

## 鱼腥蓝细菌 PCC 7120 中一个受到 NtcA 调控的基因 *alr1390*

刘梦滢, 王莉, 陈雯莉\*

(华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

**摘要:** NtcA 是鱼腥蓝细菌中一种重要的氮代谢调控蛋白质, 参与异形胞的分化。许多受 NtcA 调控的基因都至少有一个保守的 NtcA 结合位点 GTA-N<sub>8</sub>-TAC。经生物信息学分析, 鱼腥蓝细菌 PCC 7120 基因 *alr1390* 可能的转录起始位点的上游有一个保守的 NtcA 结合位点 GTA-TAGTTTTTC-TAC。【目的】为了鉴定 *alr1390* 和 NtcA 之间的关系, 【方法】采用实时定量反转录 PCR 实验 (Real-time RT-PCR) 和电泳迁移率实验 (Electrophoretic mobility shift assays, EMSA) 对 *alr1390* 和 NtcA 之间的关系进行了分析。【结果】Real-time RT-PCR 结果显示, *alr1390* 的转录水平在野生型鱼腥蓝细菌 PCC 7120 中缺氮诱导后和诱导前持平, 而在 *ntcA* 突变体中缺氮诱导 12h 后呈现上调趋势。但是 EMSA 实验中没有检测到明显的 NtcA 和 *alr1390* 启动子区片段结合的滞后带, 却观察到一条拖带。【结论】这说明 *alr1390* 受到 NtcA 的调控。

**关键词:** 鱼腥蓝细菌 (*Anabaena* sp.) PCC 7120; NtcA; *alr1390*; 实时定量反转录 PCR (Real-time RT-PCR); 电泳迁移率实验 (Electrophoretic mobility shift assays, EMSA)

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2010) 01-0036-05

NtcA 是一个转录调控蛋白质, 属于 CAP 蛋白质家族, 能调控许多参与氮代谢和碳代谢的基因<sup>[1]</sup>。鱼腥蓝细菌 (*Anabaena* sp.) PCC 7120 (以下简称 PCC 7120) 是一种丝状体革兰氏阴性细菌, 可以在缺乏化合态氮源的条件分化形成行使生物固氮功能的异形胞<sup>[2]</sup>, NtcA 是主要的氮代谢调控子<sup>[3]</sup>, 异形胞的分化也依赖于 NtcA<sup>[4-5]</sup>。目前已经证明很多在丝状蓝细菌中与氮代谢有关的基因表达都受 NtcA 的调控: 如编码谷氨酰胺合成酶的 *glnA* 基因<sup>[6]</sup>、*petH* 基因<sup>[7]</sup>、固氮酶基因 *nifHDK*<sup>[8]</sup>、亚硝酸盐还原酶基因 *nirA*<sup>[9]</sup>、与异形胞发育有关的基因 *hetC*<sup>[10]</sup> 和 *devBCA*<sup>[11]</sup> 等。这些受 NtcA 调控的基因都至少拥有一个保守的 NtcA 结合位点 GTA-N<sub>8</sub>-TAC, 而且在蓝细菌中 NtcA 结合位点的核苷酸序列

非常保守<sup>[12]</sup>。

运用生物信息学的方法在 PCC 7120 的 *alr1390* 基因 ATG 的上游发现了一个保守的 NtcA 结合位点 GTA-TAGTTTTTC-TAC, 通过实时定量反转录 PCR (Real-time RT-PCR) 和电泳迁移率实验 (Electrophoretic mobility shift assays, EMSA) 探讨 *alr1390* 和 NtcA 之间的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 野生型鱼腥蓝细菌 PCC 7120 和表达宿主大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 为本室保存。重组表达质粒 pET-NtcA, 卡那霉素 (Kanamycin, Kan) 抗性, 为本室保存。蓝细菌在

基金项目: 国家自然科学基金 (30670046)

\* 通信作者。Tel: +86-27-87282730; Fax: 86-27-87280670; E-mail: wlchen@mail.hzau.edu.cn

作者简介: 刘梦滢 (1984 -), 女, 湖北人, 硕士研究生, 主要从事蓝细菌分子生物学研究。E-mail: liumengying@webmail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2009-06-25; 修回日期: 2009-07-21

28 °C, 120 r/min, 连续光照 (40  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) 的条件下培养。大肠杆菌于 37 °C 条件下, 在 LB 培养基中培养, 如果使用卡那霉素 (Kanamycin, Kan), 其终浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** PCR 引物合成和序列测定为北京华大基因研究中心、北京三博志远生物技术有限公司和北京奥科生物技术有限公司完成; 高保真 DNA 聚合酶是购自 Toyobo 公司的 KOD-plus; PCR 回收试剂盒购自 Qiagen 公司; HisTrap 蛋白质纯化回收柱购自 Amersham 公司; DNase 购自 TaKaRa 公司; 反转录试剂盒购自 Toyobo 公司; 实时定量反转录 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司; Real-time RT-PCR 仪器购自 Bio-Rad 公司。

## 1.2 蓝细菌 RNA 的提取和纯化

采用传统的热酚法对蓝细菌进行 RNA 的抽提<sup>[13]</sup>。使用 TaKaRa 公司的 DNase 纯化蓝细菌的粗提 RNA, 去除残余 DNA。

## 1.3 半定量反转录 PCR (RT-PCR)

使用分光光度计定量 RNA, 用来自于 Toyobo 公司的试剂盒反转录 RNA 合成 cDNA。

## 1.4 实时定量反转录 PCR (Real-time RT-PCR)

使用软件 Beacon Designer 设计引物 *alr1390*-up-Realtime (5'-CGCCAAACCCTCATAACTAAATCAG-3') 和 *alr1390*-down-Realtime (5'-TCAGCCGCCGTC TTCTCC-3'), 使用 TaKaRa 公司的试剂盒 PrimeScript™ RT Reagent Kit (Perfect Real Time) 进行实时定量反转录 PCR 实验。

分析软件使用 Bio-Rad iQ5 Optical System Software (Bio-Rad), 定量方法为相对定量法  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 。

## 1.5 大肠杆菌超表达蛋白质

将重组表达质粒转化表达宿主大肠杆菌 *E. coli*

BL21 (DE3), 在 37 °C、180 r/min 条件下, 以终浓度为 1 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导蛋白质的超量表达。

## 1.6 大肠杆菌超表达蛋白质的纯化

表达宿主大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中大量表达的蛋白质带有 His-Tag, 用 HisTrap 蛋白质亲和层析柱进行纯化。

## 1.7 蛋白质溶液的去盐处理

蛋白质溶液使用 PD-10 去盐柱进行去盐处理。

## 1.8 电泳迁移率实验 (Electrophoretic mobility shift assays, EMSA)

设计引物 *alr1390*-up (5'-AAAATTCGGTGA TGATTGCTT-3'), *alr1390*-down (5'-CCTTAACCCA GAAATCCCT-3'), *glnA*-up (5'-GGATTTTATGTCAA AGTTGAC-3'), *glnA*-down (5'-CGAAACAAAGTT GATGAC-3'), 以 PCC 7120 总 DNA 为模板, 分别扩增 *alr1390* 和 *glnA* 上游的启动子区域。将纯化的 NtcA 和 DNA 片段一同孵育, 在非变性的聚丙烯凝胶电泳上, 分离复合物和非结合的 DNA 片段。DNA-蛋白复合物比非结合的 DNA 片段移动得慢。

## 2 结果

### 2.1 *alr1390* 基因的生物信息学分析

通过对 PCC 7120 基因组进行分析 (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/>), 发现 *alr1390* 的 ATG 上游 -357bp 的位置具有一个保守的 NtcA 结合位点 (GTA-N<sub>8</sub>-TAC), 见图 1。NtcA 属于 CAP 蛋白质家族, 这类蛋白质往往作为转录调控子参与目标基因的表达调控。这一保守结构域的存在表明, 在缺氮条件下, *alr1390* 的表达可能受到 NtcA 的调控。



图 1 *alr1390* 在鱼腥蓝细菌 PCC 7120 基因组中的位置

Fig. 1 Genetic map of *alr1390* in the chromosome of *Anabaena* sp. PCC 7120.

对 *alr1390* 的启动子进行预测, 发现可能有一个转录起始位点, 位于其 ATG 上游 -79bp 处 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>), 见图 2。

考虑到 *alr1390* 的 NtcA 结合位点 GTA-TAGTTTTTC-TAC 位于其可能的转录起始位点的上游, 推测这个

基因有可能受到 NtcA 的调控。

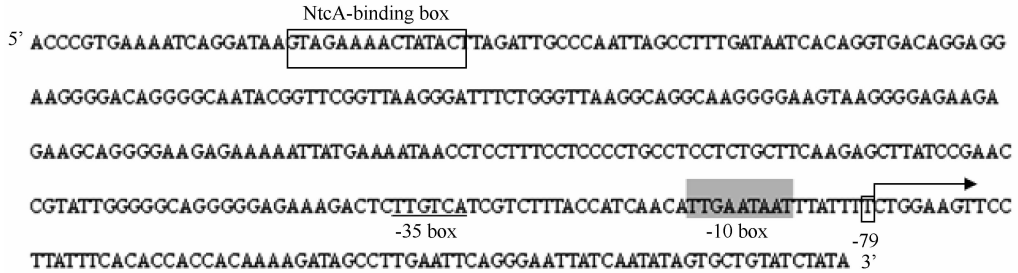


图2 *alr1390* 推测的转录起始位点位置

Fig. 2 Putative *tsp* position of *alr1390*.

对 *alr1390* 进行结构域分析,发现在其羧基端 905aa 到 930aa 处含有一个 PEP-CTERM 结构域,这个结构域可能编码一个蛋白质分拣信号 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>),见图 3-A。再进行跨膜结构

分析,发现 *alr1390* 含有 8 个跨膜片段,可能编码膜蛋白质,见图 3-B (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)。

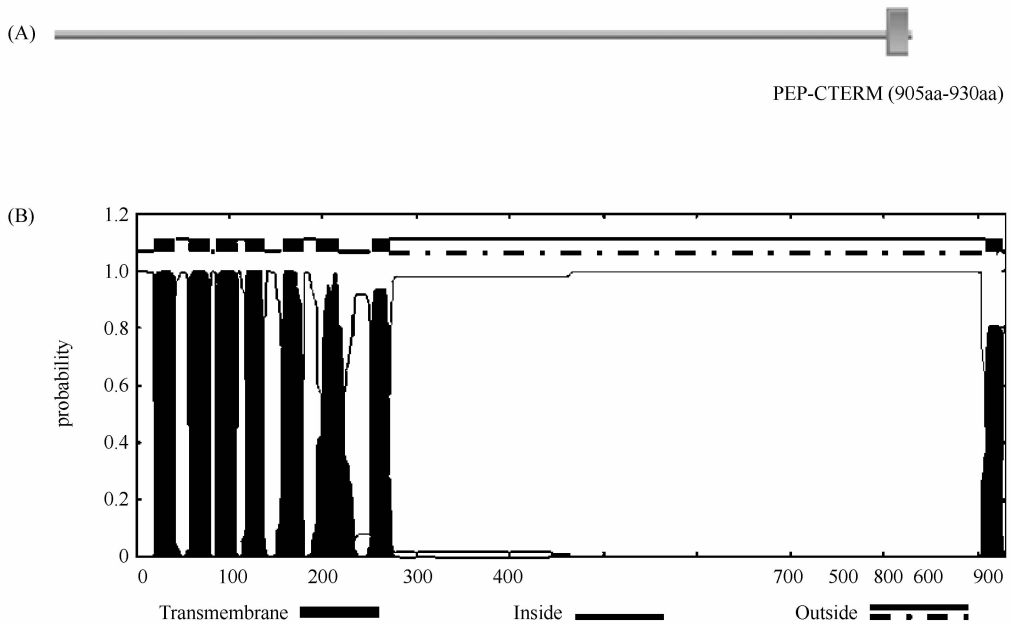


图3 *alr1390* 结构域 (A) 和跨膜结构 (B) 的预测

Fig. 3 Prediction of motif (A) and transmembrane helices (B) in *alr1390*.

## 2.2 *alr1390* 在缺氮诱导后的转录水平

为了分析 NtcA 对 *alr1390* 的调控作用,通过 Real-time RT-PCR 检测了 *alr1390* 在缺氮诱导后的野生型 PCC 7120 中和 *ntcA* 突变体中转录水平的变化,结果显示(图 4),在缺氮诱导后,*alr1390* 的转录水平存在复杂的变化。野生型 PCC 7120 缺氮诱导后 *alr1390* 的转录水平虽然存在波动但基本持平且与诱导前相似。而 *ntcA* 突变体缺氮诱导后 3 h 时 *alr1390* 的转录水平出现下调;6 h 时 *alr1390* 的转录水平反而上调并持续至 48 h,其中 12 h 时达到诱导前的 1.5 倍,24 h 时达到诱导前的 2 倍,48 h 时达到诱导前的 5.3 倍;72 h 时 *alr1390* 的转录水平再次下

调,但是也有诱导前的 3.3 倍;整个诱导过程中,除了 1.5 h 和 3 h,其它所有时间点 *alr1390* 的转录水平都高于诱导前。和野生型 PCC 7120 相比,*alr1390* 的转录水平在 *ntcA* 突变体中缺氮诱导 12 h 后呈现上调趋势,这暗示 *alr1390* 有可能是受到 NtcA 调控的。

## 2.3 NtcA 对于 *alr1390* 启动子片段的结合

为了验证 NtcA 对于 *alr1390* 的影响,使用特异性引物分别扩增出 *alr1390* 和 *glnA* 的编码区上游包含 NtcA 结合位点在内的一段核苷酸片段,其中 *glnA* 启动子片段是作为正对照。通过电泳迁移率实验 (EMSA),对 NtcA 与 *alr1390* 启动子片段的结合能

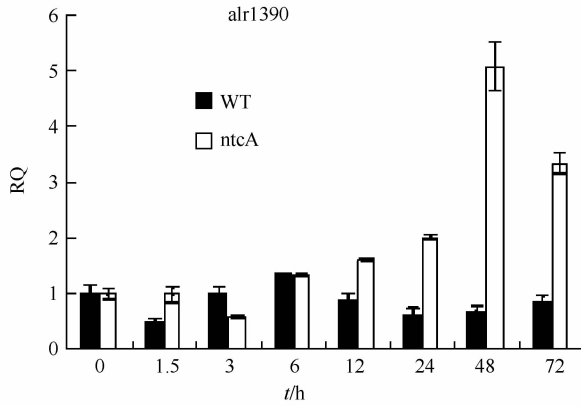


图4 *alr1390* 在野生型鱼腥蓝细菌 PCC 7120 和 *ntcA* 突变体中的转录水平

Fig. 4 Analysis of transcripts of *alr1390* in *Anabaena* sp. PCC 7120 wild type and *ntcA* mutant.

力进行分析,结果显示(图5),在添加了终浓度为 5 mmol/L 的  $MgCl_2$ , 1 mmol/L 的  $\alpha$ -酮戊二酸 (2-oxoglutarate, 2-OG), 5 mmol/L 的二硫苏糖醇 (DTT) 的条件下, *alr1390* 启动子片段添加 NtcA 的反应体系在电泳后与没有添加 NtcA 的相比没有出现一条明显的滞后的条带,但是却出现了一条拖带,而且随着蛋白质浓度的升高拖带变长。

对反应体系进行了如下改变:①添加了终浓度为 5 mmol/L 的  $MgCl_2$ ;②添加了终浓度为 5 mmol/L 的  $MgCl_2$ , 2.5 mmol/L 的 2-OG;③添加了终浓度为 5 mmol/L 的  $MgCl_2$ , 5 mmol/L 的 2-OG;④添加了终

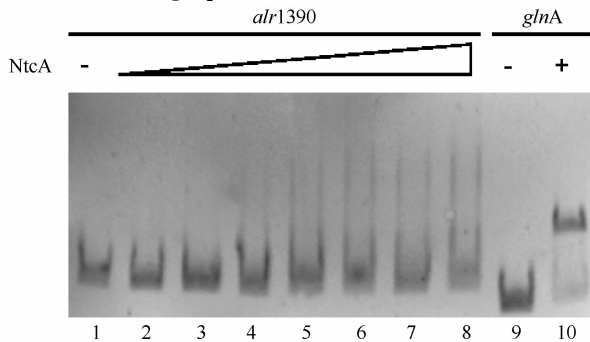


图5 NtcA 对 *alr1390* 启动子 DNA 电泳迁移的影响

Fig. 5 NtcA induced gel mobility shift of a DNA fragment in the *alr1390* promoter region. Lane 1 – 8 is Electrophoretic mobility shift assay of increasing amounts of NtcA to a 198 bp DNA fragment containing the *Anabaena* sp. PCC 7120 *alr1390* promoter. Lane 9 – 10 is Electrophoretic mobility shift assay of increasing amounts of NtcA to a 180 bp DNA fragment containing the *Anabaena* sp. PCC 7120 *glnA* promoter. Lane 1, free DNA; lane 2, 132 nmol/L NtcA; lane 3, 264 nmol/L NtcA; lane 4, 396 nmol/L NtcA; lane 5, 528 nmol/L NtcA; lane 6, 792 nmol/L NtcA; and lane 7, 924 nmol/L NtcA; lane 8, 1056 nmol/L NtcA; lane 9, free DNA; lane 10, 264 nmol/L NtcA.

浓度为 5 mmol/L 的  $MgCl_2$ , 1 mmol/L 的 2-OG, 1 mmol/L 的 DTT;⑤添加了终浓度为 5 mmol/L 的  $MgCl_2$ , 1 mmol/L 的 2-OG, 10 mmol/L 的 DTT。这 5 种反应体系都没有得到明显的 NtcA 和 *alr1390* 启动子片段复合物条带(数据没有显示)。

### 3 讨论

在 PCC 7120 中 NtcA 是一个掌控全局的氮代谢调控子,并且参与异形胞的分化。受 NtcA 直接调控的基因的启动子区域都至少含有一个 NtcA 保守结合位点。在本研究中,通过生物信息学分析发现在 *alr1390* 可能的转录起始位点的上游有一个保守的 NtcA 结合位点 GTA-TAGTTTTTC-TAC。通过 Real-time RT-PCR 实验检测了 *alr1390* 在缺氮诱导后的野生型 PCC 7120 中和 *ntcA* 突变体中转录水平的变化。发现在野生型 PCC 7120 中缺氮诱导后的各个时间点 *alr1390* 的转录水平基本持平且近似于诱导前。但是和野生型 PCC 7120 相比, *alr1390* 的转录水平在 *ntcA* 突变体中缺氮诱导 12 h 后呈现上调趋势,推测 *alr1390* 有可能受到 NtcA 的调控。但是在体外实验 EMSA 实验中,没有检测到明显的 NtcA 和 *alr1390* 启动子区的片段结合的条带,却出现了一条拖带。这有 2 个可能:一种可能是二者之间存在直接相互作用,但是在本研究中体外条件没有完全优化或者体外条件没有办法完全模拟体内环境,因而未能检测到明显的蛋白质-DNA 复合物条带,只检测到拖带;另一种可能是 NtcA 和 *alr1390* 之间确实没有直接相互作用。结合 Real-time RT-PCR 实验结果,如果是前者,有可能 NtcA 直接调控 *alr1390*;如果是后者,有可能 NtcA 间接调控 *alr1390*,当 *ntcA* 突变时影响了某个信号分子,而这个信号分子造成 *alr1390* 在缺氮诱导 12 h 后转录水平上调。这需要进一步的研究确定 NtcA 和 *alr1390* 之间的关系。

### 参考文献

- [1] Herrero A, Muro-Pastor AM, Valladares A, et al. Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 2004, 28:469-487.
- [2] Risser DD, Callahan SM. HetF and PatA control levels of HetR in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190: 7645-7654.
- [3] López-Gomollón S, Hernández JA, Pellicer S, et al. Cross-talk Between Iron and Nitrogen Regulatory Networks in *Anabaena* (*Nostoc*) sp. PCC 7120: Identification of Overlapping Genes in FurA and NtcA. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 374: 267-281.

- [ 4 ] Frías JE, Flores E, Herrero A. Requirement of the regulatory protein NtcA for the expression of nitrogen assimilation and heterocyst development genes in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Molecular Microbio*
- [ 5 ] Wei TF, Ramasubramanian TS, Golden JW. *Anabaena* sp. strain PCC 7120 *ntcA* gene required for growth on nitrate and heterocyst development. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176:4473-4482.
- [ 6 ] Valladares A, Muro-Pastor AM, Herrero A, et al. The *NtcA*-dependent P1 promoter is utilized for *glnA* expression in N<sub>2</sub>-fixing heterocysts of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186:7337-7343.
- [ 7 ] Valladares A, Muro-Pastor AM, Fillat MF, et al. Constitutive and nitrogen-regulated promoters of the *peth* gene encoding ferredoxin: NADP<sup>+</sup> oxidoreductase in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. *FEBS Letters*, 1999, 449:159-164.
- [ 8 ] Wei TF, Ramasubramanian TS, Pu F, et al. *Anabaena* sp. strain PCC 7120 *bifA* gene encoding a sequence-specific DNA-binding protein cloned by *in vivo* transcriptional interference selection. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175:4025-4035.
- [ 9 ] Frías JE, Flores E, Herrero A. Nitrate assimilation gene cluster from the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179:477-486.
- [ 10 ] Muro-Pastor AM, Valladares A, Flores E, et al. The *hetC* gene is a direct target of the NtcA transcriptional regulator in cyanobacterial heterocyst development. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181:6664-6669.
- [ 11 ] Fiedler G, Muro-Pastor AM, Flores E, et al. NtcA-dependent expression of the *devBCA* operon, encoding a heterocyst-specific ATP-binding cassette transporter in *Anabaena* sp. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183:3795-3799.
- [ 12 ] Herrero A, Muro-Pastor AM, Flores E. Nitrogen control in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183:411-425.
- [ 13 ] Zhang CC, Libs L. Cloning and characterisation of the *pknD* gene encoding a eukaryotic-type protein kinase in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Molecular and General Genetics*, 1998, 258:26-33.
- [ 14 ] Marcozzi C, Cumino AC, Salerno GL. Role of NtcA, a cyanobacterial global nitrogen regulator, in the regulation of sucrose metabolism gene expression in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Archives of Microbiology*, 2009, 191:255-263.

## A putative NtcA-regulating gene, *alr1390*, in *Anabaena* sp. PCC 7120

Mengying Liu, Li Wang, Wenli Chen\*

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** NtcA is a master transcriptional regulator in global nitrogen control in *Anabaena*. Heterocyst differentiation depends on the NtcA protein. A large number of genes regulated by NtcA have a consensus sequence, GTA-N<sub>8</sub>-TAC, for NtcA binding. Bioinformatics analysis of *alr1390* in the chromosome of *Anabaena* sp. PCC 7120 indicates that there is a conservative NtcA binding box, GTA-TAGTTTTTC-TAC, upstream the putative *tsp* position of *alr1390*. [ **Objective** ] To understand the relationship between *alr1390* and NtcA, [ **Methods** ] Real-time RT-PCR and EMSA were used. [ **Results** ] Real-time RT-PCR results showed that the transcriptional level of *alr1390* remained constant before and after combined nitrogen step-down in wild type *Anabaena* sp. PCC 7120. However, in the *ntcA* mutant, there was an increase in the transcriptional level of *alr1390* after 12h of combined nitrogen step-down, which indicated that *alr1390* should be subject to the regulation of NtcA. Additionally although no conspicuous NtcA-*alr1390* complex was detected by EMSA *in vitro*, a smear appeared in gel electrophoresis. [ **Conclusion** ] These results suggested that *alr1390* might be regulated by NtcA.

**Keywords:** *Anabaena* sp. PCC 7120; NtcA; *alr1390*; Real-time RT-PCR; Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670046)

\* Corresponding author. Tel.: +86-27-87282730; Fax: +86-27-87280670; E-mail: wlichen@mail.hzau.edu.cn

Received: 25 June 2009/ Revised: 21 July 2009