

耐辐射奇球菌 *recA* 基因的克隆、表达及其 对 *recA* 缺损大肠杆菌辐射抗性的影响

高冠军 华跃进*

(浙江大学原子核农业研究所 农业部核农学重点实验室 杭州 310029)

摘 要 将耐辐射奇球菌(*Deinococcus radiodurans*)的 *recA* 基因克隆到表达质粒 pET15b 中,并在 *Escherichia coli* HMS (DE3) 中高效表达了可溶性的 RecA 重组蛋白。同时将 *recA* 基因通过穿梭质粒 pRADZ3 导入 *recA* 缺损 *E. coli* TG2 细胞中,Western 印迹实验显示 RecA 蛋白能够在不需要诱导剂 IPTG 的条件下稳定表达。辐射抗性实验表明,*D. radiodurans* 的 *recA* 基因在 *E. coli* 细胞中的表达能够完全补偿 *recA* 缺损 *E. coli* 辐射抗性能力。

关键词 耐辐射奇球菌, RecA, 电离辐射

中图分类号: Q937 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2004)01-0041-04

耐辐射奇球菌(*Deinococcus radiodurans*)是迄今为止地球上发现的最抗辐射的生物之一^[1,2],因其对电离辐射、紫外线、干燥、强氧化剂和一些化学诱变剂显示惊人的抗性^[1~3],一直倍受生物界、医学界和环境工程界的关注和重视^[4~6]。该细菌细胞能够在几十个小时内准确无误地修复由辐射引起的几百个双链 DNA 碎片(简称 DSBs)^[7,8],但这种复杂的 DNA 损伤修复机制目前尚不清楚^[8,9]。最近通过电镜观察发现致密有序双链 DNA 碎片(DSBs)环状堆积结构利于 DNA 的重组修复^[10]。此外,大量未知功能的特殊基因或酶在这种极端抗性方面也起着重要的作用^[9]。

RecA 修复酶及其类似物广泛存在于原核和真核生物中,在 DNA 重组修复中起着十分重要的作用^[11,12]。*D. radiodurans* 的 *recA* 缺损株与大肠杆菌 *E. coli recA* 缺损株对电离辐射都异常敏感^[13]。虽然 *D. radiodurans* RecA 的氨基酸序列与 *E. coli* 的序列具有 53% 的同源性^[14],但它们行使功能的方式不一样:*D. radiodurans* 的 RecA 比 *E. coli* 的更容易结合 DSBs 而导致快速、高效的 DNA 修复^[15]。由于 *D. radiodurans* 的 RecA 基础表达水平较低,只有在 DNA 严重损伤的情况下才能大量表达^[8],因此直接纯化比较困难。另外 Minton 等^[16]在 *E. coli* 中进行 *D. radiodurans* 的 *recA* 基因的克隆和表达,他们认为 *D. radiodurans* 的 RecA 表达对 *E. coli* 是致死的。

本研究依据美国基因组研究所公布的 *D. radiodurans* 的 *recA* 基因组序列,克隆了该基因,在 *E. coli* HMS (DE3) 中高效表达了可溶性 RecA 重组蛋白,并制备了该蛋白质的多克隆抗体。并通过穿梭质粒 pRADZ3 将 *D. radiodurans* 的 *recA* 基因导入 *E. coli* TG2 (*recA* 缺损株)中,通过 Western 印迹分析证明 *D. radiodurans* 的 RecA 在 *E. coli* TG2 中能够稳定表达。实验同时观察补偿 *D. radiodurans* RecA 后的 *E. coli* TG2 在 γ -射线(⁶⁰Co)照射下与对照 *E. coli* TG1 和 TG2 的生存率差别。结果表明,*D. radiodurans* 的 RecA 能够完全弥补 *recA* 缺损株 *E. coli* 的辐射抗性功能。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

D. radiodurans 野生型菌株 R1、*E. coli* DH5 α 、*E. coli* TG1(*recA* 正常株)、*E. coli* TG2(*recA* 缺损株)、HMS (DE3)、pET15b 购自 Novagen 公司。各种限制性内切酶、T4DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司, *Taq* DNA 聚合酶、dNTP 和 IPTG 购自上海博亚公司, DNA 纯化试剂盒购自 Bio101 公司, His-beads 蛋白质纯化系统本实验室自备。上海博亚公司进行 DNA 测序。T-vector 购自 Promega 公司。穿梭质粒 pRADZ3 为美国威斯康辛大学 Cox 教授赠送。用

* 通讯作者。Tel: 86-571-86971703; Fax: 86-571-86971703; E-mail: yjhua@zju.edu.cn

作者简介: 高冠军(1972-)男,江苏靖江人,博士研究生,主要从事生物信息与分子调控方面的研究。E-mail: gjgao@zju.edu.cn

收稿日期: 2003-05-12, 修回日期: 2003-09-08

TGY 培养基(每升含胰蛋白冻 5g,酵母提取液 3g,葡萄糖 1g, pH7.0)培养 *D. radiodurans* R1, 温度 30℃; 用 LB 培养基(每升含胰蛋白冻 10g, 酵母提取液 5g, 氯化钠 10g, pH7.4)培养 *E. coli*, 温度 37℃。

1.2 *recA* 基因的克隆

D. radiodurans 基因组 DNA 按文献[17]进行提取和纯化。根据已公布的基因组序列^[9]设计两对引物, 第一组: 上游引物: 5'-AGCACATATGACGAAG-GACGCCAC-3', 划线部分为 *Nde*I 酶切位点, 下游引物: 5'-AGGGATCCCAAGAGGAGGTTTACG-3', 划线部分为 *Bam*H I 酶切位点; 第二组: 上游引物: 5'-AG-CAACTAGTAGCAAGGACGCCAC-3', 划线部分为 *Spe*I 酶切位点, 下游引物: 5'-AGGTATACCAAGAGGAG-GTTTACG-3', 划线部分为 *Nde*I 酶切位点。PCR 扩增模板为 *D. radiodurans* R1 基因组 DNA, 扩增条件: 94℃ 5min, 94℃ 45s, 59℃ 45s, 72℃ 1min, 30 个循环; 72℃ 保温 10min。

1.3 重组表达质粒和穿梭表达质粒的构建

D. radiodurans recA 基因的 PCR 产物分别连接到 T-vector, 将双酶切下的片段连接到同样双酶切的表达载体 pET15b 和穿梭质粒 pRADZ3 中。连接产物转化 DH5 α , 筛选重组质粒, 经双酶切和测序鉴定, 将其定名为 pET15b*recA* 和 pRADZ3*recA*。

1.4 RecA 重组蛋白的表达和纯化

pET15b*recA* 转化 HMS(DE3), 在 LB 平板上挑取单菌落接种到含 50 μ g/mL 青霉素的 LB 培养基中, 37℃ 振荡培养至 OD_{595} 为 0.6 左右时, 用 IPTG (终浓度为 1mmol/mL) 37℃ 诱导培养, 离心菌体, 悬于细菌裂解液(20mmol/L Tris, pH7.9, 150mmol/L NaCl, 1mmol/L PMSF, 1% Triton-100), 冰上超声, 离心(25000g, 4℃)30min。取上清 10 μ L 加等体积的上样缓冲液, 煮沸 5min 进行 SDS-PAGE 检测。RecA 重组蛋白的纯化按 Novagen 公司 His 融合蛋白纯化指南进行。

1.5 RecA 多克隆抗体制备和 Western-blot 分析

将 His 柱纯化的 RecA 融合蛋白直接作为免疫原分 3、4 次免疫新西兰大耳白兔。当效价达 1:64 时一次取血 5mL, 4℃ 下放置过夜后取抗血清约 5mL, 10000g 离心收集抗血清。Western 免疫印迹参照文献[17]进行。化学发光检测方法参见 Amersham pharmacia biotech 使用指南, 用 Image System (Bio-Rad) 凝胶成像扫描。

1.6 RecA 的补偿对 *E. coli* (TG2) 细胞抗辐射和表达的影响

将 pRADZ3*recA* 导入 *recA* 缺损株 *E. coli* TG2 细胞, 定名为 *E. coli* TG2(*recA* +), 取指数生长期 *E. coli* TG1、TG2、TG2(*recA* +) 1mL 细胞悬浮液, 室温经⁶⁰Co γ -射线不同剂量(50Gy, 100Gy, 200Gy, 300Gy, 据钴源中心不同距离而定)照射 1h, 用磷酸缓冲液稀释后涂在 LB 平板上培养。统计不同剂量下的生存率。将穿梭质粒 pRADZ3 转化的 *E. coli* TG2 作为空白对照。

2 结果和分析

2.1 *recA* 基因的扩增和表达质粒 pET15b*recA*、pRADZ3*recA* 的构建

以 *D. radiodurans* 野生型菌株 R1 基因组 DNA 为模板, 两对引物 PCR 扩增得到两条约 1100bp 的片段, 大小与预期结果相符。构建好的重组表达质粒 pET15b*recA*(*Nde*I/*Bam*H I) 和重组穿梭质粒 pRADZ3*recA*(*Spe*I/*Nde*I) 分别经双酶切初步分析, 并进行 DNA 测序证明。结果表明, 克隆的 *recA* 基因大小与文献[9]报道一致, 构建的两个重组表达质粒正确。

2.2 重组 RecA 蛋白的表达和纯化

将重组质粒 pET15b*recA* 转化表达菌株 *E. coli* HMS(DE3), 经 IPTG 诱导, 收集到的菌体超声裂解, 12000r/min, 4℃ 离心, 取上清经 12% SDS-PAGE 鉴定出一条相对分子量约 39kD 的条带, 与已知的 RecA 蛋白质大小相符(图 1)。高效表达的融合蛋白通过 His 亲和层析柱纯化, 凝胶扫描测定纯度达 95% 以上。实验表明, 诱导最佳条件为 37℃, 3h, 且 His-RecA 融合蛋白主要以可溶性的形式表达。

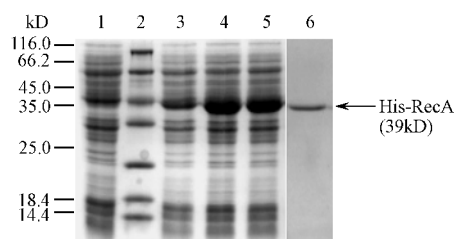


图 1 His-RecA 融合蛋白在 HMS(DE3) 的表达和纯化

Fig. 1 Expression and purification of His-RecA fusion protein in *E. coli* HMS(DE3)

1. Cellular proteins from non-induced *E. coli* HMS(DE3) pET15b*recA*;
2. Low molecular weight standards markers (MBI);
- 3~5. Soluble cellular proteins from *E. coli* HMS(DE3) pET15b*recA* after induced by IPTG for 1.5h, 3h and 4.5h, respectively;
6. The purified His-RecA fusion protein.

2.3 *E. coli* TG2 RecA 表达的 Western-blot 分析

durans RecA 蛋白质的特异性结合能力较弱,因此 Western-blot 检测中采用 *D. radiodurans* RecA 抗血清。结果在 *E. coli* TG2 细胞中未检测到 RecA,在补偿 *D. radiodurans recA* 基因的菌株 *E. coli* TG2 中检测到能够与 *D. radiodurans* RecA 抗血清起特异性反应的一条带(图 2)。由此表明,构建的重组穿梭质粒 pRADZ3*recA* 能够在不加诱导剂 IPTG 的条件下正常表达 *D. radiodurans* RecA 蛋白。

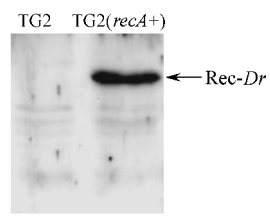


图 2 Western-blot 分析 *D. radiodurans* RecA 蛋白在 *E. coli* TG2 的表达

Fig.2 Western-blot analysis of *D. radiodurans* RecA protein in *E. coli* TG2

2.4 RecA 的补偿对 *E. coli* TG2 细胞辐射抗性的影响

如图 3 所示, *recA* 缺损株 *E. coli* TG2 细胞对 γ -射线(^{60}Co)异常敏感,经 100Gy 剂量照射时,指数生长期细胞的生存率不到 1%,而正常株 *E. coli* TG1 细胞的生存率尚达 22%左右。本实验将 *D. radiodurans recA* 基因通过穿梭质粒导入 *E. coli* TG2 细胞并使得其在不加诱导剂 IPTG 的条件下稳定表达。*E. coli* TG2 细胞经 RecA 蛋白补偿后,辐射抗性显著提高,其 γ -射线照射后的生存能力与正常株 *E. coli* TG1 细胞很接近。结果表明,RecA 是 DNA 重组修复中重要的修复酶,对 γ -射线的抗性起着十分关键的作用,*D. radiodurans* RecA 蛋白完全能够弥补 *recA* 缺损株 *E. coli* TG2 的抗辐射能力。

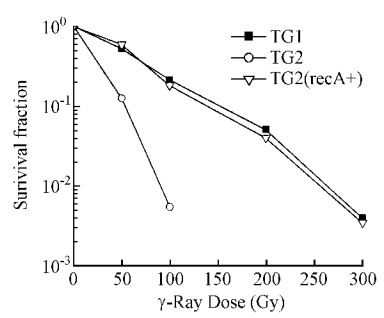


图 3 *E. coli* TG1、TG2 和 TG2(*Dr-recA* +) 经 γ -射线 ^{60}Co 辐照后的生存率

Fig.3 Survival curves for *E. coli* TG1, TG2 and TG2 (pRADZ3*recA* +) following exposure to γ -irradiation

3 讨论

RecA 在 DNA 重组修复和链间交换过程中起着十分关键的作用^[13,14],实验表明,缺少 *recA* 基因的变异株对紫外线和电离辐射相当敏感。*D. radiodurans* RecA 的补偿能够使 *D. radiodurans* 辐射敏感株 *recA30* 恢复极端抗性^[18]。同样,*D. radiodurans* RecA 对 *recA* 缺损株 *E. coli* 补偿能使 *E. coli* 恢复到正常株的抗性。这说明 *D. radiodurans* RecA 在 *E. coli* 细胞内仍具有 RecA 重组修复功能。可能的原因是 *D. radiodurans* 和 *E. coli* 的 RecA 氨基酸序列的同源性较高,都含有两个最基本的结构域,一个 RecA 信号区和一个 ATP/GTP 的结合结构域^[14],推测功能上具有一定程度的相似性。但两者的电离辐射补偿抗性相差较多,表明两个来源不同的 RecA 修复酶在行使功能方面还存在差异,这一问题有待进一步研究。

长期以来,对于 *D. radiodurans* 的研究主要集中在 DNA 损伤修复机制的研究中,而 *D. radiodurans* RecA 无疑作为研究的一个十分重要的修复酶。本研究成功的表达了 *D. radiodurans* RecA 蛋白并制备了相应的多克隆抗体,为日后开展 *D. radiodurans* RecA 的表达调控、酶蛋白的结构特点及其辐射抗性中的作用机理等方面的研究打下基础。

参 考 文 献

[1] Battista J R , Earl A M , Park M J . Why is *Deinococcus radiodurans* so resistant to ionizing radiation ? *Trends Microbiol* , 1999 , 7 : 362 - 365 .

[2] Minton K W . DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* . *Mol Microbiol* , 1994 , 13 : 9 - 15 .

[3] Mattimore V , Battista J R . Radioresistance of *Deinococcus radiodurans* : Functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation . *J Bacteriol* , 1996 , 178 : 633 - 637 .

[4] Wood R D , Mitchell M , Sgouros J , et al . Human DNA repair genes . *Science* , 2001 , 291 : 1284 - 1289 .

[5] Imamura M , Swada S , Kasahara-imamura M , et al . Synergistic cell-killing effect of a combination of hyperthermia and heavy ion beam irradiation : in expectation of a breakthrough in the treatment of refractory cancers (review) . *International journal of molecular medicine* , 2002 , 9 : 11 - 18 .

[6] Brim H S , McFarland S C , Fredrickson J K , et al . Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments . *Nat Biotechnol* , 2000 , 18 : 85 - 90 .

[7] Lin J , Qi R , Aston C , et al . Whole genome shotgun optical mapping of *Deinococcus radiodurans* . *Science* , 1999 , 258 : 1558 - 1562 .

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [8] Makarova K S , Aravind L , Yuri I , *et al.* Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* , 2001 , **65** :44 – 79.
- [9] White O , Eisen J A , Heidelberg J F , *et al.* Genome sequence of the radio-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* , 1999 , **286** :1571 – 1577.
- [10] Levin-Zaidman S , Englander J , Shimoni E , *et al.* Ringlike structure of the *Deinococcus radiodurans* genome : A key to radioresistance ? *Science* , 2003 , **299** :254 – 256.
- [11] Cox M M. Recombinational DNA repair in bacteria and the RecA protein. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* , 1999 , **63** :310 – 366.
- [12] Roca A I , Cox M M. RecA protein : structure , function , and role in recombinational DNA repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* , 1997 , **56** :129 – 223.
- [13] Minton K W. Repair of ionizing radiation damage in the radiation resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mutat Res* , 1996 , **363** :1 – 7.
- [14] 华跃进 , 高冠军. 耐辐射异常球菌 DNA 损伤与修复相关基因的比较基因组研究. *微生物学报* , 2003 **43** (1) :120 – 126.
- [15] Kim Jong-Il , Cox M M. The RecA proteins of *Deinococcus radiodurans* and *E. coli* promote DNA strand exchange via inverse pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2002 , **99** :7919 – 7921.
- [16] Carroll J D , Daly M J , Minton K W. Expression of RecA in *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* , 1996 , **178** :130 – 135.
- [17] Maniatis T , Fritsch E F , Sambrook J. Molecular cloning : A laboratory manual. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989.
- [18] Narumi I , Satoh K , Kikuchi M , *et al.* Molecular analysis of the *Deinococcus radiodurans* *recA* locus and identification of a mutation site in a DNA repair deficient mutant , *rec30*. *Mutant Res* , 1999 , **435** :233 – 243.

Cloning , Expression of *recA* Gene from *Deinococcus radiodurans* and the Effect of Radioresistance of *recA* Defective *Escherichia coli*

GAO Guan-Jun HUA Yue-Jin^{*}

(Institute of Nuclear-Agricultural Science , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China)

Abstract : The *recA* gene of *D. radiodurans* was cloned into expression vector pET15b and a recombinant fusion RecA protein was overexpressed in *E. coli* HMS(DE3) by IPTG induction. On the other hand , we have succeeded in the normal expression of the cloned *recA* gene of *D. radiodurans* in *E. coli* via a shuttle plasmid pRADZ3 under the control of GroES promoter without induction of IPTG. The expression of *recA* gene of *D. radiodurans* in *E. coli* TG2 was able to completely complement its defective radioresistance , caused by the intrinsic *recA* deficiency , following exposure to ionizing radiation.

Key words : *D. radiodurans* , RecA , Ionizing radiation

^{*} Corresponding author. Tel : 86-571-86971703 ; Fax : 86-571-86971703 ; E-mail : yjhua@zju.edu.cn