

文章编号: 1673-0062(2010)01-0078-05

## 奇球菌 pprI 基因增强枯草芽孢杆菌细胞抗性的研究

高加旺<sup>1</sup>, 谢水波<sup>1, 2\*</sup>, 唐振平<sup>2</sup>, 刘迎久<sup>1</sup>, 刘金香<sup>1</sup>, 唐东山<sup>1</sup>

(1. 南华大学 污染控制与资源化技术湖南省高校重点实验室, 湖南 衡阳 421001;

2. 南华大学 铀矿冶生物技术国防重点学科实验室, 湖南 衡阳 421001)

**摘要:** pprI 是近来在奇球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 中发现的一个极其重要的 DNA 修复开关基因. 本实验利用穿梭质粒 pRADZ3 将其转入枯草芽孢杆菌 (B-1) 中稳定表达, 并与转化了空白质粒的菌株 (B-2) 对照, 观察了改造后的两种菌株在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化压力和紫外线辐照下的存活率. 结果表明, 在两种情况下 B-1 菌株存活率明显高于 B-2 菌株. 证明奇球菌 pprI 基因在枯草芽孢杆菌中的稳定表达能够增强细胞抗氧化与抗紫外辐射能力.

**关键词:** 奇球菌; 枯草芽孢杆菌; pprI H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 紫外线

**中图分类号:** Q939.11; Q937 **文献标识码:** A

## Study on Enhances of The Resistance in *Bacillus subtilis* by *Deinococcus radiodurans* pprI

GAO Jiawang<sup>1</sup>, XIE Shuibao<sup>1, 2\*</sup>, TANG Zhenping<sup>2</sup>,  
LIU Yingjiu<sup>1</sup>, LIU Jinxiang<sup>1</sup>, TANG Dongshan<sup>1</sup>

(1 Hunan Provincial Key Laboratory of Pollution Control and Resources Technology, University of South China

Hengyang Hunan 421001, China 2 Key Discipline Laboratory for National Defence for Biotechnology

in Uranium Mining and Hydrometallurgy University of South China Hengyang Hunan 421001, China)

**Abstract** pprI, a newly identified gene switch responsible for extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*, plays a central regulatory role in multiple DNA damage repair and protection pathways in response to radiation stress. To evaluate whether pprI also functions in the radioresistance in other organisms, we expressed pprI in the *Bacillus subtilis* (B-1) using the complementation plasmid pRADZ3-pprI based on plasmid pRADZ3 and empty plasmid pRADZ3 was transformed to *Bacillus subtilis* (B-2) compared with *Bacillus subtilis* (B-1). The viabilities under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidative stress and ultraviolet irradiation were

收稿日期: 2009-12-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (10775065); 湖南省高校创新平台开放基金资助项目 (09K076); 湖南省重点学科基金资助项目 (湘教通 [2006]180号)

作者简介: 高加旺 (1983-), 男, 河北衡水人, 南华大学城市建设学院硕士研究生. 主要研究方向: 水处理理论与技术. \* 通讯作者.

observed The results showed that the *Bacillus subtilis* (B-1) can enhance the viabilities compared with the *Bacillus subtilis* (B-2) under the above two cases It is concluded that the expression of *Deinococcus Radiodurans* pprI can enhance the antioxidation and antiultraviolet irradiation in *Bacillus subtilis*

**Key words** *Deinococcus Radiodurans*; *Bacillus subtilis*; pprI; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; ultraviolet

## 0 引言

奇球菌是一种对电离辐射、紫外线、强氧化剂和化学诱变剂具有超强耐受力的极端微生物, 这种独特抗性归因于其具有高效而准确的 DNA 修复系统<sup>[1]</sup>. 最近研究表明, 负责这一抗性的开关基因—pprI 在 DNA 损伤修复中起着极为重要的作用, 它能诱导 DNA 修复相关基因 recA 和 ppvA 的表达并显著提高过氧化氢酶的活性<sup>[2]</sup>, 通过生物信息学的方法对 pprI 进行同源性搜索及比对, 在 NCBI 基因组数据库中并没有找到显著同源的类似物, 表明 pprI 可能是奇球菌所特有的基因. 其中 RecA 修复酶及其同源物广泛的存在于原核和真核生物中, 在 DNA 损伤修复生物过程中发挥了十分重要的作用<sup>[3-4]</sup>. 利用 BLAST 比对奇球菌和枯草芽孢杆菌的 recA 基因, 发现其具有较大相似性. 因此我们推测将 pprI 基因在枯草芽孢杆菌中表达能够显著增强其 DNA 损伤修复机制.

为研究 pprI 基因在枯草芽孢杆菌中表达与细胞抗性之间的关系, 通过 PCR 技术 (聚合酶链式反应) 复制扩增 pprI 基因, 并通过穿梭质粒 pRADZ3 将 pprI 基因导入大肠杆菌 JM109 中, 在提取质粒最终转入枯草芽孢杆菌中稳定表达, 并对照空白株进行了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化压力和紫外线辐照下的存活率对比试验.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

奇球菌野生型菌株 R1、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌购买于中国普通微生物菌种保藏管理中心, pMD<sup>TM</sup> 18-T Vector 载体, 各种限制性内切酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶以及合成引物购自 Takara 公司, TaqDNA 聚合酶、dNTP 购自上海博亚公司, 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 BioDev 公司. 穿梭质粒 pRADZ3 为美国华盛顿大学 Lidstrom 教授赠送. 用 TGY 培养基 (每升含胰蛋白冻 5 g 酵母提取物 3 g 葡萄糖 1 g pH 7.0) 培养奇球菌 R1, 温度 30℃; 用 LB 培养基 (每升含胰蛋白冻 10 g 酵母提取物 5 g 氯化钠 10 g pH 7.4) 培养大肠

杆菌, 温度 37℃. 大肠杆菌转化采用 CaCl<sub>2</sub> 法<sup>[5]</sup>.

### 1.2 奇球菌基因组 DNA 的提取

挑取奇球菌单个菌落, 接种到 TGY 液体培养基中, 30℃ 振荡培养 48 h 取菌液 12 000 r/min 离心 1 min 后, 加 TE 缓冲液重悬, 并加入浓度为 50 mg/ml 的溶菌酶 10 μL, 37℃ 温水浴 1 h 后提取全基因组 DNA<sup>[5]</sup>.

### 1.3 pprI 基因的克隆

根据已公布的 pprI 基因组序列 (起始密码子为 GTG) 设计引物, 上游引物: 5' - TAACTAGTGGCCAGTGCCAACGTC - 3', 划线部分为 SpeI 酶切位点, 下游引物: 5' - TACATATGTTCACTGTG-CAGCGTC - 3', 划线部分为 NdeI 酶切位点; 采用 50 μL 的 PCR 反应体系扩增 pprI 基因片段, 体系为: 10 μL 基因组 DNA 模板, 5 μL 上游引物, 5 μL 下游引物, 25 μL TaqDNA 聚合酶, 5 μL ddH<sub>2</sub>O; 扩增条件: 94℃ 预变性 5 min 后进入循环, 94℃ 保持 45 s, 62℃ 保持 45 s, 72℃ 保持 1 min, 30 个循环后 72℃ 保温 10 min, 4℃ 保存. 取 6 μL PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 观测结果.

### 1.4 重组穿梭质粒的构建

参照凝胶回收试剂盒说明回收纯化目的片段, 然后将其连接到亚克隆载体 pMD<sup>TM</sup> 18-T Vector 上, 并将连接产物转入大肠杆菌 JM109 感受态细胞中, 加入 LB 培养基 37℃ 振荡水浴 1.5 h 后, 菌液涂布于含氨苄青霉素和 X-gal 的 LB 琼脂培养基上, 37℃ 培养过夜. 次日在培养基上挑取白色菌落, 扩增培养, 继以质粒小提并酶切和 PCR 鉴定, 将鉴定为阳性克隆的菌液送上海生物工程技术有限公司测序.

重组质粒用 SpeI 和 NdeI 酶切消化后, 片段连入相同酶切消化后的 pRADZ3 质粒上, 命名为 pRADZ3pprI 并将空质粒 pRADZ3 转入枯草杆菌做对照.

### 1.5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化压力下的存活率

将 pRADZ3pprI 导入枯草芽孢杆菌 (改造后命名为 B-1) 与空白质粒 pRADZ3 转入枯草芽孢杆菌作对照 (改造后命名为 B-2). 用 LB 液体培养基中培养 B-1 和 B-2 至指数生长期 (OD<sub>600</sub> 值

约 0.22)和稳定生长期 ( $OD_{600}$ 值约 0.39)时,加入  $H_2O_2$  分别至终浓度为 5, 10和 20 mmol/L, 1 h 内每隔 20 min取一次菌液, 作平板计数, 计算其存活率。

### 1.6 紫外线辐射下的存活率

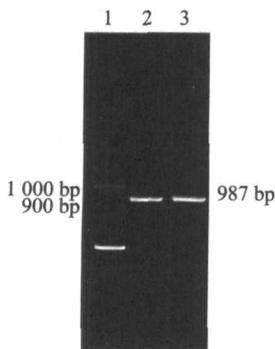
将 37°C过夜培养的枯草芽孢杆菌 B-1和 B-2接种于新鲜 LB液体培养液振荡培养 6 h 经 4 000 r/min 4°C离心 15 min, 去上清, 加入无菌生理盐水稀释到适当浓度(约  $10^8$  CFU/mL)制成细菌悬浮液。取 10 mL细菌悬浮液置于无菌小平皿, 在 UV-B紫外灯 ( $\lambda = 245$  nm)下 30 cm处照射, 60 s内每隔 10 s取 1 mL注入 9 mL生理盐水中, 稀释后涂布于固体培养基平板, 37°C温箱培养 24 h, 平板计数, 计算其存活率。

存活率计算公式: 存活率 (%) =  $[\text{Log}(\text{辐射后存活菌数}) / \text{Log}(\text{对照存活菌数})] \times 100\%$

## 2 结果与分析

### 2.1 奇球菌 pprI基因的克隆

以奇球菌全基因组 DNA为模板进行 PCR 克隆, 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 与 100 bpDNA marker 比对, 在 900 bp与 1 000 bp之间发现有明亮的扩增条带目, (如图 1泳道 2和 3), 与预计 pprI基因 987 bp的大小一致。(图 1)



1. 100bp DNAMarker 2, 3 PCR产物 pprI基因。

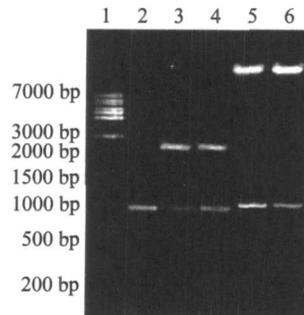
图 1 pprI基因 PCR 扩增

Fig 1 The results of PCR and ran agarose gels electrophoresis

### 2.2 重组穿梭质粒的构建与鉴定

将 PCR 目的条带割胶回收, 与 pMD<sup>TM</sup> 18-T Vector载体连接, 转化到大肠杆菌 JM 109宿主菌中。提取质粒 T Vector- pprI利用 PCR 方法检测, 通过 PCR 扩增出的条带片段与预期结果相符(如图 2泳道 2), 证明将奇球菌 pprI基因亚克隆到

pMD<sup>TM</sup> 18-T Vector载体。然后将质粒经 SpeI和 NdeI双酶切(如图 2泳道 3, 4)并连接至相同酶切消化后 pRADZ3质粒, 将构建好的重组表达质粒 pRADZ3- pprI经 SpeI和 NdeI双酶切鉴定(如图 2泳道 5, 6), 结果证明目的基因已克隆到 pRADZ3质粒中。



1. 1 kbp DNAMaker 2 PCR产 pprI基因;  
3, 4 SpeI和 NdeI酶切 pMD<sup>TM</sup> 18-T(ppr+)质粒;  
5, 6 SpeI和 NdeI酶切 pRADZ3- pprI质粒。

图 2 重组穿梭质粒的酶切鉴定

Fig 2 The results of identification of recombinant shuttle plasmid

### 2.3 pprI基因的测序与序列分析

将 pMD<sup>TM</sup> 18-T Vector- pprI亚克隆重组质粒送上海生工生物工程技术服务有限公司用 T3-T7通用引物进行双向测序, 测序得到 pprI基因序列。用 OMIGA 2.0软件对测序克隆所得的 pprI基因序列和 NCBI提供的 DR0167进行比对, 结果表明克隆的 pprI基因序列与文献 [6]完全一致。

### 2.4 pprI的补偿对枯草芽孢杆菌 $H_2O_2$ 压力存活率影响

为了确定奇球菌 pprI的表达是否能够增强枯草芽孢杆菌的抗氧化能力, 对 B-1和 B-2菌株分别进行了相同生长期下相同浓度  $H_2O_2$  的处理, 并记录其存活率的对比变化情况。如图 3 在指数生长期 ( $OD_{600}$ 约为 0.22),  $H_2O_2$  浓度为 5 mmol/L, 一小时后, 两者的存活率都在 60% 以上, 而 B-1比对照 B-2要高 6% 左右; 在  $H_2O_2$  浓度为 10 mmol/L, 一小时后存活率都降到原来的 50% 左右, B-1比对照的 B-2大约高出 10%; 而在浓度为 20 mmol/L  $H_2O_2$  时, 两者的下降趋势都很快, 一小时后 B-1降为原来的 25%, B-2降为原来的 11%, 在这一浓度下, 前者比后者在存活率上要高出约 13% 左右。在稳定生长期 ( $OD_{600}$ 约为 0.39), 各个浓度下的下降趋势都比

指数生长期来的延缓, 5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 两者的存活率都在 80% 以上, B-1 比对照 B-2 要高 5% 左右; 10 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 一小时后存活率降为原来的 70% 附近, B-1 比对照的 B-2 大约高出 7%;

而在浓度为 20 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 一小时后 B-1 降为原来的 59%, B-2 降为原来的 49%, 在这一浓度下, 前者比后者在存活率上要高出约 10%, 如图 4.

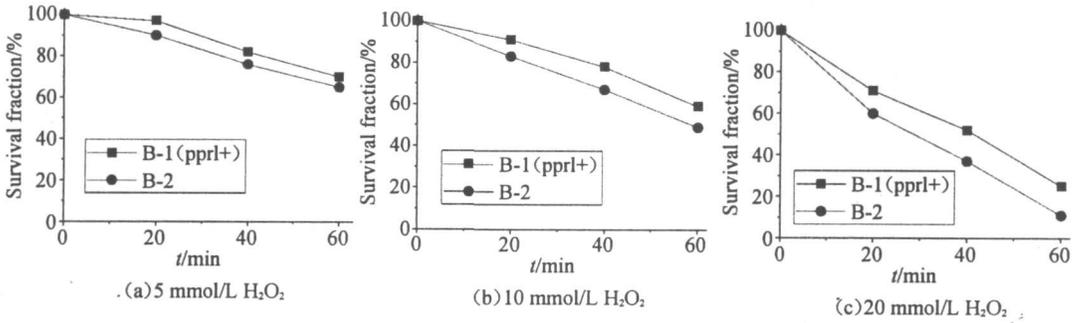


图 3 指数生长期 (OD<sub>600</sub> = 0.22) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化压力下的细胞存活率

Fig 3 Scavenging activities of B-1 (pprI+) and B-2 (empty vector pRADZ3) against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at the growth phase (OD<sub>600</sub> = 0.22)

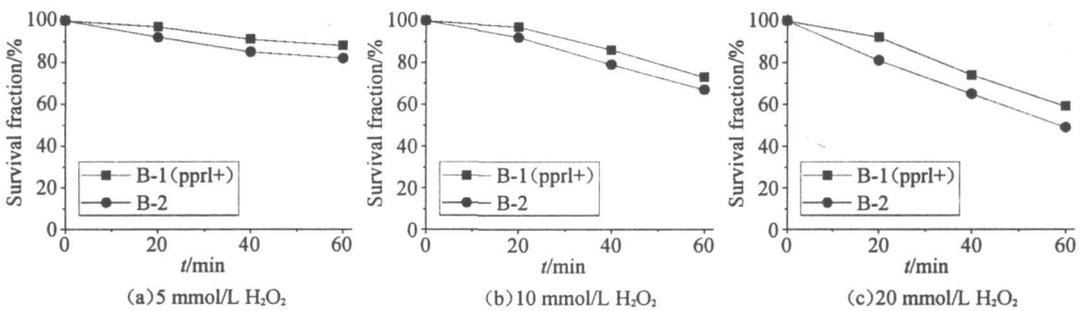


图 4 稳定生长期 (OD<sub>600</sub> = 0.39) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化压力下的细胞存活率

Fig 4 Scavenging activities of B-1 (pprI+) and B-2 against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at the stable phase (OD<sub>600</sub> = 0.39)

### 2.5 紫外线辐射下对枯草芽孢杆菌 B-1、B-2 存活率影响

将菌株 B-1 和 B-2 在相同条件下经紫外照射 30 s 后, 平板上 B-2 的菌落明显少于 B-1. B-1 菌株的存活率可以达到 30% 左右, 而 B-2 只有 22%. 当照射时间延伸到 60 s 时, B-2 的存活率只有 6%, 而 B-1 还有 20% 左右 (见图 5). 并且在刚开始的 40 s 内菌株的存活率下降很快, B-2 迅速下降到了 10%, 而 B-1 下降到 20%, 此后减缓. 说明 B-1 与 B-2 菌株在开始时由于受紫外辐射引起细胞遗传物质突变, 大量死亡. 但在随后, 由于 pprI 基因在枯草芽孢杆菌 B-1 中稳定表达能够显著增强其修复酶对 DNA 紫外线损伤的修复, 使得其相对于 B-2 菌株有较高的存活率. 证明 B-1 菌株对紫外辐射具有较好的防护作用.

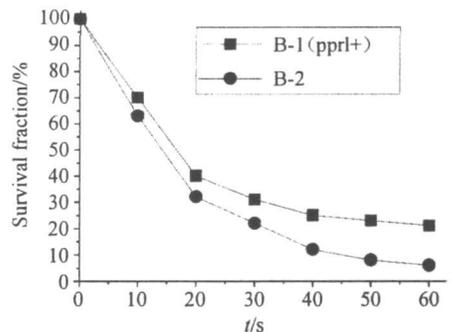


图 5 紫外线 (λ = 245 nm) 辐射下的细胞存活率  
Fig 5 Scavenging activities of B-1 (pprI+) and B-2 under ultraviolet irradiation

## 3 讨论

长期以来, 关于奇球菌对极端环境适应机理

已经成为研究的焦点,目前,奇球菌的基因组序列分析已经完成,其中大量有关 DNA 损伤修复的功能基因以及抗性酶可能是这种极端抗性的主要因素.例如 *recA* 在 DNA 重组修复和链间交换过程中起着十分关键的作用,缺少 *recA* 基因的变异株对紫外线和电离辐射相当敏感<sup>[7]</sup>.

有研究表明,奇球菌抗氧化酶活性明显高于大肠杆菌,表明奇球菌中有关抗氧化酶合成的调控可能具有特殊的机制,但缺乏相应的研究<sup>[8]</sup>.而目前发现的 *pprI* 基因无疑是 DNA 损伤修复机制中一个十分重要的开关基因,在极端环境下会开启部分与 DNA 修复直接相关的因子(如 *recA*、*pprA* 等).虽然到目前为止,在 NCBI 基因组数据库中并未发现具有较高同源性的类似物,但通过利用 BLAST 比对奇球菌和枯草芽孢杆菌的 *recA*,发现其相似性为 68%,因此推测这一外源基因在枯草芽孢杆菌中的表达会发挥部分功能.本研究成功地将 *pprI* 基因通过穿梭质粒 *pRADZ3* 导入到枯草芽孢杆菌 B-1 中,发现改造后的枯草芽孢杆菌对强氧化剂  $H_2O_2$  和紫外线的抗性能力显著提高,在对强氧化剂  $H_2O_2$  的抗性方面,在指数生长期内, B-1 比对照株 B-2 的存活率要高约 10% 左右;而稳定生长期, B-1 比 B-2 的存活率要高约 7% 左右,且随氧化剂浓度增加而增加,说明 *pprI* 基因在大肠杆菌中的稳定表达能够增强大肠杆菌细胞的抗氧化能力.在对紫外线辐射的抗性方面,枯草芽孢杆菌 B-1 比对照菌株 B-2 的存活率高出两倍左右,显著增强了枯草芽孢杆菌抗非离子辐射的能力.由此推测, *pprI* 基因的导入对枯草芽孢杆菌 DNA 修复的关键酶 *RecA* 的表达具有促进作用. *pprI* 作为一个奇球菌独有的 DNA 修复开关基因在生物抗氧化与非电离辐射方面将具有普遍适用性.

当前放射性核污染对环境威胁日益严重,但普通微生物吸附剂存在着对辐射敏感,难以在长

期核辐射下生存,而采用灭活菌体富集核素不能发挥长期作用,不适宜较低浓度铀矿冶地域的环境修复.目前奇球菌中可能存在着多个具有调控菌体抗性的独特基因(类似于 *pprI*),这些功能基因又可以进一步应用于其他物种适应极端环境的基因改造领域,如增强其他物种的抗极端环境能力,还可以用于构建处理强氧化性化学污染的基因工程菌.这些改良的菌种将在低浓度铀矿冶地域环境特点的环境修复与资源回收中具有广阔的应用前景.

#### 参考文献:

- [1] Minton K W. DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* [J]. *Mol Microbiol* 1994, 13: 9-15.
- [2] Hua Y, J Nanmi I, Gao G J, et al. *PprI* a general switch responsible for extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans* [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 2003, 306: 354-360.
- [3] Cox M M. Recombinational DNA repair in bacteria and the *RecA* protein [J]. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1999, 63: 310-366.
- [4] Roca A J, Cox M M. *RecA* protein structure, function, and role in recombinational DNA repair [J]. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1997, 56: 129-223.
- [5] 奥斯伯 F M, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指南 [M]. 5 版. 北京: 科学出版社, 2008.
- [6] White O, Eisen J A, Heidelberg J F, et al. Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1 [J]. *Science* 1999, 286: 1571-1577.
- [7] 高冠军, 华跃进. 耐辐射奇球菌 *recA* 基因的克隆、表达及其对 *recA* 缺损大肠杆菌辐射抗性的影响 [J]. *微生物学报*, 2004, 44(1): 41-44.
- [8] 田兵, 华跃进. 耐辐射球菌清除活性氧自由基及对 DNA 的保护作用 [J]. *核农学报*, 2004, 18(5): 376-380.