

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.01100

柱状黄杆菌乙酰辅酶 A 合成酶基因及其上游调控序列分析

张金, 邹红, 姚卫建, 聂品

中国科学院水生生物研究所 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072

摘要: 柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)是世界范围内危害淡水鱼类的柱形病的病原。目前对该病原菌遗传操作系统的研究进展较慢, 而寻找高效稳定的启动子来调控外源基因在细菌体内的表达, 有可能促进该细菌遗传操作系统的构建。本研究获得了柱状黄杆菌乙酰辅酶 A 合成酶基因(acetyl-coenzyme A synthetase gene, *acs*)的编码序列及其上游调控序列, 该基因全长 2 323 bp, 编码 635 个氨基酸。通过序列分析, 发现在该基因起始密码子 ATG 的上游存在核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)序列 TAAAA, 和启动子-7 和-33 的保守基序 TATTTTCG 和 TTG。将 *acs* 的上游调控序列(promoter sequence, *Pacs*)置于氯霉素抗性基因(chloramphenicol acetyltransferase, *cat*)的上游并导入柱状黄杆菌 G₄ 株后, *cat* 基因得以表达, 并使宿主细胞产生稳定的氯霉素抗性。通过 5' RACE 技术, 确定了外源的 *cat* 基因和内源的 *acs* 基因的转录起始位点都是位于起始密码子上游 46 bp 处的 T。通过删减分析调控序列 *Pacs*, 发现起始密码子上游 164 bp 的序列是保持启动子活性所必需的。通过分析和比对 32 个基因的核糖体结合位点区域, 在起始密码子上游 10 bp 处发现了 RBS 保守基序 TAAAA。

关键词: 柱状黄杆菌; 乙酰辅酶 A 合成酶基因; 启动子; 核糖体结合位点

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)05-1100-08

柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)隶属于拟杆菌门、黄杆菌纲、黄杆菌目、黄杆菌科, 是淡水鱼类的重要致病菌, 它引起的柱形病在世界范围内都有报道^[1]。患柱形病的鱼往往出现烂鳃、体表溃疡、鳍条腐烂等症状, 且有很高的死亡率, 给养殖生产带来巨大的经济损失^[2-3]。柱状黄杆菌是噬纤维菌属(*Cytophaga*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)和拟杆菌属(*Bacteroides*)家族(CFB)的一个成员。到目前为止, 对这些细菌遗传操作系统的构建进展缓慢, 尽管已有关于柱状黄杆菌遗传操作系统的报道^[4]。在变形菌中经常使用的质粒、筛选标记和启动子等都不能在这类细菌中有效地发挥作用^[5-7], 因为这些广泛应用的遗传元件的启动子在 CFB 家族细菌中基本都不能正常表达^[8-9]。因此, 从柱状黄杆菌中分离高效稳定的启动子可能

有利于实现外源基因在柱状黄杆菌细胞内的表达。

乙酰辅酶 A 是生物体内重要的化学物质, 它是丙酮酸氧化脱羧和脂肪酸 β -氧化的产物, 也是脂肪酸合成、胆固醇合成和酮体生成的碳来源。蛋白质、糖、脂肪这三大类营养物质最终都会被彻底氧化成乙酰辅酶 A 进入三羧酸循环, 为生物体提供能量, 或者通过乙醛酸旁路产生生物合成所需的物质^[10]。乙酰辅酶 A 有以下 2 种合成途径: 乙酸在乙酸激酶和磷酸转乙酰酶的作用下转化成乙酰辅酶 A; 通过乙酰辅酶 A 合成酶(acetyl-coenzyme A synthetase, ACS)一步将乙酸转化成乙酰辅酶 A^[11]。由于 ACS 参与乙酰辅酶 A 的合成, 与生物体的新陈代谢相关, 因此推测柱状黄杆菌的乙酰辅酶 A 合成酶基因(*acs*)的调控序列很可能含有比较强的能够持续驱动基因表达的启动子。

收稿日期: 2011-04-01; 修订日期: 2011-06-05.

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2009CB118703).

作者简介: 张金(1981-), 博士研究生, 主要从事水产病原微生物研究. E-mail: zhangjin2001@163.com

通信作者: 聂品, 研究员. E-mail: pinnie@ihb.ac.cn; pniefish@hotmail.com

柱状黄杆菌的 *acs* 基因片段是在对已获得的藻酸盐乙酰转移酶基因(alginate o-acetyltransferase gene, *algI*)的上游 DNA 序列进行比对时发现的^[12]。本研究测定了 *acs* 基因全长及其侧翼调控序列, 并分析了它们的特征。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

本实验所使用的菌株和质粒见表 1。柱状黄杆菌在 Shieh 培养基(蛋白胨, 5 g/L; 酵母提取物, 0.5 g/L; CH₃COONa, 0.01 g/L; BaCl₂·2H₂O, 0.01 g/L; K₂HPO₄, 0.1 g/L; KH₂PO₄, 0.05 g/L; MgSO₄·7H₂O, 0.3 g/L; CaCl₂·2H₂O, 0.006 7 g/L; FeSO₄·7H₂O, 0.001 g/L; NaHCO₃, 0.05 g/L)^[13], 25 °C 条件下培养。大肠杆菌(*Escherichia coli*)在 LB 培养基

(蛋白胨, 10 g/L; 酵母提取物, 5 g/L; NaCl, 5 g/L), 37 °C 条件下培养。在 Shieh 琼脂平板上筛选柱状黄杆菌的接合子或者转化子时使用的抗生素浓度如下: 氯霉素(chloramphenicol, Cm)3.4 μg/mL, 托普霉素(tobramycin, To)1.0 μg/mL。筛选大肠杆菌转化子所使用的抗生素浓度为: 氯霉素 34 μg/mL, 卡那霉素(kanamycin, Km)25 μg/mL, 氨苄青霉素(ampicillin, Ap)100 μg/mL。

1.2 核酸提取

柱状黄杆菌基因组 DNA 和总 RNA 的提取, 以及质粒提取和琼脂糖凝胶中的 DNA 回收, 都是使用 Omega 公司的相应试剂盒完成的(Omega Bio-Tek Inc, USA)。DNA 和 RNA 的浓度和纯度测定使用 Eppendorf 公司的 Biophotometer 生物分

表 1 本研究所用的菌株和质粒
Tab. 1 Strains and plasmids used in this study

菌株或质粒 strain or plasmid	基因型和特征 genotype and relevant characteristic	来源或参考文献 source or reference
柱状黄杆菌 <i>Flavobacterium columnare</i>		
G ₄	野生型, 抗托普霉素、对氯霉素和壮观霉素敏感 wild-type, To ^R Cm ^S Sp ^S	[14]
GL002	pGL002 插入 G ₄ 的染色体后获得, 抗托普霉素和氯霉素 G ₄ derivative carrying pGL002 integrated into its chromosome, To ^R Cm ^R	[15]
GL002-D1	pGL002-D1 插入 G ₄ 的染色体后获得, 抗托普霉素和氯霉素 G ₄ derivative carrying pGL002-D1 integrated into its chromosome, To ^R Cm ^R	本研究 this study
GL002-D2	pGL002-D2 插入 G ₄ 的染色体后获得, 抗托普霉素和氯霉素 G ₄ derivative carrying pGL002-D2 integrated into its chromosome, To ^R Cm ^R	本研究 this study
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>		
DH5α	对氨苄青霉素、托普霉素、氯霉素、壮观霉素和卡那霉素敏感 Ap ^S To ^S Cm ^S Sp ^S Km ^S	Invitrogen
SM10 (<i>λpir</i>)	抗卡那霉素, 对托普霉素、氯霉素和壮观霉素敏感 Km ^R To ^S Cm ^S Sp ^S	[15]
质粒 plasmid	克隆载体, 抗氨苄青霉素 cloning vector, Ap ^R	TAKARA
pMD18-T		
载体 vector		
pGL002	7 kbp <i>Kpn</i> I - <i>Bam</i> H I 同源重组片段插入 pZJ002 后获得, 抗氨苄青霉素和氯霉素 7 kbp <i>Kpn</i> I - <i>Bam</i> H I SCF in pZJ002, Ap ^R Cm ^{R*}	[15]
pGL002-D1	将 pGL002 的 <i>Pacs</i> 区域减少至 321 bp 后获得, 抗氨苄青霉素和氯霉素 pGL002 derivative through minimizing <i>Pacs</i> region to 321 bp, Ap ^R Cm ^{R*}	本研究 this study
pGL002-D2	将 pGL002 的 <i>Pacs</i> 区域减少至 164 bp 后获得, 抗氨苄青霉素和氯霉素 pGL002 derivative through minimizing <i>Pacs</i> region to 164 bp, Ap ^R Cm ^{R*}	本研究 this study
pGL002-D3	将 pGL002 的 <i>Pacs</i> 区域减少至 81 bp 后获得, 抗氨苄青霉素和氯霉素 pGL002 derivative through minimizing <i>Pacs</i> region to 81 bp, Ap ^R Cm ^R	本研究 this study
pGL002-D4	将 pGL002 的 <i>Pacs</i> 区域减少至 71 bp 后获得, 抗氨苄青霉素和氯霉素 pGL002 derivative through minimizing <i>Pacs</i> region to 71 bp, Ap ^R Cm ^R	本研究 this study
pGL002-D5	将 pGL002 的 <i>Pacs</i> 区域减少至 46 bp 后获得, 抗氨苄青霉素和氯霉素 pGL002 derivative through minimizing <i>Pacs</i> region to 46 bp, Ap ^R Cm ^R	本研究 this study

注: ^R 代表抗生素抗性, ^S 代表抗生素敏感性. * 表示在大肠杆菌和柱状黄杆菌中都产生抗性。

Note: ^R indicates resistance. ^S indicates sensitivity. * indicates the resistance in *Escherichia coli* and *Flavobacterium columnare* G₄.

光光度计。

1.3 DNA 扩增及生物信息学分析

根据 GenomeWalker™ kit(Clontech)的使用说明书,使用表 2 中所列的引物连续进行 3 次基因组步移扩增,在将 PCR 产物进行序列测定后拼接获得了 *acs* 基因全长及其侧翼序列。使用软件 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进行核酸序列和氨基酸序列的比对,开放阅读框(open-reading frame, ORF)的确定使用 NCBI 网页上的 ORF Finder 软件。翻译后的氨基酸序列在 <http://www.expasy.org> 上进行结构域预测分析并使用 clustalx1.81 软件进行比对,其跨膜区用 DAS 软件进行分析。

1.4 转录起始位点的确定

通过快速扩增 5' cDNA 末端(5' RACE)的方法确定 *acs* 和 *cat* 的转录起始位点。5' RACE 扩增使

用 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends(Version 2.0, Invitrogen)进行。根据 *acs* 基因 ATG 下游 300 bp 的序列设计与其互补的引物 TSPacs1,并用该引物以 3 μg 柱状黄杆菌 G₄ 株的总 RNA 为模板逆转录合成第一链的 cDNA。用 RNase A/T mix 除去 cDNA 中的单链或者双链 RNA 后,使用末端转移酶在合成的 cDNA 3' 末端加上多聚的 dCTP。使用第二条特异引物 TSPacs2 和试剂盒中提供的桥连铆钉引物(AAP)对已经加尾的 cDNA 进行扩增,然后采用第三条特异引物 TSPacs3 和桥连通用扩增引物(AUAP)进行巢式 PCR。为了保证制备 RNA 过程中没有 DNA 污染,使用没有逆转录过的 RNA 为阴性对照。巢式 PCR 扩增的 PCR 片段在纯化回收后与 pMD18-T 载体连接并进行测序。通过同样的方法,使用引物

表 2 本研究用到的引物
Tab. 2 Primers used in this study

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 purpose
Wacs1-1	GAGTAAAAAACAAGAGGTAGGAAAATCGCA	DNA 步移
Wacs1-2	AATAAGAACAAAAATGCCAATCCAACAAG	DNA walking
Wacs2-1	AGTTGTTGAGCGAACCAAGAAAAGATAGA	
Wacs2-2	AGTGTGGCTGAAATAATGGATGCTGAAGA	
Wacs3-1	CCATGTAGGAGGGAAGCGTTGTCC	
Wacs3-2	CCTACTTATGCCACCTTGCCATTACCA	
AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC	
AP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT	
PacsR	TACATATGTTGCCTTTTTATAAAAT	不同长度 <i>acs</i> 基因上游区域的扩增
PacsF	ACCAACAGGCAATACAAG	amplification of different sizes of <i>acs</i> upstream region
PacsF1	GGAAAATCGCAAATCTAAGG	
PacsF2	GATAGAATAGAAAAAGAAAATGTA	
PacsF3	TTGCTCACTCATTAGAAATATGGTA	
PacsF4	ATTAGAAATATGGTATTTTCGCTTT	
PacsF5	TCAGAATTTAACGAGTCAT	
TSPacs1	TTTTCTATGCCTTGTTT	cDNA 第一链的合成 cDNA first-strand synthesis
TSPacs2	CGTTGTAACCTATCTTCTGTGCTT	5' RACE
TSPacs3	TTCTTCGGGGTTATTAGGTTCAA	
GSPCAT1	GTCTTTCATTGCCATAC	cDNA 第一链的合成 cDNA first-strand synthesis
GSPCAT2	GTTCTTTACGATGCCATTGGGA	5' RACE
GSPCAT3	CAACGGTGGTATATCCAGTG	
AAP	GGCCACGCGTCTGACTAGTACGGGIIIGGGIIIGGGIIIG	5' RACE 简并锚定引物 5' RACE abridged anchor primer
AUAP	GGCCACGCGTCTGACTAGTAC	简并通用扩增引物 abridged universal amplification primer

注:下划线标记的是限制内切酶识别位点。

Note: recognition site of restriction enzyme on the primers is underlined.

TSPcat1、TSPcat2 和 TSPcat3, 在柱状黄杆菌 GL002 中获得氯霉素抗性基因(chloramphenicol acetyltransferase, *cat*)的转录起始位点。

1.5 质粒 pGL002-D1、pGL002-D2、pGL002-D3、pGL002-D4 和 pGL002-D5 的构建及接合转移

以柱状黄杆菌 G₄ 株基因组 DNA 为模板, 使用正向引物 PacsF1、PacsF2、PacsF3、PacsF4 和 PacsF5, 分别同反向引物 PacsR 扩增出不同长度的 *acs* 上游调控序列片段(46~321 bp)。并按照构建 pGL002 的流程^[15], 构建出包含有不同长度 *acs* 启动子区域的质粒 pGL002-D1、pGL002-D2、pGL002-D3、pGL002-D4 和 pGL002-D5 后, 将上述质粒通过接合转移导入柱状黄杆菌 G₄。

2 结果与分析

2.1 *acs* 的 ORF 全长和侧翼序列扩增及分析

通过基因组步移的方法在 *algI* 基因的上游连续扩增, 获得了乙酰辅酶 A 合成酶基因(*acs*)的开放阅读框(ORF)全长和侧翼序列, 并提交至 NCBI 网站, GenBank 登录号是 AY387595。*acs* 全长共为 2 323 nt, 其 ORF 从起始密码子 ATG 到终止密码子 TGA 共 1 908 nt, 编码 635 个氨基酸, 推测其分子量为 72.0 kD, pI 理论值为 6.47。在起始密码子 ATG 的上游 10 nt 处找到了具有黄杆菌属特征的 Shine-Dalgarno 序列, 即核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)序列(TAAAA)。在终止密码子 TAA 下游 6 nt 处找到具有转录终止信号特征的反向重复序列(AAAATACAACCTGTAA AATAGA AAAAACAGGTTGTATTTT)。通过 Pfam 结构域分析, 发现其在 97~534 氨基酸处有 1 个 AMP 结合酶结构域。通过 DAS 对 ACS 序列进行分析, 发现 5 个跨膜区。其中位于 143~163 和 286~304 氨基酸的两个跨膜区十分明显。通过在 NCBI 上的 Blastp 程序对预测的 ACS 氨基酸序列进行比对, 发现它同包括黄杆菌属在内的 100 多个物种的 ACS 都具有 51% 以上的同一性。与同属黄杆菌属的 *Flavobacterium* sp. BAL38、*F. johnsoniae* UW101、*F. psychrophilum* JIP02/86 的 ACS 具有高的同一性, 达到了 81%~85%。因此, 可以

认为所扩增的柱状黄杆菌 *acs* 基因编码的蛋白应该是乙酰辅酶 A 合成酶或者是其同源体。

2.2 转录起始位点的确定及启动子保守基序分析

由于 *acs* 和 *algI* 两个基因的转录方向相反, 推测两者之间的非编码区含有启动子调控序列。张金^[15]将 *acs* 起始密码子上游 650 bp 的序列与氯霉素乙酰基转移酶(*cat*)融合获得了氯霉素抗性筛选标记(ACAT), 将含有该标记的质粒 pGL002 成功转入柱状黄杆菌后获得了具有稳定的氯霉素抗性的菌株。这说明这 650 bp 的区域里可能含有 *acs* 的启动子序列。为了分析柱状黄杆菌 *acs* 的启动子特征, 采用 5' RACE 的技术获得了 *acs* 和筛选标记 ACAT 中的 *cat* 基因的转录起始位点(transcriptional start position, TSP)。其 TSP 是位于起始密码子 ATG 上游 46 nt 处的“T”。在转录起始位点 T 的上游的-7 和-33 位置, 发现了保守序列 TATT TTCG 和 TTG(图 1)。

2.3 启动子的删减分析

为了验证上述启动子特征基序的重要性的确定启动子的最小长度, 本研究对 *Pacs* 进行了删减分析。通过 PCR 扩增获得了 46~321 bp 的 5 个 *Pacs* 片段, 并用它们构建了质粒 pGL002-D1、pGL002-D2、pGL002-D3、pGL002-D4 和 pGL002-D5。将这些质粒用于接合转移入柱状黄杆菌 G₄, 同时使用 pGL002 为对照。在 To⁺Cm⁺ Shieh 平板上筛选接合转移子, 并在划线纯化 3 次后从形态和分子水平确定其是否为阳性接合转移株。从图 1 可以看出, 质粒 pGL002-D1、pGL002-D2 和 pGL002 能够被接合转移进入柱状黄杆菌 G₄, 并赋予菌株氯霉素抗性。但是用质粒 pGL002-D3、pGL002-D4 和 pGL002-D5 接合转移柱状黄杆菌 G₄ 时, 没有在 To⁺Cm⁺ Shieh 平板上获得抗性克隆。这些结果表明, *Pacs* 区域的 3' 末端 164 bp 碱基对于保持稳定的启动子活性和驱动氯霉素抗性基因的表达是必需的。而恰好包含有启动子保守基序的质粒 pGL002-D3 并不能赋予柱状黄杆菌 G₄ 稳定的氯霉素抗性。这说明在 *Pacs* 区域除 TATTTTCG 和 TTG 基序之外还有一些其他的转录调控元件也是很重要的。

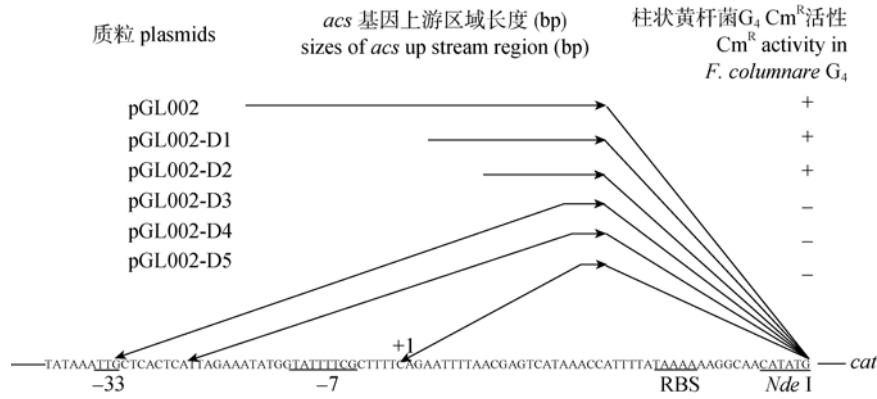


图 1 柱状黄杆菌乙酰辅酶 A 合成酶基因(*acs*)上游调控区域分析

质粒对柱状黄杆菌赋予的氯霉素抗性(Cm^R)通过 Shieh 琼脂平板(Cm, 3.4 μg/L)进行检测。“+”表示接合转移子具有氯霉素抗性,“-”表示接合转移子对氯霉素敏感。*acs* 上游调控区通过 *Nde* I 酶切位点与 *cat* 的开放阅读框进行人工融合。核糖体结合位点(RBS)基序 TAAAA 位于起始密码子上游 10 bp。转录起始位点(TSP)用+1 标注,在 TSP 上游的-7 和-33 区用下划线标明启动子保守基序。

Fig. 1 Analysis of upstream regulatory region of acetyl-coenzyme A synthetase gene *acs* of *Flavobacterium columnare G*₄. The chloramphenicol resistance (Cm^R) of plasmids in *Flavobacterium columnare G*₄ were measured on Shieh plates (Cm, 3.4 μg/L). “+” indicates resistance of the transconjugants to Cm, and “-” indicates susceptibility of the transconjugants to Cm. *Nde*I site was used to fuse *acs* upstream region and ORF of *cat*. The ribosome binding site (RBS) motif TAAAA is at 10 bp upstream of translation start codon. The transcriptional start position of *cat* is labeled as +1, and the two motifs corresponding to the -7 and -33 consensus sequences of promoter are underlined.

2.4 柱状黄杆菌 *G*₄ 核糖体结合位点的序列特征分析

Chen 等^[8]在对黄杆菌属的 *F. hibernum* W22 菌株核糖体结合位点进行特征分析和预测时,发现黄杆菌属的 RBS 具有一个共同的特征基序 TAAAA,但只涉及到柱状黄杆菌 1 个基因的 RBS。本研究比对了柱状黄杆菌 *G*₄ 32 个基因的 RBS 区域(基因起始密码子上游的 30 bp 序列),发现这 32 个 RBS 区域 AT 含量均较高(平均 78.1% 在前 30 bp 内,79.2% 在前 18 bp 内)。在这 32 个 RBS 区域里,发现了保守基序 TAAAA,尽管个别有些不同,该基序位于起始密码子 ATG 上游 1~14 bp(表 3)。

3 讨论

由于柱状黄杆菌的乙酰辅酶 A 合成酶很可能参与新陈代谢必须的乙酰辅酶 A 的合成,因此 *acs* 应该是持家基因。张金^[15]将 *acs* 起始密码子上游 650 bp 的序列与氯霉素抗性基因(*cat*)和壮观霉素抗性基因(*aadA*)的 ORF 分别融合,获得了能在柱状黄杆菌 *G*₄ 株细胞内起稳定筛选作用的氯霉

素抗性筛选标记 ACAT 和壮观霉素筛选标记 ASP。据此推测,在 *acs* 上游 650 bp 区域内有一个启动子调控序列。尽管有报道认为黄杆菌属基因转录起始位点更偏向位于碱基 A、G 或者 C^[8],但本研究通过 5' RACE 技术获得的 *acs* 和 ACAT 中 *cat* 的转录起始位点(TSP)都是位于起始密码子 ATG 上游 46 bp 的 T。TSP 的一致性说明,柱状黄杆菌细胞内的内源基因 *acs* 和外源基因 *cat* 的表达都是被包含在这 650 bp 内的同一启动子所驱动的。通过分析,在 TSP 上游的-7 和-33 区域发现了 TATTTTCG 和 TTG。这两个特征基序符合文献报道的 CFB 家族启动子特征 TANNTTTG 和 TTG^[8, 16-17],但它们不同于大肠杆菌等变形菌的相应保守基序 TATAAT 和 TTGACA^[18]。通过序列分析和比对,柱状黄杆菌 *G*₄ 32 个基因的可能 RBS 区域具有预测的黄杆菌属的典型特征:高 AT 含量和 TAAAA 保守基序^[8]。而在大多数原核细胞里面,与 16S RNA(起始蛋白合成的作用)的 3'末端互补的 RBS 保守基序是 AGGAGG^[19-20]。

CFB 家族细菌的启动子和 RBS 保守序列与大

表 3 柱状黄杆菌 G₄ 株 32 个基因可能的核糖体结合位点(RBS)区域的比对
 Tab. 3 Alignment of putative ribosome binding site (RBS) in 32 genes of *Flavobacterium columnare* G₄

基因 gene	核糖体结合位点 putative ribosome binding site	A-T 含量/% A-T content		来源* source
		In-30	In-18	
<i>clpx</i>	ctttgaactttacgacatttgact TGAAT a	70.0	66.7	this study
<i>rbfA</i>	actaattacaaaaattgtatggt TGCAA c	76.7	72.2	this study
<i>surE</i>	tttagcaagacttttttatgttt TAAAT aa	83.3	94.4	this study
<i>gldM</i>	attatTTaataactaaaaattc TAAAA ga	90.0	83.3	this study
<i>msbA</i>	aaatatcattaacgatatgcaat TGAAC ta	76.7	66.7	this study
<i>gldJ</i>	catcactTTaaataattacctac TGAAT gt	73.3	72.2	AY781294
<i>thmP</i>	atattttatcaacaaaacaaac TATTA act	83.3	77.8	EF140791
<i>ctp</i>	cataattttttatgtatTTtag TATTA gat	86.7	83.3	this study
<i>cirA</i>	cttctattttcatttagcttTgt TAGGA caa	70.0	66.7	this study
<i>algI</i>	tacctatgctgTTTTTTtaa TAAAA taaa	83.3	100	AY387595
<i>fcoI</i>	ttataaggagtttatatTTt TCAAT tcta	83.3	88.9	this study
<i>mrcA</i>	aatagaatcaatagaagaaaa TAAAT aatt	86.7	88.9	AY781295
<i>fco2</i>	ataggtatatttgatcaaa TAGAA ctgcg	66.7	55.6	this study
<i>atoD</i>	tacagacgaatttgatta TAAAC acaact	70.0	72.2	AY781295
<i>map</i>	ttgcttttatagaaacac TAAAA agtaaaa	80.0	83.3	AY387596
<i>aniA</i>	acaaatacaataatatt TAAAA ttacattt	90.0	94.4	AY387597
<i>gldH</i>	gacccaaaaataatagg TCAAA aaacagaa	70.0	72.2	AY781295
<i>uspA</i>	gatagactatcataac TAAAA cttatatat	80.0	88.9	this study
<i>clpP</i>	taaacctctaaacttt TAAAC taatagtaa	80.0	88.3	this study
<i>gldL</i>	attataggaacttaac TAAAA tttattatt	93.3	94.4	this study
<i>fco3</i>	gatataatttTgtctaaa TAAAA aaaataga	86.7	94.4	this study
<i>pop</i>	ttaaaaaaagcaggta TAGAA ggaatcgtt	70.0	61.1	AY387598
<i>acs</i>	tcataaaccatttta TAAAA aaggcaatc	76.7	77.8	AY387595
<i>clsA</i>	atagggctgTTTTtg TAATT cacaaaaatt	73.3	83.3	AY912281
<i>murF</i>	gggattttatttttt TAGTA ctttagcttt	76.7	77.8	AY781294
<i>crp</i>	gcacacctttttcgg TAATT tccgaaagta	60.0	61.1	EF501979
<i>fco4</i>	cagaaccttatctt TGAAT aaactatttag	73.3	83.3	This study
<i>lpxB</i>	cttctagcaatttt TACAC tttttgtatag	73.3	77.8	this study
<i>fjo17</i>	tatgcagcggaatt TAAAA tcgaaatagaa	66.7	77.8	AY781295
<i>fco5</i>	aaaaatcaaaat TCAAA attcaccgattata	83.3	77.8	this study
<i>fco6</i>	ttacctaacatt TAAAA tcaaaaatctatt	83.3	88.9	this study
<i>fjo24</i>	atattgtcaaa TAATT tggtttacttTgtgt	76.7	72.2	AY781294
平均值 mean		77.9	79.5	
共有序列 consensus	T _{32/32} A _{24/32} A _{24/32} A _{25/32} A _{21/32}			

注: *表示该列中的序列号为 GenBank 的序列号. 比对的是起始密码子上游的 30 个脱氧核苷酸序列. 可能的 RBS 保守基序用大写字母标明并同时列在下面. 百分比分别表示起始密码子上游 30 bp 和 18 bp 之内的 AT 含量. # 表示 32 个可能的 RBS 区域的平均 AT 含量. 没有标明 GenBank 登录号的是本实验室获得但尚未报道的 RBS 区域序列.

Note: * donates the accessing numbers in the line are the GenBank accessing numbers. The 30 bp nucleotide sequences at upstream of the start codon were chosen for comparison. The putative consensus RBSs are indicated with capital letters. The AT contents of the region between 30 bp and 18 bp at upstream of the start codon are given as percentages, and the symbol # indicates the average AT content of the 32 RBSs. Genes without accession numbers are unpublished data of our laboratory.

肠杆菌等其他一些变形细菌不同,这说明它们之间具有比较大的遗传距离和不同的遗传调控方式,包括在转录和翻译方面起作用的调控序列特征及其信号。CFB 家族中的拟杆菌属的 *Bacteroides fragilis* 就是一种比较独特的革兰氏阴性细菌,因为来自其他细菌的基因往往不能在它的细胞中表达。有实验证明各种大肠杆菌保守启动子,包括 *rrnB* P1P2、*Ptac* 和 *Ptrc*, 都不能驱动 *cat* 在 *B. fragilis* 中表达,而来自于 *B. fragilis* 的启动子却能够驱动 *cat* 的转录并建立起适合该菌的 CAT 报告系统^[16, 21]。这些也许可以解释为什么在变形菌中广泛应用的筛选标记、报告系统、转座子和质粒等遗传操作元件,不能在柱状黄杆菌中应用。这些遗传元件的启动子不能被柱状黄杆菌细胞内的 RNA 聚合酶识别,从而使外源基因不能在宿主细胞内表达。本研究克隆的遗传元件将可用来对启动子进行改造,并将会为 CFB 家族细菌的遗传操作系统的构建带来突破。

参考文献:

- [1] Bernardet J F, Segers P, Vancanneyt M, et al. Cutting a Gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family Flavobacteriaceae, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait1978)[J]. Int J Syst Bacteriol, 1996, 46: 128–148.
- [2] Koski P, Hiervelä-Koski V, Bernardet J F. *Flexibacter columnaris* infection in arctic char (*Salvelinus alpinus* L.): First isolation in Finland[J]. Bull Eur Assoc Fish Pathol, 1993, 13: 66–69.
- [3] Wagner B A, Wise D J, Khoo L H, et al. The epidemiology of bacterial diseases in food-size channel catfish [J]. J Aquat Anim Health, 2002, 14: 263–272.
- [4] Staroscik A M, Hunnicutt D W, Archibald K E, et al. Development of methods for the genetic manipulation of *Flavobacterium columnare*[J]. BMC Microbiol, 2008, 8: 115–125.
- [5] Alvarez B, Secades P, McBride M J, et al. Development of genetic techniques for the psychrotrophic fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70: 581–587.
- [6] McBride M J, Kempf M J. Development of techniques for the genetic manipulation of the gliding bacterium *Cytophaga johnsoniae*[J]. J Bacteriol, 1996, 178: 583–590.
- [7] Su H S, Shao Z Q, Tkalec L, et al. Development of a genetic system for the transfer of DNA into *Flavobacterium heparinum*[J]. Microbiology, 2001, 147: 581–589.
- [8] Chen S, Bagdasarian M, Kaufman M G, et al. Characterization of strong promoters from an environmental *Flavobacterium hibernum* strain by using a green fluorescent protein-based reporter system[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73: 1089–1100.
- [9] Shoemaker N B, Anderson K L, Smithson S L, et al. Conjugal transfer of a shuttle vector from the human colonic anaerobe *Bacteroides uniformis* to the ruminal anaerobe *Prevotella (Bacteroides) ruminicola* B₁₄[J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57: 2114–2120.
- [10] Cozzzone A J. Regulation of acetate metabolism by protein phosphorylation in enteric bacteria[J]. Ann Rev Microbiol, 1998, 52: 127–164.
- [11] Berg P. Acyl adenylates: an enzymatic mechanism of acetate activation[J]. J Biol Chem, 1956, 222: 991–1013.
- [12] 谢海峡. 柱状黄杆菌毒力相关因子研究[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2005.
- [13] Decostere A, Haesebrouck F, Devriese L A. Shieh medium supplemented with tobramycin for selective isolation of *Flavobacterium columnare (Flexibacter columnaris)* from diseased fish[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35: 322–324.
- [14] Lu Q Z, Ni D S, Ge R F. Studies on the gill diseases of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) I. Isolation of a myxobacterial pathogen [J]. Acta Hydrobiol Sin, 1975, 5: 315–334.
- [15] 张金. 柱状黄杆菌基因转移系统的构建及应用[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2005.
- [16] Bayley D P, Rocha E R, Smith C J. Analysis of *cepA* and other *Bacteroides fragilis* genes reveals a unique promoter structure[J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 193: 149–154.
- [17] Hunnicutt D W, Kempf M J, McBride M J. Mutations in *Flavobacterium johnsoniae gldF* and *gldG* disrupt gliding motility and interfere with membrane localization of GldA[J]. J Bacteriol, 2002, 184: 2370–2378.
- [18] Hawley D K, McClure W R. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences[J]. Nucl Acids Res, 1983, 11: 2237–2255.
- [19] Ringquist S, Shinedling S, Barrick D, et al. Translation initiation in *Escherichia coli*: sequences within the ribosome-

- binding site[J]. *Mol Microbiol*, 1992, 6: 1219–1229.
- [20] Vellanoweth R L, Rabinowitz J C. The influence of ribosome binding-site elements on translational efficiency in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli in vivo*[J]. *Mol Microbiol*, 1992, 6: 1105–1114.
- [21] Smith C J, Rogers M B, McKee M L. Heterologous gene expression in *Bacteroides fragilis*[J]. *Plasmid*, 1992, 27: 141–154.

Acetyl-coenzyme A synthetase gene and its upstream promoter in the bacterial pathogen *Flavobacterium columnare*

ZHANG Jin, ZOU Hong, YAO Weijian, NIE Pin

State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China

Abstract: *Flavobacterium columnare*, the etiological agent of columnaris disease, is one of the most important bacterial pathogens of freshwater fish in the world. However, suitable genetic manipulation of this bacterium which has been challenging and producing genetic mutations in this bacterium has not been reported. Therefore, isolation of an effective promoter in *F. columnare* may provide tools for the development of a genetic manipulation system in the bacterium. In this study, the acetyl-coenzyme A synthetase gene (*acs*) and flanking sequences were analyzed to determine promoter function. The *acs* gene is 2 323 bp long, encoding a protein of 635 amino acids. A TAAAA motif was identified as the conserved sequence for ribosome binding site (RBS) and TATTTTCG and TTG were determined to be -7 and -33 promoter motifs, upstream of the *acs* start codon. When a plasmid was constructed containing the *acs* upstream regulation sequence (*Pacs*) fused upstream of the chloramphenicol acetyltransferase (*cat*) gene and was introduced into *F. columnare* G₄ strain, the host cells gained chloramphenicol (Cm) resistance. The transcriptional start position (TSP) of *acs* and *cat* was both determined to be T locating 46 bp upstream of the start codon. Deletion analysis of the promoter showed that at least 164 bp nucleotides upstream of the start codon were required for promoter activity and for the expression of CAT to sufficiently confer the resistance in *F. columnare*. Nucleotide analysis and alignment of the putative RBS for 32 protein-coding genes in *F. columnare* G₄ revealed the conserved RBS consensus, TAAAA, in *Flavobacterium* located 10 bp upstream of start codon of *acs*. The current study described the first successful construction of a plasmid that was able to express cloned genes in *F. columnare*, which will allow further studies of the important columnaris disease in fish.

Key words: *Flavobacterium columnare*; acetyl-coenzyme A synthetase gene; promoter; ribosome binding site

Corresponding author: NIE Pin. E-mail: pinnie@ihb.ac.cn