

大肠杆菌磷酸酯代谢途径中 *phnF* 基因的研究

夏 琪 姜卫红* 刘 扬 赵国屏

(中国科学院上海植物生理研究所微生物次生代谢分子调控开放实验室 上海 200032)

摘 要 大肠杆菌的 *phn* 操纵子与磷酸酯(Pn)的利用密切相关。实验利用 PCR 扩增、TA 克隆等方法,获得了大肠杆菌 *phn* 操纵子中 *phnE*、*phnF* 和 *phnG* 基因的亚克隆,并进行了序列测定。通过 P1 噬菌体转导,构建了 *phnF* 的 TnphoA'-9 转座子插入突变体 JW19,该突变仅对大肠杆菌的 AEPn 同化有微弱的影响,而利用 *phnE* 和 *phnG* 序列与染色体重组构建的 *phnF* 全缺失突变株 JW67,则几乎不能在 AEPn 培养基上生长。通过 *phnF* 基因的诱导高表达,用亲和柱层析分离纯化了 PhnF 蛋白,达到电泳纯。并且用凝胶延滞的方法观察到,PhnF 蛋白与 *phn* 操纵子 DNA 片段相互作用后,可使凝胶图谱类型发生改变。

关键词 大肠杆菌, *phnF* 基因, 磷酸酯

学科分类号 Q936

作为细胞生长的必需元素,磷的吸收和利用对细菌生长有着重要的作用。细菌具有几种不同的代谢途径来降解利用不同的磷源^[1,2],其中包括磷酸酯代谢途径。磷酸酯(Phosphonate esters, 即 Pn)与磷酸酯(Phosphate esters)相似,差别仅在于以 C-P 键代替了通常的 C-O-P 键,这一取代使得 Pn 的性质非常稳定,有时键能近似 C-C 键^[3]。Pn 可以用作药物和除草剂等等,具有应用价值。现有研究表明,细菌降解 Pn 作为磷源存在两条途径,即磷酸酯酶途径(Phosphonatase pathway)和 C-P 裂解酶途径(C-P lyase pathway),并受到磷酸盐调节子(Pho regulon)的调控^[4]。

大肠杆菌利用磷酸酯是通过 C-P 裂解酶途径完成的。由于尚未找到合适的方法分析 C-P 裂解酶的生化性质,对该途径的研究主要通过遗传学和分子生物学的手段进行。迄今大肠杆菌中负责 Pn 降解利用的 14 个基因即 *phnC-P* 的基因簇已被克隆,并进行了部分功能的研究^[5,6]。分子遗传学的证据表明,这是一个由 *phnC* 上游的启动子起始转录的操纵子,受 PHO 调节子中的 Pho BR 两组分系统所控制。这 14 个基因的功能,通过研究转座子诱导突变后对不同的磷源利用情况得到了一些证实。它们可编码 C-P 裂解酶复合体(C-P lyase complex)、磷酸酯转运系统、渗透酶等,但其中 *phnF* 和 *phnO* 基因的功能还不清楚。从蛋白质水平上看,PhnF 与 FadR、GntR 和 HutC 等调节蛋白有同源性,它们可能同属于“螺旋-转角-螺旋(Helix-turn-helix motif)”类调节蛋白家族。为了真正弄清 *phnF* 在磷酸酯途径中的作用,本文对其进行克隆表达及功能研究。

本研究为“中国科学院院长基金”资助项目。

* 联系作者。

收稿日期:1997-07-02,修回日期:1998-03-06。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

实验中所用的细菌菌株和质粒见表 1。其中高表达宿主菌 BL21(DE3)为含 T7 RNA 聚合酶基因的 λ 溶源菌。载体 pLD55 含有 *ori*_{R6ky} (R6ky DNA replication origin), 其复制需要 π 蛋白的存在。质粒 pBW120 含有大肠杆菌的整个 *phn* 操纵子基因。

表 1 细菌菌株和质粒
Table 1 Bacterial strains and plasmids

Strains and plasmids	Description	Sources
<i>E. coli</i> K-12 strains		
XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac</i> ⁻ F' [<i>pro</i> AB ⁺ <i>lacI</i> ^q Tn10(<i>tet</i> ^r)]	BLW*
BL21	DE3 F' <i>omp</i> T ₇ ⁻ m _B ⁻	BLW
JW4	DE3(<i>lac</i>)X74, <i>phn</i> (EcoB)	BLW
JW7	DE3(<i>lac</i>)X74 D <i>phoA</i> 532 D(<i>phn</i> C-P) <i>uidA</i> (DmluI):: <i>pir</i> (wt)	BLW
JW9	D <i>phoA</i> 532 D(<i>mel proP phn</i> C-P):: Tn5 <i>seq1</i> /132(Kan) <i>uidA</i> (DmluI):: <i>pir</i> (wt)	BLW
JW11	DE3(<i>lac</i>)D <i>phoA phn</i> E15:: Tn <i>phoA</i> '-9	BLW
JW12	DE3(<i>lac</i>)D <i>phoA phn</i> G35:: Tn <i>phoA</i> '-9	BLW
JW13	DE3(<i>lac</i>)D <i>phoA phn</i> F23:: Tn <i>phoA</i> '-9	BLW
JW17	Kan ^r JW9(<i>pir</i> ⁺)/ <i>phn</i> E:: Tn <i>phoA</i> '-9	This study
JW18	Kan ^r JW9(<i>pir</i> ⁺) <i>phn</i> G:: Tn <i>phoA</i> '-9	This study
JW19	Kan ^r JW9(<i>pir</i> ⁺)/ <i>phn</i> F:: Tn <i>phoA</i> '-9	This study
JW67	DE3(<i>lac</i>)D(<i>phoA, phnF</i>)	This study
Plasmids		
pBW120	Amp ^r , <i>phn</i> C-P in pUC18	BLW
pLD55	Amp ^r fl(+) <i>ori lacZ</i> (?) of pBluescriptII(SK ⁺)	BLW
pGEM-T	Amp ^r , pGEM-5zf(+) ^r cut with EcoR V, add 3'-T to both ends	Promega
pET-28-b	Kan ^r , T7 <i>lac</i> promoter, His-tag sequence	Novagen
pQX1	Amp ^r , <i>phn</i> E in pGEM-T	This study
pQX2	Amp ^r , <i>phn</i> G in pGEM-T	This study
pQX3	Amp ^r , <i>phn</i> F in pGEM-T	This study
pQX4	Amp ^r , <i>phn</i> E in pLD55	This study
pQX5	Amp ^r , <i>phn</i> G in pWX1	This study
pQX6	Amp ^r , <i>phn</i> E-SD sequence- <i>phn</i> G in pLD55	This study
pQX7	Kan ^r , <i>phn</i> F in pET-28-b	This study
pWX1	Amp ^r , SD sequence	BLW

* BLW; Barry L. Wanner's lab

1.2 培养基和生化试剂

大肠杆菌菌株主要在下列培养基上生长:LB、SOB、SOC 和 M63、MOPS 选择性培养基等。对含有质粒的菌株,需在培养基中加入抗生素、氨苄青霉素(Amp)100 μ g/ml、卡那霉素(Km)50 μ g/ml、四环素(Tc)25 μ g/ml。所用限制酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、TA 克隆试剂盒及双脱氧测序试剂盒,均购自 Promega 上海公司和上海 Sangon 生物工程有限公司。pET 高表达系统及蛋白质纯化试剂盒购自 Novagen 公司。

1.3 DNA 操作及 PCR 技术

DNA 提取、酶切、连接、钙法转化、X-gal 表达筛选以及克隆子的鉴定,皆参照文献进行^[7]。电击转化所用电压 1.70V,电容量 25 μ FD,电阻 200 Ω 。从琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段,采用 QIAGEN 试剂盒和低熔点胶抽提法;从聚丙烯酰胺凝胶中回收放射性标记的 DNA 片段以“压碎与浸泡”法为主^[7]。PCR 克隆的条件均为:

94 $^{\circ}$ C, 3min \rightarrow 94 $^{\circ}$ C, 1min \rightarrow 50 $^{\circ}$ C, 30s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C, 1min \rightarrow 72 $^{\circ}$ C, 10min \rightarrow 4 $^{\circ}$ C
↑
└──────────────────┘
× 24

1.4 P1 转导

目的 P1 裂解液的制备,由供体菌过夜培养液与等体积一定稀释度的野生株 P1kc 混匀,室温吸附 10min 后倒于 LBCG 培养皿中。培养 6~8h,加入 Tris-噬菌体缓冲液 5ml。4 $^{\circ}$ C 放置 4~6h 后收集 P1 悬浮液,用 CHCl₃ 处理该液体 2 次,保存于 4 $^{\circ}$ C。转导时用 0.1ml 对数期受体菌悬浮于 MC 溶液(10mmol/L MgCl₂, 5mmol/L CaCl₂),与等体积噬菌体裂解液混合,室温作用 20min 后加入 2.5mmol/L EDTA 溶液,涂布选择性固体培养基^[8]。

1.5 基因的高表达及表达产物的纯化

参考 Novagen 公司的说明,将带有目的基因的质粒 pET-28b 引入高表达宿主菌 BL21。挑取单菌落并接种于选择性 LB-Km 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜,按 1% 转接相同基质,培养 3h 左右。当 OD 值约为 0.6 时,加入 IPTG 至 1mmol/L,再继续培养 3h,收集菌体。每 100ml 菌液离心后重新悬浮于 4ml 预冷的 Binding buffer,超声波破碎细胞,离心取上清液。用 0.45 μ mol/L 滤器过滤后上柱,速度为每小时 10 倍柱体积,再用 10 倍体积 Binding buffer 和 6 倍体积 Washing buffer 洗柱,最后用 6 倍体积 Eluting buffer 洗脱蛋白,收集。10% SDS-PAGE 电泳按照常规方法进行^[7]。

1.6 基因缺失菌的构建

pLD55 及其衍生质粒在不含 *pir* 基因的宿主菌中不稳定,易发生重组,故可利用来构建 DNA 缺失菌。根据文献所述^[10],将具有缺失序列的 DNA 片段插入含 *ori*R_{6ky}、*tet*AR 及 *bla* 基因的质粒并转化 *pir*⁻ 宿主菌 JW13,在 LB 四环素培养基上选择抗性整合菌落。挑出数个单菌落后在 LB 平板上划线分离 2 次,再用四环素敏感培养基 TSS(Tetracycline-sensitive-selective)反筛选重组子,并检查其四环素和氨苄青霉素的敏感性,以及磷源利用情况,确定重组的发生。

1.7 磷源利用表型鉴定

在葡萄糖-MOPS 液体培养基中添加不同种类和浓度的磷源,观察大肠杆菌野生型和几种突变体的生长^[9]。在 37 $^{\circ}$ C 振荡过程中,定时测定菌液的 OD₆₀₀ 值,并作生长曲线图。

固体培养时,则以 AEPn(α -aminoethylphosphonate)为主要磷源。

1.8 凝胶延滞实验

标记反应采用 36 μ l DNA、5 μ l Klenow buffer、1 μ l Klenow fragment、3 μ l 5mmol/L dXTP(X:除标记核苷酸外的另 3 种核苷酸)、5 μ l [α -³²P]-dATP 或 dCTP,混合后于 30 $^{\circ}$ C,反应 15min,添加 2 μ l 5mmol/L dNTP 继续作用 5min,即取样电泳,回收 DNA。得到的标记 DNA 片段与相应的蛋白质在 25 $^{\circ}$ C 反应 25min 后再电泳,电泳的时间根据 DNA 和蛋白质分子的大小而确定。电泳胶板曝光于 X-光片后,再将胶片定影、干燥。

2 结 果

2.1 PCR 扩增 *phnE*、*phnF* 和 *phnG* 基因片段

根据已有的资料^[11],设计合成了 P1~P6 6 段寡核苷酸引物,其序列如下:

P1:5'-CGAGAGCTCCATATGCAAACCATCACC-3' P4:5'-CGACTCGAGTCATGCGTTGTCTCC-3'
 P2:5'-CGAACTAGTTATCAGATAAAGTGCTTAG-3' P5:5'-CGACATATGCACTTGTCTACACATCC-3'
 P3:5'-CGACTGCAGCCATATGCACGCAGATACC-3' P6:5'-CGAGGATCCGGTATCTGCGTGCAT-3'

P1~P6 引物的 5' 端位点分别为 SpeI、SacI、PstI、XhoI、NdeI 和 BamHI。pBW120 作为 PCR 反应的模板。

以 P1 和 P2 为引物扩增出 848bp 的 DNA 片段,为 *phnE* 基因;P3 和 P4 引物扩增得到的 464bp DNA 片段,为 *phnG* 基因;以 P5 和 P6 引物扩增出的 748bp DNA 片段,为 *phnF* 基因。PCR 产物的电泳鉴定结果如图 1 所示。

2.2 PCR 产物的 TA 克隆及序列测定

由 Taq Plus II 聚合酶催化的 PCR 反应,可得到准确度较高、带有 dA 尾的 *phnE*、*phnF* 和 *phnG* 基因片段,分别将它们与 pGEM-T 载体连接,转化大肠杆菌 XL1-Blue,并选出带有 DNA 插入片段的 pGEM-T。

为避免 PCR 过程的差错,确证所得亚克隆片段的序列与已报道的序列一致,对上述三个基因进行了序列测定。分别从 5 个 *phnE*、3 个 *phnF* 和 4 个 *phnG* 候选重组质粒中得到 1 个全序列正确的亚克隆,分别命名为 pQX1 (pGEM-*phnE*)、pQX2 (pGEM-*phnG*) 和 pQX3 (pGEM-*phnF*)。

2.3 用 P1 转导构建 *phnE*、*phnF* 和 *phnG* 的插入突变菌株

通过野生型大肠杆菌的 P1 kc 感染突变菌株 JW11、JW12 和 JW13,并获得裂解液。再将其分别转导 *Mel* 缺失的 JW9 菌株,用 *Mel*-M63 平板筛选出转导子。检验转导子对卡那霉素的抗性(因 *TnphoA'*-9 带有 *aph*),并在 LB 平板上纯化 4 次后各保存 1 菌株,定名为 JW17、

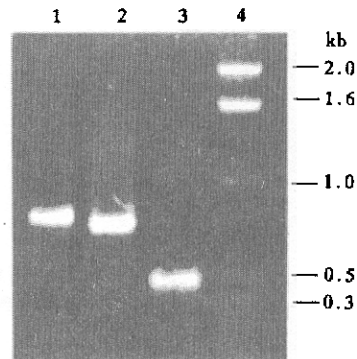


图 1 PCR 扩增得到的 *phnE*、*phnF* 和 *phnG* 基因片段
 Fig.1 PCR products of *phnE*, *phnF* and *phnG* gene
 1. *phnE*, using P1 and P2; 2. *phnF*, using P5 and P6;
 3. *phnG*, using P3 and P4; 4. 1kb ladder.

JW18、JW19, 它们分别为带有 *phnE*、*phnF* 和 *phnG* 基因的转座子(TnphoA'-9)插入突变体。

2.4 pQX6 的构建和鉴定

将 SpeI-SacI 双酶切 pQX1 得到的 *phnE* 片段与载体 pLD55 连接, 形成 pQX4(*phnE*/pLD55)。pQX2 经 NdeI-XhoI 双酶切出 *phnG*, 连入含有 SD 序列的质粒 pWX1, 得到 pQX5(SD-*phnG*/pWX1)。再将 pQX5 用 PstI-XhoI 酶切, 产生的 SD-*phnG* 片段转移到 pQX4 上, 即构建成 *phnF* 全缺失质粒 pQX6(pLD55/*phnE*-SD-*phnG*)。pQX4、pQX5 和 pQX6 皆转化到宿主菌 JW7, 并保存。

酶切鉴定和 PCR 鉴定证明, pQX6 构建正确。

2.5 *phnF* 基因全缺失突变菌株的构建及鉴定

将 *phnF* 缺失质粒 pQX6 转化 JW13(*pir*⁻) 菌株, 得到四环素和氨基青霉素抗性的转化子。经非选择性培养基 LB 培养, 积累一些分离子后, 再用四环素敏感平板 TSS 反向筛选, 以获得全部分离子。分别挑取数个单菌落, 检测其抗生素敏感性。Tc、Amp 和 Km 敏感的菌株, 为 pQX6 与 JW13 染色体重组后的 *phnF* 全缺失突变菌株 JW67。该重组过程如图 2 所示。

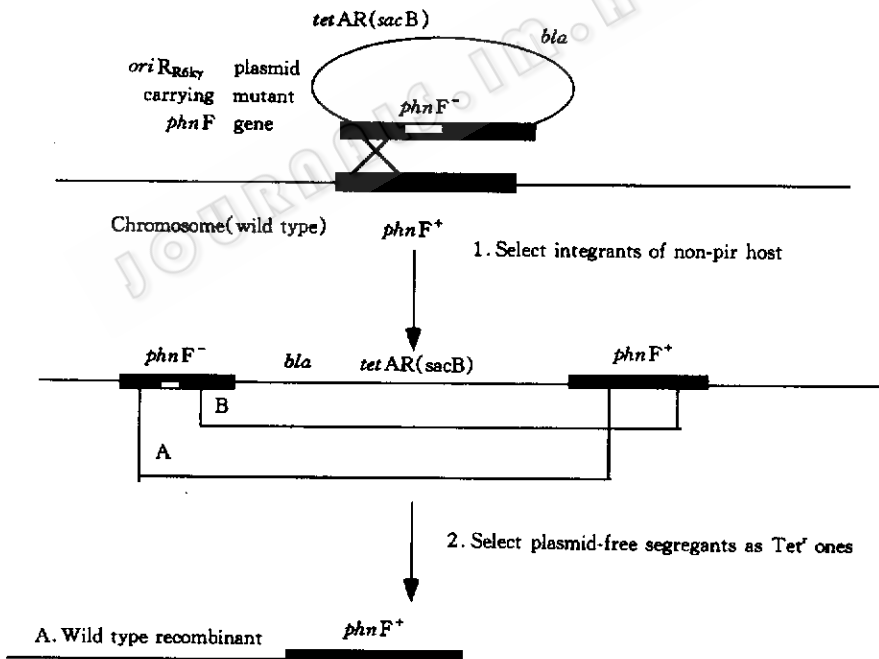


图 2 *phnF* 全缺失菌株的构建原理

Fig.2 *phnF* clean deletion in chromosome of *E. coli* (JW13)

2.6 几种实验菌株对磷源的利用

将 JW4(野生型), JW13 和 JW19(*phnF*::TnphoA'-9), 以及 JW67(Δ *phnF*) 分别在

含 0.1mmol/L Pi 的 Glucose-MOPS 平板上划线培养 24h, 然后接种含不同磷源的液体培养基, 按一定时间间隔取样, 测定其 OD₆₀₀ 值。从图 3 所示的生长曲线可见, 野生型与 3 种突变型对高 Pi 和低 Pi 的利用并无明显差别, 而对于 AEPn 的利用则显著不同。与野生型相比, JW13 和 JW19 的生长滞后, 但最后能达到相似。与其亲本菌 JW13 相比, JW67 几乎完全丧失了利用 AEPn 的能力。

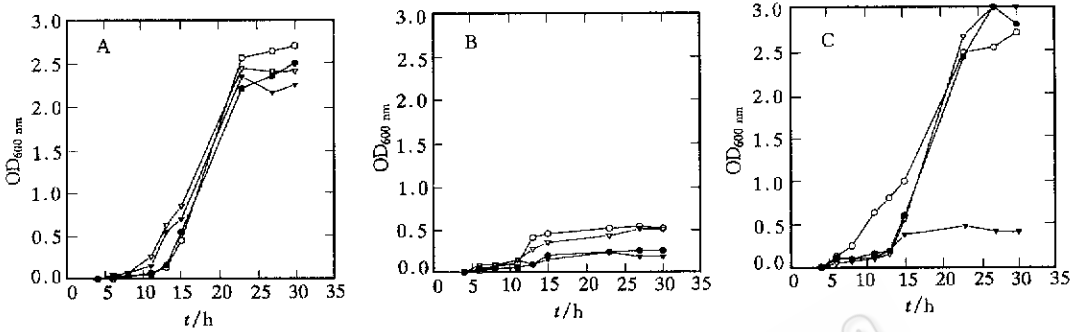


图 3 JW4、JW13、JW19 和 JW67 菌株在含不同磷源培养基上的生长情况

Fig. 3 Growth of JW4, JW13, JW19 and JW67 on different Pi sources

- A: High Pi: 0.4% glucose-MOPS medium with 0.0125mmol/L Pi plus 0.5mmol/L Pi;
- B: Low Pi: 0.4% glucose-MOPS medium with 0.0125mmol/L Pi;
- C: AEPn: 0.4% glucose-MOPS medium with 0.0125mmol/L Pi plus 0.5mmol/L AEPn;
- JW4 ● JW13 ∇ JW19 ▼ JW67

2.7 *phnF* 基因的高表达及其产物的纯化

pQX3 中的 *phnF* 基因经 NdeI 和 BamHI 酶切后插入 pET-28b 载体, 得到的重组质粒 pQX7, 并转于高表达宿主菌 BL21(DE3)。通过 IPTG 诱导, 从该菌获得过量表达的蛋白质产物, 分子量近 30kDa, 即为 PhnF 蛋白(见图 4)。

从上述诱导菌的无细胞抽提液中, 得到总蛋白质粗提物。再利用 *phnF* pET-28b 上的 His-Tag 序列和 Novagen 提供的亲和层析柱, 纯化高表达目的蛋白。纯化后的 PhnF 蛋白达到电泳纯, 在图谱上呈现单一条带, 如图 5 所示。

2.8 PhnF 蛋白与 *phn* 操纵子 DNA 片段的相互作用

用 BamHI 将 pBW120 中的 *phn* 操纵子 DNA 片段切出, 经纯化后用 MspI 和 Sau3AI 酶消化, 所得片段均在 500bp 以下。

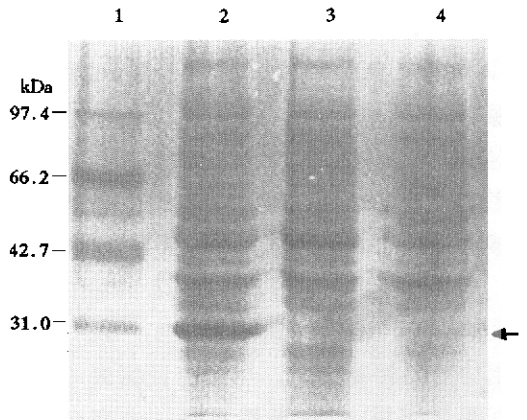


图 4 PhnF 蛋白的表达

Fig. 4 Expression of PhnF protein (10% SDS-PAGE)

- 1. Protein marker; 2. pQX7 in BL21 (DE3), induced by IPTG; 3. pQX7 in BL21 (DE3), not induced; 4. pET-28b in BL21 (DE3), induced by IPTG

标记回收这些片段后,使之与高表达的 PhnF 蛋白产物相作用。从 GEL-Retardation 分析的结果可以看出,PhnF 蛋白和 *phn* 操纵子 DNA 作用后凝胶电泳图谱的条带有所增加(如图 6),说明有结合作用存在。

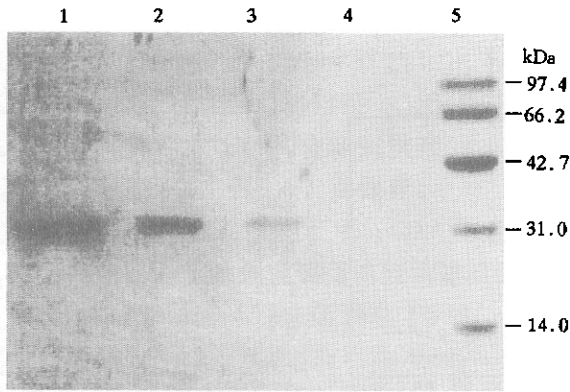


图 5 纯化的 PhnF 蛋白

Fig. 5 Purification of PhnF protein

1-4. Different loading quantity of purified PhnF protein;
5. Protein marker

lane 1: 20 μ g; lane 2: 15 μ g;
lane 3: 10 μ g; lane 4: 5 μ g

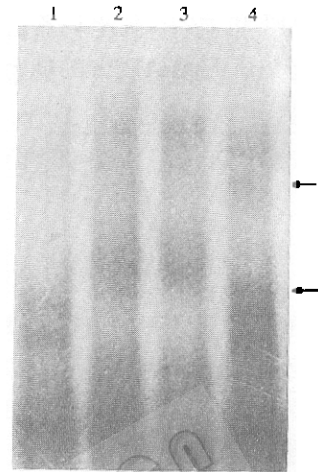


图 6 PhnF 蛋白与 *phn* 操纵子的相互作用

Fig. 6 Interaction between PhnF protein and the entire *phn* operon

1. Free DNA; 2 and 3. Without competition;
4. With competition

3 讨 论

本文利用 P1 转导构建了大肠杆菌 *phnF* 的 Tn_{phoA'}-9 插入突变株 JW19。同时利用同源重组构建了大肠杆菌染色体 *phnF* 全缺失突变菌株 JW67。生长实验表明,PhnF 蛋白对 P_n 的代谢可能起着激活因子的作用。在 JW13 和 JW19 中由于插入了转座子仅部分影响了它的功能,仍有一些渗漏表达;而在全缺失后,激活功能完全丧失,菌株几乎不再能够利用 AEP_n。这便为 *phnF* 产物具有调节功能的推测提供了一个依据。

从凝胶延滞实验的结果来看,PhnF 蛋白与 *phn* 操纵子中的 DNA 片段有结合作用,而具体结合位点尚待进一步证实。这一点与该蛋白的螺旋-转角-螺旋结构花式所相应的可能功能是相吻合的。尽管有证据表明 *phnF* 基因产物在 AEP_n 的吸收和降解过程中都没有明显作用,但它显然不是一个完全无用的组分。从 *phn* 操纵子的研究历史可以看出,最早曾确定 *phn* 操纵子中有 17 个 ORF 存在,而 *phnA*、*phnB* 和 *phnO* 先后被证明并不是该操纵子的成员,因此现在所示的 *phn* 操纵子是由 14 个基因组成,但 *phnF* 和 *phnO* 并未被排除在外。从本文的结果可以看出,*phnF* 的存在是菌株利用 AEP_n 所必须的,可能与调节有关,而其作用也许是通过与特定 DNA 序列的结合而实现。

本文在得到 *phnF* 基因全缺失突变菌株的同时也首次得到了 *phnE* 和 *phnG* 基因的亚克隆,并获得 *phnE* 和 *phnG* 基因的 Tn_{phoA'}-9 的插入突变株。这可用于进一步研究这两个基因及 *phn* 操纵子的结构和功能。同时,由于 *phnF* 和 *phnO* 基因在序列、结构以

及功能上都可能有相似性,因此,本文的研究思路及结果也可为 *phnO* 基因功能的研究提供参考。

大肠杆菌 *phn* 操纵子的分子生物学研究及遗传学研究已取得相当的进展,其中少数功能未定的基因正在逐步弄清。由于 Pn 在自然界的广泛存在,以及能够利用 Pn 的细菌种类和利用方式的多样性,使得这方面的研究始终获得关注。除大肠杆菌 *phn* 操纵子外,不同的菌株对相同 Pn 源的利用,以及相同的菌株对不同 Pn 源的利用和调节都值得研究。

致谢 美国普度大学 Barry L. Wanner 教授为本研究提供了菌种和技术支持,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Wanner B L. *E. coli and Salmonella typhimurium*. In: Neidhardt F C (eds.), Cellular and Molecular Biology. Vol. 2. Washington D C: American Society for Microbiology, 1987, 1326~1333
- 2 Wanner B L. J Cell Biochem, 1993, 51: 47~54
- 3 Metcalf W W, Wanner B L. J Bacteriol 1993, 175(11): 3430~3442
- 4 Wanner B L, Boline J A. J Bacteriol, 1990, 172: 1186~1196
- 5 Metcalf W W, Wanner B L. J Bacteriol, 1991, 173: 587~600
- 6 Wanner B L, Metcalf W W. FEMS Microbiology Letters, 192, 100: 133~140
- 7 Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Menu Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989
- 8 Wanner B L. J Mol Biol, 1989, 191: 39~58
- 9 Lee K S, Metcalf W W, Wanner B L. J Bacteriol, 1992, 174: 2501~2510
- 10 Metcalf W W, Jiang W, Daniels L L *et al.* Plasmid, 1996, 35: 1~13

Studies on *phnF* in the Phosphonate Utilization Pathway of *Escherichia coli*

Xia Qi Jiang Weihong Liu Yang Zhao Guoping

(Laboratory of Molecular Regulation for Microbial Secondary Metabolism,

Shanghai Institute of Plant Physiology, The Chinese Academy of Science, Shanghai 200032)

Abstract The *phn* operon is responsible for phosphonate utilization of *E. coli*. *phnE*, *phnF* and *phnG* genes were cloned by PCR and TA cloning method, and their nucleotide sequences have been determined. By P1 phage transduction, the mutant of *phnF*::TnphoA'-9(JW19) was constructed. The *phnF* clean deletion in JW67 chromosome was also constructed by allele replacement of *phnE* and *phnG* sequences. According to their growth on AEPn-MOPS medium, TnphoA'-9 only has a mild effect on Pn utilization of JW19 while JW67 nearly lost the ability to use Pn as P source. PhnF protein was overexpressed and purified by affinity chromatography. The purified PhnF protein was used to interact with the entire *phn* operon. Gel retardation experiment showed an obvious change on the pattern of gel bands. Thus we learned that PhnF protein is probably a regulatory protein, which acts through binding to DNA.

Key words *Escherichia coli*, *phnF* gene, phosphonate