 8 mol/L 甲酸混合, 于 -80℃ 室温反复冻融 3 次后 4℃ 8000 $\times g$ 离心, 取 5 μL 上清点样于孔径为 0.2 μm 的 PEI 纤维素薄层层析板 (10 \times 15 cm) 上。以 $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ 标记并以 1 g/L L-丝氨酸胍氨酸诱导后的 *E. coli* CF1648 细胞中提取的核苷酸样品为对照。以 1.5 mol/L KH_2PO_4 为展层溶剂, 于 4℃ 层析至液体到达层析板上端边缘约 3 cm 处时, 取出层析板, 室温晾干后, 放射自显影后扫描, 通过 NIH image software (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>) 软件计算 (p) ppGpp 相对百分含量。

PCC6803 细胞中的 (p) ppGpp 检测按以下方法进行。蓝藻细胞在 BG11 培养液中培养至 OD_{750} 为 0.6 的培养物中, 加入 $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ 至终浓度为 10 mCi/L, 继续培养 10 h 后加 L-丝氨酸胍氨酸至终浓度为 1 g/L, 分别诱导 0、2、4、6 和 8 h 后取 100 μL 培养物与等体积的 8 mol/L 甲酸混合, 反复冻融后离心, 取 5 μL 上清点样, 层析后通过放射自显影观察层析结果。

1.7 Syn-RSH 序列与结构域分析

利用 CD BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 搜索 Syn-RSH 序列 (<http://www.kazusa.or.jp/cyano>) 和已确定其功能的 RelA 和 RSH 同源蛋白序列中的保守结构域, 根据搜索结果确定功能结构域在多肽中的位置并进行比对。

2 结果

2.1 Syn-RSH 序列及功能结构域分析

PCC6803 染色体上的基因 *syn-rsh* 全长 2283 bp, 编码 760 个氨基酸残基的 Syn-RSH, 其序列与 ppGpp(p) 合成酶 RelA 或水解酶 SpoT, 以及具有 ppGpp(p) 合成酶/水解酶双重功能的 RelA/SpoT 同源。利用 NCBI CD 数据库对保守结构域检索分析, Syn-RSH 中有 4 个保守的结构域, 分别为依赖金属离子的磷酸水解酶的 HD 结构域, 合成或水解 ppGpp(p) 催化结构域 (CAD), GST (Threonyl-tRNA Synthetase, GTPase, and SpoT) 结构域以及 ACT 结构域 (图 1)。这些结构域也存在于 *E. coli* 的 (p) ppGpp 合成酶 RelA 或水解酶 SpoT、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) ppGpp(p) 合成酶/水解酶 RelA/SpoT 中。具有双重功能的 RelA/SpoT 通过位于 N-末端的两个不同的活性位点调节 (p) ppGpp 的合成或水解, 2 个功能相反的活性位点的催化活性是通过二者的交互调控机制实现的, C-末端的保守结构域 ACT 参与调节功能相反的催化位点的活性^[14-15]。根据 Syn-RSH 序列分析结果推测该蛋白可能具有 RelA/SpoT 活性。

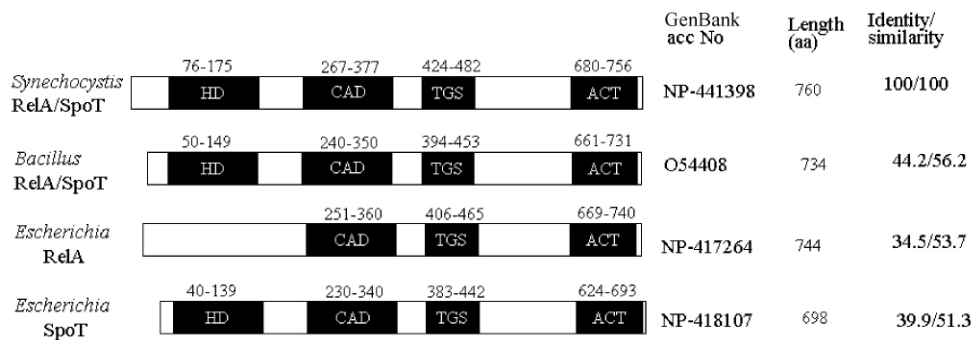


图 1 Syn-RSH 与模式 RelA 和 RelA/SpoT 蛋白结构域比对

Fig. 1 Schematic diagram showing the alignment of Syn-RSH with *E. coli* RelA, SpoT (M24503), and *Bacillus subtilis* RelA/SpoT. The positions of (p) ppGpp-degrading domain (HD), (p) ppGpp-synthesizing domain (CAD) are boxed.

2.2 诱导 *syn-rsh* 表达的重组质粒

$P_L P_R$ 启动子是大肠杆菌 λ 噬菌体中控制早期

转录的启动子, 在大肠杆菌中具有启动 RNA 转录的功能。该启动子受抑制蛋白 CI 的负调控, 温度敏感

型抑制蛋白 (CIts), 在 30°C 时具有抑制启动子的活性, 在 42°C 时失活而失去抑制启动子的活性。诱导表达载体 pBV220 中含编码 CIts 的基因 *clts* 和 $P_L P_R$ 启动子, 表达受温度严紧调控。pJS691 为本实验室构建保存 pBV220 衍生质粒, 在 pBV220 中 *EcoRI* 位点处添加了起始密码子 ATG 和酶切位点 *KpnI* (图 2-A)。以 *KpnI/BamHI* 酶切 pJS723, 回收 *syn-rsh* 片段, 克隆于 pJS691 中相应位点, 得到重组质粒为 pJS728 (图 2)。

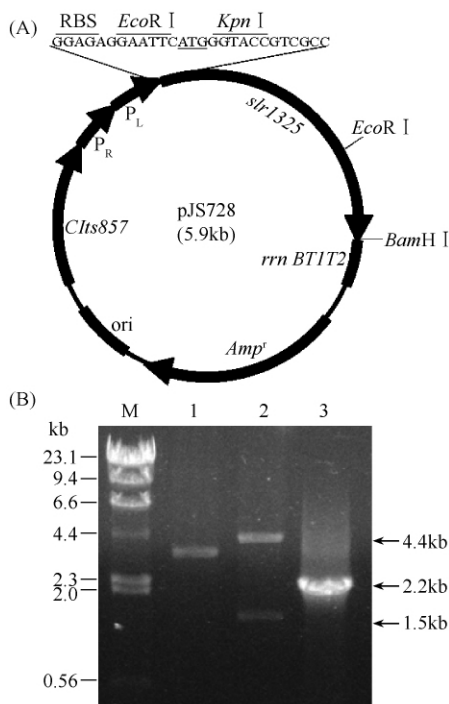


图 2 表达质粒 pJS728 的结构与电泳检测

Fig. 2 Structure and examination of expressing plasmid pJS728 by an agar electrophoresis. (A) Schematic diagram showing the structure of expressing plasmid pJS728. (B) Examination of expressing plasmid pJS728 by an agar electrophoresis. M. λ /HindIII; 1. pBV220 digested by *EcoRI*; 2. pJS728 digested by *EcoRI* 3. PCR amplification of pJS728 using *slr1325-1* and *slr1325-2* as primers.

2.3 诱导 *syn-rsh* 表达使 *relA/spoT* 双缺失突变株回复野生型表型

基因 *spoT* 缺失的大肠杆菌菌株因失去降解 (p) ppGpp 能力而有致死作用。*relA* 和 *spoT* 双突变菌株 (*relA⁻/spoT⁻*) 不能在固体寡营养培养基上生长; *relA* 突变株 (*relA⁻/spoT⁻*) 可以在寡营养培养基上生长, 但不能在 SMG 培养基上生长^[8]。因为 SMG 中添加的氨基酸使细胞的新陈代谢失去平衡, 抑制了异亮氨酸生物合成操纵子 *ilvIH* 的表达, 导致了细胞

异亮氨酸饥饿, 并诱导 RelA 合成 (p) ppGpp, 依次激活 *ilvIH* 基因表达, 使细胞能克服由 SMG 诱导产生的异亮氨酸饥饿。在 *relA* 的缺失突变株中, 因不能积累 (p) ppGpp 诱导 *ilvIH* 的表达, 细胞在 SMG 培养基上的生长受到抑制^[8]。因此, 细菌中 *relA* 或 *relA/spoT* 同源基因可通过 *E. coli* 相应的缺失突变株的互补试验得以鉴定。

含受温度诱导调控质粒的 *E. coli* 菌株的互补实验结果显示: 在 42°C 条件下, 对照菌株 CF1648 (pBV220)、CF1652 (pBV220) 在 M9 平板上可生长, 但 CF1693 (pBV220) 菌株不能生长 (结果未显示), 菌株 CF1652 (pBV220) 和 CF1693 (pBV220) 在 M9 + SMG 平板上不能生长 (图 3-B); 而含诱导表达 Syn-RSH 质粒的菌株 CF1652 (pJS728)、CF1693 (pJS728) 在 M9 (结果未显示) 和 M9 + SMG (图 3-C) 平板上都能生长。在 37°C 培养条件下, 所有菌株的在不同选择性培养基中的生长特征与在 42°C 条件下相似 (结果未显示)。但在 30°C 条件下, 含诱导表达 Syn-RSH 质粒的菌株 CF1652 (pJS728)、CF1693 (pJS728) 的生长特征与对照菌株相同 (图 3-B)。结果表明, 在 42°C 条件下诱导 *syn-rsh* 表达时, 表达产物可使 *relA⁻/spoT⁺* 和 *relA⁻spoT⁻* 突变株恢复野生型表型, 提示 *syn-rsh* 编码产物具有 (p) ppGpp 合成酶活性和水解酶活性。37°C 诱导条件下各重组菌株的表型与在 42°C 条件下相似, 提示 37°C 诱导表达 Syn-RSH 足以使突变株恢复野生型表型。

2.4 *E. coli* 中 Syn-RSH 的诱导表达能合成 ppGpp

在对 RelA 或 RelA/SpoT 同源蛋白的功能鉴定时, 通常以 L-丝氨酸的类似物 L-丝氨酸胍氨酸作为氨基酸缺乏的诱导剂, L-丝氨酸胍氨酸与 L-丝氨酸竞争, 在氨酰 tRNA 合成酶作用下形成 L-丝氨酸胍氨酸-tRNA, 并进入核糖体 A 位点抑止合成多肽的延伸, 从而激活 RelA 合成 ppGpp^[12]。为进一步证明 Syn-RSH 在 *E. coli* 中能够合成 (p) ppGpp, 将 $H_3^3PO_4$ 标记后的 CF1693 (pJS728) 细胞转移至 42°C 培养, 通过薄层层析和放射自显影技术检测细胞中 (p) ppGpp。结果显示, 菌株 CF1693 (pJS728) 在 42°C 诱导 20 min 后细胞即可检测到 ppGpp (图 4 中 5 道), 但继续诱导后细胞中 ppGpp 水平未见显著升高 (图 4 中 6, 7 道)。而菌株 CF1693 (pBV220) 在 42°C 诱导后细胞中未检测到 ppGpp (图 4 中 1 - 4

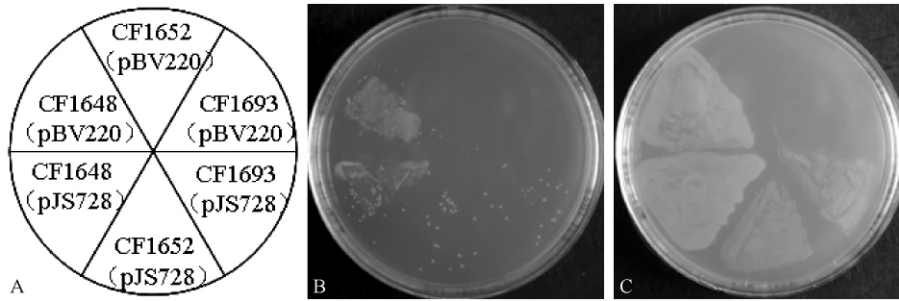


图3 诱导 Syn-RSH 表达对 *relA* 突变株以及 *relA/spoT* 双突变菌株生长的影响

Fig. 3 Growth restoration of *E. coli* strains with *relA* alone or together with *spoT* mutation plated on minimal medium by expression of *syn-rsh*. *E. coli* strains were transformed with pJS728 (expressing Syn-RSH) or the empty vector (PBV220) and then transferred to SMG selective medium (M9 salts minimal medium plus 0.4% glucose and 50 mg/ml each of serine, methionine, and glycine) with 100 g/ml ampicillin, as indicated in A. Plates were incubated for 24–48 h at 30°C (B) or 42°C (C).

道)。表明诱导表达 Syn-RSH 具有 ppGpp 合成酶活性。由于细胞中 ppGpp 随诱导时间的延长能保持相对稳定的水平,提示 Syn-RSH 也能水解 ppGpp,使细胞中的 ppGpp 保持稳定水平。

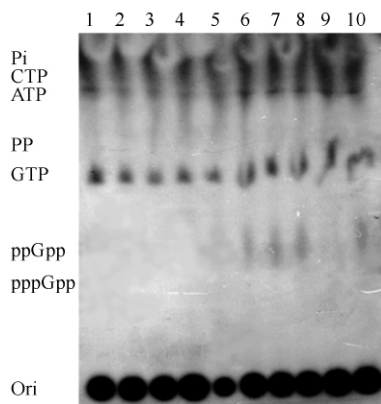


图4 诱导表达 Syn-RSH 的突变株 CF1693 中 (p) ppGpp 的检测

Fig. 4 Detection of (p) ppGpp in *E. coli* mutant CF1693 expressing Syn-RSH. 32 P-labeled CF1693 cells transformed with pBV220 (lane 1-4) or with pJS728 (lane 5-8) were induced by adding serine hydroxamate (1mg/ml) for 0, 20, 40 or 60 min, respectively, at 42°C, then nucleotides were extracted and analyzed by thin-layer chromatography and autoradiography. 32 P-labeled nucleotides extracted from CF1648 before (lane 9) or after (lane 10) incubation for 10 min with serine hydroxamate (1mg/ml) were used as controls.

2.5 在实验室培养条件下 PCC6803 细胞中存在 ppGpp

为确定 Syn-RSH 在 PCC6803 中的功能,尝试通过基因敲出构建 *syn-rsh* 缺失突变株,但对突变株细胞的突变基因检测发现仍部分残留野生型的 *syn-rsh* 基因拷贝 (PCC6803 染色体为多拷贝)。表明 *syn-*

rsh 与 *Rhodobacter capsulatus* 中的 *relA/spoT* 同源基因相似^[13],在试验条件下不能缺失,可能是细胞正常生长所必需的。为证明这一推测,对试验培养条件下处于对数生长期的 PCC6803 细胞中的 (p) ppGpp 水平进行检测。结果显示,细胞中可检测到低水平 ppGpp (图 5-A 中的第 3 道)。在 L-丝氨酸脒氨酸诱导的氨基酸缺乏条件下,细胞中 ppGpp 水平升高 (图 5-A,第 4、5 道),但随诱导时间的延长,(p) ppGpp 维持在相对稳定水平 (图 5-A 中的第 4、5、6、7 道)。提示 ppGpp 是维持细胞在试验条件下生长所必需的;在氨基酸缺乏条件下,细胞中 ppGpp 水平升高,但维持在相对稳定水平 (图 5-B)。

3 讨论

PCC6803 染色体上的基因 *syn-rsh* 编码产物与 RelA、SpoT 以及 RelA/SpoT 序列同源,并且具有依赖金属离子的磷酸水解酶的 HD 结构域,合成或水解 (p) ppGpp (p) 催化结构域 (CAD), GST (Threonyl-tRNA Synthetase, GTPase, and SpoT) 结构域以及氮末端 ACT 结构域^[3]。诱导 *syn-rsh* 表达可使 *relA⁻/spoT⁻* 双缺失突变株回复野生型表型,氨基酸饥饿诱导使表达 Syn-RSH 的 *relA⁻/spoT⁻* 双缺失突变株细胞中积累 ppGpp,并且 ppGpp 维持在相对稳定水平;对 PCC6806 细胞中 ppGpp 检测结果显示,试验培养条件下细胞中可检测到 ppGpp,氨基酸饥饿可诱导细胞 ppGpp 水平升高并维持在相应水平。本研究结果提示 PCC6803 染色体上的基因 *syn-rsh* 编码产物具有 RelA/SpoT 合成和水解 ppGpp 的双重功能,

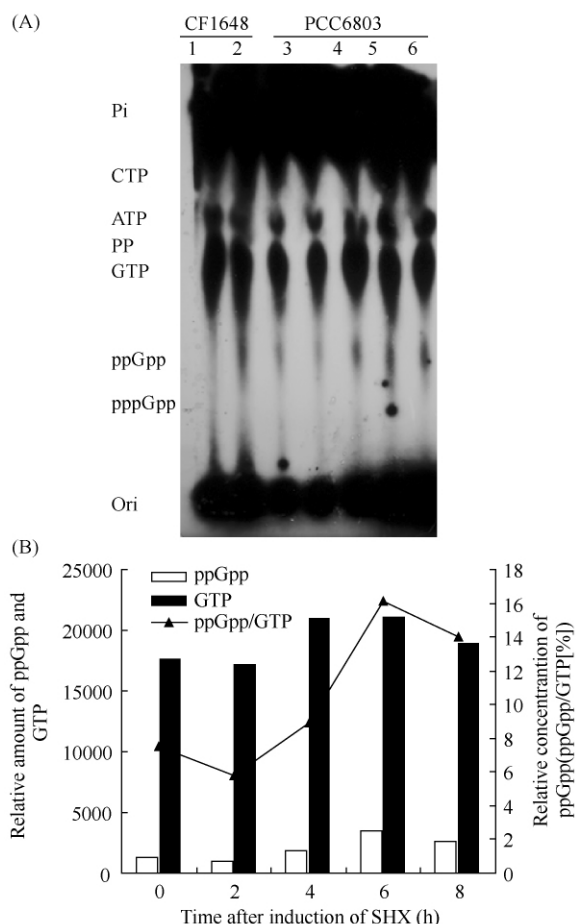


图 5 氨基酸饥饿诱导后 PCC6803 细胞中 (p) ppGpp 的检测

Fig. 5 (p) ppGpp detection of PCC6803 cells induced by amino acid starvation. (A) PCC6803 cells from a log-phase culture grown with 10uCi/mL of [³²P]orthophosphate for 10 hrs, then induced by adding 1 mg/ml L-serine hydroxamate (SHX). After incubation for 0, 2, 4, 6 or 8 hrs (lane 3, 4, 5 and 6), labeled cells were harvested, (p) ppGpp was extracted with formic acid, and analyzed by thin-layer chromatography and autoradiography. ³²P-labeled nucleotides extracted from CF1648 before (lane 1) or after (lane 2) incubation for 0.2 h with L-serine hydroxamate (1 mg/ml) were used as controls. (B) Relative amounts of GTP and ppGpp were calculated with NIH image software (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>), and relative concentrations of ppGpp were indicated by the ratio of ppGpp vs GTP at various times.

syn-rsh 与 *Rhodobacter capsulatus* 中的 *relA/spoT* 同源基因相似^[13], 在试验条件下是细胞正常生长所必需的。但与 *Rhodobacter capsulatus* 不同, 在实验室培养条件下 PCC6803 细胞中可检测到 ppGpp; 在氨基酸饥饿条件下细胞中 ppGpp 浓度升高, 但维持在相对稳定水平上, 提示 Syn-RSH 可能在蛋白水平上通过调节 (p) ppGpp 合成酶活性和水解酶活性调节细胞

内的 (p) ppGpp 水平。

具有 (p) ppGpp 合成酶活性和水解酶双重功能的 RelA/SpoT 同源蛋白在参与 (p) ppGpp 代谢过程中, 通过相反活性的交互耦联转换机制调控两个不同活性位点的活性, 调节 (p) ppGpp 在细胞中的水平^[14-15]。通过 RelA/SpoT 的 C 末端与核糖体结合, 调节其 N 末端的具有相反活性构象的变化, 调控水解酶与合成酶活性之间的转换^[16]。RelA/SpoT 酶自我调控机制提示, 其相反的催化活性可能用于设计特异的抑制子干扰不同的活性位点, 具有作为开发新的抗菌药物靶点的潜力^[16]。本研究的结果表明, PCC6803 中的 RelA/SpoT 同源蛋白具有合成和水解 ppGpp 的双重功能, 对其结构和功能的深入研究对控制产水华蓝藻的具有重要的应用价值。

(p) ppGpp 介导的细胞应激反应是细菌适应环境胁迫的重要途径之一。蓝藻是地球上最早出现的生物之一, 距今已有 30-35 亿年。在长期的自然选择过程中, 进化形成适应环境变化的独特的生理机制^[17]。蓝藻适应环境胁迫的机理已有很多研究, 但 RelA/SpoT 家族同源蛋白在蓝藻适应环境胁迫中的作用尚待阐明。本研究结果显示, 一定水平的 ppGpp 是维持试验条件下 PCC6803 细胞生长所必需的, 提示蓝藻中 *relA/spoT* 同源基因表达产物在控制 (p) ppGpp 代谢调控中具有不同于其他细菌的机制。另外, 在高等植物的叶绿体中也发现细菌 RelA/SpoT 同源基因, 对植物抗病能力等具有重要作用^[18-19], 推测植物叶绿体中的 RelA/SpoT 同源蛋白来源于内共生光合细菌。植物叶绿体起源的内共生理论认为, 叶绿体是通过蓝藻内共生进化形成。因此通过对蓝藻和植物叶绿体中的 RelA/SpoT 功能的研究, 为蓝藻内共生理论提供有力的证据。

参考文献

- [1] Chatterji D, Ojha AK. Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Current Opinion in Microbiology*, 2001, 4(2):160-165.
- [2] Touloukhonov II, Shulgina I, Hernandez VJ. Binding of the transcription effector ppGpp to *Escherichia coli* RNA polymerase is allosteric, modular and occurs near the N terminus of the β' -subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(2):1220-1225.
- [3] Potykyus K, Cashem M. (p) ppGpp: still magical? *Annual Review of Microbiology*, 2008, 62:35-51.

- [4] Magnusson LU , Farewell A , Nystrom T. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology* , 2005 , 13 (5) : 236-242.
- [5] Seyfzadeh M , Keener J , Nomura M. spoT-dependent accumulation of guanosine tetraphosphate in response to fatty acid starvation in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 1993 , 90 (23) : 11004-11008.
- [6] Spira B , Silberstein N , Yagil E. Guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp) synthesis in cells of *Escherichia coli* starved for Pi. *The Journal of Biological Chemistry* , 1995 , 177 (14) : 4053-4058.
- [7] Wendrich TM , Marahiel MA. Cloning and characterization of a *relA/spoT* homologue from *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* , 1997 , 26 (1) : 65-79.
- [8] Xiao H , Kalman M , Ikehara K , Zemel S , Glaser G , Cashel M. Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *The Journal of Biological Chemistry* , 1991 , 266 (9) : 5980-5990.
- [9] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989.
- [10] Ning DG , Xu XD. *abr0117* , a two-component histidine kinase gene , is involved in heterocyst development in *Anabaena* sp. PCC7120. *Microbiology-SGM*. 1 , 2004 , 150 : 447-453.
- [11] Bochner BR , Ames BN. Complete analysis of cellular nucleotides by two-dimensional thin layer chromatography. *The Journal of Biological Chemistry* , 1982 , 257 (16) : 9759-9769.
- [12] Tosa T , Pizer LI. Biochemical bases for the antimetabolite action of L-serine hydroxamate. *Journal of Bacteriology* , 1971 , 106 (3) : 972-982.
- [13] Masuda S , Bauer CE. Null Mutation of HvrA Compensates for loss of an essential *relA/spoT*-Like gene in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology* , 2004 , 186 (1) : 235-9.
- [14] Avarbock D , Avarbock A , Rubin H. Differential regulation of opposing RelMtb activities by the aminoacylation state of a tRNA-ribosome-mRNA-RelMtb complex. *Biochemistry* , 2000 , 39 (38) : 11640-11648.
- [15] Mechold U , Murphy H , Brown L , Cashel M. Intramolecular regulation of the opposing (p) ppGpp catalytic activities of RelSeq , the Rel/Spo enzyme from *Streptococcus equisimilis*. *Journal of Bacteriology* , 2002 , 184 (11) , 2878-2888.
- [16] Hogg T , Mechold U , Malke H , Cashel M , Hilgenfeld R. Conformational antagonism between opposing active sites in a bifunctional RelA/SpoT homolog modulates (p) ppGpp metabolism during the stringent response. *Cell* , 2004 , 117 (1) : 57-68.
- [17] Grossman A , Schaefer M , Chiang G , Collier J. The Responses of Cyanobacteria to environmental Conditions: Light and Nutrients. In: Bryant D (ed) *The Molecular Biology of Cyanobacteria*: Kluwer Academic Publishers , 1994: Chapter 21
- [18] Givens RM , Lin MH , Taylor DJ , Mechold U , Berry JO , Hernandez VJ. Inducible expression , enzymatic activity , and origin of higher plant homologues of bacterial RelA/ SpoT stress proteins in *Nicotiana tabacum*. *The Journal of Biological Chemistry* , 2004 , 279 (9) : 7495-504.
- [19] Van der Biezen EA , Sun J , Coleman MJ , Bibb MJ , Jones JD. Arabidopsis RelA/SpoT homologs implicate (p) ppGpp in plant signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 2000 , 97 (7) : 3747-3752.

Characterization of the *relA/spoT* homologue *slr1325* (*syn-rsh*) of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803

Xiaogang Miao , Huiling Liu , Degang Ning*

College of Environment , Jiangsu University , Zhenjiang 212013 , China

Abstract: [Objective] Nucleotide guanosine-3',5'-(bis) pyrophosphate (ppGpp) synthesized by (ppGpp) synthetase RelA or bifunctional ppGpp synthase/degradase RelA/SpoT, mediates bacterial stringent response to various stressful conditions. Here we characterized the *slr1325* (*syn-rsh*) gene encoding a RelA/SpoT homolog (Syn-RSH) of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. [Methods] We performed phenotypic complement test using *Escherichia coli* strain with (p)ppGpp-synthesis defect to determine Syn-RSH function(s), and employed chromatographic analysis of ³²P-labeled cellular mononucleotides to detect the accumulation of ppGpp in *Escherichia coli* strains expressing Syn-RSH and in *Synechocystis* sp. PCC6803. [Results] Syn-RSH expression in *E. coli relA/spoT* double mutant was able to restore the cell growth arrest; Chromatographic analysis of ³²P-labeled cellular mononucleotides revealed that Syn-RSH expression resulted in the synthesis of ppGpp in *E. coli* strain with *relA* and *spoT* mutant mutation. Additionally, *Synechocystis* cells accumulated a low level of ppGpp under laboratory growth conditions. [Conclusion] Syn-RSH possesses ppGpp synthase/degradase activities, and ppGpp is required for *Synechocystis* cell viability under normal growth conditions.

Keywords: *Synechocystis* sp. PCC6803, *slr1325* (*syn-rsh*), (p)ppGpp, (p)ppGpp synthase/degradase

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30771176) and by the Special Foundation of Jiangsu University(128000072)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-511-88790955; E-mail: 306502@ujs.edu.cn

Received: 26 December 2010/Revised: 3 March 2011

1953 年创刊以来所有文章全文上网

从 2008 年 1 月开始《微生物学报》的所有文章开始全文上网了。欢迎广大读者登陆本刊主页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>) 浏览、查询、免费下载全文! 由于《微生物学报》历史久远, 为方便读者查阅, 将刊期变化作以下统计。

《微生物学报》刊、期统计表

2011 年 7 月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953 - 1956	半年刊	1 - 4	1 - 2
1957 - 1958	季刊	5 - 6	1 - 4
1959	季刊	7	1 - 2
1959 - 1962	停刊 3 年		
1962	季刊	8	3 - 4
1963 - 1965	季刊	9 - 11	1 - 4
1966	季刊	12	1 - 2
1966 - 1972	停刊 6 年半		
1973 - 1988	季刊	13 - 28	1 - 4
1989 - 2007	双月刊	29 - 47	1 - 6
2008	月刊	48	1 - 12
2009	月刊	49	1 - 12
2010	月刊	50	1 - 12
2011	月刊	51	1 - 7