

超嗜热古菌 *Sulfolobus tokodaii* RadA 蛋白的克隆表达及其辐射可诱导性

盛多红, 朱珊珊, 李铭峰, 焦建东, 倪金凤, 申玉龙*

(山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

摘要: RecA/Rad51/RadA 家族蛋白是细胞内重要的重组修复蛋白, 在功能上非常保守。研究发现在细菌、真核生物、甲烷古菌和嗜盐古菌细胞内 RecA/Rad51/RadA 均可以受紫外线辐射诱导转录。而对极端嗜热古菌中的 RadA 辐射可诱导性仍存在争议。通过体外表达极端嗜热古菌 *Sulfolobus tokodaii* 的 RadA 蛋白, 制备抗体, 利用免疫学方法并结合 RT-PCR 分析, 对嗜热古菌 *S. tokodaii* 中 RadA 的辐射诱导进行了研究。经过 100J/m² 和 200J/m² UV 辐照处理, *radA* 基因的转录分别上调了 2 倍和 3 倍, 同时 RadA 蛋白的表达分别上升了 1.5 倍和 1 倍。实验结果表明 *S. tokodaii* 中 RadA 可以被紫外线辐射诱导表达, 证实了极端嗜热古菌 *S. tokodaii* 细胞中存在 DNA 损伤诱导反应的观点。

关键词: 嗜热古菌; RadA; 辐射可诱导性; DNA 修复

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 03-0317-06

紫外线(UV)可以造成 DNA 损伤, 包括碱基损伤、单链与双链断裂、链间交联及 DNA 蛋白质交联等辐射损伤形式, 如得不到及时而有效的修复, 或发生错误修复, 就会危害细胞的生存, 并可能导致人类严重疾病。对 DNA 辐射损伤的修复涉及到多种修复蛋白, 其中同源重组修复蛋白 RecA/Rad51 在这一过程中扮演重要角色^[1,2]。

RecA/Rad51 分别是细菌和真核生物重组修复的关键酶。当 DNA 受到损伤时, RecA/Rad51 的表达受到诱导, 因此, RecA/Rad51 的表达水平常被用作检测 UV 辐射的指标之一^[3-5]。RadA 是古菌中 RecA/Rad51 蛋白同系物, 同样具有 DNA 重组活性, 在 DNA 重组修复中起重要作用^[6,7]。研究发现, 和真核生物或细菌的 RecA/Rad51 一样, 甲烷古菌和嗜盐古菌中的 RadA 同样具有 UV 辐射损伤诱导活性^[8,9]。极端嗜热古菌主要生活在热泉和深海火山喷口附近等高温环境中, 分属于广古菌和泉古菌。早在 1996 年, Sandler 等^[7]

报道生活于高温环境下泉古菌 *Sulfolobus solfataricus* 中的 RadA 不受 UV 损伤诱导表达。Komori 等^[10]发现广古菌 *Pyrococcus furiosus* 的 RadA 在细胞内组成型表达, 不受 UV 辐射的诱导, 他们对此的一种解释是高温诱导了 RadA 的持续表达。

然而我们在研究另一个嗜热泉古菌 *S. tokodaii* 的损伤修复系统时发现其具有 DNA 损伤诱导反应。为了进一步探明 *S. tokodaii* 细胞中 RadA 的 UV 损伤诱导情况, 本文利用大肠杆菌异源表达 *S. tokodaii* 中的 RadA 蛋白, 制备了 RadA 抗体。通过免疫学分析及 RT-PCR 分析证实了 *S. tokodaii* 中的 RadA 可以被 UV 损伤诱导表达。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养条件: 本研究采用的 *S. tokodaii* 7 菌株来自于本实验室保存。表达菌株 BI21(DE3)-

基金项目: 国家“973 项目”(2004CB719604); 国家自然科学基金(30470386)

*通讯作者。Tel: +86-531-88362928; E-mail: yulgshen@sdu.edu.cn

作者简介: 盛多红(1972-), 男, 山东阳谷人, 博士, 主要从事微生物分子生物学研究。E-mail: dhsheng@sdu.edu.cn

收稿日期: 2007-07-11; 修回日期: 2007-08-24

CodenPlus-RIL 和表达载体 pET15b 购于 Novagen 公司。古菌 *S. tokodaii* 于 75°C 培养, 培养基采用 Allen 无机盐培养基^[6](每升培养基中含 1.3 g (NH₄)₂SO₄, 0.28 g KH₂PO₄, 0.25 g Mg SO₄·7H₂O, 70 mg CaCl₂·2H₂O, 20 mg FeCl₃·6H₂O, 4.5 mg Na₂B₄O₇·10H₂O, 1.8 mg MnCl₂·4H₂O, 0.05 mg ZnSO₄·7H₂O, 0.05 mg CuCl₂·2H₂O, 0.04 mg VoSO₄·5H₂O, 0.03 mg Na₂MoO₄·5H₂O, 0.01 mg CoSO₄·7H₂O, pH3.0) 添加 1% 的 yeast extract。大肠杆菌(*Escherichia coli*) 培养于 37°C, 使用 LB 液体培养基(1% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl, pH7.4)或含 1.5%琼脂的固体培养基。

1.1.2 主要试剂和仪器: 各种限制性内切酶、T₄DNA 连接酶、TaqDNA 聚合酶和 dNTP 等购自 TaKaRa 公司, Trizol RNA 抽提试剂盒和一步法 RT-PCR 试剂盒购于上海博彩生物科技有限公司。Ni-NTA 蛋白纯化试剂盒购于 Qiagen 公司。

1.2 古菌细胞的辐射损伤处理

参照文献[7]的方法, 将对数晚期 *S. tokodaii* 细胞悬浮于适量的 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH6.5)中, 使细胞数为 10⁷左右, 15mL 细胞悬液加到带有搅拌子的无菌的 13cm 平皿中, 轻轻搅拌, 打开紫外灯辐射处理, 通过控制辐照时间, 使辐射剂量分别为 100J/m² 和 200J/m²。将处理过的细胞转入 200mL 新鲜的 *Sulfolobus* 培养基中, 75°C 下培养 4h 后, 6°C 1000×g 离心 20min 收集细胞备用。

1.3 基因克隆

S. tokodaii 基因组 DNA 按文献[12]进行分离纯化。根据已公布的基因组序列设计 *radA* 基因引物, 上游: 5'-CGCCATATGAAATGATATGTCTTCTGATGGG-3', 下游: 5'-CCGGATCCTTAGAGCTCTTCAGCGTCTC-TTACTC-3', (画实线部分分别为 *Nde* 和 *Bam*H 酶切位点序列, 虚线为终止密码子)。PCR 产物用 *Nde* 和 *Bam*H 双酶切消化后, 片段连入用相同酶切消化后的 pET15b 质粒, 重组质粒命名为 pET15b-radA, 序列由 DNA 测序证实。将 pET15b-radA 重组质粒按常规方法转化到 BL21(DE3)-CodonPlus-RIL 表达菌株中, 涂布含有 Amp 和 Chl 双抗生素的平板进行筛选 RadA 表达菌。

1.4 RadA 蛋白的表达纯化

将过夜活化的 RadA 表达菌株接种于 LB 培养基(100 mg/L Amp, 70 mg/L Chl)37°C 培养 3h 后, 加 0.1 mol/L IPTG 诱导 4h, 收集菌体, 悬浮于 10 倍体积 Lysis buffer (50mmol/L Tris pH 8.0, 250mmol/L NaCl)

中超声破壁, 经 80°C 热处理 20 min 后, 离心收集上清。然后用 Ni-NTA 柱进一步纯化蛋白, 按照试剂盒使用说明步骤将蛋白上柱结合, 结合蛋白的 Ni 柱经 Lysis buffer 冲洗两个柱体积, 然后用 Elution buffer(50mmol/L Tris pH 8.0, 100mmol/L NaCl, 250mmol/L 咪唑)洗脱 RadA 蛋白。

1.5 抗体制备与纯化

取上述纯化的融合蛋白, 加灭菌过的生理盐水配制成约 0.5mg/mL 的混合液, 取 1 mL 蛋白液, 加等体积的弗氏完全佐剂, 置于注射器内反复抽吸至完全乳化后, 背部皮下多点免疫一只新西兰大白兔, 初次免疫两周后注射同样含弗氏完全佐剂的抗原蛋白液, 两周后再次加强免疫, 从耳缘静脉取血用双向扩散法检查抗体效价。待有合适的抗体滴度后, 从颈动脉采血, 收集血清备用。

1.6 Western blot 分析

超声波粉碎辐射处理过的细胞, 16000×g 离心 25min, 收集上清液, 即为细胞全蛋白。考马斯亮兰法进行蛋白定量, 按 30μg/lane 上样进行 SDS-PAGE 电泳分离。Western 免疫印迹参照文献[11]进行。DAB 辣根过氧化物酶检测试剂盒检测杂交目的带, 用 Image System(Bio-Rad)凝胶成像扫描和定量。

1.7 细胞总 RNA 的制备与 RT-PCR 分析

利用 Trizol RNA 抽提试剂盒方法一步抽提样品总 RNA, 分光光度计法进行定量。

分别取 20ng 辐射处理过的以及未处理的对照样品 RNA, 进行 RT-PCR 分析 *radA* 基因的诱导表达, 扩增引物与上面基因克隆相同, 具体操作步骤参照试剂盒提供的方法, PCR 步骤为, 50°C 30min; 94°C 2min; 94°C 15s, 64°C 20s, 72°C 40s, 30 个循环。PCR 产物进行琼脂糖电泳分析。

1.8 双向电泳

第一向固相 pH 梯度等电聚焦, 使用 IPG 干胶条 (pH =4~7, 24 厘米)。按照 Amersham 公司操作手册稍作修改。在泡胀槽中加入带有 180μg 总蛋白样品的 450μL IPG 胶条泡胀液(9mol/L 尿素, 4% (W/V) CHAPS, 1% (W/V) DTT, 20mmol/L Tris-HCl, 0.5% (W/V)IPG buffer, pH 值为 4~7, 痕量溴酚蓝), 30V 泡胀 12 h。等电聚焦程序: 100V, 1h; 200V 1h, 200~1000V 1h, 1000V 2h, 1000~8000V 5h。当总电压与时间的乘积约为 60 万 V·h 时, 聚焦完成。IPG 胶条先在平衡液 I (50mmol/L Tris-HCl, 6mmol/L 尿素, 30% 甘油, 2% SDS, 1% DTT, 痕量溴酚蓝)中平衡 15 分

钟, 再在平衡液 II (DTT 换成 4% 碘乙酰胺, 其余组成同 I) 中平衡 10min. 转移到 12.5% SDS-PAGE 均匀胶上进行第二向电泳, 电泳结束后, 凝胶银染, 并用图像扫描仪(ImageScanner)扫描。

2 结果

2.1 *radA* 基因的克隆、表达与纯化

PCR 扩增得到大小约为 972 bp 的 *radA* 基因片段 (图 1-A), 用 *NdeI* 和 *BamH* 进行双酶切后, 连接于 pET-15b 质粒上, 经 DNA 测序验证 pET15b-*radA* 的重质质粒。将重组质粒导入 BL21(DE3)-CodonPlus-RIL 菌株, IPTG 诱导表达。表达菌破碎上清液进行 SDS 凝胶电泳, 在相对分子质量(MW)为 35000Da 的位置上, 可见特异性表达带, 表达量占全菌体蛋白的 35%左右(图 1-B)。根据 NCBI 预测的 RadA 蛋白序列, 用 ProtParam tool(<http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam>)进行分析, RadA 蛋白由 324 个氨基酸残基组成, 分子量 35529Da。从而证明上清中的表达蛋白为 RadA 蛋白。将得到的 RadA 蛋白进行 Ni 柱亲和层析纯化, 最终得到的蛋白的纯度在 90%以上。

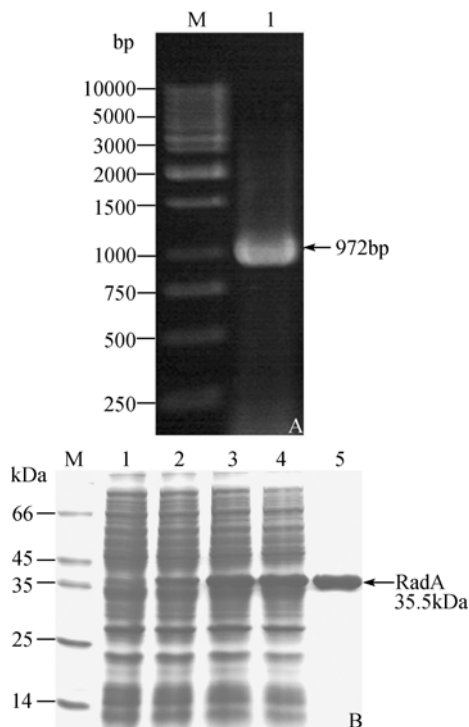


图 1 *radA* 基因的克隆与表达

Fig. 1 Cloning and expression of *radA*. The PCR product (about 972 bps) is shown with arrow in the A panel and the expression of RadA (about 35.5 kDa) is shown in the B panel. Lane 1 in the right panel, pET15b vector control without target gene; lane 2, without induction by IPTG; lane 3, with 4 hour induction; lane 4, supernatant; lane 5, RadA protein purified by Ni-column.

将纯化的蛋白用生理盐水透析, 置换缓冲液后, 按每只兔子 0.5mg RadA 蛋白加强免疫 2 次后, 耳静脉取血, 检测血清中抗体效价, 双向免疫扩散分析表明在 1:32 的血清稀释度下, 仍有免疫结合沉淀线出现, 表明抗体已经达到了一个合适的水平。

2.2 Western blot 分析

将抗血清按 1:800 稀释, 检测辐射处理后的古菌中 RadA 蛋白的变化(图 2)。在对照细胞中, RadA 蛋白的量比较低, 经过 100J/m²UV 辐照处理后, RadA 蛋白表达受到诱导, 表达量上升了约 1.5 倍。经过 200J/m²UV 辐照处理后, RadA 蛋白表达量约为对照样品的 2 倍。

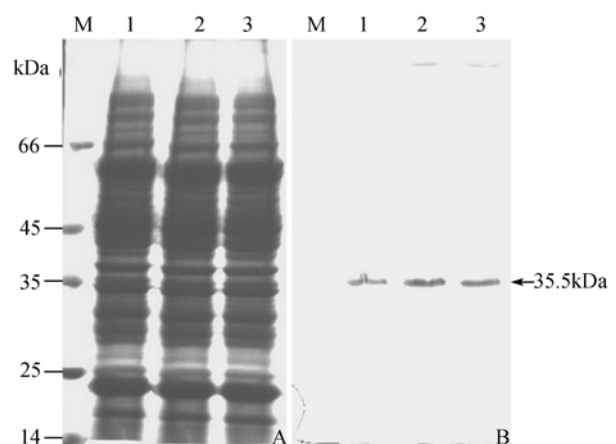


图 2 Western blot 分析

Fig. 2 Western blot analysis. Immuno-blot analyses were carried out using the anti-RadA antibody. The protein (30µg) was loaded on each lane of the gel. The gel was stained with Naphthol Blue Black after blotted (A). The membrane was treated with anti-RadA antibody and the bands were visualized using the detecting kit. Lane 1, mock without UV light irradiation; lanes 2 and 3, treatment with 100 and 200 J/m² UV light, respectively.

2.3 RT-PCR 分析

和 RadA 蛋白表达水平相似, *S. tokodaii* 菌体经辐射处理后, *radA* 基因的转录水平明显上升(图 3)。和对照细胞相比, 100J/m²和 200J/m²强度的 UV 辐照处理分别使 *radA* 基因的转录水平上升了大约 2 倍和 3 倍。

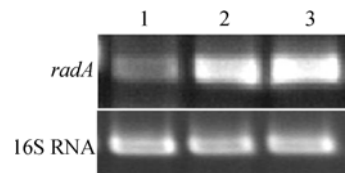


图 3 RT-PCR 分析

Fig. 3 RT-PCR assay. Total RNA (20 ng) was used for RT-PCR following the manual of one-step RT-PCR kit. 16S RNAs from each sample were inspected by RT-PCR and the results are shown in the lower panel as a control. Lane 1, mock without UV light; lanes 2 and 3, treatment with 100 and 200 J/m² UV light respectively.

2.4 双向电泳分析

通过比较双向电泳图谱(图 4)发现, 经过不同剂量 UV 辐照处理后, 伴随着一些蛋白表达的下调, 先后有 30 个蛋白点的表达量上调, 但是不同剂量、不同时间, 诱导的点及强度有明显差别。比如点 2 在 $100\text{J}/\text{m}^2$ 剂量时在 4h 有诱导, 8h

回复正常, 而在 $200\text{J}/\text{m}^2$ 在 8h 也检测到诱导, 诱导的量也有明显增加; 又如蛋白点 16 在 $100\text{J}/\text{m}^2$ 没有明显诱导, 而在 $200\text{J}/\text{m}^2$ 处理后, 表达量明显上升。损伤蛋白的诱导幅度与辐射剂量及后孵育时间有关, 表明 *S. tokodaii* 细胞中存在与原核或真核细胞相似的 DNA 损伤诱导反应。

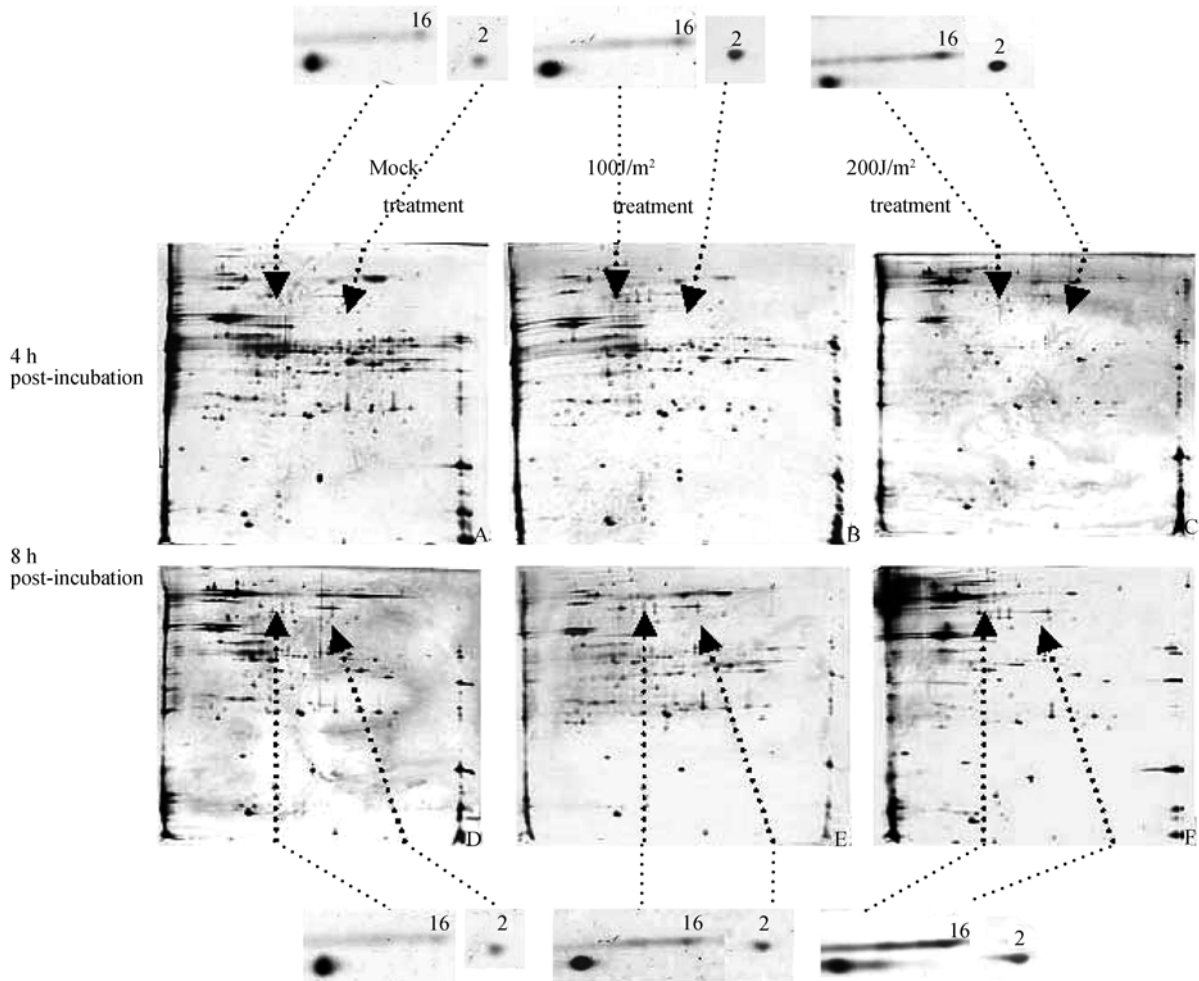


图 4 菌体蛋白的双向电泳图

Fig. 4 2-D PAGE analysis of cellular proteins of *S. tokodaii*. The extracted proteins were separated by isoelectric focusing in the pH ranging from 4 to 7 in the first dimension and 12.5% vertical SDS-PAGE in the second dimension. The resolved proteins were visualized following silver staining. (A) un-irradiated and post-incubated for 4 hours; (B) irradiated at $100\text{J}/\text{m}^2$ and post-incubated for 4 hours; (C) irradiated at $200\text{J}/\text{m}^2$ and post-incubated for 4 hours; (D) un-irradiated and post-incubated for 8 hours; (E) irradiated at $100\text{J}/\text{m}^2$ and post-incubated for 8 hours; (F) irradiated at $200\text{J}/\text{m}^2$ and post-incubated for 8 hours. The analyzed spots were numbered, and the numbers match in the six photos (A-F).

3 讨论

文中的实验结果表明, 和大多数生物中 RecA/Rad51 一样, *S. tokodaii* 中的 RadA 受 UV 辐射诱导后表达可以上调。同时也意味着, *S. tokodaii* 细胞

内 DNA 重组损伤修复系统具有损伤诱导性。我们通过双向电泳作的古菌蛋白损伤诱导表达图谱也证明了这一点(图 4)。

通过比较 RT-PCR 和 Western blot 结果, 发现两者的诱导并不完全一致, 在 RT-PCR 结果中, 通过

200J/m² 辐射处理, RNA 转录上调了大约 2.5 倍, 而蛋白表达量仅上调了 1 倍, 甚至低于 100J/m² 辐射处理的 RadA 的诱导量。对此的解释可能是因为 200J/m² 的剂量对细胞来说已经比较大了, 蛋白的翻译系统以及转录出来的 RNA 受到损伤, 部分抑制了目标蛋白的表达。

与 *S. tokodaii* 同一个属的 *S. solfataricus*, 基因组测序表明两者亲缘关系很近, 我们认为 *S. solfataricus* 也许同样存在 RadA 的 UV 损伤诱导反应。在 Sandler 等^[7]没有检测到 RadA 诱导的报道中, UV 辐射处理 *S. solfataricus* 细胞的剂量为 10J/m², 这是一个很小的辐射剂量。根据 Salerno 等^[12]的研究报告 *S. solfataricus* 能够耐受 3300J/m² 的 UV 处理剂量。我们推测低剂量损伤处理仅能造成少量的轻微损伤, 不足以引起明显的损伤诱导反应。根据我们对 *S. tokodaii* 细胞 UV 损伤诱导性的测量, 即使用 30J/m² 剂量处理对细胞的生长曲线也没有明显影响, 同样不能诱导 RadA 的转录和表达(结果未展示)。另外, Salerno 等^[12]研究 *S. solfataricus* 核酸切除修复系统相关蛋白的 UV 诱导表达时, 采用了 200J/m² 的辐射剂量, 发现了其细胞中存在修复蛋白的 DNA 损伤诱导反应, 因此, *S. solfataricus* RadA 作为细胞内重要的损伤修复蛋白, 应该可以被较高剂量 UV 辐射诱导, 从而表明 RecA/Rad51/RadA 家族蛋白在界生物(古菌、真核细胞以及细菌)中均具有 UV 辐射损伤诱导活性。

参 考 文 献

- [1] Griffin CS, Thacker J. The role of homologous recombination repair in the formation of chromosome aberrations. *Cytogenetic and Genome Res*, 2004, 104(1-4): 21–27.
- [2] Rapp A, Greulich KO. After double-strand break induction by UV-A, homologous recombination and nonhomologous end joining cooperate at the same DSB if both systems are available. *J Cell Sci*, 2004, 117(21): 4935–4945.
- [3] Courcelle J, Khodursky A, Peter B, *et al.* Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics*, 2001, **158**: 41–64.
- [4] Basile G, Aker M, Mortimer RK. Nucleotide sequence and transcriptional regulation of the yeast recombinational repair gene RAD51. *Mol Cell Biol*, 1992, 12(7): 3235–3246.
- [5] van Veelen LR, Cervelli T, van de Rakt MW, *et al.* Analysis of ionizing radiation-induced foci of DNA damage repair proteins. *Mutat Res*, 2005, 574(1-2): 22–33.
- [6] Seitz EM, Joel P, Brockman JP, *et al.* RadA protein is an archaeal RecA protein homolog that catalyzes DNA strand exchange. *Genes Dev*, 1998, 12(9): 1248–53.
- [7] Sandler SJ, Satin LH, Samra HS, *et al.* recA-like genes from three archaean species with putative protein products similar to Rad51 and Dmc1 proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(11): 2125–2132.
- [8] McCready S, Muller JA, Boubriak I, *et al.* UV irradiation induces homologous recombination genes in the model archaeon, *Halobacterium* sp. NRC-1. *Saline Systems*, 2005, 1: 3.
- [9] Reich CI, McNeil LK, Brace JL, *et al.* Archaeal RecA homologues: different response to DNA-damaging agents in mesophilic and thermophilic Archaea. *Extremophiles*, 2001 5(4): 265–275.
- [10] Komori K, Miyata T, DiRuggiero J, *et al.* Both RadA and RadB Are Involved in Homologous Recombination in *Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem*, 2000, 275(43): 33782–33790.
- [11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor, 1989.
- [12] Salerno V, Napoli A, White MF, *et al.* Transcriptional response to DNA damage in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(21): 6127–6138.

Cloning, expression and radiation inducibility of RadA from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii*

Duohong Sheng, Shanshan Zhu, Mingfeng Li, Jiandong Jiao, Jinfeng Ni, Yulong Shen*

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: RecA/Rad51/RadA recombinases are important recombination proteins with conserved functions. Studies on the enzymes have shown that members of RecA/Rad51/RadA family from bacteria, eukaryota, methanogens and halophilic archaea have UV inducibility. However, the UV inducibility of RadA homologues from hyperthermophilic archaea is controversial. We analyzed the UV inducibility of *Sulfolobus tokodaii* RadA by RT-PCR and immune assays. Comparing with the mock, the transcription and expression of the *radA* increased 2 and 1.5 folds respectively after UV irradiation at 100 J/m², or 3 and 1 fold at 200 J/m². These results demonstrated that *S. tokodaii* RadA could be induced after UV treatment. In addition, proteome induction analysis proved that there existed a DNA damage induction response in *S. tokodaii*, which further supported RadA inductility in this hyperthermophilic archaeon.

Keywords: hyperthermophilic archaea; RadA; radiation inducibility; DNA repair

Supported by the Major Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2004CB719604) and the National Natural Science Foundation of China (30470386)

*Corresponding author. Tel: +86-531-88362928; E-mail: yulgshen@sdu.edu.cn

Received: 11 July 2007/ Revised: 24 August 2007

2008年《微生物学报》改用新的“稿件远程处理系统”

自2006年本刊开通使用了“稿件远程处理系统”，因软件使用不畅，本刊决定2008年改用新的稿件处理系统，随之也更换了网址。使用旧版网址(journal.im.ac.cn/xuebao)时也会直接看到新版网页。由此会给作者和专家带来不便，敬请谅解！

2007年12月31日之前的来稿(稿号为xb2007-×××)，依然使用旧版网页进行查询和审稿，直到稿件处理终结为止。新版网页的首页右上方设有“旧版入口”。

2008年1月1日以后的投稿(稿号为xb2008×××)，将在新的网站 <http://journals.im.ac.cn> 上操作，原有的“作者库”将全部导入新的系统，凡是进行过网上投稿的作者仍然可以使用原来的“用户名”和“口令”，不必再重新注册。新系统使用起来会非常方便！欢迎大家进行在线投稿、查询、修稿和审稿。

衷心感谢广大读者、专家对本刊的支持！