

集胞藻PCC6803中S2P蛋白酶假定底物的体外诱导表达及纯化

秦春燕, 陈 谷*

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘要: 金属蛋白酶S2P同源蛋白在行光合作用的蓝藻中广泛存在。S2P蛋白酶通过在膜切割转录调控因子(anti- σ 因子), 释放 σ 因子来参与胁迫响应是跨膜信号转导的保守机制。集胞藻PCC6803中S2P蛋白酶参与胁迫响应的跨膜信号转导, 但其作用机理及底物均未明确。经过深入考察分析, 实验锁定了4对 σ 因子和anti- σ 因子的组合: SigE-ChlH(Slr1055)、SigI(Sll0687)-Sll0688、SigG(Slr1545)-Slr1546及SigH(Sll0856)-Sll0857。以pET-30b(+)为载体, 通过重组表达纯化, 成功获得一系列S2P假定底物的重组蛋白: 全长anti- σ 因子及截去羧基端部分序列的截短片段, 包括Slr1055、Slr1055 Δ (1~232)、Sll0688、Sll0688 Δ (1~152)、Slr1546、Slr1546 Δ (1~174)、Sll0857、Sll0857 Δ (1~101)和大肠杆菌的S2P底物RseA(1~148)。为下一步在体外重构S2P蛋白酶与底物的酶切体系、阐释蓝藻体内S2P介导的级联信号转导机制奠定了基础。

关键词: 第二位点蛋白酶(S2P); 底物; anti- σ 因子; 原核表达; 纯化

Expression and Purification of Putative Substrates of the Site-2 Protease Homologs from *Synechocystis* sp. PCC6803

QIN Chun-yan, CHEN Gu*

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Nearly all cyanobacterial species contain genes encoding site-2-protease (S2P) homologs. Some S2P homologs have been reported to play essential roles in regulating stress response through intramembrane proteolysis of membrane-bound anti-sigma factors. However, the mechanism of action and substrates of S2P in *Synechocystis* sp. PCC6803, Sll0862, Slr0643, Sll0528 and Slr1821 remain unsolved. In this study, we focused on the four sigma factor-anti sigma factor pairs, SigE-ChlH(Slr1055), SigI(Sll0687)-Sll0688, SigG(Slr1545)-Slr1546 and SigH(Sll0856)-Sll0857. Using pET-30b(+) as vector, we constructed recombinant plasmids, optimized expression and successfully purified the full length and truncated fragment of putative substrates, including Slr1055, Slr1055 Δ (1~232), Sll0688, Sll0688 Δ (1~152), Slr1546, Slr1546 Δ (1~174), Sll0857 and Sll0857 Δ (1~101) as well as RseA(1~148), the S2P substrate from *E.coli*. This work may lay the foundation for constructing in vitro enzymatic digestion system to justify the relationship of various S2Ps with their putative substrates.

Key words: site-2 protease; substrate; anti- σ factor; prokaryotic expression; purification

中图分类号: Q816

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)09-0114-07

doi:10.7506/spkx1002-6630-201309025

蓝细菌是一类分布广泛、行光合作用的原核生物, 被认为是植物叶绿体的祖先。它是研究光合生物基因表达调控的模式生物^[1], 其胁迫响应机理一直是该领域的研究热点。当胁迫压力超过一定的阈值时, 生物体会感知环境变化并将胁迫信号转导到基因转录区域以调控响应基因的表达, 通过激活一系列响应基因的转录、合成特定蛋白、生成特定代谢物来应对胁迫。这个过程涉及跨

膜信号转导^[2]。蓝细菌基因组中包含9个 σ 因子^[3], 不同的 σ 因子的替换被认为是应对环境或细胞内变化改变基因表达模式的关键。其中SigG、SigH、SigI的功能未知, 但被推断为胞外功能 σ 因子(ECF σ)^[3]。细菌中的研究发现大部分负责响应胞外刺激和胁迫压力的ECF σ 因子, 其活力受到相对应并共转录的跨膜anti- σ 因子结合抑制, 在外界压力胁迫条件下, 金属蛋白酶S2P(Site-2-Protease)在膜切

收稿日期: 2013-03-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31270085)

作者简介: 秦春燕(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为蓝细菌分子生物学。E-mail: xinqing2833@126.com

*通信作者: 陈谷(1973—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为微藻功能基因组与生物能源。E-mail: chengu@scut.edu.cn

割anti- σ 因子跨膜区域解除对 σ 因子的抑制，启动一系列 σ 因子识别基因的转录^[4-5]。

集胞藻PCC6803中有4个S2P同源蛋白：Slr0682、Slr0643、Slr0528、Slr1821^[6]，但其功能扑朔迷离。在此前的研究中发现，弱酸胁迫响应条件下(pH6.5)，slr0643缺失突变体 Δ slr0643与野生型(wild type, WT)相比生长停滞，提示Slr0643可能参与这一胁迫响应过程^[7]，slr0682缺失突变体在氧化和热胁迫响应中出现异常^[8]，但其作用机理及底物均未明确。通过系统考察各个物种中S2P作用机理和底物特征，并深入分析集胞藻PCC6803的9个 σ 因子及anti- σ 因子，发现了几对 σ 因子和anti- σ 因子的组合：SigE-ChlH(Slr1055)^[9]、SigI(Slr0687)-Slr0688、SigG(Slr1545)-Slr1546及SigH(Slr0856)-Slr0857。这些anti- σ 因子是否作为S2P底物被S2P剪切，从而介导胁迫信号级联转导呢？这是个非常有趣的问题。此外，文献报道S2P对底物的剪切发生在S1P切割之后，且S2P剪切底物的效率受底物(跨膜蛋白anti- σ 因子)的羧基端氨基酸影响^[10]。例如，在体外大肠杆菌S2P蛋白酶(RseP)不能直接切割其底物RseA全长，但能有效切割其底物的截短片段RseA Δ (1~140)^[10-12]。

故而通过体外重组系统，诱导表达并纯化几个可能的S2P底物，包括全长及截去羧基端部分序列的截短片段：Slr1055及Slr1055 Δ (1~232)、Slr0688及Slr0688 Δ (1~152)、Slr1546及Slr1546 Δ (1~174)、Slr0857及Slr0857 Δ (1~101)和RseA(1~148)^[10]，为构建体外酶切体系，验证S2P与anti- σ 因子之间酶与底物的关系提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

集胞藻PCC6803(*Synechocystis* sp. PCC6803) 美国模式培养物集存库；大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH10B、BL21(CE3) 日本TaKaRa公司；pET-30b(+)质粒 美国Novagen公司。

1.1.2 试剂与仪器

限制性内切酶BamH I、Xho I、Nde I、EcoR I、HindIII、T4 DNA连接酶、蛋白质Marker 加拿大Fermentas公司；Pfu DNA聚合酶、质粒DNA提取试剂盒及胶回收试剂盒 日本TaKaRa公司；DNA Marker 广州东盛生物科技有限公司；Ni-IDA蛋白纯化树脂 美国Novagen公司；胰蛋白胨、酵母粉、乳糖、IPTG、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、四甲基二乙胺 美国Sigma公司；PCR仪iCycle、电泳装置 美国Bio-Rad公司；UV2300紫外分光光度计 上海天美科学仪器有限公司；其余试剂均为国产分析纯或生化试剂。

1.1.3 培养基

LB培养基：胰蛋白胨10g/L、酵母粉5g/L、NaCl

10g/L，调节pH 7.0；32Y培养基：酵母粉32g/L、胰蛋白胨8g/L、甘油0.5%、NaCl 100mmol/L、Tris-HCl 10mmol/L(pH7.6)；M9培养基：Na₂HPO₄ 30g/L、KH₂PO₄ 15g/L、NH₄Cl 5g/L、葡萄糖2g/L、硫胺素500μg/L。

1.2 重组质粒的构建

1.2.1 引物合成

在Cyanobase数据库中(<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/> Synechocystis)获取slr1055、slr0688、slr1546、slr0857及其片段基因序列，采用Primer 5软件设计引物(表1)。引物由上海英骏生物技术有限公司广州分公司合成。

表1 PCR扩增所用的引物

Table 1 PCR primers used for DNA amplification

引物编号	引物序列(5'→3')	大小/bp	酶切位点
CG80-A	CGCGGATCCGATGTTACTAACGTCAAGTC	30	BamHI
CG80-B	CCGCTCGAGTTCAACCCCTTCATG	25	Xho I
Q7	CCGCTCGAGTTAGGGATAGACCCTGGCTC	30	Xho I
CG92-A	CCGGAATTGATGGAATCCCTAAACCGATC	31	EcoRI
CG92-B	CCCAAGCTTAGATTGGAAAGCGCTG	27	HindIII
Q4	CCGCTCGAGTTAAAGAAGATAACTACCTGACGA	34	Xho I
CG93-A	CGCGGATCCGGTGTCCAACTTGTGAGGAG	30	BamHI
CG93-B	CCCAAGCTTATGCAGCCCTGTCCGC	27	HindIII
Q5	CCGCTCGAGTTACGATCGCCGGTC	27	Xho I
Q6-A	CGCGGATCCGATGTCCTTAACCCTTAA	30	BamHI
Q6-B	CCGCTCGAGTTATCCCGTGGGGAT	26	Xho I
Q6	CCGCTCGAGTTAGATGGAGCCAGACCAA	28	Xho I
CG94-A	CCGGAATTGATGCAGAAAACAACCTTCCGC	33	EcoRI
CG94-B	CCGCTCGAGTACCGGGCTGGTTACCCATC	31	Xho I

1.2.2 PCR扩增

采用改进的CTAB法提取集胞藻PCC6803基因组DNA，以其为模板进行PCR扩增。反应体系：0.5μL PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase、10μL PCR Buffer(Mg²⁺ plus)、4μL dNTPs、1μL基因组模板，上下游引物各1μL(10μmol/L)，ddH₂O补足体积至50μL。反应条件：94℃、3min，98℃、10s，58℃、15s，72℃、2min，72℃、5min。反应30个循环，取5μLPCR产物，经1%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.2.3 构建重组质粒

将PCR产物和pET-30b(+)载体经相应的内切酶切，回收目的基因和载体片段，经T4 DNA连接酶22℃、10min连接后再经16℃连接过夜，取连接产物，转化感受态*E.coli* DH10B。次日挑取单克隆，利用快速筛选法、PCR验证、质粒双酶切鉴定筛选阳性克隆，并送上海英骏生物技术有限公司广州分公司进行DNA测序，鉴定正确的质粒分别命名为pF1055(CG80-A/CG80-B)、pF1055 Δ (CG80-A/Q7)、pF0688(CG92-A/CG92-B)、pF0688 Δ (CG92-A/Q4)、pF1546(CG93-A/CG93-B)、pF1546 Δ (CG93-A/Q5)、pF0857(Q6-A/Q6-B)、pF0857 Δ (Q6-A/Q6)、pFRseA(CG94-A/CG94-B)。

1.3 集胞藻6803中S2P蛋白酶假定底物的诱导表达和表达产物的分离纯化

1.3.1 Slr1055及Slr1055 Δ 、Slr0688及Slr0688 Δ 、Slr1546及Slr1546 Δ 、Slr0857及Slr0857 Δ 和RseA(1~148)诱导表达

将鉴定正确的重组质粒pF1055、pF1055 Δ 、pF0688、pF0688 Δ 、pF1546、pF1546 Δ 、pF0857、pF0688 Δ 、pFRseA均转化感受态*E.coli* BL21(CE3)，铺至含50 μ g/mL卡那霉素(Kana)的LB培养皿上，次日，挑选单菌落，接种至5~10mL含有相应抗生素的LB液体培养基中，37℃培养过夜。按照1%接种量将过夜培养的菌液接种至10mL含相应抗生素的不同培养基(LB、32Y、M9)中，待菌液生长至 A_{600nm} 至1.0左右时，加入IPTG或 α -乳糖至不同的终质量浓度，不同温度下诱导表达过夜。取样进行SDS-PAGE分析，以诱导前的菌液作为对照，进行同样操作。

1.3.2 诱导表达产物的分离纯化

收集100mL诱导表达的菌体，加入10mL结合缓冲液(0.5mol/L NaCl、20mmol/L Tris-HCl、5mmol/L咪唑，pH7.9)，冰浴超声裂解细胞(工作3s，间隔3s，功率250W)至澄清透明，4℃收集菌体，16100 $\times g$ 离心20min，收集上清经0.45 μ m滤膜过滤，调节pH值至7.9。用IDA His Bind树脂直接纯化上清中的目的蛋白，用不同浓度的咪唑溶液梯度洗脱，纯化产物经SDS-PAGE分析检测浓度和分子质量，纯化蛋白样品保存于-80℃备用。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的构建

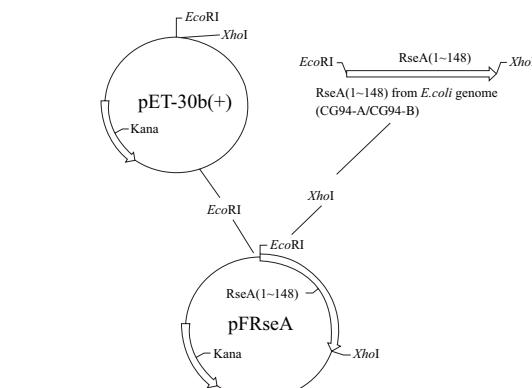
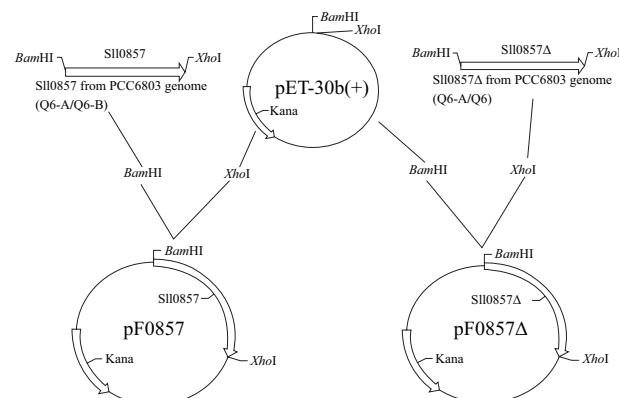
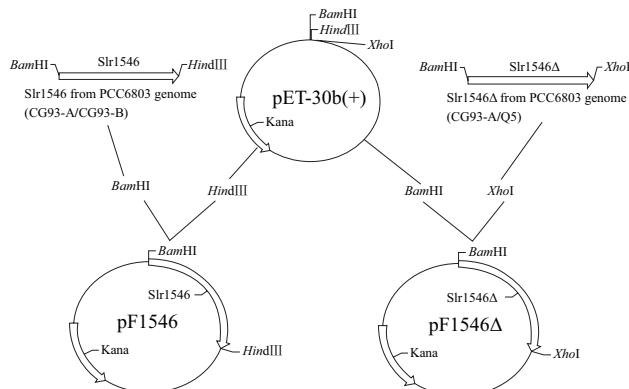
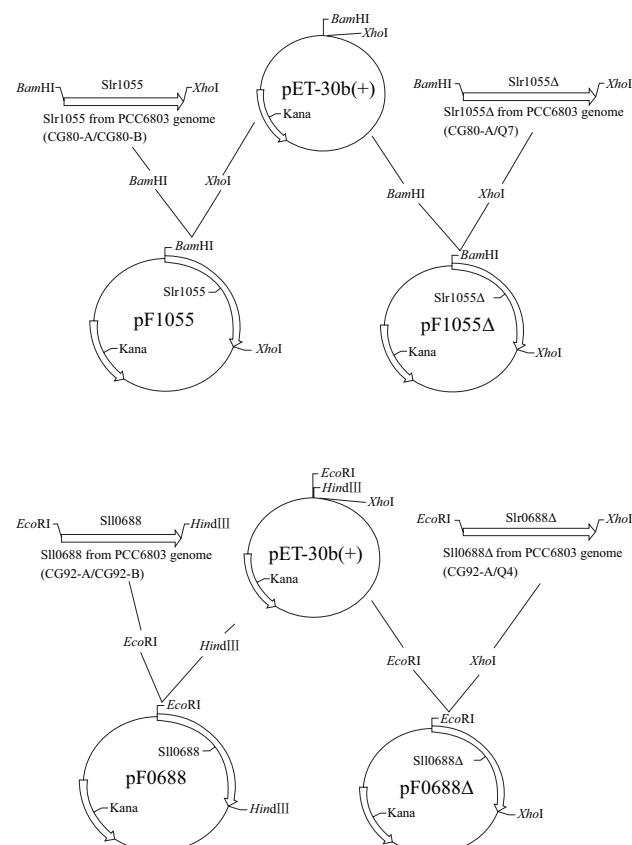
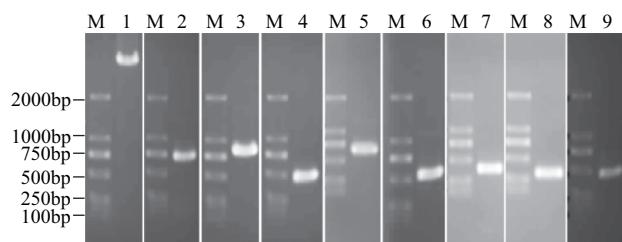


图1 重组质粒构建流程图

Fig.1 Flow chart of the construction of recombinant plasmids

以表1相应的引物从集胞藻PCC6803基因组中扩增出相应的目的基因并连接到pET-30b(+)载体中，构建流程见图1。用快速筛选法筛选阳性菌落进行PCR及酶切鉴定(图2)。鉴定正确的质粒进行了测序鉴定，确保目的片段正确插入pET-30b(+)中。

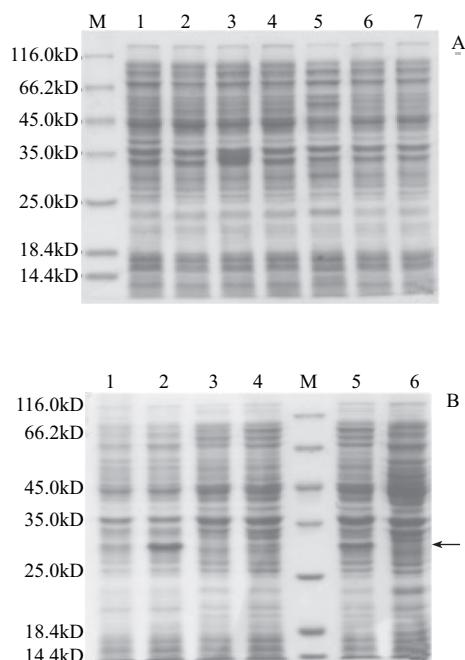


泳道M. DNA Marker; 泳道1. 以pF1055重组质粒为模板(3999bp); 泳道2.以pF1055 Δ 重组质粒为模板(699bp); 泳道3.以pF0688重组质粒为模板 (807bp); 泳道4.以pF0688 Δ 重组质粒为模板(459bp); 泳道5.以pF1546重组质粒为模板(642bp); 泳道6.以pF1546 Δ 重组质粒为模板(525bp); 泳道7.以pF0857重组质粒为模板(327bp); 泳道8.以pF0857 Δ 重组质粒为模板(306bp); 泳道9.以pFRseA重组质粒为模板(447bp)。

图2 重组质粒PCR产物的鉴定
Fig.2 Identification of recombinant plasmids

2.2 集胞藻PCC6803中S2P假定底物诱导表达条件的优化

2.2.1 RseA重组蛋白表达条件优化



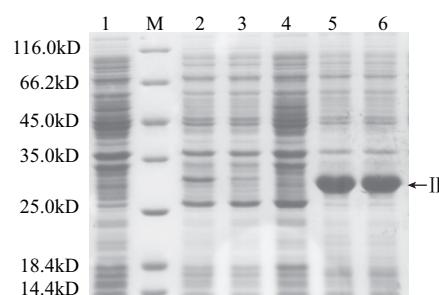
图A: 泳道M. 蛋白Marker; 泳道1、2、4. LB培养基中分别添加0.2、0.6、1.0mmol/L IPTG, 37℃条件下诱导10h; 泳道3.未诱导对照; 泳道5、6. LB培养基中添加0.2、0.8mmol/L IPTG, 29℃条件下诱导10h; 泳道7. LB培养基中添加0.2% α -乳糖, 29℃条件下诱导10h。图B: 泳道M. 蛋白Marker; 泳道1、2. 32Y培养基中添加0.2mmol/L IPTG, 22℃条件下分别诱导4、10h; 泳道3、4. 32Y培养基中分别添加0.02%、0.2% α -乳糖, 22℃条件下诱导10h; 泳道5. M9培养基中添加0.2% α -乳糖, 22℃条件下诱导10h; 泳道6. 未诱导对照; I.诱导的RseA蛋白。

图3 重组蛋白RseA的诱导表达
Fig.3 Induced expression of putative substrates of RseA

由于大肠杆菌中S2P蛋白酶RseP底物的RseA(1~148)是大肠杆菌体内的蛋白, 表达过程中容易被体

内蛋白酶降解, 故其诱导表达具有一定难度。实验通过IPTG浓度、培养基及温度等条件的优化, 成功诱导出RseA蛋白(图3A、B)。并得到RseA最佳诱导表达条件: 32Y培养基中添加0.2mmol/L IPTG在22℃条件下诱导10h(图3B泳道2)。

2.2.2 Slr1546 Δ 重组蛋白表达条件优化

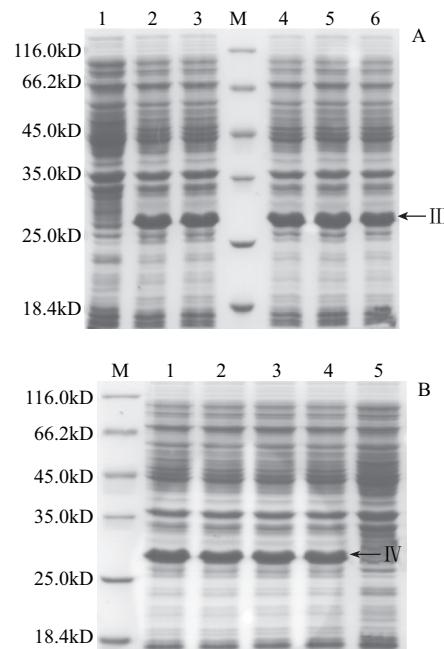


泳道M. 蛋白Marker; 泳道1、3、4. 未诱导对照; 泳道2、5、6. LB培养基中添加0.4mmol/L IPTG, 37℃条件下诱导4、10h和过夜; II.诱导的Slr1546 Δ 蛋白。

图4 重组蛋白Slr1546 Δ 的诱导表达
Fig.4 Induced expression of putative substrates of Slr1546 Δ

由图4可知, 诱导表达时间对Slr1546 Δ 重组蛋白的表达影响较大, 最优表达条件为LB培养基中添加0.4mmol/L IPTG在37℃条件下诱导10h以上(泳道5、6)。

2.2.3 Sll0688 Δ 重组蛋白表达条件优化

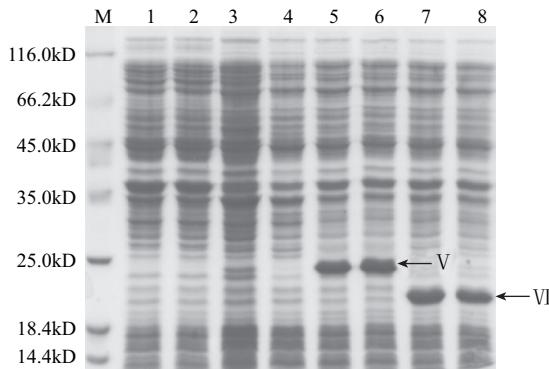


图A: 泳道M. 蛋白Marker; 泳道1.未诱导对照; 泳道2~6. LB培养基中添加0.4mmol/L IPTG, 37℃条件下诱导8、10h、过夜。图B: 泳道1、2. 32Y培养基中添加0.4mmol/L IPTG, 37℃条件下诱导6、8h; 泳道3、4. 32Y培养基中添加0.4mmol/L IPTG, 22℃条件下诱导10h、过夜; III、IV. 诱导的Sll0688 Δ 蛋白。

图5 重组蛋白Sll0688 Δ 的诱导表达
Fig.5 Induced expression of putative substrates of Sll0688 Δ

由图5可知，在LB、32Y培养基中添加0.4mmol/L IPTG在37℃条件下诱导8h以上Sll0688 Δ 重组蛋白均可得到高效表达。

2.2.4 Sll0857与Sll0857 Δ 重组蛋白表达条件优化



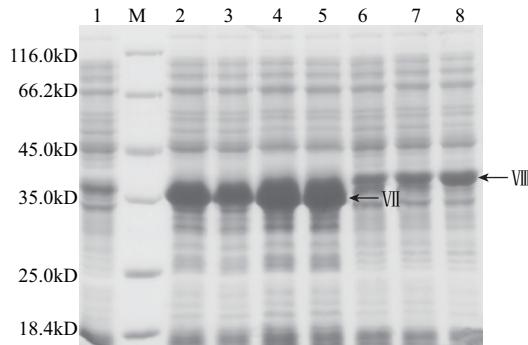
泳道M. 蛋白Marker; 泳道1~4. 未诱导对照; 泳道5、6. 32Y培养基中添加0.4mmol/L IPTG, 22℃条件下诱导8、10h; 泳道7、8. 32Y培养基中添加0.4mmol/L IPTG, 22℃条件下诱导8、10h; V. 诱导的Sll0857蛋白; VI. 诱导的Sll0857 Δ 蛋白。

图6 重组蛋白Sll0857及Sll0857 Δ 的诱导表达

Fig.6 Induced expression of putative substrates of Sll0857 and Sll0857 Δ

由图6可知，Sll0857 and Sll0857 Δ 重组蛋白诱导表达条件为：32Y培养基中添加0.4mmol/L IPTG在37℃条件下诱导8h以上。

2.2.5 Slr1546与Sll0688重组蛋白表达条件优化



泳道M. 蛋白Marker; 泳道1. 未诱导对照; 泳道2. LB培养基中添加0.4mmol/L IPTG, 37℃条件下诱导10h; 泳道3、4、5. LB培养基中添加0.4mmol/L IPTG, 22℃条件下诱导8、10h、过夜; 泳道6、7. LB培养基中添加0.4mmol/L IPTG, 37℃条件下诱导10h、过夜; 泳道8. 32Y培养基中添加0.4mM IPTG, 22℃条件下诱导过夜; VII. 诱导的Slr1546蛋白; VIII. 诱导的Sll0688蛋白。

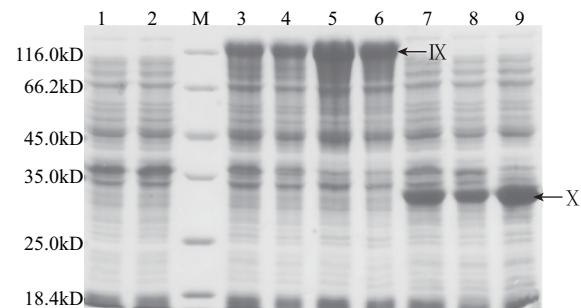
图7 重组蛋白Slr1546及Sll0688的诱导表达

Fig.7 Induced expression of putative substrates of Slr1546 and Sll0688

由图7可知，在32Y培养基中添加0.4mmol/L IPTG在

37℃条件下诱导8h以上，Slr1546及Sll0688重组蛋白均能得到有效表达。

2.2.6 Slr1055与Slr1055 Δ 重组蛋白表达条件优化



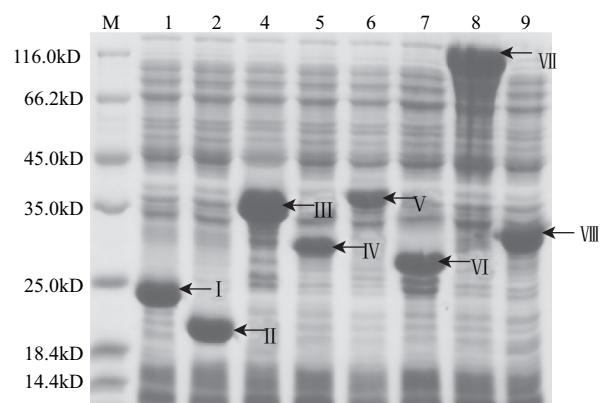
泳道M. 蛋白Marker; 泳道1、2. 未诱导对照; 泳道3、4. LB培养基中添加0.4mmol/L IPTG, 37℃条件下诱导8、10h; 泳道5、6. 32Y培养基中添加0.4mmol/L IPTG, 22℃条件下诱导8、10h; 泳道7、8. LB培养基中添加0.4mmol/L IPTG, 22℃条件下诱导8、10h; 泳道9. 32Y培养基中添加0.4mmol/L IPTG, 22℃条件下诱导过夜; IX. 诱导的Slr1055蛋白; X. 诱导的Slr1055 Δ 蛋白。

图8 重组蛋白Slr1055及Slr1055 Δ 的诱导表达

Fig.8 Induced expression of putative substrates of Slr1055 and Slr1055 Δ

由图8可知，在32Y培养基中添加0.4mmol/L IPTG在37℃条件下诱导8h以上，Slr1055及Slr1055 Δ 重组蛋白均能得到有效表达。

2.3 S2P假定底物的诱导表达



M. 蛋白Marker; I. 诱导的Sll0857蛋白; II. 诱导的Sll0857 Δ 蛋白; III. 诱导的Slr1546蛋白; IV. 诱导的Slr1546 Δ 蛋白; V. 诱导的Sll0688蛋白; VI. 诱导的Sll0688 Δ 蛋白; VII. 诱导的Slr1055蛋白; VIII. 诱导的Slr1055 Δ 。

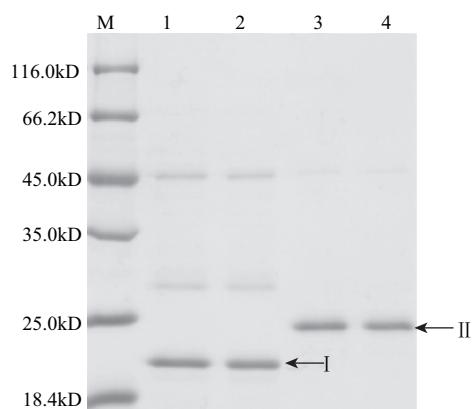
图9 S2P假定底物的诱导表达

Fig.9 Induced expression of putative substrates of site-2-proteases

由上述实验可知，成功诱导表达了各个假定底物：Slr1055及Slr1055 Δ (1~232)、Sll0688及Sll0688 Δ (1~152)、Slr1546及Slr1546 Δ (1~174)、Sll0857及Sll0857 Δ (1~101)。

2.4 集胞藻PCC6803中S2P假定底物的表达纯化

之前对 $\Delta slr0643$ (*slr0643*缺失突变体)与野生型的弱酸胁迫响应差异进行了基因芯片分析^[6],发现Slr0643很可能通过基因簇 $sll0856-sll0857-sll0858$,控制Sigma因子(σ^H , $Sll0856$)的表达,即Slr0643/Sll0857/SigH通过S2P/anti-sigma factor/sigma factor的级联信号转导模式调控酸胁迫下基因的转录^[6]。因此首先重点纯化了Sll0857以及其片段Sll0857 Δ ,得到纯度较高的重组蛋白,如图10所示。

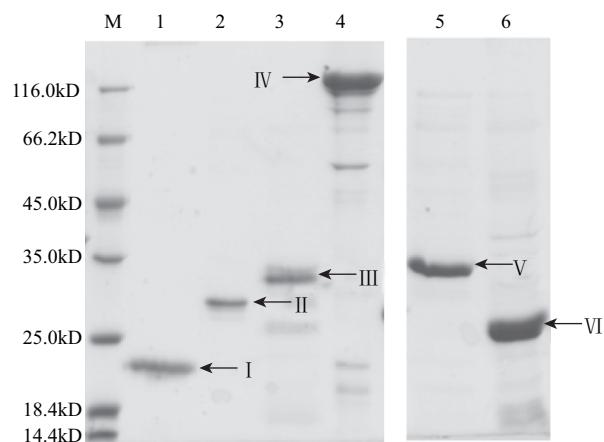


M. 蛋白Marker; 池道1~2. Sll0857 Δ 蛋白纯化; 池道3~4. Sll0857蛋白纯化; I. 纯化出的Sll0857 Δ 蛋白; II. 纯化出的Sll0857蛋白。

图10 重组蛋白Sll0857、Sll0857 Δ 的表达纯化

Fig.10 Purification of Sll0857 and Sll0857 Δ

而后用最优条件诱导表达,并纯化了几个可能的底物全长及片段: Slr1055及Slr1055 Δ (1~232)、Sll0688及Sll0688 Δ (1~152)、Sll1546及Sll1546 Δ (1~174)、RseA,如图11所示。



M. 蛋白Marker; I. 纯化的Sll0857 Δ 蛋白; II. 纯化的Sll0688 Δ 蛋白; III. 纯化的RseA(1~148)蛋白; IV. 纯化的Slr1055蛋白; V. 纯化的Slr1055 Δ 蛋白; VI. 纯化的Sll0857蛋白。

图11 S2P假定底物的纯化

Fig.11 Purification of putative substrate of site-2-protease

3 讨论

前期工作已经成功证实集胞藻PCC6803中的S2P蛋白酶Slr0643和Sll0862参与多种胁迫响应^[14-16],但是揭开它们的具体机制有赖于找到S2P的底物。此前成功在体外重组表达了Slr0643及Sll0862,并揭示它们能在体外切割 β -Casein^[6]具有蛋白酶活性。本研究通过系统考察各个物种中S2P作用机理和底物特征,深入分析集胞藻PCC6803的9个 σ 因子及anti- σ 因子,锁定了4对 σ 因子和anti- σ 因子的组合: SigE-ChlH(Slr1055)^[9]、SigI(Slr0687)-Sll0688、SigG(Slr1545)-Slr1546及SigH(Slr0856)-Sll0857。通过构建于pET载体,优化诱导表达条件,成功地获得8个S2P假定底物:包括全长的anti- σ 因子及其截断的片段。

近年来,光合生物S2P的功能颇受关注。例如,AMOS1/EGY1介导了拟南芥应答铵盐胁迫的响应,并与脱落酸信号调控通路相关,参与维持铵盐胁迫下叶绿体的完整结构和功能^[17]。但其具体的机理却有待揭开S2P的底物才能完整解释。依据其他生物体中S2P的研究结果,在正常生长条件下, σ 因子被anti- σ 因子束缚在膜上,无法识别并与RNA聚合酶的核心酶结合,故其无法调控相应基因的转录;当胁迫信号刺激启动S2P级联信号转导,anti- σ 因子将先后被S1P和S2P剪切,释放所束缚的 σ 因子到核区,启动其调控的基因簇转录。迄今为止,锁定集胞藻PCC6803中的4对 σ 因子和anti- σ 因子的组合,是光合生物研究中的首个关于S2P底物的研究。通过重组表达纯化4个anti- σ 因子及其截短片段,下一步将在体外重构S2P与假定底物之间的酶切体系,考察酶与底物的相互关系。当然,集胞藻PCC6803中4个S2P蛋白酶: Sll0862、Slr0643、Sll0528、Slr1821均含有多个跨膜区域、导致其表达纯化非常困难。下一步实验将进一步优化表达纯化这4个S2P蛋白酶的条件,获取更多有活性的蛋白酶,来构建体外酶切体系,为阐释蓝藻体内S2P介导的级联信号转导机制提供进一步证据。

参考文献:

- [1] ANGERMAYR S A, HELLINGWERF K J, LINDBLAD P, et al. Energy biotechnology with cyanobacteria[J]. Curr Opin Biotechnol, 2009, 20(3): 257-263.
- [2] LOS D A, ZORINA A, SINETOVA M, et al. Stress sensors and signal transducers in cyanobacteria[J]. Sensors (Basel), 2010, 10(3): 2386-2415.
- [3] IMAMURA S, ASAYAMA M. Sigma factors for cyanobacterial transcription[J]. Gene Regul Syst Bio, 2009, 3: 65-87.
- [4] HEINRICH J, WIEGERT T. Regulated intramembrane proteolysis in the control of extracytoplasmic function sigma factors[J]. Res Microbiol, 2009, 160(9): 696-703.
- [5] CHEN Gu, ZHANG Xu. New insights into S2P signaling cascades: regulation, variation, and conservation[J]. Protein Sci, 2010, 19(11): 2015-2030.

- [6] 秦春燕, 张旭, 陈谷. 集胞藻PCC6803中S2P同源蛋白Slr0643及Sll0862金属蛋白酶活性的体外鉴定[J]. 微生物学报, 2012, 52(1): 130-135.
- [7] ZHANG Xu, CHEN Gu, QIN Chunyan, et al. Slr0643, an S2P homologue, is essential for acid acclimation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. Microbiology, 2012, 158(Pt 11): 2765-2780.
- [8] 曾小琳, 闻盼盼, 陈谷. 集胞藻PCC6803中S2P同源蛋白基因sll0862缺失突变株对热胁迫与氧化胁迫的响应[J]. 微生物学报, 2012, 52(5): 594-601.
- [9] OSANAI T, IMASHIMIZU M, SEKI A, et al. ChlH, the H subunit of the Mg-chelatase, is an anti-sigma factor for SigE in *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(16): 6860-6865.
- [10] LI Xiaochun, WANG Boyuan, FENG Lihui, et al. Cleavage of RseA by RseP requires a carboxyl-terminal hydrophobic amino acid following DegS cleavage[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(35): 14837-14842.
- [11] ALBA B M, LEEDS J A, ONUFRYK C, et al. DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response[J]. Genes Dev, 2002, 16(16): 2156-2168.
- [12] AKIYAMA Y, KANEHARA K, ITO K. RseP (YaeL), an *Escherichia coli* RIP protease, cleaves transmembrane sequences[J]. EMBO J, 2004, 23(22): 4434-4442.
- [13] GORDON E, HORSEFIELD R, SWARTS H G, et al. Effective high-throughput overproduction of membrane proteins in *Escherichia coli*[J]. Protein Expr Purif, 2008, 62(1): 1-8.
- [14] 张旭. 集胞藻6803中蛋白酶Slr0643的功能分析[D]. 广州: 华南理工大学, 2012.
- [15] 闻盼盼. 集胞藻6803中S2P同源蛋白的定位与功能初探[D]. 广州: 华南理工大学, 2012.
- [16] 曾小琳. 集胞藻PCC6803中S2P同源基因sll0862缺失突变体的胁迫响应研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2012.
- [17] LI Baohai, LI Qing, XIONG Liming, et al. Arabidopsis plastid AMOS1/EGY1 integrates abscisic acid signaling to regulate global gene expression response to ammonium stress[J]. Plant Physiology, 2012, 160(4): 2040-2051.