

抗辐射菌 *lexA* 基因的克隆及 在大肠杆菌中表达 *

王明锁 杜泽吉 孔向蓉 苏燎原
(苏州医学院放射医学系 苏州 215007)

摘要 研究了旨在克隆抗辐射菌 *Deinococcus radiodurans* 的 *lexA* 基因并构建其表达载体, 以便进一步研究 *lexA* 基因的功能及其在辐射抗性中的作用。主要的实验步骤包括分离提取抗辐射菌基因组 DNA, 分离出 *lexA* 基因并测定其序列, 克隆于质粒载体 PUC19, 用电击穿孔法将重组的质粒导入大肠杆菌 JM109, SDS-PAGE 检测基因的表达。用定点突变技术, 改变 *lexA* 基因核糖体结合位点 (RBS), 以增强 *lexA* 基因的表达。结果表明, *lexA* 基因位于基因组 DNA 的 *BlnI-AscI* 片断中, 由 630 个碱基对 (bp) 组成, 编码 210 个氨基酸 (aa), 理论上推定, 分子量为 22.5kD, 等电点为 6.4。用 pUC19 构建的 *lexA* 基因表达载体能在大肠杆菌 JM109 中表达, 但表达效率低, 改变 *lexA* 的核糖体结合位点 RBS 可提高该基因表达水平, 使进一步分离纯化 *lexA* 蛋白质以及深入研究该基因的作用成为可能。

关键词 抗辐射菌, *lexA* 基因, 基因克隆, 基因表达

中图分类号 R811.5, Q691.9

抗辐射菌 *Deinococcus radiodurans* 是一种对辐射及其他 DNA 损伤剂都具有极强抗性的微生物, 是在 1956 年由 Anderson 等^[1] 从辐射灭菌的肉类罐头中分离出来的。研究表明, 这种独特抗性归因于其具有高效而准确的 DNA 修复系统^[2]。目前已知道该菌具有切除修复和重组修复功能^[2], 相关基因已被克隆。至于 SOS 修复机制在抗辐射菌的辐射抗性中的作用, 目前尚未见报道。本研究的目的, 在于分离并克隆 SOS 修复调节基因 *lexA*, 并使之能很好地表达蛋白产物, 为进一步研究 *lexA* 基因在抗辐射菌的辐射抗性中的作用提供了基础。

1 材料和方法

1.1 细菌株及生长条件

Deinococcus radiodurans 为野生型的 KD8301(日本原子力研究所生物技术研究室馈赠), 大肠杆菌 (*E.coli*) 为 JM109。抗辐射菌 KD8301 生长在 TGY [5g/L 胰蛋白胨 (Difco), 1g/L 葡萄糖, 3g/L 酵母提取物 (Difco)] 培养液中, 以 160 次 /min 摇动培养, 最合适的培养温度为 30°C^[3]。JM109 生长在 LB-M(10g/L 胰蛋白胨, 5g/L 酵母提取物, 10g/L NaCl) 培养液中, 最佳培养温度为 37°C。

* 卫生部优秀青年科技人才专项科研基金 (1999 年度批准)

收稿日期: 初稿 1999-12-15, 修回 2000-03-13

1.2 抗辐射菌 KD8301 基因组 DNA 的制备

收获培养 24h 的 KD8301, 分别用 NE(0.15mol/L NaCl, 0.1mol/L EDTA, pH8.0) 和经丁烷饱和的 NE 洗涤一次。再悬浮于 NE 中, 加入终浓度为 10g/L 的溶菌酶 (Sigma), 37°C 温浴 1h。按文献 [4] 的方法分离和纯化基因组 DNA。

1.3 SuperCos 基因文库的构建

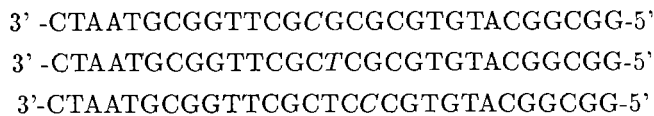
以限制性内切酶 *Mbo I* (Takara) 部分消化 KD8301 的基因组 DNA, 用 SuperCos I 质粒载体试剂盒 (Stratagene) 和体外包装试剂盒 (In vitro packaging kit) LAMBDA INN (Nippon Gene), 按说明书构建基因文库, 转染体接种于 LB-L 琼脂培养基上, 得到 534 个单一菌落, 分别扩增后, 用 1:10 的甘油保存, -80°C 存放备用。

1.4 基因转导和 DNA 序列测定

用 Gene Pulser (Bio-Red) 电击穿孔法进行 *lexA* 基因转导 (详见 2.2 中所述), 条件为 1.8kV, 25 μ F, 200 Ω 。DNA 序列测定采用荧光标记链终止循环测定法 (ABI PRISM Dye Terminator cycle Sequencing), 测序仪为 ABI 373A (Perkin-Elmer)。

1.5 定点突变技术

采用 Site-Directed Mutagenesis 试剂盒 (ClonTech), 详细步骤参见产品说明书。含突变的引物可根据突变靶点的不同进行设计。要改变 3 个碱基, 需进行 3 次定点突变, 3 个突变引物序列分别为 (斜黑体为置换的碱基):



引物用 DNA 合成仪 (Beckman) 合成。PCR 仪为 PJ2000 (Perkin-Elmer)。

2 结 果

2.1 抗辐射菌 KD8301/*lexA* 基因的分离和测序

通过转导试验对所构建的基因文库进行分别筛选, 最终通过序列测定, 确定 *lexA* 基因定位于 *Bln I* 和 *Asc I* 两个酶切位点之间 (*Bln I-Asc I*), 该 DNA 片断由 1041 bp 组成。序列测定结果见图 1。该序列中有一个 630 bp 的可读序列 (Open Reading Frame, ORF, 从第 249 位到第 878 位), 编码 210 个 aa (图 1 中以单个的大写字母表示), 理论上推测其分子量为 22.5kD, 等电点为 6.4。通过与已知的 *lexA* 基因序列相比较 [5], 发现其具有极高的同源性, 从而确定该 ORF 即是抗辐射菌的 *lexA* 基因的编码序列。

2.2 *lexA* 基因的克隆及在 JM109 中的表达

将 *Bln I-Asc I* 片断用 *BssH II* 和 *Hind III* (Takara, 作用位点分别见图 1 中上画线部位和下画线部位) 酶切, 得到含 *lexA* 基因的 DNA 片断, 在 T4 DNA 聚合酶的作用下, 进行末端补平后, 再使之与 pUC19/*Sma I* 连接, 所构建的重组质粒命名为 pZA171。通过电击穿孔法, 将该表达载体转入感受态的 JM109, 在含有 0.1mmol 的基因表达诱导剂 IPTG (异丙基- β -D- 硫代半乳糖苷) 的 LB-M 培养基中培养 24h 后, 离心收获 JM109, 经超声破碎后, 进行 SDS-PAGE 电泳检测 *lexA* 基因的表达, 结果见图 2(A-E)。从图 2 可见, *lexA* 基因在 IPTG 的诱导下能在 JM109 中表达, 即在第 E 列的 25.4kD 处可看到一条淡的蛋白带, 经 aa 序列分

析,测得的 N'-末端 aa 序列: N'-MPPELTPTRRSILQATLR-,与已知 *lexA* 蛋白的 aa 序列完全一致。证实了该蛋白质就是 *Deinococcus radiodurans* 的 *lexA* 的表达产物。但表达水平低,很难对该蛋白进行分离纯化。

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120
CCTAGGCGAGCGCTACGCCCTTCATCGCCAGTTATCCGGGCGCCGAGGAGGACTTTCTGTGGTCCCTCTCCGAACTCACGGAAAGCTGCGGCCACCCAGTTGTCTCAGTCAGGGACGACGG
130     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240
TCAGCCCTATTCTTTCCGTTCAAACCTCTGACCTCCCGTTTCTGAACGGTGGCTCTCTGTAGGCCAAATTCGACGGTTGGGCCGCCCTTGACCCCTGACAAGCGCTGGCGCAAAC
250     260     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360
GGCGCACATGCGCGCTGAAGTGAAGCCCAACCGCGCTCCATCTGCAAGCCACCCCTGGCTCTGGGCGCGGGGCCACGGCGGGCAGGTGGCGCAGGAAGTGGGCATCACCAAGCAGG
M P P E L T P T R R S I L Q A T L R L G A G A T A G Q V A Q E V G I T K Q A
370     380     390     400     410     420     430     440     450     460     470     480
CAATCAGCCAGGAGTGAACATCTGCGCAAGCTCGGTACTCTCAGCCGCCGAAACGGCTACGGCCCGTTGACGGTACGGACCGGGCGGGCGGGCTGGCGCAAGGGCTGCCGA
I S Q Q V M I L R K L G Y L Q P A E T R Y G P L Q V T D R A R A A L G E G L P I
490     500     510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
TCTACGGCCAGATCGCCGCGCATCCCGCCCTTCCGACGAGTCCGCCGAGGACTTACCCCAAGCATCGAGGCGCTGCTCGGCCGAAAGCGGGCGATTTCTTCTGGGGTGGCGG
Y G Q I A A G I P A L A E Q S P E D F T P S I E A L L G L K A G D F L L R V R G
610     620     630     640     650     660     670     680     690     700     710     720
CGGAAGCATGACCGGATCGCGGTGATGACGGCGACTACTGGTGGTGGCCGCGCCGAGGTCCACGACGGCGAGGTGGCGGTGCTCTGCTGCCCGCAATGCGGGACCC
E S M T G I G V M D G D Y V Y V R P A P E V H D G E V A V Y L V P G D N A A T L
730     740     750     760     770     780     790     800     810     820     830     840
TCAGCGGCTGTACCACTTGGCCAGGACATCTCTGACGAGCGAGAACCAGCCGCTGCGCCCTCTTTCCCGCCAGCAGGTGCAGGTGCAGGGCGGAATGTTGGGGCGCTCG
K R L Y H F G Q D I L L T S E N P A M P R L S F P A E Q V Q V Q G R M V G R V G
850     860     870     880     890     900     910     920     930     940     950     960
GGTCCGGGCGCCGCGCTGAGCCACCGCTGACCGAGTAGAAGCTCGACTGTCCCGCACGGCTCGGGCAGGTGTCATTGTCCGGGAATGTCGGCAACAACAGGAGCGGCCACAGAGCG
Y G A P R V S H R V T E
970     980     990     1000    1010    1020    1030    1040    1050
AGTATCTTCAGGCTTACCCGGCACTCATACCCCTTCCCGCGCCGGGGAGTCTAGTCCCGGGTGTTCCTGGGCGGCC

```

Fig.1 The nucleotide sequences of *Bln* *I*-*Asc* *I* fragment from the genomic DNA of *Deinococcus radiodurans*

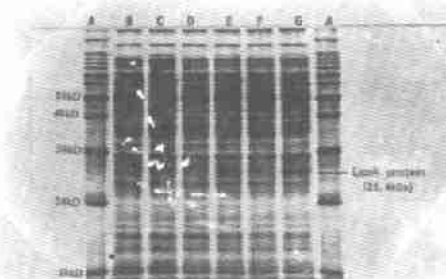


Fig.2 The expression of *lexA* gene different recombinants of JM109 A,10kD protein marker, B, JM109(pUC19); C,B+ IPTG; D, JM109(pZA171); E,D+IPTG; F, JM109(pZA172); G, F+IPTG

2.3 核糖体结合位点 (RBS) 对基因表达的影响

在重组质粒 pZA171 中, *lexA* 基因上游的 RBS 为 -TCGC-, 对于原核生物而言, 理想的 RBS 序列应为 -GAGG-, -GGAG- 或 -AGGA-, 所以需要进行人工的定点突变, 使 RBS 由 -TCGC- 变为 -GAGG- (见图 3), 所形成的新的重组质粒命名为 pZA172. 用同样的方法将其转导于 JM109 中. *lexA* 在 pZA171 和 pZA172 中的表达水平见图 2(D-G). 结合 aa 序列测定结果, 证明了调整 RBS 后的 *lexA* 基因能在 JM109 中较充分地表达, 为分离和纯化 *lexA* 蛋白质提供了方便。

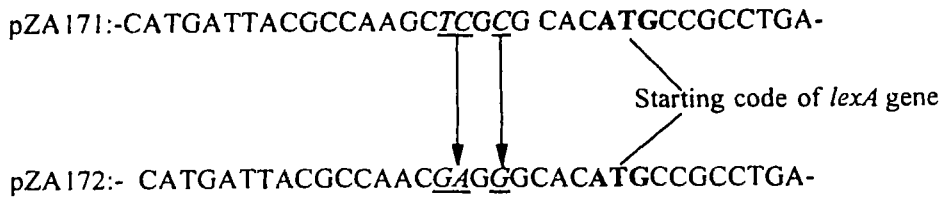


Fig.3 Optimization of RBS at the upstream of *lexA* gene

3 讨论

自抗辐射菌 *Deinococcus radiodurans* 发现以来的几十年间, 国外已做了大量的研究工作。在 80 年代以前, 研究的热点是该菌的生长特性和形态特征, 从细胞水平探讨其抗性的机理。随着分子生物学的发展, 从基因水平阐明其抗性的机制正成为近几年研究的热点^[6~8]。

一般认为, 该菌对辐射及其他 DNA 损伤剂的抗性是由其高效和准确的 DNA 修复系统所决定的^[3]。研究表明, *Deinococcus radiodurans* 能够无误地修复每条染色体上的 100 多个 DNA 双链断裂 (DSB), 而一般细菌只能修复几个 DSB^[9]。如此高效的 DNA 修复, 是靠切除修复和重组修复两种方式来完成的, 与之相关的基因, 目前仅有 4 种 (*uvrA*、*polA*、*recA*、*pprA*) 已被克隆, 其中 *pprA* (Pleiotropic Gene A Promoting DNA Repair) 是我们最近发现的一种多功能的促进 DNA 修复的新基因 (DDBJ/EMBL/GenBank 注册号为 AB001601)^[1]。至于抗辐射菌 *Deinococcus radiodurans* 是否具有 SOS 易错修复 (error-prone repair) 尚存有争论。

SOS 修复是 Radman^[10] 于 1973 年首次提出的 DNA 修复的一种方式, 而 *lexA* 基因是 SOS 修复的重要调节基因^[11]。正常情况下 *lexA* 基因、*recA* 基因和其他可诱导基因都被 *lexA* 阻遏蛋白抑制, 只能生成少量的蛋白产物。当 DNA 发生损伤 *recA* 基因时, 形成一个信号, *RecA* 蛋白被激活, 水解 *lexA* 阻遏蛋白, 其他有关基因同时解除了抑制。这些基因转译出各自编码的蛋白, 参与修复活动。近年来, 已发现 SOS 反应诱导的基因约有 30 个^[12]。这些基因有一个共同的调节部位叫做 SOS 盒, 带有一段 CTG-N₁₀-CAG 序列, 这是 *lexA* 阻遏蛋白的结合部位。因此对 *lexA* 基因结构和功能的研究是判定 SOS 易错修复在抗辐射菌 *Deinococcus radiodurans* 中的重要的作用的重要基础。

参 考 文 献

- 1 Anderson A W, Krabbenhaft K L, Elliker P R. Food Technol, 1956, 10:575-758
- 2 Mintonn K W. Mol Microbiol, 1994, 13:9-15
- 3 Moseley B E B. Photochem Photobiol Rev, 1983, 7:223-274
- 4 Saito H, Miura K. Biochem Biophys Acta, 1963, 72:619-629
- 5 Pearson W R, Lipman D J. Proc Natl Acad USA, 1998, 85:2444-2448
- 6 Du Z J, Takahashi Y, Narumi I. Acta Academiae Medicinac Suzhou (in Chinese), 1998, 18:1131-1133
- 7 Du Z J, Tian H L, Narumi I et al. J Radiat Res Radiat Proces (in Chinese), 1998, 16:218-224

- 8 Du Z J, Narumil, Watanabe *et al.* J Radiat Res Radiat Proces (in Chinese), ,1999, 17:91-96
- 9 Minton K W. Mutat Res, 1996, 363:1-7
- 10 Radman M. Molecular and Environmental Aspects of Mutagenesis. USA: Thomas Spring Field Press, 1974, 128-130
- 11 Xia S X. Radiobiology. Beijing: Military Medical Sciences Press, 1998, 117-118
- 12 Sancar A. Annu Rev Biochem, 1996, 65:68-73

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF *lexA* GENE FROM THE RADIORESISTANT BACTERIUM *Deinococcus radiodurans*

WANG Mingsuo DU Zeji KONG Xiangrong SU Liaoyuan

(*Institute of Radiation Medicine, Suzhou Medical College, Suzhou 215007*)

ABSTRACT In order to investigate the role of *lexA* gene in the radioresistance of *Deinococcus radiodurans*, the expressing vector of *lexA* gene was constructed. The genomic DNA was extracted from wild type *Deinococcus radiodurans* KD8301. The *lexA* gene was isolated from the genomic DNA and sequenced. The Plasmid vector pUC19 was used to clone *lexA* gene and the electroporation was employed to transfer the recombinant plasmid into *E. coli* JM109. SDS-PAGE was used to check the expression of *lexA* gene. The ribosome binding site (RBS) of *lexA* gene was mutated by means of Site -Directed Mutagenesis technique for the optimum of gene expression. The results indicated that the *lexA* gene was located in the *BlnI-AscI* fragment of *Deinococcus radiodurans* genomic DNA, containing 630bp and coding 210 aa. The theoretically deduced molecular weight and the isoelectric point were 2.5KDa and 6.4 respectively. *lexA* gene inserted into pUC19 could be expressed in JM109, but at very low level. After optimizing the RBS of *lexA* gene, higher level of *lexA* expression was observed. The results make it possible to isolate and purify *lexA* protein, and further to investigate the function of *lexA* gene in *Deinococcus radiodurans*.

KEYWORDS *Deinococcus radiodurans*, *LexA* gene, Gene cloning, Gene expression

CLC R 811.5, Q 691.9

Supported by the Special Research Fundation of Hygiene Ministry for Excellent Young Scientists and granted in the year 1999