

PprI 和 RecX 蛋白对耐辐射奇球菌抗氧化作用的影响

田 兵¹, 张韶文², 许镇坚¹, 盛多红¹, 华跃进^{1*}

(¹ 浙江大学原子核农业科学研究所 农业部核农学重点开放实验室 杭州 310029)

(² 浙江大学医学院 杭州 310027)

摘 要 利用基因突变、化学发光法和酶活性分析研究了耐辐射奇球菌中与辐射抗性密切相关的基因 *pprI* (Dr0167) 和 *recX* (Dr1310) 突变对菌体活性氧清除作用的影响, 分析了其对抗氧化酶活性的调控功能。实验结果表明, 缺失 *pprI* 的突变株对活性氧自由基氧化异常敏感, 过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活性显著降低。与之相反, *RecX* 对菌体活性氧清除作用表现为一种“负”的影响, 即缺失 *recX* 的突变株对活性氧自由基的清除能力反而增强了, 过氧化氢酶和超氧化物歧化酶的酶活性明显增加。表明这两个基因与抗氧化系统的调控有关。为进一步研究该菌的抗氧化机制提供了一些思路。

关键词 耐辐射奇球菌, PprI, RecX, 活性氧清除作用, 过氧化氢酶, 超氧化物歧化酶

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2006)02-0238-05

耐辐射奇球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 与其他物种比较, 具有超强的耐辐射能力, 它能够在 15kGy 的辐射条件下生存, 比大肠杆菌的抗辐射能力高出 100 多倍^[1]。而人的辐射半致死剂量约为 4Gy, 照射 6.5Gy 100% 死亡。耐辐射奇球菌的超强抗辐射能力主要被归结为三个方面的适应机制: 保护、耐受和修复^[2]。其保护作用是指在长期进化过程中形成的抗氧化防御体系, 分为酶类和非酶类两种: 酶类抗氧化物有过氧化氢酶 (CAT), 超氧化物歧化酶 (SOD) 等; 非酶类的抗氧化物质主要包括类胡萝卜素等^[3]。它们能够清除活性氧自由基或阻断活性氧自由基反应, 或将有害的自由基转变为比较稳定的自由基。其中 SOD 的作用是将超氧阴离子自由基通过歧化反应生成过氧化氢, CAT 可以将过氧化氢转变成水和氧。至今关于耐辐射奇球菌抗氧化作用的分子机理和调控机制的研究较少。Ping Wang 和 Herb Schellhorn 发现耐辐射奇球菌对过氧化氢的抗性明显高于大肠杆菌^[4]。但是, 耐辐射奇球菌抗氧化体系的调控机制还不清楚, 对调控抗氧化作用的功能基因的研究不仅具有重要的理论研究价值, 而且还可以应用于其他物种适应极端环境的基因改造领域, 如增强其他物种的抗活性氧自由基能力, 还可以用于构建处理强氧化性化学污染的基因工程菌。我们最近发现了两种与其辐射抗性相关的蛋白 PprI

(Dr0167 表达蛋白产物 PprI 是一种促进 DNA 修复的多效蛋白的诱导物) 和 RecX (Dr1310)^[5,6], PprI 是一个耐辐射奇球菌独有的蛋白, 研究表明, PprI 能诱导 DNA 重组修复相关的因子如 RecA 和 PprA (pleiotropic protein promoting DNA repair) 的表达, *pprI* 基因缺失明显降低了 *recA* 的表达并导致大部分辐射抗性的丧失。RecX 是一个具有抗重组酶 RecA 活性的调节蛋白, RecX 能够直接下调 RecA 蛋白活性, 降低 RecA 过表达对细胞的损伤。RecX 还能抑制包括 SSB (单链结合蛋白) 和 PprA 的活性, 可能是一个多功能抑制子。因此, PprI 和 RecX 是参与抗辐射机制的重要上游调控因子, 它们也可能参与了菌体抗氧化体系的调控作用。本文研究了 PprI 和 RecX 对耐辐射奇球菌活性氧清除作用和抗氧化酶的调控功能。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 耐辐射奇球菌野生型菌株 (*D. radiodurans* R1, ATCC 13939) 由中国科学院微生物资源中心提供。

1.1.2 培养基和培养条件: 耐辐射奇球菌生长于 TGY 培养基 (每升含 5g 蛋白胨、3g 酵母提取物、1g 葡萄糖)。培养温度为 32℃。

1.1.3 主要试剂和仪器: 各种限制性内切酶、T4

基金项目: 国家“973”项目 (2004CB719604) 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: 田 兵 (1970 -), 男, 辽宁人, 副研究员, 博士, 从事耐辐射奇球菌环境适应机理的研究。E-mail: tianbing@zju.edu.cn

其他作者: 高冠军¹

收稿日期: 2005-07-29 接受日期: 2005-08-19 修回日期: 2005-12-12

DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司, *Taq* DNA 聚合酶、dNTP 购自上海博亚公司。pGEMT Easy 载体购于 Promega 公司。鲁米诺(luminol)、Superoxide dismutase 和 Catalase 标准品均为 Sigma 公司产品。过氧化氢(H_2O_2)、邻苯三酚、抗坏血酸(Vc)、邻菲罗啉(Phen)等试剂均为分析纯试剂。

1.2 耐辐射奇球菌 *pprI* 和 *recX* 缺失突变株的构建
pprI 缺失突变株 YA 是利用氯霉素抗性基因(*catA*)插入突变,对 *pprI* 进行基因敲除,氯霉素抗性用作突变株筛选标记,其制备过程见文献[5]。*recX* 缺失突变株是利用卡那霉素抗性基因(Kam)插入突变 *recX* 基因获得[6]。

1.3 菌体活性氧自由基清除作用分析

野生菌和突变菌株的细胞在生长到稳定早期时,取菌液 50mL 离心(5000r/min 4℃)10min,收集菌体沉淀。用 50mmol/L PBS (pH7.0)洗涤两次,离心收集菌体。按每克湿菌体加入 3 倍体积缓冲液制成菌悬液,超声波破碎细胞。在菌液中加入终浓度为 0.01mg/mL 的脱氧核糖核酸酶 DNase I 和核酸酶 RNaseA,于 37℃ 下温浴处理 2h,去除其中的 DNA 和 RNA。4℃ 下离心(12000r/min)20min,收集上清液,保存于冰上待用。蛋白浓度(mg/mL)用 Bradford 染色法测定[7]。菌体活性氧自由基清除能力用化学发光法分析。

1.3.1 菌体对超氧阴离子自由基(O_2^-)的清除能力分析:超氧阴离子自由基采用邻苯三酚自氧化作为产生体系,以鲁米诺为发光剂,测定方法参照文献[8]。每组实验重复 3 次得平均值。清除活性 Scavenging activity (%) 由以下公式计算得出:

$$\text{Scavenging activity (\%)} = \frac{[(CL_{\text{control}} - CL_0) - (CL_{\text{sample}} - CL_0)]}{(CL_{\text{control}} - CL_0)} \quad (1)$$

式中 CL_{control} 对照发光值; CL_0 本底发光值; CL_{sample} 样品发光值。

1.3.2 菌体对过氧化氢(H_2O_2)的清除能力分析:采用 H_2O_2 激发鲁米诺产生化学发光的反应体系,具体测定方法参照文献[8],清除活性(%)的计算公式同公式(1)。

1.3.3 菌体对羟基自由基($\cdot OH$)清除能力的分析:羟基自由基($\cdot OH$)由 Fenton 反应体系产生,测定方法参照文献[8],按公式(1)计算清除活性(%)。

1.4 菌体过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)活性的分析

菌体中的超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶

(CAT)活性分别采用黄嘌呤氧化酶法[9]和 Beers & Sizars 法测定[10]。

2 结果和分析

2.1 耐辐射奇球菌 *pprI* 和 *recX* 突变株的超氧阴离子自由基清除作用

利用化学发光法分析了 *pprI* 和 *recX* 突变对耐辐射奇球菌超氧阴离子自由基(O_2^-)清除活性的影响,并与野生型菌株进行比较,结果表明(图1),菌体对超氧阴离子自由基清除作用与蛋白浓度具有一定的量效关系,自由基清除活性随着浓度的增加而增加。*pprI* 突变使超氧阴离子自由基的清除活性显著降低,与此相反,*recX* 突变后菌体的自由基清除活性明显增加。在相同浓度条件(2mg/mL)下,野生型、*pprI* 突变株和 *recX* 突变株的超氧阴离子自由基清除活性分别为 $54.39 \pm 1.72\%$ 、 $15.24 \pm 1.31\%$ 和 $69.15 \pm 1.86\%$ 。因此,PprI 和 RecX 蛋白可能与菌体的超氧阴离子自由基清除活性的调控密切相关。

超氧阴离子自由基是生物体内产生的一种重要的活性氧,可以通过非酶反应或酶反应形成,如还原型核黄素、FMN 等生物分子氧化时可以产生 O_2^- 。另外,在氧的代谢反应中的酶促氧化与还原,也会有 O_2^- 的产生[11]。由于活性氧之间是可以相互转变的,超氧阴离子自由基可以歧化成过氧化氢和氧分子(反应速率很慢,但在 SOD 催化作用下可迅速发生歧化反应),并在过渡金属离子催化下可以产生羟基自由基($\cdot OH$)。我们进一步考察了 PprI 和 RecX 蛋白对过氧化氢和羟基自由基清除能力的影响。

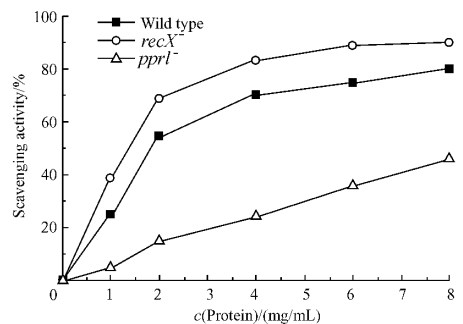


图1 耐辐射奇球菌野生型菌株 R1、*pprI* 突变株 (*pprI*⁻) 和 *recX* 突变株 (*recX*⁻) 对 O_2^- 清除能力的比较

Fig.1 Comparison of scavenging effects of *D. radiodurans* wild type R1, *pprI* mutant (*pprI*⁻) and *recX* mutant (*recX*⁻) on O_2^- .

2.2 耐辐射奇球菌 *pprI* 和 *recX* 突变株对过氧化氢的清除作用

生物体通过酶促反应可以直接将 O_2 转化为

H_2O_2 也可以在 SOD 催化下将 O_2^- 歧化为 H_2O_2 。图 2 的结果是菌体 H_2O_2 清除活性的比较。耐辐射奇球菌野生型在低浓度(0~0.25mg/mL)条件下,能够明显地清除 H_2O_2 ,并且表现出一定的浓度量效关系。在 0.25~1.00mg/mL 浓度范围内, *recX* 基因敲除后菌株的清除活性高于对照的野生型菌株,在相同的浓度条件(0.25mg/mL)下,突变株和野生型菌株对 H_2O_2 的清除活性分别为 $87.15 \pm 1.23\%$ 和 $72.61 \pm 1.72\%$,突变株的清除活性提高了约 15%,表明 *recX* 的缺失能够导致菌体清除氧自由基活性的显著增加。而当 *pprI* 基因敲除后, H_2O_2 清除活性显著降低 ($42.48 \pm 2.23\%$),与野生型比较,下降了约 30%。我们的研究表明, PprI 和 RecX 这两种蛋白质本身对活性氧自由基并没有直接的清除活性(未发表数据),因此,它们可能是参与菌体抗氧化作用的重要调控因子。

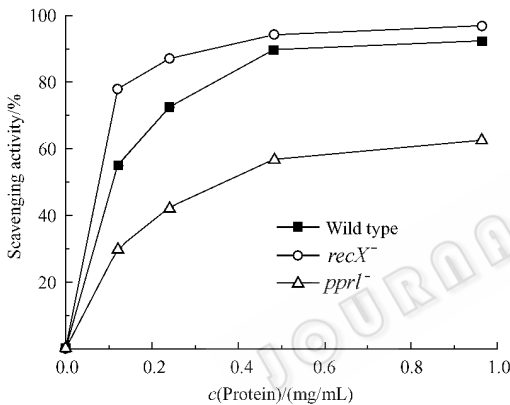


图 2 耐辐射奇球菌野生型菌株 R1、*pprI* 突变株 (*pprI*⁻) 和 *recX* 突变株 (*recX*⁻) 对 H_2O_2 清除能力的比较

Fig.2 Comparison of Scavenging effects of *D. radiodurans* wild type R1, *pprI* mutant (*pprI*⁻) and *recX* mutant (*recX*⁻) on H_2O_2 .

2.3 耐辐射奇球菌 *pprI* 和 *recX* 突变株的羟基自由基清除作用

$\cdot OH$ 是生物体中化学性质活跃的一种活性氧,过量的 $\cdot OH$ 能够对机体组织产生较强的毒性作用。机体组织中可以通过 Fenton 型的 Haber-Weiss 反应产生羟基自由基^[11]。研究发现, *pprI* 和 *recX* 基因突变株对羟基自由基的清除能力与野生型比较差别不大,尤其是 *recX* 基因突变株与野生型相近(图 3)。在相同浓度条件(0.5mg/mL)下, *recX* 突变株、野生型和 *pprI* 突变株的清除活性分别为 $93.44 \pm 1.59\%$ 、 $91.37 \pm 2.31\%$ 和 $84.63 \pm 1.89\%$ 。这可能是在菌体中存在有其他的非酶类羟基自由基清除因子,如类胡萝卜素和维生素类等,它们有其自身的合成代谢

途径和调控机制,这些非酶类清除因子的活性可能不受 *pprI* 和 *recX* 的影响或影响较弱。

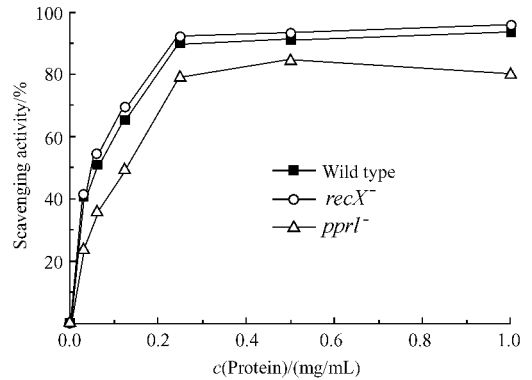


图 3 耐辐射奇球菌野生型菌株 R1、*pprI* 突变株 (*pprI*⁻) 和 *recX* 突变株 (*recX*⁻) 对羟基自由基 $\cdot OH$ 清除能力的比较

Fig.3 Comparison of Scavenging effects of *D. radiodurans* wild type R1, *pprI* mutant (*pprI*⁻) and *recX* mutant (*recX*⁻) on $\cdot OH$.

2.4 *pprI* 和 *recX* 突变对菌体超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性的影响

由于在菌体细胞中,多数 O_2^- 和 H_2O_2 是分别被 SOD 和 CAT 催化降解的,因此,突变株菌体的活性氧自由基清除能力的改变与基因突变株的抗氧化酶活性相关。为此,我们考察了突变株和野生型菌中的两种抗氧化酶活性,结果表明(表 1),与野生型比较, *pprI* 突变株的 SOD 和 CAT 酶活性显著下降,分别减少了约 60% 和 47%。然而, *recX* 的缺失使两种酶的活性提高了 1 倍以上。

表 1 突变株和野生型菌株的抗氧化酶(SOD 和 CAT)酶活性的比较*

Table 1 Comparison of activities of SOD and CAT in mutants and wild type*

Strain	SOD	CAT
Wild type R1	100	100
Mutant PprI	40.24 ± 5.52	52.99 ± 4.21
Mutant RecX	207.32 ± 7.15	231.68 ± 3.76

* Enzyme activities of mutants are presented by their relative activities to wild type(%).

另外,我们前面的研究工作也表明, *pprI* 补偿的大肠杆菌中的过氧化氢酶活性显著提高^[12]。因此, PprI 是菌体抗氧化酶的一种重要调控因子,可能通过激活抗氧化酶的表达来抵御外界的氧化压力。*RecX* 的缺失也影响了菌体中抗氧化酶的活性,我们的研究表明通过向突变株中添加 *RecX* 蛋白,并没有影响菌体的自由基清除活性,这表明 *RecX* 蛋白本身不是直接的自由基清除作用因子。*RecX* 的存在可能抑制了过量的自由基清除因子(SOD 和 CAT)

的作用,可能存在一种“负”调控机制,即在正常的生理状态下,能够通过抑制抗氧化酶的过量表达而维持抗氧化体系的平衡。

3 讨论

辐射引起细胞内水辐解,形成活性氧自由基,攻击生物大分子。因此,活性氧自由基对生物大分子氧化损伤是导致辐射损伤的一个重要原因,耐辐射奇球菌的超强耐辐射能力与其清除自由基的能力应该存在着密切的联系。目前,关于耐辐射奇球菌对极端环境适应机理的研究已经成为研究的焦点。耐辐射奇球菌的基因组序列分析已经完成,研究表明,大量未知的功能基因和抗性酶可能贡献于这种极端抗性^[13]。耐辐射奇球菌抗氧化酶活性明显高于大肠杆菌,表明耐辐射奇球菌中有关抗氧化酶合成的调控可能具有特殊的机制,但缺乏相应的研究。吕星等人利用简并引物克隆了耐辐射奇球菌中的过氧化氢酶和超氧化物歧化酶的基因片段^[14]。最近,美国的 Daly 等人的研究发现耐辐射奇球菌能够富集 $Mn(II)$ 离子,并且和辐射抗性有着密切的关系,而 SOD 的金属辅基 $Mn(II)$ 是菌体中 Mn 的主要存在形式之一^[15]。pprI 是我们在耐辐射奇球菌中新发现的与适应极端环境有关的一个保护性“开关”基因^[5],在胁迫环境下会开启部分与 DNA 修复直接相关的因子(如 RecA、PprA 等)。RecX 最初被认为是一种抗重组酶,它通过作用于 RecA(一种参与 DNA 修复过程的蛋白)而降低 RecA 的活性。在耐辐射奇球菌中也有 recX 的同源基因(DR1310),我们通过基因敲除得到了它的基因突变株 recX⁻^[6]。本文研究了它们对菌体抗氧化作用的影响。结果表明,耐辐射奇球菌 pprI(Dr0167)和 recX(Dr1310)基因突变对菌体活性氧清除作用具有显著影响,缺失 PprI 的突变株对活性氧自由基氧化异常敏感,过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活性显著降低。与之相反,RecX 对菌体活性氧清除作用表现为一种“负”的影响,即缺失 RecX 的突变株对自由基的清除能力反而增强了,过氧化氢酶和超氧化物歧化酶的酶活性也明显增加。pprI 和 recX 基因突变株对羟基自由基的清除能力与野生型比较差别不大,这可能是在菌体中存在有其他的非酶类羟基自由基清除因子,如类胡萝卜素,它们的合成可能不受 pprI 和 recX 的影响。有关菌体类胡萝卜素和抗氧化酶之间的协同作用关系还有待研究。

可以推测,在耐辐射奇球菌中可能存在着由多

个具有正向(类似于 pprI)和负向(如 recX)调控基因构成的抗氧化作用调控网络,共同维护菌体抗氧化体系的平衡。虽然,有关 pprI 和 recX 基因对抗氧化酶的转录和表达的具体调控作用、激活机制以及它们在整个调控网络中的地位和其他相关基因需要深入研究,对耐辐射奇球菌抗氧化作用基因调控的研究具有重要的理论价值。同时,功能基因又可以进一步应用于其他物种适应极端环境的基因改造领域,如果增强其他物种的抗活性氧自由基氧化能力,还可以用于构建处理强氧化性化学污染的基因工程菌。

参 考 文 献

- [1] Xu WL, Shen JY, Dunn CA, et al. The Nudix hydrolases of *Deinococcus radiodurans*. *Molecular Microbiology*, 2001, **39**(2): 286–290.
- [2] Makarova KS, Aravind L, Wolf YI. Genome of the extremely radiation resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001, **65**(1): 44–79.
- [3] Lemece L, Peuchant E, Clerc M, et al. Deinoxanthin: A new carotenoid isolated from *Deinococcus radiodurans*. *Tetrahedron*, 1997, **53**(3): 919–926.
- [4] Wang P, Schellhorn HE. Induction of resistance to hydrogen peroxide and radiation in *Deinococcus radiodurans*. *Can J Microbiol*, 1995, **41**: 170–176.
- [5] Hua YJ, Narumi I, Gao GJ, et al. PprI: a general switch responsible for extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2003, **306**: 354–360.
- [6] Sheng DH, Liu R, Xu ZJ, et al. Dual negative regulatory mechanisms of RecX on RecA functions in radiation resistance, DNA recombination and consequent genome instability in *Deinococcus radiodurans*. *DNA Repair*, 2005, **4**(6): 671–678.
- [7] Bradford MM. 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.
- [8] Tian B, Wu Y, Sheng D, et al. Chemiluminescence assay for reactive oxygen species scavenging activities and inhibition on oxidative damage of DNA in *Deinococcus radiodurans*. *Luminescence*, 2004, **19**(2): 78–84.
- [9] Benov LT, Beyer WF, Stevens RD, et al. Purification and characterization of the Cu, Zn SOD from *Escherichia coli*. *Free Radical Biology & Medicine*, 1996, **21**(1): 117–121.
- [10] Stellmach B. 酶的测定方法. 钱嘉渊, 译. 第一版. 北京: 中国轻工业出版社, 1992, 186–188.
- [11] 方允中, 郑荣梁. 自由基生物学的理论与应用. 第一版. 北京: 科学出版社, 2002, 126–130.
- [12] Gao G, Tian B, Liu L, et al. Expression of *Deinococcus radiodurans* PprI enhances the radioresistance of *Escherichia coli*. *DNA Repair*, 2003, **2**: 1419–1427.

- [13] White O, Eisen JA, Heidelberg JF, *et al.* Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science*, 1999, **286**: 1571 – 1577.
- [14] 吕 星,邢瑞云,郑 晖,等. 用简并引物扩增与克隆 *D. radiodurans* 超氧化物歧化酶和过氧化氢酶基因片段. 应用与环境生物学报, 1999, **5**(5): 515 – 520.
- [15] Daly MJ, Gaidamakova EK, Matrosova VY, *et al.* Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* Facilitates Gamma-Radiation Resistance. *Science*, 2004, **306**(5): 1025 – 1028.

Effects of Ppr1 and RecX on antioxidant activity of *Deinococcus radiodurans*

TIAN Bing¹, ZHANG Shao-wen², XU Zhen-jian¹, SHENG Duo-hong¹, HUA Yue-jin^{1*}

(¹ Institute of Nuclear Agricultural Sciences, Zhejiang University, Key Lab of Nuclear-Agricultural Sciences of Ministry of Agriculture, Hangzhou 310029, China)

(² University Hospital, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: Effects of mutations of Ppr1(Dr0167) and RecX(Dr1310), which are relative to radioresistance, on reactive oxygen species scavenging activities in *Deinococcus radiodurans* were investigated using gene mutation, chemiluminescence measurement and enzyme activity analysis. Their possible regulating functions on the activities of antioxidant enzymes was evaluated. Results show that mutant that lacks Ppr1 is remarkably sensitive to reactive oxygen species and its enzyme activities of catalase and superoxide dismutase decrease significantly. On the other hand, RecX has a "negative" effect on reactive oxygen species scavenging activities of this bacterium, i. e., mutation of recX enhances the scavenging activities on reactive oxygen species, and the enzyme activities of catalase and superoxide dismutase in mutant that lacks RecX are significantly increased. These results indicate that these two genes are relative to the regulation of antioxidant system of this bacterium. It presents some idea to the further investigation on the antioxidant mechanism of this bacterium.

Keywords: *Deinococcus radiodurans*; Ppr1; RecX; Reactive oxygen species scavenging effects; Catalase; Superoxide dismutase

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

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

Other author: GAO Guan-jun¹

Received: 29 July 2005/Accepted: 19 August 2005/Revised: 12 December 2005