

枯草杆菌 *ylyA* 基因的绿色荧光蛋白标记

霍乃蕊¹, Lewis P J^{2*}

(¹ 山西农业大学食品科学与工程学院, 太谷 030801)

(² School of Environmental and Life Sciences, University of Newcastle, Callaghan NSW 2308, Australia)

摘要:【目的】本研究对枯草杆菌 *ylyA* 基因进行荧光标记以便对其产物 YlyA 在菌体中的位置进行初步观察。【方法】以不同菌株基因组 DNA 为模板, 对 *ylyA* 基因进行 PCR 扩增和序列分析; 重新设计引物扩增全长的 *ylyA* 并将其克隆到载体 pSG1729 中, 形成 *gfpmut1-ylyA* 融合而构建重组载体 pNG426; 将 pNG426 转化枯草杆菌 168 菌株, 双交换使 *gfpmut1-ylyA* 插入染色体的 *amyE* 位点, 用碘染色法和菌落 PCR 对阳性转化子 BS363 进行鉴定。NA 固体培养基上生长的 BS363 经 0.5% 木糖诱导表达后, 利用表面荧光显微镜技术进行观察。【结果】通过对多个 PCR 产物的序列分析确定了 *ylyA* 基因的正确序列以及正确的翻译起始位点, 成功将重组载体 pNG426 转化枯草杆菌得到了 BS363 菌株; 荧光检测结果表明 GFP 标记的 YlyA 分布于菌体的外周, 在位置上靠近细胞膜并与之平行排列。【结论】生长缓慢的 BS363 菌体, 在 0.5% 木糖诱导下产生的荧光标记 YlyA 蛋白分布在细胞外周, 可能在膜生物学中发挥作用。

关键词: 枯草杆菌; YlyA 蛋白; 荧光标记

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 06-0829-05

枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 是产芽孢革兰氏阳性菌的典型代表, 对这种模式生物的转录因子进行研究有助于为新型药物设计提供新靶点, 从而为炭疽芽孢杆菌等这一类由革兰氏阳性芽孢杆菌引起的烈性传染病的预防与治疗提供新的途径。自枯草杆菌的全基因组序列于 1997 年在 *Nature* 上公开发表后^[1], 包括 *ylyA* 在内的许多新基因及其功能的研究也陆续展开。COG 数据库和 Smith-Waterman 算法理论上认定枯草杆菌 YlyA 在功能上是 DnaK 抑制蛋白; 在结构上 Pfam 蛋白数据库和 UniProtKB/Swiss-Prot 数据库预示了 YlyA 具有大肠杆菌 DksA 样的 C4 型锌指结构。各种 YlyA 结构信息和功能信息都预示 YlyA 极有可能是一种转录因子, 通过抑制 DnaK 而在转录调节和信号转导中发挥作用。但目前有关该基因的研究

尚属空白, 本文对该基因进行了克隆和测序分析, 并以 *gfp* 为报告基因, 对 YlyA 进行 N 末端标记, 对其亚细胞定位进行了初步观察研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基: 所有菌株和质粒都由实验室保存: 枯草杆菌 168 菌株 (基因型: *trpC2*), 采用 LB 液体培养基和 NA 固体培养基培养; 所有质粒克隆都在 *Escherichia coli* DH5 α (基因型: *F⁻ endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 Δ (lacZYA-argF)U169 80 dlacZAM15*) 中进行; pSG1729 质粒载体 (基因型: *bla amyE3 spc P_{xyl}-gfpmut1 amyE5*) 由 Peter J Lewis 和 Adele L Marston 于 1999 年构建^[2]。

基金项目: 山西农业大学青年基金(200101); 澳大利亚研究委员会(ARC)基金(DP0664370); 澳大利亚国立卫生与医学研究委员会(NHMRC)基金(455597, 455646); 澳大利亚教育、科学与培训部(DEST)基金(ISL CG110055)

*通讯作者: Tel: +612-4921-5701; E-mail: Peter.Lewis@newcastle.edu.au

作者简介: 霍乃蕊(1972-), 女, 山西平遥人, 副教授, 博士研究生, 主要从事微生物工程研究。E-mail: tgnrhuo@163.com

收稿日期: 2007-09-30; 修回日期: 2008-03-12

1.1.2 主要试剂：工具酶和各种抗生素 (Fermentas 或 Sigma 公司); 100bpDNA 标准(MBI Fermentas); QIA quick Gel Extraction Kit (QIA Gene 公司); Taq 酶 (TransGen 公司)。

1.2 *ylyA* 基因序列分析

根据法国 Pasteur 研究所 Subtlist 数据库提供的 *ylyA* 基因序列设计并合成 (sigma 公司) 上游引物 GACATATGGGCTTTAGATCATCATTC 和下游引物 GGCAGGGTACCTTATTCATACAGTGC; 分别以枯草杆菌 BS168、trpC2、BS19、IQB350 菌株的基因组 DNA 为模板, 采用 20 μ L 反应体系和如下反应条件 95 2 min, 95 30 s, 50 30 s, 72 45 s。对 *ylyA* 基因进行 PCR, 然后对扩增产物加以测序分析 (AGRF); 再利用 NCBI 的 BLAST (bl2seq) 软件对上述扩增序列和 Subtlist 数据库提供的 *ylyA* 序列进行比对分析; 以实测序列为中心, 在其上下游分别增加 200 个碱基, 利用 BioEdit sequence alignment Editor 软件确定正确的 ORF。

1.3 重组质粒 pNG426 的构建

根据 *ylyA* 正确序列重新设计引物 Fwd: GAGTTGCTCGAGATGAATGATCAACTGACC 和 Rvs: GGACAGAAGCTTTTATTCATACAGTGC, 分别引入 *Xho* 和 *Hind* 酶切位点 (下划线处)。以 BS168 菌株的基因组 DNA 为模板, 采用 1.1 中的扩增条件进行高保真扩增 (使用 Taq 和 Pfu), 纯化后的 PCR 产物经测序分析正确后, 与载体 pSG1729 分别用克隆酶消化后 T4DNA 连接酶 4 $^{\circ}$ C 过夜连接, 次日转化 DH5 α 感受态细胞, 涂布于含氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 平板上过夜培养, 利用 *Eco*R I 和 *Kpn* I 双酶切鉴定阳性克隆, 并将其命名为 pNG426。

1.4 pNG426 转化枯草芽孢杆菌

用碱裂解法制备 pNG426 质粒, 按照实验室标准操作程序^[3]对枯草杆菌的感受态细胞进行质粒转化, 将菌体涂布在含有壮观霉素 (Spec, 终浓度为 50 μ g/mL) 和木糖 (Xylose, 终浓度为 0.5%) 的 NA 平板上, 30 过夜培养, 选取 42 个菌落在加有淀粉 (1%, W/V) 的 NA 培养基上过夜培养并用碘染色法筛选和菌落 PCR 对阳性转化子加以鉴定并将其命名为 BS363。

1.5 荧光检测与图像获得

将生长在含有 0.5% (W/V) 木糖的 NA 平板上的 BS363 菌体悬于液体培养基中, 吸取 5 μ L 菌体细胞固定在 1.2% 的琼脂糖载玻片上^[3]并置于 Zeiss Ax-

ioskop 2 荧光显微镜下, 使用 41018 滤镜, 紫外曝光 3-10 s 进行 GFPmut1 荧光检测; 所有图片都使用 Photometrics Quantix 1401E cooled charge-coupled device (CCD) 相机获得; 图片分析使用 MetaMorph 软件 (version 4.6; Universal Imaging Corporation)。

2 结果

2.1 *ylyA* 基因的克隆与 ORF 的确定

在上述 PCR 条件下, 以枯草杆菌不同菌株基因组 DNA 为模板均扩增到了与预期大小一致的目的片段, 这些片段的测序分析结果一致。序列比对结果表明: 原数据库序列与实测序列有 6 处不同 (图 1 阴影

```

Q 1 ATGGGCTTTAGATCATCATTCACAGGCAACAA 32
S 1 ATGGGCTTTAGATCATCATTCACAGGCAACAA 32
Q 33 TAAAGATAATAACGTTAAGAGCAGGAGTTGTG 64
S 33 TAAAGATACT-ACGTTAAGAGCAGGAGTTGT- 62
Q 65 GAAGAATGAATGATCAACTGACCGCAATTTAT 96
S 63 GAAGAATGAATGATCAACTGACCGCAATTTAT 94
Q 97 ACGGAA-TTCTTCTGGATGAAAGAAGAATTAC 127
S 95 ACGGAACTTCTTCT-GATGAAAGAAGAATTAC 125
Q 128 AGTCGAATTATTATTGAGTATTCTTGCTTTCAG 159
S 126 AGTCGAGATTATTTGAGTATTCTTGCTTTCAG 157
Q 160 GTTTCTACAAGCCCAGCAAGCAGCAATCAATCA 191
S 158 GTTTCTACAAGCCCAGCAAGCAGCAATCAATCA 189
Q 192 AAAACAAAAAGCAACTCTGATCTATCATATTA 223
S 190 AAAACAAAAAGCAACTCTGATCTATCATATTA 221
Q 224 AAGAAGAACTTCAAGACGTTCTCCTTGCAATTG 255
S 222 AAGAAGAACTTCAAGACGTTCTCCTTGCAATTG 253
Q 256 TCCAAAATCGAAAACGGCACATTTCGGATACTG 287
S 254 TCCAAAATCGAAAACGGCACATTTCGGATACTG 285
Q 288 TGAAGAACTGGGGCCCCCATTCTCTTGCAA 319
S 286 TGAAGAACTGGGGCCCCCATTCTCTTGCAA 317
Q 320 AGCTGGCAGTGCTGCCGACGGCCCGAACAGCA 351
S 318 AGCTGGCAGTGCTGCCGACGGCCCGAACAGCA 349
Q 352 AACGATTTTCTTTATTCTGTCCAATTTGAGAA 383
S 350 AACGATTTTCTTTATTCTGTCCAATTTGAGAA 381
Q 384 AAAACGCTTCCGATATGGAATCAACGGATA 415
S 379 AAAACGCTTCCGATATGGAATCAACGGATA 413
Q 416 TCGAATATGGTCAGGCACTGTATGAATAA 444
S 414 TCGAATATGGTCAGGCACTGTATGAATAA 442
  
```

图 1 *ylyA* 实测序列与数据库序列的比对结果

Fig. 1 Sequence blast result between database *ylyA*(Q) and sequenced *ylyA*(S).

部分), 两处是碱基置换 (A-C; A-G), 四处是 gaps, 所有差异都集中在序列的 5' 端部分。如果以数据库原 *ylmA* 序列的起始密码子开始阅读, 实测序列在第 55 个密码子处便出现了终止密码子 (TGA), 随后又在多处出现。重新确定的 ORF (图 1 下划线部分) 为 375 bp, 所编码的 YlyA 含有 124 个氨基酸, 新的 ORF 实际上仍位于原 *ylmA* 中, 使用了原 *ylmA* 下游的另一起始密码子, 但仍然使用同一个终止密码子。

2.2 重组质粒 pNG426 的构建

以 BS168 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增出与预期大小一致 (约 400bp) 的 *ylmA* 基因全长序列 (图 2), 序列分析表明此序列与上述实测序列的一致性为 100%。

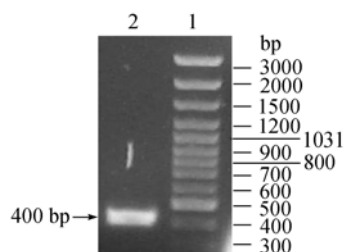


图 2 *ylmA* 全长序列的 PCR 产物电泳结果

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of full-length amplified *ylmA*. 1. 100bp DNA ladder; 2. amplified full-length *ylmA*.

将 *ylmA* 克隆到载体 pSG1729 中, 图 3 为 *EcoRI* 和 *KpnI* 酶切鉴定结果: *KpnI* 位于 *gfpmut1* 上游的多克隆位点区, 而 *EcoRI* 位于 *gfpmut1* 下游, 作为阴性对照的 pSG1729 酶切产生的小片段为 *gfp* 序列, 约 817 bp (lane 11), 而 pNG426 酶切后得到的小片段约 1192 bp, 为插入片段 *ylmA* 与 *gfp* 长度的总和, 比阴性对照正好多一个 *ylmA* 插入序列。

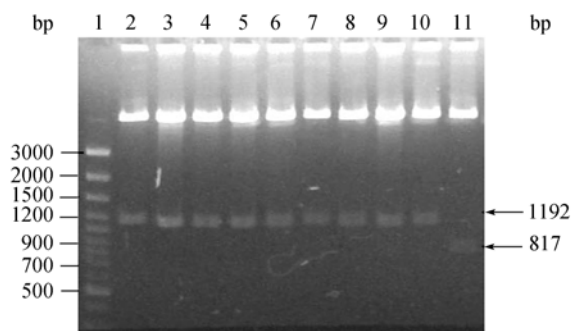


图 3 pNG426 的 *EcoRI* 和 *KpnI* 双酶切鉴定结果

Fig. 3 Identification of pNG426 by *EcoRI* and *KpnI* double digestion. 1. 100 bp DNA ladder; 2-10. *EcoRI* and *KpnI* cut plasmid prepared from colony 1-9; 11. *EcoRI* and *KpnI* cut pSG1729.

2.3 BS363 的筛选和鉴定

过夜培养后, 在 NA+Spec+Xylose 平板上观察到了约 200 个菌落, 选取 42 个菌落用牙签分别将其影印到 NA+starch (1%, W/V) 和 NA+Xylose 平板的相对应位置上, 30℃ 过夜培养后, 将 NA+starch 平板用结晶碘染色, 阳性转化子具有淀粉酶缺陷表型^[2], 如图 4 所示, 根据平板上菌落及其周围培养基染色情况判断, 有 3 个菌落产生了淀粉酶并在其周围出现了透明圈, 其余的菌落都表现为淀粉酶缺陷而初步判定为阳性转化子, 选取其中的 4 个用菌落 PCR 方法进一步确认。由于菌落 PCR 使用的上游引物为 *gfp* 的上游引物, 下游引物为 *ylmA* 下游引物, 所以 PCR 产物应该是 *gfp* 下游序列和 *ylmA* 全长序列的总和, 约 500 bp。图 5 结果表明: 所选取的 4 个菌落都得到了预期大小的片段, 而以枯草杆菌染色体 DNA 和 pSG1729 质粒为模板的阴性对照没有扩增到任何条带, 所以 4 个菌落都是阳性转化子 BS363。

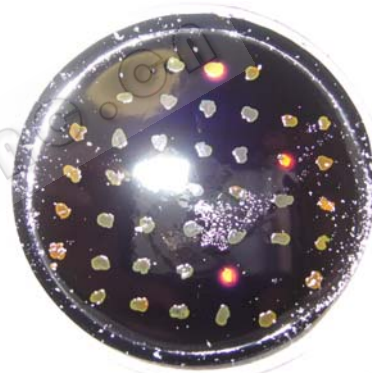


图 4 BS363 碘染色鉴定结果

Fig. 4 Identification of BS363 by Iodine staining.

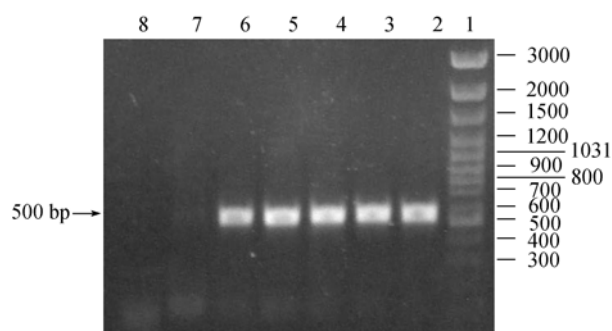


图 5 菌落 PCR 结果

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis of colony PCR products. 1. 100bp DNA ladder; 2-6. colony PCR from 4 selected amylase phenotype deficient colonies; 7. PCR products using BS168 chromosome DNA and pSG1729 as template respectively.

2.4 融合蛋白的荧光显微镜观察结果

经紫外光激发, 荧光显微镜下只能检测到产生

GFP 的菌体 (图 6-B), 未经木糖诱导的 BS363 菌体经紫外线激发, 荧光显微镜下检测不到任何荧光信号 (图 6-A), 说明绿色荧光蛋白 *gfpmut1* 基因已经整合到枯草杆菌基因组中并与 *ylyA* 基因进行了融合。进一步观察发现荧光标记的 YlyA 主要分布在 BS363 菌体的外周而勾勒出枯草杆菌的菌体轮廓。

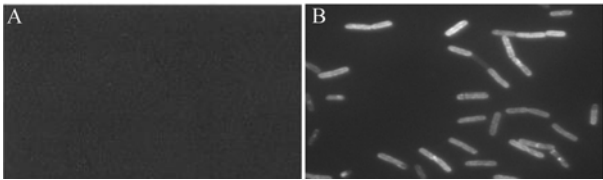


图 6 木糖诱导 BS363 产生的 GFP-YlyA 的荧光显微镜观察
Fig. 6 Fluorescence microscopy of xylose-induced GFP-YlyA production in *B. subtilis*: Representative views of BS368 without and with xylose induction (A and B, respectively).

3 讨论

pSG1729 是一种通过双交换 (double crossover) 将 *gfp* 标记的基因整合到枯草杆菌基因组 *amyE* 位点的载体, 插入导致 *amyE* 失活, 而使枯草杆菌具有淀粉酶缺陷表型。在构建 pNG426 时需要克隆 *ylyA* 的全长编码序列并且只有将其与 *gfp* 置于同一个阅读框内才能产生功能性的融合蛋白, 双交换将 GFP-YlyA 融合蛋白的表达置于了可诱导启动子 *Pxyl* 之下, 并且 *Pxyl* 是一个可以用木糖浓度加以调控的启动子, 因而可通过改变木糖浓度而使某些 GFP 融合蛋白的表达达到最适水平, 这一点对于某些控制特定细胞功能的基因的研究是非常重要的。本研究当用浓度为 0.5% 的木糖诱导时, 绝大多数 BS363 菌体都发出了较强的荧光信号。

pSG1729 所使用的 GFPmut1^[4] 是一个荧光光谱大幅红移的突变体 (red-shifted mutants), 所以可以被 FITC 激发光激发, 并且发出比野生型 GFP 更亮的荧光^[5]。GFPmut1 是目前获得的最亮的 GFP^[6], 除激发光波长改变之外, 许多这类突变体的性能也得到了改良: 例如能够在较高的温度下生长, 溶解度增加, 荧光素形成速度加快^[5-7], 因而菌体培养几小时后就能检测得到 GFP 的荧光信号了。

Johnson 等对两种已知的膜蛋白 ATP 合成酶 (AtpA) 和琥珀酸脱氢酶 (SdhA) 进行荧光标记并对其在膜上的动态分布进行了研究, 荧光显微镜下这两种蛋白的分布与本研究中的 YlyA 相同, 位于菌体的外周 (around the cell periphery)^[8]; Rudner 等所研究的膜蛋白的亚细胞定位也分布在菌体的外周^[9], 也与 YlyA 相同, 所以我们可以

得出初步结论: 在本实验条件下, 生长在 NA 固体培养基上的 BS363 菌体, 在 0.5% 木糖诱导下产生的荧光标记 YlyA 蛋白在位置上与细胞膜并置排列, 或者就是一种膜蛋白, 可能在膜生物学中发挥作用。

核糖体 RNA 基因 (*rrns*) 的数目及其在染色体上的位置与生物的生长速率直接相关^[10-12], 枯草杆菌染色体中有 10 个 rRNA 操纵子^[1]。当菌体生长速度很快时, RNAP 的位点实际上就代表了 rRNA 的合成位点, 因为随着菌体生长速率的增加, 细胞对核糖体的需求量也随之增加^[13], 进而导致了 rRNA 各操纵子的活跃转录, 此时细胞内近 80% 的 RNA 是 rRNA^[14]。Lewis 等对 RNA 聚合酶 (RNAP) 亚基和核糖体亚基进行双重标记, 发现原核生物尽管没有核膜, 转录和翻译像真核生物一样分别在不同的功能区域进行, 因而空间上也是相隔的 (spatial separation); 他们还进一步指出了 RNAP 在枯草杆菌中的亚细胞定位: RNAP 一般情况下主要位于拟核的中心区域, 在菌体快速生长时, RNAP 就会聚集到亚拟核区域 (subnucleoid region) 定位于细胞两极 (oriented toward the cell poles) 而形成转录位点 (transcription foci)^[15]。他们的研究结果还进一步揭示: 枯草杆菌的转录位点中含有 7 个 *rrn* 操纵子^[16]。一旦开始诱导产紧张型应答 (stringent response), 这些转录位点就会迅速消失, 表明它们确实代表了枯草杆菌的转录位点。

如果 YlyA 的确是一种转录因子, 那么 YlyA 就可借助其自身的锌指结构在转录起始的原点附近与 RNAP 和 *rrn* 启动子同时结合, 调节靶基因的表达; 如果正如各种数据库预示的那样 YlyA 具有 DksA 样的作用, 那么 YlyA 可使 *rrn* 的转录下调; 本研究由于 BS363 菌体生长在固体培养基上生长速度较慢, 因而没有观察到转录位点。YlyA 能否在快速生长的 BS363 菌体中形成转录位点, 还需要深入研究。

参 考 文 献

- [1] Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 1997, 390(6657): 237-238.
- [2] Lewis PJ, Adele L, Marston. GFP vectors for controlled expression and dual labeling of protein fusions in *Bacillus subtilis*. *Gene*, 1999, 227(1): 101-109.
- [3] Anagnostopoulos C, Spizizen. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 1961, 81(5): 741-746.
- [4] Cormack BP, Valdivia, RH, Falkow S. FACS-optimized mu-

- tants of the green fluorescent protein(GFP). *Gene*, 1996, 173 (1 Spec No): 33–38.
- [5] Heim R, Cubitt AB, Tsien RY. Improved green fluorescence. *Nature*, 1995, 373(6516): 663–664.
- [6] Herman B. Fluorescence Microscopy. 2nd ed. Oxford, UK BIOS, 1998.
- [7] Siemering KR, Golbik R, Haseloff J. Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Current Biology*, 1996, 6(12): 1653–1663.
- [8] Johnson AS, Horck S, Lewis PJ. Dynamic localization of membrane proteins in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 2004, 150(Pt 9): 2815–2824.
- [9] David Z, Rudner, Qi Pan, *et al.* Evidence that subcellular localization of a bacterial membrane protein is achieved by diffusion and capture. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, 99(13): 8701–8706.
- [10] Aiyar SET, Gaal RL, Gourse. rRNA promoter activity in the fast-growing bacterium *Vibrio natriegens*. *J Bacteriol*, 2002, 184(5): 1349–1358.
- [11] Cole ST, Brosch R, Parkhill J, *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 1998, 393 (6685): 537–544.
- [12] Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, *et al.* The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 1997, 277 (5331): 1453–1474.
- [13] Gourse RLT, Gaal MS, Bartlett JA, *et al.* rRNA transcription and growth rate-dependent regulation of ribosome synthesis in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol*, 1996, 50: 645–677.
- [14] Cashel MDR, Gentry VJ, Hernandez, *et al.* The stringent response. In: F. C. Neidhardt *et al.* *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. 2nd ed. Washington, D.C: American Society for Microbiology, 1996.
- [15] Lewis PJ, Shail D, Thaker, *et al.* Compartmentalization of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *The EMBO Journal*, 2000, 19(4): 710–718.
- [16] Karen M, Davies, Lewis PJ. Localization of rRNA Synthesis in *Bacillus subtilis*: Characterization of Loci Involved in Transcription Focus Formation. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(7): 2346–2353.

Green fluorescent protein labeling of *ylyA* gene in *Bacillus subtilis*

Nairui Huo¹, Peter J. Lewis^{2*}

(¹Shanxi Agricultural University, College of Food Science and Engineering, Taigu 030801, China)

(²School of Environmental and Life Sciences, University of Newcastle, Callaghan NSW 2308, Australia)

Abstract: [Objective] In this study we labeled the *ylyA* gene of *Bacillus subtilis* with green fluorescent protein (GFP) to investigate the subcellular localization of YlyA protein. **[Methods]** Chromosomal DNA was prepared from different strains of *Bacillus subtilis*, *ylyA* amplified by PCR and the products sequenced. Full-length *ylyA* was then amplified and inserted into the GFP plasmid vector pSG1729, to give pNG426 containing a *gfpmut1-ylyA* fusion. Finally, *Bacillus subtilis* 168 was transformed with pNG426, resulting in insertion of the *gfpmut1-ylyA* fusion into the chromosome at the *amyE* locus. Double crossover integrants (subsequently named BS363) were identified by their inability to hydrolyse starch and verified by colony-PCR. Following induction of *gfpmut1-ylyA* expression with 0.5% xylose, localization of the fusion protein was determined by epifluorescence microscopy. **[Results]** The correct sequence and translation start site of *ylyA* was identified from sequence analysis of the several amplified PCR products permitting construction of a *gfpmut1-ylyA* fusion. Microscopic observation of strain BS363 showed that the GFP labeled YlyA was distributed around the cell periphery, closely juxtaposed with the cytoplasmic membrane. **[Conclusion]** GFP labeled YlyA produced by BS363 cultured on the nutrient agar solid medium distributed around the cell periphery. This suggests it may play a role in membrane biology.

Keywords: *Bacillus subtilis*; YlyA protein; fluorescent labeling

Supported by the Shanxi Agricultural University Youth Foundation(200101), the Australian Research Council(DP0664370), the National Health and Medical Research Council(455597, 455646) and the Department of Education and Science Training(ISL CG110055)

*Corresponding author. Tel: +612-4921-5701; E-mail: Peter.Lewis@newcastle.edu.au

Received: 30 September 2007/ Revised: 12 March 2008