

耐辐射奇球菌RecR和SSB蛋白的克隆表达 及抗紫外功能*

常晓松^{1,2} 杨澜¹ 付文娟¹ 赵清¹ 胡冉¹ 陈济安¹ 舒为群^{1**}

(¹重庆第三军医大学环境卫生学教研室 重庆 400038)

(²广州军区武汉总医院检验科 武汉 430070)

摘要 RecR和SSB蛋白是耐辐射奇球菌(*Deinococcus radiodurans*)同源重组修复RecFOR途径的关键蛋白。以耐辐射奇球菌基因组为模板,PCR扩增*recR*和*ssb*基因片段,以质粒pET32a(+)为载体,构建重组质粒pET32a(+)-*recR*和pET32a(+)-*ssb*,并转化到*Escherichia coli* BL21 (DE3)中,IPTG诱导蛋白表达,表达产物采用SDS-PAGE鉴定,同时,应用平板菌落计数法检测紫外辐照前后各组细菌生存率变化,研究RecR和SSB蛋白在*E. coli* BL21 (DE3)抗紫外线辐射中的作用。结果表明,RecR和SSB能够克隆至pET32a(+)载体并在*E. coli* BL21(DE3)中诱导表达。紫外辐照生存率实验结果提示,RecR和SSB蛋白能增强*E. coli* BL21 (DE3)对紫外线辐射的抵抗能力。RecR和SSB的成功表达及紫外抗性特点将为耐辐射奇球菌超强耐辐射机制的研究提供实验基础。图2 表2 参14

关键词 *recR*; *ssb*; 基因克隆; 耐辐射奇球菌; 紫外抗性

CLC Q78+Q939.105

Cloning Expression and UVC Resistant Function of RecR and SSB Proteins from *Deinococcus radiodurans**

CHANG Xiaosong^{1,2}, YANG Lan¹, FU Wenjuan¹, ZHAO Qing¹, HU Ran¹, CHEN Ji'an¹ & SHU Weiqun^{1**}

(¹Department of Environment Hygiene, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

(²Department of Clinical Laboratory, Wuhan General Hospital of Guangzhou Command, Wuhan 430070, China)

Abstract To construct the expression recombinants of RecR and SSB from *Deinococcus radiodurans*, express these target proteins in *Escherichia coli* BL21 (DE3) and analyze UVC resistant abilities of RecR and SSB in *E. coli*, *recR* and *ssb* genes were amplified by PCR from genomic DNA of *D. radiodurans* and inserted into expression plasmid vector pET32a(+) to construct pET32a(+)-*recR* and pET32a(+)-*ssb*. The recombinant plasmids were then transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and the recombinant proteins were expressed by induction with isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) and analyzed with SDS-PAGE. Compared to the survival rate of bacteria in each group before and after UVC irradiation, the recombinant plasmids pET32a(+)-*recR* and pET32a(+)-*ssb* were obtained and these recombinant proteins could be highly expressed in *E. coli* BL21 (DE3). The results indicated that RecR and SSB from *D. radiodurans* could be expressed in *E. coli* BL21 successfully and could increase UVC resistance of *E. coli*. This study provides basic data for further studies on and future applications of the recombinants RecR and SSB. Fig 2, Tab 2, Ref 13

Keywords *recR*; *ssb*; gene clone; *Deinococcus radiodurans*; UV resistance

CLC Q78+Q939.105

耐辐射奇球菌(*Deinococcus radiodurans*)是目前发现的对电离辐射、紫外辐射、干燥、强氧化剂以及一些化学诱变剂抗性最强的一类细菌,其对 γ 射线的最大耐受量高达15 kGy^[1],脊椎动物(包括人类)整体离子辐射暴露剂量最多达到10 Gy,绝大多数细菌离子辐射暴露极限剂量在200 Gy以内^[2]。

电离辐射、化疗药物及细胞代谢产物等多种外源和内源性因素都能引起不同形式的DNA损伤,其中DNA双链断裂

为最严重的损伤形式。研究表明,同源重组修复机制在DNA双链断裂损伤中具有重要作用^[3]。在大肠杆菌的同源重组修复机制中,RecBCD和RecFOR途径介导了双链和单链缺口损伤修复^[4]。然而,在耐辐射奇球菌中,并不存在RecBCD途径相关基因,因此,RecFOR途径(包括RecF、RecO、RecR、SSB等蛋白)在此类细菌的耐辐射机制中具有重要作用。本实验组前期已经对RecFOR途径中的RecF和RecO蛋白进行了克隆表达,本次实验拟通过对RecR和SSB的相关基因进行PCR扩增,将产物整合至原核表达载体pET32a(+),构建RecFOR途径关键蛋白RecR和SSB的表达体系,通过对诱导条件的优化,纯化得到功能蛋白,对表达菌株的抗紫外功能进行检测,为后续研究各关键蛋白的功能及RecFOR途径的机制提供基础和参考资料。

收稿日期: 2009-11-03 接受日期: 2009-11-16

*国家自然科学基金项目(Nos. 30670635, 50804049)、全军医药卫生科研基金项目(No. 06M0199)和重庆市自然科学基金项目(No. CSTC2007BB5004)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 30670635, 50804049), the Medical Research Foundation of the Chinese People's Liberation Army (No. 06M0199) and the Natural Science Foundation of Chongqing, China (No. CSTC2007BB5004)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: xm0630@sina.com)

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 *Deinococcus radiodurans* 标准株购自ATCC(ATCC13939TM); *Escherichia coli* DH5 α 和*E. coli* BL21(DE3)由第三军医大学基础微生物教研室胡福泉教授惠赠; pGEM-T easy载体购自美国Promega公司; pET32a(+)由第三军医大学军事预防预防医学院防原教研室王军平研究员馈赠。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶*Eco*RI、*Hind*III、Ex TaqDNA聚合酶(大连TaKaRa公司); T4 DNA连接酶(美国Promega公司); 基因组DNA小量提取试剂盒(大连TaKaRa公司); 质粒快速抽取试剂盒和胶回收试剂盒(美国Omega公司); IPTG(德国Merck公司); 氨苄青霉素(美国Sigma公司); 引物合成和测序由上海Invitrogen公司完成。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA的提取 将-70℃冻存的耐辐射奇球菌液三线法划线于TGY平板37℃过夜培养,挑取单克隆菌落接种于100 mL TGY(每100 mL含胰蛋白0.5 g,酵母提取液0.3 g,葡萄糖0.1 g, pH 7.0)培养基中,32℃、220 r/min摇床振荡培养24 h,采用TaKaRa公司细菌基因组DNA小量提取试剂盒按说明书提取耐辐射奇球菌基因组DNA。

1.2.2 PCR扩增*recR*及*ssb* 根据GenBank收录的耐辐射奇球菌基因序列*recR*(NP293922)及*ssb*(NP293826)编码区,应用Primer 5.0设计特异性引物(表1),以耐辐射奇球菌基因组DNA为模板,用TaKaRa EX Taq酶进行PCR扩增。扩增体系为:10 mmol/L dNTPs 4 μ L, 10 \times Ex Taq PCR Buffer 5 μ L, 25 mmol/L Mg²⁺ 3 μ L, 10 pmol/ μ L正反向引物各1 μ L; 基因组DNA 4 μ L; 5 U/ μ L Taq酶0.5 μ L; DMSO 2.5 μ L, 加超纯水补足50 μ L总体积。*recR* PCR扩增条件为:95℃预变性5 min; 94℃变性45 s; 50℃退火1 min, 72℃延伸1 min。共37个循环,72℃末次延伸10 min。*ssb* PCR扩增条件为:95℃预变性5 min; 94℃变性45 s; 48℃退火1 min, 72℃延伸1 min。共37个循环,72℃末次延伸10 min。PCR产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳,切胶回收产物并连接至pGEM-T easy载体,将连接反应产物转化DH5 α 感受态中,蓝白斑筛选阳性克隆。纯化质粒,送上海Invitrogen公司测序确认。

1.2.3 pET32a(+)-*recR*和pET32a(+)-*ssb*重组表达质粒构建及阳性克隆鉴定 pET32a(+)载体酶切体系:*Eco*RI和*Hind*III各5 μ L; 10 \times M Buffer 10 μ L; pET32a(+)质粒50 μ L; 加超纯水至100 μ L。pGEM-T-*recR*和pGEM-T-*ssb*酶切体系:*Eco*RI和*Hind*III各5 μ L; 10 \times M Buffer 10 μ L; pGEM-T-*recR*和pGEM-T-*ssb*分别50 μ L; 加超纯水至100 μ L。酶切体系置于37℃水浴1.5 h。

配制1.2%琼脂糖凝胶,上样120 μ L(100 μ L酶切产物+20 μ L 6 \times buffer上样缓冲液),120 V,电泳30 min。采用Omega公司胶回收试剂盒分别回收载体和目的片段的双酶切产物,载体酶切产物回收后浓度为39 ng/ μ L, *recR*回收后浓度为45 ng/ μ L, *ssb*回收后浓度为47 ng/ μ L。

连接体系组成:10 \times T₄连接缓冲液2 μ L; 载体pET32a(+) 1 μ L; 按载体和基因产物1:6的比例加入连接体系, T₄连接酶1 μ L, 超纯水补足20 μ L。室温放置1 h后,16℃连接过夜。取5 μ L连接反应产物加入100 μ L感受态BL21(DE3)中,冰浴30 min,42℃水浴90 s,冰浴2 min后加入37℃预温的SOC培养基950 μ L。37℃、200 r/min摇床振荡培养1.5 h。分别取200 μ L转化液涂布接种至含100 μ g/mL氨苄西林的LB平板上,37℃过夜培养。挑取平板上的菌落到含100 μ g/mL氨苄西林的LB培养液中,37℃、200 r/min摇床振荡培养至D_{600nm}值0.8左右,提质粒酶切鉴定并测序验证。

1.2.4 目的蛋白的诱导表达 挑取酶切验证的各阳性菌株单菌落至终浓度为100 μ g/mL氨苄西林的10 mL LB培养液中,37℃、200 r/min摇床振荡过夜;取50 μ L过夜培养物接入终浓度为100 μ g/mL氨苄西林的10 mL LB培养液中,37℃、200 r/min摇床振荡培养至D_{600nm}值为0.4左右;IPTG终浓度0.1、0.3、0.5、1 mmol/L,37℃通气培养,在不同诱导时间(1、3、5、12 h)取1 mL样品放入EP管中,室温12 000 r/min,离心1 min;沉淀悬于50 μ L 2 \times SDS凝胶加样缓冲液与50 μ L无菌双蒸水混合液中,100℃加热5 min,12 000 r/min,离心1 min,冰上放置。每孔加入10 μ L混合液。以1~8 V/cm电压梯度电泳。电泳结束后,取出凝胶,浸泡在100℃双蒸水中漂洗10 min,加热的考马斯亮蓝染色液中染色30 min,100℃双蒸水再次漂洗5~10 min后用凝胶分析系统进行结果分析。

1.2.5 紫外辐射抗性测定 用间接计数法调整含pET32a(+)-*recR*、pET32a(+)-*ssb*、pET32a(+)及无载体的*E. coli* BL21菌液浓度在1 \times 10⁸左右。调整紫外灯与照射台面的照射功率为1 J/s,照射前打开紫外灯预热30 min,使紫外灯强度稳定。每个培养基上加入0.2 mL菌液(菌液浓度根据预试验结果进行稀释调整),用灭菌L棒均匀涂抹于LB固体培养基表面(培养基中IPTG终浓度为0.1 mmol/L)。培养平板表面标注UV照射剂量(25、50、75、100、150、200 J/m²),各辐照剂量做3个重复测定平板,留一个平板做空白对照。照射完毕后所有培养平板用黑纸包裹,倒置放于37℃恒温培养箱内,孵育至d 2取出平板计数,计算存活率。

2 结果与分析

2.1 各目的片段的PCR扩增

以耐辐射奇球菌基因组为模板,运用Primer 5.0设计的引物扩增得到相应的目的片段,其大小与NCBI上的序列大

表1 目的基因扩增引物序列及酶切位点
Table 1 Primers and restriction enzymes

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	酶切位点 Restriction site
<i>recR</i>	(Forward) 5'-CGCGAATTCATGAAATATCCGCCTCC-3'	<i>Eco</i> RI
	(Reverse) 5'-CGCAAGCTTCATGGCTCAGGCTACCG-3'	<i>Hind</i> III
<i>ssb</i>	(Forward) 5'-CGCGAATTCATGGCCGAGGCATGAACCA-3'	<i>Eco</i> RI
	(Reverse) 5'-CGCAAGCTTCATGTTGGGTGCTTGGTG-3'	<i>Hind</i> III

小相同(图1), 送上海生工测序得到进一步的确认, 片段与NCBI上公布序列完全一致. PCR产物分子大小分别为: *recR* 700 bp; *ssb*: 982 bp.

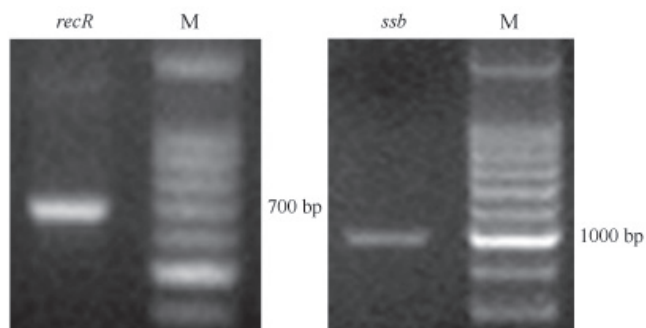


图1 *recR*和*ssb* PCR产物凝胶电泳
Fig. 1 PCR products of *recR* and *ssb* gel electrophoresis

2.2 RecR和SSB融合蛋白的诱导表达

在IPTG浓度为0.1、0.3、0.5、1 mmol/L, 培养时间分别为1、3、5、12 h, 培养温度分别为16 °C和37 °C条件下, 对各蛋白进行诱导表达. 各蛋白在培养温度37 °C、IPTG 1 mmol/L、12 h培养条件下, 其蛋白诱导浓度最高. 蛋白条带大小与预计理论值相符(*RecR*融合蛋白相对分子质量为 45.7×10^3 , *SSB*融合蛋白相对分子质量为 54.7×10^3) (图2).

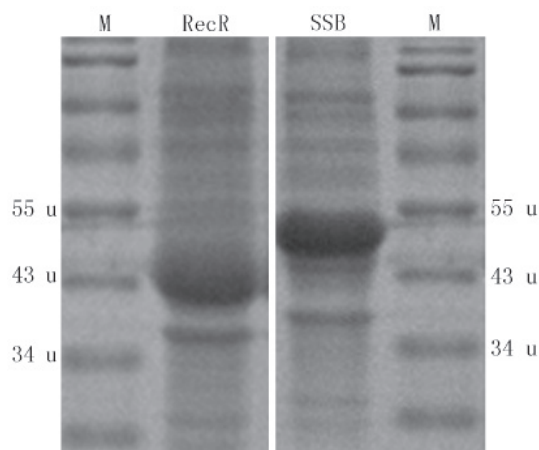


图2 RecR和SSB融合蛋白SDS-PAGE分析
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of RecR and SSB proteins

2.3 RecR和SSB融合蛋白紫外辐射防护结果

与空载体转化BL21和BL21比较, *E. coli* pET32a(+)-*recR*和*E. coli* pET32a(+)-*ssb*在25~150 J/m²的紫外辐射剂量下, 表

现出较强的辐射抗性 ($P < 0.01$) (表2).

3 讨论

本实验以耐辐射奇球菌基因组为模板, 利用Primer 5.0设计RecFOR关键基因*recR*和*ssb*的引物, 在引物上下游分别加载*EcoRI*和*HindIII*酶切位点, 并在引物5'末端补充2~3个保护性碱基. pET32a(+)载体上带有编码6×His标签的核苷酸序列, 能利用RecR和SSB融合蛋白中所带有的6×His标签, 有效地通过金属离子亲和层析进行纯化而不影响蛋白的表达、折叠和生物学活性. 结果表明, RecR和SSB融合蛋白在BL21中均成功诱导表达.

高效的DNA损伤修复机制在耐辐射奇球菌对特殊环境压力的抗性中具有重要作用, 相关研究具有良好的应用前景, 因此备受关注. 研究表明, 在大肠杆菌中, *rec*基因决定了其重组修复系统的主要途径, 对*E. coli*重组修复途径的研究发现, 其修复途径启动阶段包括一条涉及*recB*、*recC*、*recD*基因的RecBCD途径和一条包括*recF*、*recO*、*recR*等基因的RecFOR途径^[5]. 在耐辐射奇球菌基因组中, 没有找到RecB和RecC的同源物, 如果对照大肠杆菌中同源重组的几种途径, 按照经典遗传学理论, 在RecBCD途径不能运作的情况下, 基因组仍然具有重组活性, RecFOR途径必然发挥非常重要的作用^[6].

目前研究表明, RecFOR途径在耐辐射奇球菌的抗辐射方面具有重要的作用, 通过对该途径关键基因的敲除研究表明, *recF*、*recO*、*recR*及*ssb*的缺失能够导致耐辐射奇球菌辐射抗性显著降低. 针对大肠杆菌和嗜热菌的研究表明, RecO和RecF之间无直接的相互作用, RecR能够分别与RecO和RecF形成复合物, RecFR复合物能够识别dsDNA-ssDNA接合点, 增强RecOR与DNA的亲合力, 从而介导RecA蛋白微丝的形成和延伸^[7-10]. SSB在RecA微丝形成过程中具有较为复杂的作用, 在RecA微丝延伸阶段, SSB蛋白能够解除DNA二级结构, 从而保证RecA微丝的正常延伸^[11], SSB结合在ssDNA上能够保护裸露的ssDNA免受核酸酶或内切酶的降解. 但是, 如果SSB持续结合在ssDNA上, 将抑制RecOR与DNA的结合, 影响RecA微丝的形成^[12], 因此, 在进行同源修复启动阶段, RecO将SSB从ssDNA上移除^[13]. 将RecR和SSB在BL21中进行诱导表达后, 转化菌耐紫外辐射剂量得到明显增强, 与空载体宿主菌和宿主菌比较, 在本实验所选择的25~200 J/m²辐照范围均具有统计学差异, 前期大肠杆菌研究表明, RecFOR途径的*recO*、*recQ*、*recJ*、*recF*等基因在紫外辐射抗性方面具有重要作用^[14], 本研究结果提示, 耐辐射奇球菌

表2 不同菌株经不同剂量UVC辐照后存活率变化 ($N=3$, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Surviving rate of different strains following different UVC irradiation doses ($N=3$, $\bar{x} \pm s$)

菌株 Strain	紫外辐射剂量 UVC irradiation dose ($H/J m^2$)						
	0	25	50	75	100	150	200
<i>E. coli</i> pET32a(+)-RecR	$(1.69 \pm 0.09) \times 10^8$	$(9.00 \pm 0.10) \times 10^5$	$(3.10 \pm 0.33) \times 10^4$	$(5.60 \pm 0.71) \times 10^3$	$(1.75 \pm 0.33) \times 10^2$	$(0.60 \pm 0.23) \times 10^2$	0
<i>E. coli</i> pET32a(+)-SSB	$(2.56 \pm 0.17) \times 10^8$	$(8.60 \pm 0.14) \times 10^5$	$(1.40 \pm 0.07) \times 10^4$	$(3.30 \pm 0.28) \times 10^3$	$(5.65 \pm 1.80) \times 10^2$	$(1.10 \pm 0.30) \times 10^2$	0
<i>E. coli</i> pET32a(+)	$(2.54 \pm 0.27) \times 10^8$	$(1.37 \pm 0.08) \times 10^5$	$(1.02 \pm 0.12) \times 10^4$	$(8.40 \pm 0.79) \times 10^2$	30±13	0	0
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	$(2.23 \pm 0.16) \times 10^8$	$(1.45 \pm 0.20) \times 10^5$	$(7.80 \pm 0.35) \times 10^3$	$(7.20 \pm 0.33) \times 10^2$	25±8	0	0

*其Log值与相应剂量下*E. coli* pET32a(+)和*E. coli* BL21 Log值相比, $P < 0.01$

* shows its Log value significantly different ($P < 0.01$) with those of *E. coli* pET32a(+) and *E. coli* BL21(DE3) at same UVC irradiation dose

RecFOR途径的RecR和SSB在紫外辐射防护方面具有重要作用,其具体机制还有待进一步研究.

迄今为止,耐辐射奇球菌RecFOR途径机制虽取得一定的进展,但其蛋白之间的相互作用机理及离子辐射致单双链断裂的具体修复机制尚不明确,因此,本实验在前期克隆表达RecF和RecO的基础上,成功克隆表达RecFOR途径的关键蛋白RecR和SSB,其在大肠杆菌中的紫外辐射防护功能研究表明,RecR和SSB能够增强大肠杆菌的抗辐射能力.同时,RecFOR途径关键蛋白的成功克隆表达为后续体外实验研究各蛋白之间以及各蛋白与单双链DNA之间的相互作用机制奠定了基础,也为耐辐射奇球菌超强辐射防护能力的机制研究提供了实验支持.

References

- 1 Daly MJ, Ouyang L, Fuchs P, Minton K W. *In vivo* damage and *recA*-dependent repair of plasmid and chromosomal DNA in the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol*, 1994, **176** (12): 3508~3517
- 2 Thornley MJ. Radiation resistance among bacteria. *J Appl Bacteriol*, 1963, **26**: 334~345
- 3 Makharashvili N, Mi T, Koroleva O, Korolev S. RecR-mediated modulation of RecF dimer specificity for single- and doublestranded DNA. *J Biol Chem*, 2009, **284** (3): 1425~1434
- 4 Kowalczykowski SC. Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem Sci*, 2000, **25** (4): 156~165
- 5 Lewin B. *Genes VIII*. Beijing, China: Science Publishing Company, 2005. 513
- 6 Rocha EP, Cornet E, Michel B. Comparative and evolutionary analysis of the bacterial homologous recombination systems. *Public Library Sc*, 2005, **1** (2): 247~259
- 7 Honda M, Fujisawa T, Shibata T, Mikawa T. RecR forms a ring-like tetramer that encircles dsDNA by forming a complex with RecF. *Nucleic Acids Res*, 2008, **36** (15): 5013~5020
- 8 Sakai A, Cox MM. RecFOR and RecOR as distinct RecA loading pathways. *J Biol Chem*, 2008, **284** (5): 3264~3272
- 9 Honda M, Inoue J, Yoshimasu M, Ito Y, Shibata Ta, Mikawa T. Identification of the RecR toprim domain as the binding site for both RecF and RecO. *J Biol Chem*, 2006, **281** (27): 18549~18559
- 10 Sakai A, Cox MM. RecFOR and RecOR as distinct RecA loading pathways. *J Biol Chem*, 2009, **284** (5): 3264~3272
- 11 Kowalczykowski SC, Clow JC, Somani R, Varghese A. Effects of the *Escherichia coli* SSB protein on the binding of *Escherichia coli* RecA protein to single-stranded DNA: Demonstration of competitive binding and the lack of a specific protein-protein interaction. *J Mol Biol*, 1987, **193** (1): 81~95
- 12 Hobbs MD, Sakai A, Cox MM. SSB protein limits RecOR binding onto single-stranded DNA. *J Biol Chem*, 2007, **282** (15): 11058~11067
- 13 Inoue J, Honda M, Ikawa S, Shibata T, Mikawa T. The process of displacing the single-stranded DNA-binding protein from single-stranded DNA by RecO and RecR proteins. *Nucleic Acids Res*, 2008, **36** (1): 94~109
- 14 Handa N, Ichige A, Kobayashi I. Contribution of RecFOR machinery of homologous recombination to cell survival after loss of a restriction-modification gene complex. *Microbiology*, 2009, **155** (7): 2320~2332