

# *Thermus thermophilus* HB27 质粒分离基因位点 同系物 *parA<sub>Tth</sub>* 的功能研究

李海娟

(西安文理学院生物与环境工程学院, 陕西 西安 710065)

**摘 要:** 通过敲除嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*) HB27 的 *parA<sub>Tth</sub>* 基因, 获取 *parA<sub>Tth</sub>* 基因敲除突变体, 并从染色体 DNA 的复制及子细胞分离等方面分析突变体的表现型, 鉴定 *parA<sub>Tth</sub>* 的功能。结果显示: 在 *parA<sub>Tth</sub>* 突变体中, 未出现明显的细胞生长与分裂受阻现象, 细胞形态也未发生变化; 与野生株相比, 突变株染色体 DNA 的拷贝数未发生变化, 大区段染色体 DNA 的子细胞分离也未受阻, 但染色体的复制起始位点(*oriC*)区域的亚细胞定位受到影响, 其定位于细胞任意位置。综合分析, *T. thermophilus* HB27 的 *parA<sub>Tth</sub>* 基因在大区段染色体 DNA 的子细胞分离过程中没有起关键作用, 但其可能参与染色体复制起始位点区域的子细胞定位与分离。

**关 键 词:** 嗜热栖热菌; 质粒分离基因位点 *parABS*; 染色体; 亚细胞定位

中图分类号: Q933 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2019)06-0594-07

## The functions of the plasmid partitioning gene homolog *parA<sub>Tth</sub>* in *Thermus thermophilus* HB27

LI Haijuan

(School of Biological and Environmental Engineering, Xi'an University, Xi'an, Shaanxi 710065, China)

**Abstract:** In this study, the *parA<sub>Tth</sub>* gene mutant,  $\Delta parA_{Tth}$ , was generated by deleting the gene in *Thermus thermophilus* HB27 and were subjected to phenotype analysis with respect to chromosome replication and segregation. The results showed that in the  $\Delta parA_{Tth}$  mutant, the cell growth, cell division, cell morphology were not apparently affected. And, the chromosome copy number was not changed in the mutant and the chromosomal bulk DNA segregation was not impeded either. However, the subcellular localization of the chromosomal origin (*oriC*) was randomly localized in the mutant cells instead of the polar localization pattern in the wild type cells. Therefore, in *T. thermophilus* HB27, the *parA<sub>Tth</sub>* gene is not critical for the chromosomal bulk DNA segregation, however, it might be involved in the chromosomal origin region localization and segregation.

**Keywords:** *Thermus thermophilus*; partitioning locus *parABS*; chromosome; subcellular localization

细菌的低拷贝质粒上一般都含有质粒分离基因位点 *parABS* (*par* 源自 partitioning), 该位点一般包括 3 个遗传结构, 其中 2 个基因组成操纵子, 分别编码 ATP 酶(*ParA*)和 DNA 结合蛋白(*ParB*); 另外 1 个位点类似着丝粒的 DNA 序列(*parS*)。在低拷贝质粒中, *ParB* 与 *parS* 相结合, 形成 DNA-蛋白复合物(*ParB-parS* 复合物); *ParA* 则会为 *ParB-parS* 复

合体分离到子细胞中提供源动力, 从而为高精度的质粒分离提供必备条件<sup>[1]</sup>。近年来的研究发现, 不仅是在低拷贝质粒中, 在许多细菌的染色体上也存在着 *parABS* 基因位点同系物<sup>[2]</sup>。LIN 等<sup>[3]</sup>首次在枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的染色体中发现了能被 *ParB* 结合的 *parS* 序列; 之后, 在其他多种细菌的染色体中都发现了 *parS* 同源序列, 且基本上都位

于复制起始位点近侧区<sup>[4-5]</sup>。目前,对细菌染色体上 *parABS* 基因位点同系物的功能与作用机制尚缺乏统一结论。研究发现,有的细菌的 *parAB* 基因为细胞生长的关键基因,突变会造成细胞死亡,如新月柄杆菌(*Caulobacter crescentus*)的 *parAB*<sup>[6-7]</sup> ;而有些细菌(如 *B. subtilis*)的 *parAB* 为非关键基因,突变后,通常能产生多重效应,可引起染色体 DNA 复制障碍、大区段染色体 DNA 或复制起始位点 *oriC* 子细胞分离障碍、细胞分裂障碍等<sup>[8-14]</sup>。

嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)是研究极端嗜热微生物的模式物种<sup>[15-16]</sup>,可利用其筛选并表达耐高温的蛋白质和酶<sup>[16]</sup>。与大多数细菌相似,*T. thermophilus* 的染色体上也含有 *parABS* 基因位点同系物,将其命名为 *parABS<sub>Th</sub>*,其包含 *parA<sub>Th</sub>*、*parB<sub>Th</sub>* 2 个基因和 1 个 *parS<sub>Th</sub>* DNA 序列<sup>[17]</sup>。但 *parABS<sub>Th</sub>* 在 *T. thermophilus* 的染色体分离过程中是否起作用,是否参与其他生理过程,以及其作用机制等都尚待考究。本研究中,通过敲除 *T. thermophilus* HB27 的 *parA<sub>Th</sub>* 基因,从细胞生长、细胞形态、细胞分裂、核 DNA 形态、染色体 DNA 的复制及子细胞分离等方面分析 *parA<sub>Th</sub>* 基因在染色体 DNA 子细胞分离过程是否具有关键意义,是否参与细胞分裂及染色体 DNA 复制等生理过程,以期为后续解析 *parABS<sub>Th</sub>* 基因位点的功能机制提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

嗜热栖热菌 *T. thermophilus* HB27 来自德国微生物菌种保藏中心(NO. DSM7039);大肠埃希菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$  来自 Takara。

#### 1.1.2 主要试剂

胰化蛋白胨、酵母提取物购自 BD Biosciences;博来霉素和卡那霉素购自 Calbiochem;DNA 扩增酶、限制性内切酶及 Gibson 组装反应试剂盒购自 NEB;DNA Marker 购自 Takara;qPCR Mastermix plus with fluorescein 购自 Eurogentec。

#### 1.1.3 培养基

*T. thermophilus* HB27 用 TB 培养基培养,其配方为:胰化蛋白胨 8 g/L,酵母提取物 4 g/L,NaCl 3 g/L,pH 7.5;往 TB 培养基中添加的抗生素为博来霉素(3  $\mu$ g/L)或卡那霉素(20  $\mu$ g/L);*T. thermophilus* HB27 的培养温度为 60  $^{\circ}$ C 或者 70  $^{\circ}$ C。*E. coli* 用 LB 培养基,根据需要可往 LB 培养基中添加抗生素博来霉素(15  $\mu$ g/L)或卡那霉素(50  $\mu$ g/L)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 *parA<sub>Th</sub>* 基因敲除载体及 *ParB<sub>Th</sub>*-sGFP 融合绿色荧光蛋白表达载体的构建

*parA<sub>Th</sub>* 基因敲除载体 pUC- $\Delta$ *parA<sub>Th</sub>*::*blm* 的构建:根据 *Thermus thermophilus* HB27(NCBI 登录号 NC\_005835)的 *parA<sub>Th</sub>* 基因(NCBI ID :WP\_011173976.1)所在的区域,以及博来霉素抗性基因“*blm*”序列<sup>[18]</sup>(由化学方法合成),设计 PCR 扩增引物(表 1)。通过 PCR 反应获取基因敲除过程中的双交换同源重组臂(即 *parA<sub>Th</sub>*-F1 与 *parA<sub>Th</sub>*-F2),以及“*blm*”抗性基因。使用 *Xba* I 酶切载体 pUC18。通过组装克隆反应(Gibson Assembly,NEB)将 *parA<sub>Th</sub>*-F1、*parA<sub>Th</sub>*-F2 及 *blm* 连接到 pUC18 载体上。

*ParB<sub>Th</sub>*-sGFP 融合荧光蛋白表达载体 pMK-*parB<sub>Th</sub>*-*sgfp* 的构建:从 *T. thermophilus* HB27 基因组中扩增 *parB<sub>Th</sub>*(NCBI ID :WP\_011173975.1),通过 Gibson Assembly 反应连接到表达有绿色荧光蛋白的载体 pMK-*sgfp* 中<sup>[17]</sup>。通过质粒酶切及 DNA 测序验证 pUC- $\Delta$ *parA<sub>Th</sub>*::*blm* 及 pMK-*parB<sub>Th</sub>*-*sgfp* 载体的序列准确性。

#### 1.2.2 $\Delta$ *parA<sub>Th</sub>* 基因敲除突变株的获得与鉴定

用 *Hind* III 将 pUC- $\Delta$ *parA<sub>Th</sub>*::*blm* 载体线性化,参照文献[19]的方法,转化至 *T. thermophilus* HB27 中。在含有博来霉素的 TB 培养平板上筛选阳性转化子。通过 PCR 反应验证阳性重组子,即  $\Delta$ *parA<sub>Th</sub>*::*blm* 基因敲除突变株的基因型。在 *parA<sub>Th</sub>* 基因上游和下游序列中设计 PCR 扩增使用的引物(表 1)。

表 1 本研究所用的引物

| Table 1 Primers used in this study |                                          |                                                                                   |
|------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 引物名称                               | 序列(5'—3')                                | 用途                                                                                |
| parA_F1-F                          | tgcatgcctgcaggtcgactTCCTCCAAGGAGCGGTACTG | 扩增 <i>parA<sub>Th</sub></i> -F1 片段                                                |
| parA_F1-R                          | gttatactcccggggatcccCCTGGCAGAGGAGGTGATGG |                                                                                   |
| parA_F2-F                          | gactgatctagagatccccGCCCTTAGCATAACGGATAC  | 扩增 <i>parA<sub>Th</sub></i> -F2 片段                                                |
| parA_F2-R                          | cggtagcccggggatcctCAAGTACGCGGGCTACATTG   |                                                                                   |
| blm-F                              | GGGATCCCCGGGAGTATAAC                     | 扩增 <i>blm</i> 片段                                                                  |
| blm-R                              | GGGGATCCTCTAGATCAGTC                     |                                                                                   |
| $\Delta parA_{Th}$ -F              | TGGAGGAGGCCCTTCTCCCGGAT                  | PCR 鉴定 $\Delta parA_{Th}::blm$ 基因敲除突变株                                            |
| $\Delta parA_{Th}$ -R              | GTTCCTCGAGCGGTATCCGTT                    |                                                                                   |
| TTC1601-F-1                        | TCAAGGAGAAGGGCTACAG                      | PCR 扩增 TTC1601 的标准 DNA 片段                                                         |
| TTC1601-R-1                        | CCTTG TAGCTCACGGA AAC                    |                                                                                   |
| TTC1601-F-2                        | ACGCCATCCTGGTCAAGGTG                     | qPCR 检测 TTC1601 的拷贝数                                                              |
| TTC1601-R-2                        | AGGTCGGCGATGAAGCTGTC                     |                                                                                   |
| TTC0574-F-1                        | CCGGCAGGTAGACGTCAAAG                     | PCR 扩增 TTC0574 的标准 DNA 片段                                                         |
| TTC0574-R-1                        | TGAGCCGAGGGAGTTTGAG                      |                                                                                   |
| TTC0574-F-1                        | AGGTGACCACCACGCTTTCG                     | qPCR 检测 TTC0574 的拷贝数                                                              |
| TTC0574-R-1                        | TTAGGCCGCCAGGATCAGTACG                   |                                                                                   |
| parB-sgfp-F                        | caaaacgcataccatttgaGAGGAGGTGATGGCCCGTGT  | 扩增 <i>parB<sub>Th</sub></i> 基因,用于 pMK- <i>parB<sub>Th</sub></i> - <i>sgfp</i> 的构建 |
| parB-sgfp-R                        | cccttgcgctcctcctccCGCCTGGTAGCCGAGGCGC    |                                                                                   |

小写碱基代表 2 个插入片段之间或插入片段与载体之间重叠的序列。

1.2.3  $\Delta parA_{Th}::blm$  基因敲除突变株表现型的观察

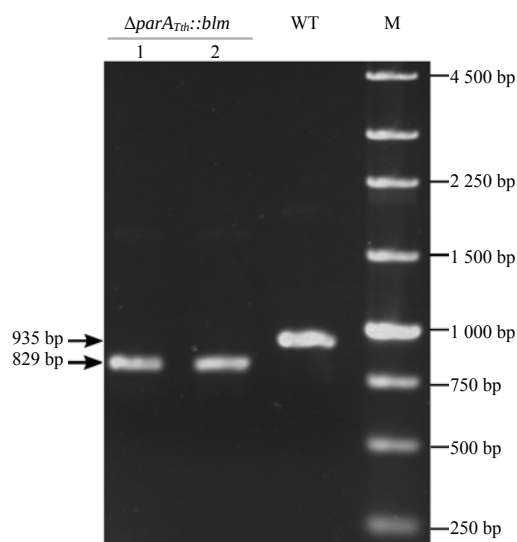
分别利用荧光染料 CFS(6-Carboxyfluorescein)和 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)将指数生长时期的野生株(WT)与  $\Delta parA_{Th}::blm$  突变株细胞的细胞膜和核 DNA 染色,用荧光显微镜观察细胞形态、核 DNA 的形态及细胞分裂、核 DNA 的子细胞分离等表现型。为观察染色体的复制起始位点区域在细胞中的定位,将 pMK-*parB<sub>Th</sub>*-*sgfp* 分别转化至野生株和  $\Delta parA_{Th}::blm$  突变株,在含卡那霉素的 TB 平板上筛选得到转化子。由于 *ParB<sub>Th</sub>*-sGFP 能与接近复制起始位点 *oriC* 的 *parS<sub>Th</sub>* DNA 序列结合,形成聚焦点状荧光信号,因此该荧光信号在细胞中的位置可反映 *parS<sub>Th</sub>* 的定位,即复制起始位点区域的定位。在阳性转化子中,*ParB<sub>Th</sub>*-sGFP 在卡那霉素抗性基因的启动子下转录并表达。通过荧光显微镜分析阳性转化子中聚焦点荧光信号的亚细胞定位;利用 Image J 图像分析软件(NIH)处理显微图片,并测量正在分离的子细胞中核 DNA 的相对含量(即信号相对强度);利用 qPCR 分析  $\Delta parA_{Th}::blm$  中染色体 DNA 的相对拷贝数(相对于野生株),qPCR 的操作方法参照文献[17]和文献[20]

进行,选取染色体上的 2 个基因位点(TTC1610 和 TTC0574)作为检测位点。qPCR 反应在 qPCR Mastermix plus with fluorescein 上进行,每个反应设置 3 个重复。运用标准曲线计算野生株和  $\Delta parA_{Th}::blm$  突变株中染色体的拷贝数。

2 结果与分析

2.1  $\Delta parA_{Th}$  基因敲除突变体的构建

将基因敲除载体 pUC- $\Delta parA_{Th}::blm$  转化至 *T. thermophilus* HB27,该载体含有 *parA<sub>Th</sub>* 两侧同源臂,转化后会发生双交换同源重组<sup>[21-22]</sup>。为了不影 响下游基因的表达,*blm* 的转录方向为下游基因转 录的相反方向。在博来霉素抗性平板上筛选转化 子,并通过 PCR 扩增分析转化子的基因型。结果(图 1)显示,在挑选出的转化子中,未检测到任何野生 型的 *parA<sub>Th</sub>* 基因信号,因此,*parA<sub>Th</sub>* 基因已完全被 pUC- $\Delta parA_{Th}::blm$  载体上的  $\Delta parA_{Th}::blm$  等位基 因取代敲除,即形成  $\Delta parA_{Th}::blm$  突变株。该结果 可证明,在 *T. thermophilus* HB27 中,*parA<sub>Th</sub>* 基因 是细胞生长非关键基因,可被敲除。

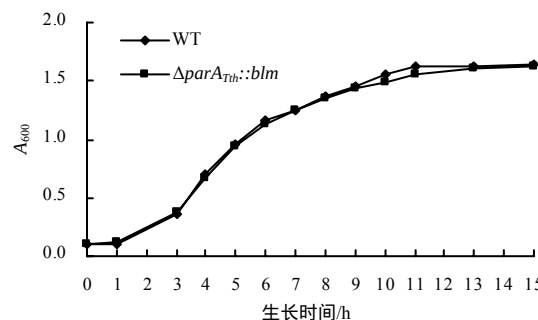


泳道 1、2 表示 2 个克隆；M 表示 250 bp DNA marker。

图 1 PCR 验证  $\Delta parA_{Th}::blm$  基因敲除突变株的基因型Fig.1 PCR confirmation of the  $\Delta parA_{Th}::blm$  gene deletion mutant

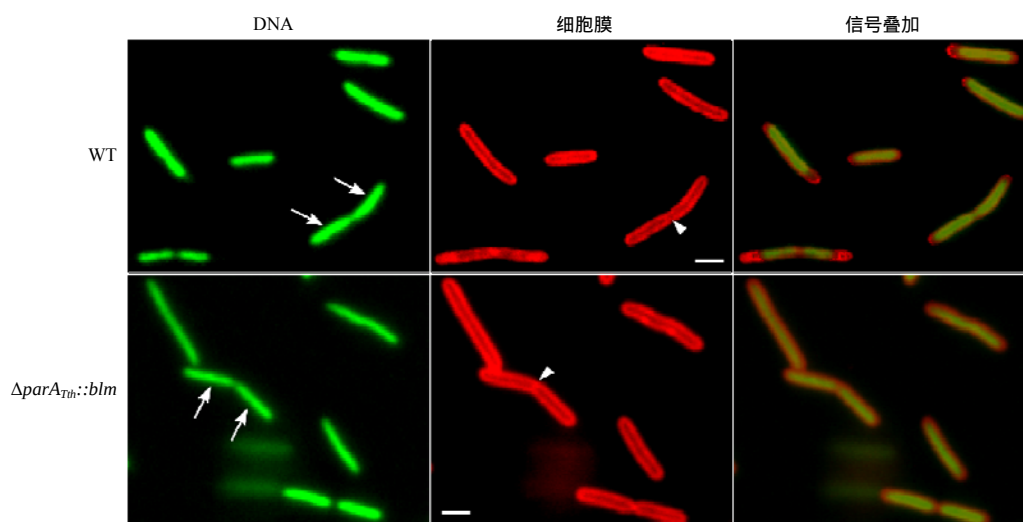
## 2.2 $\Delta parA_{Th}::blm$ 突变株的细胞生长曲线

从图 2 可以看出,  $\Delta parA_{Th}::blm$  突变株的细胞生长曲线与野生型的基本一致。表明 *parA<sub>Th</sub>* 基因的缺失对细胞生长无明显影响, 该结果也进一步证明了该基因为细胞生长的非关键基因。

图 2 野生株(WT)和突变株  $\Delta parA_{Th}::blm$  的细胞生长曲线Fig.2 Growth curves of the wild-type strain and  $\Delta parA_{Th}::blm$  mutant

## 2.3 $\Delta parA_{Th}::blm$ 的细胞形态及细胞分裂

利用荧光染料 CFS 将细胞膜染色, 结合荧光显微观察解析 *parA<sub>Th</sub>* 是否参与细胞形态维持、细胞分裂等生理过程。结果(图 3)显示:  $\Delta parA_{Th}::blm$  的细胞形态与野生型细胞的形态无明显差异, 野生型细胞的平均长宽比为  $(8.71 \pm 0.86)$ ,  $\Delta parA_{Th}::blm$  细胞的平均长宽比为  $(8.67 \pm 0.65)$ (各统计 200 个细胞); 与野生型相比,  $\Delta parA_{Th}::blm$  的细胞分裂未出现异常, 在正在分裂的细胞中, 可观察到初始形成的细胞隔膜。由此可判断 *T. thermophilus* 的 *parA<sub>Th</sub>* 基因不参与细胞形态维持、细胞分裂等生理过程。

白色三角形表示新隔膜; 白色箭头为正在分离的 DNA, 标尺 2  $\mu m$ 。图 3 野生株与  $\Delta parA_{Th}::blm$  突变株的细胞形态与细胞分裂及核 DNA 形态的荧光显微观察结果Fig.3 Fluorescent microscopic analysis results of the cell shape, cell division and nucleoid morphology of the wild-type strain and the  $\Delta parA_{Th}::blm$  mutant

## 2.4 $\Delta parA_{Th}::blm$ 的核 DNA 的形态及大区段染色体 DNA 的子细胞分离

从图 3 还可看出,  $\Delta parA_{Th}::blm$  中核 DNA 形态(即 DAPI 染色区域的形态)与野生型的无明显差异, 复制的核 DNA 可正常分离到子细胞中。在野

生型中, 无 DAPI 荧光信号的细胞(判断为失去核 DNA 的细胞)出现的概率是 1.7%, 在  $\Delta parA_{Th}::blm$  中, 无 DAPI 荧光信号的细胞的概率是 1.8%(各统计 200 个细胞), 以上结果可初步判断 *parA<sub>Th</sub>* 的缺失对大区段染色体 DNA 的子细胞分离无明显影响。

进一步测量并统计了 100 对正在分离的子细胞中核 DNA 的相对含量(即信号相对强度), 结果(图 4)显示, 在野生型和  $\Delta parA_{Th}::blm$  突变株中, 100 对子细胞的核 DNA 相对含量平均值分别为 0.89 和 0.88, 分布范围分别为 0.67~0.99 和 0.65~0.99。以上结果说明, 在 *T. thermophilus* 中,  $parA_{Th}$  不参与大片段染色体 DNA 的子细胞分离过程。

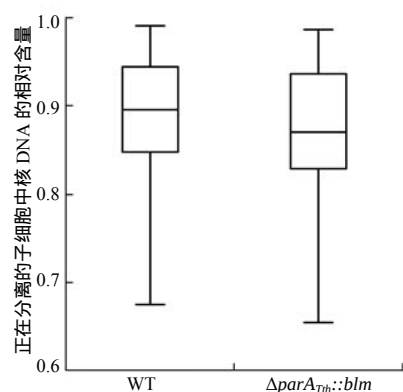


图 4 野生株和  $\Delta parA_{Th}::blm$  突变株中 100 对正在分离的子细胞中的核 DNA 的相对含量

Fig.4 The relative DNA contents in 100 pairs of dividing daughter cells of the wild-type strain and the  $\Delta parA_{Th}::blm$  mutant

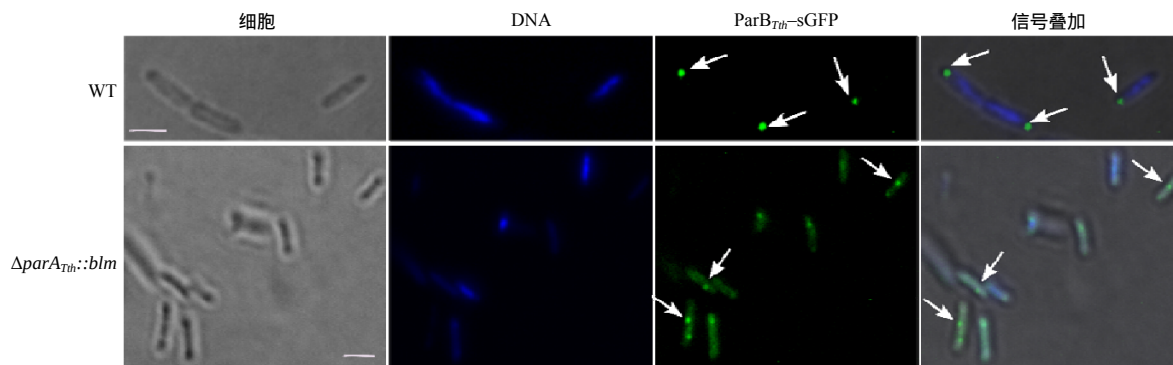
## 2.5 $\Delta parA_{Th}::blm$ 中染色体的相对拷贝数

为了检验  $parA_{Th}$  是否参与染色体 DNA 的复制过程, 采用 qPCR 方法分析了  $\Delta parA_{Th}::blm$  突变株中染色体的相对拷贝数(相对于野生株)。选取染色体上的 TTC1610 和 TTC0574 作为 qPCR 的检测位点。qPCR 分析结果显示,  $\Delta parA_{Th}::blm$  突变株中, TTC1610 和 TTC0574 相对野生株的拷贝数分别为  $(1.06 \pm 0.14)$ 、 $(1.11 \pm 0.13)$ , 说明  $\Delta parA_{Th}::blm$  的

染色体拷贝数与野生株的相比无显著差异, 即  $parA_{Th}$  不参与染色体 DNA 的复制过程。

## 2.6 $\Delta parA_{Th}::blm$ 的染色体复制起始位点 $oriC$ 区域的子细胞分离

上述的研究结果证明了 *T. thermophilus* HB27 的  $parA_{Th}$  不参与大片段染色体 DNA 的子细胞分离, 但该基因是否参与染色体复制起始位点( $oriC$ )的子细胞定位与分离还需进一步研究。为此, 对野生株和  $\Delta parA_{Th}::blm$  突变株中染色体的  $oriC$  区域分别进行了亚细胞定位分析。*T. thermophilus* 的  $parABS_{Th}$  基因位点中的  $ParB_{Th}$  蛋白能与  $parS_{Th}$  DNA 序列特异性结合<sup>[17]</sup>,  $ParB_{Th}$ -sGFP 融合绿色荧光蛋白在细胞中形成聚焦点状荧光信号, 荧光信号的定位反映  $parS_{Th}$  的亚细胞定位, 而  $parS_{Th}$  位于  $oriC$  所在的 DNA 区域(距离  $oriC$  仅 6 kb), 说明  $ParB_{Th}$ -sGFP 荧光信号出现的位置即为  $oriC$  区域的亚细胞定位。根据此原理, 将表达  $ParB_{Th}$ -sGFP 的载体 pMK- $parB_{Th}$ -sgfp 分别转化野生株及  $\Delta parA_{Th}::blm$  突变株, 该载体可在 *T. thermophilus* 中自主复制,  $ParB_{Th}$ -sGFP 也可持续表达。结果(图 5)显示, 在野生株中,  $ParB_{Th}$ -sGFP 聚焦点状荧光信号定位于细胞末端, 而在  $\Delta parA_{Th}::blm$  突变株中, 该荧光信号却定位在细胞的任意位置。该结果证明在  $\Delta parA_{Th}::blm$  突变株中, 染色体  $oriC$  区域的亚细胞定位及子细胞分离受到了影响, 表明  $parA_{Th}$  基因虽不参与大片段染色体 DNA 的子细胞分离, 但可能参与染色体复制起始位点  $oriC$  的子细胞定位与分离。



白色箭头示  $ParB_{Th}$ -sGFP 的亚细胞定位; 标尺为 2  $\mu m$ 。

图 5  $\Delta parA_{Th}::blm$  突变株与野生株中染色体复制起始位点( $oriC$ )区域的亚细胞定位

Fig. 5 Subcellular localization of the chromosome replication origin ( $oriC$ ) regions in the  $\Delta parA_{Th}::blm$  and wild-type strains

### 3 结论与讨论

本研究中,从细胞生长、细胞形态、细胞分裂、核 DNA 的形态、大区段染色体 DNA 及复制起始位点区域的子细胞分离以及染色体 DNA 的相对拷贝数等方面分析了 *T. thermophilus* HB27 中 *parA<sub>Th</sub>* 基因敲除突变体的表现型。研究结果显示,在 *T. thermophilus* HB27 中, *parA<sub>Th</sub>* 基因在大区段染色体 DNA 的子细胞分离过程中没有起到关键作用,同时,也不参与细胞形态维持、细胞分裂以及染色体 DNA 复制等生理过程。究其原因,可能是因为细菌染色体上的 *parABS* 基因位点同系物在不同的细菌中有不同的功能,其在大区段染色体 DNA 子细胞分离的重要性没有其对单拷贝质粒 DNA 子细胞分离那么关键。例如, *B. subtilis* 的 *parB* 基因突变体虽然有部分细胞呈现为无核状态,但其他大部分有核的细胞依然能正常生长,其染色体 DNA 子细胞分离也未受阻<sup>[23]</sup>;另外,敲除 *parA* 也并未造成明显的染色体 DNA 子细胞分离障碍<sup>[9]</sup>。在恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)中,敲除 *parA* 和 *parB* 也并未造成细胞生长受阻或者染色体 DNA 子细胞分离障碍<sup>[24]</sup>。

细菌染色体 DNA 的子细胞分离是一个复杂的过程,目前的研究<sup>[25-26]</sup>认为,其分离过程是复制的姐妹 *oriC* 首先被定位到 2 个细胞末端,随后大区段姐妹染色体 DNA 在复制、被压缩的同时受到一些动力因子的牵引,定位到 *oriC* 所在的细胞末端,从而完成分离。本研究中,关于 *T. thermophilus parA<sub>Th</sub>* 基因的功能研究结果提示, *parA<sub>Th</sub>* 没有为大区段染色体 DNA 的子细胞定位与分离提供动力,但在  $\Delta parA_{Th}::blm$  突变株中,染色体的复制起始位点 *oriC* 却定位在细胞的任意位置,而非在细胞末端。这种现象在其他一些细菌中也有被观察到,例如,FOGEL 等<sup>[10]</sup>敲除霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)染色体 I 的 *parAI* 基因后,发现突变株的细胞生长以及大区段染色体 DNA 的子细胞分离未受到影响,但染色体的 *oriC* 的细胞末端定位模式却出现异常;因此, *T. thermophilus* 的 *parA<sub>Th</sub>* 极大可能与 *V. cholerae* 的 *parAI* 的功能类似<sup>[10]</sup>,参与复制起始位点 *oriC*,但不参与大区段染色体 DNA 的亚细胞定位以及子细胞分离过程。在后续研究中,可通过 *lacO*/GFP-LacI 荧光显微技术观察 *oriC* 的亚细胞定位来进一步验证。

### 参考文献:

- [1] FUNNELL B E . ParB partition proteins : complex formation and spreading at bacterial and plasmid centromeres[J] . Frontiers in Molecular Biosciences , 2016 , 3 : 44 .
- [2] GERDES K , MØLLER-JENSEN J , JENSEN R B . Plasmid and chromosome partitioning : surprises from phylogeny[J] . Molecular Microbiology , 2002 , 37(3) : 455-466 .
- [3] LIN D C H , GROSSMAN A D . Identification and characterization of a bacterial chromosome partitioning site[J] . Cell , 1998 , 92(5) : 675-685 .
- [4] LIVNY J , YAMAICHI Y , WALDOR M K . Distribution of centromere-like *parS* sites in bacteria : insights from comparative genomics[J] . Journal of Bacteriology , 2007 , 189(23) : 8693-8703 .
- [5] TROJANOWSKI D , HOŁÓWKA J , ZAKRZEWSKA-CZERWIŃSKA J . Where and when bacterial chromosome replication starts : a single cell perspective[J] . Frontiers in Microbiology , 2018 , 9 : 2819 .
- [6] MOHL D A , EASTER JR J , GOBER J W . The chromosome partitioning protein, ParB , is required for cytokinesis in *Caulobacter crescentus*[J] . Molecular Microbiology , 2001 , 42(3) : 741-755 .
- [7] TRAN N T , STEVENSON C E , SOM N F , et al . Permissive zones for the centromere-binding protein ParB on the *Caulobacter crescentus* chromosome[J] . Nucleic Acids Research , 2018 , 46(3) : 1196-1209 .
- [8] LEE P S , LIN D C H , MORIYA S , et al . Effects of the chromosome partitioning protein Spo0J (ParB) on *oriC* positioning and replication initiation in *Bacillus subtilis*[J] . Journal of Bacteriology , 2003 , 185(4) : 1326-1337 .
- [9] LEE P S , GROSSMAN A D . The chromosome partitioning proteins Soj(ParA) and Spo0J(ParB) contribute to accurate chromosome partitioning , separation of replicated sister origins , and regulation of replication initiation in *Bacillus subtilis*[J] . Molecular Microbiology , 2006 , 60(4) : 853-869 .
- [10] FOGEL M A , WALDOR M K . A dynamic , mitotic-like mechanism for bacterial chromosome segregation[J] . Genes & Development , 2006 , 20(23) : 3269-3282 .
- [11] SAINT-DIC D , FRUSHOUR B P , KEHRL J H , et al . A *parA* homolog selectively influences positioning of the large chromosome origin in *Vibrio cholerae*[J] . Journal of Bacteriology , 2006 , 188(15) : 5626-5631 .
- [12] YAMAICHI Y , FOGEL M A , WALDOR M K . Par genes and the pathology of chromosome loss in *Vibrio cholerae*[J] . Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America , 2007 , 104(2) :

- 630–635 .
- [13] INIESTA A A . ParABS system in chromosome partitioning in the bacterium *Myxococcus xanthus*[J]. PLoS One , 2014 , 9(1) : e86897 .
- [14] KAWALEK A , BARTOSIK A A , GLABSKI K , et al. *Pseudomonas aeruginosa* partitioning protein ParB acts as a nucleoid-associated protein binding to multiple copies of a *parS*-related motif[J] . Nucleic Acids Research , 2018 , 46(9) : 4592–4606 .
- [15] KOBAYASHI N , HARANO Y , TOCHIO N , et al . An automated system designed for large scale NMR data deposition and annotation : application to over 600 assigned chemical shift data entries to the BioMagResBank from the Riken Structural Genomics/ Proteomics Initiative internal database[J] . Journal of Biomolecular NMR , 2012 , 53(4) : 311–320 .
- [16] LEIS B , ANGELOV A , MIENTUS M , et al. Identification of novel esterase-active enzymes from hot environments by use of the host bacterium *Thermus thermophilus*[J] . Frontiers in Microbiology , 2015 , 6 : 275 .
- [17] LI H J , ANGELOV A , PHAM V T T , et al. Characterization of chromosomal and megaplasmid partitioning loci in *Thermus thermophilus* HB27[J] . BMC Genomics , 2015 , 16 : 317 .
- [18] BROUNS S J J , WU H , AKERBOOM J , et al. Engineering a selectable marker for hyperthermophiles[J]. Journal of Biological Chemistry , 2005 , 280(12) : 11422–11431 .
- [19] DE GRADO M , CASTÁN P , BERENGUER J . A high-transformation-efficiency cloning vector for *Thermus thermophilus*[J] . Plasmid , 1999 , 42(3) : 241–245 .
- [20] BREUERT S , ALLERS T , SPOHN G , et al . Regulated polyploidy in halophilic archaea[J] . PLoS One , 2006 , 1(1) : e92 .
- [21] 李海娟 . 双交换同源重组法构建 *Thermus thermophilus* 基因无痕敲除突变体[J] . 湖南农业大学学报(自然科学版) , 2019 , 45(2) : 143–148 .
- [22] 张飞燕 , 何敏 , 王振华 , 等 . 铜绿假单胞菌脂肪酶基因(*LipA*)在枯草芽孢杆菌 *pab02* 中的整合表达[J] . 湖南农业大学学报(自然科学版) , 2017 , 43(2) : 200–205 .
- [23] IRETON K , GUNTHER N W 4th , GROSSMAN A D. Spo0J is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology , 1994 , 176(17) : 5320–5329 .
- [24] LEWIS R A , BIGNELL C R , ZENG W , et al. Chromosome loss from *par* mutants of *Pseudomonas putida* depends on growth medium and phase of growth[J] . Microbiology , 2002 , 148(2) : 537–548 .
- [25] BADRINARAYANAN A , LE T B K , LAUB M T. Bacterial chromosome organization and segregation[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology , 2015 , 31(1) : 171–199 .
- [26] WANG X D , RUDNER D Z . Spatial organization of bacterial chromosomes[J] . Current Opinion in Microbiology , 2014 , 22 : 66–72 .

责任编辑: 毛友纯

英文编辑: 柳 正