

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(5) 585-590; 4 May 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

抗辐射菌属-大肠杆菌间的穿梭载体的构建及荧光基因的表达

屠振力, 钟儒杰, 王家刚

(浙江大学动物科学学院 杭州 310029)

摘要【目的】构建抗辐射菌属-大肠杆菌间的穿梭载体,通过此载体使荧光素酶基因在大肠杆菌中得到表达。【方法】以质粒 pUE30、pGBM5 及 pKatCAT 为基础,构建抗辐射菌属-大肠杆菌间的穿梭载体,将 groEL 启动子和荧光素酶基因 lux+ 插入到构建的穿梭载体中得到穿梭表达载体,并将该载体转化大肠杆菌诱导荧光素酶基因的表达。【结果】成功构建了大小约为 5.8 kb 的抗辐射菌属-大肠杆菌间的穿梭载体 pZT17,该载体在没有抗生素的非选择性培养基中能稳定存在。在穿梭载体 pZT17 的 EcoRV 部位插入含有 groEL 启动子和荧光素酶基因 lux+ 的 DNA 片段,构建得到了穿梭表达载体 pZTGL2,利用该表达载体在大肠杆菌中可诱导表达荧光素酶基因。【结论】构建的穿梭表达载体为以后用大肠杆菌高效表达来源于抗辐射菌的基因、特别是 DNA 损伤修复蛋白基因,提供了可能。

关键词: 抗辐射菌; 大肠杆菌; 穿梭载体; 荧光素酶基因; 表达载体

中图分类号: Q937 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2009)05-0585-06

抗辐射菌(*Deinococcus radiodurans*)是美国科学家 Anderson 等^[1]从辐照灭菌后变质的肉类罐头中发现的一种非病原性红色球菌,该菌具有惊人的 DNA 二条链切断损伤的修复能力,由辐射等引起的切断损伤 DNA 在几~十几小时内能高效正确地进行完全修复^[2-7]。现已鉴定的抗辐射菌有 7 个种(*D. radiodurans*; *D. radiopugnance*; *D. radiophilus*; *D. grandis*; *D. proteolyticus*; *D. geothermalis*; *D. murrayi*)^[8],目前对于抗辐射菌的放射线抵抗性机理研究主要集中在 *D. radiodurans* 上。抗辐射菌超强的 DNA 切断损伤修复能力吸引人们去研究其潜在修复机制以及寻找与修复有关的特殊基因或酶^[9-10];虽早在 1999 年研究人员就已经完成了 *D. radiodurans* RI 基因组的全部测序工作^[11],但从全部基因组序列中不能解释其高效正确的损伤修复的原因。构建抗辐射菌属-大肠杆菌间的穿梭载体对于揭示抗辐射菌高效正确的 DNA 损伤修复机理、进行

DNA 损伤修复基因的克隆及表达等具有非常重要的意义。有关 *D. radiodurans*-*E. coli* 的穿梭载体, Meima & Lidstrom 等曾用来自 *D. radiodurans* Sark 株的质粒 pUE10 的复制子和大肠杆菌载体 pMTL23 等成功构建了 *D. radiodurans*-*E. coli* 的穿梭载体 pRAD1^[12],但该载体的宿主范围较小,不能在 *D. radiopugnance* 等其它抗辐射菌属细胞内自我复制及重组转化;此外,该载体在宿主菌中的存在需要依赖氯霉素选择性标记。所以迫切需要有一种取代 pRAD1 的新载体,以进行抗辐射菌的 DNA 损伤修复机理的研究。*D. radiopugnance* 存在大小约 2.45 kb 的质粒 pUE30^[13-14],本研究拟以该质粒为材料,通过与大肠杆菌载体 pUC19 复制起始区、质粒 pKatCAT 携带的在大肠杆菌中有活性的氨苄青霉素抗性基因等连接,进行抗辐射菌属-大肠杆菌间的穿梭载体的构建。

基金项目: 国家自然科学基金(30770650)浙江省自然科学基金(Y305224)浙江省“钱江人才计划”项目(2006R10001)教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(J20040269)浙江省教育厅基金项目(G20040392)

作者简介: 屠振力(1966-),男,浙江绍兴人,副教授,研究方向为生物机能工学及分子生物学。Tel: +86-571-86971367; Fax: +86-571-86971647; E-mail: tuzl@zju.edu.cn

收稿日期: 2008-09-26; 修回日期: 2009-02-09

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 本研究所用菌株与质粒见表 1。

1.1.2 培养基和培养条件 :抗辐射菌生长于 TGY

培养基中 ,在 160 ~ 200 r/min 下摇床发酵培养 ,最佳生长温度 30℃^[7] ,当细胞数量达到在 600 nm 处光吸收值(即 OD_{600})为 0.8 左右时停止培养。大肠杆菌 (*Escherichia coli*)JM109 生长在 LB 培养基中 ,培养温度为 37℃ ,当 OD_{600} 值为 0.6 左右时停止培养。

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>D. radiodurans</i> R1 ATCC 13939	Wild type strains	Store in this lab
<i>D. radiopugnance</i> ATCC 19172	Wild type strains	Store in this lab
<i>D. grandis</i> ATCC 43672	Wild type strains	Store in this lab
<i>E. coli</i> JM109	lacZ DM15	TaKaRa
Plasmids		
pKatCAT	Resource of chloromycetin resistant cassette ,Amp ^r and Cm ^r	Store in this lab
pGBM5	repA pSC101ori	Store in this lab

1.1.3 主要试剂 :AmpliTaq Gold DNA polymerase 购自 Applied Biosystems 公司 ;荧光素酶活性的测定试剂 (Bright-Glo Luciferase Assay Solution) ,荧光素酶基因的质粒 pSP-lux+ 购自 Promega 公司 ;DNA Marker、限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司 ;质粒提取

试剂盒 (QIAprep Miniprep Plasmid kit) 购自 Qiagen 公司 ; Pfu Turbo DNA polymerase 购自 Stratagene 公司。

1.1.4 引物 本研究所用的引物见表 2。

1.2 穿梭载体的构建

以 pUE30 为模板 ,以表 2 所示的 PpUE30 为引

表 2 本研究所用引物

Table 2 The primer used in this study

Primer	Sequences(5'→3')	Size/bp	Restriction site
PpUE30	Forward :CGCGCATGCATCTTCCTCTGAAACTGCGTT	2487	<i>Sph</i> I
	Reverse :GACGGGATGCACCTTTAGTGCTAATCTTGCG		
PgroESL	Forward :TTGTCAGCGT CGGTCACTTG ACAT	131	
	Reverse :TGGGTTCCTC CTGTGAGTGA		

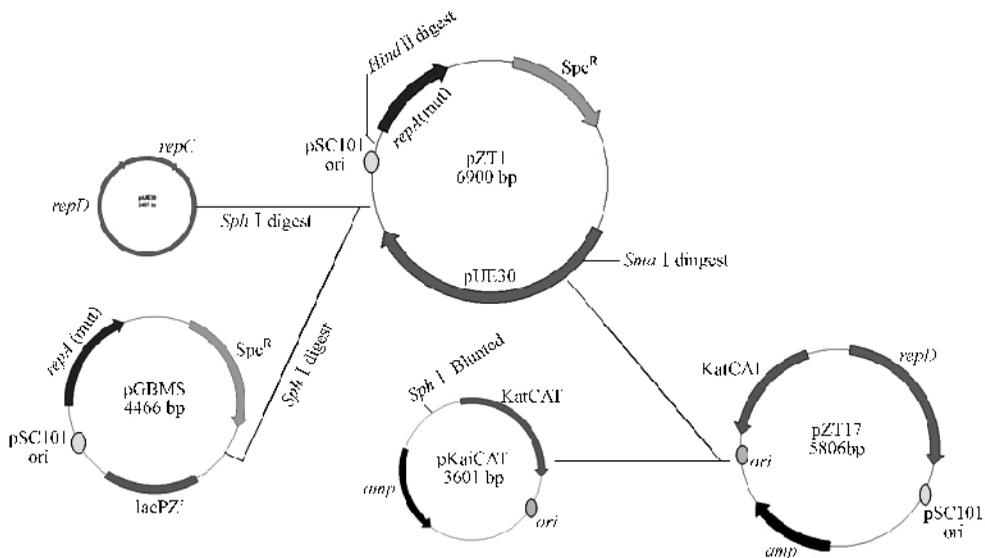


图 1 穿梭载体 pZT17 的构建示意图

Fig.1 Construction of shuttle vector pZT17.

物,用 AmpliTaq Gold DNA polymerase 进行 PCR 反应,得到两端设计有限制性内切酶 *Sph* I 的酶切位点、包含 pUE30 全碱基序列的 PCR 产物,用 *Sph* I 消化上述 PCR 产物,与同样用 *Sph* I 消化的质粒 pGBM5 连接得到的新质粒 pZT1;用 *Sma* I 和 *Hinc* II 双酶切 pZT1 后得到的包含 pSC101 ori 和 pUE30 的片段与用 *Sph* I 消化后平滑化的质粒 pKatCAT(该质粒包含有大肠杆菌载体 pUC19 复制起始区、大肠杆菌中有活性的氨苄青霉素抗性基因、抗辐射菌 *D. radiodurans* 中有活性的氯霉素抗性基因)连接,选择具有 pSC101 ori、pUE30 和 pKatCAT 连接的大小约 5.8 kb 的质粒,构建方法如图 1。

1.3 穿梭载体的稳定性检测

将携带穿梭载体 pZT17 的 *D. grandis* 在含有氯霉素的 TGY 培养基中培养 24 h,将上述培养液稀释后转接到不加氯霉素的 TGY 培养基中,30℃ 培养。经过 8 世代分裂后的培养液稀释再次转接到不加氯霉素的 TGY 培养基中 30℃ 培养。重复上述操作直到在非选择培养基中分裂 40 代为止。每分裂 8 世代后提取一部分培养液,稀释后分别涂布到添加和不添加氯霉素的 TGY 平板上,测定培养液中氯霉素抗性菌的比率,作为对照,用 Meima & Lidstrom^[12] 记

载的 *D. radiodurans*-*E. coli* 穿梭载体 pRAD1 导入 *D. grandis* 后得到的重组转化株中 pRAD1 的稳定性。

1.4 对穿梭载体 pZT17 的验证:荧光素酶基因的克隆与表达

以 *D. radiodurans* ATCC 13939 的基因组 DNA 为模板,以表 2 所示的 PgroESL 为引物,用 Pfu Turbo DNA polymerase 进行 PCR 反应,扩增染色体上的 groEL 启动子区域,同时用 *Nco* I 内切酶消化含有荧光素酶基因的质粒 pSP-lux+,用 T4 DNA polymerase 将得到的 DNA 片段末端进行补平。将上述 PCR 反应得到在 *D. radiodurans* 中具有活性的 131 bp 的 groEL 启动子片段与平滑化的 pSP-lux+ 连接,分别得到 groEL 启动子正向和反向插入的两种质粒,分别命名为 pGroE-lux+2 和 pGroE-lux+4(4235 bp),用 *Hind* III 和 *Eco* RV 消化上述质粒,得到含有 groEL 启动子和荧光素酶基因 lux+ 的 DNA 片段,将这个 DNA 片段插入图 1 中所得的穿梭载体 pZT17 的 *Eco* RV 部位,构建具有荧光素酶基因的穿梭载体,命名为 pZTGL2 及 pZTGL4(7618 bp)(图 2),用构建的质粒 pZTGL2 及 pZTGL4 质粒转化 *D. grandis*,筛选具有荧光素酶活性以及氯霉素抗性的菌株。

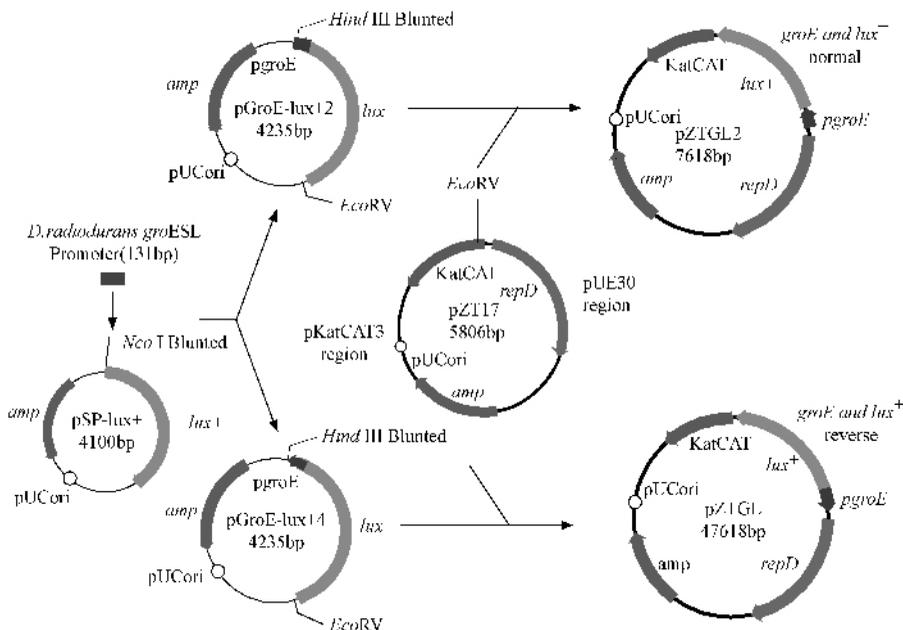


图 2 包含荧光素酶基因的穿梭载体 pZTGL2 及 pZTGL4 的构建方法

Fig. 2 Construction of shuttle expression vector pZTGL2 and pZTGL4 containing Luciferase gene.

1.5 荧光素酶活性的测定

将上述得到的重组转化子在 TGY 培养基中

30℃ 培养 24 h 后将培养液 10 μL 与等量的 Bright-Glo Luciferase Assay Solution 混合,1 分钟后用 Lumi

Imager F1 (Roche Molecular Biochemicals) 测定 1 分钟间的化学发光活性。

2 结果

2.1 穿梭载体的构建及鉴定

将 pUC19 复制起始区 pSC101 ori、pUE30 及质粒 pKatCAT (图 1) 的连接物转化大肠杆菌 JM109 株, 选择抗氨苄青霉素的转化株, 用质粒提取试剂盒提取质粒进行电泳分析, 选择具有 pUE30 和 pKatCAT 连接的、预期大小约为 5.8 kb 的质粒 (图 3-A), 该质粒用限制性内切酶 *Hinc* II 酶切后得到的片段大小为 4703、915 及 188 bp (图 3-B), 与预期的 DNA 片段大小一致, 表明已成功构建穿梭载体质粒, 将该质粒命名为 pZT17。

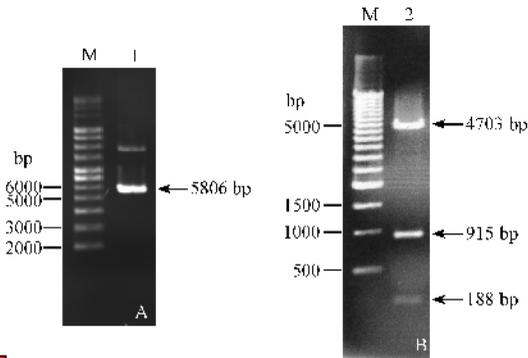


Fig.3 穿梭载体 pZT17 的电泳分析 (A) 及酶切鉴定 (B)

Fig.3 Electrophoresis analysis (A) and restriction identification (B) of the shuttle vector pZT17. M: DNA marker; 1: the shuttle vector pZT17; 2: Products after digestion with *Hinc* II.

2.2 穿梭载体的稳定性验证

为了验证构建的穿梭载体 pZT17 在没有抗生素的非选择培养基中的稳定性, 将上述构建得到的穿梭载体 pZT17 导入 *D. grandis*, 以 pRAD1 为对照, 调查了构建的质粒在没有抗生素的培养基和有抗生素的培养基中的生存率, 结果表明: pRAD1 在没有抗生素的非选择培养基中不能稳定存在, 生存率明显下降, 经 40 世代继代后的生存率仅为 10% 左右, 而 pZT17 在没有抗生素的非选择培养基条件下能够稳定存在, 经过 40 代培养后生存率仍保持在 100% 左右 (图 4)。

2.3 对穿梭载体 pZT17 的验证 (荧光素酶基因的克隆与表达)

携带 pZTGL2 或 pZTGL4 的 *D. grandis* 重组菌株培养后经荧光显微镜观察, 发现含有 *groEL* 启动

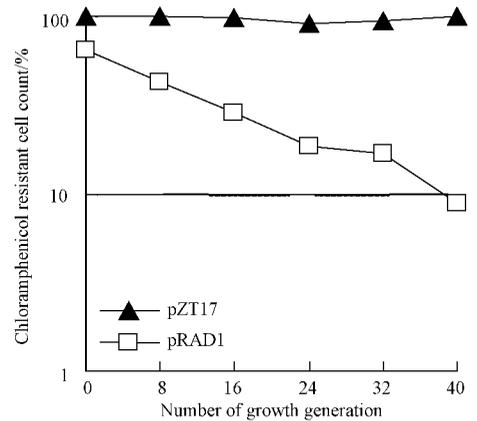


Fig.4 穿梭载体 pZT17 在抗辐射菌 *D. grandis* 中的稳定性

Fig.4 Stability of shuttle vector pZT17 in *D. grandis* strain.

子和荧光素酶基因顺向连接的质粒 pZTGL2 的重组转化子具有荧光素酶表达活性, 而含有 *groEL* 启动子和荧光素酶基因逆连接的 pZTGL4 的重组转化子没有荧光素酶表达活性 (图 5-A)。1 分钟间的化学发光活性的测定结果如图 5-B: 重组转化子 pZTGL2 的发光量为 1.2×10^5 / 分钟 / 10^6 个菌, 而重组转化子 pZTGL4 几乎测不到发光量。

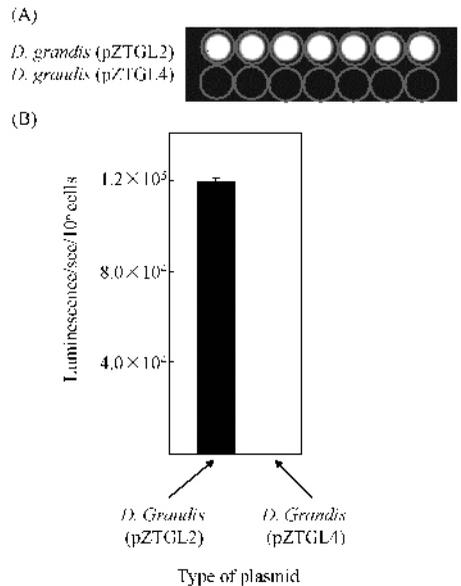


Fig.5 pZTGL2 及 pZTGL4 转化到 *D. grandis* 中的荧光素酶活性

Fig.5 Luciferase activity in *D. grandis* strain transformed with pZTGL2 and pZTGL4. A: Micrographs of *D. grandis* strain; B: Luciferase activity.

3 讨论

本研究利用抗辐射菌属中来自 *D. radiopugnans* 的大小约 2.45 kb 的质粒 pUE30^[13-14]

为基础,构建得到大小约为 5.8 kb 的抗辐射菌属—大肠杆菌间的穿梭载体 pZT17(图 1&3),该载体比已有的穿梭载体 pRAD1 小^[12],有利于基因重组转化及将外源基因导入到抗辐射菌属细菌中;并且该载体除了能够在 *D. grandis* 中进行自我复制及重组转化外,也能在 *D. radiopugnance* 等抗辐射菌细胞内进行自我复制及重组转化(结果省略),具有更加广泛的宿主范围。经稳定性测定表明,新构建的穿梭载体 pZT17 在没有抗生物质的非选择培养基条件下能够稳定存在,而 pRAD1 在不含氯霉素的非选择性培养基中不能稳定存在(图 4),这样可以减少实验过程中的抗生素污染。有关新构建的穿梭载体 pZT17 能在无抗生素的非选择培养基条件下稳定存在的原因目前还不清楚,有待于进一步的研究。本研究进一步用荧光素酶基因对构建的穿梭载体 pZT17 的适用性进行了验证(图 5)。能表达荧光素酶活性的重组质粒 pZTGL2 有望作为实时监控重组转化子投放野外以后的生存、分布及对环境的影响标记,对于监测利用抗辐射菌重组菌株从放射性污染的废弃物中除去难分解性物质和有毒物质等具有重要的意义。

致谢 本研究的部分内容在日本原子能研究开发机构高崎研究所内进行。感谢同研究机构鸣海一成博士所给予的帮助及指导。

参考文献

- [1] Adnerson AW ,Nordan HC ,Cain RF ,et al. Studies on a radio-resistant micrococcus. i. isolation , morphology , cultural characteristics ,and resistance to gamma radiation. *Food Technology* ,1956 ,10 :575 – 578.
- [2] Battista JR. Against all odds :the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. *Annual Review of Microbiology* , 1997 51 :203 – 224.
- [3] Dean CJ ,Feldschreiber P ,Lett J. Repair of X-ray damage to the deoxyribonucleic acid in *Micrococcus radiodurans*. *Nature* ,1966 209 :49 – 52.
- [4] Grimsley JK ,Masters CI ,Clark EP ,et al. Analysis by

- pulsed-field gel electrophoresis of DNA double-strand breakage and repair in *Deinococcus radiodurans* and a radiosensitive mutant. *International Journal of Radiation Biology* ,1991 60 :613 – 626.
- [5] 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.
- [6] Lin J ,Qi R ,Aston C ,et al. Whole genome shotgun optical mapping of *Deinococcus radiodurans*. *Science* ,1999 ,285 : 1558 – 1562.
- [7] Moseley BEB. Photobiology and radiobiology of *Micrococcus* (*Deinococcus*) *radiodurans*. *Photochemical and Photobiological Reviews* ,1983 7 :223 – 274.
- [8] Ferreira AC ,Nobre MF ,Rainey FA ,et al. *Deinococcus geothermalis* sp. nov. and *Deinococcus murrayi* sp. nov. , two extremely radiation-resistant and slightly thermophilic species from hot springs. *International Journal of Systematic Bacteriology* ,1997 47 :939 – 947.
- [9] Brim H ,McFarlan SC ,Fredrickson Jk ,et al. Engrineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments. *Nature Biotechnology* 2000 ,18 : 85 – 90.
- [10] Wood RD ,Mitchell M ,Sgouros J ,et al. Human DNA repair genes. *Science* 2001 291 :1384 – 1289.
- [11] White O ,Eisen J A ,Heidelberg JF ,et al. Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* ,1999 286(19):1571 – 1577.
- [12] Meima R ,Lidstrom ME ,Characterization of the minimal replicon of a cryptic *Deinococcus radiodurans* SARK plasmid and development of versatile *Escherichia coli-D radiodurans* shuttle vectors. *Applied and Environmental Microbiology* , 2000 66 :3856 – 3867.
- [13] Mackay MW ,Al-Bakri GH ,Mosely BEB. The plasmids of *Deinococcus* spp. and the cloning and restriction mapping of the *D. radiophilus* plasmid pUE1. *Archivers of Microbiology* ,1985 ,141 :91 – 94.
- [14] 屠振力 ,吕霄 ,姚邦 ,等. 抗辐射菌 *Deinococcus radiopugnance* 的质粒 pUE30 的克隆及序列分析. 激光生物学报(*ACTA Laser Biology Sinica*) ,2008 ,17(3) :311 – 316.

Construction of *Deinococcal bacteria-Escherchia coli* shuttle vector and expression of Luciferase gene

Zhenli Tu* ,Rujie Zhong ,Jiagang Wang

(College of Animal Sciences ,Zhejiang University ,Hangzhou 310029 ,China)

Abstract [Objective] To express Luciferase gene in *Escherchia coli* through developed *Deinococcal bacteria-E. coli* shuttle expression vector. **[Methods]** The *D. bacteria-E. coli* shuttle expression vector pZT17 was constructed based on plasmids of pUE30 ,pGBM5 and pKatCAT. Then pZT17 with *lux +* from *Photinus pyralis* was used to transform into *D. grandis* and *E. coli*. The recombinant strains were induced separately. **[Results]** Based on a small cryptic plasmid from *Deinococcus radiopugnans* a shuttle vector between *Escherichia coli* and *Deinococcal bacteria* was constructed. The plasmid vector could stably aintained in *Deinococcus grandis* under non-selective conditions. Moreover it is showed that a luciferase gene was highly expressed both observed in *D. grandis* and *E. coli*. **[Conclusions]** The *D. bacteria-E. coli* shuttle vector was constructed successfully,the developed shuttle vector makes it possible to induce expression of DNA damage and repair gene from *Deinococcus* species.

Keywords : *Deinococcal bacteria* ; *Escherichia coli* ; shuttle vector ; *lux +* ; expression vector

(本文责编 :王晋芳)

Supported by the National Science Foundation of China (30770650) ,the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Y305224) ,the " Qiangjiang Talent Plan " Project of Zhejiang Province (2006R10001) ,the Project Sponsored by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars , State education Ministry (J20040269) and the Scientific Research Fund of Zhejiang Provincial Education Department (G20040392)

* Corresponding authors. Tel : + 86-571-86971367 ; Fax : + 86-571-86971647 ; E-mail : tuzl@zju.edu.cn

Received 26 September 2008/ Revised 9 February 2009

《微生物学报》答作者问——关于审稿

问 我想知道我的稿件的处理状态 ,如何查询 ?

答 您可以登录主页 journals.im.ac.cn/actamicrocn ,在“ 作者稿件查询 ”处 输入您的用户名、密码 ,即可查询到稿件状态 ,如有问题 ,您也可以通 e-mail 询问 ,请注意务必要提示稿件编号 ,编辑部在收到您的来信会及时给予回复。

问 我想尽早得到审稿结果 ,或者提前发表 ,有没有好的办法能使审稿老师快点。比如我们增加审稿费等方法 ?

答 在给作者发送的“ 受理通知 ”中 ,我们已经告知了本刊处理稿件的程序和大致时间进度。

- (1) 在作者向我刊投稿之前 ,应详细了解我刊的规定。审稿人评审一篇文章 ,并给出谨慎的评审意见是需要一定时间的。所以 ,作者在投稿之前应该留出足够多的时间给编辑部 ,以便于进行评审。我们的承诺是在 2 个月之内给予答复 ,5~7 个月之内刊出。
- (2) 如要求提前发表 ,请在投稿的同时提出书面报告 ,说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性 ,经过我刊编委会讨论并通过后 ,可予提前刊出 ,无需另加任何费用。

问 我的文章现已审查完毕 ,并收到了编辑部发来的“ 审稿意见 ”。我想咨询 ,如果文章修改后 ,再次投递 ,是否还需要交稿件受理费 ? 是否仍然用原论文编号提交 ?

答 这要分两种情况 ,

- (1) 如果你的文章已经被通知“ 退稿 ”了 ,那么修改之后再投来的文章将按“ 新稿件 ”处理 ,从程序上来讲和新投稿件是一样的 ,仍需要缴纳稿件受理费。但是为便于稿件审理 ,请作者投稿时在文题的后面加上“ 原稿件号 + 修后再投 ”字样。
- (2) 如果是编辑部在审稿意见中要求您修改后再提交本刊“ 复审 ” ,则不作为新稿处理 ,请作者直接将修改稿上传到远程系统中 ,不再另交稿件受理费。