

嗜盐古菌 R1 中与真核同源基因 *rad25* 启动子的序列分析和启动活性研究

朱建裕^{1,2}, 胡岳华², 柳 婧¹, 黄玉屏¹, 沈 萍^{1*}

(¹ 武汉大学生命科学学院 武汉 430072)

(² 中南大学资源加工与生物工程学院 长沙 410083)

摘 要 在盐生盐杆菌(*Halobacterium halobium*) R1 中分析了真核同源基因 *rad25* 的转录, 分析了 *rad25* 同源基因启动子片段的序列特征, 用 β -半乳糖苷酶基因(*bgaH*)为报告基因, 利用启动子探针检测技术验证了 *rad25* 同源基因启动子片段在嗜盐古生菌 WFD11 中的启动功能, 缺失分析进一步确认了 *rad25* 同源基因启动子具有嗜盐古菌启动子典型特征。从启动子和转录水平上证明盐生盐杆菌 R1 中真核同源基因 *rad25* 存在生物学功能, 推测其可能在核苷酸切除修复(NER)起作用。

关键词 嗜盐古菌; 同源基因 *rad25*; 启动子

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2006)02-0196-04

盐生盐杆菌(*Halobacterium halobium*) R1 是一种极端嗜盐古菌^[1]。生存在高盐高强度阳光照射的自然环境中, 它有很强的抗紫外辐射能力, 能经受住高达 110J/m² 的紫外辐射, 因此, 它们有很强修复机制来修复大量的紫外辐射 DNA 损伤。基因敲除发现, 编码光裂合酶的 *phr2* 基因是其进行光修复的主要基因, 光修复也是其最重要修复机制。研究还表明, 盐生盐杆菌还有核苷酸切除修复(NER)能力, 其速度大约和酵母中的修复速度相当^[2,3]。近年来的基因组序列分析表明, 嗜盐古菌和其它古菌一样存在真核 NER 同源基因(*rad1*、*rad2*、*rad3* 和 *rad25*)^[4], 而且古菌的转录和复制与真核生物有很大的相似性, 因此推测古菌 NER 很可能是遵循真核的 NER 模式。然而, 仅仅两种 NER 修复同系物 *rad2* 和 *rad1* 在古菌中有生物学的特性^[5]。其中古菌 *S. Sulfolobus* 编码的真核同源 NER 核酸酶 XPF(*rad1*) 在底物特异性、在优先剪切的 DNA 结构和碱基偏爱性上, 表现了与人类的 XPF 蛋白非常高的相似性^[6]。另外, 研究发现古菌 *S. solfataricus* 含有的真核同源基因 *xpb/rad25-I* 是由紫外高度诱导的, 然而另一个同源基因 *xpb/rad25-II* 是组成型表达的, 暗示了它们有类似真核 NER 基因的作用^[7]。

真核解旋酶 XPB/*rad25*, 结合其它 NER 解旋酶

XPD/*rad2* 和另外一些蛋白, 组成转录因子 TFIIH, 是转录和修复所基本需要的。盐生盐杆菌同源基因 *xpb/rad25* 编码产物(AAG20805.1)^[3]与这个蛋白家族有高度的氨基酸序列同源性, 具有这个蛋白家族的典型特征, 说明该同源基因很可能有类似真核 NER 的作用。但缺少生物学方面的研究证据。本实验室前期的研究工作克隆到了嗜盐古生菌——盐生盐杆菌 R1 的 *rad25* 同源基因 5'端 1848bp 的 DNA 片段。本研究利用启动子探针检测技术从 mRNA 和蛋白质水平证实了 *rad25* 同源基因 5'端启动子序列在嗜盐古生菌中确实有启动子功能, 结合在盐生盐杆菌 R1 中 *rad25* 同源基因的转录分析, 从转录水平上证明盐生盐杆菌 R1 中真核 NER 同源基因 *rad25* 是有生物功能的, 为嗜盐古菌 NER 也可能是遵循真核 NER 的模式提供了证据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 表 1 为本实验所用菌株和质粒。

1.1.2 培养基 用于嗜盐菌培养和转化的嗜盐菌培养基为复合培养基^[8], 37℃ 培养。用于大肠杆菌培养和转化的 LB 培养基参照文献[9], 37℃ 培养。

基金项目: 国家 973 项目(2004CB719603), 国家自然科学基金(30570026)

* 通讯作者。Tel: 86-27-68754533; Fax: 86-27-87883833; E-mail: pingshen@whu.edu.cn

作者简介: 朱建裕(1975-), 男, 湖南湘乡人, 博士, 主要从事极端微生物研究。E-mail: csuzhu@hotmail.com

收稿日期: 2005-08-19; 接受日期: 2005-09-07; 修回日期: 2005-12-06

表 1 供试菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this work		
Strains or plasmids	Characteristics	Source or reference
<i>Haloflex volcanii</i> WFD11	Lacking the endogenous plasmid pHV2 , <i>Mev</i> ^r	W. F. Doolittle Lab
<i>Halobacterium halobium</i> R1	with rhodopsins	This Laboratory
<i>Escherichia coli</i> ET	dam dem supE44 hsdR17 thi leu rpsL lacY galK galT ara tonA thr	This Laboratory
pRM10	Promoter probe vector , containing promoter fragment of <i>rad25</i> gene , <i>Amp</i> ^r	This Laboratory
pSY1-bop	The <i>E. coli</i> and <i>H. volcanii</i> shuttle vector , Using <i>bgaH</i> as the reporter genes with Pr bop promoter , <i>nov</i> ^r	This Laboratory
pSY1-PrF1	pSY1 derivative with PSF1 to PSR4 fragment fused to <i>bgaH</i>	This work
pSY1- PrF2	pSY1 derivative with PSF2 to PSR4 fragment fused to <i>bgaH</i>	This work
pSY1- PrF3	pSY1 derivative with PSF3 to PSR4 fragment fused to <i>bgaH</i>	This work
pSY1- PrF4	pSY1 derivative with PSF4 to PSR4 fragment fused to <i>bgaH</i>	This work
pSY1- PrF5	pSY1 derivative with PSF5 to PSR4 fragment fused to <i>bgaH</i>	This work
pSY1- PrF6	pSY1 derivative with PSF6 to PSR3 fragment fused to <i>bgaH</i>	This work

1.1.3 PCR 引物 :PCR 所用引物由上海博亚生物技术公司合成(表 2)。RDF1 和 RDR2 检测 *rad25* 的转录产物 ,pBHF1 和 PBHR1 检测 *bgaH* 的转录产物 ,

PSF1、PSF2、PSF3、PSF4、PSF5 和 PSR4 以及 PSF6 与 PSR3 用于构建 *rad25* 启动子缺失片段。

表 2 引物名称和序列

Table 2 Primers name and sequence			
Primer	Sequence(5'-3')	Primer	Sequence(5'-3')
PSF1	ATTGGTACCTCGCTGTTGCTACCGG	RDF1	GAGATTGGCGTACTTGGCGG
PSF3	TCAGGTACCGCGGTAGTACTGACCCCAAC	RDR2	GAGTTTCTTCTCGGCGGTGC
PSF4	AGCGGTACCTGTTGAGCCGAATGAGGAAC	PBHF1	CAC TCGGACGCTTTTCGCC
PSF6	TCAGGTACCAAGAGAGCCACGACCCAC	PBHR1	GCTCGATGCTTCGCGGTAC
PSR3	TCGCATATGACAGCGAGGCGACATGCTTC	PSF2	AGTCGGTACCGCCCGTTGACTTCTGC
PSR4	TCGCATATGTTGGGTTGTGTACGTAATTTCG	PSF5	TGCGGTACCACCTTAACCGACGTACGG

1.1.4 主要试剂 :ONPG 和 X-Gal 购自华美公司 , TRIzol 总 RNA 提取溶液购自 GIBCO-BRL 公司 ,限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Rnase-freeDnase 和 *Taq* 酶购自 TaKaRa 公司 ,M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司。新生霉素(novobiocin) 购自 Sigma 公司 ,使用浓度为 0.3μg/mL。氨苄青霉素购自华美生物工程公司 ,使用浓度为 100μg/mL 。

1.2 质粒分离、重组质粒的构建和嗜盐菌的转化
常规 DNA 酶切、电泳、连接和转化大肠杆菌 (*E. coli*)均参照文献进行[9] ,嗜盐古菌中质粒制备用大肠杆菌的碱法 ,把溶液 I 换成 1mol/L NaCl ,嗜盐菌原生质球转化方法参照文献[8]。

1.3 逆转录 PCR(RT-PCR)

嗜盐古菌总 RNA 提取 :利用 TRIzol 溶液 ,具体操作步骤见 TRIzol 总 RNA 提取的说明书。非变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。在总 RNA 中加入 RNase-free DNase ,去除总 RNA 中残留的 DNA。去除 DNA 干净的 RNA 样品作为 RT-PCR 的模板。RT-PCR 的具体步骤按文献[10]的方法进行。

1.4 总蛋白含量和 β-半乳糖苷酶活性的测定

嗜盐菌细胞中总蛋白含量的测定采用考马斯亮兰染色法 ,以牛血清白蛋白(BSA)为标准。嗜盐菌

转化子的 β-半乳糖苷酶活性 ONPG 测定按文献[11]提供的方法进行。

2 结果和分析

2.1 在嗜盐古菌 R1 中 *rad25* 同源基因转录分析
在嗜盐古菌 R1 对数生长中期取菌液提取总 RNA ,去除总 RNA 中残留的 DNA ,根据嗜盐古菌 *rad25* 同源基因 ORF 设计的特异配对引物 RDF1 和 RDR2 进行 RT-PCR 检测 ,结果能检测到 534bp 特异性条带存在 ,*rad25* 同源基因在其基因组的上游 4.3kb 以内都没有发现其它基因的存在 ,在下游有一个 ORF(VNG6129H)编码假设的蛋白 ,因此可以推测 RT-PCR 检测到的就是 *rad25* 基因的转录产物。结合 Nitin 等用芯片分析 *Halobacterium* NRC-1 对紫外反应的表达谱^[2] ,我们可以推测嗜盐古菌 *rad25* 同源基因是组成型表达或转录后调控的。

2.2 *rad25* 同源基因启动子片段序列特征分析
pRM10 是本实验室在盐生盐杆菌 R1 的染色体上克隆到 1.8kb 片段的重组质粒 ,包含了 *rad25* 同源基因部分 ORF 和 5'端序列。我们分析了 5'端序列的序列特征 ,GC 百分比为 58% ,是 AT 相对较丰富区 ,存在两个可能的嗜盐古生菌启动子 TFB 的结

合位点 ;1449GCTAAA、630ACTAAT ,该元件被称为 TFB 识别元件 BRE(TFB recognition element) ,存在 4 个可能的嗜盐古生菌启动子 TBP 结合保守序列 (TATA box) :757TATTAT、841TTATTT、929TAAAAA、1388ATATTT、1508TAATTAA ,它们的位置如下(图 1) 所示 :

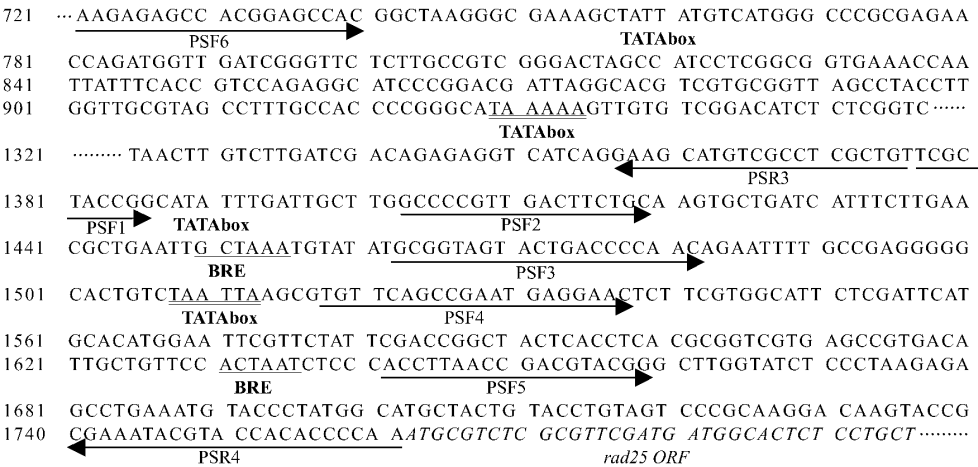


图 1 *rad25* 基因 5'端序列结构特征分析

Fig.1 Analysis of sequence structure of *rad25* gene 5' end. Putative TATA box and TFB recognition element regions are underlined. Arrows indicate the primers used in deletion mutagenesis of the promoter sequences.

2.3 *rad25* 同源基因启动子片段在嗜盐古生菌 WFD11 中的启动活性分析

启动子探针载体 pSY1-bop 是嗜盐菌/大肠杆菌穿梭质粒 ,含有编码 β-半乳糖苷酶的 *bgaH* 基因^[12,13]。我们利用 *bgaH* 作为报告基因对 *rad25* 同源基因启动子片段在嗜盐古生菌中的启动子活性进行了研究。从 pRM10 亚克隆 *rad25* 同源基因 5'端启动子片段替代 pSY1 *bgaH* 酶报告基因前的 bop 启动子 ,构建成 pSY1-PrF1 ,转化嗜盐古生菌 WFD11 培养转化子 WFD11/pSY1-PrF1 至生长对数中期 ,取菌液提取总 RNA ,RT-PCR 分析菌株中 *bgaH* 基因的转录。而在 WFD11/pSY1-bop 和 WFD11/pSY1-PrF1 菌株中都出现了预期的 400bp 特异性产物带 ,这表明 *bgaH* 基因在 WFD11/pSY1-bop 和 WFD11/pSY1-PrF1 菌株中都进行了转录。用 ONPG 方法测定结果 WFD11/pSY1-bop 和 WFD11/pSY1-PrF1 的 β-半乳糖苷酶活性分别为 152mU/mg 和 113mU/mg ,从 mRNA 转录水平和蛋白质表达证实了 *rad25* 同源基因启动子片段在嗜盐古生菌中确实具有启动活性。

2.4 *rad25* 同源基因启动子片段在嗜盐古生菌中的缺失分析

根据上述方法 ,进一步通过缺失分析 *rad25* 同源基因启动子片段对于启动子活性所必需的功能区 ,证明结构与功能的一致性。通过 PCR(引物的序列和位置如图 1 所示)获得的一系列 *rad25* 同源基因启动子不同缺失片段分别插入 *bgaH* 报告基因的上游 ,得到不同区段与报告基因相融合的质粒分别转入嗜盐菌 WFD11 ,用 ONPG 方法定量检测 *bgaH*

报告基因的表达。结果表明(图 2)包含了 *rad25* 基因的 ATG 上游 403bp 片段含后面两个 TATAbox 和全部两个 BRE 在嗜盐古生菌中具有最大的启动子活性 ,而依次缺失 TATAbox、BRE、TATAbox、BRE ,导致 WFD11 菌株逐渐产生量降低的 β-半乳糖苷酶 ,最后一个 TATAbox 和 BRE 是基本活性所要求的 ,当缺失了这段序列会导致启动子活性的丧失 ,前面的一个 TATAbox 和 BRE 能起增强作用。在 PSF6 和 PSR3 引物间含两个 TATAbox 而缺少 5'近端的序列没有启动子活性。结果说明 *rad25* 同源基因启动子符合典型古菌启动子的特征规律。

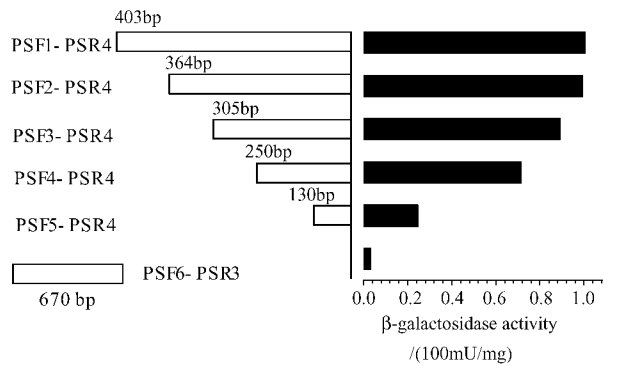


图 2 *rad25* 的启动子片段在古菌中的缺失分析

Fig.2 Analysis of promoter activity of promoter sequence of *rad25* in *H. volcanii* through deletion. Deletion derivatives of promoter sequence of *rad25* were generated by PCR and inserted into the promoter probe vectors pSY1 , respectively , resulting in the plasmids shown on the left side of the figure. The corresponding expression level of the reporter gene is shown on the right. PSF1 to PSF6 and PSR4 represent the primers.

3 讨论

核苷酸切除修复(NER)在细菌和真核生物中普遍存在,但细菌和真核生物的 NER 蛋白没有进化上的相关性。古菌与真核生物在它们的遗传信息处理方面有许多的相似特征,已经被证明是一个研究 DNA 的复制和转录的有用的模型。真核 NER 系统非常复杂,要求许多蛋白参与,同样需要一种相对简单的模型来研究其复杂的修复过程和机制。目前的序列分析已揭示古菌存在真核 NER 同源基因,推测古菌 NER 与真核有同样的机制,但这些序列上同源的基因是否有生物活性则需要实验证明。本研究利用启动子探针检测技术从 mRNA 和蛋白质水平证实了 NER 同源基因 *rad25* 启动子序列在嗜盐古生菌中具有启动子功能,结合在盐生盐杆菌 R1 细胞内 *rad25* 同源基因的转录分析,从启动子和转录水平上推测盐生盐杆菌 R1 中真核 NER 同源基因 *rad25* 存在生物学功能。为嗜盐古菌 NER 也可能是遵循真核 NER 的模式提供依据。另外,通过 *rad25* 同源基因启动子片段的缺失突变分析,确定古生菌两种基本转录因子 TATA box 结合蛋白(TBP)和转录因子 B(TFB)的识别位点 TATA box 和 BRE 序列是 *rad25* 同源基因启动子片段在嗜盐古生菌中的有启动子活性的重要功能区。这一结果从启动子序列上证明了古生菌 RNA 聚合酶单独不能够有效地识别启动子序列,需要另外两种基本转录因子 TATA box 结合蛋白(TBP)和转录因子 B(TFB)的协助,从而表明 *rad25* 基因在嗜盐古菌中的转录起始也是遵循真核模式的。

参 考 文 献

- [1] Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 4576 - 4579.
- [2] Nitin SB, Sarah JB, Richard B, et al. Systems Level Insights Into the Stress Response to UV Radiation in the Halophilic Archaeon Halobacterium NRC-1. *Genome Research*, 2004, **14**: 1025 - 1035.
- [3] McCready S, Marcello L. Repair of UV damage in Halobacterium salinarum. *Biochemical Society Transactions*, 2003, **31**: 694 - 698.
- [4] Wailap VN, Sean PK, Gregory GM, et al. Genome sequence of Halobacterium species NRC-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 12176 - 12181.
- [5] Roberts JA, Bell SD, White MF. An archaeal XPF repair endonuclease dependent on a heterotrimeric PCNA. *Mol Microbiol*, 2003, **48**: 361 - 371.
- [6] Shen B, Qiu J, Hoseld D, et al. A Flap endonuclease homologs in archaeobacteria exist as independent. *Trends Biochem Sci*, 1998, **23**: 171 - 173.
- [7] Vincenzo S, Alessandra N, Malcolm FW, et al. Transcriptional response to DNA damage in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Nucleic Acids Research*, 2003, **31**: 6127 - 6138.
- [8] Cline SW, Lam WL, Charlebois RL, et al. Transformation methods for Halophilic archaeobacteria. *Can J Microbiol*, 1989, **35**: 148 - 152.
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] Dieffenbach CW, Dveksler GS. PCR Primer: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995.
- [11] Holmes ML, Scopes RK, Moritz RL, et al. Purification and analysis of an extremely Halophilic β -Galactosidase from Haloferax Alicantei. *Biochim Biophys Acta*, 1997, **1337**: 276 - 286.
- [12] Holmes ML, Dyall-Smith ML. Sequence and expression of a Halobacterial β -Galactosidase gene. *Mol Microbiol*, 2000, **36**: 114 - 122.
- [13] Yang Y, Huang YP, Shen P. The 492-bp RM07 DNA fragment from the Halophilic Archaea confers promoter activity in all three domains of life. *Curr Microbiol*, 2003, **47**: 388 - 394.

Analysis of promoter sequence and its activity of homologues gene *rad25* of eukaryotes from halophilic archaea

ZHU Jian-yu^{1,2}, HU Yue-hua², LIU Jing¹, HUANG Yu-ping¹, SHEN Ping^{1*}

(¹ College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

(² School of Resource Processing and Biological Engineering, China Southern University, Changsha 410083, China)

Abstract: The transcriptional product in Halobacterium halobium R1 similar to eukaryotic gene *rad25* was analyzed by RT-PCR. Using bgaH as the reporter genes, the promoter function of eukaryotic *rad25*-like DNA fragment in halophilic archaea was investigated by promoter probe analysis. The important functional regions, which could influence the promoter activity of *rad25*-like gene, were identified by deletion analysis of the promoter sequence in Haloferax volcanii. It is found that the DNA fragment of promoter similar to eukaryotic gene *rad25* contains the typical characteristic sequence of archaeal promoter. These results indicate that *rad25*-like gene in Halobacterium halobium R1 is active and may play a role on the NER pathway as the eukaryotic pattern.

Keywords: Halophilic Archaea; Homologues gene; *rad25*; Promoter

Foundation item: Key Project of National Programs for Fundamental Research and Development of China(2004CB719603); National Natural Science Foundation of China(30570026)

* Corresponding author. Tel: 86-27-68754533; Fax: 86-27-87883833; E-mail: pingshen@whu.edu.cn

Received: 19 August 2005/Accepted: 7 September 2005/Revised: 6 December 2005

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