

哈氏弧菌 *dam* 基因的克隆与分析

王华磊¹, 王焕然^{2,3}, 张卫卫^{2,3}, 孙 黎^{2*}

(¹ 中国海洋大学生命学院 青岛 266003) (² 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

(³ 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘 要 利用兼并 PCR 的方法克隆得到哈氏弧菌 T4 的 DNA 腺嘌呤甲基化酶 (*dam*) 基因, 序列分析表明该基因编码 279 个氨基酸, 与其它已知弧菌的 Dam 具有较高的同源性, 其中与副溶血弧菌 Dam 的相同性达 95%。功能检验表明所克隆的 *dam* 基因在大肠杆菌中具有 DNA 腺嘌呤甲基化酶活性, 能够甲基化大肠杆菌染色体 DNA GATC 序列中的腺嘌呤。运用染色体步移法获得 *dam* 基因上游的 3251 bp DNA, 发现该区域含有 3 个基因, 其与 *dam* 在染色体上的相对排列顺序为: 莽草酸激酶 - 脱氢奎尼酸合成酶 - *damX* - *dam*。对 *dam* 上游 DNA 序列研究发现位于翻译起点 ATG 上游的 78bp、112bp 和 477bp DNA 片段皆具有启动子活性, 但前者的活性明显高于后二者。

关键词: DNA 腺嘌呤甲基化酶; 哈氏弧菌; 启动子

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)05-0855-0

DNA 甲基化在生物界是一种普遍机制, 几乎存在于所有生命体中^[1]。目前已发现的甲基化皆由 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase)所介导, 该酶能够利用 S-腺苷甲硫氨酸为底物, 将其甲基转移至腺嘌呤(A)的 N6 或胞嘧啶(C)的 C5 或 N4 位置上^[2,3]。DNA 甲基转移酶具有序列识别特异性, 只有当 A 和 C 位于某一特定序列内(如 GATC, CCWGG)时方可成为甲基受体。DNA 甲基化最早是作为限制-修饰系统的一个组成部分而被发现的^[4,5], 该系统是生物在长期进化过程中形成的一种自我保护机制, 其中甲基转移酶所起的作用是甲基修饰某些特定序列中的腺嘌呤或胞嘧啶, 以此特征将自身 DNA 与异源 DNA 区别开来。随后的研究发现一些独立存在的甲基转移酶, 其功能与限制-修饰无关。DNA 腺嘌呤甲基化酶(DNA adenine methylase, Dam)即是这种类型的酶之一。Dam 广泛存在于细菌中, 如大肠杆菌, 沙门氏杆菌, 耶尔森氏菌, 奈瑟菌, 以及霍乱弧菌等。与限制-修饰系统中的甲基化酶不同, Dam 参与细胞生理代谢过程中的许多重要方面, 如通过影响 SeqA 与复制起点的结合而调控染色体 DNA 的复制^[6], 通过影响调控因子与启动子靶位点的相互作用而控制某些基因的表达等^[7]。近年来研究表明在某些人类病原菌中 Dam 与细菌致病力密切相关, 其基因敲除导致细菌毒力

大幅下降^[8-10]。基于其在细胞生命过程中所起的多重作用, *dam* 基因的研究将有助于加深我们对细菌生命机制的理解。

弧菌为兼性厌氧类革兰氏阴性杆菌, 广泛分布于自然界中。弧菌科多种属是人类或养殖动物病原性细菌, 其中哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)能够感染多种养殖水生生物(虾、鱼、贝等), 是危害我国水产养殖业发展的重要病原菌之一。本文报道了哈氏弧菌 *dam* 基因的克隆、*dam* 基因启动子活性的定位及分析, 为深入了解 Dam 在哈氏弧菌生命机制中的作用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本研究所用的大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 购自 TaKaRa 公司; ER2925 购自于 NEB 公司。哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)T4 菌株为本实验室自鱼体中分离。大肠杆菌 TOP10 λ RS65 和质粒 pSC6 参见文献^[11]。质粒 pBR322 和 pBS-T 购自于“天根生化科技(北京)有限公司”。pSC11、pBD 为本研究中所构建。

1.1.2 主要试剂和仪器: 所有酶皆购自于 NEB 公司; 所有试剂、药品皆购自于上海生工生物工程技术服务有限公司; 各种纯化试剂盒皆购自天根生化科

基金项目: 国家自然科学基金(40576071), 国家“973 项目”——重点基础研究发展规划项目(2006CB101807)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-532-82898834, E-mail: lsun@ms.qdio.ac.cn

作者简介: 王华磊(1983-)男, 山东烟台人, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物学。E-mail: kingeaglecat@163.com

收稿日期: 2007-02-09; 接受日期: 2007-04-02; 修回日期: 2007-07-09

技(北京)有限公司;实验中所用 PCR 仪为德国 Biometra T personal;吸光值测定采用 Amersham Biosciences 公司的 GeneQuant pro 仪器。

1.1.3 引物 本研究所用的引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成(表 1)。

表 1 引物序列

Table 1 DNA sequences of the primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
VdamF1	AAAAAGCAGCGAGCCTTTC
VdamF2	ACGCTACTTGAATATTGCGGCC
VdamF4	CCCGGGTTCAAACCGGTCAGCCC
VdamF7	GATATCCCTCAAGCGAAAAGC
VdamF8	GATATCAGTGGGTCAGGTACAT
VdamF11	GTGAAATAATCTGAGCTTCG
VdamR1	AACAAAAAGGTGCGTTCAA
VdamR2	GTAGATAGTGGTCATAGTCGGT
VdamR3	CCCGGGAGATCCACTATTCAATG
VdamR5	GATATCTACTGCTCTATCTATC
LacZYF2	TATCCCGGGATTTAAATTCACACAGGAAACAGC
LacZYR2	ATATCCCGGGTTAAGCGACTTCATTACC

1.2 细菌培养

大肠杆菌在 LB 培养基中于 37℃ 培养。T4 在 LB 培养基中于 30℃ 培养。抗菌素的添加量为:氨苄青霉素(ampicillin, Ap) 100 μg/mL;卡那霉素(kanamycin, Kn) 50 μg/mL。

1.3 DNA 技术

质粒提取、DNA 琼脂糖凝胶回收、PCR 产物纯化皆用“天根生化科技(北京)有限公司”相应试剂盒。细菌基因组 DNA 提取按文献[12]方法。β-半乳糖苷酶活力测试按文献[13]方法。染色体步移采用 BD GenomeWalker Universal Kit(Clontech, USA)。所有试剂盒的具体使用皆按厂家说明书进行。

1.4 质粒构建

TOP10λRS65 为携带有噬菌体 λRS65 的大肠杆菌 TOP10。λRS65 中含有大肠杆菌 *lacZ* 基因,该基因可以用引物 LacZYF2 和 LacZYR2 进行 PCR 而获得。以 10ng TOP10λRS65 基因组 DNA 为模板,以 LacZYF2 和 LacZYR2 为引物按下列条件进行 PCR 反应以获得 *lacZ* 基因:94℃ 60s;94℃ 40s,54℃ 60s,72℃ 60s,5 个循环;之后改为 94℃ 40s,64℃ 60s,72℃ 60s,25 个循环;72℃ 10min。PCR 产物经纯化后连接于 *EcoRV*/*Pvu* II 处理过的 pSC6 中,重组质粒命名为 pSC11。pBD 的构建在“结果和分析”中阐述。

1.5 基因克隆

1.5.1 T4 *dam* 基因的克隆 以 10ng T4 基因组 DNA 为模板,以 VdamF1 和 VdamR1 为引物按下列条件进

行梯度 PCR 反应:94℃ 60s;94℃ 40s,温度梯度 35℃~55℃,60s,72℃ 60s,30 个循环;72℃ 10min。PCR 产物经纯化后连接于 TA-克隆载体 pBS-T,连接液转化入大肠杆菌 DH5α,在含有 Ap(100 μg/mL)、Xga(40 μg/mL)和 IPTG(24 μg/mL)的 LB 固体培养基上筛选转化子。挑取白色转化子进行测序分析。

1.5.2 P₄₇₇、P₁₁₂ 和 P₇₈ 的克隆 以 10ng T4 基因组 DNA 为模板,分别以 VdamF7 和 VdamR5 为引物 PCR 扩增 P₄₇₇,以 VdamF8 和 VdamR5 为引物 PCR 扩增 P₁₁₂,以 VdamF11 和 VdamR5 为引物 PCR 扩增 P₇₈ 条件为:94℃ 60s,94℃ 40s,51℃ 60s,72℃ 60s,5 个循环;之后改为 94℃ 40s,54℃ 60s,72℃ 60s,25 个循环;72℃ 10min。PCR 产物经纯化后连接于 *Swa* I 处理过的 pSC11 中,重组质粒分别命名为 pSC477、pSC112 和 pSC78。

1.6 核酸和氨基酸序列分析

所有序列分析比较皆通过 NCBI(National Center for Biotechnology Information)blast(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)进行。T4 *dam* 及相关基因的 GenBank 序列号为 EF421460。

2 结果和分析

2.1 哈氏弧菌 T4 甲基化状态的确定

哈氏弧菌 T4 基因组 DNA 经用 *Dpn* I、*Dpn* II 和 *Sau*3A I 酶切,酶切结果经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后(图 1)发现 T4 DNA 对 *Dpn* I 和 *Sau*3A I 敏感,而对 *Dpn* II 则具有抗性,说明该菌中存在具功能活性的 DNA 腺嘌呤甲基化酶,在其作用下 T4 染色体 DNA 处于被甲基化状态。

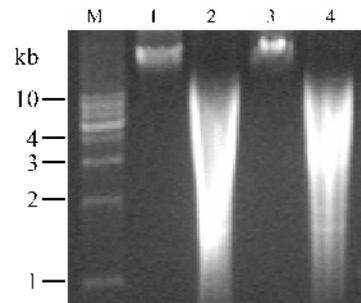


图 1 T4 基因组 DNA 的 *Dpn* I、*Dpn* II 和 *Sau*3A I 酶切分析

Fig. 1 *Dpn* I, *Dpn* II and *Sau*3A I analysis of the T4 genomic DNA. M: DNA marker; 1: Undigested T4 genomic DNA; 2, 3 and 4: T4 genomic DNA digested with *Sau*3A I, *Dpn* II and *Dpn* I, respectively.

2.2 *dam* 基因的克隆和分析

通过分析已知弧菌属 *dam* 基因的序列确定出
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

其共同的保守区域, 据此设计兼并引物 *VdamF1* 和 *VdamR1*。以 T4 基因组 DNA 为模板, 用 *VdamF1* 和 *VdamR1* PCR 获得一 392bp 的 DNA 片段。根据这 392bp DNA 序列设计引物 *VdamF2* 和 *VdamR2*, 用其进行染色体步移, 由此获得了 T4 *dam* 全基因。生物信息学分析表明 T4 *dam* 基因全长为 840bp, 编码 279 个氨基酸, 与副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*) 以及霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) *Dam* (GenBank 序列号分别为 BA000031, AE016795, AE004329) 的同源性分别为 95%、90% 和 81%。

2.3 T4 *dam* 上游区基因序列的确定和分析

为了确定 T4 *dam* 基因在染色体上的相对位置, 我们利用染色体步移的方法克隆了 T4 *dam* 上游的 3251 bp DNA。序列分析发现在该区有两个紧密相邻的开放阅读编码框 (Open Reading Frame, ORF), 其大小分别为 1503bp 和 1101bp。ORF1503 的编码产物为 *DamX* 相关蛋白, 其与副溶血弧菌、创伤弧菌以及霍乱弧菌的同类蛋白 (GenBank 序列号分别为 BA000031, AE016795, AE004329) 的同源性 (identity) 分别为 80%、62% 和 54%。ORF1101 编码 366 个氨基酸, 其序列与副溶血弧菌和创伤弧菌的脱氢奎尼酸合成酶 (3-dehydroquinate synthase, GenBank 序列号同上) 的同源性分别为 91% 和 82%。ORF1101 的上游为一截断的 ORF (truncated ORF), 其编码的 C 端 169 个氨基酸与副溶血弧菌的莽草酸激酶 (shikimate kinase) 具有 94% 的相同性 (identity)。这 3 个基因与 *dam* 在染色体上的相对排列顺序为: 莽草酸激酶 - 脱氢奎尼酸合成酶 - *damX* - *dam*。

2.4 T4 *dam* 基因的功能检验

为了检验所克隆的 T4 *dam* 基因是否具功能活性, 以 T4 基因组 DNA 为模板, 用引物 *VdamF4* 和 *VdamR3* PCR 扩增 *dam* 结构基因及 433bp 上游区域。PCR 产物纯化后与经 *EcoRV* 处理过的质粒 pBR322 相连, 连接液转化 *dam*⁻ 大肠杆菌 ER2925, 将重组质粒命名为 pBD。将含有 pBD 和 pBR322 的 ER2925 分别命名为 ER2925/pBD 和 ER2925/pBR322。将 ER2925/pBD 和 ER2925/pBR322 过夜培养, 提取其基因组 DNA, 分别用 *Dpn I*、*Dpn II* 和 *Sau3A I* 酶切。酶切结果 (图 2) 表明, 与 ER2925 的 *dam*- 基因型一致, ER2925/pBR322 的 DNA 对 *Dpn II* 和 *Sau3A I* 敏感, 对 *Dpn I* 具有抗性。与此相反, ER2925/pBD 的基因组 DNA 则对 *Dpn I* 敏感, 对 *Dpn II* 具有抗性, 说明该菌的 DNA 处于被甲基化状态, 即 pBD 所

携带的 T4 *dam* 基因在大肠杆菌中能够表达并且具有 DNA 甲基化酶的功能活性。

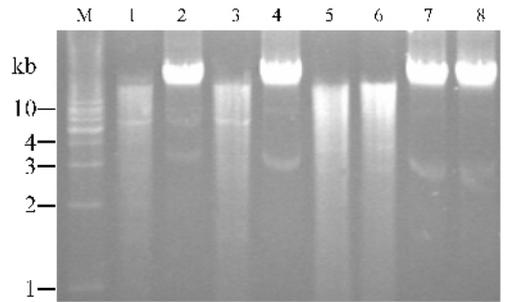


图 2 ER2925/pBD 和 ER2925/pBR322 基因组 DNA 的 *Dpn I*、*Dpn II* 和 *Sau3A I* 酶切分析

Fig. 2 *Dpn I*, *Dpn II* and *Sau3A I* analysis of the genomic DNA of ER2925/pBD and ER2925/pBR322. M. DNA marker; 1, 2, and 3: ER2925/pBD genomic DNA digested with *Sau3A I*, *Dpn II* and *Dpn I*, respectively; 4: undigested ER2925/pBD genomic DNA; 5, 6 and 7: ER2925/pBR322 genomic DNA digested with *Sau3A I*, *Dpn II*, and *Dpn I*, respectively; 8: undigested ER2925/pBR322 genomic DNA.

2.5 *dam* 启动子活性分析

为了确定 T4 *dam* 基因上游序列是否具有启动子活性, 我们利用 pSC11 对 T4 *dam* 翻译起点 ATG 上游的 477bp DNA 区进行了分析。pSC11 的主要特点是其含有一个去启动子的 *lacZ* 作为报告基因, 该基因的上游区设计有一个 *Swa I* 酶切位点, 外源 DNA 可以由此插入, 如果插入的外源 DNA 具启动子活性, 那么 *lacZ* 基因即可得以表达, 并且其表达水平可以作为一个反映异源启动子活性程度的指标。在本研究中我们通过 PCR 扩增 (具体细节参见“材料与方法”) 得到位于 T4 *dam* 翻译起点 ATG 上游的 477bp 和 112bp DNA 片段 (分别命名为 P_{477} 和 P_{112} 。见图 3), PCR 产物连接于 *Swa I* 处理过的 pSC11 后转化大肠杆菌 DH5 α , 重组质粒分别命名为 DH5 α /pSC477 和 DH5 α /pSC112。将 DH5 α /pSC477、DH5 α /pSC112 和 DH5 α /pSC11 (即 DH5 α 带有 pSC11, 作为对照) 点划于含有 Xgal 的 LB 固体平板上, 发现前二者皆为蓝色, 而 DH5 α /pSC11 则为白色, 说明 P_{477} 和 P_{112} 皆具启动子活性。分析 P_{112} 序列发现一个类似经典 σ^{70} 依赖型启动子: GTGAAA TAATCCTGAGCTTCGTTG AAAAAT (其中方框内序列分别为可能性 -35 和 -10)。将该启动子的 -10 序列中的 AT 突变为 CG 导致该启动子活性完全消失, 说明该启动子确为 σ^{70} 依赖型。我们推测, 如果 P_{112} 的活性确为上述启动子所致, 那么去掉 P_{112} 中该启动子序列前端的 34bp DNA 应该不影响 P_{477} 的启动子活性。为了检验

- [10] Del Portillo G , Pucciarelli MG , Casades J. DNA adenine methylase mutants of *Salmonella typhimurium* show defects in protein secretion , cell invasion , and cell cytotoxicity . *Proc Natl Acad Sci USA* , 1999 , **96** : 11578 – 11583 .
- [11] Sun L , vanderSpek J , Murphy JR. Isolation and characterization of iron-independent positive dominant mutants of Diphtheria toxin repressor , DtxR . *Proc. Natl Acad Sci USA* , 1998 , **95** : 14985 – 14990 .
- [12] Syn CK , Swarup S. A Scalable Protocol for the Isolation of Large-Sized Genomic DNA within an Hour from Several Bacteria . *Analytical Biochemistry* , 2000 , **278** : 86 – 90 .
- [13] Miller JH. *Experiments in Molecular Genetics*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory . Press , 1972 .
- [14] Lyngstadaas A , Lobner-Olesen A , Boye E. Characterization of three genes in the *dam*-containing operon of *Escherichia coli* . *Mol Genet* , 1995 , **247** (5) : 546 – 554 .
- [15] Marinus MG. Methylation of DNA . In : Neidhardt FC , *et al.* ed. *Escherichia coli* and *Salmonella* : Cellular and Molecular Biology . Washington DC : ASM Press , 1996 : 782 – 791 .
- [16] Calmann MA , Marinus MG. Regulated expression of the *Escherichia coli dam* gene . *J Bacteriol* , 2003 , **185** : 5012 – 5014 .

Cloning and analysis of the *Vibrio harveyi dam* gene

WANG Hua-lei¹ , WANG Huan-ran^{2,3} , ZHANG Wei-wei^{2,3} , SUN Li^{2*}

(¹ Ocean University of China , Qingdao 266003 , China)

(² Institute of Oceanology , Chinese Academy of Sciences , Qingdao 266071 , China)

(³ Graduate University of the Chinese Academy of Sciences , Beijing 100049 , China)

Abstract : The DNA adenine methylase (*dam*) gene was cloned by degenerate PCR from *Vibrio harveyi* strain T4. The gene was 840bp in length and encoded a putative protein of 279 amino acids that shared relatively high homology with the Dam of other *Vibrios* , especially with that of *V. parahaemolyticus* (96% in identity). The *V. harveyi dam* gene was subcloned into plasmid pBR322 and the resulting plasmid pBD was introduced into the *E. coli* strain ER2925 in which the *dam* gene had been knocked out. *Dpn* I , *Dpn* II , and *Sau*3A I restriction enzyme analysis of the genomic DNA of ER2925 transformed with pBD indicated that the cloned *V. harveyi dam* gene could functionally complement the *E. coli dam* mutant and methylate *E. coli* chromosome at the GATC sites. The 3251 bp upstream region of *V. harveyi dam* was obtained by genome walking and analyzed at the sequence level. It was found that this 3251 bp region contained two complete open reading frames (ORF) : one was of 1101 bp in length and the other was of 1503 bp in length. The predicted amino acid sequence of ORF1101 shared 91% identity with the 3-dehydroquinate synthase of *V. parahaemolyticus* . The amino acid sequence of ORF1503 shared 80% identity with *V. parahaemolyticus* DamX. A truncated ORF was found at the upstream of ORF1101 , encoding 169 amino acids that shared 94% identity with the shikimate kinase of *V. parahaemolyticus* . These three genes , together with *dam* , were arranged in the order of shikimate kinase-3-dehydroquinate synthase-*damX-dam* . The region immediate upstream of the *V. harveyi dam* structural gene was cloned in three fragments of different length : 78bp , 112 bp and 477bp (named P78 , P112 , and P477 , respectively) and tested for promoter activity. The results showed that , while all the three fragments had detectable promoter activities , the activity of P78 appeared to be higher than that of P₁₁₂ and P₄₇₇ .

Keywords : DNA adenine methyltransferase ; *Vibrio harveyi* ; promoter activity