

# 耐辐射球菌 *pprI* 在大肠杆菌中表达增强细胞抗氧化能力的研究

乐东海 高冠军 华跃进\*

(浙江大学原子核农业研究所 农业部核农学重点开放实验室 杭州 310029)

**摘 要** 将耐辐射球菌(*Deinococcus radiodurans*)与 DNA 修复有关的开关基因—*pprI* 通过穿梭质粒 pRADZ3 导入大肠杆菌 TG1 中,使其在正常培养条件下(不需诱导剂)表达 PprI 蛋白,并通过 Western blot 证实该基因在 TG1 中可稳定表达。与转化了空白质粒 pRADZ3 TG1 对照,观察了改造后的两种大肠杆菌在有 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化压力下的存活率和大肠杆菌中两种过氧化氢酶(KatE, KatG)的活性表达差异。结果表明,无论在指数生长期还是稳定生长期,能表达 PprI 蛋白的大肠杆菌比对照的存活率要高出 10% 左右;非变性电泳结果表明,耐辐射球菌 *pprI* 在大肠杆菌中的表达使得 KatE 活性在指数生长期与稳定生长期分别增加 1.5~2 倍和 2.5~3 倍。证明耐辐射球菌 *pprI* 在大肠杆菌中的表达能够增强细胞抗氧化能力。

**关键词** 耐辐射球菌,大肠杆菌, *pprI*, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, KatE

中图分类号:Q937 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)03-0324-04

耐辐射球菌(*Deinococcus radiodurans*)是一种对电离辐射、紫外线、强氧化剂和化学诱变剂具有超强耐受力的极端微生物<sup>[1,2]</sup>。稳定生长期的耐辐射球菌能够在超过 17KGy 的  $\gamma$  射线照射下存活且不发生突变,抗性是大肠杆菌的 100 多倍<sup>[3]</sup>。最近研究表明,负责这一抗性的开关基因——*pprI* 在 DNA 损伤修复中起着极为重要的作用,它能诱导与 DNA 修复相关基因 *recA* 和 *pprA* 的表达并显著提高 *D. radiodurans* 中过氧化氢酶的活性<sup>[4]</sup>,在大肠杆菌中的表达增强了抗辐射能力<sup>[5]</sup>。

细胞内的氧化压力是由大量产生的氧自由基(主要有 O<sub>2</sub><sup>-</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 HO· 等)引起的<sup>[6]</sup>,氧自由基的存在会破坏细胞膜、蛋白和核酸而导致细胞或组织的生理病变和老化<sup>[7]</sup>。为抵抗氧化压力,细胞内会产生能降解自由基的酶并修复因自由基引起的损伤,过氧化氢酶就是其中最主要的抗氧化酶,催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成水和氧来降低细胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的浓度<sup>[6]</sup>。大肠杆菌能产生两种过氧化氢酶:HP I(*katG* 基因产物)和 HP II(*katE* 基因产物),两者在结构、动力学特性和调控机制方面存在显著差异<sup>[8]</sup>,但任何一种基因的缺失都会导致自然突变率的增加和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 敏感性的上升<sup>[9]</sup>。同时, KatE 是大肠杆菌稳定生长期起主要作用的过氧化氢酶<sup>[10]</sup>。

为研究 *pprI* 基因在其它生物中的表达与细胞

抗氧化能力之间的关系,将 *pprI* 基因通过穿梭质粒导入大肠杆菌 TG1 中并稳定表达,与空白质粒转化形成的对照株 TG1 进行了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化压力下的存活率测定和两种过氧化氢酶(KatE, KatG)的活性检测,结果发现 PprI 在大肠杆菌中的表达能够增强细胞的抗氧化能力。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和试剂

本研究采用的是 *D. radiodurans* 野生型菌株 R1(ATCC 13939),购于美国 ATCC(American Type Culture Collection)。大肠杆菌 TG1 购于 Novagen 公司。各种限制型内切酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司, *Taq* DNA 聚合酶、dNTP 购自上海博亚公司。pGEM-T Easy 载体购于 Promega 公司。穿梭质粒 pRADZ3<sup>[11]</sup>为美国华盛顿大学 ME. Listrom 教授赠送。PprI 蛋白的多克隆抗体为本实验室自制(相关工作待发表)。大肠杆菌(*Escherichia coli*)培养于 37℃ LB(1% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 1% NaCl, pH 7.4)液体培养基或含 1.5% 琼脂的固体培养基,用 100 $\mu$ g/mL 的 Amp 筛选。*E. coli* 转化用改良 CaCl<sub>2</sub> 法<sup>[12]</sup>。

### 1.2 *pprI* 基因的克隆和穿梭表达载体的构建

*D. radiodurans* 基因组 DNA 按文献 [12] 进行分离和纯化。*pprI* 在大肠杆菌中的表达采用改良穿梭

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

作者简介:乐东海(1979-)男,浙江宁波人,硕士研究生,主要从事生物信息与分子调控方面的研究。E-mail: dlhe@sina.com.cn

收稿日期:2003-08-22, 修回日期:2003-12-15

质粒 pRADZ3。根据已公布的基因组序列<sup>[13]</sup>设计引物,上游:5'-TAACTAGT GCCCAGT GCCAACGTC-3',下游:5'-TACATATGGTTC ACTGTGCAGCGTC-3'(划线部分分别为加入的 *Spe* I 和 *Nde* I 酶切位点序列)。PCR 产物连接到亚克隆载体 pGEM-T Easy 重组质粒用 *Spe* I 和 *Nde* I 酶切消化后,片段连入用相同酶酶切消化后的 pRADZ3 质粒,命名为 pRADZ3*pprI*,并将空质粒 pRADZ3 转入 *E. coli* TG1 作对照,质粒 DNA 序列由 DNA 测序证实。

### 1.3 Western blot 检测 *pprI* 的表达

Western 免疫印迹参照文献[12]进行。化学发光检测方法详见 Amersham pharmacia biotech 使用指南,用 Image System(Bio-Rad)凝胶成像扫描和定量。

### 1.4 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化压力下的存活率

将转化菌 TG1(pRADZ3*pprI*)用 LB 培养基培养至指数生长期( $A_{600}$  值约 0.5)和稳定生长期( $A_{600}$  值约 1.5)时,加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分别至终浓度 5、10、20mmol/L,1h 内每隔 20min 取一次菌液,以未经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理的分别作对照,平板计数,计算存活率。同时以 pRADZ3 空质粒的转化菌作对照。

### 1.5 过氧化氢酶活性检测

取未经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理和各个 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度处理 20min 后的转化菌液,离心收集菌体,冰上超声破碎,离心收取上清液。蛋白浓度采用 Branford 染色法定量<sup>[14]</sup>。取 8 $\mu$ g 蛋白进行非变性电泳,后进行过氧化氢酶活性染色<sup>[15]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 *pprI* 基因的扩增和 pRADZ3*pprI* 的构建

以 *D. radiodurans* 基因组 DNA 为模板,通过 PCR 扩增出的 984bp 片段与预期结果相符。将 PCR 产物先亚克隆到 pGEM-T Easy 载体,然后克隆至 pRADZ3 质粒,构建好的重组表达质粒 pRADZ3*pprI* 经 *Spe* I 和 *Nde* I 双酶切鉴定,并通过 DNA 序列测定证实了克隆的 *pprI* 基因与文献[13]报道一致。

### 2.2 *pprI* 在 *E. coli* TG1 中的表达

Western blot 实验结果表明(图 1),在转化了空质粒 pRADZ3 对照 *E. coli* TG1 中未检测到 PprI,而用 pRADZ3*pprI* 转化补偿后的 TG1(*pprI*<sup>+</sup>)检测到 *pprI* 的表达,说明构建的补偿表达质粒 pRADZ3*pprI* 能被 *E. coli* 识别并成功表达。

### 2.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化压力下的存活率

为了确定耐辐射球菌 *pprI* 的表达是否能够增

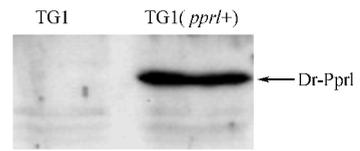


图 1 Western blot 分析 *D. radiodurans* PprI 蛋白在 *E. coli* TG1 中的表达

Fig.1 Western blot analysis of *D. radiodurans* PprI protein in *E. coli* TG1

强大肠杆菌的抗氧化能力,对 TG1(*pprI*<sup>+</sup>)和 TG1 进行了不同生长期下不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的处理,并考察了它们存活率的变化情况。结果表明,在指数生长期 5mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 下,1h 内,两者的存活率都在 60% 以上,而 TG1(*pprI*<sup>+</sup>)比对照 TG1 要高 7% 左右;10mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 下,1h 后存活率降为原来的一半,TG1(*pprI*<sup>+</sup>)比对照 TG1 约高出 10%;高浓度 20mmol/L 下,两者的下降趋势都很快,1h 后 TG1(*pprI*<sup>+</sup>)降为原来的 21%,TG1 降为原来的 8%,这一浓度下,前者比后者的存活率高出约 12%。在稳定生长期,各个浓度下的下降趋势都比指数生长期来的延缓,1h 后的存活率分别为 80%、70% 和 60% 左右,TG1(*pprI*<sup>+</sup>)比对照 TG1 分别高出 7%、8% 和 10%。

### 2.4 PprI 表达对过氧化氢酶(KatE, KatG)活性的影响

指数生长期和稳定生长期的细菌裂解液上清非变性 PAGE 过氧化氢酶活性染色图及密度扫描见图 2。由图 2-A 可见, TG1(*pprI*<sup>+</sup>)细胞的 KatE 酶活性是 TG1 的 1.5~2 倍(无论是否用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理),到稳定生长期,这种差异达 2.5~3 倍(图 2-B)。而 KatG 的活性两者差异并不显著。

## 3 讨论

PprI 是耐辐射球菌中与 DNA 损伤修复相关的特异性蛋白质。虽然到目前为止,在 NCBI 基因组数据库中并未发现具有较高同源性的类似物,但分析已预测的结构域得知, *pprI* 含有两个结构域:一个锌依存性的蛋白酶和一个 HTH(Helix turn helix)结构域,前者具有蛋白水解酶活性,后者具有 DNA 结合活性<sup>[16]</sup>。因此推测这一外源基因在大肠杆菌中的表达可能在蛋白质水平同样会发挥部分功能,本实验从 PprI 在抗氧化方面进一步证实这一推测。在对强氧化剂 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的抗性方面, *E. coli* TG1(*pprI*<sup>+</sup>)比对照 TG1 的存活率高出 7%~12%,且随氧化剂浓度增加而增加,说明 *pprI* 基因在大肠杆菌中的稳定表达能够增强大肠杆菌细胞的抗氧化能力。随后在对

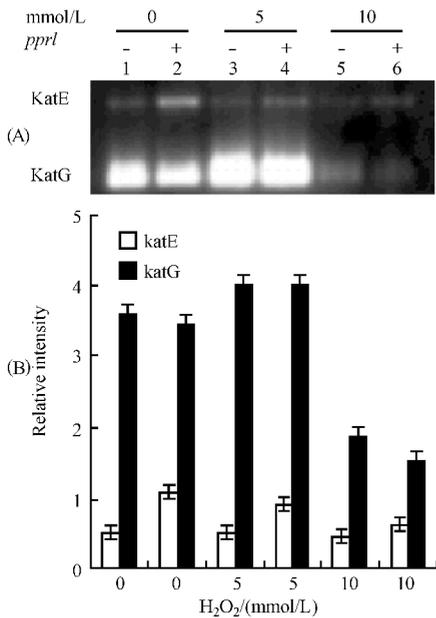


图2 (A) PprI对指数生长期 *E. coli* strains TGI 过氧化氢酶活性的影响 (B) PprI对稳定生长期 *E. coli* strains TGI 过氧化氢酶活性的影响

Fig. 2 (A) Effects of PprI on catalase activities of *E. coli* strains TGI in exponential growth phase (B) Effects of PprI on catalase activities of *E. coli* strains TGI in stationary growth phase

Odd-numbered lanes. strain TGI; Even-numbered lanes. strain TGI (*pprI*<sup>+</sup>); 1, 2. Blank samples (untreated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); 3, 4. Samples challenged by 5mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 5, 6. Samples challenged by 10mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Each sample contains 8μg of protein. The enzyme activity of KatE in parental *E. coli* strain TGI without treatment of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was arbitrarily assigned as 0.5. The relative intensities from three independent scans are presented as means ± SD.

两种过氧化氢酶的活性检测中发现, PprI 的表达能够促进 KatE 活性增加, 而 KatE 作为一种重要的抗氧化酶在降解 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 方面起着关键的作用<sup>[17]</sup>。

关于 *D. radiodurans* PprI 在辐射抗性的研究以前主要集中于 DNA 损伤修复机制方面, 有关 PprI 在抗氧化能力与自由基的清除方面的研究较少。综上所述, *pprI* 基因除了作为一个保护开关基因起到诱导 DNA 修复基因(如 RecA 和 PprA)表达的作用外, 在抵御细胞氧化压力方面, 也可能通过调控过氧化氢酶的表达活性来提高抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的能力。但这种对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的抵御能力仅表现在 KatE 活性的显著增加, 而 KatG 的活性并没有增加, 另外 PprI 蛋白在大肠杆菌细胞内如何调控 KatE 表达的机制还有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] Mosely B. Photobiology and radiobiology of *Micrococcus* (*Deinococcus*) *radiodurans*. *Photochem Photobiol Rev*, 1983, **7**: 223 – 275.
- [2] Minton K W. DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mol Microbiol*, 1994, **13**: 9 – 15.
- [3] Daly M J, Ouyang L, Fuchs P, et al. In vivo damage and recA-dependent repair of plasmid and chromosomal DNA in the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol*, 1994, **176**: 3508 – 3517.
- [4] Hua Y J, Narumi I, Gao G J, et al. PprI: a general switch responsible for extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*. *Biochem Biophys Res Comm*, 2003, **306**: 354 – 360.
- [5] Gao G J, Tian B, Hua Y J, et al. Expression of *Deinococcus radiodurans* PprI enhances the radioresistance of *Escherichia coli*. *DNA Repair*, 2003, **12**: 1419 – 1427.
- [6] Storz G, Imlay J A. Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol*, 1999, **2**: 188 – 194.
- [7] Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science*, 1978, **201**: 875 – 880.
- [8] Schellhorn H E, Hassan H M. Transcriptional regulation of *katE* in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 1988, **170**: 4286 – 4292.
- [9] Abril N, Pueyo C. Mutagenesis in *Escherichia coli* lacking catalase. *Environ Mol Mutagen*, 1990, **15**: 184 – 189.
- [10] Schellhorn H E. Regulation of hydroperoxidase (catalase) expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 1995, **131**(2): 113 – 119.
- [11] Meima R, Lidstrom M E. Characterization of the minimal replicon of a cryptic *Deinococcus radiodurans* SARK plasmid and development of versatile *Escherichia coli*-*D. radiodurans* shuttle vectors. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(9): 3856 – 3867.
- [12] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- [13] 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.
- [14] Bradford M W. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248 – 254.
- [15] Dong S J, Liu C L. An iron staining method for determination of catalase activity. *Prog Biochem Biophys*, 1996, **23**(1): 86 – 88.
- [16] 华跃进, 高冠军. 耐辐射奇球菌 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.
- [17] Loewen P C N. Isolation of catalase-deficient *Escherichia coli* mutants and genetic mapping of *katE*, a locus that affects catalase activity. *J Bacteriol*, 1984, **157**: 622 – 626.

## Study on Enhances of The Antioxidation in *Escherichia coli* by Expression of *Deinococcus radiodurans pprI*

YUE Dong-Hai GAO Guan-Jun HUA Yue-Jin\*

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

**Abstract :** The *Deinococcus radiodurans pprI* , a switch gene responsible for DNA repair , was transformed to *E. coli* via a shuttle plasmid pRADZ3 and a recombinant fusion PprI protein was expressed in normal growth condition without induction . The stable expression of PprI protein in *E. coli* TG1 was confirmed by Western blot . Empty plasmid pRADZ3 was transformed to *E. coli* TG1 as control . The viabilities under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidative stress and the differences in catalases ( KatE , KatG ) activities of these two reconstructed *E. coli* TG1 were observed . The results showed that either in exponential phase or stationary phase , the expression of PprI protein in *E. coli* TG1 can enhance the viabilities , compared with the relative control ; The results obtained from the Native-PAGE indicates that the expression of *pprI* in *E. coli* TG1 can enhance the enzymatic activity . It is concluded that the expression of *D. radiodurans pprI* can enhance the antioxidation in *E. coli* .

**Key words :** *Deinococcus radiodurans* , *Escherichia coli* , *pprI* , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> , KatE

\* Corresponding author . Tel/Fax : 86-571-86971703 ; E-mail : yjhua@zju.edu.cn

Received date : 08-22-2003

### 《微生物学报》投稿要求

1. 投稿范围 : 凡有关微生物学基础研究、应用基础研究及其高技术创新等领域的研究成果 , 包括普通微生物学 , 工业、农业、医学和兽医微生物学 , 免疫学以及与微生物学有关的生物工程等方面的研究报告、简报等 本刊均欢迎投稿。
2. 应首次发表 : 所有来稿均应未在公开出版的刊物上发表过。要求论点明确、数据可靠、行文简练、用词规范、图表清晰、结论合理。
3. 介绍信 : 所有来稿要求一式两份。论文是否涉及保密、署名是否无误 , 请出示第一署名单位的介绍信。若是与国外作者合写的论文 , 应出示国外作者同意以中文形式发表及署名顺序的信函说明。
4. 作者联系方式 : 请在投稿时提供通讯作者或第一作者的 Tel、Fax 和 E-mail 地址。
5. 审稿费 : 投稿时请随寄 100 元审稿费 , 可通过邮局汇款 ( 务请在汇款单上注明汇款单位和稿件第一作者 , 我们将开具正式发票 )。
6. 投稿方式 : 本刊中英文稿件均收 , 采用邮寄投稿。要求五号宋体、A4 纸单面打印稿 2 份 , 并同时要求提供电子版 ( 附软盘或 E-mail 传来 actamicro@sun.im.ac.cn )。
7. 投稿及汇款地址 ( 100080 ) 北京中关村中国科学院微生物研究所内 《微生物学报》编辑部  
欲知更详细的投稿要求请登陆我刊的网址 : [Http //www.im.ac.cn/journals](http://www.im.ac.cn/journals)