

鱼腥蓝细菌 PCC7120 *alr3504* 基因缺失突变体的构建及表型分析

戴燕, 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: c-di-GMP 是新发现的真细菌所特有的第二信使, 其合成和降解由双鸟苷酸环化酶和磷酸二酯酶分别完成。经生物信息学分析, 鱼腥蓝细菌 PCC7120 基因 *alr3504* 可能编码含有保守 GGDEF 结构域的双鸟苷酸环化酶。【目的】为了鉴定该基因的功能, 【方法】采用标记置换方法将 *alr3504* 缺失。【结果】敲除该基因后, 发现缺失突变体的形态、生长速度及异形胞发育与野生型无明显差异, 但在盐胁迫条件下, 突变体比野生型对钠盐更敏感。【结论】可见 *alr3504* 虽不直接影响异形胞发育, 但参与了其它信号途径, 研究结果为阐明蓝细菌丰富而复杂的信号转导机制奠定了基础。

关键词: 鱼腥蓝细菌; c-di-GMP; GGDEF 结构域; 双鸟苷酸环化酶; 磷酸二酯酶

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 11-1532-05

1987 年, Benziman 等在木醋杆菌中发现了(3', 5')-环状双鸟苷酸[bis-(3', 5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate, 简称 cyclic di-GMP 或者 c-di-GMP]^[1], c-di-GMP 是一种具有细菌特异性的新型第二信使, 它参与绝大多数真细菌的生理过程, 但不存在于真核生物和古细菌中^[2-5]。近几年来, 对这种小分子的研究使人们不仅发现了调节胞内 c-di-GMP 浓度的复杂体系, 而且还发现 c-di-GMP 调控着各种生理过程, 包括细菌的运动性(motility), 生物膜的形成(biofilm formation)和毒力(virulence)等等^[3,6]。

c-di-GMP 的合成和降解分别由双鸟苷酸环化酶(DGC, diguanylate cyclase)和磷酸二酯酶(PDE, phosphodiesterase)完成。其中 DGC 催化活性功能为保守结构域(conserved domain)GG(D/E)EF, PDE 催化活性功能为 EAL 保守结构域^[2-5]。这种结构域的命名源于它们的保守序列: Gly-Gly-Asp-Glu-Phe 和 Glu-Ala-Leu^[5]。GGDEF 结构域催化两个 GTP 合成

c-di-GMP, EAL 结构域则将 c-di-GMP 水解成线状的 5'-pGpG, 5'-pGpG 再进一步被其它 PDE 水解成 GMP^[7-9]。两种 PDE 是不同的, 因此将 c-di-GMP 水解成线状的 5'-pGpG 的磷酸二酯酶称为 PDEA。最近新发现的另一个蛋白结构域 HD-GYP, 也具有水解 c-di-GMP 的功能^[10], 与 EAL 结构域不同的是, HD-GYP 将 c-di-GMP 直接水解成 GMP^[3]。含这些保守结构域的蛋白在真细菌中广泛存在, 例如在 *Escherichia coli* 中, 有 19 个 GGDEF 蛋白质和 17 个 EAL 蛋白质, 而在 *Vibrio vulnificus* 中这种蛋白的数量高达 100 个^[2]。在蓝细菌中, 存在 16 个此类蛋白, 这暗示着 c-di-GMP 可能参与蓝细菌信号转导过程。本研究首次在 *Anabaena* PCC7120 中研究 c-di-GMP, 由于 *alr3504* 编码只含有 GGDEF 结构域的蛋白, 不含有其他接受信号的结构域, 蛋白结构简单, 因此将 *alr3504* 敲除, 为探讨蓝细菌丰富而复杂的信号转导系统奠定基础。

基金项目: 国家自然科学基金(30670046)

*通讯作者: Tel: +86-27-87282730; Fax: +86-27-87280670; E-mail: wlchen@mail.hzau.edu.cn

作者简介: 戴燕(1983-), 女, 湖北省人, 硕士研究生, 主要从事蓝细菌分子生物学研究。E-mail: dy1567@webmail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2008-05-05; 修回日期: 2008-07-23

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌体和质粒:鱼腥蓝细菌(*Anabaena* PCC7120)和大肠杆菌(*Escherichia coli*) TG1 为本室保存,大肠杆菌 HB101/pRL623 和 J53/RP4 由 C.P.Wolk 惠赠。质粒 pBluescript SK-和 pPH45Ω 为本室保存,质粒 pRL271 由 C.P.Wolk 惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器:DNA 回收试剂盒购自 Axygen 公司。T4 DNA 连接酶和限制性内切酶 *Xho*、*Bam*H I、*Not* I 等均购自 TaKaRa 公司。*Taq* 酶购自上海申能博彩生物科技有限公司。

1.2 基因片段的扩增与克隆

1.2.1 引物:引物由北京奥科生物技术有限责任公司合成,以鱼腥蓝细菌 PCC7120 总 DNA 为模板。引物 P1(5'-ATCGCTCGAGGTTGGAACAGTTTGGTGA-3')和 P2(5'-CAGTGGATCCGAGATGAAAGTGGAGGT-

A-3')用于扩增 *alr3504* ORF 外的上游序列 A,引物序列中分别含有 *Xho* 和 *Bam*H I 酶切位点。引物 P3(5'-GTCAGGATCCAACCTTAGGCTCCCGTCTT-3')和 P4(5'-CTAGGCGGCCGCTGCTAATCATCGCCACAT-3')用于扩增 *alr3504* ORF 外的下游序列 B,引物序列中分别含有 *Bam*H I 和 *Not* I 酶切位点。用下划线标记的序列为各酶切位点。

1.2.2 基因克隆:PCR 扩增条件为:94 5 min;94 1 min,56 1 min,72 3 min,30 个循环;72 5 min。按文献[11]PCR 扩增产物,经酶切后连至 pBluescript 载体,验证得到阳性克隆后,再插入从 pPH45Ω 经 *Bam*H I 酶切得到的具有壮观霉素抗性的 Ω 片段。将整个包含上游片段、Ω 片段及下游片段经 *Xho* 和 *Not* I 双酶切连至载体 pRL271,构建流程见图 1。pRL271 是一整合载体,它可以通过同源重组将克隆基因整合到蓝细菌染色体上。

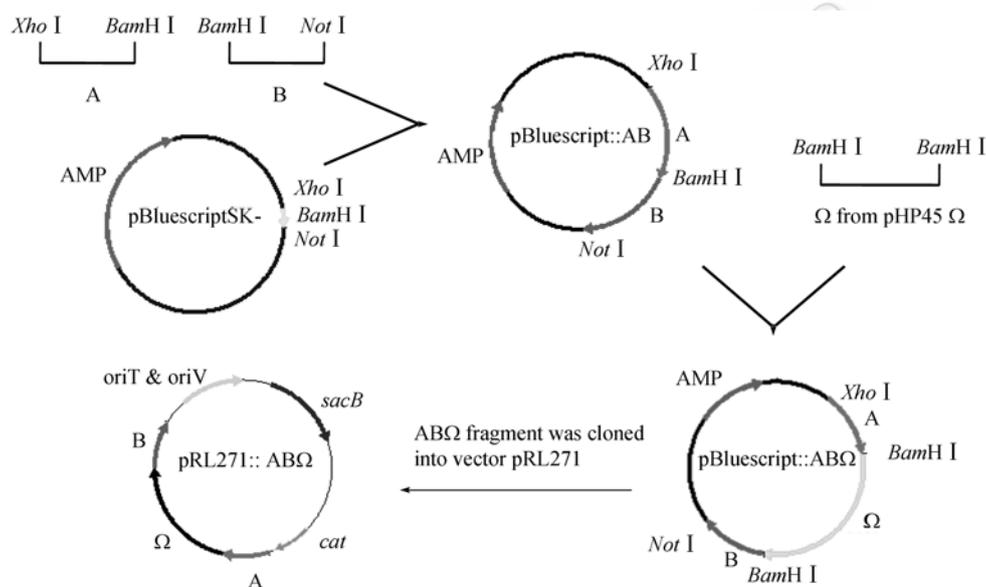


图 1 质粒 pRL271::ABΩ 构建流程图

Fig. 1 A flow chart showing the construction process of pRL271::ABΩ.

1.3 菌株的培养和接合转移

所有的大肠杆菌用 LB 培养基于 37 培养。蓝细菌 PCC7120 在 28 , 120 r/min, 连续光照条件下培养。鱼腥蓝细菌突变株在 BG11 中培养时加终浓度为 10 μg/mL 的壮观霉素 (Sp)。通过接合转移将质粒从大肠杆菌导入蓝细菌,按文献[12]进行。

1.4 缺失突变株的筛选及验证

将含有外源片段的 pRL271 通过接合转移导入鱼腥蓝细菌 PCC7120 中,以 10 μg/mL 的 Sp 筛选接合

子。利用 pRL271 的蔗糖致死基因 *sacB*,将接合子数次传代后涂布于含有 5%蔗糖的 Sp 抗性平板上,筛选可能的双交换突变株。约两周后,扩大培养能在此平板上生长的菌体,提取总 DNA,以野生型为对照,用引物 P1 和 P4 进行 PCR,验证缺失突变株。

1.5 生长曲线的测定

将蓝细菌菌液浓度调至 OD_{750} 约 0.1 后进行培养,每天取样 3 mL,用分光光度计测定 OD 值,收集数据后,制定生长曲线。

2 结果

2.1 *alr3504* 基因 ORF 外的上游片段和下游片段的克隆

PCR 扩增 *alr3504* 基因 ORF 外的上游片段 A 及下游片段 B, 大小分别为 946 bp 和 775 bp。整个重组质粒构建流程见图 1, 将每一步获得的重组质粒分别命名为 pBluescript::AB, pBluescript::AB Ω , pRL271::AB Ω 。

2.2 缺失突变体的筛选

将构建好的 pRL271 重组质粒导入含有帮助质粒 PRL623 的 HB101 菌株中, 并进行接合转移, 将得到的接合子连续培养数代后再在含 5% 蔗糖、Sp (壮观霉素) 10 μ g/mL 的 BG11 培养基平板上筛选可能的双交换突变体, 即缺失突变体。通过蔗糖筛选得到了 6 株可能的缺失突变体。

利用 PCR 法对蔗糖平板上所得到的突变体进行验证, 所用引物为 P1 和 P4。验证结果表明所得的 6 株突变体全部为缺失突变体, 命名为 *alr3504*。选择其中的一株进行后续研究。

2.3 缺失突变体表型观察

2.3.1 突变体生长曲线测定: 为了查明 *alr3504* 的缺失是否会影响菌体的生长, 以野生型为对照, 重复两次测定了缺失突变体的生长曲线, 结果表明 (图 2) 突变体生长速度与野生型无明显差异, *alr3504* 的缺失并不影响蓝细菌的生长。

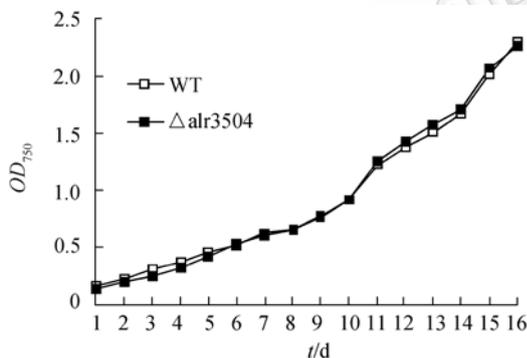


图 2 突变体生长曲线

Fig. 2 Growth curve of the mutant.

2.3.2 突变体异形胞分化的观察: c-di-GMP 是一种信号分子, 它可以使细胞感受到的外界信号放大, 从而引起细胞内一系列的生理反应。鱼腥蓝细菌 PCC7120 是一种丝状固氮蓝细菌, 在无氮盐条件下一些营养细胞会在 24 h 内分化成异形胞并进行固氮作用, 其间涉及到多种复杂的信号转导过程。为了验证与 c-di-GMP 相关的 *alr3504* 是否参与异形胞分化过程, 对突变体进行缺氮诱导后, 观察了异形胞的发育

以及生长状况。结果表明在缺氮条件下, 突变体异形胞的发育正常 (图 3)。

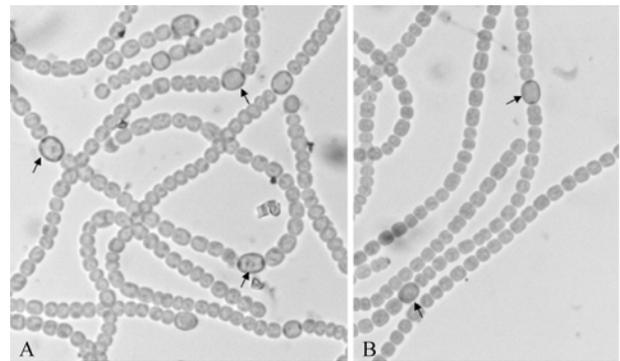


图 3 野生型和突变体的异形胞发育情况

Fig. 3 Heterocyst development in the mutant and wild type strain. A: WT; B: $\Delta alr3504$; The arrows indicate the position of the heterocysts.

2.3.3 突变体盐胁迫: 有研究表明 c-di-GMP 与细胞的抗胁迫及细胞形态有关^[5,13], 因此本研究检测了该缺失突变体对盐胁迫是否敏感。在含有不同浓度 NaCl 的 BG11 液体培养基中培养后, 检测了突变体与野生型在生长及形态上的差异。添加的 NaCl 浓度为 0、0.2、0.3 和 0.4 mol/L。通过重复两次测定菌体的生长曲线和不同时间取样镜检, 发现突变体对盐胁迫更敏感, 每一个盐浓度下的突变体生长速度比同浓度下的野生型要缓慢, 甚至 0.3 mol/L 盐浓度下其生长比野生型在 0.4 mol/L 盐浓度下的生长还要慢, 这说明 *alr3504* 的缺失会使菌体对盐敏感 (图 4)。但镜检并未发现突变体形态异常。在低盐浓度下测定突变体的生长曲线, 发现与野生型没有明显区别 (数据未显示)。

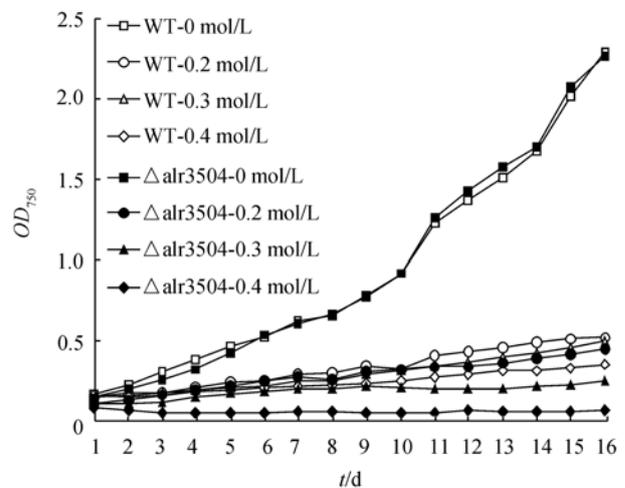


图 4 突变体在盐胁迫下的生长曲线

Fig. 4 Growth curve of the mutant under salt-stress condition.

3 讨论

c-di-GMP 作为第二信使在细菌中普遍存在,在大多数细菌中有多个与 c-di-GMP 相关的基因,它们编码的蛋白含有 GGDEF、EAL 或 GGDEF-EAL 耦联的结构域^[14,15],其中有许多 GGDEF、EAL 或 GGDEF-EAL 结构域的 N 端会有各种各样的其他与接受外界信号有关的输入结构域,如 PAS、GAF、HAMP 和 REC 等等^[16],它们感受到信号后,能激活 C 端 GGDEF 或 EAL 结构域的功能,从而引起胞内 c-di-GMP 浓度的变化。而本研究中的 *alr3504* 编码的是一个纯粹的 GGDEF 蛋白质,其 N 端无任何输入结构域,故推测该基因可能编码纯粹的 c-di-GMP 合成酶,需要和其他因子互作才能影响细胞的生理活动。

另外,通过生物信息学方法在鱼腥蓝细菌 PCC7120 的基因组中查找发现,包括 *alr3504* 在内总共有 16 个与 c-di-GMP 可能相关的基因。单独缺失 *alr3504* 有可能并不影响胞内 c-di-GMP 浓度。而且鱼腥蓝细菌 PCC7120 信号转导途径错综复杂,单是异形胞发育过程就涉及多个因子调控,如 NtcA、2-oxoglutarate 等等,因此突变体在缺少氮源时与野生型异形胞发育无明显区别也并不代表 c-di-GMP 与异形胞发育过程毫无关系。

从盐胁迫实验可以看出,*alr3504* 缺失突变体对盐浓度具有敏感性。一些研究也表明 c-di-GMP 参与胁迫过程^[5]。当环境改变不利于细菌生长的时候,它们将会从浮游状态变为聚集的群体状态,通常它们粘附于一表面,外层由疏水的胞外多糖包裹,我们将这种细菌复合体称之为生物膜(biofilm)。这种胞外多糖能使细菌抵抗外界不良环境而得以生存。c-di-GMP 调控胞外多糖的产生,因而它能在多种细菌中激活生物膜的形成,如 *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium*, *Vibrio* spp, *Yersinia pestis* 等^[17,18]。当 c-di-GMP 浓度升高时,细菌就会产生更多的胞外多糖,以便形成生物膜。这就不难解释突变体对盐敏感的原因。该基因的缺失可能使胞内 c-di-GMP 水平降低,从而使胞外多糖减少,因此会对盐更敏感。c-di-GMP 虽可以体外化学合成,但国内尚无合成的技术与平台,由于缺少标准品,因此本研究无法检测 c-di-GMP 浓度的变化。

c-di-GMP 是一种非常重要的信使分子,目前的研究已表明它参与多种生理过程,但它在鱼腥蓝细菌

中的功能我们还不是很清楚,本文只是对此进行了初步的探讨,后续研究还在进行中。

参 考 文 献

- [1] Ross P, Weinhouse H, Aloni Y, *et al.* Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature*, 1987, 325: 279–281.
- [2] Jenal U, Malone J. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu Rev Genet*, 2006, 40: 385–407.
- [3] Tamayo R, Pratt JT, Camilli A. Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annu Rev Microbiol*, 2007, 61: 131–148.
- [4] Romling U, Amikam D. Cyclic di-GMP as a second messenger. *Curr Opin Microbiol*, 2006, 9: 218–228.
- [5] Romling U, Gomelsky M, Galperin MY. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol Microbiol*, 2005, 57(3): 629–639.
- [6] Cotter PA, Stibitz S. C-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Curr Opin Microbiol*, 2007, 10: 17–23.
- [7] Chang AL, Tuckerman JR, Gonzalez G, *et al.* Phosphodiesterase A1, a regulator of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*, is a heme-based sensor. *Biochemistry*, 2001, 40: 3420–3426.
- [8] Schmidt AJ, Ryjenkov DA, Gomelsky M. The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *J Bacteriol*, 2005, 187: 4774–4781.
- [9] Tamayo R, Tischler AD, Camilli A. The EAL domain protein VieA is a cyclic diguanylate phosphodiesterase. *J Biol Chem*, 2005, 280: 33324–33330.
- [10] Ryan RP, Fouhy Y, Lucey JF, *et al.* Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 6712–6717.
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989, pp16–69.
- [12] Elhai J, Wolk CP. Conjugal transfer of DNA to Cyanobacteria. *Methods Enzymol*, 1988, 167: 747–754.
- [13] Aldridge P, Jenal U. Cell cycle-dependent degradation of a flagellar motor component requires a novel type response regulator. *Mol Microbiol*, 1999, 32: 379–391.
- [14] Galperin MY. Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J Bacteriol*, 2006, 188(12): 4169–4182.
- [15] Ryan RP, Fouhy Y, Lucey JF, *et al.* Cyclic di-GMP signaling in bacteria: recent advances and new puzzles. *J Bacteriol*, 2006,

- 188(24): 8327–8334.
- [16] Galperin MY, Nikolskaya AN, Koonin EV. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, 203: 11–21.
- [17] Garcia B, Latasa C, Solano C, *et al.* Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Mol Microbiol*, 2004, 54: 264–277.
- [18] Simm R, Morr M, Kader A, *et al.* GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol*, 2004, 53: 1123–1134.

Construction of an *alr3504* defected mutant and its phenotype analysis in *Anabaena* PCC7120

Yan Dai, Li Wang, Wenli Chen*

(College of Life Science and Technology, State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: C-di-GMP [Bis-(3',5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate] is a novel global second messenger in bacteria. The diguanylate cyclase and phosphodiesterase involve in c-di-GMP synthesis and degradation, respectively. *alr3504* in *Anabaena* PCC7120 possibly encodes diguanylate cyclase with a conserved GGDEF domain. **[Objective]** For functional characterization, **[Methods]** the deletion mutant of *alr3504* was constructed by using marker exchange method. **[Results]** No significant differences were found in the cell morphology, growth rate or heterocyst development between the deletion mutant and the wild type strain. But the mutant was more sensitive to Na⁺-salt under salt-stress. **[Conclusion]** The results show that *alr3504* did not affect heterocyst development directly, but involved in other signaling pathway, which lay a foundation for exploring the abundant and complex signal transduction of cyanobacteria.

Keywords: *Anabaena*; c-di-GMP[Bis-(3',5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate]; GGDEF domain; diguanylate cyclase; phosphodiesterase

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

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

Received: 5 May 2008/ Revised: 23 July 2008

科学出版社新书推介 (2008-08)

中国食品安全控制研究应用 (译)

魏益民 刘为军 潘家荣著

978-7-03-021909-1 ¥29.00 2008年8月30日出版



本书在有关食品安全控制理论分析的基础上,借鉴国际组织和发达国家食品安全控制的基本经验,对中国食品安全的历史变迁进行了系统研究,通过深入分析中国各阶段食品安全控制的变迁特征、变迁规律以及存在的问题,从国际和国内两个视角总结了食品安全系统化、综合化控制的总体趋势,提炼了食品安全控制的关键影响因素,最终提出了新型食品安全“网链控制”模式,从理论和实践两方面为解决中国的食品安全问题提供了一种新的思路。

作为一部食品安全管理领域的学术论著,本书适合于从事食品安全研究的科研人员、负责食品安全监管的行政管理人员及食品企业管理人员阅读,也可作为食品质量与安全专业的高校教师、本专科学生及硕士研究生的参考书。