

鼠伤寒沙门氏菌嘌呤生物合成调控研究*

IX. PUR box 的突变分析 2

马伟军 秦浚川

(南京大学生物化学系 国家医药生物技术重点实验室 南京 210093)

王敖全**

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 为研究 16bp PUR box 中 8 个完全保守的碱基中的 2 个碱基在与 purR^+ 阻遏蛋白结合中的功能, 对它们分别作了定点突变, 使其分别从 C/G 突变为 G/A。凝胶阻滞实验结果表明, 含上述保守碱基突变的 PUR box 均不能与 purR^+ 阻遏蛋白结合。证明这 2 个保守碱基对维持 PUR box 的功能是必须的, 其中任一改变都导致 PUR box 功能的丧失。

关键词 PUR box, 鼠伤寒沙门氏菌, 嘌呤核苷酸生物合成调控

分类号 Q939.44 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)05-0436-40

对鼠伤寒沙门氏菌嘌呤生物合成调节突变体的研究表明, 分散在染色体上的嘌呤从砂合成途径所有结构基因均受同一反式调节基因的负调控^[1,2]。对受控结构基因的核苷酸序列测定发现, 在它们的 5' 端调控区都存在一个 16bp 的保守序列称之 PUR box。已证明该序列为 purR^+ 编码的阻遏蛋白的结合区^[3-5]。比较各结构基因的 PUR box 序列可见有 8 个 bp 即第 3 位的 G, 第 4 位的 C, 第 5 位的 A, 第 6 位的 A, 第 8 位的 C, 第 9 位的 G, 第 12 位的 T 和第 14 位的 C 是完全保守的。通过分离 purHD 和 purG 的 O^c 突变体和定点突变分析已证明, 其中 6 个保守碱基即第 3 位的 G, 第 4 位的 C, 第 5 位的 A, 第 6 位的 A, 第 12 位的 T 和第 14 位的 C 对维持 PUR box 的功能是必须的。本文报道余下的 2 个保守碱基的定点突变及其生物学功能。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒(见表 1)

1.2 培养基

M63 用作基础培养基^[6], 丰富培养基 LB^[6], 氨卞青霉素终浓度为 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.3 质粒 DNA 的提取, 目的片段的回收, 限制核苷酸内切酶和 T4 连接酶连接^[7]。

1.4 DNA 核苷酸序列测定

采用 pharmaciaT7 试剂盒, 按厂家说明书操作。

1.5 PCR 引物设计, 扩增反应^[7]

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39470382)

** 联系人

收稿日期: 1998-08-27, 修回日期: 1998-10-15

1.6 蛋白浓度测定^[8]

1.7 凝胶阻滞实验 Gel retardation^[5]

1.7.1 purR⁺ 阻遏蛋白的提取 :参照文献^[4] 完成

1.7.2 含 O⁺ 和带指定突变的 PUR box DNA 片段的 5′末端端 γ—³²P 标记按 Promega 公司提供方法进行。

表 1 菌株和质粒
Table 1 Strains and Plasmids

菌株 Strains	相关遗传型 Relevant genotype	来源或参考文献 Sources or reference
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	supE44△lacU169(801acZ△M15) hsdR17recA/end/gyrA96thi/relA	Storage in this lab
<i>Salmonella typhimurium</i>		
DH-LO ⁺ P	DH5α with pLHGO ⁺	This study
DH-LP8	DH5α with pLHG-8	This study
DH-LP9	DH5α with pLHG-9	This study
plasmid		
pBR322	amp ^r tet ^r sup pMB	This lab
pUC19	amp ^r lacI POZ rep pMB	This lab
pLBG1	Mud5005 with O ⁺ purG	[4]
pLHGO ⁺	含 PUR box 的 270bp <i>Eco</i> RI- <i>Pst</i> I 片段 插入 pUC19(O ⁺)	This study
pLHG-8	含突变的 PUR box 的 270bp 片段 插入 pUC19 <i>Eco</i> RI- <i>Pst</i> I 片段(第 8 位 C→G)	This study
pLHG-9	含突变的 PUR box 的 270bp 片段 插入 pUC19 <i>Eco</i> RI- <i>Pst</i> I 片段(第 9 位 G→A)	This study

1.7.3 阻遏蛋白与 PUR box 的结合 :反应在 purR 缓冲液中完成 终体积为 10μL ,其中非特异性结合 DNA pBR322 1μg ,蛋白粗提液 1μL ,蛋白浓度为 2.4mg/mL。在加入特异结合 DNA 前反应液在室温下继续反应 20min ,即刻上样进行聚丙烯酰胺电泳。胶浓度 4%(30:1)7V/cm 电泳 1h。

2 结果

2.1 PUR box 突变体的构建

2.1.1 引物设计 :采用 PCR 方法通过设计引物在 PUR box 特定定位点引入突变。根据鼠伤寒沙门氏菌 purG 序列 ,使设计引物的 5′端含部分 PUR box 序列。分别将 PUR box 第 8 位的 C ,第 9 位的 G ,分别改成 G 和 A。

这些引物分别为 :

O⁺ 5′—TTTGAATTCTACGCAAACG—3′
Primer No.8 5′—TTGAATTCTACGCAAAGGGTT—3′
Primer No.9 5′—TTGAATTCTACGCAAACAGTTTTCG—3′
3′端下游引物 5′—TTTCTGCAGGCGTTCAAG—3′

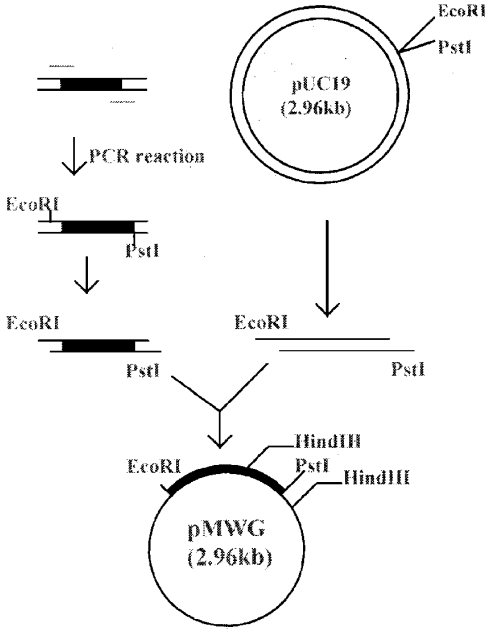


图 1 PUR box 定点突变体的构建

Fig. 1 Construction of PUR box mutants with a specific mutation
— primer ■ PUR box

2)。测序结果表明 2 个 PUR box 突变体的突变位点均正确。

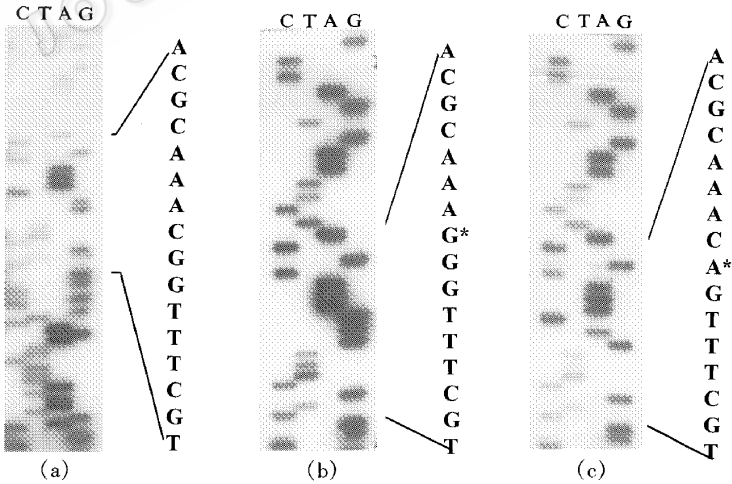


图 2 PUR box 突变体的 DNA 序列分析

Fig. 2 Determination of DNA sequence of PUR box mutants
a. pLHGO⁺ ; b. pLHG-8 ; c. pLHG-9.

黑体字表示酶切位点 ,斜体字表示改变的碱基 ,下划线部分为 PUR box 序列。

2.1.2 目的片段的 PCR 扩增 :以具完整功能的 purG 克隆 pLBG-1 质粒 DNA 为模板 ,用上述引物分别进行 PCR 扩增 ,均扩增出约 280bp 的目的片段(资料未列出)。

2.1.3 目的片段的克隆、鉴定和核苷酸序列测定 3 种 PCR 扩增片段经 *Eco*RI 和 *Pst*I 酶切用 DEAE 纤维素膜回收 ,分别克隆至 pUC19 的 *Eco*RI-*Pst*I 位点并转化 *E. coli* DH5 α 。进而对获得的转化子进行酶切鉴定。已知 purG 的 PUR box 下游 80bp 处有一个 *Hind*III 切点 ,在 pUC19 *Pst*I 切点处也有一个 *Hind*III 切点。因此当用 *Hind*III 酶切上述克隆子时若克隆片段正确 ,则应切出约 190bp 的特征片段。酶切结果表明 2 种克隆均能切出预期片段。这些克隆分别被命名为 pLHGO⁺ ,pLHG-8 ,pLHG-9(图 1)。为证明这些克隆已在 PUR box 指定位点引入突变 ,对它们分别作了 DNA 核苷酸序列测定(图

2.2 PUR box 突变体的功能分析

为检验经突变的 PUR box 是否具有与 purR^+ 阻遏蛋白结合的功能, 用 *Eco*RI 和 *Pst*I 分别酶切上述 2 种质粒。回收 280bp 片段。以 $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ 标记这些片段后, 与 purR^+ 阻遏蛋白作体外结合实验(Gel Retardation)。结果见图 3。

由图可见, purR^+ 阻遏蛋白能与野生型的 PUR box 很好结合, 但与带有突变的 PUR box 均不能结合。有力证明余下的这 2 个保守碱基对维持 PUR box 的正常功能同样是至关重要的, 一旦突变便可导致功能的丧失。

3 讨论

比较发表的各嘌呤结构基因的 PUR

box 序列可见, 16bp 中仅有 8 个是完全保守的, 本实验室曾获得了 purHD 和 purG 的 O^c 突变体各一株。经突变位点分析表明, O^c 突变正是这 8 个保守碱基中的两个发生突变的结果。即第 4 位的 C 和第 14 位的 G。为阐明每个保守碱基的生物学功能, 我们已经对余下的 6 个中的 4 个碱基进行了定点突变和功能分析。结果显示 4 个碱基中任一发生突变即丧失与 purR^+ 阻遏蛋白的结合功能。本文对最后 2 个保守碱基也作了定点突变和功能分析, 得到同样的结果。观察 PUR box 的结构下不难发现, 16bp 呈回文对称结构。因此可以认为完全保守的这些碱基在维持 PUR box 的对称性是必须的, 而这种结构的对称性肯定对维持 PUR box 与 purR^+ 阻遏蛋白的结构合功能是至关重要的。当然这个结果还不能排除 16bp 中非保守碱基对结合功能的影响。

参 考 文 献

- [1] Sandobon K e, Roth J. *Microbiological reviews*. 1998 **52** :485~532.
- [2] He B, Shiam A, Choik Y *et al.* *J Bacterial*, 1990 **172** (8) :4555~4560.
- [3] Rolfs R J, Zalkin H. *J Biol Chem*, 1988 **263** (36) :19653~19661.
- [4] 李凯羿, 戴秀玉, 刘 奔等. 遗传学报, 1995 **22** (2) :152~160.
- [5] Liu ben, Huang Yi, WangAoquan. *Science in China*(Series C), 1997 **40** (3) :138~245.
- [6] Miller J H. *Experiments in Molecular Genetics*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972.
- [7] Sambroak J, Fretsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A R *et al.* *J Biol Chem*, 1955 **234** (1) :193~265.

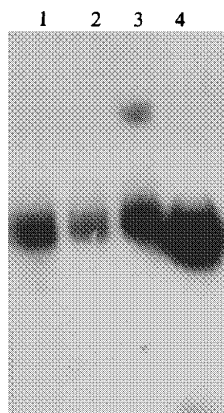


图 3 purR^+ 阻遏蛋白与 PUR box 的体外结合

Fig.3 Bind of purR^+ repressor with PUR box in vitro
1. 2. pLHG-8 and pLHG-9 mixed with purR^+ repressor
seperately ; 3. PUR box of pLHG- O^c mixed with purR^+
repressor ; 4. Labeled fragment of pLHG- O^c PUR box by
 $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$.

GENE REGULATION STUDIES ON PURINE BIOSYNTHETIC IN
SALMONELLA TYPHIMURIUM *

IX. MUTATION ANALYSIS OF PUR BOX 2

Ma Weijun Qin Junchuan

(Department of Biochemistry , State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology ,
Nanjing University , Nanjing 210093)

Wang Aoquan * *

(Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080)

Abstract Two consensus bases C and G in 16 bp PUR box were directed mutated to G and A separately by PCR amplification. The binding function of PUR box carrying mutation with PUR protein were examined by gel retardation experimnet. The result showed that the PUR box with above mutations could not bind with purR protein extracted from LT2. It proved that the two consensus bases C and G are necessary for PUR box binding with purR protein.

Key words PUR box , *Salmonella typhimurium* , Regulation of purine nucleotide biosynthesis

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No.39470382)

致 读 者

首先感谢广大作者、读者多年来对《微生物学报》的关心和支持。为了适应改革开放的需要,使科研成果尽快得到交流,本刊自 2000 年 40 卷第 1 期开始扩版,双月刊,每册 112 面。全部道林纸印刷,内附进口铜版纸印制的黑白图版和彩色图版。

欢迎投稿! 欢迎订阅! 欢迎提出宝贵意见!

《微生物学报》编辑部