

* 学术论文 *

功能型 DNA 重组修复蛋白质 RecR 的体内分布示踪*

邱洁芳 潘学峰**

北京理工大学生命科学与技术学院, 北京 100081

摘要 RecR 是参与大肠杆菌 (*E. coli*) 同源重组的蛋白质, 在真核生物中存在功能保守性组分. 通过构建 *recR-yfp* 融合基因及其表达载体, 对大肠杆菌菌体内 RecR 蛋白的分布情况进行了活体观察. 显微镜观察结果表明, RecR 蛋白一般在菌体的拟核区起作用. 通过对比紫外线敏感性, RecR-YFP 在重组质粒上提高了 *recR* 缺陷型大肠杆菌的抗紫外线能力, 表明重组质粒表达的融合蛋白 RecR-YFP 具有生物活性, 能够提高 *recR* 缺陷型大肠杆菌的存活率.

关键词 RecR 黄色荧光蛋白 DNA 修复 同源重组 大肠杆菌

DNA 复制、损伤修复和重组对维护基因组的稳定性意义重大, 很多情况下 DNA 的复制、损伤修复和重组的异常与威胁人类健康的肿瘤和遗传病的发生密切相关^[1,2]. RecR 是参与大肠杆菌同源重组的蛋白质, 分子质量为 22 ku, 本身在离体条件下不具有 DNA 结合能力^[3,4], 但能与 RecF 和 RecO 结合形成 RecFOR 复合体. RecFOR 促进 RecA* 结合到被 SSB 蛋白覆盖的 DNA 单链区, 然后籍 RecA* 催化 ssDNA 与 dsDNA 同源区发生链交换, 从而启动 DNA 重组反应^[5,6]. 与此同时, RecR 还参与 DNA 复制. 当 DNA 模板链出现损伤时, DNA 复制叉移动到损伤处被迫停止, 形成单链缺口, 此缺口需要在 RecFOR 的协助下通过跨缺刻合成^[7]或重组修复^[2, 5, 6, 8-11]填补, 跨过 DNA 模板损伤处, 使 DNA 复制继续进行. 从而保证 DNA 复制的完整性. 此外, SOS 反应也与 RecR 有关, RecA-ssDNA 可作为 SOS 应答的信号分子, 在多数情况下 RecA* 的形成需要通过 RecBCD 或 RecFOR 两种途径实现^[2, 5, 6, 8-10].

当前, 大肠杆菌 RecR 蛋白质的结构和功能的许

多细节尚有待进一步研究^[3, 5, 8-11]. 目前国际上有关 RecR 蛋白的研究报道主要是针对古细菌 *Deinococcus radiodurans* 中 RecR 蛋白的晶体结构和缺陷菌进行研究^[12-14]来了解 RecR 的更多功能细节. 本工作则采用了荧光蛋白体内示踪技术对大肠杆菌 RecR 蛋白在大肠杆菌细胞内的分布及工作情况进行了观察. 此法属于蛋白质功能体内研究, 相较体外研究能够直接反映功能性 RecR 蛋白在体内的分布和定位.

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

E. coli JM83 由英国爱丁堡大学 Leach 教授提供^[15]; *E. coli* AB1157 *recR* 缺陷菌则由法国国家科学研究院 Benidict Michell 教授惠赠; pUC18-*yfp* (黄色荧光蛋白基因)质粒、pUC18 质粒以及 P1 噬菌体为本实验室保藏^[15-17].

1.2 培养基和细菌培养

本工作采用培养基为 LB 培养基, 制备和使用

2009-02-08 收稿, 2009-03-16 收修改稿

* 北京理工大学自然科学基金项目资助(1060050320804)

** 通信作者, E-mail: xuefengpancam@yahoo.com.cn

方法均参照文献[16]进行。

1.3 酶、试剂盒和化学试剂

DAPI 染料购自 Sigma 公司; *Pst*I、*Bam*HI、*Hind*III 等限制性内切酶, 以及 *Tag* DNA 聚合酶, T4DNA 连接酶等均购自 MBI 公司; 质粒提取, DNA 回收等试剂盒购自 TIANGEN 公司; IPTG 和 *X-gal* 等购自华美生物工程有限公司。

1.4 构建大肠杆菌 JM83 为背景的 *recR* 缺陷菌

recR 缺陷基因的遗传背景为大肠杆菌 AB1157, 而我们的工作菌株为大肠杆菌 JM83, 故此需要构建 JM83 的 *recR* 突变体。我们利用了 P1 噬菌体转导方法[17]构建了 *E. coli* JM83 的 *recR* 缺陷菌, 同时, 利用 PCR 扩增对所得到的抗药性菌落中 *recR* 基因的缺陷情况进行确认[16], 大肠杆菌遗传背景的确定则利用 JM83 和 pUC18 质粒之间表现 α 互补, 而 AB1157 和 pUC18 之间不具 α 互补的特征[15]。

1.5 构建 *recR-yfp* 融合基因、*recR-yfp* 融合基因表达载体以及 *recR* 基因的表达载体

作为融合蛋白, 黄色荧光蛋白(YFP)有可能会影响 RecR 蛋白的体内折叠与活性。为此, 我们构建了重组质粒 *recR*- pUC18 作为融合对 RecR 体内功能影响的对照。以大肠杆菌 JM83 基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增获得 *recR* 基因, PCR 过程中所使用的引物分别为: RecR _ F: TGGCTGCAGCATTCAACGAC (含有 *Pst*I 限制性内切酶位点, 斜体下划线碱基序列), 和 RecR _ R: CTCGTAAGCITAAAACGAATC (含有 *Hind*III 限制性内切酶位点, 斜体下划线碱基序列)由北京华大基因合成。分别用限制性内切酶 *Pst*I 和 *Hind*III 对 *recR* 基因 DNA 扩增产物进行双酶切, 并把酶切过的 DNA 片段亚克隆到质粒 pUC18 的相应位点上[16], 得到的重组质粒 *recR*-pUC18 经酶切鉴定和测序确认。

1.6 构建荧光蛋白 YFP 标记的 RecR 蛋白表达体系

以大肠杆菌 JM83 基因组为模板, 通过 PCR 扩增获得 *recR* 基因, 此 PCR 扩增所使用的正向引物依然是 RecR _ F: TGGCTGCAGCATTCAACGAC (含有 *Pst*I 限制性内切酶位点, 斜体下划线碱基序列), 而反向引物中对应 *recR* 基因转录终止密码子“TAA”则被人为改造为 *Bam*HI 限制性内切酶识别序列中的

“CCT”, 即 5' CGTTGGATCCAAAACGAATC 中的斜体下划线序列。得到扩增产物之后, 分别用 *Pst*I 和 *Bam*HI 对之进行双酶切。同时, 提取含黄色荧光蛋白(YFP)基因的质粒和载体质粒 pUC18, 分别用 *Hind*III 和 *Pst*I 进行双酶切。上述酶切片段彼此连接, 以构建重组质粒 *recR-yfp*-pUC18。通过酶切鉴定连接产物的正确性(图 2), 并经测序确认, 测序引物如下: 5'-ATCCACATTGCCCTCCATC。

1.7 活体观察荧光蛋白 YFP 示踪的 RecR 蛋白

荧光显微镜下, 活体观察大肠杆菌体内的目的蛋白, 研究荧光蛋白 YFP 示踪的 RecR 蛋白的功能。同时设置合适的对照组(表 1), 使得荧光观察的结果更加准确。

表 1 荧光显微镜观察的实验组和对照组

菌株	非荧光场		荧光场	
	DAPI 染色	不用 DAPI 染色	不用 DAPI 染色	DAPI 染色
实验组 <i>E. coli</i> JM83 <i>recR</i> 突变体 含有 <i>recR-yfp</i> -pUC18	√	√	√	√
对照组 <i>E. coli</i> JM83	√	√	√	√
对照组 <i>E. coli</i> JM83 含 pUC18-YFP 质粒	√	√	√	√

1.8 荧光蛋白 YFP 标记的 RecR 功能检测

荧光显微镜下看到的 YFP 标记的 RecR 蛋白只能表明蛋白质表达, 不能因此确定 RecR 是否有活性。由于 RecR 蛋白参与重组修复, 可以通过检测其相应的紫外辐射敏感性的改变来加以表征。若荧光蛋白 YFP 标记的 RecR 蛋白具有活性, 则会保留增强 *recR* 缺陷菌的抗紫外线辐射的能力, 提高菌体紫外辐射之后的大肠杆菌 *recR* 突变体的存活率, 反之, 则不能。利用紫外线照射对比菌体的存活率的具体方法如下: 紫外灯的功率为 15 W, 波长为 254 nm, 照射距离为 30 cm, 分别对实验组和对照组照射不同时间, 计算菌体的存活率(表 2)。

表 2 紫外实验的实验组和对照组

菌株	IPTG 诱导
野生型 JM83	×
<i>recR</i> 突变体	×
对照组 <i>recR</i> 突变体含有 <i>recR</i> -pUC18 质粒	×
<i>recR</i> 突变体含有 <i>recR</i> -pUC18 质粒	√
<i>recR</i> 突变体含有 <i>recR-yfp</i> -pUC18 质粒	×
实验组 <i>recR</i> 突变体含有 <i>recR-yfp</i> -pUC18 质粒	√

2 结果与讨论

2.1 *recR*-pUC18 载体构建

利用 PCR 扩增大肠杆菌 JM83 基因组上的 *recR* 基因, 经 *Pst*I 和 *Hind*III 分别酶切, 定位克隆到质粒 pUC18 的相应位点上. 利用 α -互补筛选连接产物. 平板上挑白色菌落, 提取质粒进行酶切鉴定, 酶切结果见图 1. 双酶切和单酶切均获得了预期条带, 表明重组质粒 pUC18-*recR* 构建成功.

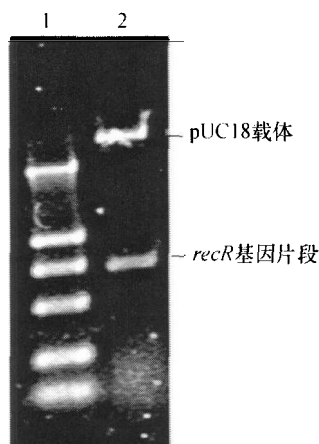


图 1 酶切鉴定 *recR*-pUC18 重组质粒

1. DNA 分子量标准(由下至上: 0.1 kb, 0.25 kb, 0.5 kb, 0.75 kb, 1 kb, 2 kb); 2. 利用 *Pst*I 和 *Hind*III 酶解之后的质粒载体和 *recR* 基因片段

2.2 *recR*-*yfp* 融合基因及其表达载体的构建

利用引入 *Pst*I 的正向引物和引入 *Bam*HI 限制性内切酶位点的反向引物对大肠杆菌基因组的 *recR* 基因进行 PCR 扩增. 在所使用的反向引物的 5' 端引入 *Bam*HI 限制性内切酶识别序列之后, *recR* 基因原有的转录终止密码子“TAA”则相应的改变成“GGA”, 从而使 *recR* 基因不能在原有转录终止密码子处终止转录. 之后, 借 *Bam*HI 限制性内切酶位点进行 *recR*-*yfp* 融合基因的构建, 如图 2 所示. 这种融合发生在 *recR* 基因的 3' 端和 *yfp* 基因的 5' 端(对应 YFP 蛋白的 N 端), 本身并不影响 *yfp* 基因的读码框, 因此通过转录和翻译得到的蛋白质的 5' 段是完整的 RecR 蛋白, 而与之连接的则是一个完整的 YFP 荧光蛋白分子. 所构建的融合基因的正确性得到 DNA 测序结果的确定(图 2).

2.3 荧光蛋白 YFP 标记的 *RecR* 蛋白的活性鉴定

2.3.1 构建大肠杆菌 JM83 为背景的 *recR* 缺陷菌

(1) PCR 法确认所构建的 *E. coli* JM83 *recR* 基因的缺陷

E. coli AB1157 基因组上的 *recR* 基因内被人为插入一个卡那霉素基因, 使原有野生型 *recR* 基因被割裂失活, 并同时获得卡那霉素抗性. 这样的 *recR* 基因割裂突变体可以经 P1 噬菌体侵染, 并可以在繁殖过程中包装进 P1 基因组, 形成含有 *recR* 卡那霉素基因的 P1 噬菌体. 然后将其侵染野生型 JM83 菌, 使 P1 噬菌体基因组上的 *recR*-卡那霉素基因通过同源重组替换掉 JM83 基因组上的 *recR* 基因, 导致 *recR* 基因失去活性. 把经过上述 P1 噬菌体转导处理的 JM83 涂布在含有卡那霉素的 LB 平板上, 37°C 过夜培养得到了抗卡那霉素的转导子. 为了进一步验证所得到的卡那霉素抗性菌落确实为含有卡那霉素基因的 *recR* 基因割裂突变体, 我们利用 PCR 对 JM83 卡那抗性突变体基因组中相应的 *recR* 基因突变进行了检测, 并和 *E. coli* AB1157*recR* 突变体相应的基因扩增结果进行了比较. 分别用 *recR* 基因缺陷的菌基因组和野生型 JM83 和 AB1157 的菌基因组为模板, PCR 扩增相应的 *recR* 基因, 结果显示 *recR* 突变体基因均比野生型 *recR* 基因多一个卡那霉素抗性基因, 而且 PCR 扩增行为在 *E. coli* JM83*recR* 和 *E. coli* AB1157*recR* 中表现一致(图 3), 表明 JM83*recR* 突变体基因是通过 P1 噬菌体转导 AB1157*recR* 突变体.

(2) *recR* 缺陷菌遗传背景的进一步确定

大肠杆菌 AB1157 因不能表达 β -半乳糖苷酶 C 端片段, 而不能通过蓝白菌落筛选. 而大肠杆菌 JM83 带有 β -半乳糖苷酶 C 端部分序列的编码信息, 可用蓝白菌落筛选. 通过转化分别导入 pUC18 质粒, 实验结果见图 4. 构建的 *recR* 缺陷菌(菌 JM83 为背景)在导入质粒 pUC18 后示蓝色, 说明利用 P1 噬菌体转导成功, *recR* 缺陷菌的遗传背景已经由大肠杆菌 AB1157 变为 JM83.

2.3.2 利用紫外线照射对比菌体的存活率 紫外线辐射敏感性试验结果见图 5. *recR* 缺陷菌因缺失重组修复蛋白 RecR, 紫外照射后菌体存活率明显比野生型 JM83 菌低. 当分别导入重组质粒 *recR*-

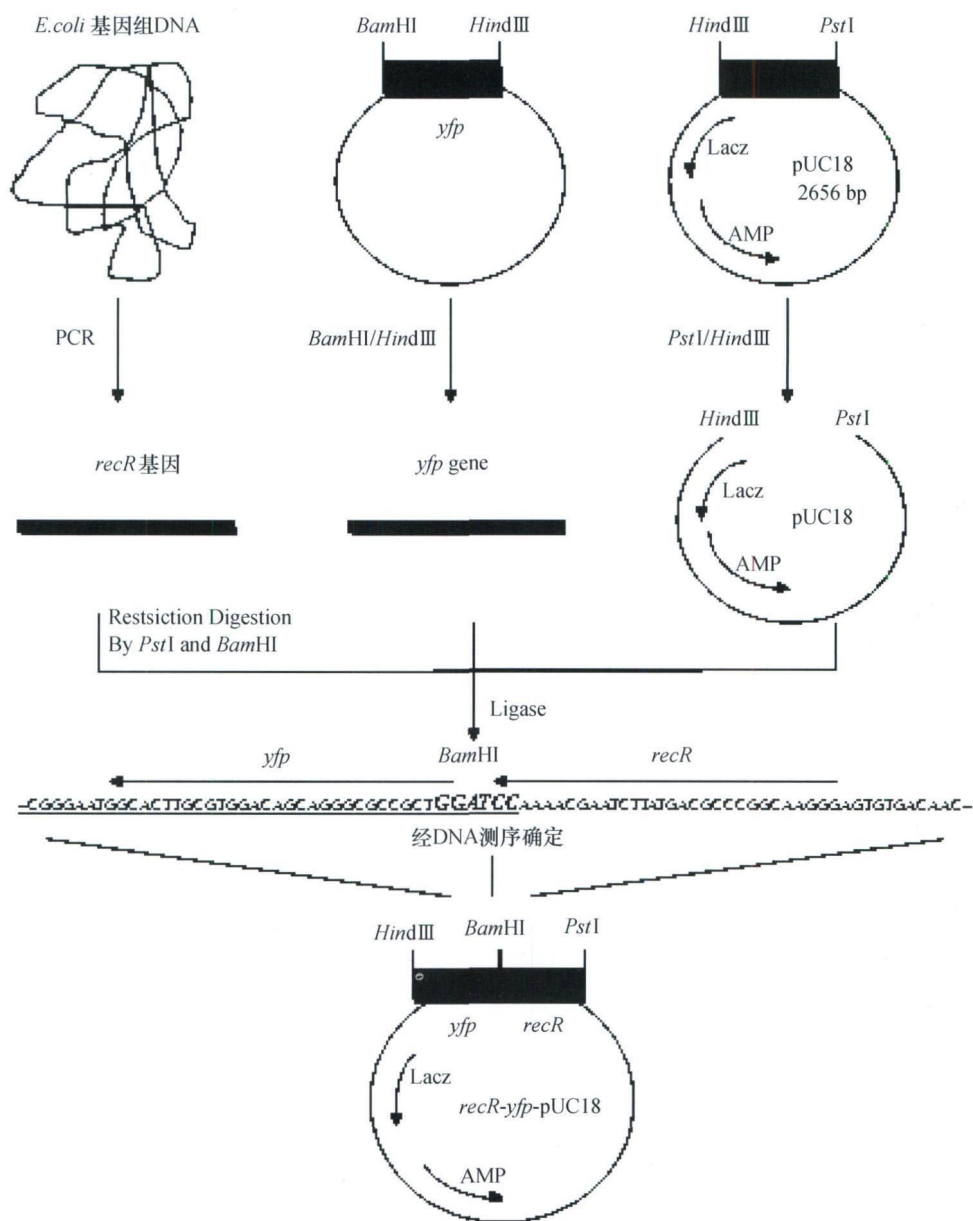


图2 *recR-yfp* 融合基因及其表达载体的构建及测序确认

pUC18 和 *recR-yfp-pUC18* 后, 经 IPTG 诱导, 重组修复蛋白 RecR 表达, 使得 *recR* 缺陷菌存活率有所提高. 虽然在重组质粒 *recR-yfp-pUC18* 中, 诱导表达的 RecR 被荧光蛋白标记, 以融合蛋白的形式表达, 但实验结果表明此融合蛋白能够提高 *recR* 缺陷菌的抗紫外线能力, 因此是具有功能的.

2.4 活体观察 YFP 示踪的 RecR 蛋白的分布

实验组和对照组的荧光显微镜观察结果见图 6. *E. coli* JM83 *recR* 缺陷菌的菌体在对数末期呈现纤

维化生长, 菌体变长, 细胞周期也相应受到干扰, 而这正好方便我们进行荧光观察. 其中, *E. coli* JM83 *recR* 缺陷菌(含重组质粒 *recR-yfp-pUC18*), 在未进行 DAPI 染色的前提下, 在荧光场中看到了较清晰的菌体, 而且菌体内的荧光主要集中在核区(图 6(a)), 说明融合蛋白正常表达, 对比经过 DAPI 染色的菌体细胞内的荧光分布, 两者之间并不表现出实质性的差异. DAPI 是一种特异性较高的 DNA 活性荧光染料, 主要与 DNA 分子中富含 AT 碱基的区域结合, 并使 DNA 分子出现荧光. 我们

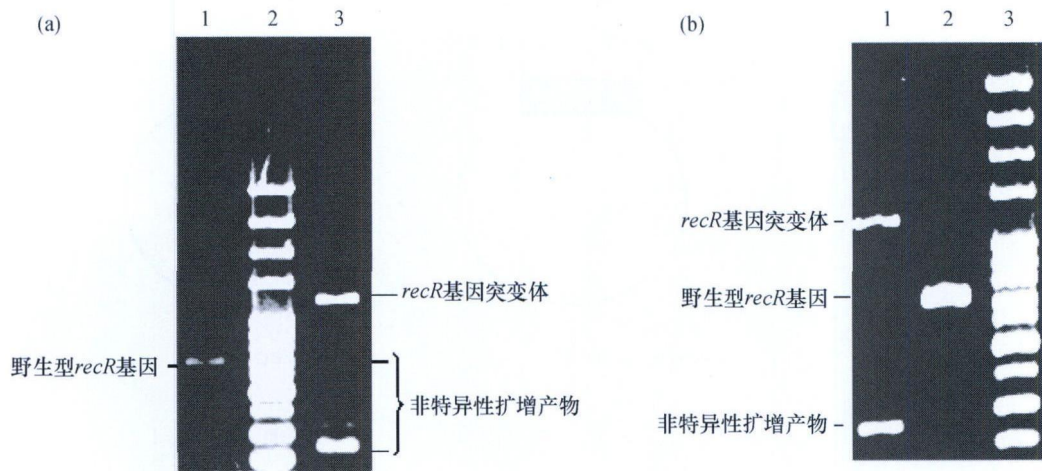


图3 PCR扩增法验证JM83 *recR* 基因突变

(a) AB1157 基因组野生型及突变体 *recR* 基因的 PCR 扩增. 1, 利用 AB1157 基因组 DNA 扩增; 2, DNA 分子量标准 (由上至下: 5, 3, 2, 1.5, 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 kb); 3 利用含有 *recR* 缺陷基因的基因组 DNA 扩增 (AB1157 背景). (b) JM83 基因组野生型及突变体 *recR* 基因 PCR 扩增. 1, 利用含有 *recR* 缺陷基因的基因组 DNA 扩增 (JM83 背景); 2, 利用 JM83 基因组 DNA 扩增; 3, DNA 分子量标准

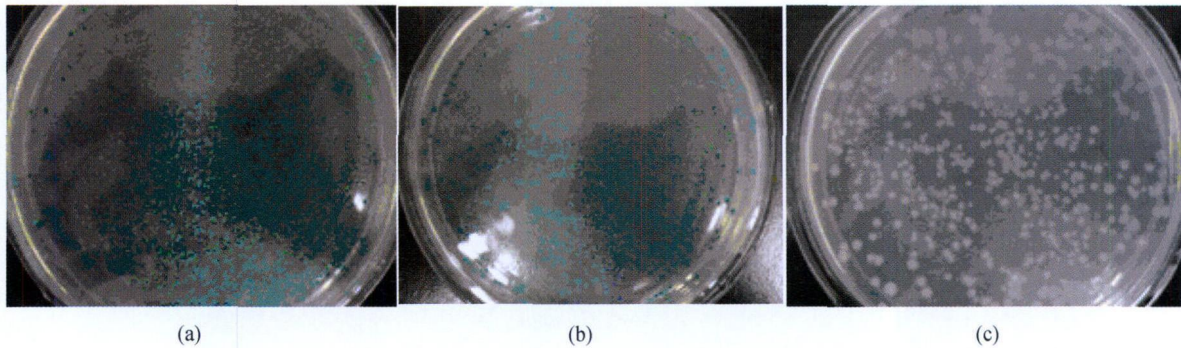


图4 转化确定 *recR* 缺陷菌的遗传背景

(a) 转化有 pUC18 质粒的野生型 JM83 形成蓝色菌落; (b) 转化有 pUC18 质粒的 JM83 *recR* 突变体形成蓝色菌落; (c) 转化有 pUC18 质粒的 AB1157 *recR* 突变体形成白色菌落

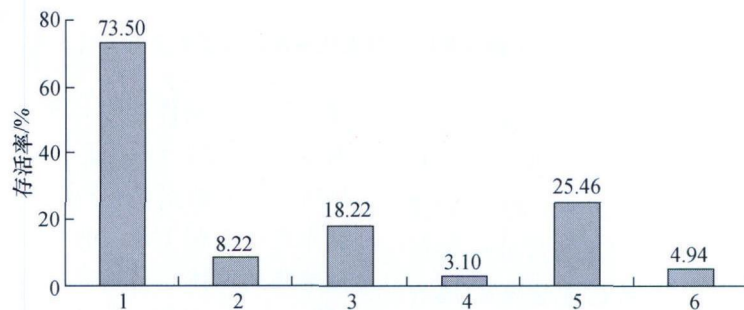
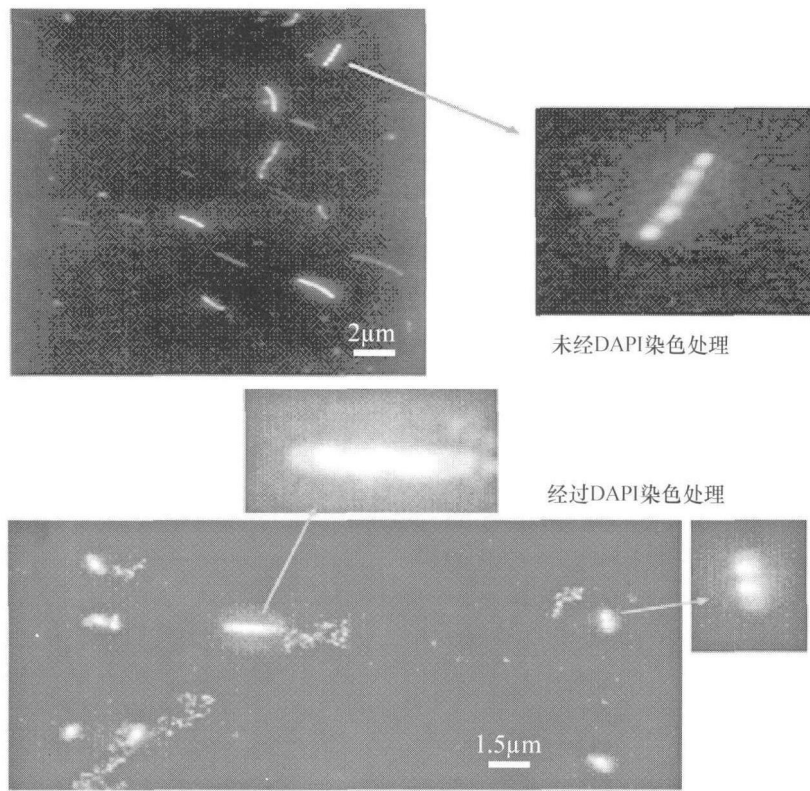
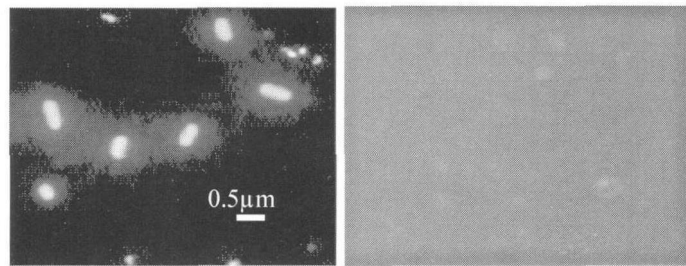


图5 对比紫外线照射后菌体的存活率

1, 野生型 JM83; 2, JM83 *recR* 突变体; 3, JM83 *recR* 突变体含有 (*recR*- pUC18), 用 IPTG 诱导表达; 4, JM83 *recR* 突变体含有 (*recR*- pUC18), 不用 IPTG 诱导表达; 5, JM83 *recR* 突变体含有 (*recR*-*yfp*-pUC18), 用 IPTG 诱导表达; 6, JM83 *recR* 突变体含有 (*recR*-*yfp*-pUC18), 不用 IPTG 诱导表达

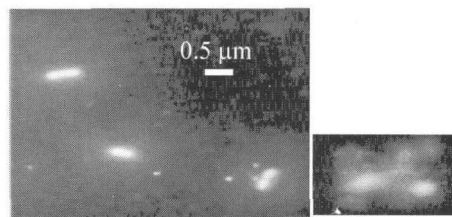


(a) JM83 *recR* (*recR-yfp-pUC18*)



(b) 荧光场中的野生型JM83

左图: 经过DAPI染色处理; 右图: 不经DAPI染色处理



(c) 荧光场中的JM83 (*yfp-pUC18*)

左图: 经DAPI染色; 右图: 不经DAPI染色处理

图6 功能型 RecR 蛋白质的活体观察

所观察到的结果表明, 携带有黄色荧光蛋白 YFP-RecR 蛋白分子也主要分布在细菌细胞的拟核区, 通过 DAPI 复染并不能进一步增进拟核区和胞浆区荧光的强度差别, 因此, YFP-RecR 蛋白一般倾向

于在菌体的核区起作用。

对照组中, 不含重组质粒的 *E. coli* JM83 未进行 DAPI 染色时, 荧光场中看不到明显的菌体(图 6 (b)). 含 pUC18-YFP 质粒的 *E. coli* JM83 未进行

DAPI 染色时, 荧光场中能清晰看到发黄绿色荧光的菌体, 荧光颜色与不染色的 *E. coli* JM83 *recR* 缺陷菌(含重组质粒 *recR-yfp*-pUC18)不太一样, 这可能是重组蛋白的结构形式影响了显微镜下黄色荧光蛋白 YFP 的荧光颜色(图 6(c)).

3 结论

本工作利用黄色荧光蛋白体内示踪技术研究了具有生物学活性的 RecR 蛋白在大肠杆菌细胞内分布情况. 首先通过分子克隆技术成功构建了荧光蛋白基因 *yfp* 标记的 *recR-yfp* 融合基因及其蛋白表达载体. 在 IPTG 诱导时融合蛋白得到了表达. 在未经 DAPI 染色处理的前提下, 荧光显微镜下活体观察到了被荧光蛋白 YFP 标记的 RecR 蛋白, 且荧光主要集中在菌体的拟核区, 而只有少量弥散在整个大肠杆菌细胞胞浆中. 为了确定所表达的 RecR 蛋白是否具有活性, 我们同时对野生菌、缺陷菌以及含重组质粒的缺陷菌的抗紫外辐射敏感性进行了表征, 通过对比紫外敏感性的结果可知, 携带有 *recR* 基因和 *recR-yfp* 基因的重组质粒均不同程度地提高了 *recR* 缺陷菌的抗紫外辐射能力, 明显提高了缺陷菌的存活率. 表明被荧光蛋白 YFP 标记的 RecR 蛋白依然具有生物活性. 因此, 我们的研究表明, 由多拷贝质粒载体携带的 *recR* 基因在表达之后, 具有功能型的 RecR 蛋白倾向于分布在大肠杆菌的核区. 这一发现暗示大肠杆菌细胞内具有功能的 RecR 蛋白可能在活体内能够直接或间接地与大肠杆菌细胞的遗传物质发生作用. 与 RecR 蛋白在离体条件下需要 ATP 分子的帮助与双链 DNA 发生较强作用的结论相一致^[9,10]. 目前尚不清楚大肠杆菌细胞内的 RecR 蛋白是否也和 *Deinococcus radiodurans* 中的 RecR 蛋白那样是通过形成四聚体发挥生物功能^[12-14], 今后我们期待会通过提高荧光显微镜的分辨率对这个问题进行进一步的分析研究.

致谢 本工作受到北京理工大学自然科学基金资助. 同时, 英国爱丁堡大学(University of Edinburgh)D Leach 教授提供了菌种和噬菌体, 法国国家科学研究中心(CNRS)B Michell 教授提供了 AB1157*recR* 突变体; 中国农业科学院的郭荣君老师在荧光显微观察方面给予了宝贵的协助和指导. 在此一并致以衷心的感谢!

参 考 文 献

- 1 Kalluri SR. Mechanisms of disease: DNA repair defects and neurological disease. *Nature*, 2007, 3(4): 162-172
- 2 潘学峰. 基因的自身维护与疾病的发生. 北京: 科学出版社, 2004, 1-403
- 3 Mahdi AA, Lloyd RG. The *recR* locus of *Escherichia coli* K-12: Molecular cloning, DNA sequencing and identification of the gene product. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17(17): 6781-6794
- 4 Yeung T, Mullin DA, Chen KS, et al. Sequence and expression of the *Escherichia coli* *recR* locus. *J Bacteriol*, 1990, 10: 6042-6047
- 5 邱洁芳, 潘学峰. 大肠杆菌细胞 DNA 复制、修复和重组的连接. *生物化学与生物物理进展*, 2008, 35(7): 751-756
- 6 Stauffer ME, Chazin WJ. Structural mechanisms of DNA replication, repair and recombination. *J Biol Chem*, 2004, 279(30): 30915-30918
- 7 Phuong P, Savithri R, Roger W, et al. Roles of DNA polymerases V and II in SOS-induced error-prone and error-free repair in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(15): 8350-8354
- 8 Masayoshi H, Jin I, Masatoshi Y, et al. Identification of the RecR toprim domain as the binding site for both RecF and RecO. *J Biol Chem*, 2006, 281(27): 18549-18559
- 9 Umezumi K, Chi NW, Kolodner RD. Biochemical interaction of the *Escherichia coli* RecF, RecO, and RecR proteins with RecA protein and single-stranded DNA binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(9): 3875-3879
- 10 Webb BL, Cox MM, Inman RB. An interaction between the *Escherichia coli* RecF and RecR proteins dependent on ATP and double-stranded DNA. *J Biol Chem*, 1995, 270(52): 31397-31404
- 11 Sakai A, Cox MM. RecFOR and RecOR as distinct RecA loading pathways. *J Biol Chem*, 2009, 284(5): 3264-3272
- 12 Honda M, Fujisawa T, Shibata T, et al. RecR forms a ring-like tetramer that encircles dsDNA by forming a complex with RecF. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(15): 5013-5020
- 13 Makharashvili N, Mi T, Koroleva O, et al. RecR-mediated modulation of RecF dimer specificity for single- and double-stranded DNA. *J Biol Chem*, 2009, 284(3): 1425-1434
- 14 Lee BI, Kim KH, Park SJ, et al. Ring-shaped architecture of RecR: Implications for its role in homologous recombinational DNA repair. *EMBO J*, 2004, 3(10): 2029-2038
- 15 Yanisch-Perron C, Viera J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 1985, 33: 103-119
- 16 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd. Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 17 Miller JH. *A Short Course in Bacterial Genetics*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992, 263-278