

# 血链球菌部分基因克隆及与 nif 基因同源序列初探

潘亚萍 王红杨 金春元 孙开来

**摘要** 目的: 分析血链球菌染色体DNA 片段序列, 探讨血链球菌遗传生物学特性。方法: 采用TA 克隆技术将此片段转化克隆并进行碱基序列测定, 通过 GenBank 进行同源分析。结果: 血链球菌A TCC10556 DNA 片段含有与固氮菌高度同源的 nifS、nifU 基因, 同源分值为 114 点(bits)。结论: 国内外首次报道血链球菌DNA 片段含有 nifS、nifU 部分基因。

**关键词** 血链球菌 基因克隆 nif 基因

血链球菌属口腔固有菌群, 近年牙周病微生物学研究显示血链球菌与大多数牙周可疑致病菌部位检出率之间是一种负相关关系。体外实验证实血链球菌对大多数牙周可疑致病菌均有很强的拮抗作用, 拮抗机理一方面通过产生细菌素样物质, 一方面通过过氧化氢的释放。细菌学检测也显示某些顽固性牙周炎口腔缺乏原籍血链球菌。因此, 深入研究血链球菌生物学特性, 特别是遗传学行为将为利用血链球菌及其产物防治牙周病提供有效的实验数据, 也将对口腔微生物学的深入研究具有重要意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 PCR 扩增及产物纯化

血链球菌(*Streptococcus sanguis*, S. s)A TCC10556 染色体 DNA 为模板, 引物为 S<sub>1</sub>-S<sub>2</sub> 即 5'GAGGTCCACA 3', 5'CCTCTGACTG 3'。用 PCR 方法扩增特异基因片段。50 μl 体积 PCR 反应体系为 94 1 分钟, 45 1 分钟, 72 1 分钟, 最后 72 延伸 7 分钟, 35 个循环。扩增产物经 8% 聚丙烯酰胺检测后, 用 1.5% 的低熔点琼脂糖回收特异 DNA 片段, 回收的 DNA 用 Wizard™ PCR Prep s DNA 纯化试剂盒进行纯化, 纯化产物经紫外分光光度计进行定量。

### 1.2 PCR 产物的克隆

用 TA 克隆系统(Eukaryotic TA cloning system, Invitrogen)通过载体连接将上述 PCR 产物直接克隆到 PCR™ 3 真核表达质粒上。

### 1.3 质粒提取

采用质粒纯化试剂盒(p lasm id m i n i k i t)快速提取质粒。

### 1.4 筛选阳性克隆

采用限制性内切酶分析方法, 用 EcoR I 消化重组质粒, 37 消化过夜后经 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定插入子的片段大小。

### 1.5 DNA 片段碱基序列测定

采用荧光素引物标记法(Dye-Primer), 使用荧光素标记的通用引物 T<sub>7</sub>。用 ABI PRISM 310 全自动遗传分析仪对带有原 PCR 产物的重组体 PCR<sub>3</sub>-S<sub>sr</sub> 进行测序。

### 1.6 蛋白氨基酸同源序列分析

将已知碱基序列转换为氨基酸序列, 进入 GenBank 系统进行蛋白氨基酸同源序列分析。

## 2 结果

### 2.1 血链球菌 PCR 扩增及产物纯化结果

PCR 扩增合成的 DNA 片段长度约为 800 碱基对(base pair, bp) 清晰单一条带, 经过低熔点琼脂糖回收及纯化符合克隆条件(图 1)。

### 2.2 血链球菌 DNA 片段阳性克隆鉴定

PCR™ 3 有两个 EcoR I 酶切位点, 重组质粒 PCR<sub>3</sub>-DNA S<sub>sr</sub> 经过 EcoR I 消化后预计得到 816 bp 的含 DNA S<sub>sr</sub> 基因的片段。电泳结果显示所选择的质粒与预期相符, 克隆成功(图 2)。

### 2.3 血链球菌克隆基因序列分析结果

根据限制性内切酶分析结果, 测序后所读出的序列应为载体序列 S<sub>1</sub>-S<sub>2</sub> 引物序列 S<sub>sr</sub> DNA 碱基序列 载体序列, 测序结果与预期完全相符。

本课题由美国中华医学会 CMB 基金资助

作者单位: 110002 中国医科大学口腔医学院口腔内科学教研室(潘亚萍, 王红杨), 基础医学院遗传学教研室(金春元, 孙开来)

## 2.4 血链球菌克隆基因蛋白同源序列分析

通过 GenBank 的 Database similarity search 检测, 显示氨基酸序列的 6 个阅读框架与 *nifS*, *nifU* 基因具有高度同源性, 与已知 16 个微生物 *nifS* 和 *nifU* 基因含有部分同源序列, 同源分值为 114 点, 符合同源标准(表 1)。

表 1 ATCC10556 *nif* 基因同源序列分析

细菌名称 (Genebank 分类号)	ATCC10556 克隆表达基因 碱基序列号	被查询的细菌 蛋白基因碱基 序列号	阅读 框架	同源 分值
麻风分枝杆菌	558~ 701	113~ 160	+ 3	107
S72754	365~ 544	47~ 106	+ 2	91
大肠杆菌	9~ 140	329~ 372	+ 3	102
d1016178	143~ 223	373~ 399	+ 2	73
麻风分枝杆菌	24~ 134	536~ 572	+ 3	99
e335040	152~ 223	578~ 601	+ 2	54
集胞藻菌属	30~ 203	344~ 401	+ 3	114
d1011196	143~ 229	381~ 409	+ 2	79
麻风分枝杆菌	27~ 179	345~ 395	+ 3	105
s72761	150~ 220	386~ 408	+ 2	72
大肠杆菌	18~ 131	326~ 363	+ 3	74
882705	146~ 220	368~ 392	+ 2	70
肺炎支原体	371~ 529	44~ 96	+ 2	89
p75297				
肺炎克氏杆菌	392~ 493	51~ 84	+ 2	69
s37295	597~ 656	101~ 120	+ 3	43
大肠杆菌	383~ 502	49~ 88	+ 2	76
l788878				
流感嗜血杆菌	383~ 502	49~ 88	+ 2	75
1573346				
流感嗜血杆菌	383~ 502	74~ 113	+ 2	75
c64064				
流感嗜血杆菌	24~ 119	365~ 396	+ 3	61
l64114	155~ 220	408~ 429	+ 2	48
兰绿藻目菌	392~ 502	56~ 92	+ 2	71
2183204	603~ 656	108~ 125	+ 3	36
酵母菌	389~ 502	84~ 121	+ 2	71
s69049				
棕色固氮菌	383~ 502	49~ 88	+ 2	70
2271522				
生殖支原体	371~ 511	44~ 90	+ 2	67
p47579				

## 3 讨 论

### 3.1 血链球菌部分 DNA 片段基因克隆与表达分析

本实验采用的 TA 克隆技术原理是 Taq DNA 聚合酶具有一种非模板依赖性的活性, 能在双链 DNA 分子的 3' 末端添加一个 A。因此, PCR 产物的 3' 末端均突出一个 A, 真核 TA 克隆系统正是利用 Taq DNA 聚合酶这种特性设计了一种 3' 末端突出单个 T 的能在哺乳动物细胞直接表达的线性质粒 PCR<sup>TM</sup> 3。根据 T-A 互补原理, PCR 产物可以直接连接到真核表达载体上<sup>1,2</sup>。本文选择较短一对引物即 10 个碱基, 目的在于寻找口腔链球菌 DNA 多态位点的差异, 结果显示 ATCC 10556 在 PCR 扩增产物 800 bp 左右有一 DNA 条带, 扩增结果稳定, 显示较强的特异性, 经过纯化仍可扩增说明特异及纯化度较高。通过核酸序列分析, 前 55 个碱基为已知的载体序列, 55 位至 65 位为原引物序列, 表明运用真核 TA 克隆表达 PCR 产物获得成功, 并获得了部分血链球菌的遗传基因。

### 3.2 血链球菌 *nifS*、*nifU* 基因同源序列分析

*nif* 基因(nitrogen fixed gene) 被发现在固氮菌中, 属于固氮酶基因<sup>3~5</sup>。Walter Arnold 于 1988 年首次报道克氏肺炎杆菌 *nif* 基因全序列为 24206 个碱基的 DNA 片段, 其中 *nifS* 和 *nifU* 是固氮酶的成熟基因<sup>6</sup>。血链球菌 ATCC 10556 的 DNA 片段与 16 种微生物的 *nif* 基因进行同源序列分析, 显示具有较高的同源性。在血链球菌 DNA 片段克隆表达的氨基酸序列中, + 2 阅读框架主要含有 *nifU* 基因同源序列, + 3 阅读框架主要含有 *nifS* 同源基因序列。

### 3.3 血链球菌 *nif* 基因的生理功能推测

对于固氮菌的生理功能研究提示, 此类细菌具有自生固氮活性<sup>7</sup>。通过氧呼吸和吸氢酶的作用达到避氧固氮, 同时在固氮中释放氢气, 其中钼铁蛋白和铁蛋白复合物- 固氮酶起催化调节作用<sup>8</sup>。

血链球菌是口腔链球菌中释放过氧化氢的微生物。血链球菌主要通过释放过氧化氢和细菌素达到防止外来菌侵入口腔的作用。什么机制导致血链球菌能够释放过氧化氢而其它细菌如变形链球菌、唾液链球菌无此功能一直未有明确答案。血链球菌是口腔早期定植菌, 除了血链球菌具有较强粘附牙

面的作用,导致血链球菌长期存留于口腔可能与其它影响因素有关。血链球菌不属于固氮菌,却含有 nifS、nifU 基因,能否推断血链球菌具有类固氮样作用,在血链球菌营养代谢中显示比其它细菌更具有优势而存在于口腔。通过对固氮菌在固氮过程中释放氢气提示血链球菌释放过氧化氢的机理可能与 nif 基因表达相关,因此深入研究 nif 基因表达与血链球菌产生过氧化氢机理相关性研究具有重要意义。

(本文图见中心插页 2)

#### 4 参考文献

- 1 Watson JD. Origin of concatameric T7 DNA. *Nat New Biol*, 1972, 239(94): 197~ 201
- 2 金春元,张 学,孙开来,等 PCR 产物真核 TA 克隆法构建基因表达重组体,中华医学遗传学杂志,1997, 14(1): 115~ 117
- 3 Jacobson MR, Bridge KE, Bennett LT, et al Physical and

- genetic map of the major nif gene cluster from *Azotobacter vinelandii* *J Bacteriol*, 1989, 171(2): 1017~ 1027
- 4 Jacobson MR, Cash V I, Weiss MC, et al Biochemical and genetic analysis of the nifU SVW ZM cluster from *Azotobacter vinelandii* *Mol Gen Genet*, 1989, 219(1): 49~ 57
- 5 Kennedy C, Dean D. The nifU, nifS and nifV gene products are regulated for activity of all the three nitrogenases of *Azotobacter vinelandii* *Mol Gen Genet*, 1992, 231(3): 494~ 498
- 6 Arnold WA, Rump W, Klipp UB, et al Nucleotide sequence of a 24, 206-base pair DNA fragment containing the entire nitrogen fixation gene cluster of *klebsiella pneumoniae* *J Mol Biol*, 1988, 203(3): 715~ 738
- 7 Hoover TR, Robertson AD, Cernly RC, et al Identification of the V factor needed for synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase as homocitrate *Nature (London)*, 1987, 329(6142): 855~ 857
- 8 王 丽,张静娟 土壤杆菌固氮菌生理特性研究 *微生物学报*, 1994, 34(2): 385~ 392

(1998-05-20 收稿)

## Partial Gene Clone and nif Gene Homologous Sequence Analysis of *Streptococcus sanguis*

Pan Yaping, Wang Hongyang

Department of Oral Medicine, Dental School, China Medical University

Jin Chunyuan, Sun Kailai

Department of Heredity, Basic Medicine College, China Medical University

### Abstract

**Objective:** To analyze the sequence of *Streptococcus sanguis* chromosome which contains one DNA fragment of 800 base pairs (bp) and discuss *Streptococcus sanguis* biological features of heredity. **Methods:** *Streptococcus* DNA of 800-bp genetic fragment was cloned and analyzed by using eukaryotic expression vector. **Results:** By Genebank's database, it showed that the 800-bp genetic sequence was highly homologous with other bacterial nifS and nifU gene, and the highest homologous score was 114. **Conclusion:** this nif gene of ATCC 10556 strain may correlate with nutrient metabolism and peroxide hydrogen release of *Streptococcus sanguis*.

**Key words** *Streptococcus sanguis* gene clone nif gene

### 第七届全国副省级城市口腔科学学术会议征文通知

第七届全国副省级城市口腔科学学术会议拟定于1999年10月在浙江省宁波市召开。会议采取专题学术讲座与论文交流相结合的形式,对口腔医学的科研、新技术和临床等方面的成果进行交流。来稿请寄论文全文及500字左右的摘要各一份,以便编印论文汇编。稿件请寄浙江省宁波市第一医院口腔科李哲光医生收(邮政编码315010),信封上注明“副省级城市口腔科学学术会议论文”。截稿日期1999年5月31日。欢迎全国各省、市同道参加会议。

(第七届全国副省级城市口腔科学学术会议筹备组)