

• 研究论文 •

## 极端嗜盐古生菌启动子序列缺失突变的微量热研究

朱建裕<sup>a,b</sup> 刘义<sup>c</sup> 胡岳华<sup>b</sup> 曾驰<sup>a</sup> 张立侠<sup>c</sup>  
崔长征<sup>a</sup> 黄玉屏<sup>a</sup> 沈萍<sup>\*a</sup>

(<sup>a</sup> 武汉大学生命科学学院 武汉 430072)

(<sup>b</sup> 中南大学资源加工与生物工程学院 长沙 410083)

(<sup>c</sup> 武汉大学化学与分子科学学院 武汉 430072)

**摘要** 用微量热方法和 DNA 缺失突变技术研究了来源于极端嗜盐古生菌 R1 上的一个推测的启动子片段(RM10)在大肠杆菌中的启动子功能. 启动子片段融合到质粒 pKK232-8 上无启动子的氯霉素乙酰转移酶(CAT)基因前来检测它驱动基因表达的能力, 缺失分析 RM10 启动子片段定位具有启动活性的重要功能区. 实验结果从热动力学角度揭示, 这个启动子片段上含有-35 区和-10 区特征的 1382~1517 bp(碱基对)区段是它在大肠杆菌中具有启动子功能的关键部分; 在 1~1382 bp 区段或 1571~1848 bp 区段上还存在它的负调控区. 该研究为基因启动子功能研究提供了一种新的、更加灵敏便捷的、化学与生物学相结合的方法.

**关键词** 微量热; 嗜盐古菌; 缺失突变; 启动子

## Microcalorimetric Study on Deletion Mutagenesis of the Gene Promoter Sequences from the Extremely Halophilic Archaea

ZHU, Jian-Yu<sup>a,b</sup> LIU, Yi<sup>c</sup> HU, Yue-Hua<sup>b</sup> ZENG, Chi<sup>a</sup> ZHANG, Li-Xia<sup>c</sup>  
CUI, Chang-Zhen<sup>a</sup> HUANG, Yu-Ping<sup>a</sup> SHEN, Ping<sup>\*a</sup>

(<sup>a</sup> College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

(<sup>b</sup> School of Resource Processing and Biological Engineering, China Southern University, Changsha 410083)

(<sup>c</sup> College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

**Abstract** Microcalorimetric method and DNA deletion mutagenesis technique were combined to study a putative gene promoter fragment (RM10) from the extremely halophilic archaea, *Halobacterium halobium* R1, for its promoter function toward *Escherichia coli*. The promoter fragments were fused to the promoter-less chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene on plasmid pKK232-8 to evaluate its ability of driving CAT gene expression. Deletion analysis for RM10 was performed to identify important functional region responsible for promoter activity toward *Escherichia coli*. From the view of thermokinetics, the experimental results revealed that the 1382 to 1517 bp (base pair) with the typical -35 and -10 box sequences of bacterial promoters was very critical region for promoter function to *Escherichia coli*, and there was a negative control region from 1 to 1382 bp or from 1571 to 1848 bp. Our research work also provided a very sensitive and easily-performed novel method, combining the chemical and biological technique, for studying gene promoter function.

**Keywords** microcalorimetry; halophilic archaea; deletion mutagenesis; gene promoter

\* E-mail: pingshen@whu.edu.cn; Tel.: 027-68754533; Fax: 027-87883833.

Received May 10, 2005; revised September 14, 2005; accepted November 30, 2005.

“973”计划(No. 2004CB719603)、国家自然科学基金(Nos. 20373051, 30170018, 30470033)资助项目.

极端嗜盐菌是一类只能在高盐浓度(15%~30%)下才能生长并维持其结构稳定性与完整性的极端环境微生物, 属于古生菌域, 目前又被广泛称之为生命的第三种形式或第三生命<sup>[1,2]</sup>. 由于其自身的特性及其在进化上的独特重要性, 极端嗜盐古菌是研究生命起源、进化等理论问题以及开发利用新的微生物资源的极其有价值的生命类群<sup>[3~5]</sup>.

转录是以 DNA 为模板合成 RNA 的过程, 也是基因表达的第一个阶段并且最后导致这个基因编码的蛋白的合成, 因此是基因表达调控的主要阶段<sup>[6]</sup>. 转录分为三个阶段: 起始, RNA 聚合酶与 DNA 结合并开始合成 RNA; 延伸, RNA 链被延伸; 终止, 延伸终止, 转录本从模板上脱落. 起始是很重要的一步, 包括 RNA 聚合酶识别特定的 DNA 序列使之双链解开并与之结合开始合成 RNA, 这个特定的 DNA 序列就是启动子(promoter), 是所有基因表达的总开关. 典型的细菌基因启动子具有保守序列(-35 和 -10 区)<sup>[7]</sup>. 开始转录的效率影响整个转录的效率, 是转录的限速步骤, 而起始转录效率由启动子的结构和 RNA 聚合酶与启动子的相互作用决定<sup>[8]</sup>. 不同基因启动子间有很大的变异性, 这些都是现代分子生物学的研究重点.

细胞内的各种代谢过程伴随着能量的转移和热变化, 现代微量热计能检测 0.1  $\mu\text{W}$  的热功率, 具有足够灵敏度, 可以实时连续检测细胞代谢过程中所产生的热效应, 研究表明, 微量热技术不仅在研究生理营养学上<sup>[9~12]</sup>, 而且在微生物的转化、基因克隆和表达等分子水平上也具有重要的应用, 可获取一些生物学方法难以获取的重要信息<sup>[13,14]</sup>. 本实验室用微量热方法研究了启动子活性片段(RM07)上保守碱基定点突变后启动活性的变化, 证明了该方法能检测基因启动子区碱基的突变<sup>[15~17]</sup>. 本文利用从极端嗜盐古生菌-盐生盐杆菌 R1 染色体中分离的一个与真核同源修复基因 rad25 的启动子片段(RM10)为材料, 用微量热方法结合 DNA 缺失突变技术精确定位这个在大肠杆菌中有弱启动子活性的关键部分和可能的调控区.

## 1 实验部分

### 1.1 材料和仪器

细菌菌株: 大肠杆菌(*Escherichia coli*) HB101, HB101/pKK232-8, HB101/pKK232-RM10, HB101/pKK232-RM10-A, HB101/pKK232-RM10-B 菌株均由本实验室构建或保存.

LB 培养基: 氯化钠 10 g, 蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g,

加水至 1000 mL. 120  $^{\circ}\text{C}$  高压蒸汽灭菌 30 min, 接种前按需要加入一定浓度的氨苄青霉素(amp)或氯霉素(cm).

仪器: 采用瑞典产的 LKB2277 生物活性检测仪, 是一种高灵敏的热导式热量计, 热功率最小检测极限为 0.15  $\mu\text{W}$ , 24 h 内基线漂移为 0.2  $\mu\text{W}$ , 可测定 20~80  $^{\circ}\text{C}$  之间的物理、化学或生命等过程产生的热效应. 其结构、原理、操作等见参考文献[18].

### 1.2 实验方法

聚合酶链式反应(PCR)、重组质粒的构建和转化等分子生物学方法参照分子克隆手册<sup>[19]</sup>.

微量热检测采用停流法进行, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ , LKB2277 量热仪获得稳定的基线后流通池依次用 0.1 mol/L HCl, 0.1 mol/L NaOH, 75% 乙醇和无菌蒸馏水灭菌和清洗, 用 LKB2132 蠕动泵将定量接种了不同的大肠杆菌 HB101, HB101/pKK232-8, HB101/pKK232-RM10, HB101/pKK232-RM10-A 和 HB101/pKK232-RM10-B 的 LB 培养基(含不同浓度的氯霉素和氨苄青霉素, 约 5 mL)分别泵入量热计不同通道中, 当整个流通池中充满菌液后(约 0.6 mL)停泵, 并关闭检测系统的进出口管道. 开启记录软件, 实时检测流通池内含有不同质粒的细菌生长的热效应变化, 采集数据间隔为 60 s.

## 2 结果与讨论

### 2.1 RM10 启动子活性片段的克隆和缺失突变体的构建

RM10 片段是本实验从极端嗜盐古生菌-盐生盐杆菌 R1 染色体中分离得到具有真细菌基因启动子活性的 1848bpDNA 片段<sup>[20]</sup>, 通过生物信息学分析, 含有一个推定的古菌基因 rad25 的启动子区, 而且具有典型的真细菌基因启动子的保守序列. 我们推测这个片段在大肠杆菌中有启动子功能起主要作用的是含有 TTGAAC 和 TATATG 序列的 1382~1517 bp 区, 这是典型的真细菌启动子-35 区和-10 区保守序列, 为了证实这个推测, 先利用 PCR 方法得到 RM10 片段的缺失片段 A, B 的 PCR 产物, 分别将 A, B 产物用 BamHI+HindIII 酶切后插入 pKK232-8 载体上 CAT 报告基因的上游, 获得了融合质粒 pKK232-RM10-A (1382~1571 bp/RM10 片段), pKK232-RM10-B (1517~1571 bp/RM10 片段)(结构如图 1 所示), 转入大肠杆菌 HB101 得到正确的转化子. DNA 测序分析证明融合质粒是正确的. 因为氯霉素抗性基因(CAT)作为报告基因, 氯霉素的抗性水平对应于 CAT 基因的转录水平和启动子活性大小<sup>[21]</sup>.

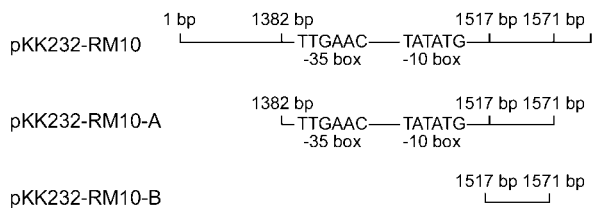


图1 缺失突变 RM10 启动子活性片段

Figure 1 Deletion mutagenesis of the RM10 promoter activity fragment

pKK232-RM10-A (1~1382 bp and 1571~1848 bp)

pKK232-RM10-B (1~1517 bp and 1571~1848 bp)

## 2.2 微量热分析含不同缺失突变体重组细菌的生长代谢

在大肠杆菌的对数生长期, 细胞数量( $n$ )的增长是呈指数增加的, 热功率也呈指数式增长. 则有

$$n_t = n_0 \exp(kt)$$

$$P_t = P_0 \exp(kt)$$

或者

$$\ln P_t = \ln P_0 + kt \quad (1)$$

其中:  $k$  是生长速率常数,  $P_t$  是对数生长前期  $t$  时刻的热功率, 量热测得各转化子菌株 HB101/pKK232-RM10, HB101/pKK232-RM10-A 和 B101/pKK232-RM10-B 等生长代谢产热曲线(如图 2~4 所示)与式(1)表现了很好的相关性. 所以可从产热曲线的对数生长期取一系列的  $P_t$  和  $t$  数据进行线性拟合, 通过方程式(1)即可求出生长速率常数  $k$  值,  $k$  值反映了大肠杆菌菌株的生长快慢和状态.

高浓度的抗生素(如氯霉素)能够抑制大肠杆菌的生长, 因此会导致生长速率常数  $k$  值的下降. 假设  $k_0$  是抗生素浓度为 0 时的细菌生长速率常数,  $k_C$  是抗生素浓度为  $C$  时的细菌生长速率常数, 那么当抗生素的浓度为  $C$  时, 细菌生长的抑制率  $I = [(k_0 - k_C)/k_0] \times 100\%$ . 当抑制率为 50% 时, 对应的氯霉素浓度可定义为  $IC_{50}$ ,  $IC_{50}$  值表示使细菌生长速率常数降低 50% 的氯霉素浓度.

根据计算公式和生长产热曲线, 我们获得的各种转化子菌株的生长热动力学参数:  $k$  (生长速率常数)、 $I$  (氯霉素抑制率)、 $IC_{50}$  (氯霉素半抑制浓度)、 $P_m$  (对数生长期最大放热功率)、 $t_p$  (出峰时间, 即对数生长期产生最大产热功率所对应的时间)如表 1 和表 2 所示. 这些结果都有较好的规律性和相关性.

## 2.3 不同缺失突变体重组细菌生长与启动功能的关系

本研究构建的启动子活性片段如果具有启动功能, 它就可以启动与之相连氯霉素乙酰转移酶基因的表达,

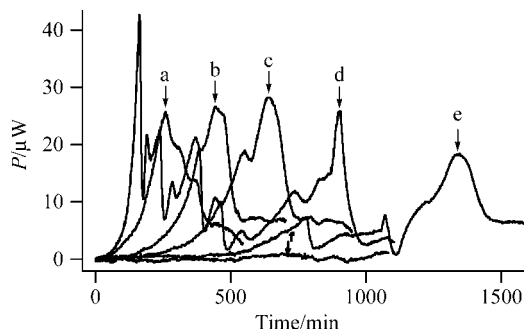


图2 HB101/pKK232-RM10 在含不同浓度氯霉素 LB 培养基中的生长产热曲线

Figure 2 Thermogenic curves of HB101/pKK232-RM10 in LB medium containing various concentrations of chloramphenicol  
Concentrations of chloramphenicol: 0 (a), 5 (b), 7.5 (c), 12 (d), 15 (e), 30 (f)  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

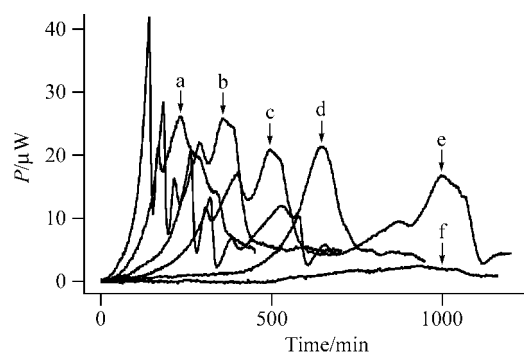


图3 HB101/pKK232-RM10-A 在含不同浓度氯霉素 LB 培养基中的生长产热曲线

Figure 3 Thermogenic curves of HB101/pKK232-RM10-A in LB medium containing various concentrations of chloramphenicol  
Concentrations of chloramphenicol: 0 (a), 5 (b), 10 (c), 15 (d), 20 (e), 35 (f)  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

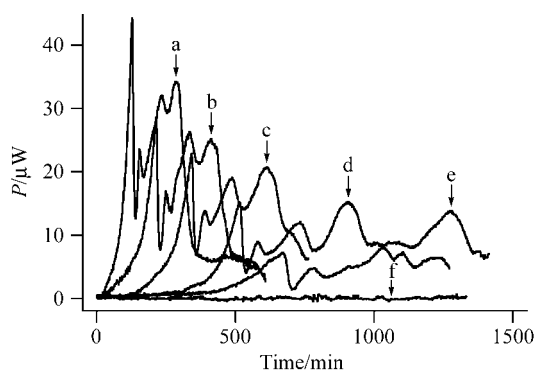


图4 HB101/pKK232-RM10-B 在含不同浓度氯霉素 LB 培养基中的生长产热曲线

Figure 4 Thermogenic curves of HB101/pKK232-RM10-B in LB medium containing various concentrations of chloramphenicol  
Concentrations of chloramphenicol: 0 (a), 2 (b), 4 (c), 6 (d), 8 (e), 12 (f)  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

表1 各种大肠杆菌菌株在含氯霉素培养基中的生长热动力学参数

Table 1 Thermodynamic data for the growth of *E. coli* in LB medium containing chloramphenicol

<i>E. coli</i>	$C_{cm}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	$k/\text{min}^{-1}$	$P_m/\mu\text{W}$	$t_p/\text{min}$	$I/\%$	$IC_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
HB101	0	0.03812	38.9	131	—	1.16
	0.6	0.02207	27.11	186	42.1	
	1.2	0.01894	22.82	205	50.3	
	1.8	0.01608	13.71	268	57.8	
	2.4	0.01098	12.64	314	71.2	
	4.0	0	0	0	100	
HB101/pKK232-8	0	0.03079	39.06	124	—	1.96
	0.5	0.02824	32.12	142	8.3	
	1.0	0.02308	29.7	158	25.0	
	2.0	0.01321	11.72	295	57.4	
	4.0	0	0	0	100	
HB101/pKK232-RM10	0	0.02818	40.7	161	—	6.3
	5.0	0.01561	22.6	236	44.6	
	7.5	0.01304	18.9	379	53.7	
	12.0	0.01099	9.6	460	61.0	
	15.0	0.00714	6.7	774	74.7	
	30.0	0	0	0	100	
HB101/pKK232-RM10-A	0	0.03714	41.86	141	—	10.2
	5.0	0.02354	28.42	183	36.6	
	10.0	0.01871	20.66	263	49.6	
	15.0	0.01384	13.27	319	62.7	
	20.0	0.0104	10.36	577	72.1	
	35.0	0	0	0	100	
HB101/pKK232-RM10-B	0	0.03461	44.37	126	—	2.60
	2.0	0.01784	28.24	212	48.5	
	4.0	0.01558	21.60	343	55.0	
	6.0	0.01085	16.44	513	68.7	
	8.0	0.00759	7.24	669	78.1	
	12.0	0	0	0	100	

表2 各种大肠杆菌菌株在含氨苄青霉素培养基中的生长热动力学参数

Table 2 Thermodynamic data for the growth of *E. coli* in LB medium containing ampicillin

<i>E. coli</i> /plasmid	$C_{amp}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	$k_m/\text{min}^{-1}$	$P_m/\mu\text{W}$	$t_p/\text{min}$
HB101	10	0	0	0
HB101/pkk232-8	1000	0.03057	42.3	140
HB101/pKK232-RM10-B	1000	0.03786	43.65	150
HB101/pKK232-RM10-A	1000	0.03184	40.87	138
HB101/pKK232-RM10	1000	0.02839	41.89	160

启动子活性越强, 细菌表达的氯霉素乙酰转移酶就越多, 使氯霉素的羟基发生乙酰化而失活的就越多, 细菌生长受到氯霉素抑制就越小,  $IC_{50}$  值越高. 因此可以用

$IC_{50}$  来量化 CAT 基因的转录水平和启动子活性大小.

根据表中数据, 宿主菌 *E. coli* HB101 对氨苄青霉素 (amp) 敏感, 当 amp 浓度为  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, HB101 不能生

长( $k=0$ ), HB101 菌株对氯霉素(cm)也敏感, 当 cm 浓度为  $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, HB101 不能生长( $k=0$ ), HB101 菌株是转化的受体菌株, 本身不含有任何抗生素抗性基因包括 CAT 基因, 因此 HB101 对氨苄青霉素和氯霉素都敏感. HB101 的氯霉素  $\text{IC}_{50}$  值为  $1.16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 是其本底抗性, 不是 CAT 基因表达的结果.

HB101/pKK232-8 菌株对 amp 具有抗性, 当 amp 浓度为  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, 仍然能很好生长, 表明携带氨苄青霉素抗性基因的质粒 pKK232-8 转入了 HB101, 是氨苄青霉素抗性基因表达使其对 amp 产生抗性. 但是 HB101/pKK232-8 对 cm 仍然敏感, 当 cm 浓度达到  $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, HB101/pKK232-8 即不能生长( $k=0$ ). pKK232-8 其上携带的氯霉素抗性基因(CAT)上游无启动子, CAT 基因不能表达, HB101/pKK232-8 氯霉素  $\text{IC}_{50}$  值为  $1.96 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 也是其本底抗性.

HB101/pKK232-RM10 对 amp 具有抗性, 与 HB101/pKK232-8 是同样原理.  $\text{IC}_{50}$ (氯霉素)值为  $6.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 比对照菌 HB101, HB101/pKK232-8 的分别提高了 443%, 221%, 说明是 CAT 基因在表达才使其  $\text{IC}_{50}$  大大地提高, 可见 CAT 基因上游插入 RM10 片段在大肠杆菌中具有启动子功能, 能启动 CAT 基因的表达. 这进一步证明了前面的生物学结果一致<sup>[20]</sup>.

HB101/pKK232-RM10-A 对 amp 的抗性也与 HB101/pKK232-8 是同样原理.  $\text{IC}_{50}$ (氯霉素)值为  $10.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 比对照菌 HB101, HB101/pKK232-8 的分别提高了 779%, 420%, 表明 CAT 基因在转录和表达, 可见 CAT 基因上游插入的缺失突变 RM10-A 片段(1382~1517 bp)具有启动子活性. 相比于 pKK232-RM10 转化子菌株, 氯霉素  $\text{IC}_{50}$  提高了 61.9%, 这表明 RM10 片段缺失前面 1~1382

bp 区段和后面的 1571~1382 bp 区段后保留含有 TTGAAC 和 TATATG 序列的 1382~1517 bp 区段的启动子活性最强.

相比 HB101/pKK232-RM10-A 和 HB101/pKK232-RM10, B101/pKK232-RM10-B 对氯霉素的抗性水平大幅下降,  $\text{IC}_{50}$  值为  $2.60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 几乎降到对照菌 HB101 和 HB101/pKK232-8 的抗性水平, 说明 CAT 基因几乎没有表达, 也就没有了启动活性, 这个缺失突变体相对于 HB101/pKK232-RM10-A 是 1382~1517 bp 区段被缺失引起启动活性急剧降低的, 该结果表明 1382~1517 bp 区段是启动子功能关键部分. 而这区段里正好包含了一35TTGAAC 和一10TATATG 序列特征, 是典型的真细菌启动子-35 区和-10 区保守序列.

#### 2.4 不同缺失突变体重组细菌的最大放热峰、出峰时间与培养基中氯霉素浓度之间的关系

随着培养基中抗生素浓度的增加, 不仅细菌的生长速率常数降低, 而且最大出热峰( $P_m$ )值也在降低, 直至为零, 说明抗生素浓度越高, 细菌生长越受抑制, 到一定浓度后细菌生长完全被抑制. 如果将  $P_m$  与抗生素浓度  $C$  作线性回归分析, 可得出最大放热峰  $P_m$  与抗生素浓度的  $C_{\text{cm}}$  关系(表 3).

由以上关系式可见, 同一菌株的最大放热峰  $P_m$  与抗生素浓度  $C_{\text{cm}}$  之间是存在线性关系, 与  $Y=A+BX$  方程式拟合. 不同菌株的  $A$  和  $B$  值与所含启动子活性大小成正相关, 有  $A$  和  $B$  (HB101/pKK232-RM10-A)  $> A$  和  $B$  (HB101/pKK232-RM10)  $> A$  和  $B$  (HB101/pKK232-RM10-B) 的关系.

与此同时, 培养基中氯霉素浓度越高, 细菌产热曲线上出峰时间也越晚, 如果将  $t_p$  与抗生素浓度  $C$  作线性回归分析, 可得到  $t_p$  与  $C$  之间的关系(表 4).

表 3 最大放热峰  $P_m$  与抗生素浓度  $C_{\text{cm}}$  的关系

Strain	Equation	$R$	$C_{\text{cm}}$ Range
HB101	$P_m = 34.54 - 9.21C$	$R = -0.97399$	$(C_{\text{cm}}: 0 \sim 4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
HB101/pKK232-8	$P_m = 37.48 - 9.97C$	$R = -0.97713$	$(C_{\text{cm}}: 0 \sim 4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
HB101/pKK232-RM10	$P_m = 38.97 - 2.62C$	$R = -0.97738$	$(C_{\text{cm}}: 0 \sim 10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
	$P_m = 15.04 - 0.51C$	$R = -0.98983$	$(C_{\text{cm}}: 10 \sim 30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
HB101/pKK232-RM10-A	$P_m = 40.08 - 1.87C$	$R = -0.98814$	$(C_{\text{cm}}: 0 \sim 15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
	$P_m = 23.50 - 0.67C$	$R = -0.99947$	$(C_{\text{cm}}: 15 \sim 35 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
HB101/pKK232-RM10-B	$P_m = 38.47 - 3.53C$	$R = -0.96834$	$(C_{\text{cm}}: 0 \sim 12 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$

表 4  $t_p$  与  $C$  之间的关系

Strain	Equation	$R$	$C_{\text{cm}}$ Range
HB101	$t_p = 131.2 + 74.67C$	$R = 0.99095$	$(C_{\text{cm}}: 0 \sim 2.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
HB101/pKK232-8	$t_p = 103.8 + 86.8C$	$R = 0.9493$	$(C_{\text{cm}}: 0 \sim 2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
HB101/pKK232-RM10	$t_p = 148.16 + 26.38C$	$R = 0.97444$	$(C_{\text{cm}}: 0 \sim 12 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
HB101/pKK232-RM10-A	$t_p = 134.40 + 12.28C$	$R = 0.99366$	$(C_{\text{cm}}: 0 \sim 15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
HB101/pKK232-RM10-B	$t_p = 95.20 + 69.35C$	$R = 0.99314$	$(C_{\text{cm}}: 0 \sim 8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$

由以上关系式可见, 同一菌株出峰时间  $t$  与抗生素浓度  $C_{\text{cm}}$  之间存在线性关系: 符合  $Y=A+BX$  方程式, 不同菌株的  $B$  值与所含启动子活性大小成负相关, 有  $B$  (HB101/pKK232-RM10-A)  $< B$  (HB101/pKK232-RM10)  $< B$  (HB101/pKK232-RM10-B) 的关系。

### 3 讨论

本研究结果确认了 RM10 片段在大肠杆菌中具有启动子功能, 精确定位了 1382~1517 bp 区段是启动子活性的关键部分, 而在 1~1382 bp 区段或 1571~1848 bp 区段存在负调控区。在 1382~1517 bp 区段含有一 35 区 TTGAAC 和 -10 区 TATATG 的序列特征, 符合典型的真细菌基因启动子的保守序列(-35 和 -10 区)结构。在我们的试验中, 一旦含有一 10 和 -35 保守区(1382~1517 bp 区段)序列被缺失, 启动活性急剧减少, 转录效率立刻降低, CAT 基因合成的氯霉素乙酰转移酶减少, 重组菌对抗性氯霉素降低, 细菌生长变慢。这是首次从结构和功能上发现并证实了来自极端嗜盐古生菌的一个推测基因的启动子序列上具有原核生物启动子的特征, 这是一种新的生命现象, 具有重要的理论意义和应用价值, 研究结果也从启动子方面证明了极端嗜盐古生菌具有独特的基因类型, 特殊的生理机制, 这些在生命起源、系统进化等方面给人们许多重要的启示, 在生命行为的原理上也将拓展人们的概念, 从而为进一步揭示古生菌之谜和丰富生物的系统发育和进化关系提供了新的信息和途径并为发展生物技术提供了新的机会, 并有可能为构建双功能表达载体提供新的启动子来源。

本实验室用微量热方法研究了启动子活性片段 (RM07) 上保守碱基定点突变后启动活性的变化, 证明了该方法能检测基因启动子区碱基的突变, 成功地把微量热引入到基因分子水平的研究。本研究提供了一个新的化学和分子生物学相结合的方法来精确定位基因启动子的关键功能区和可能的调控区, 对这种弱活性的启动子的研究无疑是开辟了一个新的途径。

精确定位关键功能区和调控区对研究启动子的调控很重要, 因为不同基因启动子间有很大的变异性, 启动活性大小也有差别<sup>[22]</sup>; 特别是弱启动子, 没有精确、灵敏的方法是无法进行研究的<sup>[23]</sup>。传统分子生物学方法如 Northern 杂交、报告基因酶活性检测<sup>[24]</sup>等, 常用来研究基因启动子功能, 前者往往要涉及放射性同位素, 对研究人员不安全, 近年来发展的生物素灵敏度又不够; 而后者一般都要破坏生物正常的活动来检测, 而且得到的结果往往是最终的累积, 不能如实反映生物生命过程中真实的变化。微量热方法非常安全, 不需要同位素和

有机溶剂等对研究人员健康破坏性很强的试剂, 而且能直接检测一个活系统的生物学活动, 不会破坏生物系统正常的活动, 可对样品进行后续分析, 它比其它方法更接近于样品的真实状态, 它是实时进行的检测, 得到的实验结果是真实的, 而不是最终的累积。本研究通过微量热技术直接、快捷地获得一系列的动力学和热力学参数, 分析了这些参数与启动子功能的关系, 能从多个角度来说明我们的研究结果, 比单纯的生物学方法可得到更多、更详细、更精确的信息。因此, 微量热法可以作为细胞生物学、微生物学和遗传学的一种新的研究手段和技术, 是研究生命科学中一个很有用的工具, 会促进化学和生命科学的相互交叉和渗透。微量热分析和分子生物学技术结合应用将会在二十一世纪最热门的生命科学研究领域里发挥重大的作用。

### References

- 1 Woese, C. R.; Kandler, O.; Wheelis, M. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*, 4576.
- 2 Gray, M. W. *Nature* **1996**, *383*, 299.
- 3 Bult, C. J.; White, O.; Olsen, G. J.; Zhou, L.; Fleischmann, R. D.; Sutton, G. G.; Blake, J. A.; FitzGerald, L. M.; Clayton, R. A.; Gocayne, J. D.; Kerlavage, A. R.; Dougherty, B. A.; Tomb, J. F.; Adams, M. D.; Reich, C. I.; Overbeek, R.; Kirkness, E. F.; Weinstock, K. G.; Merrick, J. M.; Glodek, A.; Scott, J. L.; Geoghagen, N. S.; Venter, J. C. *Science* **1996**, *273*, 1058.
- 4 Olsen, G. J.; Woese, C. R. *Cell* **1997**, *89*, 991.
- 5 Doolittle, R. F. *Res. Microbiol.* **2000**, *151*, 85.
- 6 Watson, J. D. *Science* **1963**, *140*, 17.
- 7 Hawley, D. K.; McClure, W. R. *Nucleic Acids Res.* **1983**, *11*, 2237.
- 8 Busby, S.; Ebricht, R. H. *Cell* **1994**, *79*, 743.
- 9 Nilsson, A.; Larsson, C.; Gustafsson, L. *Thermochim. Acta* **1995**, *250*, 233.
- 10 Liu, P.; Liu, Y.; Xie, Z.-X.; Chen, Y.-G.; Zhao, R.-M.; Shen, P.; Qu, S.-S. *Chin. J. Chem.* **2003**, *21*, 693.
- 11 Hou, A.-X.; Liu, Y.; Wang, W.-G.; Xue, Z.; Qu, S.-S. *Acta Chim. Sinica* **2003**, *61*, 1382 (in Chinese). (侯安新, 刘义, 黄伟国, 薛智, 屈松生, 化学学报, **2003**, *61*, 1382.)
- 12 Hou, A.-X.; Xue, Z.; Liu, Y.; Qu, S.-S. *Chin. J. Chem.* **2003**, *21*, 1146.
- 13 Xie, Z.-X.; Liu, Y.; Chen, X.-D.; Shen, P.; Qu, S.-S. *Acta Chim. Sinica* **2000**, *58*, 153 (in Chinese). (谢志雄, 刘义, 陈向东, 沈萍, 屈松生, 化学学报, **2000**, *58*, 153.)
- 14 Ruan, L.-F.; Liu, Y.; Gao, Z.; Shen, P.; Qu, S.-S. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2002**, *70*, 521.
- 15 Yang, Y.; Liu, Y.; Zhu, J.; Shen, P. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2004**, *75*, 293.

- 16 Yang, Y.; Liu, Y.; Zhu, J.; Li, M.-J.; Shen, P. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2005**, *79*, 645.
- 17 Yang, Y.; Zhu, J.; Liu, Y.; Shen, P.; Qu, S.-S. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2005**, *62*, 183.
- 18 Boling, E. A.; Blanchar, G. C.; Russed, W. *Nature* **1973**, *241*, 472.
- 19 Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, **1989**.
- 20 Huang, Y. P. *Ph.D. Dissertation*, Wuhan University, Wuhan, **2001** (in Chinese).  
(黄玉屏, 博士论文, 武汉大学, 武汉, **2001**.)
- 21 Brosius, J. *Gene* **1984**, *27*, 151.
- 22 Ping, Q. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *309*, 495.
- 23 Kandiah, J.; Donghui, M.; Arunmozhiarasi, A. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 58.
- 24 Yang, Y.; Huang, Y.-P.; Shen, P. *Curr. Microbiol.* **2003**, *47*, 388.

(A0505102 SONG, J. P.; ZHENG, G. C.)