

一株动性球菌 ZOYM 的初步鉴定及其内源性质粒 pPCZ1 和 pPCZ2 的分析

朱颖旻¹ 许铭翱¹ 刘庆华² 夏海洋¹ 刘双江³ 覃重军^{1*}

(1. 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所合成生物学重点实验室 上海 200032)

(2. 复旦大学附属中山医院 上海 200032)

(3. 中国科学院微生物研究所 北京 100101)

摘要: 从来自中国深海的样品中分离到一株菌株 ZOYM, PCR 获得其 16S rRNA 基因序列, 经比对, 与已发表的动性球菌属(*Planococcus*)的不同种高度相似。提取质粒 DNA, 在琼脂糖凝胶上检测到多条 DNA 带, 对其中 2 个小的环型质粒 pPCZ1 和 pPCZ2 进行了克隆和测序。pPCZ1 和 pPCZ2 的全长分别为 4738 bp 和 7935 bp, 编码 3 个和 8 个蛋白。预测的 pPCZ1 和 pPCZ2 的复制蛋白 Rep 分别与链球菌(*Staphylococcus*)质粒 pSCFS1 和芽孢杆菌(*Bacillus*)质粒 pBM19 的 Rep 有很高的相似性。此外, pPCZ1 和 pPCZ2 的复制蛋白 Rep 之间也有一定的同源性。质粒 pPCZ1 和 pPCZ2 上均未找到滚环复制质粒保守的 *dso* 和 *sso* 序列, 而在复制基因的上游均发现多个重复序列和富含 AT 的序列, 因此, 推测它们可能不是以滚环方式进行复制, 而是 theta 方式。这是首次报道动性球菌属两个质粒的完整序列。

关键词: 动性球菌, 质粒, 核苷酸序列, 复制

Identification of a New *Planococcus* Strain and Analysis of Its Indigenous Plasmids pPCZ1 and pPCZ2

ZHU Ying-Min¹ XU Ming-Xuan¹ LIU Qing-Hua² XIA Hai-Yang¹
LIU Shuang-Jiang³ QIN Zhong-Jun^{1*}

(1. Key Laboratory of Synthetic Biology, Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Science, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

(2. Fudan University Affiliated Zhongshan Hospital, Shanghai 200032, China)

(3. Institute of Microbiology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: A new strain ZOYM was isolated from deep ocean of China and its 16S rRNA gene sequence showed high homology with that of the other published *Planococcus* species. Plasmids DNA were isolated and multiple bands were detected on an agarose gel, and two small of them, designated pPCZ1 and pPCZ2, were further cloned and sequenced. The complete nucleotide sequences of pPCZ1 and pPCZ2 consisted of 4738 and 7975 base pairs, encoding 3 and 8 proteins, respectively. The predicted replication proteins (Reps)

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30870067, 30770045); 国家 863 计划项目(No. 2007AA021503); 中国科学院知识创新工程项目(No. KSCX2-YW-G-014)

* 通讯作者: Tel/Fax: 86-21-54924171; 信箱: qin@sibs.ac.cn

收稿日期: 2008-12-25; 接受日期: 2009-03-20

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

of pPCZ1 and pPCZ2 showed high homology with that of *Staphylococcus* plasmid pSCFS1 and *Bacillus* plasmid pBM19, respectively. In addition, the Repts of pPCZ1 and pPCZ2 displayed homology with each other. No conserved *dso* and *ssu* of the rolling-circle plasmids were found on pPCZ1 and pPCZ2, while multiple direct-repeats and AT-rich sequences were found on upstream of the *rep* genes, suggesting that replication of the two plasmids might be in a mechanism of theta-type. This is first report on the complete nucleotide sequences of *Planococcus* plasmids pPCZ1 and pPCZ2.

Keywords: *Planococcus*, Plasmids, Nucleotide sequence, Replication

动性球菌属于革兰氏阳性细菌, 广泛分布于海洋或者沙滩。自 1894 年 Migula 发现动性球菌 (*Planococcus*) 以来^[1], 相继有十余个种被鉴定到这个属中。最近有两个动性球菌属的种被重新归类到动性微菌属 (*Planomicrobium*) 中^[2]。

动性球菌属中质粒的报道仅 Labuzek 等在 2003 年发现了一个 5 kb 的质粒^[3], 尚未见有报道该质粒的序列测定。我们从海洋样品中分离得到一株细菌, 经过 16S rRNA 基因测序和与已发表的动性球菌属的种进行比对, 初步认为这是一株新的动性球菌, 命名为 *Planococcus* sp. ZOYM。进一步发现该菌中存在多个内源的质粒, 我们对其中的两个质粒 pPCZ1 和 pPCZ2 进行了克隆、测序和分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 动性球菌 ZOYM 从中国深海样品中分离到, pPCZ1 和 pPCZ2 为该菌中的两个内源质粒。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 α 和质粒 pSP72 作为克隆的宿主和载体。

1.1.2 主要试剂: 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购于 MBI 公司。Taq DNA 聚合酶和溶菌酶为 Sangon 产品, PCR 产物纯化试剂盒为上海华舜生物工程有限公司产品。

1.1.3 培养基: 培养动性球菌 ZOYM 和大肠杆菌的培养基为 LB。

1.2 培养和基本的遗传操作

大肠杆菌培养、转化、质粒提取和 PCR 等基本操作见文献[4]。动性球菌于 30 $^{\circ}$ C 培养, 质粒 DNA 的提取参照文献[4]。

1.3 16S rRNA 基因测序和比对

刮取 LB 平板上生长的单菌落 3 个, 扩大培养并提取总 DNA。以 10 ng 基因组 DNA 为模板, 利用一对引物 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3') 加入 dNTPs

和 Taq 聚合酶进行 PCR 扩增, 条件为: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物用试剂盒纯化后进行测序 (上海基康公司)。序列比对的软件为 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)。

1.4 质粒 DNA 的克隆、序列测定和分析

全长的 pPCZ1 克隆到大肠杆菌质粒 pSP72 上, 利用双向引物延伸进行测序 (上海基康公司)。从凝胶中回收约 5 μ g 质粒 PCZ2 的 DNA, 利用“鸟枪法”进行测序 (国家人类基因组南方研究中心)。DNA 开放阅读框的分析软件为“CPUlot” (www.nocardia.nih.gov/jp/cuplot/), 序列比对的软件为 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), DNA 二级结构的预测采用软件“DNA folder” (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/dna-form1.cgi>), pPCZ1 和 pPCZ2 的核苷酸全序列及其注解已提交 GenBank 数据库, 登录号分别为 DQ438984 和 DQ438985。

2 结果和讨论

2.1 动性球菌属的一个新的菌株 ZOYM

菌株 ZOYM 可以在 LB 培养基上生长, 产淡黄色色素, 菌落表面光滑, 经革兰氏染色为阳性。提取 DNA, 进行了 16S rRNA 基因序列的扩增和测序。在 GenBank 数据库比对显示, 与动性球菌属的所有菌株有很高的相似性, 如与 *Planococcus* sp. Tibet-IX21 和 *Planococcus* sp. Smarlab 3302355 的相似性分别为 99.23% 和 99.65%, 初步表明 ZOYM 是动性球菌属的一个新的菌株。如果将菌株 ZOYM 归类到种, 尚需更多的分类鉴定。

2.2 质粒 pPCZ1 的克隆、测序和分析

利用碱变性方法从菌株 ZOYM 提取环型质粒 DNA, 进行琼脂糖凝胶电泳。图 1 显示, 凝胶中可见 4 条清晰的 DNA 带, 表明存在多个内源质粒。我们对其中的两个较小的质粒进行了研究。

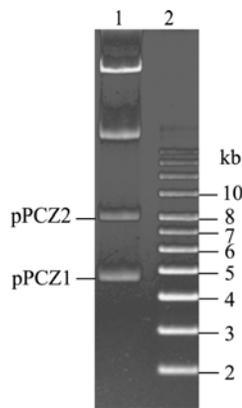


图1 从菌株 ZOYM 中检测质粒 DNA

Fig. 1 Detection of plasmids in *Planococcus* sp. ZOYM

Note: 1: Strain ZOYM; 2: CCC marker. Plasmids DNA of strain ZOYM was isolated by alkaline procedure^[4] and electrophoresed in a 0.9% agarose gel at 2 V/cm for 5 h. Two plasmids DNA bands were indicated. Supercoiled DNA ladder (Invitrogen Co.) was used as size marker.

从凝胶中回收约 5 kb 的质粒(命名为 pPCZ1), 用 *Bam*H I、*Bgl* II、*Eco*R I、*Eco*R V、*Hind* III 和 *Xho* I 进行酶切, 显示单一的 *Bgl* II 位点。从凝胶中回收 *Bgl* II 酶切的质粒 DNA, 克隆到大肠杆菌质粒 pSP72 中。利用双向引物延伸进行测序, 结果表明, pPCZ1 的 DNA 全长为 4738 bp, G+C 含量为 37.15%。

表 1 显示, pPCZ1 上携带 3 个基因, 其中 *PCZ1.1* 基因(命名为 *rep*)编码的蛋白与链球菌(*Staphylococcus*)质粒 pSCFS1 的复制蛋白有很高的相似性, 与已知

为 theta 复制机制的假单胞菌(*Pseudomonas*)质粒 pPS10 的 Rep 也有显著的相似性 [预期值 2×10^{-4} , 相似性 30/126 (23%)]. PCZ1.3 蛋白与质粒 pSCFS1 编码的重组酶(Recombinase)很相似。链球菌质粒 pSCFS1 的大小为 17108 bp (GenBank 登录号为 NC_005076), 编码 14 个蛋白。pPCZ1 仅为 4738 bp, 是目前在动性球菌属中发现的最小的质粒。

2.3 质粒 pPCZ2 的克隆、测序和分析

从凝胶中回收约 8 kb 的质粒(命名为 pPCZ2), 用 *Bam*H I、*Bgl* II、*Eco*R I、*Eco*R V、*Hind* III 和 *Xho* I 进行酶切, 也显示单一的 *Bgl* II 位点。经过“鸟枪法”测序, pPCZ2 大小为 7935 bp, G + C 含量为 36.64%。

表 2 显示, pPCZ2 编码 8 个基因, 其中 *PCZ2.1* 基因(命名为 *rep*)编码的蛋白与芽孢杆菌(*Bacillus*)质粒 pBM19 的复制蛋白有很高相似性, 与质粒 pPS10 的 Rep 也有较好的相似性 (预期值 8×10^{-11} , 相似性 62/217 [28%])。PCZ1.3 蛋白与质粒 pSCFS1 编码的重组酶很相似。芽孢杆菌质粒 pBM19 的大小为 19167 bp (GenBank 登录号为 NC_005328), 编码 15 个蛋白, 除了 Rep 蛋白和整合酶(Integrase)外, 其余蛋白与 pPCZ2 的无显著的相似性。

值得注意的是, pPCZ1 和 pPCZ2 的复制蛋白 Rep 之间也有一定同源性(预期值 4×10^{-9} , 相似性 60/244 [24%]), 暗示这 2 个质粒有一定的衍生关系。

表 1 预测质粒 pPCZ1 可能的蛋白编码区
Table 1 Potential open reading frames in plasmid pPCZ1

阅读框 ORFs	位置 Position (bp)	大小 Size (aa)	评价价值 E value	相似性和功能 Similarity and function
PCZ1.1	673~1689	338	2.87×10^{-130}	Replication initiator protein (<i>Staphylococcus sciuri</i>)
PCZ1.2	2145~2834	229	/	No similarity
PCZ1.3	3350~4738	462	2.57×10^{-58}	Integrase or recombinase (<i>Staphylococcus sciuri</i>)

表 2 预测质粒 pPCZ2 可能的蛋白编码区
Table 2 Potential open reading frames in plasmid pPCZ2

阅读框 ORFs	位置 Position (bp)	大小 Size (aa)	评价价值 E value	相似性和功能 Similarity and function
PCZ2.1	560~1765	391	1×10^{-36}	Replication initiator protein (<i>Bacillus thuringiensis</i>)
PCZ2.2	2388~2588	66	6×10^{-6}	Unknown (<i>Bacillus</i> sp. NRRL B-14911)
PCZ2.3	3215~3769	184	3×10^{-72}	Unknown (<i>Staphylococcus sciuri</i>)
PCZ2.4	5011~4343	222	/	No similarity
PCZ2.5	5285~5611	108	/	No similarity
PCZ2.6	6267~5818	149	4×10^{-5}	Unknown (<i>Bacillus</i> sp. NRRL B-14911)
PCZ2.7	6917~7360	147	/	No similarity
PCZ2.8	7475~7975	166	1×10^{-61}	Integrase or recombinase (<i>Staphylococcus sciuri</i>)

2.4 质粒 pPCZ1 和 pPCZ2 可能以 theta 方式进行 DNA 复制

细菌质粒一般以滚环(Rolling circle replication, RCR)或 theta 方式进行 DNA 的复制。滚环复制的质粒要求有复制蛋白 Rep、双链起点(Double strand origin, *dso*)和单链起点(Single strand origin, *sso*)^[5]。但是, 在 pPCZ1 和 pPCZ2 上均找不到保守的 *dso* 和 *sso*, 其复制蛋白 Rep 与已知的 RCR 质粒没有相似性, 暗示它们可能不是以滚环的方式进行复制。

Theta 复制的质粒一般有质粒编码的 *rep* 基因和邻近的非编码区(常常包括富含 AT 的序列和重复序列)^[6]。大量的研究表明, 假单胞菌质粒 pPS10 采用了 theta 方式复制, 在复制基因的上游有一段富含

AT 序列、4 个 22 bp 的重复序列(Iteron)和 1 个 DnaA 结合区^[7]。pPCZ1 和 pPCZ2 的复制蛋白均与 pPS10 的相似, 在 pPCZ1 的 *rep* 基因上游有两段富含 AT 的序列(分别为 41 bp 和 78 bp)和 3 个 21 bp (TGAAAGAAATGCCACCTTTTA)的重复序列(图 2), 在 pPCZ2 的 *rep* 基因上游也有一段富含 AT 的序列(40 bp)、5 个 21 bp (TAACTATTACACTTTCGGT GT)和 4 个 8 bp (TGTTTTAA)的重复序列(图 3)。这些结果暗示 pPCZ1 和 pPCZ2 可能均以 theta 方式进行 DNA 复制。过量表达和纯化 pPCZ1 和 pPCZ2 的复制蛋白, 在体外与以上预测的 DNA 重复序列进行结合反应, 然后利用凝胶阻滞(Gel retardation)和 DNA 足印(Footprinting)实验可以确定蛋白-DNA 相互作用的特异性和结合的序列。

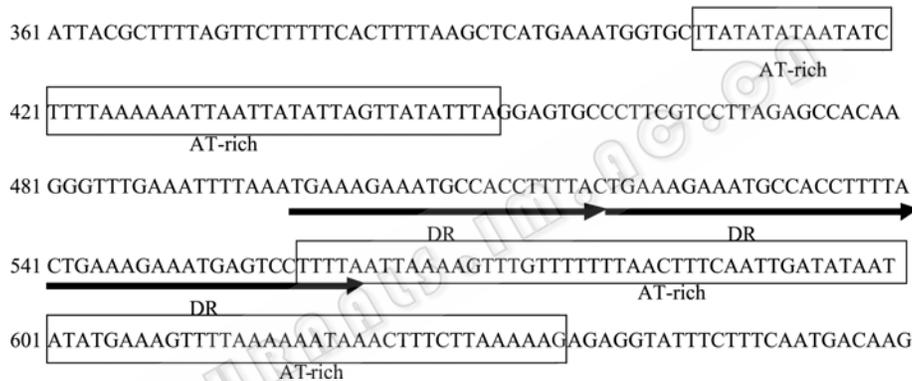


图 2 质粒 pPCZ1 可能的复制起点的序列特征

Fig. 2 Sequence characters of putative origin for initiation of pPCZ1 replication

Note: Three direct repeats (DR) are indicated by arrowheads. Two AT-rich sequences are boxed.

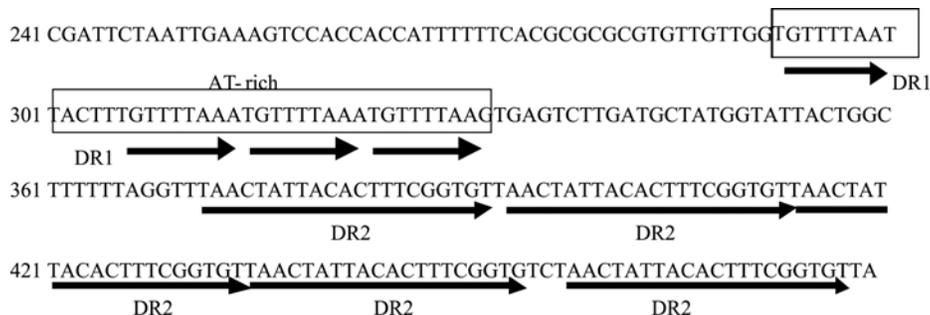


图 3 质粒 pPCZ2 可能的复制起点的序列特征

Fig. 3 Sequence characters of putative origin for initiation of pPCZ2 replication

Note: Four direct repeats of 8 bp (DR1) and five direct repeats of 21 bp (DR2) are indicated by arrowheads. One AT-rich sequence is boxed.

参考文献

[1] Migula W. Uber ein neues system der bakterien. *Arb Bakteriol Inst Karlsruhe*, 1894, 1: 235-238.

[2] Dai X, Wang YN, Wang BJ, et al. *Planomicrobium chinense* sp. nov., isolated from coastal sediment, and transfer of *Planococcus psychrophilus* and *Planococcus alkanoclasticus* to *Planomicrobium* as *Planomicrobium*

- psychrophilum* comb. nov. and *Planomicrobium alkano-clasticum* comb. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, **55**(Pt 2): 699–702.
- [3] Labuzek S, Hupert-Kocurek KT, Skurnik M. Isolation and characterisation of new *Planococcus* sp. strain able for aromatic hydrocarbons degradation. *Acta Microbiol Pol*, 2003, **52**(4): 395–404.
- [4] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [5] Khan SA. Plasmid rolling-circle replication: highlights of two decades of research. *Plasmid*, 2005, **53**(2): 126–136.
- [6] del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarria MJ, et al. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**(2): 434–464.
- [7] Giraldo R, Fernandez-Tresguerres ME. Twenty years of the pPS10 replicon: insights on the molecular mechanism for the activation of DNA replication in iteron-containing bacterial plasmids. *Plasmid*, 2004, **52**(2): 69–83.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果,产业化新技术和新进展,以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室(原技术与方法)、高校教改纵横(原高等院校教学)、精品教学(原名师讲堂)、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>, 点击作者投稿区,第一次投稿请先注册,获得用户名和密码,然后依照提示提交稿件,详见主页“投稿、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿,图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的文稿,本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确,数据可靠,简明通顺,重点突出。

3.1 篇幅

以 A4 纸 5 号字计算,综述、教学和方法类文章最好在 4 页以内,研究报告 4~7 页(以上均包括图表)。

3.2 图表

文中的图表须清晰简明,文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm(占半栏),大图的宽度应小于 17 cm(通栏)。

3.3 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码,未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出,多于 3 人时列出前 3 人,后加“等”或“*et al.*”,作者姓前、名后,名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名可以缩写,但必须标准,不加缩写点,斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘 杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达. *微生物学通报*, 2007, **34**(2): 1–3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, et al. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Biol Chem*, 2001, **276**(39): 36514–36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. *微生物实验教程*. 北京: 北京大学出版社, 2000, p.4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理. 见: 华 珞等. *核农学进展*. 北京: 中国农业出版社, 1996, pp.115–120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金资助(No.)

*通讯作者 Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2009-00-00 ; 接受日期: 2009-00-00

(下转 p.1333)