

硫化叶菌超表达载体构建及 Mre11 的表达

张文茂 彭楠 余群新 葛向阳

华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 利用 araS 启动子并在穿梭载体 pZC1 及 pEXA 的基础上构建硫化叶菌超表达载体 pZC2, 成功超表达了带有 C 端 6×His 标签序列的 DNA 双链断裂修复蛋白 Mre11, 进一步采用共纯化法鉴定到 Mre11 蛋白的作用配体 Rad50, 确定上述蛋白在高浓度盐(500 mmol/L NaCl)中仍能形成 MR 复合体, 表明该复合物在逆性条件下可能仍保持 DNA 断链修复的功能。进一步共纯化分析表明, 基因组 DNA 片段是 MR 复合体形成的必需条件, 在缺乏基因组 DNA 片段的情况下古菌分子伴侣蛋白结合并可能保护 Mre11, 该表达系统能够有效地应用于鉴定蛋白质的体内作用网络。

关键词 古菌; 硫化叶菌; 超表达载体; Mre11 蛋白; 共纯化

中图分类号 Q 936 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)03-0293-05

硫化叶菌蛋白通常采用异源表达来研究其功能, 古菌翻译后修饰作用会影响其蛋白功能, 因此一直希望能够构建硫化叶菌超表达载体用于分析受修饰蛋白的特定功能, 同时采用共纯化法鉴定蛋白质的作用网络。硫化叶菌生长在 75 ℃的高温环境, 培养困难, 且缺乏有效的遗传工具, 因此有效的嗜热菌表达载体一直未构建成功。Jonuscheit 等^[1]、Berkener 等^[2]在 *Sulfolobus solfataricus* P2 和 *S. acidocaldarius* 中分别构建了基于 SSV1 病毒和 pRN1 质粒的表达载体, 但这些表达载体仅成功地表达了一些与硫化叶菌代谢有关的酶。目前, 还没有成功表达与嗜热古菌生命活动相关重要蛋白的报道, 如作用于 DNA 双链断裂修复的 Mre11 蛋白等。因此构建能够超表达嗜热古菌生命活动必需蛋白的表达载体, 并以此为基础研究其功能显得十分重要。

本研究构建的硫化叶菌超表达载体 pZC2 是在华中农业大学农业微生物学国家重点实验室古菌分子实验室构建的硫化叶菌-大肠杆菌穿梭质粒 pZC1^[3] 和 pEXA^[4] 的基础上构建而成的, pEXA 载体是在 pZC1 的基础上消除了 *Nde* I 克隆位点构建而成, pEXA 和 pZC1 均只能用于基因克隆, 没有表达基因的功能。笔者在硫化叶菌-大肠杆菌穿梭载体 pEXA 的基础上插入阿拉伯糖诱导性启动子和

6×His 编码序列来构建硫化叶菌的超表达载体 pZC2, 使 pZC2 不仅可以用于基因的克隆, 还可在硫化叶菌中对基因直接进行表达, 用于基因功能分析及其纯化鉴定蛋白作用网络, 解决了硫化叶菌蛋白在大肠杆菌胞内表达困难的问题, 而且由于阿拉伯糖启动子受严谨调控, 此载体可避免非诱导培养基中的本底表达, 同时在阿拉伯糖诱导培养基中进行高水平表达; 并且 His-tag 的加入更能让表达的蛋白通过亲和层析直接进行纯化, 因此该载体的优点比较显著。笔者利用此载体表达了硫化叶菌必需蛋白 Mre11, 采用共纯化方法鉴定与 Mre11 相互作用的蛋白配体, 对进一步了解 Mre11 蛋白的作用机制有重要意义。

本研究不仅开发了硫化叶菌超表达载体这个有效的工具, 同时为重要蛋白的体内功能研究奠定了一个较好的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1) 菌株。冰岛硫化叶菌 E233S (*S. islandicus* E233S, \triangle *pyrEF*, \triangle *lacS*)、硫磺矿硫化叶菌 P2 (*S. solfataricus* P2)、*E. coli* DH5 α 及穿梭质粒 pEXA 来自华中农业大学农业微生物学国家重点实

验室古菌分子实验室。

2) 主要试剂。限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司; Fast Pfu DNA 聚合酶购自全式金公司; PCR 清洁回收试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒基因组 DNA 提取试剂盒以及 Ni-NTA 树脂购自北京 TIANGEN 生物技术有限责任公司; DNA Marker 购自 TaKaRa 公司; 其他化学试剂均为分析纯。

1.2 超表达载体 pZC2 构建

根据 *S. solfataricus* P2 的基因组设计用于 PCR 扩增 araS 启动子的正向引物 araS F (5'-ACATGCATGC ATGTTAACAGTTAGGTAT -3') 和 反向引物 araS R (5'-GGAATTCCATATGA GCT-TCACCTCATTCTCGGG-3'), 并分别在引物的 5' 端引入限制性酶切位点 *Sph*I 和 *Nde*I(下划线处)。PCR 扩增条件为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 51 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。随后将纯化后的阿拉伯糖启动子 PCR 产物和 pEXA^[3] 分别用 *Sph* I / *Nde* I 酶切后切胶回收, 酶连, 热激法转化大肠杆菌 DH5 α , 用氨苄青霉素作为筛选标记分离单菌落。挑取单菌落培养, 抽质粒验证, 即实现在穿梭质粒 pEXA 上插入阿拉伯糖启动子, 命名为 pEXAa。6×His 标签编码序列由引物 HisF (5'-GGCCGCCATCATCATCAC-CACCATC-3') 和 HisR (5'-CCCGGGATGGTG-GTGATGATGATGGC-3') 退火而成并直接形成 *Not* I 和 *Xma* I 酶切后的粘性末端。将该退火产物插入 *Not* I / *Xma* I 处理后的 pEXAa 中得到硫化叶菌表达载体 pZC2(图 1)。

1.3 重组质粒构建

根据 *S. solfataricus* P2 基因组分别设计用于 PCR 扩增 *mre11* 的引物 *mre11F* (5'-CTAGCTAGCGTA-CAAATTTACATATTCT -3') 和 *mre11R* (5'-ACGCGTCGACTAACGTTAACACCTGTTAACT -3')。同时在 2 对引物的 5' 端分别引入酶切位点 *Nde* I 和 *Sal* I。PCR 扩增条件为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 51 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。随后将 PCR 克隆产物和超表达载体 pZC2 分别用 *Nde* I / *Sal* I 酶切后清洁回收, 酶连, 热激法转化大肠杆菌 DH5 α , 用氨苄青霉素作为筛选标记分离单菌落。挑取单菌落培养, 抽质粒验证。

1.4 电转化

验证正确后的重组质粒电转化入硫化叶菌, 硫化叶菌感受态细胞制备方法、电转化步骤、硫化叶菌各培养基配方等参见文献[5]。

1.5 蛋白诱导表达及 6×His 标签蛋白纯化

将含有重组质粒的超表达菌株 ACVY 培养基诱导, 在细胞 $D_{600\text{ nm}}$ 值达到 0.8~1.0 时收集细胞重悬于破碎缓冲液 (50 mmol/L PBS, pH 7.4 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 稜唑) 中并采用超声波破碎(冰水浴条件下, 超声波功率 25%, 破碎 5 min)。破碎后 12 000 r/min、4 °C 离心 30 min 除去菌体碎片。其后将上清直接过 Ni-NTA 柱纯化, 或者上清使用 0.1% PEI(聚乙亚胺)除去 DNA 后总蛋白用 100% 硫酸铵沉淀, 离心收集蛋白沉淀后重悬于上述破碎缓冲液中并对之透析, 透析液再过 Ni-NTA 柱亲和纯化, 收集洗脱蛋白。上述纯化的蛋白经 SDS-PAGE 染色后检测蛋白成分。

1.6 蛋白质 SDS-PAGE、MALDI-TOF 及 Western blot 检测

将蛋白样品经 12% SDS-PAGE 分离后用考马斯亮蓝 R250 染色, 目的条带用手术刀切下后 Trypsin 胶内酶解, 并用 MALDI-TOF 法^[6] 分析肽指纹图谱(采用 Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer), 并在数据库中检索结果。Western blot 使用鼠抗 His-tag 抗体作一抗, 碱性磷酸酶标记的兔抗鼠抗体作为二抗, 具体步骤见文献[7]。

2 结果与分析

2.1 构建硫化叶菌表达载体

PCR 扩增出的 araS 启动子约 70 bp, 产物克隆至穿梭载体 pEXA 后得到 pEXAa。6×His 标签编码序列通过 *Not* I / *Xma* I 插入 pEXAa 得到硫化叶菌表达载体 pZC2(图 1)。需表达的目的基因可以通过 *Nde* I / *Sal* I 或者 *Nde* I / *Not* I 克隆到该表达载体上。

2.2 克隆 *mre11* 基因至表达载体 pZC2 上

使用 *mre11* 基因扩增引物, 并以 *S. solfataricus* P2 基因组为模板, 进行 PCR 扩增, 琼脂糖电泳显示得到 1 500 bp 左右的条带(图 2), 与 *mre11* 的基因预期条带大小一致。PCR 产物经 *Nde*I / *Sal*I 双酶切、回收后克隆至 pZC2 上, 得到 pZC2-*mre11*。重组质粒经酶切验证正确后转化至 *S. islandicus* E233S。

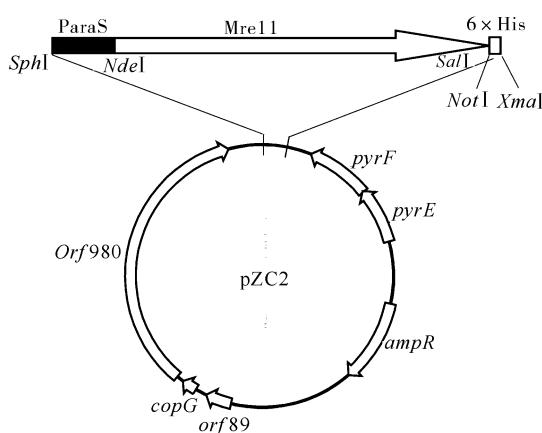
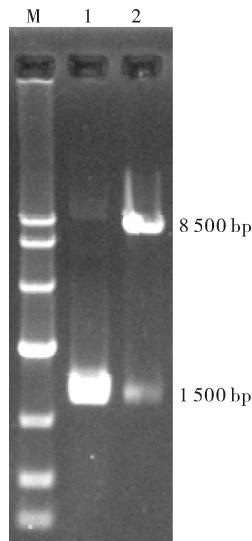


图 1 pZC2 超表达载体

Fig. 1 The over-expression vector pZC2



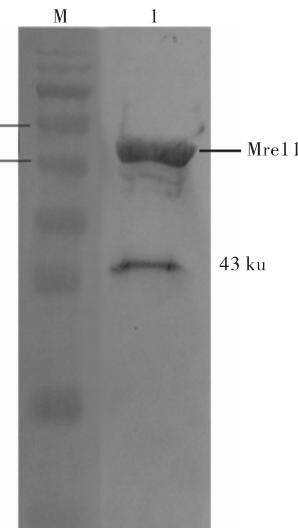
M. DNA Marker DL10 000; 1. *mre11* PCR 产物 PCR product of *mre11*; 2. 经 *Nde* I 和 *Sal* I 双酶切的表达载体 pZC2-*mre11* pZC2-*mre11* digested with *Nde* I and *Sal* I.

图 2 *mre11* 基因克隆及 pZC2-*mre11* 酶切验证Fig. 2 The clone of *mre11* and restriction analysis of pZC2-*mre11*

2.3 Mre11 蛋白 Western 印迹检测

将正确的重组质粒电转入 *S. islandicus* E233S, 挑取转化子使用 PA 瓶摇活后转到 100 mL 三角瓶在 75 °C 油浴摇床中培养。可见分光光度法测细胞 $D_{600\text{ nm}}$ 值在 0.8~1.0 时收集细胞并超声波破碎, 上清液 SDS-PAGE 分离, 用 Western 印迹检测。由图 3 可知, 带 His-tag 标签的 Mre11 蛋白经过 Ni-NTA 柱纯化后 SDS-PAGE, 再经 Western 印迹检测, 可看到 1 条大小为 45 ku 左右清晰的条带。该结果表明 pZC2 载体成功的表达了带有 C 端 6×

His 标签序列的 Mre11 蛋白, 且蛋白表达量较大, 说明该表达系统能够有效地工作。



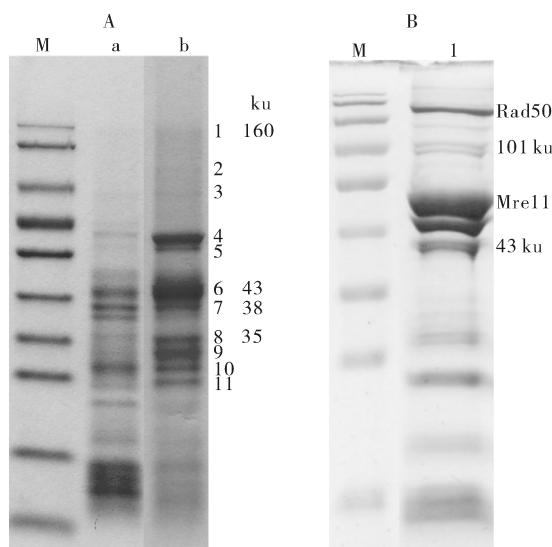
1. Mre11; M. 蛋白质预染 Marker fermentas SM0671 PageRuler™ prestained protein ladder.

图 3 蛋白 Mre11 的 Western 印迹

Fig. 3 The Western blot figure of protein Mre11

2.4 表达并共纯化 Mre11 结合蛋白

含有 pZC2-*mre11* 表达载体的菌株经扩大培养后, 收集并破碎细胞, 同时使用含有空载体的菌株作为参照。将上清用 0.1% PEI 除去 DNA, 经 Ni-NTA 柱纯化后样品进行 SDS-PAGE 分离, 并将目的条带用 MALDI-TOF 检测, 由图 4-A 可知条带 6 为 Mre11 蛋白条带, 并发现与 Mre11 蛋白一起被纯化下来的有 RadA, Thermosome(Tf55 $\alpha\beta$ 复合体)和果糖-1,6-二磷酸酶等蛋白(图 4-A)。当不除去 DNA, 细胞上清直接用 Ni-NTA 纯化后 SDS-PAGE 分析并经质谱鉴定后发现上述蛋白不再与 Mre11 作用, 而 1 条明显的 Rad50 蛋白条带被检测到(图 4-B), Rad50 在古菌中与 Mre11 形成 M2R2 复合物用于 DNA 断链修复^[8], 结果表明, pZC2 表达系统能够有效地表达必需基因 *mre11* 且能通过共纯化获得 Mre11 结合蛋白, 并以 MALDI-TOF 法鉴定结合蛋白; Mre11 与 Rad50 之间即使在高盐浓度下依然形成很强的相互作用, 即在逆性条件下可能仍保持 DNA 断链修复的功能; 溶液中的 DNA 片段是 Mre11 和 Rad50 形成复合体的必要条件, 当用 0.1% PEI 去除 DNA 后不能鉴定到两者间的相互作用; 溶液中去除 DNA 后, Mre11 可能与 RadA 和分子伴侣(Tf55 $\alpha\beta$ 复合体)等发生相互作用。



A: M. Fermentas SM0671; a. 阴性对照 E233S Negative reference E233S; b. 除去 DNA 的 Mre11 纯化条带 Mre11 purification with 0.1% PEI; 1: tf55 α and β ; 2: tf55 α and β ; 3: tf55 α and β ; 4: tf55 β (α); 5: 谷氨酸氨连接酶 Glutamate ammonia ligase; 6: Mre11; 7: 果糖-1,6-二磷酸酶 Fructose-1,6-bisphosphatase; 8: RadA; 9: 果糖-1,6-二磷酸酶 Fructose-1,6-bisphosphatase; 10: PAC2 Proteasome assembly chaperone 2; 11: Sso1812 SirA_YedF_YeeD superfamily; B: M. Fermentas SM0671; 1. 不加 0.1% PEI 除去基因组 DNA 的 Mre11 纯化条带 Mre11 purification without 0.1% PEI.

图 4 Mre11 蛋白纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE figure of Mre11 purification

3 讨 论

古细菌作为生命三域中的一域^[9]具有许多特点,如许多古菌生活在极端高温、高压、高盐和酸性等环境,这表明蛋白行使生命功能的古菌具有与细菌、真核生物不同的特点。古菌翻译后修饰作用是古菌蛋白具有这些特点的原因之一,同时古菌蛋白之间的相互作用网络仍有待于发掘。因此构建古菌超表达载体用于同源表达、纯化具有重要功能的蛋白,不仅能更好地了解蛋白翻译后修饰作用的机制,而且能够利用蛋白共纯化技术结合质谱法来鉴定古菌中重要功能蛋白的相互作用网络。

本研究在穿梭质粒 pEXA 的基础上构建了 *S. islandicus* E233S 的超表达载体 pZC2,成功利用此载体表达了 DNA 双链断裂修复蛋白 Mre11,并进一步采用共纯化法鉴定到 Mre11 蛋白的作用配体。在除去基因组 DNA 的情况下,检测到可能与之相互作用的 3 个重要蛋白 RadA, Thermosome (Tf55 $\alpha\beta$ 复合体) 和果糖-1,6-二磷酸酶, Thermo-

some (Tf55 $\alpha\beta$ 复合体) 是古菌里的分子伴侣蛋白^[10],帮助古菌蛋白前体折叠成有生物活性的蛋白;果糖-1,6-二磷酸酶可能参与细胞周期调控^[11]; RadA 参与 DNA 断链修复过程中的 3' 单链侵入同源 DNA 双链^[8],并且此前没有文献报道 RadA 与 Mre11 有相互作用;而不除基因组 DNA 的时候,这 3 个重要蛋白与 Mre11 的相互作用消失,却发现了 Rad50 与 Mre11 相互作用。在古菌中, Rad50 与 Mre11 形成 M2R2 复合物参与 DNA 双链断裂修复,故根据上述结果推断在 DNA 存在下, Mre11 和 Rad50 发生相互作用,反之, Mre11 和 Rad50 是不能发生相互作用的,而在此条件下 Thermosome (Tf55 $\alpha\beta$ 复合体) 可能结合并保护 Mre11;同时 Mre11 可能与另一个 DNA 断链修复蛋白 RadA 发生相互作用,可以利用酵母双杂交等技术进行进一步确定。另外,此超表达载体还被笔者所在实验室用来表达其他蛋白,比如 β -1,4-内切葡聚糖酶^[12],表明这个载体也可以用于基础应用研究。

参 考 文 献

- [1] JONUSCHEIT M, MARTUSEWITSCH E, STEDMAN K M, et al. A reporter gene system for the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* based on a selectable and integrative shuttle vector[J]. Molecular Microbiology, 2003, 48(5): 1241-1252.
- [2] BERKNER S, LIPPS G. Genetic tools for *Sulfolobus* spp.: vectors and first applications[J]. Archives of Microbiology, 2008, 190(3): 217-230.
- [3] PENG N, XIA Q, CHEN Z J, et al. An upstream activation element exerting differential transcriptional activation on an archaeal promoter[J]. Molecular Microbiology, 2009, 74(4): 928-939.
- [4] DENG L, ZHU H, LIANG Y X, et al. Unmarked gene deletion and host-vector system for the hyperthermophilic crenarchaeon *Sulfolobus islandicus* [J]. Extremophiles, 2009, 13(4): 735-746.
- [5] ZHANG C Y, GUO L, DENG L, et al. Revealing the essentiality of multiple archaeal pcna genes using a mutant propagation assay based on an improved knockout method[J]. Microbiology, 2010, 156(11): 3386-3397.
- [6] BROCK J E, POURSHAHIAN S, GILIBERTI J, et al. Ribosomes bind leaderless mRNA in *Escherichia coli* through recognition of their 5'-terminal AUG[J]. RNA, 2008, 14(10): 2159-2169.
- [7] 田斌, 张昌毅, 余群新, 等. 泉古菌 *Sulfolobus islandicus* PCNA1 的原核表达及其多克隆抗体的制备[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(1): 59-62.

- [8] DELMAS S, SHUNBURNE L, NGO H P, et al. Mre11-Rad50 promotes rapid repair of DNA damage in the polyploid archaeon *Haloferax volcanii* by restraining homologous recombination[J]. PLoS Genetics, 2009, 5(7): e1000552.
- [9] WOESE C R, KANDLER O, WHEELIS M L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990, 87(12): 4576-4579.
- [10] LUND P. Insights into chaperonin function from studies on archaeal thermosomes[J]. Biochemical Society Transactions, 2011, 39(1): 94-98.
- [11] KITANOVIC A, WOLFL S. Fructose-1,6-bisphosphatase mediates cellular responses to DNA damage and aging in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Mutation Research, 2006, 594(1/2): 135-147.
- [12] 朱泾, 赵述森, 彭楠, 等. 冰岛硫化叶菌 β -1,4-内切葡聚糖酶的同源表达、纯化与性质[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(6): 674-679.

Construction of *Sulfolobus* over-expression vector and expression of Mre11

ZHANG Wen-mao PENG Nan SHE Qun-xin GE Xiang-yang

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Life Science & Technology,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract It is important in expressing, purifying and analyzing crucial protein *in vivo* of *solfataricus* for the study of important life activities of extremely thermophilic archaea. The over-expression vector is constructed on the basis of pZC1 and pEXA vector inserted by araS promoter. Mre11 with 6×His-tag in C-terminal are expressed successfully using it. Rad50 which interplays with Mre11 is detected by co-purification. And it is ensured that the frame of the complex is still unchanged in high concentration of salt (500 mmol/L NaCl). It indicates that the complex still keeps the function of DNA repair in adverse situation. Further analysis of co-purification makes it clear that genome DNA fragments are the essential condition of forming the MR complex. In the absence of genome DNA fragments, the molecular chaperone of archaea may bind and protect Mre11. So this expression system possesses important sense in identifying the interact network of protein *in vivo*.

Key words archaea; *Sulfolobus*; over-expression vector; Mre11; co-purification

(责任编辑:陆文昌)