

蓝细菌 PCC6803 染色体上的毒素蛋白 Slr0664 与抗毒素蛋白 Ssr1114 的相互作用

叶森, 宁德刚*

(江苏大学环境学院, 镇江 212013)

摘要:【目的】证明蓝细菌 PCC6803 染色体上的毒素-抗毒素系统(TA, toxin-antitoxin system) *ssr1114/slr0664* 中毒素蛋白 Slr0664 与抗毒素蛋白 Ssr1114 之间的相互作用。【方法】构建在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 (DE3)中诱导表达 H₆-Ssr1114 或共表达 H₆-Ssr1114 和 Slr0664 的重组质粒,诱导表达后借助亲和捕捉技术在不同的条件下纯化 H₆-Ssr1114 或共纯化重组蛋白 H₆-Ssr1114 和 Slr0664,并通过肽谱分析共纯化的重组蛋白,证明 H₆-Ssr1114 与 Slr0664 之间存在相互作用。【结果】诱导 Slr0664 表达对细胞产生毒性作用导致生长抑制或细胞死亡,诱导 H₆-Ssr1114 和 Slr0664 共表达时细胞能正常生长,在非变性条件下可纯化共表达的重组蛋白 H₆-Ssr1114 和 Slr0664,在变性条件下仅 H₆-Ssr1114 被纯化,肽谱分析结果表明共纯化的重组蛋白为 H₆-Ssr1114 和 Slr0664。【结论】*ssr1114/slr0664* TA 系统中抗毒素蛋白 Ssr1114 与毒素蛋白 Slr0664 之间存在相互作用。

关键词: 蓝细菌 PCC6803; TA 系统; *ssr1114/slr0664*; 相互作用

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 06-0743-06

一般认为,细菌染色体上的毒素-抗毒素系统(Toxin-antitoxin system, TA 系统)参与或介导中度过胁迫条件下细胞的生长抑制或死亡^[1]。大肠杆菌染色体上的 *relBE* 是研究最为清楚的 TA 系统之一, *relE* 和 *relB* 分别编码毒素蛋白 RelE 和抗毒素蛋白 RelB; RelE 对细胞具有毒性作用,抑制细胞生长^[2-3]; RelB 与 RelE 相互作用形成复合体,抑制毒素蛋白的细胞毒性作用^[4]; RelB 被依赖 ATP 的丝氨酸蛋白酶 Lon 降解,因此在正常的生理条件下需要持续合成 RelB 来维持抑制毒素蛋白活性的复合体的稳定性^[5]; RelB 或 RelB₂-RelE₂ 复合体与操纵子的启动子结合,反馈抑制毒素和抗毒素蛋白的表达^[6]。

生物信息学分析发现,在已完成基因组测序的其他细菌染色体上也存在 *relE* 同源基因,与 *relB* 非同源的基因位于同一操纵子中^[7]。常家宁等^[8]在大肠杆菌中证明了蓝细菌 PCC6803 (*Synechocystis* sp. PCC6803,以下简称 PCC6803)染色体上的基因 *ssr1114* 和 *slr0664* 构成一个 TA 系统(简称为 *ssr1114/slr0664* 系统)。其中, *slr0664* 编码的毒素蛋白 Slr0664,与 *relBE* 系统中的毒素蛋白 RelE 同源,但 *ssr1114* 编码的抗毒素蛋白与 RelB 没有相似性^[8]。这种组合的 TA 系统是否具有大肠杆菌 *relBE* 相似的特征和功能有待证明。本研究对 PCC6803 染色体上的 *ssr1114/slr0664* 系统中的毒素蛋白和抗毒素蛋白之间的相互作用进行了研究。

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资助(1283000072)

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

作者简介: 叶森(1985-),男,山东聊城人,硕士研究生,主要从事蓝细菌 PCC6803 染色体上毒素抗毒素基因的研究。E-mail: yesen1985828@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-12-02; **修回日期:** 2010-01-23

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等均购自宝生物(大连)有限公司,蛋白纯化试剂盒 Ni-NTA His-Bind Resin 购自 Novagen (USA),引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,来源于 PCR 产物的克隆片段由上海生工生物工程技术有限公司测序确定。高速冷冻离心机(Eppendorf, Centerifuge 5804R 型), PCR 仪(Eppendorf, Mastertycler 型), 蛋白电泳仪(Bio-Rad, PowerPac basic 型), 质谱仪(Bruker, Ultraflex ToF-ToF 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)。

1.1.2 菌株、质粒和培养条件:用于质粒克隆的宿主菌大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 和诱导表达重组蛋白的菌株 *E. coli* BL21(DE3) 在 37 $^{\circ}$ C LB 培养基中培养,含有质粒的大肠杆菌加入相应的抗生素(氨苄青霉素和硫酸卡拉霉工作浓度均为 50 μ g/mL),所用质粒均为本实验室构建并保存。质粒 pJS306 见文献[8],该质粒中 *slr0664* 的编码序列克隆于 pET30a 的衍生质粒 pJS298 中,由启动子 *P_{lac}* 控制表达。

1.2 分子生物学操作

DNA 重组按标准操作方法进行^[9], PCC6803 染色体的提取参照徐旭东描述的方法^[10]。PCR 反应体系中含 10 mmol/L Tris · Cl (pH 8.3), 50 mmol/L MgCl₂, 引物各 100 pmol, 200 μ mol/L dNTPs, 50 ng 模板 DNA, 2.5 U DNA 聚合酶。反应程序为:94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。

1.3 重组质粒的构建

为构建诱导表达 *Ssr1114* 的重组质粒,设计并合成引物 *ssr1114-N*: 5'-GAGACATATGATGAGAGCTTTTGAGGTAATGGC-3' 和 *ssr1114-B*: 5'-GAGAGATCCCTTCTCCTATATTCGGGTGA-3'。为便于克隆在上下游引物中分别添加 *NdeI* 和 *BamHI* 酶切位点。以 *ssr1114-N* 和 *ssr1114-B* 为引物 PCR 扩增 *ssr1114* 编码序列片段(约 0.3 kb), 扩增产物 217nt 处有 *EcoRI* 位点。扩增产物抽提沉淀后,分别以 *NdeI* 和 *BamHI* 酶切,克隆于 pET28a 的相应位点。设计并合成引物 *ssr1114-B*: 5'-GAGAGGATCCCTTCTCCTATATTCGGGTGA-3', 并添加 *BamHI* 酶切位点。以 *ssr1114-N* 和 *slr0664-B* 为引物 PCR 扩增含 *ssr1114* 和 *slr0664* 编码序列片段(约 0.97 kb),

扩增产物以 *NdeI* 和 *BamHI* 酶切,克隆于 pET28a 的相应位点。

1.4 重组蛋白的诱导表达和纯化

诱导表达的重组质粒转化 *E. coli* BL21(DE3), 以含 50 μ g/mL 硫酸卡拉霉素的 LB 平板筛选转化子, 鉴定后的重组菌株于 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min 培养至 *OD₆₀₀* 约为 0.6, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 诱导 3-4 h 后收集菌体, Tricine-SDS-PAGE 检测重组蛋白的表达^[11]。重组蛋白的变性纯化或非变性纯化按 Ni-NTA His-Bind Resin (Novagen, USA) 操作指南进行。

1.5 重组蛋白的肽指纹图谱分析

1.5.1 蛋白质肽指纹图谱的质谱分析方法:非变性共纯化的 H₆-*Ssr1114* 和 *Slr0664* 经 Tricine-SDS-PAGE 电泳分离染色后,切下目的条带;以 ddH₂O 洗净后加 50 μ L 50 mmol/L NH₄HCO₃/乙腈(100%)(1:1)溶液,超声脱色 5 min;弃溶液后重复脱色直到蓝色褪去;加 50 μ L 乙腈脱水至胶粒完全变白,真空抽干 5 min;加 20 μ L 二硫苏糖醇(DTT)缓冲液(10 μ L 1 mol/L DTT, 990 μ L 25 mmol/L NH₄HCO₃), 56 $^{\circ}$ C 水浴 1 h;冷却到室温,吸干,快速加入 20 μ L IAM 缓冲液(55 μ L 1 mol/L 碘代乙酰胺(IAM), 945 μ L 25 mmol/L NH₄HCO₃), 暗室静止 45 min;以 25 mmol/L NH₄HCO₃、50% 乙腈溶液洗胶粒和 100% 乙腈脱水直到胶粒完全变白,真空抽干;加 2 μ L 以 25 mmol/L NH₄HCO₃ 稀释至终浓度为 0.01 μ g/ μ L 的胰蛋白酶,使酶液充分与胶粒接触,4 $^{\circ}$ C 放置 30 min;待溶液被胶块完全吸收后,加 10 μ L 25 mmol/L NH₄HCO₃, 37 $^{\circ}$ C 消化过夜;加 2% 三氟乙酸(TFA)至终浓度为 0.1%, 终止反应,振荡混匀,离心,所得即为待测样品。以 MALDI TOF-TOF MS (Ultraflex TOF/TOF) 对样品进行质谱分析,输出肽指纹图谱(PMF)数据。

1.5.2 重组蛋白肽谱在线预测分析:利用肽谱在线软件 MS-Digest (<http://prospector2.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msdigest>) 对重组蛋白进行肽谱预测分析。输入重组蛋白氨基酸序列,在选项中蛋白酶为 Trypsin, Variable Mods 选项为 Acetyl (Protein N-term), Peptide Mass 为 1000.0 至 2000.0, 其他设置保持默认。在线分析后输出肽段氨基酸序列和 m/z 值。

2 结果

2.1 大肠杆菌中诱导表达 *Ssr1114* 和共表达 *Ssr1114-Slr0664* 的重组质粒

PCC6803 染色体上的 *ssr1114/slr066* 系统中,

ssr1114 编码序列为 261bp, 编码 86 个氨基酸残基的抗毒素蛋白, 分子量为 9.9 kDa。 *ssr1114* 编码序列克隆于质粒 pET28a 中, 经酶切鉴定和测序验证其序列正确后命名为 pJS631 (图 1)。该质粒中 *ssr1114* 编码序列与 6 个组氨酸残基的编码序列处于同一阅读框中, 受来源于 T7 噬菌体的启动子 P_{lacZ} 调控。诱导表达的重组蛋白 N 末端有 6 个 His 标签, 表示为 H_6 -Ssr1114, 分子量约为 12.1 kDa。

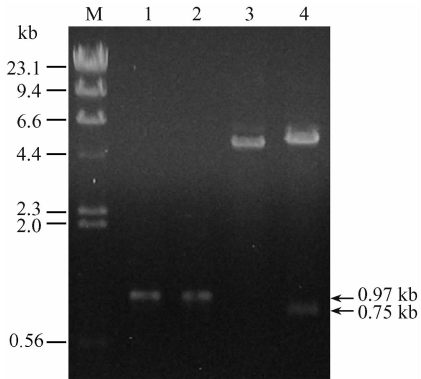


图 1 重组质粒 pJS631 电泳检测

Fig. 1 Examination of plasmid pJS631 by an agar electrophoresis. M. λ /HindIII; 1. PCR amplification of the Chromosome of PCC6803; 2. PCR amplification of plasmid pJS631; 3. pET28a digested by EcoRI; 4. pJS631 digested by EcoRI.

PCC6803 染色体上 *ssr1114*/*slr0664* 系统中 *slr0664* 位于 *ssr1114* 下游, 与 *ssr1114* 的编码序列有 11 个碱基的重叠^[8]。Slr0664 含 120 个氨基酸, 分子量为 13.68 kDa。 *ssr1114*/*slr0664* 编码序列片段克隆于 pET28a 中, 经酶切鉴定和测序验证其序列正确后命名为 pJS562 (图 2)。该质粒中启动子 P_{lac} 控制 *ssr1114* 和 *slr0664* 的表达。

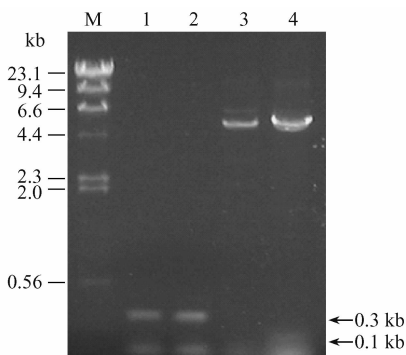


图 2 重组质粒 pJS562 电泳检测

Fig. 2 Examination of plasmid pJS562 by an agar electrophoresis. M. λ /HindIII; 1. PCR amplification of the Chromosome of PCC6803; 2. PCR amplification of plasmid pJS562; 3. pET28a digested by EcoRI; 4. pJS562 digested by EcoRI.

2.2 重组蛋白 H_6 -Ssr1114 的诱导表达及纯化

将重组质粒 pJS631 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 得到菌株 *E. coli* BL21 (DE3) (pJS631)。以 1 mmol/L IPTG 诱导重组菌株, Tricine-SDS-PAGE 检测诱导表达产物, SDS-PAGE 电泳检测结果显示, 分子量约为 12 kDa 的蛋白质被诱导后表达, 与推测 H_6 -Ssr1114 分子量一致 (图 1, 泳道 1, 2, 3, 4)。将诱导后的重组菌株超声破碎并离心沉淀, SDS-PAGE 检测上清和沉淀, 发现诱导表达的重组蛋白位于上清中, 表明重组蛋白存在与可溶组分中 (结果未附)。以镍亲和层析柱非变性分离纯化 H_6 -Ssr1114, SDS-PAGE 电泳检测到分子量约为 12 kDa 的蛋白, 与诱导表达产物的条带一致 (图 3, 泳道 5)。

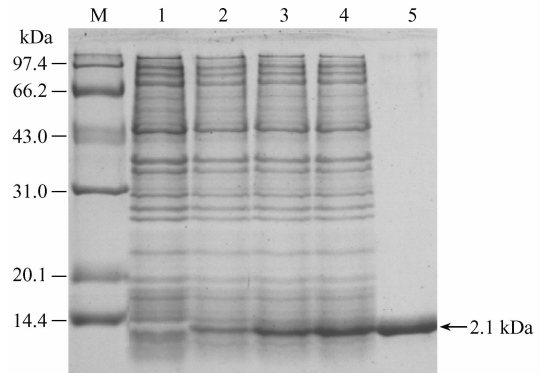


图 3 *E. coli* BL21 (DE3) 中的诱导表达与纯化重组蛋白 H_6 -Ssr1114 的电泳检测

Fig. 3 SDS-PAGE detection of expression and purification of H_6 -Ssr1114 in *E. coli* BL21 (DE3). M, Standard protein marker; 1. *E. coli* BL21 (DE3) (pJS631) non-induced; 2, 3 and 4. *E. coli* BL21 (DE3) (pJS631) induced for 1, 2 and 3 h, respectively; 5. Purified H_6 -Ssr1114 recombinant protein under native condition.

2.3 Ssr1114 和 Slr0664 共表达及共纯化

为分析毒素蛋白 Slr0664 与抗毒素蛋白 Ssr1114 的相互作用, 诱导表达并纯化毒素蛋白 Slr0664。将 pJS306^[8] 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 得到重组菌株 *E. coli* BL21 (DE3) (pJS306)。以 0.1 mmol/L IPTG 诱导后重组菌株生长受到显著抑制, 也检测不到 Slr0664 的表达。 *E. coli* BL21 (DE3) 染色体上有溶源性噬菌体 λ DE3, 其中含有一个拷贝的 T7 聚合酶基因, pJS306 中 *slr0664* 在 T7 启动子 P_{lac} 控制下, 可能低水平地表达 Slr0664 足以对细胞产生毒性作用, 细胞生长抑制, 与此前的研究结果一致^[8]。

将重组质粒 pJS562 转化 *E. coli* BL21 (DE3), 得到重组菌株 *E. coli* BL21 (DE3) (pJS562)。以 1 mmol/L IPTG 诱导后, 重组菌株能正常生长。SDS-PAGE 电泳检测诱导表达产物, 可见分子量约

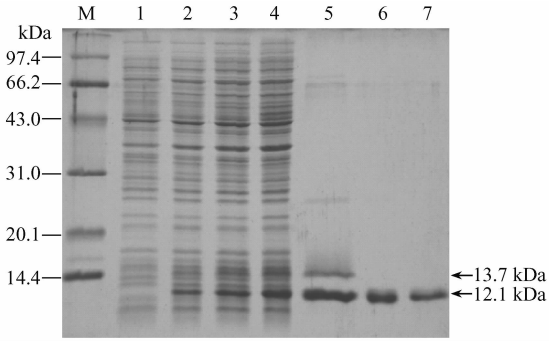


图4 H_6 -Ssr1114 和 Slr0664 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中的共表达与共纯化产物的电泳检测

Fig. 4 SDS-PAGE detection of coexpression and copurification of H_6 -Ssr1114 and Slr0664 in *E. coli* BL21 (DE3). M. Standard protein marker; 1. *E. coli* BL21 (DE3) (pJS562) non-induced; 2, 3 and 4. *E. coli* BL21 (DE3) (pJS562) induced for 1, 2 and 3 h, respectively; 5. H_6 -Ssr1114 and Slr0664 purified from *E. coli* BL21 (DE3) (pJS562) under native condition; 6. H_6 -Ssr1114 purified from *E. coli* BL21 (DE3) (pJS562) under denaturing condition; 8. H_6 -Ssr1114 purified from *E. coli* BL21 (DE3) (pJS631) under native condition.

为 12 kDa 和 14 kDa 的蛋白质诱导表达 (图 4, 泳道 1, 2, 3, 4), 与推测重组蛋白 H_6 -Ssr1114 和 Slr0664

分子量一致。以镍亲和层析柱非变性分离纯化重组蛋白, SDS-PAGE 电泳检测道分子量约为 12 kDa 和 14 kDa 的蛋白质 (图 4, 泳道 5), 与推测的重组蛋白 H_6 -Ssr1114 和 Slr0664 分子量一致。结果提示, 诱导表达的 H_6 -Ssr1114 和 Slr0664 在大肠杆菌细胞中相互作用形成复合体, 在非变性纯化过程中, 通过 H_6 -Ssr1114 与镍层析柱的亲合作用一起被纯化。为证明这种推测, 尝试以 8 mol/L 尿素变性缓冲液处理诱导后的重组菌株, 以镍亲和层析柱变性分离纯化重组蛋白, 同样检测到分子量约为 12 kDa 和 14 kDa 的蛋白质 (结果未附)。表明 8 mol/L 尿素并不能使 H_6 -Ssr1114 和 Slr0664 复合体分离, 与大肠杆菌中 RelE 和 RelB 的共纯化结果一致^[4]。但以 6 mol/L 的盐酸胍变性缓冲液处理诱导后的重组菌株, 以镍亲和层析柱分离重组蛋白, 仅检测到分子量约为 12 kDa 的蛋白质 (图 4, 泳道 6), 表明盐酸胍破坏 H_6 -Ssr1114 和 Slr0664 之间的相互作用, 使 H_6 -Ssr1114 和 Slr0664 分离, 以镍亲和层析柱分离纯化时, H_6 -Ssr1114 与镍层析柱的亲合作用被纯化, 而与 H_6 -Ssr1114 分离后的 Slr0664 的在洗涤过程中被洗脱。

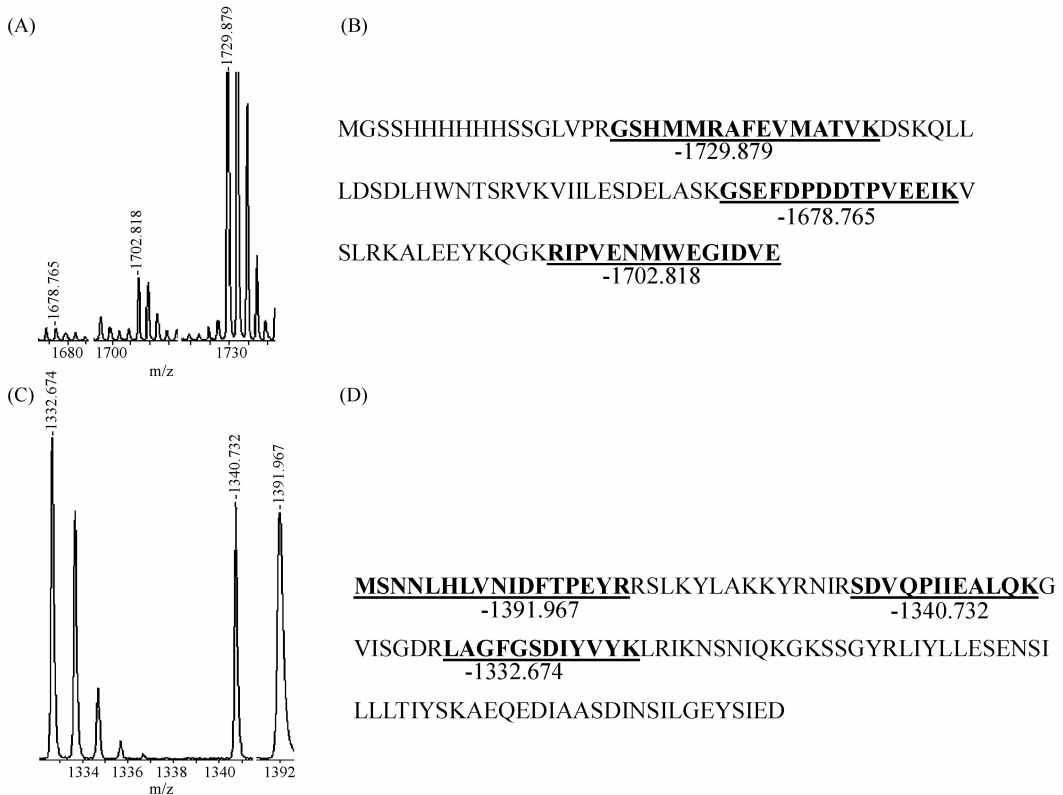


图5 H_6 -Ssr1114 和 Slr0664 的肽谱分析

Fig. 5 Peptide mass fingerprinting of H_6 -Ssr1114 and Slr0664. A and C. Peptide mass fingerprinting of H_6 -Ssr1114 and Slr0664 after Mass spectrographic analysis by ultraflees II MALDI-TOF/TOF-MS, respectively; B and D. Amino acid sequence and predicted m/z by online analysis of H_6 -Ssr1114 and Slr0664, respectively.

2.4 H₆-Ssr1114 和 Slr0664 的肽指纹图谱分析

为进一步证明镍亲和层析柱非变性共纯化的蛋白为 H₆-Ssr1114 和 Slr0664, 将 Tricine-SDS-PAGE 电泳分离的对应蛋白以胰蛋白酶消化, 利用质谱分析肽指纹图谱 (PMF) 数据 (图 5-A, C)。分别将重组蛋白 H₆-Ssr1114 和 Slr0664 的氨基酸序列输入肽谱在线分析软件 MS-Digest (<http://prospector2.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msdigest>), 选择胰蛋白酶消化重组蛋白, 进行肽谱在线预测分析 (图 5-B, D)。预测结果与质谱分析的肽指纹图谱比对结果显示, 质谱检测的目的蛋白的肽指纹谱部分波峰与在线预测的肽谱质/核比 (m/z) 一致 (图 5)。结果证明镍亲和层析柱非变性共纯化的重组蛋白分别为 H₆-Ssr1114 和 Slr0664。

3 讨论

此前已证明了 PCC6803 染色体上的基因 *ssr1114* 和 *slr0664* 组成一个 TA 系统。其中, *slr0664* 为毒素基因, *ssr1114* 为抗毒素基因; 抗毒素蛋白 Ssr1114 抑制毒素蛋白 Slr0664 的细胞毒性作用, 推测 Ssr1114 与 Slr0664 相互作用形成复合体抑制毒素蛋白的细胞毒性作用。本文利用 Ssr1114 与 Slr0664 的共表达, 借助亲和捕捉技术共纯化重组蛋白 Ssr1114 与 Slr0664, 通过肽谱分析证明了共表达的重组蛋白 Ssr1114 与 Slr0664 之间存在相互作用。

在营养胁迫条件下, 大肠杆菌 *relBE* 系统中的 RelE 被激活并通过降解 mRNA 抑制蛋白质合成, 从而表现出对细胞的毒性作用, 抑制细胞生长或导致细胞死亡^[12-13]。RelB 通过 C 末端结构域的相互作用形成同源二聚体, 两个二聚体通过 C 末端的结构域介导形成四聚体 ($K_d > 10^{-5}$ M)。在有 RelE 存在时, 纯化的 *E. coli* RelB 和 RelE 为稳定的异源四聚体, RelB 二聚体中两个亚基的 C 末端的尾巴与两个 RelE 相互作用 ($K_d < 10^{-7}$ M) 形成 RelB₂ - RelE₂ 复合体, 抑制 RelE 的细胞毒性^[6]。PCC6803 染色体上 *ssr1114/sl0664* TA 系统中, *slr0664* 编码产物与 RelE 同源, 但 Ssr1114 与 RelB 无同源性, 也未发现与之同源的抗毒素蛋白家族。根据现有的研究结果, Ssr1114 是一种与 RelE 同源的毒素蛋白 Slr0664 相互作用的一种新的抗毒素蛋白, 推测它们可能具有大肠杆菌中的 RelB 和 RelE 相同的作用机制。

生物信息学研究发现不同来源的毒素与抗毒素基因相互匹配构成不同的 TA 系统, 推测毒素或抗毒素基因可能具有独立的起源与进化过程, TA 系统

中紧密相邻基因可独自被功能相关蛋白基因原位替代。在原位替代过程中, 尽管编码蛋白的序列不相关, 但能发挥相同的功能, 使操纵子中的基因排列方式得以维持, 并且这种替代基因的来源不受限制。因此, TA 系统中的基因的替代是功能相同的毒素或抗毒素基因的替代^[7]。但这类通过生物学信息发现的 TA 系统是否具有典型 TA 系统的生物学活性尚未有试验证明。本文及前期研究结果显示, *ssr1114* 和 *slr0664* 可能是通过原位替代构成的一个具有生物学活性的 TA 系统。尽管抗毒素蛋白 Ssr1114 与 RelB 或其同源家族蛋白的序列不同, 但具有与 RelB 相同的功能。Ssr1114 和 Slr0664 相互作用是否形成与 RelB 和 RelE 相同的复合体, 以及是否能反馈调控其操纵子的转录, 还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Buts L, Lah J, Dao-Thi MH, Wyns L, Loris R. Toxin-antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers. *Trends in Biochemical Sciences*, 2005, 30 (12): 672-679.
- [2] Bech FW, Jorgensen ST, Diderichsen B, Karlstrom, O. H. Sequence of the *relB* transcription unit from *Escherichia coli* and identification of the *relB* gene. *EMBO Journal*, 1985, 4:1059-1066.
- [3] Gotfredsen M, Gerdes K. The *Escherichia coli relBE* genes belong to a new toxin-antitoxin gene family. *Molecular Microbiology*, 1998, 29:1065-1076.
- [4] Galvani C, Terry J, Ishiguro EE. Purification of the RelB and RelE proteins of *Escherichia coli*: RelE binds to RelB and to ribosomes. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(8):2700-2703.
- [5] Christensen SK, Gerdes K. Delayed-relaxed response explained by hyperactivation of RelE. *Molecular Microbiology*, 2004, 53(2):587 - 597.
- [6] Li GY, Zhang Y, Inouye M, Ikura M. Structural mechanism of transcriptional autorepression of the *Escherichia coli* RelB/RelE antitoxin/toxin module. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 380(1):107-119.
- [7] Anantharaman V, Aravind L. New connections in the prokaryotic toxin-antitoxin network: relationship with the eukaryotic nonsense-mediated RNA decay system. *Genome Biology*, 2003, 4(12):R81.
- [8] 常家宁, 宁德刚. 蓝细菌 PCC6803 染色体上的一对毒素-抗毒素基因的鉴定. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2009, 36(1):1-36.

- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] 徐旭东, 王业勤, 黎尚豪. 鱼腥藻—大肠杆菌 CAT 启动子探测质粒的构建. *中国科学院研究生院学报 (Academia Sinica)*, 1993, 10:203-209.
- [11] Schägger H, Jagow GV. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 1987, 166(2):368-379
- [12] Christensen SK, Pedersen K, Hansen FG. Toxin - antitoxin loci as stress response elements; ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 332(4):809 - 819.
- [13] Pedersen K, Zavialov AV, Pavlov MY, Elf J, Gerdes K, Ehrenberg M. The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell*, 2003, 112(1):131-140.

The interaction between chromosome-encoded toxin Slr0664 and antitoxin Slr1114 of Cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC6803

Sen Ye, Degang Ning*

(Environmental School, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: [**Objective**] We identified the interaction between toxin Slr0664 and antitoxin Slr1114, encoded by *ssr1114/slr0664* system in the chromosome of cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC6803. [**Methods**] We constructed a recombinant plasmid in which only H₆-Ssr1114 was induced to express, and another plasmid in which both H₆-Ssr1114 and Slr0664 was co-expressed in *E. coli* B121 (DE3). After induction, we used affinity capture technique to purify H₆-Ssr1114 and copurified H₆-Ssr1114 and Slr0664 under different conditions. We confirmed the co-purified H₆-Ssr1114 and Slr0664 by using mass spectrographic analysis. [**Results**] When induced to express, Slr0664 showed cell toxicity leading to cell growth suppression or death. However, cells could grow normally if both H₆-Ssr1114 and Slr0664 were induced to co-express. We could purify both H₆-Ssr1114 and Slr0664 by His-Bind under native conditions, but only H₆-Ssr1114 could be purified under denature conditions. The results of mass spectrometric analysis showed that the copurified proteins were H₆-Ssr1114 and Slr0664. [**Conclusion**] The antitoxin Slr1114 and toxin Slr0664 in *ssr1114/slr0664* TA system was interacted with each other.

Keywords: *Synechocystis* sp. PCC6803; TA system; *slr0664/ssr1114*; interaction

(本文责编:王晋芳)