

耐辐射奇球菌 *crtI* 基因缺失突变株的构建及其功能研究

许镇坚, 田 兵, 许光治, 华跃进*

(浙江大学原子核农业科学研究所 杭州 310029)

摘 要 利用 PCR 方法和体内同源重组技术, 对耐辐射奇球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 中控制色素合成的关键基因——*crtI* 进行缺失突变, 成功获得红色色素缺失突变株 M61。对突变株分别进行不同剂量电离辐射 (IR) 和不同浓度过氧化氢 (H_2O_2) 处理, 结果表明: 与野生型菌株 R1 相比, 突变株 M61 对电离辐射的抗性降低, 对过氧化氢的敏感性明显上升, 在高浓度 H_2O_2 条件下表现异常敏感。HPLC 分析结果显示, *crtI* 基因的完全缺失对色素合成途径产生重要影响, 导致番茄红素和其他红色类胡萝卜素的合成被抑制。证明 *crtI* 基因是耐辐射奇球菌中控制红色类胡萝卜素合成的一个关键基因。为阐明耐辐射奇球菌中类胡萝卜素参与的抗辐射和抗氧化机制奠定了一定基础, 为进一步研究类胡萝卜素在耐辐射奇球菌中的合成途径及功能提供了思路。

关键词: 耐辐射奇球菌; *crtI* 突变株; 类胡萝卜素; 抗氧化机制

中图分类号: Q937 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)02-0210-04

耐辐射奇球菌 (*Deinococcus radiodurans*, 简称 DR) 为红色革兰氏阳性非光合细菌, 它以对电离辐射、紫外线、强氧化剂及化学诱变剂表现极强的耐受力而著称^[1]。有研究表明, DR 高效的 DNA 损伤修复系统和特异蛋白功能对其辐射抗性有贡献, 但是还不足以说明它具有的这种超强的适应机制^[2,3]。耐辐射奇球菌体内大量合成的类胡萝卜素可能对其发挥重要作用^[4,5]。然而, 至今尚缺乏对其合成代谢的分子基础和功能的深入研究。

类胡萝卜素的生物合成途径在光合微生物和植物中已有相关的研究报道^[6], 但在非光合细菌中研究较少。其中, 八氢番茄红素脱氢酶基因 (*crtI*) 是类胡萝卜素合成途径中的一个重要上游基因, 它主要通过多步脱氢反应将无色的八氢番茄红素 (Phytoene) 转变为红色的番茄红素 (Lycopene)^[7], 它也是从无色类胡萝卜素合成红色类胡萝卜素的关键基因。为研究耐辐射奇球菌体内类胡萝卜素的合成途径和功能, 我们运用 PCR 方法和体内同源重组技术对 *crtI* 基因进行了缺失突变, 用 HPLC 方法分析了 *crtI* 基因突变后对色素组分及含量产生的影响。通过不同剂量的电离辐射和不同浓度过氧化氢处理突变株, 对 *crtI* 基因的功能进行了研究。为在分子水平上了解耐辐射奇球菌的类胡萝卜素合成途径、功能与调控机制提供了研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及生长条件 本实验使用的菌株、质粒及其特性见表 1。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 用 LB 液体培养基或含 1.5% 琼脂的固体培养基, 温度 37°C; *D. radiodurans* R1 用 TGY 培养基 (5g/L 胰蛋白胍, 3g/L 酵母提取物, 1g/L 葡萄糖) 培养, 温度 30°C。E. coli 转化用普通 $CaCl_2$ 法^[8], 用 100 μ g/mL 的氨苄青霉素 (Amp) 筛选; *D. radiodurans* 转化采用改良 $CaCl_2$ 法^[9], 突变株用抗生素筛选, 卡那霉素 (Km) 用量为 20 μ g/mL。

表 1 供试菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this work		
Strains and plasmids	Characteristics	Source
Strains		
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>SupE44, ΔlacU169, hsdR17, recA1, endA1, gryA96, thi-1, relA1</i>	Store in this lab
<i>D. radiodurans</i>		
R1	Wide type strains (ATCC 13939)	Store in this lab
M61	<i>crtI</i> gene deleted-mutant	This study
Plasmids		
pGEM-T easy	ColE, Ap ^r	Promega
pRADK	Resource of Km resistant cassette	Store in this lab

基金项目: 国家 973 项目 (2004CB19604); 国家自然科学基金重点资助项目 (30330020); 国家杰出青年基金项目 (30425038); 国家自然科学基金项目 (30500008)

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

作者简介: 许镇坚 (1980 -) 男, 浙江乐清人, 博士研究生, 主要从事 DNA 损伤修复和分子调控研究。

收稿日期: 2005-07-29; 接受日期: 2005-08-23; 修回日期: 2005-11-30

1.1.2 主要试剂: 本实验所用各种限制性内切酶、*LA Taq* DNA 聚合酶、dNTP、Agarose 和分子量标准均购自 TaKaRa 公司, T4 DNA 连接酶购自 New England Biolab 公司。氨苄青霉素和卡那霉素购自上海博亚公司。亚克隆载体 pGEM-T easy 购于 Promega 公司。PCR 纯化和胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司。质粒抽提试剂盒购自 Omega 公司。番茄红素标准品购自 Sigma 公司。引物合成和 DNA 测序反应均委托上海博亚公司完成。

1.2 *crtI* 基因缺陷性突变株的构建

如图 1 所示, 以 *D. radiodurans* R1 基因组^[10] 为模板, 设计引物 P1: 5'-CGTGTTCCTGCGACCTCAAAAACCCCAT-3', P2: 5'-CTGCATGGATCCGTCATACGGATTCCGCTT-3' (划线部分为 *Bam*H I 位点); 扩增产物 PCR1 为 *crtI* 基因的上游序列; 引物 P3: 5'-ATGCTGAAGCTTGACAGTAAACCTCGGAAG-3' (划线部分为 *Hind* III 位点), P4: 5'-CCATATTGCTAGGGTCGCAACTGTTTTTCG-3' 扩增产物 PCR2 为 *crtI* 基因的下游序列; 引物 P5: 5'-TTCTAGAAGCTTCTGCAGACGCGTCATCTGCAG-3' (划线部分为 *Hind* III 位点) 与 P6: 5'-ACAGACGGATCCCTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATG-3' (划线部分为 *Bam*H I 位点), 以 pRADK 质粒为模板^[11], 扩增产物 PCR3 为含有 *D. radiodurans* R1 菌 GroEL 启动子与卡那霉素抗性基因融合的一段序列。将 PCR1 与 PCR2 分别经 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切后与用同样酶双酶切的 PCR3 片段连接, 以此 3 段连接产物为模板, P1 与 P4 引物扩增得到含有卡那霉素抗性基因的产物 PCR4, 通过同源重组方法将 PCR4 重组进入 *D. radiodurans* R1 基因组中, 以 20 μ g/mL 卡那霉素筛选得到 *crtI* 基因功能完全破坏的突变株 M61 (图 1)。

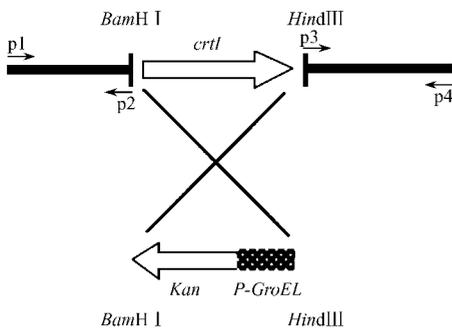


图 1 *D. radiodurans* R1 功能缺陷性突变株 M61 的构建

Fig. 1 Construction of the *crtI* gene function-deficient M61

1.3 辐射 IR 和 H₂O₂ 处理

1.3.1 γ 射线 (⁶⁰Co) 辐照处理: 处理方法参照文献 [11]。辐照处理独立进行 3 次, 以 3 次的平均值作为计数值。

1.3.2 H₂O₂ 处理: 处理方法参照文献 [5] 进行。

1.4 类胡萝卜素的分析

1.4.1 色素的提取: 取对数生长中后期的菌液 50mL 5000r/min 离心 10min, 用 dd H₂O 清洗 2 次, 沉淀用 1.8mL 预冷丙酮/甲醇溶液 (7:2, V:V) 悬浮, 室温下避光振荡 10min 4 $^{\circ}$ C 10000r/min 离心 10min, 取上清, 沉淀重复抽提 2~3 次至澄清, 提取液置 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.4.2 色谱条件: 采用 Waters 2690 Alliance 高效液相色谱仪, Hypersil ODS-C₁₈ 色谱柱 (4.6mm \times 250mm, 5 μ m), Waters-Millennium 32 色谱工作站, 流动相为乙腈-甲醇-异丙醇 (40:50:10, V:V:V), 检测波长为 472nm, 流速 0.8mL/min, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 进样量 10 μ L。

2 结果和分析

2.1 *crtI* 突变株的构建及鉴定

为获得 *crtI* 基因缺陷突变株, 通过 PCR 方法从本实验室已经构建的 pRADK 质粒上克隆了含有耐辐射奇球菌 GroEL 启动子的卡那霉素抗性基因 (长度为 1088bp), 反向插入 *crtI* 基因的上下游之间, 同源重组后抗性基因将 *crtI* 基因完全替换 (图 1), 通过 20 μ g/mL 卡那霉素抗性筛选得到了具有 *crtI* 基因功能缺陷性突变株 M61。通过 PCR 和酶切来鉴定融合 DNA 片段插入的正确性。以上述 P1 与 P4 引物进行 PCR 反应, 以 GroEL 启动子内部含有的一个 *Nde* I 酶切位点进行酶切验证。结果表明, 以 M61 基因组为模板扩增得到的全长片段为 2968bp, 它的酶切片段长度为 1208bp 和 1760bp, 与预期的 DNA 片段大小一致, 能完全区分野生型菌株 R1 的 PCR 全长片段 (3526bp)。克隆的 DNA 片段通过测序进一步验证了实验结果的正确性。

2.2 *crtI* 基因突变对色素合成的影响

八氢番茄红素脱氢酶基因 (*crtI*) 在类胡萝卜素合成途径中是位于比较上游的基因, 催化无色的八氢番茄红素脱氢生成红色的番茄红素, 而番茄红素又作为下一步反应的底物合成其他的类胡萝卜素。实验发现, *crtI* 基因的完全缺失会导致红色的野生型耐辐射奇球菌转变为完全无色的突变株。通过对野生型 R1 (图 2-A) 和 *crtI* 基因突变株 M61 (图 2-B) 色素组分的比较分析可知, 在 472nm 下, 对照 R1 的 HPLC 图谱上出现多个洗脱峰, 根据与番茄红素标准品的比较, 推断色谱峰 13 为番茄红素。图中主要峰 3 的紫外吸收特征与文献报道的 *Deinoxanthin* 相同^[41], 图中其他峰有待进一步鉴定; 而 M61 突变株的番茄红素以及其他红色类胡萝卜素组分均消失, HPLC 分析结果与表型变化完全一致, 证实了 *crtI* 的突变。上述实验结果表明, 耐辐射奇球菌中 *crtI* 基

因的突变确实会导致类胡萝卜素合成途径的中断,从而使 DR 的类胡萝卜素组分发生变化,最终可能对其生理功能产生影响。

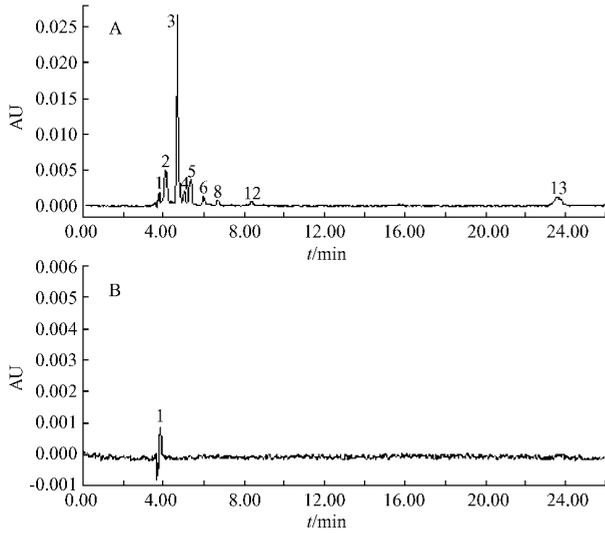


图2 野生型 R1 和突变株 M61 提取物的 HPLC 色谱图

Fig.2 HPLC separation of the carotenoids of *D. radiodurans* strain R1 and *crtI* gene function-deficient M61. A: R1; B: M61.

2.3 辐照条件下突变株的存活率

为了比较耐辐射奇球菌野生型菌株 R1 和 *crtI* 基因功能缺陷株 M61 对 γ 射线电离辐射抗性的差异,我们观察了菌株在不同辐照剂量下的细胞存活率。如图 3 所示,野生型菌株 R1 生存率曲线呈现明显的肩形,表现出极强的电离辐射抗性。2000Gy 辐照剂量对其生存率几乎没有影响,4000Gy 辐照剂量下仍有 90% 的存活率;而 *crtI* 基因功能缺陷株 M61 受电离辐射影响较大,虽然 4000Gy 辐照剂量下尚有 60% 的存活率,但辐照剂量升至 6000Gy 时却只保留 20% 左右的存活率,远低于野生型菌株 R1 的 72% 存活率。这表明, *crtI* 基因在耐辐射奇球菌中发挥重要作用,可能是 *crtI* 基因的突变导致它所催化合成的番茄红素以及下游的红色类胡萝卜素的缺失,

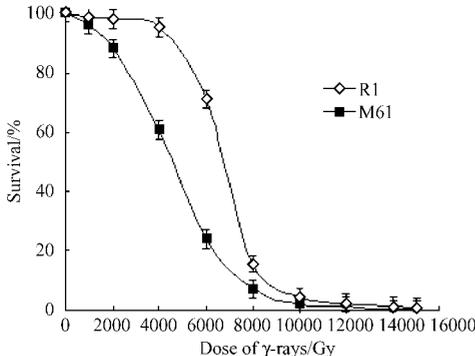


图3 辐射条件下野生型 R1 与突变株 M61 的生存率

Fig.3 Survival curves for *D. radiodurans* strain R1 and the *crtI* gene function-deficient M61 following exposure to γ -radiation. Values are means obtained from three independent experiments.

致使 M61 突变株不能及时清除辐照后体内大量产生的自由基,最终可能导致细胞的死亡。可见,在电离辐射条件下,番茄红素以及下游的红色类胡萝卜素参与了耐辐射奇球菌的保护作用。

2.4 H₂O₂ 处理对菌体存活率的影响

为了进一步确认 *crtI* 基因功能缺陷株 M61 对自由基的敏感性,我们对 R1 和 M61 进行了不同浓度 H₂O₂ 的处理,并考察了它们的存活率的变化情况。图 4 的结果表明,在稳定生长期,9.01mmol/L H₂O₂ 条件下,1h 内两者的存活率都在 90% 以上,而 M61 突变株比对照 R1 要低 6% 左右;19.61mmol/L H₂O₂ 下 2h 后 M61 存活率降为 67.5%,R1 比对照 M61 大约高出 26%;29.13mmol/L 高浓度下,M61 的存活率下降明显,2h 后存活率降为 46%,而 R1 仍有 87% 的高存活率,这一浓度下,前者比后者在存活率上要低约 41%。可见,稳定生长期, *crtI* 基因功能缺陷株 M61 对不同浓度的 H₂O₂ 比野生型菌株 R1 均要敏感,高浓度条件下表现尤为明显。

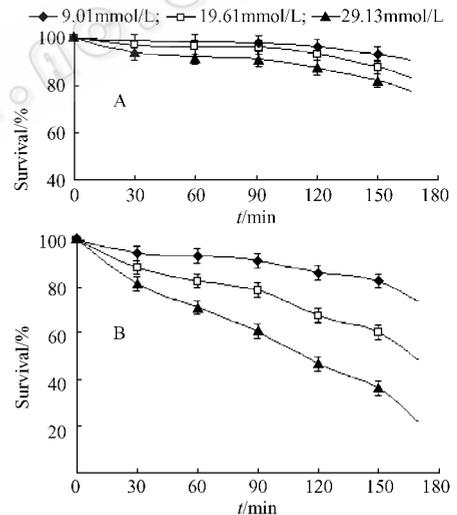


图4 不同浓度 H₂O₂ 下野生型 R1 和突变株 M61 的生存率

Fig.4 Survival curves for *D. radiodurans* strain R1 and *crtI* gene function-deficient M61 following exposure to H₂O₂. Values are means obtained from three independent experiments. A: R1; B: M61.

3 讨论

关于耐辐射奇球菌的研究已经进行了近 60 年,但对其超强抗性机制仍不清楚^[12]。虽然 DR 当前的研究热点是高效 DNA 损伤修复系统和特异蛋白功能,但类胡萝卜素作为抗氧化机制的重要成员无疑对耐辐射奇球菌是有重要贡献的。本研究首次在耐辐射奇球菌中对控制色素合成的关键基因——*crtI* 进行缺失突变,成功获得 *crtI* 基因缺失突变株 M61,利用 HPLC 分析和鉴定了 *crtI* 基因的缺失突变对色素合成的影响。同时初步研究了不同剂量电离辐射

对突变株的影响,进一步检测了 M61 突变株对不同浓度 H_2O_2 的敏感性。实验结果表明, *crtI* 基因的缺失导致耐辐射奇球菌对电离辐射抗性受到影响,并表现出对 H_2O_2 的敏感性。HPLC 分析表明, *crtI* 基因的突变致使 DR 中红色类胡萝卜素的大量缺失,可能是色素的合成途径由于 *crtI* 基因的突变而被阻断,最终导致整个途径下游色素的合成被抑制,从而使突变株 M61 对电离辐射和 H_2O_2 敏感性显著增加,表明番茄红素等红色类胡萝卜素对菌体的抗性具有重要意义。类胡萝卜素为 DR 体内抗氧化机制的重要成员,它能猝灭单线态氧的产生及清除对 DNA 造成损伤的自由基,防止 DNA 损伤的加剧。作为非酶体系的关键一环,它与 DR 中存在的过氧化氢酶(CAT)及超氧化物歧化酶(SOD)等酶类体系共同组成了 DR 体内的抗氧化体系^[13]。由于类胡萝卜素的合成路径和调控关系的复杂性,相关工作有待于进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Battista JR, Ear AM, Park MJ. Why is *Deinococcus radiodurans* so resistant to ionizing radiation? *Trends Microbiol*, 1999, **7**(9): 362 - 365.
- [2] Hua Y, Gao G, Tian B, et al. PprI: a general switch responsible for extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **306**(2): 354 - 360.
- [3] Narumi I, Satoh K, Cui S, et al. PprA: a novel protein from *Deinococcus radiodurans* that stimulates DNA ligation. *Mol*

Microbiol, 2004, **54**(1): 278 - 285.

- [4] Laurant L, Evlyne P, Michel C. *Deinoxanthin*: A New Carotenoid Isolated from *Deinococcus radiodurans*. *Tetrahedron*, 1997, **53**(3): 919 - 926.
- [5] Carbonneau MA, Melin AM, Perromat A, et al. The action of free radicals on *Deinococcus radiodurans* carotenoids. *Arch Biochem Biophys*, 1989, **275**(1): 244 - 251.
- [6] Harada J, Nagashima KV, Takaichi S, et al. Phytoene desaturase, CrtI, of the purple photosynthetic bacterium, *Rubrivivax gelatinosus*, produces both neurosporene and lycopene. *Plant Cell Physiol*, 2001, **42**(10): 1112 - 1118.
- [7] Van Dien SJ, Marx CJ, Brien BN, et al. Genetic characterization of the carotenoid biosynthetic pathway in *Methylobacterium extorquens* AM1 and isolation of a colorless mutant. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(12): 7563 - 7566.
- [8] Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.
- [9] Meima R, Rothfuss HM, Gewin L, et al. Promoter cloning in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol*, 2001, **183**(10): 3169 - 3175.
- [10] White O, Eisen JA, Heidelberg JF, et al. Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science*, 1999, **286**(5444): 1571 - 1577.
- [11] Gao G, Lu H, Huang L, et al. Construction of DNA damage response gene *pprI* function deficient and function complementary mutants in *Deinococcus radiodurans*. *Chinese Science Bulletin*, 2005, **50**(4): 311 - 316.
- [12] Narumi I. Unlocking radiation resistance mechanisms: still a long way to go. *Trends Microbiol*, 2003, **11**(9): 422 - 425.
- [13] Makarova KS, Aravind L, Wolf YI, et al. Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2001, **65**(1): 44 - 79.

Construction and functional analysis of the *crtI* gene disruptant in *Deinococcus radiodurans*

XU Zhen-jian, TIAN Bing, XU Guang-zhi, HUA Yue-jin*

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

Abstract: With the method of Polymerase Chain Reaction and homologous genetic recombination in vivo, the key gene encoding bacterial-type phytoene desaturase (CrtI) which controls the carotenoids biosynthesis pathway in the non-photosynthetic and extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* was deleted from the genome. The colorless mutant obtained was designated as M61. Survival rates of mutant strain and wild type strain were investigated under different doses of γ -radiation and hydrogen peroxide. The results showed that the radioresistant activity of M61 reduced rapidly under ionization radiation, and it became more sensitive to the treatment of hydrogen peroxide especially to high concentration of hydrogen peroxide compared to that of wild type R1. Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) was used to investigate the carotenoid composition of wild type R1 and mutant M61. HPLC results exhibited that the deficient of *crtI* gene had important effect on pigment biosynthesis pathway, leading to inhibition of the biosynthesis of lycopene and other carotenoids in *D. radiodurans*. All the results indicated that *crtI* gene was a key gene controlling the biosynthesis of red carotenoid including lycopene in *D. radiodurans*. The roles of carotenoids in protecting the bacterial cell from damage by ionization radiation and hydrogen peroxide suggest that the carotenoids contribute to the defense system in *D. radiodurans*. This study is important for elucidating the radioresistant and antioxidant mechanism in which carotenoids are involved, and it will supply some ideas to the further investigation on the biosynthesis pathway and functions of carotenoids in *D. radiodurans*.

Keywords: *Deinococcus radiodurans*; *crtI*-mutant; Carotenoid; Antioxidant mechanism

Foundation items: Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2004CB19604); Key Project of Chinese National Natural Science Foundation (30330020); National Science Foundation for Distinguished Young Scholars (30425038); Chinese National Natural Science Foundation (30500008)

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

Received: 29 July 2005/Accepted: 23 August 2005/Revised: 30 November 2005