

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
53(10):1043–1049; 4 October 2013
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

蓝细菌 *Synechocystis* PCC 6803 染色体上的基因 *ssl2138* 和 *sll1092* 构成的毒素-抗毒素系统

宁德刚, 赵卫飞, 钱亚如

江苏大学环境学院, 镇江 212013

摘要:【目的】证明集胞藻 (*Synechocystis*) PCC 6803 染色体上的假定基因 *ssl2138* 和 *sll1092* 构成 *vapBC* 家族的毒素-抗毒素系统 (toxin-antitoxin system, TA 系统)。【方法】以 RT-PCR 分析 *ssl2138* 和 *sll1092* 的共转录, 以选择性表达系统分析其编码产物对大肠杆菌生长的影响, 并通过亲和层析和质谱检测证明编码产物之间的相互作用。【结果】*ssl2138* 和 *sll1092* 构成的二元操纵子在正常生长条件下共转录; *Sll1092* 表达抑制大肠杆菌的生长, *Ssl2138* 的同时表达或随后表达可拮抗 *Sll1092* 的生长抑制作用; *Ssl2138* 与 *Sll1092* 相互作用形成复合体。【结论】位于同一操纵子中的假定基因 *ssl2138* 和 *sll1092* 构成 *vapBC* 家族的 TA 系统。

关键词: 集胞藻 PCC 6803, 毒素-抗毒素系统, *vapBC*, 蛋白复合体

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 10-1043-07

细菌毒素-抗毒素系统 (toxin-antitoxin (TA) system) 由位于同一操纵子中分别编码毒素和抗毒素蛋白的 2 个基因构成。已鉴定的 TA 毒素具有不同的生化活性, 通过作用于复制、翻译等细胞过程, 抑制细菌生长或导致细胞死亡^[1]。毒素与抗毒素形成蛋白复合体抑制毒素活性^[1]。根据 TA 毒素序列的相似性, 将已鉴定的 TA 系统分为包括 *vapBC* 的多个不同家族^[1]。最初发现于低拷贝质粒、维持质粒稳定性的 TA 系统也大量存在于细菌染色体上^[2–3]。染色体上的 TA 系统可作为胁迫反应因子, 通过调控细菌生长使细胞适应不同的环境胁迫^[4–5]。蓝藻是一类古老的具有放氧光合作用的革兰氏阴性细菌。在漫长的自然选择过程中, 蓝藻进化出独特的适应能力, 具有显著的生态竞争优势。譬如, 富营养化水体中的某些蓝藻在适当的环境条

件下能迅速生长并形成蓝藻水华^[6]。蓝藻水华可导致严重的环境污染, 威胁人类身体健康。因此, 蓝藻中 TA 系统的研究对阐明蓝藻水华的发生以及开发以 TA 系统为靶标的蓝藻水华控制技术具有重要的理论与应用价值。本研究证明了集胞藻 (*Synechocystis*) PCC 6803 染色体上假定基因 *ssl2138* 和 *sll1092* 构成具有活性 *vapBC* 家族的 TA 系统。

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, PrimeScript 1st strand cDNA synthesis kit 等均购自宝生物工程有限公司 (大连, 中国), 镍亲和层析柱 Ni-NTA His-Bind Resin 购自

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 (1283000072)

作者简介: 宁德刚 (1966–), 男, 湖北大悟人, 副教授, 主要从事蓝藻遗传学研究。Tel/Fax: +86-511-88790955; E-mail: 306502@ujs.edu.cn

收稿日期: 2013-03-12; **修回日期:** 2013-04-24

Novagen (美国)。L-阿拉伯糖 (L-arabinose) 和异丙基- β -D 硫代半乳糖苷 (isopropyl β -D-thiogalactopyranoside, IPTG) 购自 Sigma-Aldrich (美国)。引物合成及 PCR 扩增片段测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。主要仪器包括高速冷冻离心机 (Centrifuge 5804R, Eppendorf, 德国), 蛋白电泳仪 (PowerPae Basic, BioRad, USA), 质谱仪 (Shimadzu Biotech Axima TOF2, Shimadzu Biotech, 日本)。

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) 接种于 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养, 重组菌株的培养加入相应的抗生素 (氨苄青霉素和硫酸卡拉霉工作浓度均为 50 μ g/mL)。

1.2 分子生物学操作

DNA 重组按标准操作方法进行^[7]。按文献[8]提取的 *Synechocystis* PCC 6803 染色体用于 PCR 扩增反应模板。

pJS298^[9] 载体含受 L-阿拉伯糖诱导的启动子 P_{BAD} 和 IPTG 诱导的启动子 P_{T7lac} , 以及编码相应的转录调控蛋白的基因 *araC* 及 *lacI*, 用于 *ssl2138* 和 *sll1092* 的选择性表达。以 *sll1092*-N (GGAGACATATGAATTCTGTTTTGATAGACAC) 和 *sll1092*-B (GGAGAGGATCCAGGATGAACAGTATTGGC) 为引物, PCR 扩增 *sll1092* 基因, 扩增产物以 *NdeI* 和 *BamHI* 酶切后克隆于 pJS298 的 *NdeI*/*BglIII* 位点, 重组质粒命名为 pJS343。以 *ssl2138*-S (GGAGAGCTCGACTACTGAAGCTGCCCTATT) 和 *ssl2138*-K (GGAGAGGTACCGTCGTCACAGGCAAGTTAGAG) 为引物, PCR 扩增含 *ssl2138* 片段, 以 *SacI* 和 *KpnI* 酶切后克隆于 pJS343, 鉴定后的重组质粒命名为 pJS349。pJS343 质粒中含 P_{T7lac} 控制的 *sll1092*, pJS349 含 P_{T7lac} 控制的 *sll1092* 和 P_{BAD} 控制的 *ssl2138*。

以 *ssl2138*-N (GGAGACATATGACTACTGAAGCTGCCCTATT) 和 *sll1092*-B (GGAGAGGATCCAGGATGAACAGTATTGGC) 为引物, PCR 扩增含基因 *ssl2138* 和 *sll1092* 片段, 扩增片段经 *NdeI* 和 *BamHI* 酶切后, 克隆于 pET28a 的 *NdeI* 和 *BglIII* 位点, 得到重组质粒 pJS541。该重组质粒在 *E. coli* BL21 (DE3) 中诱导共表达氨基末端含有 6 个组氨酸残基

的 His₆-Ssl2138 蛋白和 Sll1092 蛋白。

1.3 RNA 提取和 RT-PCR 反应

从 200 mL *OD*₇₃₀ 约为 0.8 的集胞藻 PCC 6803 培养物中收集细胞, 按文献[10]描述方法提取蓝藻细胞总 RNA。取 3 μ g 总 RNA 样品为模板, 以 PrimeScript 1st strand cDNA synthesis kit 合成 cDNA 链。取 1 μ g cDNA 作为模板, 以 *ssl2138*-S 和 *ssl2138*-K 为引物, PCR 检测 *ssl2138* 和 *sll1092* 的转录。

1.4 选择性表达 Ssl2138 和 Sll1092 的大肠杆菌生长及活性分析

选择性表达质粒分别转化 *E. coli* BL21 (DE3) 得到相应的重组菌株。为抑制启动子 P_{T7lac} 和 P_{BAD} 本底表达, 培养基中添加 0.2% 的葡萄糖。分别以 0.1 mmol/L 的 IPTG 和 0.2% (W/V) 的阿拉伯糖诱导重组菌株中 P_{T7lac} 和 P_{BAD} 控制的相应基因的表达。重组菌株接种于 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养至 *OD*₆₀₀ 约 0.2。1 mL 培养物分别作 10 倍系列稀释, 并取 2 μ L 稀释样品滴于含 IPTG (Glu + IPTG), L-阿拉伯糖 (Glu + Ara), IPTG 和阿拉伯糖 (Glu + IPTG + Ara) 以及不含诱导剂 (Glu) 的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h。重组菌株接种于 Glu + IPTG, 液体 LB 培养基中, 初始 *OD*₆₀₀ = 0.1, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养, 分别于 0、2、4 和 8 h 时取样, 并离心收集细胞。细胞以无诱导剂的 LB 培养基洗涤 2 次后, 重悬于相同体积的 LB 培养基中。取 100 μ L 适当稀释后的细胞悬液涂布于含相应诱导剂的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 30 h 后计数菌落 (colony forming unit, CFU)。

1.5 重组蛋白的诱导表达和纯化

共表达质粒 pJS541 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 得到重组菌株 BL21 (DE3) (pJS541)。重组菌株接种于 LB 液体培养基中振荡培养至 *OD*₆₀₀ 约为 0.6, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 诱导 3–4 h 后收集菌体。诱导表达重组蛋白的检测及纯化按文献[11]描述方法进行。

1.6 重组蛋白质谱鉴定

非变性共纯化的 His₆-Ssl21384 和 Sll1092 经 15% SDS-PAGE 电泳分离染色后, 切下目的条带。蛋白样品处理及质谱分析按文献[11]描述方法进行。肽谱 *m/z* 值与 MS-DIGEST 软件 (<http://prospector.ucsf.edu>) 理论值分析比对。

2 结果

2.1 *ssl2138* 和 *sll1092* 的遗传结构和编码产物

集胞藻 PCC 6803 染色体上的基因 *ssl2138* 与下游的基因 *sll1092* 紧密相邻,并有 1 个核苷酸的重叠,可能组成一个二元操纵子(图 1-A)。*ssl2138* 和 *sll1092* 均注释为假定蛋白基因(<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase>),分别编码 68 个和 128 个残基、分子量分别为 7.7 kDa 和 14.8 kDa 的蛋白。对 *ssl2138* 和 *sll1092* 编码蛋白的保守结构域分析发

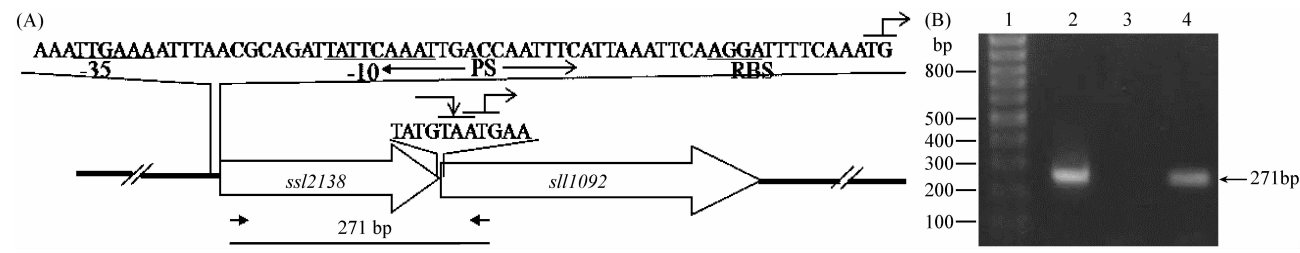


图 1. *ssl2138* 和 *sll1092* 的遗传结构与转录

Figure 1. Co-transcription of *ssl2138* and *sll1092*. (A) A schematic diagram showing the structure of *ssl2138* and *sll1092*. -35, -10 and ribosome binding site (RBS) are underlined. PS indicates the palindrome sequence. Small arrows symbolize the relative location of the primers used for RT-PCR analysis in B. (B) RT-PCR analyses for co-transcription of *ssl2138* and *sll1092*. Lane 1, molecular weight standard, lane 2, the genome DNA. lane 3, total RNA, and lane 4, cDNA.

2.2 Sll1092 表达抑制大肠杆菌生长,Ssl2138 抑制 Sll1092 的生长抑制作用

TA 系统的显著特征是毒素基因的表达抑制细菌生长。由于大肠杆菌已建立了成熟的诱导表达系统,通常用于鉴定异源 TA 系统。我们利用含选择性表达质粒(图 2-A)的 *E. coli* BL21 (DE3) 重组菌株分析 *ssl2138* 和 *sll1092* 表达产物的活性。IPTG 可诱导重组菌株 BL21 (DE3) (pJS343) 和 BL21 (DE3) (pJS349) 表达 Sll1092 蛋白,阿拉伯糖可诱导 BL21 (DE3) (pJS349) 表达 Ssl2138;含空载体 pJS298 的重组菌株 BL21 (DE3) (pJS298) 为阴性对照。如图 2-B 所示,所有重组菌株在不含诱导剂的 LB 平板上都能生长,对照菌株 BL21 (DE3) (pJS298) 在含不同诱导剂的平板上也能正常生长。但 BL21 (DE3) (pJS343) 在含 IPTG 的平板上的生长都受到抑制;BL21 (DE3) (pJS349) 在仅含 IPTG 的平板上受到抑制,在同时含 IPTG 和阿拉伯糖的平板上能正常生长。因此,无 Ssl2138 表达时,Sll1092 的表达可抑制大肠杆菌生长;Ssl2138 和 Sll1092 同时表达时,细菌能正常生长。表明 *sll1092* 具有抑制细胞生长作用,

现,*sll1092* 编码蛋白 Sll1092 含有 PIN 结构域 (PFAM: PF01850; N-terminal domain of the pilinbiogenesis protein PilT),*ssl2138* 编码未知功能的蛋白 Ssl2138 (Pfam:PF10047)。为证明 *ssl2138* 和 *sll1092* 构成二元操纵子,以分别与 *ssl2138* 和 *sll1092* 互补配对的上下游引物 RT-PCR 分析其转录。结果显示,扩增产物与预期结果一致 (271 bp) (图 1-B),表明 *ssl2138* 和 *sll1092* 共转录,并且在正常生长条件下具有转录活性。因此,遗传结构和编码产物序列的分析结果表明,*ssl2138* 和 *sll1092* 可能构成 *vapBC* 家族的 TA 系统。

为毒素蛋白;Ssl2138 具有拮抗 Sll1092 毒性的作用,为抗毒素蛋白。因此,*ssl2138* 和 *sll1092* 具有 TA 系统的典型特征。

2.3 Ssl2138 的表达可拯救 Sll1092 诱导的生长抑制

在一些已鉴定的 TA 系统中,终止毒素蛋白的表达可使细菌恢复生长活性^[12-13];但有些 TA 系统毒素诱导的生长抑制需要抗毒素蛋白才能使细胞恢复活性^[14-15]。为检测 Sll1092 表达对细胞活性的影响,计数 IPTG 诱导 Sll1092 表达后的 BL21 (DE3) (pJS349) 细胞在含不同诱导剂的平板上的菌落。如图 3 所示,IPTG 持续诱导 (Glu + IPTG → Glu + IPTG) 或 IPTG 诱导 2 h 后停止诱导 (Glu + IPTG → Glu),CFU 较未诱导的细胞 (0 h) 下降约 100 倍;但 IPTG 诱导 2 h 后以阿拉伯糖诱导时 (Glu + IPTG → Glu + Ara),CFU 与未诱导细胞 (0 h) 的 CFU 相似。结果提示,Sll1092 的表达使大部分细胞的生长活性受到抑制,仅小部分 (1/100) 细胞具有生长活性;停止诱导 Sll1092 不能恢复细胞活性,但随后表达 Ssl2138 可使细胞恢复生长。

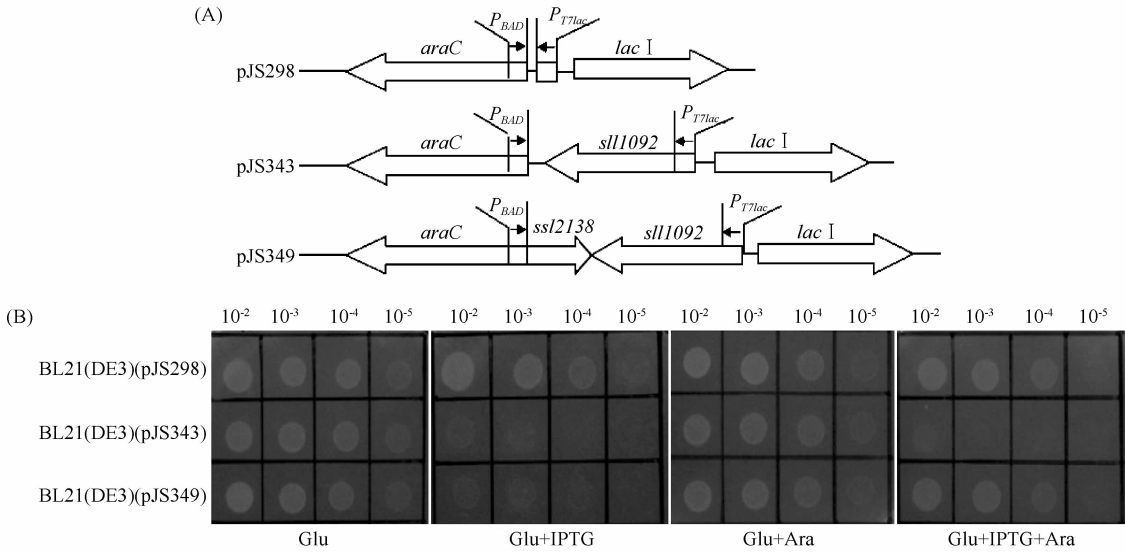


图 2. Ssl2138 和 Sll1092 表达对大肠杆菌生长的影响

Figure 2. Effect of Ssl2138 and/or Sll1092 on the growth of *E. coli*. A: Schematic representation of plasmids for selective expression of *ssl2138* and *sll1092* under control of P_{BAD} and P_{T7lac} , respectively. B: Growth of *E. coli* strains containing corresponding selection-expression plasmids on LB plates with glucose (Glu), glucose and IPTG (Glu + IPTG), glucose and arabinose (Glu + IPTG + Ara) as well as glucose, IPTG and arabinose (Glu + IPTG + Ara).

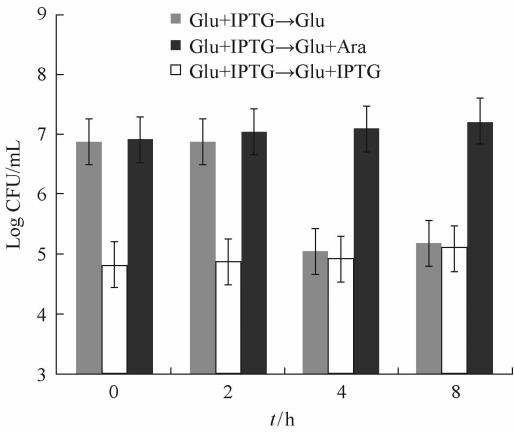


图 3. 终止 Sll1092 表达或随后诱导 Ssl2138 表达对大肠杆菌细胞活性的影响

Figure 3. Effect of the stop of Sll1092 production or the subsequent induction of Ssl2138 production on viability of *E. coli*. The IPTG-induced cells of BL21 (DE3) (pJS349) were transferred at the indicated time points to LB plates with or without the corresponding inducers. Error bars indicate the standard error of the means from three independent experiments.

2.4 Ssl2138 和 Sll1092 相互作用形成复合体

由于 *ssl2138* 和 *sll1092* 位于同一操纵子中 (图 1-B), 为证明其编码产物 Ssl2138 对 Sll1092 在细胞内是否相互作用形成蛋白复合体, 将其编码序列置于 pET28a 中 P_{T7} 启动子控制下, 构建诱导 His₆-

Ssl2138 和 Sll1092 共表达的重组菌株 BL21 (DE3) (pJS541)。如图 4-A, 分子量大小约为 9.7 和 14.8 kDa 的蛋白在被诱导后的细胞中表达, 与 His₆-Ssl2138 和 Sll1092 重组蛋白的分子量大小一致。在非变性条件下被诱导表达的重组蛋白被同时纯化, 而在变性条件下仅 9.7 kDa 的重组蛋白被纯化。质谱分析结果显示, 9.7 kDa 的蛋白有 2 个肽峰 (1654.868 和 1457.947 m/z), 14.8 kDa 有 3 个肽峰 (1333.732、1779.122 和 2958.670 m/z) 分别与理论推测的 His₆-Ssl2138 和 Sll1092 肽谱结果相同。表明 His₆-Ssl2138 和 Sll1092 相互作用形成蛋白复合体。

3 讨论

本研究证明了集胞藻 PCC6803 在正常生长条件下 *ssl2138* 和 *sll1092* 共转录; *sll1092* 过表达能抑制大杆菌生长, 但这种生长抑制作用可被同时或随后表达的 *ssl2138* 所中和; Ssl2138 与 Sll1092 可相互作用形成复合体拮抗 Sll1092 的生长抑制作用。这些结果表明 *ssl2138* 和 *sll1092* 形成的操纵子具有 TA 系统的一些重要特征。蛋白质序列分析结果显示, Sll1092 含有 *vapBC* 家族 TA 系统毒素蛋白保守

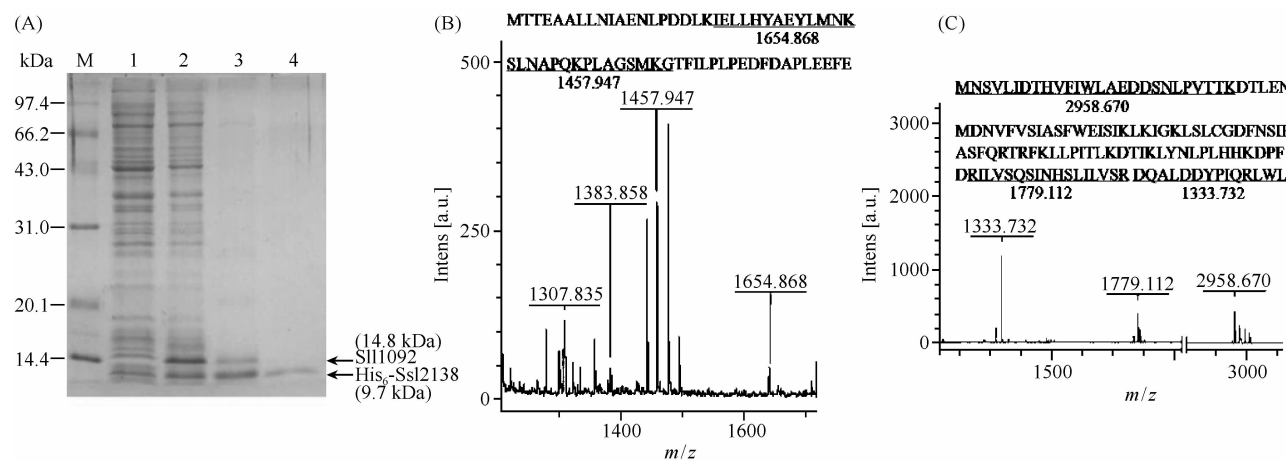


图 4. Ssl2138 和 Sll1092 之间的相互作用

Figure 4. Interaction between Ssl2138 and Sll1092 *in vivo*. A: SDS-PAGE analysis of co-expression and purification of His₆-Ssl2138 and Sll1092 from cells of BL21 (DE3) (pJS541). Lane1, crude extract of un-induced cells; lane 2, crude extract of induced cells; lanes 3 and 4, products purified from induced cells under native and denaturing conditions, respectively; M, protein molecular weight standard with sizes as indicated in kDa. (B) and (C) analyses of peptide mass fingerprinting of His₆-Ssl2138 and Sll1092, respectively, by mass spectrometry. Amino acid sequence and predicted *m/z* of both proteins are embedded in each panel.

的 PIN 结构域^[1]。编码含 PIN 结构域的毒素是鉴定 *vapBC* 家族 TA 系统的重要特征之一。因此, *ssl2138* 和 *sll1092* 构成具有活性的 *vapBC* 家族 TA 系统。已有的研究结果证明, 含 PIN 结构域的 TA 毒素蛋白具有核酸酶活性, 并通过降解 mRNA 抑制细胞生长^[16-18]。因此, Sll1092 的生长抑制作用可能是由于降解细胞中的 mRNA, 从而抑制蛋白质的合成。

本研究结果显示, 抗毒素 Ssl2138 可中和 Sll1092 的生长抑制作用, 表明 Sll1092 为可逆的生长抑制。已有研究结果表明, 营养缺乏、高温或低温、重金属离子等环境胁迫可诱导蓝藻细胞可逆生长抑制^[19]。Sll1092 的可逆的生长抑制作用类似于环境胁迫诱导的蓝藻生长表型。已鉴定的参与细菌适应性胁迫反应的 TA 系统, 在正常生长条件下可连续合成毒素蛋白和过量的抗毒素蛋白, 并形成无细胞毒性的 TA 复合体; 当细菌遭遇环境胁迫时, 抗毒素合成受到抑制并且被蛋白酶降解, 从复合体中释放毒素。激活的毒素抑制如 DNA 复制或蛋白质合成等重要细胞活动, 导致细胞生长抑制或部分细胞死亡^[1]。因此, 集胞藻 PCC 6803 染色体上的 *ssl2138-sll1092* TA 系统可能也通过调控生长使细胞适应不同的环境胁迫, 但其活性调控机制有待阐明。

生物信息学技术分析结果显示 TA 系统也广泛存在于蓝藻中^[2-3,20]。这些 TA 系统可能在蓝藻适

应性胁迫反应中, 通过调控蓝藻生长, 使细胞处休眠或缓慢生长状态, 从而降低细胞代谢速率和能量消耗, 增强细胞的抗逆性, 提高蓝藻的生态竞争优势。在适当的环境条件下, 蓝藻大量繁殖形成蓝藻水华。另一方面, 由于 TA 系统编码的毒素蛋白具有生长抑制作用, 并且其活性可在不同水平上进行调控。因此, 通过破坏毒素-抗毒素蛋白之间的相互作用或其他措施, 激活毒素生长抑制作用, 为开发有效控制蓝藻水华技术可供了新的思路。因此, 蓝藻中的 TA 系统值得深入研究。

参考文献

[1] Gerdes K, Christensen SK, Lobner-Olesen A. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(5): 371-382.

[2] Makarova K, Wolf Y, Koonin E. Comprehensive comparative-genomic analysis of Type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes. *Biology Direct*, 2009, 4(1): doi:10.1186/1745-6150-4-19.

[3] Leplae R, Geeraerts D, Hallez R, Guglielmini J, Dreze P, Van Melderen L. Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(13): 5513-5525.

[4] Van Melderen L. Toxin-antitoxin systems: why so many,

- what for? *Current Opinion in Microbiology*, 2010, 13(6): 781-785.
- [5] Yamaguchi Y, Park JH, Inouye M. Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea. *Annual Reviews of Genetics*, 2011, 45: 61-79.
- [6] Paerl HW. Growth and reproductive strategies of freshwater blue-green algae (cyanobacteria) // Sandgren C. Growth and Reproductive Strategies of Freshwater Phytoplankton. London: Cambridge University Press, Cambridge, 1988: 261-315.
- [7] Sambrook JFE, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd eds. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] Xu X, Wang Y, Li C. Constructjion of biphasic CAT promoter probe vector shuttling between *Anabaena* (blue-green algae) and *Escherichia coli*. *Academia Sinica*, 1993, 10: 203-209. (in Chinese)
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报, 1993, 10: 203-209.
- [9] Ning D, Ye S, Liu B, Chang J. The proteolytic activation of the *relNEs* (*ssr1114/slr0664*) toxin-antitoxin system by both proteases Lons and ClpP2s/Xs of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Current Microbiology*, 2011, 63 (5): 496-502.
- [10] Ning D, Xu X. *alr0117*, a two-component histidine kinase gene, is involved in heterocyst development in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Microbiology-SGM*, 2004, 150 (Pt 2): 447-453.
- [11] Ye S, Ning D. The interaction between chromosome-encoded toxin Slr0664 and antitoxin Slr1114 of the Cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50 (6): 743-748. (in Chinese)
叶森, 宁德刚. 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. 微生物学报, 2010, 50(6): 743-748.
- [12] Keren I, Shah D, Spoering A, Kaldalu N, Lewis K. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *Journal Bacteriology*, 2004, 186(24): 8172-8180.
- [13] Robson J, McKenzie JL, Cursons R, Cook GM, Arcus VL. The *vapBC* operon from *Mycobacterium smegmatis* is an autoregulated toxin-antitoxin module that controls growth via inhibition of translation. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 390 (3): 353-367.
- [14] Amitai S, Yassin Y, Engelberg-Kulka H. MazF-mediated cell death in *Escherichia coli*: a point of no return. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(24): 8295-8300.
- [15] Pedersen K, Christensen S, Gerdes K. Rapid induction and reversal of a bacteriostatic condition by controlled expression of toxins and antitoxins. *Molecular Microbiology*, 2002, 45(2): 501-510.
- [16] Arcus VL, Backbro K, Roos A, Daniel EL, Baker EN. Distant structural homology leads to the functional characterization of an archaeal PIN domain as an exonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279 (16): 16471-16478.
- [17] Daines DA, Wu MH, Yuan SY. VapC-1 of nontypeable *Haemophilus influenzae* is a ribonuclease. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(14): 5041-5048.
- [18] Ahidjo BA, Kuhnert D, McKenzie JL, Machowski EE, Gordhan BG, Arcus V, Abrahams GL, Mizrahi V. VapC Toxins from *Mycobacterium tuberculosis* are ribonucleases that differentially inhibit growth and are neutralized by cognate VapB antitoxins. *PLoS One*, 2011, 6 (6): e21738.
- [19] Tandeau de Marsac N, Houmard J. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiology Letter*, 1993, 104(2): 119-189.
- [20] Pandey DP, Gerdes K. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Reserch*, 2005, 33(3): 966-976.

A hypothetical gene pair, *ssl2138* and *sll1092*, constitutes a functional TA system on the chromosome of *Synechocystis* PCC 6803

Degang Ning^{*}, Weifei Zhao, Yaru Qian
School of the Environment, Jiangsu University, 212013 Zhenjiang, China

Abstract:[**Objective**] We characterized the hypothetical gene pair *ssl2138* and *sll1092* that constitute a *vapBC-family* toxin-antitoxin (TA) system on the chromosome of *Synechocystis* PCC 6803. [**Methods**] An RT-PCR analysis was conducted to confirm the co-transcription of this gene pair, a selection-expression system was constructed to demonstrate the effect of their encoded proteins on *E. coli* growth. To validate interaction between these two proteins, an affinity capture analysis was performed. [**Results**] *ssl2138* and *sll1092* were co-transcribed under normal growth conditions. Ectopic expression of *sll1092* inhibited the growth of *E. coli*, which could be overcome by simultaneous or subsequent expression of *ssl2138*. Both proteins Ssl2138 and Sll1092 *in vivo* formed a protein complex due to their specific interaction. [**Conclusion**] *ssl2138* and *sll1092* constitute a functional *vapBC-family* TA system of *Synechocystis* PCC 6803.

Keywords: toxin-antitoxin system, *vapBC*, protein complex, *Synechocystis* sp. PCC 6803

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30771176) and by the Special Foundation of Jiangsu University (128000072)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-511-88790955; E-mail: 306502@ujs.edu.cn

Received: 12 March 2013/Revised: 24 April 2013

系统发育树的构建方法

构建系统树是为了鉴定菌株的分类学地位,应该使用正确的方法构建。具体要求如下:

1. 将鉴定菌的 16S rRNA 序列递交 GenBank,用 Blast 软件搜索相似的 16S rRNA,然后一起构树。
2. 采用能反应分支长度的软件(如 NJ 法),并用 Bootstrap 值分析分支聚类的稳定性。
3. 用国际较为通用的一些建树方法,如 Neighbour – Joining 等,这样结果就更为可靠,更直观。
4. 请严格按照下列具体要求写作[参见:微生物学报,2004,44(2):143.]

① 系统树中:菌名应列出全称,且属和种名应斜体,名称后再加括号,其内含序列号。

② 图注(本刊的图注要求用英文写作):应标明“树”上所有的内容,包括:括号中的序号、分支点上的数字涵义、0.01 代表的意义。

③ 作图要求:要求达到印刷清晰,字体为“Time New Roman”,字号为“8p”。可以选用两种方式——(A)文件格式为“*.Tif”,分辨率为 600 线;(B)文件格式为“word”,画出树,输入文字。