

结核枝杆菌中毒素-抗毒素系统的鉴定

贤一博, 崔丽丹, 张俊杰*

北京师范大学生命科学院, 教育部细胞增殖及调控生物学重点实验室, 北京 100875

摘要:【目的】鉴定结核分枝杆菌基因组上 MazF 同源蛋白基因与其上游基因是否组成毒素-抗毒素系统, 阐明毒素蛋白的作用机理, 并初步探讨毒素-抗毒素系统在营养缺乏时的表达调控。【方法】在大肠杆菌和耻垢分枝杆菌中将 MazF 同源蛋白单独表达或与其对应的抗毒素蛋白共同表达, 鉴定 MazF 同源蛋白对细菌生长的抑制作用以及其对应的抗毒素蛋白能否消除这种生长抑制; 通过体外 RNA 切割实验, 检测 MazF 同源蛋白是否具有 RNA 切割活性; 检测正常生长条件下和饥饿条件下毒素-抗毒素系统的启动子活性, 探讨其在应激条件下的表达调控。【结果】结核分枝杆菌 MazF 同源蛋白中, Rv0659c、Rv1495 和 Rv1942c 不具有抑制细菌生长的毒素蛋白活性, Rv1991c、Rv2801c、Rv1102c 和 mtPemK 能够抑制细菌生长, 而且它们的抑制作用可以分别被其对应的抗毒素 Rv1991a、Rv2801a、Rv1103c 和 mtPemI 解除。Rv1991c、Rv2801c 和 Rv1102c 具有 RNA 切割活性, mtPemK 则不能切割 RNA。Rv1991a-1991c 和 Rv2801a-2801c 系统的启动子在饥饿条件下活性显著升高。【结论】结核分枝杆菌基因组上 Rv1991a-1991c、Rv2801a-2801c、Rv1103c-1102c 和 mtPemI-mtPemK 是毒素-抗毒素系统。毒素蛋白 Rv1991c、Rv2801c 和 Rv1102c 通过切割 RNA 发挥抑菌或杀菌活性, mtPemK 具体作用机理目前还不清楚。Rv1991a-1991c 和 Rv2801a-2801c 系统可能参与结核分枝杆菌在营养匮乏条件下的生长调控。

关键词: 结核分枝杆菌, MazF 同源蛋白, 毒素-抗毒素系统

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 02-0214-10

毒素-抗毒素系统 (Toxin-antitoxin system, TA 系统) 最早发现于一些低拷贝的质粒上, 用于保障质粒在细菌中的稳定传递^[1]。典型的 TA 系统是由共表达的两个基因组成的一个操纵子 (operon), 前面基因编码不稳定的抗毒素蛋白 (antitoxin), 后面基因编码稳定的毒素蛋白 (toxin), 抗毒素蛋白通过与毒素蛋白相互结合形成复合物, 抑制其毒素蛋白发挥毒性作用。抗毒素蛋白本身和毒素-抗毒素复合物都可结合到操纵子的启动子区域, 在转录水平上反馈调节 TA 系统的表达^[2]。目前已鉴定的 TA 系

统主要分为 9 个家族, 包括由两个基因组成的家族 *ccdAB*、*parDE*、*mazEF*、*relBE*、*phd/doc*、*vapBC*、*HipBA*、*higBA* 和一个由 3 个基因组成的家族 ω - ϵ - ξ , 不同家族毒素蛋白的作用机理不同, 主要是通过干扰细胞的复制或翻译过程抑制细胞生长或诱发细胞死亡^[3]。目前对于 TA 系统的生理功能还存在争议, 有学者认为它们介导了细菌在不良生长状况下的死亡, 即细菌程序性细胞死亡 (bacterial programmed cell death, PCD); 但也有证据显示, 它们功能更偏向于应激状态下的生理调节方面, 即只起应激状态

基金项目: 国家自然科学基金 (30770030); 北京市科技新星项目 (2005B47)

* 通信作者。Tel: +86-10-58802137; Fax: +86-10-58807720; E-mail: jjzhang@bnu.edu.cn

作者简介: 贤一博 (1984-), 女, 山东青岛人, 硕士研究生, 主要从事分子微生物学方面的研究。E-mail: yiboxian@yahoo.cn

收稿日期: 2010-08-05; **修回日期:** 2010-10-15

下的抑菌作用而不是杀菌作用^[2, 4]。

MazEF 系统是在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 染色体发现的第一个 TA 系统。毒素蛋白 MazF 是一种序列特异性的核酸内切酶,能够在 ACA 序列上切割 mRNA,抑制蛋白质的合成。MazF 及其同源蛋白构成了一个新的核糖核酸内切酶家族 mRNA Interferase (MIase)^[5-9]。在营养缺乏等不良生长条件下,信号分子 ppGpp 抑制 MazEF 系统的转录,同时蛋白酶降解不稳定的抗毒素蛋白 MazE,释放出的毒素蛋白 MazF 发挥毒性,导致细菌生长抑制或死亡^[10]。

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) H37Rv 基因组上有多个基因编码 MazF 同源蛋白^[2, 3]。Ling Zhu 等于 2006 年在 *E. coli* 中对 7 个 MazF 同源蛋白进行了鉴定,结果显示其中 4 个 (Rv2801c、Rv1991c、Rv0659c 和 Rv1102c) 对 *E. coli* 的生长有抑制作用,并发现 Rv2801c 和 Rv1102c 具有 mRNA 内切酶活性^[11];其后,他们证实 Rv1991c 和 Rv1495 是序列特异的 mRNA 内切酶,具有各自不同的特异性识别位点^[12]。Amita Gupta 等在 *E. coli* 中对这些毒素蛋白的鉴定结果却与 Ling Zhu 等人的结果不尽相同,他们认为只有 Rv2801c、Rv1991c 和 Rv1102c 对大肠杆菌生长有明显的抑制作用^[13]。目前,对于结核杆菌中 MazF 同源蛋白的鉴定还存在争议,而且上述研究均在 *E. coli* 中进行,考虑到 *E. coli* 和分枝杆菌诸多性质的不同,本研究中我们在 *E. coli* 和分枝杆菌的模式菌耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*) 中对结核分枝杆菌 MazF 同源蛋白进行鉴定。计算机分析表明,结核分枝杆菌 MazF 同源蛋白基因可能与其上游的基因构成 TA 系统,因此我们进一步鉴定了这些可能的 TA 系统及其作用机理,并探讨了它们在应激条件下的表达调控。结核分枝杆菌中的 TA 系统被认为与结核分枝杆菌持留现象形成相关,这些 TA 系统的鉴定和表达调控研究将有助于深入了解结核分枝杆菌中 TA 系统的功能,认识持留现象发生的机理。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养基: *E. coli* DH5 α 、BL21 (DE3) 和 BW25113 接种于 LB 或 M9 培养基。耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis* mc2155) 接种于

Middlebrook 7H9 液体培养基 (0.2% 甘油, 0.05% Tween 80, 10% OADC) 或 Middlebrook 7H10 固体培养基 (0.5% 甘油, 10% OADC)。抗生素中潮霉素对 *E. coli* 的作用浓度为 150 mg/L, 对分枝杆菌为 50 mg/L; 卡那霉素对大肠杆菌的作用浓度为 50 mg/L, 对分枝杆菌为 25 mg/L; 对 *E. coli* 使用的氨苄霉素浓度为 50 mg/L, 氯霉素浓度为 25 mg/L。 *E. coli* 和耻垢分枝杆菌都在 37 $^{\circ}$ C 培养。

1.1.2 主要试剂: BamHI、Hind III 等限制性内切酶和 DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司; Ni₂NTA His-Bind Resin 和 RNeasy Mini Kit 购自德国 Qiagen 公司; PCR 产物纯化试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自 Tiangen; RiboMAX T7 large scale RNA production system 试剂盒购自 Promega。

1.2 MazF 同源蛋白毒性的鉴定以及相应抗毒素蛋白作用的鉴定

将 7 个结核分枝杆菌 MazF 同源基因分别克隆入 pBAD33 载体 (*E. coli* 表达载体, 阿拉伯糖诱导表达, 氯霉素抗性) (表 1), 转化 *E. coli* BW25113 (Δ araBAD), 在含有或不含有 0.2% 阿拉伯糖诱导剂的 M9 固体培养基 (含氯霉素) 上 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 观察菌体生长情况。

将 7 个结核分枝杆菌 MazF 同源基因分别克隆入 pACE 载体 (*E. coli*-*Mycobacteria* 穿梭质粒, 乙酰胺诱导表达, 潮霉素抗性) (表 1), 电转耻垢分枝杆菌。将抗毒素基因克隆入 pMV261 载体 (*E. coli* - *Mycobacteria* 穿梭质粒, 持续表达, 卡那霉素抗性) (表 1), 电转入含有相应 pACE-毒素蛋白表达载体的耻垢分枝杆菌中, 在含有或不含有 0.1% 乙酰胺的 7H10 双抗固体培养基 (含潮霉素和卡那霉素) 37 $^{\circ}$ C 培养两天, 观察菌体生长情况。

1.3 蛋白的表达和纯化

将结核分枝杆菌 MazF 同源基因及其上游可能编码抗毒素的基因分别克隆入 pET28a 载体 (*E. coli* 表达载体, IPTG 诱导表达 6 (His 融合蛋白, 卡那霉素抗性) (表 1), 转化 *E. coli* BL21 (DE3), M9 液体培养基中培养至 OD₆₀₀ 达到 1.0 时, 0.5 mmol/L IPTG 诱导蛋白表达 4 h, 将离心获取的细胞在裂解 buffer (含 10 mmol/L 咪唑, 300 mmol/L NaCl, 50 mmol/L NaH₂PO₄, pH 8.0) 中重悬, 通过超声破碎后, 4 $^{\circ}$ C 离心去除细胞碎片, 将得到的上清液与 Ni²⁺-NTA

表1 本研究中使用的菌种载体和重组质粒

Table 1 Strains, vectors and recombinant plasmids used in this study

Strains, vectors and plasmids	Characteristics
Strains	
<i>M. tuberculosis</i>	H37Rv
<i>M. smegmatis</i>	mc2155
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)
<i>E. coli</i>	BW25113 (Δ araBAD)
Vectors	
pBAD33	<i>E. coli</i> inducible expression vector; Cml ^R
pET28a	<i>E. coli</i> inducible expression vector ; Kan ^R
pACE	<i>E. coli-Mycobacterium</i> shuttle vector; Hyg ^R
pMV261	<i>E. coli-Mycobacterium</i> shuttle vector; Kan ^R
pSD5B	<i>E. coli-Mycobacterium</i> shuttle vector carrying <i>lacZ</i> ; Kan ^R
Recombinant plasmids^a	
pBAD33-1991c	Rv1991c gene was cloned in the <i>XbaI-HindIII</i> sites in pBAD33
pBAD33-2801c	Rv2801c gene was cloned in the <i>XbaI-HindIII</i> sites in pBAD33
pBAD33-0659c	Rv0659c gene was cloned in the <i>XbaI-HindIII</i> sites in pBAD33
pBAD33-1942c	Rv1942c gene was cloned in the <i>XbaI-HindIII</i> sites in pBAD33
pBAD33-1102c	Rv1102c gene was cloned in the <i>XbaI-HindIII</i> sites in pBAD33
pBAD33-1495	Rv1495 gene was cloned in the <i>XbaI-HindIII</i> sites in pBAD33
pBAD33-mtpemK	mtpemK gene was cloned in the <i>XbaI-HindIII</i> sites in pBAD33
pACE-1991c	Rv1991c gene was cloned in the <i>BamHI-ClaI</i> sites in pACE
pACE-2801c	Rv2801c gene was cloned in the <i>BamHI-ClaI</i> sites in pACE
pACE-0659c	Rv0659c gene was cloned in the <i>BamHI-ClaI</i> sites in pACE
pACE-1942c	Rv1942c gene was cloned in the <i>BamHI-ClaI</i> sites in pACE
pACE-1102c	Rv1102c gene was cloned in the <i>BamHI-ClaI</i> sites in pACE
pACE-1495	Rv1495 gene was cloned in the <i>BamHI-ClaI</i> sites in pACE
pACE-mtpemK	mtpemK gene was cloned in the <i>BamHI-ClaI</i> sites in pACE
pMV261-1991a	Rv1991a gene was cloned in the <i>BamHI-HindIII</i> sites in pMV261
pMV261-2801a	Rv2801a gene was cloned in the <i>BamHI-ClaI</i> sites in pMV261
pMV261-0660c	Rv0660c gene was cloned in the <i>BamHI-HindIII</i> sites in pMV261
pMV261-1943c	Rv1943c gene was cloned in the <i>PstI-HindIII</i> sites in pMV261
pMV261-1103c	Rv1103c gene was cloned in the <i>BamHI-HindIII</i> sites in pMV261
pMV261-1494	Rv1494 gene was cloned in the <i>BamHI-HindIII</i> sites in pMV261
pMV261-mtpemI	mtpemI gene was cloned in the <i>BamHI-HindIII</i> sites in pMV261
pET28a-1991c	Rv1991c gene was cloned in the <i>NdeI-XhoI</i> sites in pET28a
pET28a-1991a	Rv1991a gene was cloned in the <i>NdeI-XhoI</i> sites in pET28a
pET28a-2801c	Rv2801c gene was cloned in the <i>NdeI-HindIII</i> sites in pET28a
pET28a-2801a	Rv2801a gene was cloned in the <i>BamHI-HindIII</i> sites in pET28a
pET28a-0659c	Rv0659c gene was cloned in the <i>NdeI-XhoI</i> sites in pET28a
pET28a-0660c	Rv0660c gene was cloned in the <i>NdeI-XhoI</i> sites in pET28a
pET28a-1102c	Rv1102c gene was cloned in the <i>NdeI-XhoI</i> sites in pET28a
pET28a-1103c	Rv1103c gene was cloned in the <i>NdeI-XhoI</i> sites in pET28a
pET28a-1495	Rv1495 gene was cloned in the <i>NdeI-HindIII</i> sites in pET28a
pET28a-1494	Rv1494 gene was cloned in the <i>NdeI-XhoI</i> sites in pET28a
pET28a-mtpemK	mtpemK gene was cloned in the <i>NdeI-XhoI</i> sites in pET28a
pET28a-mtpemI	mtpemI gene was cloned in the <i>NdeI-XhoI</i> sites in pET28a
pSD5B-P1991c	Promoter of Rv1991a-Rv1991c system was cloned in the <i>XbaI-SphI</i> sites in pSD5B
pSD5B-P2801c	Promoter of Rv2801a-Rv2801c system was cloned in the <i>XbaI-SphI</i> sites in pSD5B
pSD5B-P0659c	Promoter of Rv0660c-Rv0659c system was cloned in the <i>XbaI-SphI</i> sites in pSD5B
pSD5B-P1942c	Promoter of Rv1943c-Rv1942c system was cloned in the <i>XbaI-SphI</i> sites in pSD5B
pSD5B-P1102c	Promoter of Rv1103c-Rv1102c system was cloned in the <i>XbaI-SphI</i> sites in pSD5B
pSD5B-P1495	Promoter of Rv1494-Rv1495 system was cloned in the <i>XbaI-SphI</i> sites in pSD5B
pSD5B-Ppemk	Promoter of mtpemI-mtpemK system was cloned in the <i>XbaI-SphI</i> sites in pSD5B
pSD5B-Phsp60	Promoter of hsp60 gene was cloned in the <i>XbaI-SphI</i> sites in pSD5B

^a Constructed in present study.

(Qiagen)共孵育 1 h,然后将 Resin 转移到提取柱上,用漂洗液(50 mmol/L NaH₂P₀₄,300 mmol/L NaCl,20 mmol/L 咪唑,pH 8.0)洗涤,再用洗脱液(50 mmol/L NaH₂P₀₄,300 mmol/L NaCl,250 mmol/L 咪唑,pH 8.0)洗脱目的蛋白。通过 SDS-PAGE 检测蛋白提取物的纯度,用 BCA 法测定其浓度。

1.4 MazF 同源蛋白的体外 RNA 切割实验

以 pET17b-Rv0707 质粒为模板,上游引物 5'-AGATCTCGATCCCGCAAATTAAT-3'和下游引物 5'-TCAGCTCTCCGTGCTCTG-3'由生工生物工程(上海)有限公司合成,通过 PCR 扩增获得含 T7 启动子的 Rv0707 基因片段,体外转录制备 Rv0707 的 mRNA。体外 RNA 切割每个反应体系(20 μL)含 1 μg RNA 底物,1 μL RNase 抑制剂,6 μL 切割缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,100 mmol/L NaCl,1 mmol/L DTT),毒素蛋白(1 μg)或毒素和抗毒素蛋白混合物(1:2),不足部分用 DEPC 水补足。37℃ 反应 15 min 后反应混合物通过 5% RNA PAGE(丙烯酰胺 29:1)进行分离,EB 染色检测。

1.5 启动子活性的测定

将毒素-抗毒素系统上游的启动子区域插入 pSD5B 载体中的 lacZ 基因上游,构建 pSD5B-promoter-lacZ 载体(表 1),电转入耻垢分枝杆菌中,β-半乳糖苷酶活性测定法检测启动子活性。β-半乳糖苷酶活性测定依据 Miller 法^[14]进行。

1.6 启动子在饥饿条件下的调控

将含有 pSD5B-promoter-lacZ 载体的耻垢分枝杆菌在 Middlebrook 7H9 液体培养基培养至 OD₆₀₀ 达到 1.0,离心除去培养基并用 0.01% Tween-80 洗 2 遍,沉淀重悬于 TBST 溶液(Tris-buffered saline with Tween,50 mmol/L Tris-HCl,pH 7.0,150 mmol/L NaCl,0.05% Tween 20),调节 OD₆₀₀ 至 0.2,37℃,190 r/min 培养。在饥饿处理的 0 h,4 h,8 h,16 h 和 20 h 取样,用 β-半乳糖苷酶活性测定法检测启动子活性。

2 结果

2.1 结核分枝杆菌中的 MazF 同源蛋白及其可能参与构成的 TA 系统

结核分枝杆菌基因组中存在多个编码 MazF 同源蛋白的基因,它们编码的蛋白 Rv0659c、Rv1102c、Rv1495、Rv1942c、Rv1991c、Rv2801c 和 mtPemK 与 *E. coli* MazF 蛋白进行序列同源比对,具有较高的同源性(图 1)。计算机分析表明,与 *E. coli* 中的 mazEF 操纵子类似,结核分枝杆菌中编码 MazF 同源蛋白的基因与其上游相邻的基因具有一个或数个碱基对的重叠,组成类似 TA 系统的结构。此外,大多数系统中的两个蛋白的等电点与大肠杆菌 MazE 蛋白和 MazF 蛋白相似(表 2)。因此,它们极有可能是结核分枝杆菌中的 TA 系统。

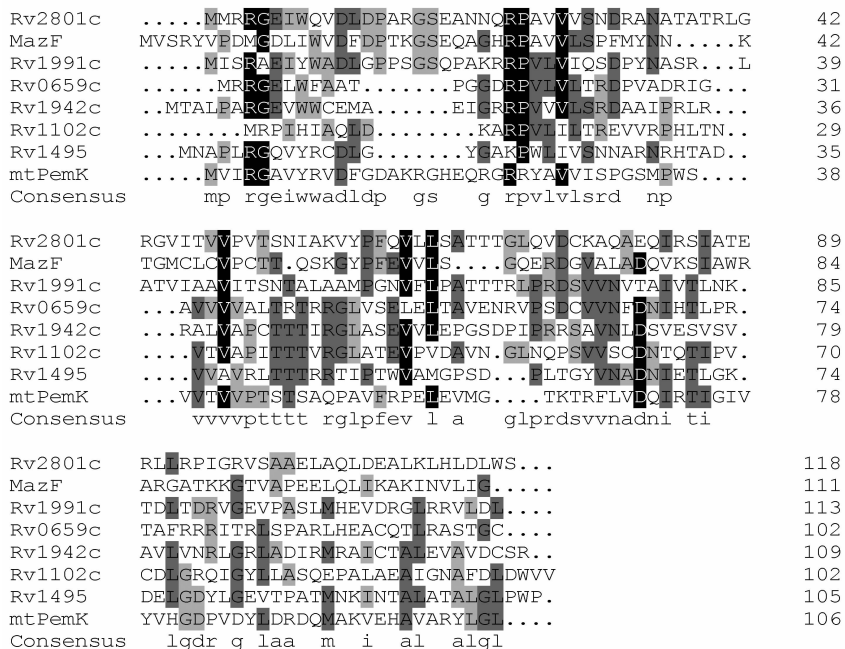


图 1 结核分枝杆菌 H37Rv 中的 MazF 同源蛋白与大肠杆菌 MazF 蛋白序列比对

Fig. 1 Sequence alignments of MazF homologues from *M. tuberculosis* H37Rv with *E. coli* MazF. Identical and homologous residues are shown in black and shaded backgrounds.

表 2 结核分枝杆菌中 MazF 同源蛋白可能组成的毒素-抗毒素系统

Antitoxin	pI	Toxin	pI	overlap
MazE (82aa)	4.72	MazF (111aa)	8.49	1bp
mtPemI (100aa) ^a	4.99	mtPemK (106aa) ^a	9.51	7 bp
Rv0660c (81aa)	4.40	Rv0659c (102aa)	11.16	13bp
Rv1103c (106aa)	5.32	Rv1102c (103aa)	5.10	1 bp
Rv1494 (100aa)	9.29	Rv1495 (105aa)	7.89	4 bp
Rv1943c (125aa)	5.23	Rv1942c (109aa)	9.00	4 bp
Rv2801a (76aa) ^b	4.37	Rv2801c (118aa)	9.09	17 bp
Rv1991a (82aa) ^c	4.63	Rv1991c (114aa)	9.51	4 bp

^a mtPemK was identified in *M. tuberculosis* by Tyagi, J. S. *et al* [15], and mtPemI was encoded by the open reading frame located upstream of mtPemK gene.

^b Rv2801a was encoded by the open reading frame located upstream of Rv2801c.

^c Rv1991a was encoded by the open reading frame located upstream of Rv1991c.

2.2 MazF 同源蛋白对细菌生长的抑制作用

E. coli mazEF 是典型的 TA 系统,诱导 MazF 蛋白表达,可导致细菌的生长抑制,而抗毒素蛋白 MazE 则可消除 MazF 毒素蛋白的毒性。为了鉴定结核分枝杆菌中这 7 种 MazF 同源蛋白基因是否与其上游基因构成 TA 系统,我们分别在大肠杆菌和耻垢分枝杆菌中诱导表达 MazF 同源蛋白或将其与上游基因同时表达,检测 MazF 同源蛋白对细菌生长的影响。

将表 2 中的 7 个结核分枝杆菌 MazF 同源基因分别克隆到 pBAD33 载体,转化 *E. coli* BW25113,在添加和未添加 0.2% 阿拉伯糖的 M9 固体培养基培养,结果发现在不加诱导剂的 M9 平板上,所有细菌都能正常生长,而在加 0.2% 阿拉伯糖的平板上,pBAD33 空载对照和诱导表达 Rv0659c、Rv1495 和 Rv1942c 的 *E. coli* 正常生长,而 Rv1991c、Rv2801c、Rv1102c 和 mtPemK 四种蛋白的表达抑制了 *E. coli* 的生长(图 2)。这一结果表明结核分枝杆菌中的这 7 个 MazF 同源蛋白对 *E. coli* 生长的影响程度不同,其中 Rv1991c、Rv2801c、Rv1102c 和 mtPemK 表现出毒素蛋白的特性,对 *E. coli* 的生长有明显的抑制作用。

由于 *E. coli* 和分枝杆菌具有很大的不同,结核分枝杆菌 MazF 同源蛋白在 *E. coli* 中的作用不一定能够代表它们在分枝杆菌的真实特性。因此,我们以分枝杆菌的无毒模式菌株-耻垢分枝杆菌做受体菌,对结核分枝杆菌 MazF 同源蛋白生物学特性及其

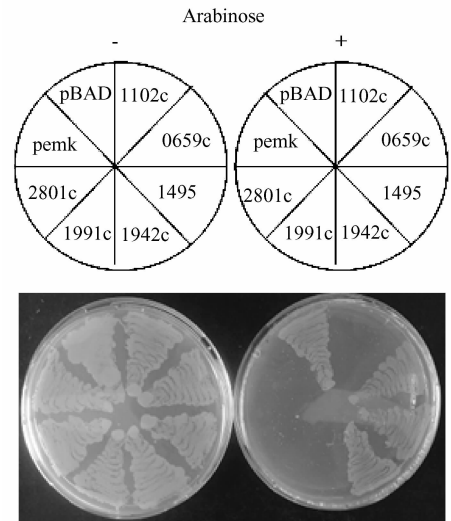


图 2 大肠杆菌中 MazF 同源蛋白的毒性鉴定

Fig. 2 Identification of toxic effects of the seven *M. tuberculosis* MazF homologues on *E. coli* BW25113. *E. coli* BW25113 cells were transformed with pBAD harboring ORF of the individual MazF homologous gene as indicated, and were streaked on M9 (glycerol, CAA) plates with or without 0.2% arabinose.

可能构成的 TA 系统进行鉴定。将 7 个结核分枝杆菌 MazF 同源基因分别克隆入 pACE 载体,电转入耻垢分枝杆菌,在 0.1% 乙酰胺诱导作用下,含有 Rv2801c、Rv1991c、Rv1102c 和 mtPemK 诱导表达质粒的耻垢分枝杆菌在 7H10 固体培养基上的生长受到明显抑制,而含有 pACE 空载以及 Rv0659c、Rv1942c 和 Rv1495 诱导表达质粒的耻垢分枝杆菌可以正常生长(图 3-A)这一结果与在 *E. coli* 中获得的结果一致,即 Rv1991c、Rv2801c、Rv1102c 和 mtPemK 是毒素蛋白,而 Rv0659c、Rv1942c 和 Rv1495 尽管是 MazF 同源蛋白,但不具有抑制细菌生长的作用。

2.3 抗毒素蛋白的生物活性鉴定

根据计算机分析结果,将表 2 中的抗毒素基因分别克隆入 pMV261 持续表达载体,电转入含有对应的 pACE-毒素诱导表达载体的耻垢分枝杆菌中。当用 0.1% 乙酰胺诱导毒素蛋白表达时,Rv2801a、Rv1991a、Rv1103c 和 mtPemI 的存在消除了对应的毒素蛋白 Rv2801c、Rv1991c、Rv1102c 和 mtPemK 对细菌的生长抑制作用,使耻垢分枝杆菌的生长恢复正常(图 3-B)。这一结果表明 Rv1991a-1991c、Rv2801a-2801c、Rv1103c-1102c 和 mtPemI-mtPemK

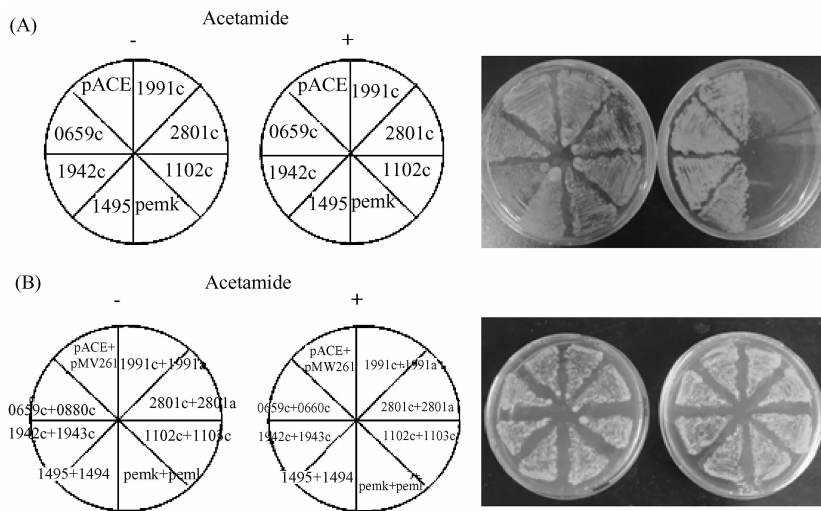


图3 耻垢分枝杆菌中 MazF 同源蛋白的毒性鉴定及其抗毒素蛋白作用的检测

Fig. 3 Identification of toxic effects of the seven *M. tuberculosis* MazF homologues on *M. smegmatis* and characterization of their correspondent antitoxins. A: *M. smegmatis* mc2155 cells were transformed with pACE harboring ORF of the individual MazF homologous gene as indicated (pACE-T), and were streaked on 7H10-OADC plates without or with 0.1% acetamide. B: *M. smegmatis* mc2155 cells were co-transformed with pACE-T and pMV261 with corresponding possible antitoxin gene, and then streaked on 7H10-OADC plates without or with 0.1% acetamide.

可以构成生物学意义上的 TA 系统。由此可见,在 7 个结核分枝杆菌 MazF 同源蛋白中只有 Rv1991c、Rv2801c、Rv1102c 和 mtPemK 是毒素蛋白,且与其上游基因构成 TA 系统。

2.4 MazF 同源蛋白的作用机理

E. coli MazF 蛋白是一种序列特异性 RNA 的内切酶,通过降解 mRNA 来抑制细菌生长。已有文献报道结核分枝杆菌中的 MazF 同源蛋白 Rv2801c、Rv1102c、Rv1991c 和 Rv1495 是 mRNA 内切酶,具有各自不同的特异性识别位点,但是这些结论都是以 *E. coli* mRNA 为底物获得的。结核分枝杆菌的基因组 GC 含量很高,结核分枝杆菌中的 MazF 同源蛋白是否同样都是通过切割 RNA 以发挥其毒性作用还需要进一步证实,特别是我们的研究表明其中的 Rv1495 并不具有毒素蛋白的特性。

我们将结核分枝杆菌 MazF 同源基因及其上游可能编码抗毒素的基因分别克隆入 pET28a 表达载体,转化大肠杆菌 BL21 (DE3),经 IPTG 诱导表达,亲和纯化分别获得含有 (His)₆ 标签的毒素和抗毒素蛋白。Rv0707 编码结核分枝杆菌核糖体 30S 小亚基 S3 蛋白,该基因 GC 含量 69.2%,是典型的分枝杆菌基因。我们以体外转录获得的 Rv0707 mRNA 为底物,检测结核分枝杆菌中的 MazF 同源蛋白的 RNA 切割活性。当 MazF 同源蛋白分别与

Rv0707 mRNA 共孵育,发现 Rv0659c、Rv1495 和 mtPemK 不具有切割 mRNA 的活性,而 Rv1991c、Rv2801c 和 Rv1102c 则可以降解 mRNA,其中 Rv1991c 和 Rv2801c 具有较强的切割 mRNA 能力,Rv1102c 的切割活性相对较弱,在反应体系中加入抗毒素蛋白 Rv1991a、Rv2801a 和 Rv1103c 时,其对应的毒素蛋白的 RNA 切割活性被显著抑制(图 4)。当 Rv1991c 和 Rv1991a 共同存在时,RNA 条带向上

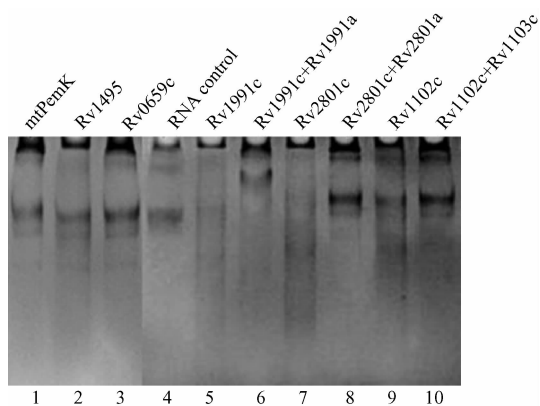


图4 MazF 同源蛋白的 mRNA 切割活性以及其相应的抗毒素蛋白的消除作用

Fig. 4 Characterization of the RNA cleavage activities of the *M. tuberculosis* MazF homologues with Rv0707 mRNA as substrate. Lanes 1-3 and lanes 5, 7 and 9, RNA was incubated with the indicated toxin; lane 4, control, RNA alone; lanes 6, 8 and 10, RNA was incubated the indicated toxin and antitoxin.

迁移,这可能是由于在该 RNA 二级结构中存在 Rv1991c-Rv1991a 复合物的结合序列。这些结果表明,Rv1991a-Rv1991c Rv2801a-Rv2801c 和 Rv1103c-Rv1102c 属于 *mazEF* TA 系统,其中的毒素蛋白 Rv1991c、Rv2801c 和 Rv1102c 通过 RNA 切割机制发挥毒性,抑制细菌生长,而抗毒素蛋白则可以抑制毒素蛋白的核酸内切酶活性。然而,在 mtPemK-mtPemI 系统中,尽管 mtPemK 蛋白能够抑制 *E. coli* 和耻垢分枝杆菌细胞的生长,同时抗毒素蛋白 mtPemI 能够消除毒素蛋白 mtPemK 的毒性作用,但是 mtPemK 不是通过 mRNA 切割发挥作用,其作用机制有待进一步探索。

2.5 毒素-抗毒素系统启动子活性的检测及其在饥饿条件下的转录调控

在上述实验中,我们鉴定了结核分枝杆菌中 MazF 同源蛋白与其上游基因构成的 TA 系统,并探讨了它们的作用机制。为了进一步阐明这些 TA 系统在分枝杆菌中的转录水平及其表达调控,我们将这些 TA 系统的启动子区域插入 pSD5B 载体中的 *lacZ* 基因上游,构建启动子报告质粒,报告质粒被电转入耻垢分枝杆菌,通过 β -半乳糖苷酶测定法检测启动子的活性,结果表明 P1991c、P2801c 和 P0659c 表现为较强的启动子活性,P1102c、P1495、P1942c 和 PpemK 则几乎没有活性(图 5)。

在实验确定的 4 个结核分枝杆菌 TA 系统中,Rv1991a-Rv1991c 和 Rv2801a-Rv2801c 系统的启动子有较强的活性。为进一步探讨在营养匮乏条件下 P1991c 和 P2801c 启动子活性变化,将含有 pSD5B-P1991c 和 pSD5B-P2801c 的耻垢分枝杆菌在 7H9 液体培养基中培养至对数生长期中期 (OD_{600} 约为 1.0),取样稀释至 OD_{600} 0.2,作为对照组检测启动子活性;同时将剩余菌液离心,并用 0.1% Tween 80 洗两遍除去残留培养基,转接到 TBST 完全饥饿培养基中,调节 OD_{600} 为 0.2,37°C,190 r/min 培养。在饥饿处理的 0h,4h,8h,16h 和 20h 取样,测定启动子活性。结果显示,随着饥饿处理时间的延长,P1991c 和 P2801c 启动子活性逐渐升高;与未饥饿处理的对照组相比,处理 16h 和 20h 后 P1991c 和 P2801c 启动子活性显著增强(图 6)。这表明 Rv1991a-1991c 和 Rv2801a-2801c 系统存在饥饿条件下的转录调控,它们可能参与营养匮乏条件下细菌的生长调控。

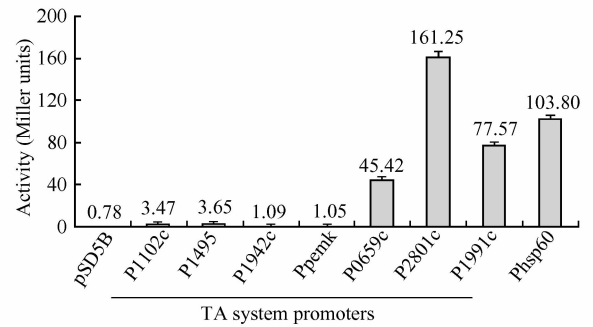


图 5 结核分枝杆菌毒素-抗毒素系统启动子活性的测定
Fig. 5 Analysis of the promoter activities of *M. tuberculosis* toxin-antitoxin systems. *M. smegmatis* mc2155 cells were transformed with pSD5B vector harboring the promoter of *M. tuberculosis* toxin-antitoxin loci as indicated in front of the *lacZ* reporter gene. The β -galactosidase activity assays were done in triplicates. The data represent the average, and error bars represent standard deviations. Hsp60 promoter (Phsp60) was used as a positive control.

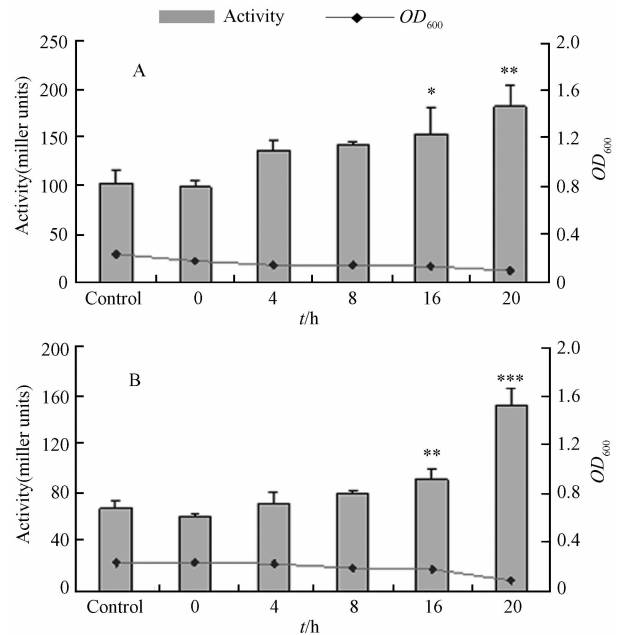


图 6 Rv2801a-Rv2801c 系统启动子 (A) 和 Rv1991a-Rv1991c 系统启动子 (B) 在完全饥饿条件下活性变化

Fig. 6 The activities of Rv2801a-Rv2801c system promoter (P2801c) and Rv1991a-Rv1991c system promoter (P1991c) under nutrient deprivation. *M. smegmatis* mc2155 cells, which were transformed with pSD5B vector harboring P2801c (A) or P1991c (B) in front of the *lacZ* reporter gene, were cultured in Middlebrook 7H9 medium and then transferred to the TBST complete starvation medium. The β -galactosidase activity assays were done at the indicated time points after the starvation treatment. Error bars represent standard deviations, and the p values derived from Student's t test are * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$.

3 讨论

TA 系统广泛存在于细菌的染色体上,参与不良条件下细菌生长调控,使细菌在应激条件下进入休眠状态,这与结核分枝杆菌的持留状态非常类似。基因组分析表明,结核分枝杆菌 H37Rv 菌株染色体上有 38 个可能的 TA 系统位点,其中至少有 7 系统有 MazF 同源蛋白参与构成。MazF 及其同源蛋白组成了一个毒素蛋白家族,它们通过切割 mRNA 来抑制蛋白合成,从而抑制细菌的生长。目前对结核分枝杆菌中 MazF 同源蛋白还缺乏系统深入的认识,已有的研究仅对结核分枝杆菌 MazF 同源蛋白在 *E. coli* 中的毒性进行了鉴定,而且结果不尽相同。本文针对结核分枝杆菌基因组上的 7 个 MazF 同源蛋白,在 *E. coli* 和耻垢分枝杆菌进行了它们的毒性鉴定,并以能够代表结核分枝杆菌高 GC 含量特性的 Rv0707 mRNA 为底物进行了体外切割 RNA 实验。结果表明,Rv1942c、Rv0659c 和 Rv1495 对 *E. coli* 和耻垢分枝杆菌的生长均无明显的抑制作用,同时也不具备切割 RNA 的能力,它们不具备毒素蛋白的生化特征;Rv1102c、Rv1991c 和 Rv2801c 在 *E. coli* 中和耻垢分枝杆菌中都具有抑制细菌生长的作用,并且它们均具有 RNA 切割活性,具备典型的 MazF 毒素家族的生化特征。mtPemK 在 *E. coli* 和耻垢分枝杆菌中表达时,能够抑制细菌生长,但 mtPemK 不能切割 RNA,具体作用机制还有待进一步研究。上述研究表明,尽管在结核分枝杆菌中存在多个编码 MazF 同源蛋白的基因,但是其中一些并不具有毒素蛋白的功能,具备毒素蛋白的功能的 MazF 同源蛋白也可能具有不同的作用机理。

此前的研究主要集中于对结核分枝杆菌中 MazF 同源蛋白的生化特性鉴定,我们在计算机分析的基础上,对可能由 MazF 同源蛋白基因与其上游基因组成的 TA 系统进行了系统分析和鉴定。我们发现 Rv1103c-1102c、Rv1991a-1991c 和 Rv2801a-2801c 属于经典的 mazEF 毒素-抗毒素系统,其中的抗毒素蛋白 Rv1103c、Rv1991a 和 Rv2801a 可以通过抑制对应的毒素蛋白切割 RNA 的活性,消除毒素蛋白对细菌生长的抑制作用。mtPemI-mtPemK 也构成

有生物活性的毒素-抗毒素系统,即 mtPemK 蛋白能够抑制 *E. coli* 和耻垢分枝杆菌细胞的生长,抗毒素蛋白 mtPemI 能够消除毒素蛋白 mtPemK 的毒性作用,但是 mtPemK 不是通过 RNA 切割发挥作用。在我们鉴定出的毒素-抗毒素系统中,Rv1991a、Rv2801a 和 mtPemI 均是基于生物信息学分析和生物活性来命名的新基因。这些结核分枝杆菌中 TA 系统的鉴定为进一步认识它们的生理功能奠定了基础。

我们以 *LacZ* 为报道基因,在耻垢分枝杆菌中对表 2 中 7 个可能的毒素-抗毒素系统的启动子活性进行了测定,结果表明在正常生存环境下,只有 P2801c、P1991c 和 P0659c 有活性,其中 P2801c 活性较高,其他 4 个系统的启动子 P1942c、P1495、P1102c 和 Ppemk 没有明显的活性。由于实验系统的局限性,这一检测的结果不能够全面地体现结核分枝杆菌中各系统的真实转录水平,但是它可以定性地反映在毒素-抗毒素系统自我反馈抑制不存在的条件下,各系统间本底表达水平的差异。TA 系统在应激条件下发挥作用时抗毒素蛋白会被降解,抗毒素和毒素-抗毒素复合物的反馈调控作用也随之丧失。因此,应激条件下 TA 系统的本底表达调控将具有重要的作用。我们以 *LacZ* 为报道基因,研究了饥饿条件下分枝杆菌中 TA 系统本底水平的表达调控,发现随着饥饿处理时间的延长 P2801c 和 P1991c 的活性显著升高。这表明 Rv1991a-1991c 和 Rv2801a-2801c 系统存在营养缺乏条件下的转录调控,可能参与营养缺乏条件下细菌的生长调控。在 *E. coli* 中的高表达 RelA 可以导致应激分子 ppGpp 产生,来抑制 MazEF 系统的转录,同时蛋白酶降解抗毒素蛋白 MazE,释放出的毒素蛋白 MazF 发挥毒性,然而在分枝杆菌中高表达 mtRelA 对 Rv1991a-1991c 和 Rv2801a-2801c 系统的表达却没有显著影响(结果未显示)。这些结果表明,分枝杆菌可能存在不同于 *E. coli* 的 TA 系统调控机制。

胞内感染的结核分枝杆菌在营养缺乏、厌氧等不良生长条件下可以产生持留现象,形成不生长但仍然存活的菌体,持留菌的产生是结核病临床治疗中抗药性和病情复发的重要原因之一^[16]。结核分

枝杆菌的毒素-抗毒素系统被认为与结核分枝杆菌持留现象形成相关^[17]。本研究中对于结核分枝杆菌中毒素-抗毒素系统的鉴定和表达调控的研究有助于了解结核分枝杆菌中毒素-抗毒素系统的功能。我们将构建不同应激条件下的结核分枝杆菌持留模型,检测持留状态产生和发展过程中毒素-抗毒素系统的表达状况,进一步探讨毒素-抗毒素系统在结核分枝杆菌生长调控中的作用机制。

参考文献

- [1] Amitai S, Yassin Y, Engelberg-Kulka H. MazF-mediated cell death in *Escherichia coli*: a point of no return. *The Journal of Bacteriology*, 2004, 186(24):8295-8300.
- [2] Gerdes K, Christensen SK, Lobner-Olesen A. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(5):371-382.
- [3] Pandey DP, Gerdes K. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(3):966-976.
- [4] Hayes F; Toxins-antitoxins. plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science*, 2003, 301(5639):1496-1499.
- [5] Suzuki M, Zhang J, Liu M, Woychik NA, Inouye M. Single protein production in living cells facilitated by an mRNA interferase. *Molecular Cell*, 2005, 18(2):253-261.
- [6] Zhang J, Zhang Y, Inouye M. Characterization of the interactions within the mazEF addiction module of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(34):32300-32306.
- [7] Zhang J, Zhang Y, Zhu L, Suzuki M, Inouye M. Interference of mRNA function by sequence-specific endoribonuclease PemK. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(20):20678-20684.
- [8] Zhang Y, Zhang J, Hara H, Kato I, Inouye M. Insights into the mRNA cleavage mechanism by MazF, an mRNA interferase. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(5):3143-3150.
- [9] Zhang Y, Zhang J, Hoeflich KP, Ikura M, Qing G, Inouye M. MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Molecular Cell*, 2003, 12(4):913-923.
- [10] Engelberg-Kulka H, Glaser G. Addiction modules and programmed cell death and antideath in bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, 1999, 53:43-70.
- [11] Zhu L, Zhang Y, Teh JS, Zhang J, Connell N, Rubin H, Inouye M. Characterization of mRNA interferases from *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(27):18638-18643.
- [12] Zhu L, Phadtare S, Nariya H, Ouyang M, Husson RN, Inouye M. The mRNA interferases, MazF-mt3 and MazF-mt7 from *Mycobacterium tuberculosis* target unique pentad sequences in single-stranded RNA. *Molecular Microbiology*, 2008, 69(3):559-569.
- [13] Gupta A. Killing activity and rescue function of genome-wide toxin-antitoxin loci of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 290(1):45-53.
- [14] Zhao L, Zhang J. Biochemical characterization of a chromosomal toxin-antitoxin system in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS Letters*, 2008, 582(5):710-714.
- [15] Tyagi JS, Das TK, King AK. An *M. tuberculosis* DNA fragment contains genes encoding cell division proteins ftsX and ftsE, a basic protein and homologues of PemK and small protein B. *Gene*, 1996, 177(1-2):59-67.
- [16] Boshoff HI, Barry CE. Tuberculosis - metabolism and respiration in the absence of growth. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(1):70-80.
- [17] Wayne LG, Sohaskey CD. Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55:139-163.

Characterization of Toxin-antitoxin systems in *Mycobacterium tuberculosis*

Yibo Xian, Lidan Cui, Junjie Zhang*

Key Laboratory for Cell Proliferation and Regulation Biology of Ministry of Education, Institute of Cell Biology, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

Abstract: [**Objective**] To characterize the toxin-antitoxin system (TA system) in *Mycobacterium tuberculosis*, which consist of *MazF* homologue gene and its upstream gene. [**Methods**] Seven *M. tuberculosis* *MazF* homologues were induced alone or co-expressed with their upstream genes respectively in *Escherichia coli* and *Mycobacterium smegmatis*, to test the toxic effects of the *MazF* homologues on bacteria growth, and the antitoxic effects of protein encoded by their upstream genes. The RNA cleavage activity of *MazF* homologous was identified *in vitro* with Rv0707 mRNA as the substrate. The promoter region of the identified toxin-antitoxin loci in *M. tuberculosis* was cloned in front of the *lacZ* reporter gene in pSD5B vector. The promoter activity was measured under the normal or starvation condition. [**Results**] The growth of either *E. coli* or *M. smegmatis* was inhibited by four *MazF* homologous proteins, among which Rv1102c, Rv1991c and Rv2801c, but not mtPemK, had the RNA cleavage activities. The toxic effects and RNA cleavage activities of Rv1102c, Rv1991c and Rv2801c were inhibited by their corresponding antitoxin Rv1103c, Rv1991a and Rv2801a, respectively. The other three *MazF* homologues, Rv1942c, Rv0659c and Rv1495, were not toxic to *E. coli* and *M. smegmatis* and also could not cleave RNA. It was found that the promoter activities of Rv2801a-2801c and Rv1991a-1991c systems were significantly increased under the complete starvation condition. [**Conclusion**] Our results demonstrated that Rv1103c-1102c, Rv1991a-1991c, Rv2801a-2801c and mtPemI-mtPemK were typical toxin-antitoxin systems in *M. tuberculosis*. Rv1102c, Rv1991c and Rv2801c were toxin proteins which inhibited cell growth through their RNA cleavage activities, while the mechanism of mtPemK toxin is still unknown. It is possible that Rv2801a-2801c and Rv1991a-1991c systems are involved in the starvation stress response.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, *MazF* homologue, toxin-antitoxin system

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Nature Science Foundation of China (30770030) and by the Beijing NOVA Program (2005B47)

* Corresponding author. Tel: +86-10-58802137; Fax: +86-10-58807720; E-mail: jjzhang@bnu.edu.cn

Received: 5 August 2010/ Revised: 15 October 2010