

Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233, China).

**Abstract** An *E. coli* strain which could express domain III of the extracellular region of the human EGF-R (EGF-R III) in its membrane had been obtained. The results of EGF receptor radiobinding assay showed that <sup>125</sup>I-EGF could bind specifically to the intact bacterial body, the amount of specific binding varied with the time and temperature of the reaction. The data of

Scatchard analysis indicated that the number of the human EGF-R III expressed in the bacteria was about 738 sites/cell, and its dissociation constant was about  $3.0 \times 10^{-11}$  mol/L. The sites of the bacteria to which EGF bound were discovered mainly on its membrane by immunoelectronmicroscopy.

**Key words** epidermal growth factor receptor, *E. coli*, receptor radiobinding assay, immunoelectronmicroscopy

# 大肠杆菌基因组中存在 Era 亲和蛋白的基因

陈南春 陈苏民 高磊 郝晓萌 高辉 金晶 马小峰

(第四军医大学生物化学与分子生物学教研室, 西安 710032)

**摘要** 构建了一个大肠杆菌基因组 DNA λ ZAP 表达文库, 以 Dig 标记的 Era 为探针, 从  $4 \times 10^4$  噬斑中筛选到一个与探针呈特异结合的噬斑, 说明大肠杆菌基因组中确有 Era 亲和蛋白基因存在. 将该噬斑体中插段 DNA 前 800 bp 的测序结果与 1996 年底完成的大肠杆菌基因组全序列作同源性比较, 发现该插段序列位于大肠杆菌基因组的第 267 section.

**关键词** 大肠杆菌, 基因组表达型文库, Era 结合蛋白

era 基因是大肠杆菌 rnc 操纵子的一个成员, 在野生型大肠杆菌中表达水平极低, 但却是大肠杆菌生存繁殖所必需的基因<sup>[1]</sup>. 已经证明该基因产物 Era 蛋白可与鸟苷酸结合, 具有 GTPase 活性, 属于 G 蛋白<sup>[2,3]</sup>. 尽管做过许多研究, 但对于大肠杆菌中这种 G 蛋白的功能依然不清楚. 作者设想: Era 既然是 G 蛋白, 则它应与其他 G 蛋白一样, 有相应的亲和蛋白存在. 为寻找 Era 亲和蛋白及其基因, 作者构建了一个表达型大肠杆菌基因组 DNA 文库, 以 Dig 标记 Era 为探针, 从该文库中筛选到了一个能与探针特异结合的噬斑, 表明大肠杆菌基因组中存在 Era 亲和蛋白基因. 现将主要方法及结果报告如下.

## 1 表达型大肠杆菌基因组文库的构建

取大肠杆菌基因组 DNA 以 Sau3A1 在控

制条件下作部分酶解, 使成 1~ 10 kb 片段; λ ZAP 载体 DNA 以 BamH I 水解至完全, 并以牛肠碱性磷酸酶脱去 5' 端磷酸. 载体与 1~ 10 kb 插段以 T4 DNA 连接酶连接后, 作体外包装. 测包装后的原始库容量为  $10^6$  pfu/μg DNA; 蓝/白筛选鉴定, 含插段的白色噬斑占 98.6%; 经扩增一次后的扩增库, 滴度为  $10^{12}$  pfu/ml.

## 2 Dig 标记 Era 探针的制备

Era 蛋白按陈苏民的方法制备<sup>[4]</sup>. 取 Era 77 μg, 溶于 1.5 ml 磷酸钾缓冲液中, 加 Dig-活酯 5 μl 混匀, 室温放 3 h, 探针的 Dig 标记即告完成. 将标记探针点于 NC 膜上, 测出

\* 国家自然科学基金资助项目 (39670006).  
收稿日期: 1997-07-08, 修回日期: 1997-09-15

其最低显色量为  $10^{-11}$  g.

### 3 Era 亲和蛋白基因的筛选

取  $\lambda$  ZAP 表达型大肠杆菌基因组文库, 适当稀释后, 感染大肠杆菌并铺于含 IPTG 的平板上, 待噬斑长至适当大小后, 吸印转移至 NC 膜上, 经洗涤 → 封闭 → 与探针结合 → 洗涤 → 与 AP 标记的抗 Dig 抗体结合 → 洗涤 → 加 X-磷酸、NBT 显色等步骤, 从  $4 \times 10^4$  个噬斑中筛到一个与周围噬斑显色有显著区别的噬斑 (图 1)



图 1 与 Era 探针特异结合的阳性噬斑

放大 4 倍.

### 4 Era 亲和蛋白基因的分析

特异结合 Dig-Era 的噬斑经纯化后, 作体内剪切, 现表达 Era 亲和蛋白的插段 DNA 存在于噬菌粒 pBK-CMV 中, 插段大小约为 2.8 kb. 对插段 DNA 的限制酶谱分析表明, 插段内有 Hind III、Bal I、Bgl II、Nru I 等单一酶切位点, 无 EcoR I、Sma I、Sca I、Apa I、Sal I、Kpn I、Cla I、Xba I、Xho I、Spe I、Nde I、Mlu I 等酶切位点. 以双脱氧末端终止法测插段 DNA 前端 800 bp 的碱基序列, 将所得结果与 GenBank 中大肠杆菌基因组 DNA 序列作同源性比较, 发现该插段位于大肠杆菌基因组序列的第 267 section.

1996 年底, 人类已完成了大肠杆菌基因组 DNA 全序列的测定, 但是要阐明其全部基因的功能及表达调控, 仍然是十分艰巨的任务. 本工作对 era 基因的研究就是一个例子.

era 是细菌生存繁殖必需的基因, 产物 Era 属 G 蛋白. 我们曾用免疫电镜观察到 Era 蛋白分布在细菌内膜的表面. 在脊椎、无脊椎动物, G 蛋白也多分布于膜上, 在细胞的信号转导过程中扮演重要角色. 最近在哺乳类 (人和小鼠) 中找到了与大肠杆菌 era 基因同源的序列, era 基因产物的功能就更是令人感兴趣的问题了. 本研究肯定了 Era 亲和蛋白基因的存在, 这将为阐明 Era 的功能提供新的线索.

### 参 考 文 献

- 1 Takiff H E, Chen S M, Court D L. Genetic analysis of rnc operon of *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 1989, 171 (5): 2581~ 2590
- 2 Ahnn J, March P E, Takiff H *et al.* A GTP-binding protein of *E. coli* has homology to yeast RAS protein. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83: 8849~ 8853
- 3 Chen S M, Takiff H E, Barber A M *et al.* Expression and characterization of RNase III and Era protein: products of rnc operon of *Escherichia coli*. J Biol Chem, 1990, 265: 2888 ~ 28953
- 4 陈苏民, Court D L. 大肠杆菌中高表达重组 Era 可溶性蛋白的纯化及其生化特性. 生物化学杂志, 1992, 8 (1): 33~ 41

**A Gene Encoding Era-binding Protein Exists in *E. coli* Genome.** CHEN Nanchun, CHEN Sumin, GAO Lei, HAO Xiaomeng, GAO Hui, JIN Jing, MA Xiaofeng (Department of Biochemistry, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China).

**Abstract** A  $\lambda$  ZAP expression library of *E. coli* genomic DNA has been constructed. Screening the library with the Era protein probe labeled by digoxigenin, a plaque specially bound with Era has been isolated from  $4 \times 10^4$  plaques. It is confirmed that an Era-binding protein gene exists in *E. coli* genomic DNA. Compared with the data in GenBank, the 5' end 800 bp of inserted DNA is located in the section 267 of *E. coli* genomic DNA.

**Key words** *E. coli*, genomic expression library, Era-binding protein