

泉古菌 *Sulfolobus tokodaii* RadA 同系物 stRad55B 与 RadA 的共表达及其对 RadA 重组活性的抑制

盛多红, 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

* 联系人, E-mail: yulgshen@sdu.edu.cn

收稿日期: 2007-08-28; 接受日期: 2007-10-09

国家重点基础研究发展计划“973”计划(批准号: 2004CB719604)和国家自然科学基金(批准号: 30470386 和 30700011)资助项目

摘要 ST0838 (定义为 stRad55B)是嗜热古菌(*Sulfolobus tokodaii*)编码的 4 个 RadA 的同系物(或 Rad55 同源蛋白)之一. 研究发现, 它能够被紫外线(UV)辐射损伤诱导, 可能参与了细胞内的 DNA 损伤修复过程, 然而利用常规方法, 该蛋白不能体外可溶性地表达. 通过和 RadA 共表达, 得到了具有热稳定性的可溶 stRad55B 蛋白, 并对其活性进行了初步检测. stRad55B 优先结合单链 DNA, 并且具有不依赖 DNA 的 ATP 酶活性. 另外, DNA 链交换实验发现 stRad55B 能够明显抑制 RadA 催化的链重组活性, 表现出一个重组修复系统抑制蛋白的特征. 实验结果为进一步研究古菌中 RadA 同系蛋白的功能以及相互作用机制, 揭示古菌 DNA 同源重组修复机理提供了依据.

关键词

古菌
重组修复
RadA
Rad55
共表达

古菌是独立于真核生物和细菌的第三域生命形式, 基因组测序表明古菌呈现出细菌和真核生物的嵌合特性. 其中有关细胞分裂和代谢的蛋白质和细菌相似, 而复制、转录、翻译、修复和重组等 DNA 信息处理过程明显和真核生物相似, 两者很可能起源于共同的祖先. 因此, 古菌已经成为了解真核生物 DNA 复制和 DNA 修复系统的理想模型^[1,2].

迄今为止, 对嗜热古菌的 DNA 重组修复的认识主要来自于基因组的比较研究. 和细菌中的 RecA 及 RadA 不同, 嗜热古菌的 RadA 更接近于真核细胞的 Rad51 蛋白, 氨基酸序列同源性在 40% 以上^[2,3]. 另外细胞内还有 Mre11, Rad50, Rad55, Hje 和 Hjc 等真核细胞重组修复蛋白类似物^[4-6], 古菌的 DNA 损伤重组修复蛋白和真核细胞的相接近, 但种类上明显比真核细胞中少得多, 缺少 Rad52, Rad54, Rad57 和 Rad59 等重组修复介导蛋白的类似物. 已有研究发现修复蛋

白的简化, 尤其是典型损伤识别蛋白 Rad52 的缺失并没有降低嗜热古菌的 DNA 损伤修复能力^[1,6]. 嗜热古菌以何种方式识别 DNA 损伤并有效启动重组修复还不清楚. 序列比对发现, *Sulfolobus tokodaii* 中编码有 4 个 RadA 的结构域类似物, 在氨基酸序列上接近于真核细胞 Rad55 蛋白(故把这 4 个蛋白称为 stRad55 类似物). 在修复蛋白被简化的古菌修复系统中, 这些 Rad55 类似蛋白发挥什么作用, 在没有 Rad57 蛋白的情况下, 它们如何发挥作用, 是否替代了 Rad52, Rad54, Rad57 和 Rad59 等蛋白的功能, 还是 Rad55 有新的作用机制尚未被认识, 都是值得探讨的问题.

StRad55B(ST0838)是 4 个 Rad55 同源蛋白之一, 由 244 个氨基酸残基组成, 但是体外表达一直得不到可溶性的蛋白质. 本文通过 stRad55B 和 stRadA 共表达, 成功获得耐热的可溶性蛋白质, 并对其酶活性进行了体外分析.

1. 材料与方 法

1.1 材料与试剂

研究采用的 *Sulfolobus tokodaii* 7 菌株来自于本实验室保存. 大肠杆菌 TG1 和 BL21(DE3) 购于 Novagen 公司. 各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司, *Taq* DNA 聚合酶、dNTP 购于上海博亚生物公司. 表达载体 pET15b 和 pET29b 购于 Novagen 公司. 引物由上海博亚生物公司合成.

S. tokodaii 75°C 培养, 培养基采用 Allen 无机盐培养基^[7] (1.3 g (NH₄)₂SO₄, 0.28 g KH₂PO₄, 0.25 g MgSO₄·7H₂O, 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, pH 3.0) 添加 0.1% 的酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 提取物. 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 培养于 LB (1% Tryptone, 0.5% 酵母菌提取物, 1% NaCl, pH 7.4) 液体培养基或含 1.5% 琼脂的固体培养基.

1.2 细胞辐射处理与 RT-PCR 分析

参照文献^[8]的方法, 将对数晚期的 *S. tokodaii* 细胞悬浮于适量的 20 mmol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 中, 使最终细胞数为 10⁷ 左右, 加 15 mL 细胞悬液到带有搅拌子的无菌的 13 cm 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 100 和 200 J/m². 将处理过的细胞转入新鲜的培养基 75°C 培养. 收集处理后培养 4 h 的古菌细胞, 依照 Trizol 方法一步抽提总 RNA, 分光光度计法进行定量后, 进行反转录和 RT-PCR 分析基因的诱导表达, 具体步骤参照试剂盒提供的方法.

1.3 遗传学操作

(1) 基因克隆和重组质粒的构建: *S. tokodaii* 基因组 DNA 按文献^[9]的方法进行分离纯化. 根据已公布的基因组序列设计 stRad55B 引物, 上游: 5'-GGG-CATATGAAGGTCCTTAGAGTTAGAAC-3', 下游: 5'-GGGGTTCGACATTTATGTTCAAATGTCTA-C-3' (下画实线部分分别为 *Nde* I 和 *Sal* I 酶切位点序列, 下画虚线为终止密码子). PCR 产物用 *Nde* I 和 *Sal* I 双酶切消化后, 片段连入同样酶切消化的 pET29b 载体, 重组

质粒命名为 pET29b-0838, 序列由 DNA 测序证实. 同样 PCR 扩增 *strada* 基因 (ST0297) 连入 pET15b 载体的 *Nde* I 和 *Bam*H I 位点之间, 扩增引物上游为 5'-CGCATATGAATGATATGTCTTCTGA-TGGG-3', 下游为 5'-CCGGATCCCTCTTCAGCGTC-TCTTACTC-3' (下画实线部分分别为 *Nde* I 和 *Bam*H I 酶切位点序列, 下画虚线为终止密码子), 重组质粒命名为 pET15b-0297, 序列由 DNA 测序证实.

(2) 和 RadA 蛋白共表达菌株的构建: 分别取 3 μL (约 10⁵ 个细胞) pET29b-0838 和 pET15b-0297 质粒与 100 μL BL21(DE3) 感受态细胞混匀, 按常规方法进行转化, 涂含有氨苄青霉素 (50 mg/L) 和卡那霉素 (30 mg/L) 双抗生素的 LB 平板筛选共表达菌株.

1.4 StRad55B 蛋白的表达纯化

将过夜活化的共表达菌株接种于 LB 培养基 (含氨苄青霉素 50 mg/L, 卡那霉素 30 mg/L), 30°C 培养 3 h, 加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 继续培养 6 h, 收集菌体, 悬浮于 10 倍体积裂解缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 100 mmol/L NaCl) 中超声破壁, 经 80°C 处理 20 min 后, 离心收集破壁上清. 接下来用 Ni-NTA 柱纯化上清液中的蛋白质. 按照使用说明将蛋白上柱结合, 结合蛋白质的镍亲和层析柱经结合缓冲液冲洗两个柱体积, 然后用洗脱液-I (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 800 mmol/L NaCl) 洗脱 stRad55B 蛋白, 接着用洗脱液-II (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 100 mmol/L NaCl, 300 mmol/L 咪唑) 洗脱 stRadA 蛋白.

1.5 热稳定性检测

热稳定性是嗜热蛋白的一个重要特性, 按照文献^[9], 将等量蛋白分别置于 70, 80, 90 和 100°C 下温浴 30 min 后离心, 电泳检测上清蛋白.

1.6 ATPase 活性、链结合活性和重组活性分析

(1) ATPase 活性分析: 参照文献^[10]的方法, 20 μL 反应体系将 ATP 与待测蛋白在 60°C 共孵育 15 min 后, 孔雀石绿法检测无机磷的释放, 同时减去空白对照释放的无机磷后计算待测蛋白 ATPase 活性指标.

(2) 链结合活性分析: 采用 γ-³²P 标记的 84 bp 单链 DNA 或双链 DNA 为底物进行目的蛋白的 DNA 凝胶

阻滞分析. 反应混合物中含有 30 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1 mmol/L DTT, 2.5 mmol/L ATP, 25% 甘油, 1 nmol/L γ -³²P标记的 84 bp单链DNA或双链DNA, 不同浓度的目的蛋白, 以不加目的蛋白的反应作为对照. 反应混合物在 65℃水浴 20 min后, 以 6%的聚丙烯酰胺凝胶在一倍TBE缓冲液中电泳进行凝胶阻滞分析.

(3) 链重组活性分析按参考文献[11]进行: 反应在 60℃下进行, 反应混合物(25 mmol/L Tris-HAc, pH 7.5, 1 mmol/L DTT, 5% 甘油, 10 mmol/L MgAc, 2.5 mmol/L ATP)中加入 4.5 μ mol/L stRadA和 15 μ mol/L 单链M13 环状DNA (New England Biolabs) 在 60℃孵育 5 min, 然后加入 15 μ mol/L 线性化M13 双链DNA 片段(dsDNA) (约 3 kb)开始反应, 在 60℃保温 30 min 后, 加入 5 倍的终止缓冲液(0.125% 溴酚兰, 25 mmol/L EDTA, 25%甘油, 5% SDS)停止反应, 0.8%的琼脂糖凝胶电泳, 检测DNA交联. 为了考察对反应的抑制, 可预先在反应混合物中加入stRad55B蛋白.

2 实验结果

2.1 RT-PCR 检测基因的诱导表达

在我们以前的蛋白质组学分析中, 发现*S. tokodaii*细胞内的一些修复蛋白具有辐射损伤可诱导性. 在这里通过RT-PCR分析了基因stRad55B的诱导活性. 图 1 中stradA基因的转录(作为对照)显示出了辐射可诱导性, 与文献[2]报道结果相似. 同样经 100 或 200 J/m²处理后, stRad55B的RNA转录水平上升了 2 或 3 倍, 也表现出了可诱导性, 作为古菌中Rad55 的类似物, stRad55B很可能参与了UV损伤后的修复过程.

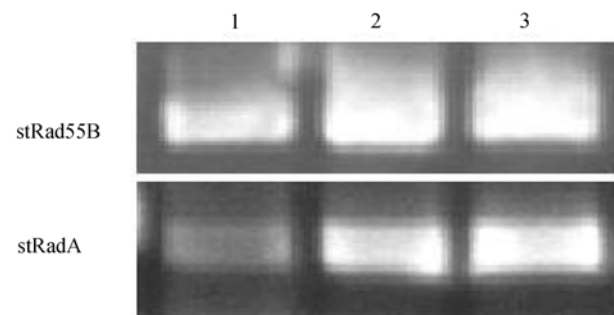


图 1 RT-PCR 检测 UV 诱导基因表达

泳道 1: 未辐照处理样品; 泳道 2: 100 J/m²辐照处理样品; 泳道 3: 200 J/m²辐照处理样品

2.2 stRad55B 的表达与纯化

实验发现, 在大肠杆菌中单独表达时, stRadA 可以在细胞内可溶性地表达, stRad55B 蛋白则全是以不可溶的包含体形式存在. 考虑到酵母细胞中的 Rad55 可以与 Rad51 结合, 形成功能复合物, stRad55B 作为古菌中 Rad55 的类似物, 很有可能与 stRadA 形成复合物, 因此, 两个蛋白的共表达也许会改善 stRad55B 蛋白的可溶性表达.

以 *S. tokodaii* 基因组为模板, 通过 PCR 扩增出 stRad55B 和 stradA 的基因片段, 大小与预期结果相符. 将 PCR 产物分别连接到 pET29b 和 pET15b 载体, 然后共转化至表达菌 BL21(DE3)中, 进行诱导表达. 因为设计的两个基因的下游引物都有终止密码子, 所以当重组蛋白表达时, stRadA 可以形成 N 端带有 His-tag 融合蛋白, stRad55B 则不带 His-tag. 当用镍亲和层析柱纯化时, stRad55B 可以通过与 stRadA 的结合而一起结合到柱上. 图 2 结果证明了实验设想, 在两个蛋白共表达时, stRad55B 以可溶性形式存在, 并且在含有 100 mmol/L NaCl 的裂解缓冲液中, 两个蛋白仍结合在一起(图 2, 泳道 3), 按照镍柱纯化程序结合蛋白复合物, 然后通过 800 mmol/L NaCl 洗脱, 从而得到 stRad55B 可溶蛋白(图 2, 泳道 4). 此时得到的粗蛋白纯度仅为 80%左右.

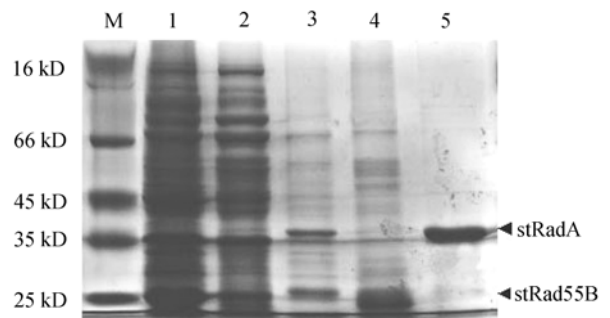


图 2 蛋白的共表达及纯化

泳道 1: 诱导表达总蛋白; 泳道 2: 表达蛋白上清液; 泳道 3: 热处理后上清蛋白; 泳道 4: 800 mmol/L NaCl 洗脱 stRad55B 蛋白; 泳道 5: 300 mmol/L 咪唑洗脱 stRadA 蛋白

热稳定性是活性嗜热蛋白的一个重要特点, 将 stRad55B 粗蛋白在裂解缓冲液中透析脱盐后, 进行热稳定性检测. 图 3(a)证明单独存在的 stRad55B 蛋

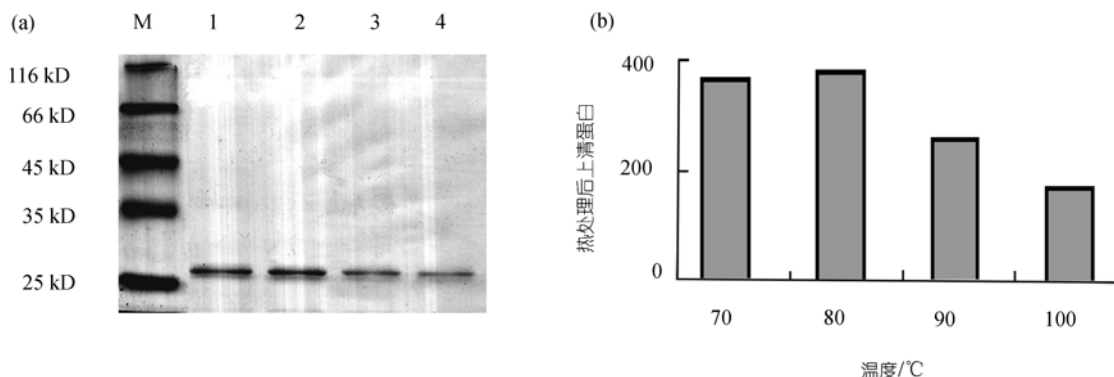


图 3 蛋白热稳定性分析

(a) 泳道 1~4, 分别为 70, 80, 90 和 100°C 热处理后剩余上清蛋白; (b) 热处理后上清中的蛋白量的相对值

白可以在 80°C 稳定存在, 100°C 处理 30 min, 仍然有大约 50% 的可溶性蛋白, 表明共表达得到的 stRad55B 蛋白具有高的热稳定性. 另外经过热处理进一步除去杂蛋白后, stRad55B 蛋白纯度均达到 97% 以上. 将 80°C 纯化的 stRad55B 蛋白置换到蛋白储存缓冲液中 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0, 50 mmol/L NaCl, 0.1 mmol/L DTT, 30% 甘油), -20°C 冻存. 用于下一步的活性实验来验证蛋白质功能.

2.3 stRad55B 蛋白的体外活性分析

stRad55B 蛋白具有不依赖于 DNA 的 ATPase 活性. 图 4 是 stRad55B 蛋白和 stRadA 蛋白的 ATP 酶活性检测结果, 当添加 M13 单链或双链 DNA 时, stRadA 蛋白的

ATP 酶活性明显提高 (图 4(a)), 并且单链 DNA 表现出了对 ATP 酶更强的激活作用, 与文献报道的古菌 RadA 活性相符 [11,12]. 在没有 DNA 时, stRad55B 蛋白表现出了比较弱的 ATP 酶活性, 添加 DNA 对 stRad55B 蛋白的酶活性没有明显影响 (图 4(b)).

DNA 结合活性表明 (图 5), stRad55B 蛋白具有较强的单链 DNA 结合活性, 同时也表现出了一些对双链 DNA 结合活性, 但明显比单链 DNA 结合活性弱. 这一点和 RadB 以及 RadA (RecA/Rad51) 同系蛋白的 DNA 链结合活性相一致 [12,13].

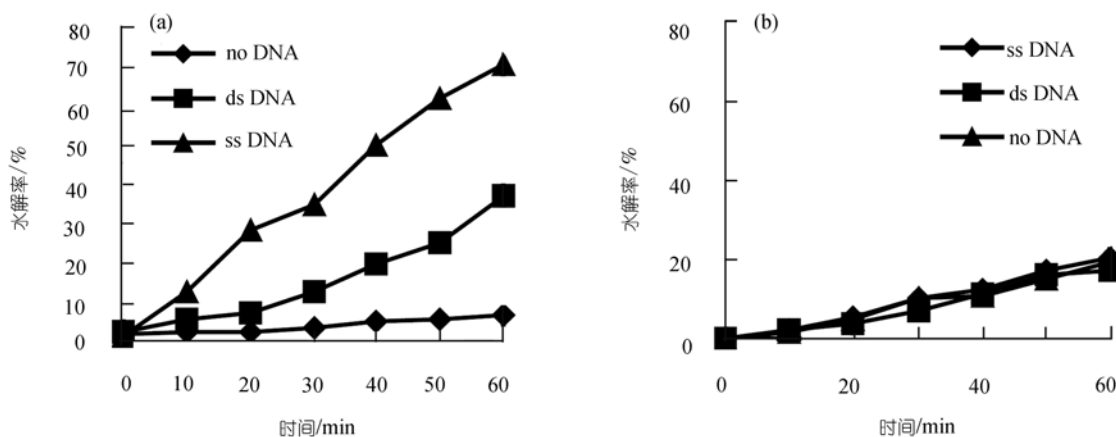


图 4 ATP 酶活性分析

(a) stRadA; (b) stRad55B

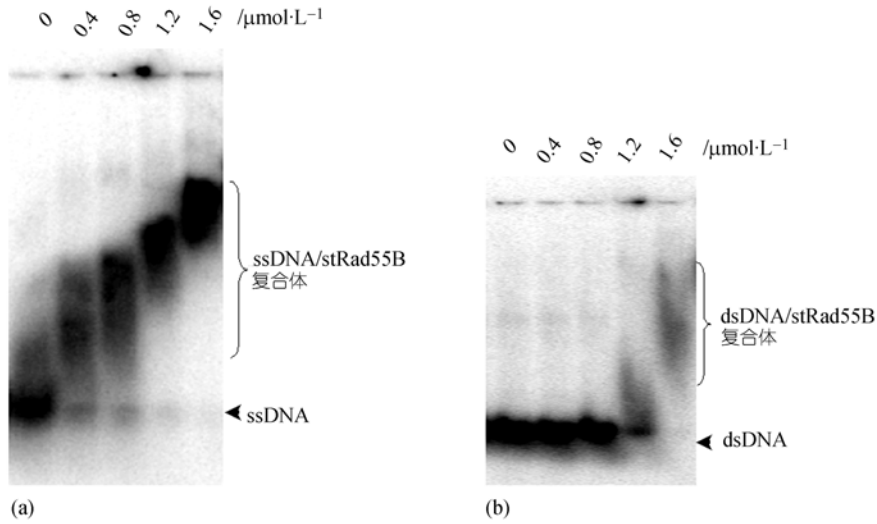


图5 stRad55B 蛋白的 DNA 结合活性

(a) 为 stRad55B 蛋白的单链 DNA 结合活性; (b) 为双链 DNA 结合活性. 每条泳道所用蛋白的量如图上标注

链交换活性分析发现 stRad55B 蛋白不能促进 M13 链交换活性(图 6, 泳道 6), 并且在 stRadA 催化的反应体系中, stRad55B 蛋白表现出了对 stRadA 催化地链交换反应的抑制, 在图 6 中随着 stRad55B 量的增加(泳道 2~5), stRadA 催化的链交换反应产物减少, stRad55B 抑制了 stRadA 的重组活性.

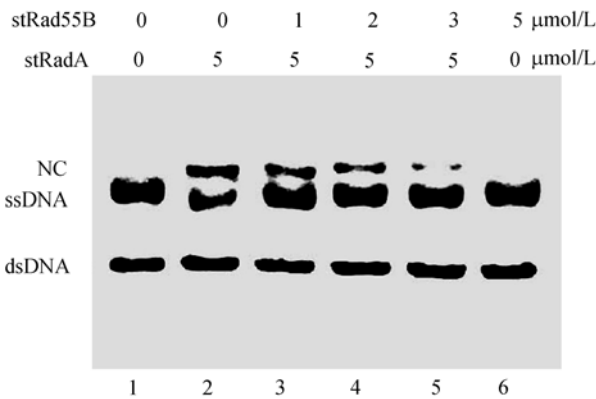


图6 stRad55B 抑制 stRadA 蛋白的重组活性

3 讨论

对 stRadA 的同系蛋白 stRad55B 的研究是探索古菌 RadA 调控机制的一个重要内容. 酵母菌细胞中的

Rad55 和 Rad57 是 Rad51 的两个同系物(paralogs), 它们通常形成杂合二聚体, 通过 Rad55 与 Rad51 的直接相互作用协助 Rad51 丝状体的装配 [14,15]; 哺乳动物细胞中有 5 个 Rad51 同系物(Rad51B, Rad51C, Rad51D, Xrcc2 及 Xrcc3), 这些蛋白质之间相互作用, 在 DNA 同源重组修复过程中起重要作用 [16,17]. 古菌细胞也编码 RadA 的同系物. 广古菌(*Pyrococcus furiosus*)的 RadA 类似物(RadB)已经被发现 [13,18]. RadB 具有 DNA 结合活性和弱的 ATP 酶活性, 并且可以直接和 RadA 或 Hjc 结合, 抑制它们的活性. 泉古菌(*S. tokodaii*)中却发现 4 个 RadA 类似蛋白(根据我们研究的顺序依次命名为 stRad55A-D), 数量上接近动物细胞, 结构上和酵母菌中的 Rad55 及广古菌中的 RadB 相似, 但氨基酸序列上却更接近 Rad55 蛋白, 对它们功能的研究, 有助于了解 RadA 的作用机制, 了解 RadA/Rad51 同系蛋白间的进化关系, 并且有助于了解真核细胞中 Rad51 同系蛋白的功能.

然而 stRad55B 却不能可溶性体外表达, 低温诱导和融合蛋白表达等常规增加表达蛋白可溶性的方法也不起作用, 影响了进一步工作的开展. 两个以上蛋白共表达是解决外源蛋白可溶性表达的另一个常用

方法. 考虑到真核细胞中 Rad51 可以和它的同系物直接结合成功能复合体^[13-17]. 这里, 我们将 stRadA 和 stRad55B 在同一细胞内进行共表达, 结果得到了 stRad55B 的可溶性蛋白, 经测定其热稳定性、DNA 结合活性以及 ATP 酶活性, 证明共表达得到的是有活性的蛋白.

另外, stRad55B 和 stRadA 共表达实验结果还证明了两个蛋白可以直接结合, 形成复合物, 这与 Rad55 和 RadB 的活性一致^[13,14]. 然而, stRad55B 具有抑制 RadA 的链交换活性和不受 DNA 诱导的 ATP 酶活性, 这一点和 Rad55 稳定丝状体结构, 促进 Rad51 重组活性不同^[14], 却和 *P. furiosus* 中的 RadB 活性相似^[13]. 和 RadB 活性不同的是, stRad55B 具有辐射诱导活性,

radB 不受辐射诱导. 考虑到 *P. furiosus* 中的 radA 同样不受 UV 辐射诱导, 而 *S. tokodaii* 中的 strada 可以受诱导, 因此更倾向于认为 stRad55B 蛋白和 RadB 蛋白活性更接近一些.

在以前的实验中还发现, *S. tokodaii* 中另一个 RadA 同系蛋白, stRad55A (ST0579), 参与了 stRadA 在 ssDNA 上的装配过程, 可以促进 stRadA 在 stSSB (*S. tokodaii* 中的单链 DNA 结合蛋白) 覆盖的 ssDNA 上装配, 部分替代了真核细胞中 Rad52 蛋白的功能 (未发表资料). 同样作为 stRadA 的同系物, stRad55B 和 stRad55A 的关系如何, 它们在古菌的重组修复机制中扮演什么角色, 一直是大家关心的问题, stRad55B 的体外表达成功, 为开展下一步工作准备了条件.

参考文献

- Lundgren M, Bernander R. Archaeal cell cycle progress. *Curr Opin Microbiol*, 2005, 8: 662—668
- Kelman Z, White M F. Archaeal DNA replication and repair. *Curr Opin Microbiol*, 2005, 8: 669—676
- Zhou Q, Zhang X, Xu H, et al. RadA, a protein involved in DNA damage repair processes of *Deinococcus radiodurans*. *Chin Sci Bul*, 2006, 51(24): 2993—2999
- Shin D S, Pellegrini L, Daniels D S. Full-length archaeal Rad51 structure and mutants: mechanisms for RAD51 assembly and control by BRCA2. *EMBO J*, 2003, 22(17): 4566—4576 [\[DOI\]](#)
- Hopfner K P, Karcher A, Shin D. Mre11 and Rad50 from *Pyrococcus furiosus*: cloning and biochemical characterization reveal an evolutionarily conserved multiprotein machine. *J Bacteriol*, 2000, 182: 6036—6041 [\[DOI\]](#)
- Dennis W G. The question of DNA repair in hyperthermophilic archaea. *Trends Microbiol*, 2000, 8: 180—185 [\[DOI\]](#)
- Kan E S, Park C B, Lee S B. Optimization of culture conditions for hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Biotechnol Bioeng*, 1997, 12: 121—126
- Sheng D, Zheng Z, Tian B, et al. LexA Analog (dra0074) is a regulatory protein that is irrelevant to *recA* induction. *J Biochem*, 2004, 136(6): 787—793 [\[DOI\]](#)
- Herbert R A, Sharp R J. *Molecular biology and biotechnology of extremophiles*. New York: Chapman and Hall, 1992. 259—280
- Zhou X, Arthur G. Improved procedures for the determination of lipid phosphorus by malachite green. *J Lipid Res*, 1992, 33(8): 1233—1236
- Sheng D, Liu R, Xu Z, 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 (Amst)*, 2005, 4: 671—678
- Seitz E M, Brockman J P, Sandler S J. RadA protein is an archaeal RecA protein homolog that catalyzes DNA strand exchange. *Genes Dev*, 1998, 12(9): 1248—1253
- Komori K, Miyata T, DiRuggiero J. Both RadA and RadB are involved in homologous recombination in *Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem*, 2000, 275: 33782—33790 [\[DOI\]](#)
- Fortin G S, Symington L S. Mutations in yeast Rad51 that partially bypass the requirement for Rad55 and Rad57 in DNA repair by increasing the stability of Rad51-DNA complexes. *EMBO J*, 2002, 21: 3160—3170 [\[DOI\]](#)
- Hope J C, Maftahi M, Freyer G A. A postsynaptic role for Rhp55/57 that is responsible for cell death in Deltarq1 mutants following replication arrest in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 2005, 170: 519—531 [\[DOI\]](#)
- Yokoyama H, Sarai N, Kagawa W. Preferential binding to branched DNA strands and strand-annealing activity of the human Rad51B, Rad51C, Rad51D and Xrcc2 protein complex. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: 2556—2565 [\[DOI\]](#)
- Miller K A, Sawicka D, Barsky D, et al. Domain mapping of the Rad51 paralogs protein complexes. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(1): 169—178 [\[DOI\]](#)
- Guy C P, Haldenby S, Brindley A. Interactions of RadB, a DNA repair protein in archaea, with DNA and ATP. *J Mol Biol*, 2006, 358(1): 46—56 [\[DOI\]](#)