

耐辐射奇球菌 *pprM* DNA 结合域功能分析预测与 基因敲除重组体的构建

杨杰¹ 苏泽红² 李斌元² 马云² 肖潇¹ 范美婷¹
李伟² 王秋岩² 何淑雅^{1,2}

¹ (南华大学公共卫生学院 衡阳 421001)

² (南华大学生物化学与分子生物学教研室 衡阳 421001)

摘要 通过生物信息学分析发现, *pprM* 基因含有冷休克 DNA 结合域。利用 Overlap PCR 方法获得 *pprM* 基因 DNA 结合域缺失的基因片段 *pprM*ΔCSD 后, 酶切扩增的片段和自杀质粒空载体 pk18mobsacB, 并将目的基因片段与自杀质粒载体连接构建重组载体 pk18mobsacB-*pprM*ΔCSD, 将重组子转化大肠杆菌 JM109 感受态, 筛选出阳性克隆, 酶切及测序鉴定。成功构建 *pprM* DNA 结合域基因敲除重组体, 且生物信息学分析预测结果显示 *pprM* DNA 结合域与耐辐射奇球菌抗辐射功能相关。

关键词 耐辐射奇球菌, *pprM* 基因, 重叠延伸 PCR, 电离辐射

中图分类号 Q78, TL71

耐辐射奇球菌 (*Deinococcus radiodurans*, DR) 已被公认为是迄今为止地球上发现的辐射抗性最强的生物之一, 因其对电离辐射、紫外线、干燥及一些 DNA 氧化损伤剂的超强抗性, 一直倍受生物学以及核医学界的重视^[1-3]。该细菌具有强大的 DNA 修复能力, 能够在十几小时内准确无误地修复由辐射引起的成百上千个致死性的 DNA 双链断裂碎片而不发生任何突变^[4]。

目前已发现耐辐射奇球菌的辐射损伤修复途径有多条^[5], 其中 PprI 被认为是激活这些辐射损伤修复途径的总开关。受 PprI 激活转录的辐射损伤修复相关的基因 (或其产物), 如 *recA*、*recF* 和 *pprA* 等对耐辐射奇球菌的辐射损伤修复起到重要作用^[6]。

PprM 蛋白是在研究 *pprI* 基因缺失株与野生株差异时发现的一种耐辐射奇球菌特有的调控蛋白, *pprM* 基因编码的蛋白是属于冷休克蛋白 A 家族的一种同源蛋白。且发现 *pprM* 基因敲除株显示出对 γ 辐射的敏感性明显增加^[7]。这表明 *pprM* 在耐辐射奇球菌抗辐射能力中发挥重要功能。但是 *pprM* 发挥功能的机制未知。

本实验室通过生物信息学分析 PprM 蛋白的结构域发现其含有 Cold-Shock DNA-binding domain

(冷休克 DNA 结合域), 故推测该结构域可能与 PprM 蛋白发挥其 DNA 结合蛋白的功能结合于其他 DNA 损伤修复蛋白的启动子区域调控其表达有关。

本研究根据耐辐射奇球菌 R1 的基因组序列设计引物, 通过 overlap PCR 的方法扩增中间缺失约 189 bp 序列的 *pprM* 基因, 与载体 pk18mobsacB^[8] 连接后构建重组载体 pk18mobsacB-*pprM*ΔCSD, 将重组子转化 JM109, 筛选阳性克隆进行双酶切及测序鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

耐辐射奇球菌 R1 为本实验室保存, 30 °C 于 TGY 培养基 (蛋白胨 5 g·L⁻¹, 酵母提取物 3 g·L⁻¹, 葡萄糖 1 g·L⁻¹, pH 7.0) 或营养肉汁琼脂培养基 (蛋白胨 10 g·L⁻¹, 牛肉提取物 3 g·L⁻¹, NaCl 5 g·L⁻¹, 琼脂 15 g·L⁻¹, pH 7.0) 中培养。

大肠杆菌 JM109 由本实验室保存, 37 °C 培养于 LB 培养基 (蛋白胨 1%, 酵母提取物 0.5%, NaCl 1%, pH 7.0) 或者含 1.5% 琼脂的 LB 固体培养基。自杀质粒 pK18mobsacB 为本实验室保存。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81272993) 资助

第一作者: 杨杰, 男, 1987 年 10 月出生, 2011 年毕业于衡水学院生物技术专业, 现为南华大学环境化学与辐射分子毒理方向硕士研究生; 并列第一作者: 苏泽红

通讯作者: 何淑雅, 博士, 教授, E-mail: skyhe2000@hotmail.com

收稿日期: 初稿 2013-08-28, 修回 2013-10-12

1.2 方法

1.2.1 *pprM* 基因 DNA 结合域的生物信息学分析

利用 SSDB 在线软件预测 *pprM* 基因片段的功能结构域, 对 *PprM* 蛋白分子模型使用 SWISS-MODEL 在线工具进行分析^[9-10]。

1.2.2 耐辐射奇球菌基因组的提取 从-85℃低温冰箱中取冻存的耐辐射奇球菌液接种于 5 mL TGY 液体培养基中, 于 30℃、220 r·min⁻¹ 摇床振荡培养 48 h, 利用 CTAB/NaCl 法提取 DR 基因组 DNA, -20℃保存。

1.2.3 *pprM* 冷休克 DNA 结合域基因敲除引物的设计 为了获得 *pprM* 冷休克结构域缺失的 DNA 片段, 根据 NCBI 上已经公布的 *pprM* 基因及其上下游序列设计重叠延伸 PCR 引物, 其中 *pprM*-1R、*pprM*-2F 有 15 bp 的互补序列(下划线标出), *pprM*-1F 有 EcoR I 酶切位点, *pprM*-2R 有 BamH I 酶切位点(下划线标出)。

pprM-1F:

F-EcoR I-5' CTTGAATTCCGAGAACCTGCGCTAC 3'

pprM-1R:

R-5' GCTGCCTTGGTCACCCATCTCAAATCTCC 3'

pprM-2F:

F-5' GGAGATTTGAGATGGGGTGACCAAGGCAGC 3'

pprM-2R:

R-BamHI-5' TGAGGATCCGCGCCGAGTACACTT 3'

1.2.4 *pprM* 基因 DNA 结合域 5'端及 3'端片段的扩增 PCR 扩增 *pprM* 基因冷休克 DNA 结合域 5'端(或 3'端)片段的反应体系为 20 μL: 其中 DR1 基因组 2 μL, 引物 *pprM*-1F、*pprM*-1R 各 1 μL, pfu Master Mix 10 μL, ddH₂O 6 μL, 混合后进行 PCR 扩增。PCR 反应程序: 98℃预变性 5 min; 98℃变性 1 min, 59℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72℃延伸 5 min。

1.2.5 *pprM*ΔCSD 基因片段的扩增 以 *pprM* 基因 DNA 结合域 5'端片段及 3'端片段为模板通过 overlap

PCR 获得 *pprM* 基因内缺失 DNA 结合域的 DNA 片段 ΔCSD。PCR 扩增 *pprM*ΔCSD 片段的反应体系为 50 μL: *pprM*-1F 2.5 μL, *pprM*-2R 2.5 μL, *pprM* 冷休克 DNA 结合域 5'端片段及 3'端片段各 10 μL, Pfu Master Mix 25 μL, 混合后进行 PCR 扩增。PCR 反应程序: 98℃预变性 5 min; 98℃变性 20 s, 61℃退火 1 min, 35 个循环; 72℃最后延伸 10 min。

1.2.6 重组载体 pk18mobsacB-*pprM*ΔCSD 的构建 将 *pprM*ΔCSD 片段与敲除载体 pk18mobsacB 同时用限制性内切酶 EcoR I、BamH I 进行双酶切, 双酶切体系为 20 μL 体系: *pprM*ΔCSD 或载体溶液 7 μL, EcoR I 1 μL, BamH I 1 μL, 10×buffer R 2 μL, ddH₂O 10 μL。酶切 3 h 后切胶回收, 并用 T4 连接酶连接两回收产物, 连接体系为 10 μL 体系: pk18mobsacB 1 μL, *pprM*ΔCSD 3 μL, T4 DNA ligase 1 μL, 2×T4 DNA ligase buffer 5 μL, 16℃连接过夜。连接体系转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞后涂布于含卡那霉素终浓度为 30 μg·mL⁻¹ 的 LB 平板上, 置于 37℃生化恒温培养箱中倒置培养过夜。挑单菌落接种至含终浓度为 30 μg·mL⁻¹ 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37℃, 220 r·min⁻¹ 培养 12 h, 提质粒进行酶切鉴定。

2 结果

2.1 *PprM* 蛋白的结构域分析及分子模型

PprM 蛋白在 50 到 113 氨基酸位置存在一个冷休克 DNA 结合域(表 1), 该结构域是否有可能在 *PprM* 参与的耐辐射球菌的 DNA 损伤修复中发挥作用, 可以通过敲除 *pprM* 基因中该 DNA 结合域的方法来鉴定。SSDB 在线软件分析 *pprM* 基因的冷休克 DNA 结合域结果显示(图 1), 运用 SWISS-MODEL 在线工具预测 *PprM* 蛋白的整个分子模型(图 2a), 然后分别分析 *PprM* 蛋白 CSD DNA 结合域(图 2b)以及 OB RNB RNA 结合域(图 2c)的分子模型, 主要是由螺旋和片层结构组成。

表 1 *pprM* 基因 SSDB 结构域搜索结果
Table 1 SSDB motif search results of *pprM* gene

结构域 ID	Motif ID	范围 Range	定义 Definition	可信度 E value
pf:CSD		50-113	冷休克 DNA 结合域 'Cold-shock' DNA-binding domain	4.6×10 ⁻²⁶
pf:OB_RNB		50-110	核糖核酸酶 B OB RNA 结合域 Ribonuclease B OB RNA-binding domain	0.0027

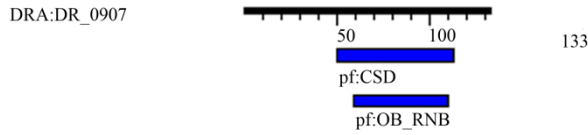


图 1 *pprM* 基因的功能结构域
Fig.1 Function domain of *pprM* gene

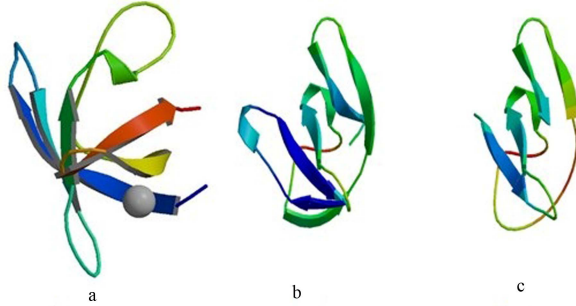


图 2 PprM(a)、PprM 冷休克 DNA 结合域(b)及 RNA 结合域(c)三维空间结构预测结果

Fig.2 Predicting results of three-dimensional structure of PprM (a), PprM 'Cold-shock' DNA-binding domain (b) and Ribonuclease B OB RNA-binding domain (c)

2.2 *pprM* 基因 DNA 结合域 5'端及 3'端片段的扩增及 *pprM*ΔCSD 片段的扩增制备

以耐辐射奇球菌基因组 DNA 为模板，通过普通 PCR 方法获得 *pprM* 基因 DNA 结合域 3'端片段约 595 bp 片段及 5'端约 733 bp 片段(图 3a)，以 PCR 产物为模板通过 overlap PCR 的方法获得 *pprM* 基因 DNA 结合域缺失的 DNA 片段 *pprM*ΔCSD(图 3b)，约 1328 bp。

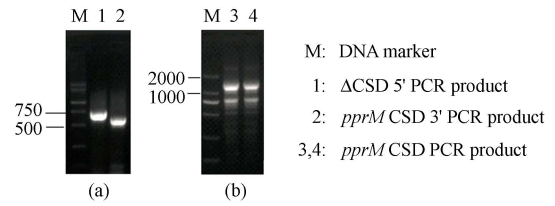


图 3 *pprM* 基因 DNA 结合域 3'端 PCR 扩增片段、5'端 PCR 扩增片段(a)和 ΔCSD PCR 扩增片段(b)

Fig.3 *pprM* gene DNA binding domain 3' PCR product, 5'PCR product (a) and *pprM*ΔCSD PCR product (b)

2.3 重组载体 *pk18mobsacB-pprM*ΔCSD 的阳性克隆筛选

将获得的目的片段 *pprM*ΔCSD 与基因敲除载体 *pk18mobsacB* 连接，转化大肠杆菌 JM109 感受态，提取质粒，酶切鉴定(图 4)，进一步测序鉴定分析(图 5)，结果显示基因敲除重组载体 *pk18mobsacB-pprM*ΔCSD 构建成功。

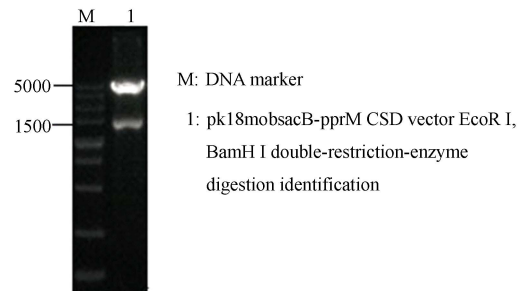


图 4 *pk18mobsacB-pprM*ΔCSD 重组质粒双酶切鉴定结果
Fig.4 *pk18mobsacB-pprM*ΔCSD recombinant vector double-restriction-enzyme digestion identification results

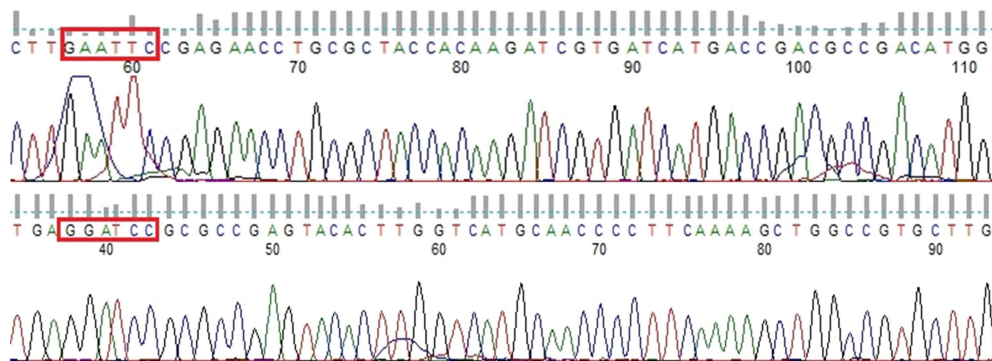


图 5 部分测序结果

Fig.5 Partial sequencing results

3 讨论

随着核电、核科学技术及放射治疗技术的不断发展,世界发生核泄漏事故的几率以及受到核辐射污染的可能性正在增加^[11]。耐辐射奇球菌在接收 20 kGy 的 γ 射线辐照后仍能存活,其最高甚至可耐受 50 kGy 的辐射剂量^[12]。这种极高的放射抗性为探讨生物体放射损伤防御体系、寻找为人类所具有的抗辐射损伤新技术提供了理想的研究模型。有研究表明,耐辐射奇球菌通过控制和限制在其细胞内自由铁的量,可减少耐辐射奇球菌暴露于电离辐射时潜在的蛋白质氧化损伤。类似于耐辐射奇球菌的情况,白血病细胞内的铁调节蛋白 IRP-1 介导的铁代谢能调节其对 γ 射线的抗辐射作用^[13]。冻干的耐辐射球菌也可定量作为 γ 辐射剂量的指标^[14]。Radzimanowsk 等^[15]研究发现耐辐射奇球菌中 RecOR 复合体的一个“开放”结构与 ssDNA 结合于该复合体上有关,而 PprM 也具有 ssDNA 结合活性,提示我们 PprM 蛋白可能与 RecOR 复合物具有相似的机制。同源重组通路是耐辐射奇球菌中 dsDNA 和 ssDNA 断裂的一个主要修复手段,这个通路某些 ssDNA 结合蛋白如 RecA 类似蛋白(如 RecFOR 蛋白)结合于 ssDNA 形成一个核蛋白丝状体有关。本文首先通过生物信息学分析预测 *pprM* 基因发现其具有冷休克 DNA 结合域,具有 ssDNA 结合活性。提示 PprM 蛋白与耐辐射奇球菌中的同源重组通路可能相关,故该结构域很可能与 *pprM* 基因的抗辐射功能密切相关。基因敲除是研究基因功能最直接,最有力的实验手段,本文成功构建耐辐射奇球菌 *pprM* 基因关键 DNA 结合功能结构域敲除重组体对其高效损伤修复机制进行研究,敲除该结构域后 PprM 蛋白的 ssDNA 结合活性消失,可通过进一步实验研究该结构域敲除株的辐射抗性是否发生改变,以期揭示耐辐射奇球菌高抗辐射性的机理。为研究耐辐射奇球菌的辐射、氧化抗性以及耐辐射奇球菌在医学、核技术的应用上提供进一步的理论基础。

参考文献

- Slade D, Radman M. Oxidative Stress Resistance in *Deinococcus radiodurans* [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2011, **75**(1): 133-191
- Pellegrino S, Radzimanowski J, Timmins J, *et al.* Expression, purification and preliminary structural analysis of the head domain of *Deinococcus radiodurans* RecN [J]. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2012, **68**(Pt 1): 81-84
- Satoh K, Kikuchi M, Narumi I, *et al.* The role of *Deinococcus radiodurans* RecFOR proteins in homologous recombination [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2012, **11**(4): 410-418
- Battista JR. Radiation resistance: The fragments that remain. *Curr Biol*, 2000, **10**(5): 204-205
- Battista JR, Park MJ, McLemore AE. Inactivation of two homologues of proteins presumed to be involved in the desiccation tolerance of plants sensitizes *Deinococcus radiodurans* R1 to desiccation. *Cryobiology*, 2001, **43**(2): 133-139
- Hua Y, Narumi I, Gao G, *et al.* PprI: a general switch responsible for extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **306**(2): 354-360
- Ohba H, Satoh K, Narumi I, *et al.* Identification of PprM: a modulator of the PprI-dependent DNA damage response in *Deinococcus radiodurans* [J]. *Extremophiles*, 2009, **13**(3): 471-479
- Andreas Schgfer, Andreas Tauch, Alfred Piehler, *et al.* Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Gene*, 1994, **145**(1994): 69-73
- KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [EB/OL]. [2013-08-27]. http://www.kegg.jp/ssdb-bin/ssdb_motif?kid=dra:DR_0907
- ExPASy: SIB Bioinformatics Resource Portal [EB/OL]. [2013-08-27]. <http://swissmodel.expasy.org/repository/?pid=smr03&zid=async>
- Minton K W. Repair of ionizing radiation damage in the radiation resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* [J]. *Mutat Res*, 1996, **363**(1): 1-7
- Ghosal D, Omelchenko M V, Venkateswaran A, *et al.* How radiation kills cells: survival of *Deinococcus radiodurans* and *Shewanella oneidensis* under oxidative stress [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2005, **29**(2): 361-375
- Haro K J, Sheth A, David A. Scheinberg. Dysregulation of

- IRP1-Mediated Iron Metabolism Causes Gamma
Ray-specific Radioresistance in Leukemia Cells [J]. Plos
One, 2012, 7(11): e48841
- 14 Lu H, Xia W, Chen H, *et al.* Characterization of the role of
DR0171 in transcriptional response to radiation in the
extremely radioresistant bacterium *Deinococcus*
radiodurans [J]. Archives of Microbiology, 2011, 193(10):
741-750
- 15 Radzimanowski J, Dehez F, Timmins J, *et al.* An 'open'
structure of the RecOR complex supports ssDNA binding
within the core of the complex [J]. Nucleic Acids
Research, 2013, 41(16): 7972-7986

Bioinformatics analysis of *pprM* DNA binding domain and construction of gene knockout vector recombinant in *deinococcus radiodurans*

YANG Jie¹ SU Zehong² LI Binyuan² MA Yun² XIAO Xiao¹ FAN Meiting¹
LI Wei² WANG Qiuyan² HE Shuya^{1,2}

¹(School of Public Health, University of South China, Hengyang 421001, China)

²(Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of South China, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT Bioinformatics analysis showed that *pprM* gene contained a Cold-shock DNA-binding domain. The *pprM*△CSD was obtained by Overlap-PCR technology. And then it was connected with the suicide vector pk18mobsacB. Before ligation, amplified fragment and the empty vector were digested by the restriction enzyme EcoRI and BamHI. The ligation products were transformed into E.coil JM109. Positive clones were selected and followed by restriction enzyme digestion and sequencing analysis results. The *pprM* gene DNA binding domain knockout vector recombinants were successfully constructed. The bioinformatics analysis shows that *pprM* gene DNA binding domain is associated with the radiation resistance function in *Deinococcus radiodurans*.

KEYWORDS *Deinococcus radiodurans*, *pprM* gene, Overlap PCR, Ionizing radiation

CLC Q78, TL71