

冰岛硫化叶菌 *xpb* 基因 缺失突变体的构建及遗传学分析

李素明 张昌毅 彭楠 梁运祥 余群新

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 为在体内研究古菌核苷酸切除修复(nucleotide excision repair, NER)机制, 利用基因敲除的方法, 对泉古菌核苷酸切除修复机制进行研究, 构建了冰岛硫化叶菌编码真核生物 NER 解旋酶 XPB 同源蛋白的基因 *xpb1* 和 *xpb2* 单缺失突变体, 从而在体内分析 *xpb1* 和 *xpb2* 基因的功能。结果表明: 基因 *xpb1* 或 *xpb2* 不是冰岛硫化叶菌存活的必需基因。表型分析发现, *xpb1* 和 *xpb2* 基因单缺失突变体相较野生型菌株 REY15A, 对 DNA 损伤试剂 4-NQO 4-硝基喹啉-1-氧化物(4-nitroquinoline 1-oxide, 4-NQO)分别表现出轻微敏感性和不敏感性, 暗示 NER 解旋酶功能在冰岛硫化叶菌体内存在多重冗余。

关键词 核苷酸切除修复; 嗜嗜热古菌; *xpb* 基因; 基因敲除; 缺失突变体; 4-硝基喹啉-1-氧化物(4-NQO)

中图分类号 Q 933 文献标识码 A 文章编号 1000-2421(2012)01-0028-06

核苷酸切除修复(nucleotide excision repair, NER)机制是细胞修复 DNA 损伤的重要途径之一, 它主要用于修复紫外线或化学物质对 DNA 碱基修饰所导致的 DNA 结构扭曲。其修复切除过程可分为损伤识别、解链和切开 3 个步骤。在真核生物中, 3'到 5'解旋酶 XPB 和 5'到 3'解旋酶 XPD 能够结合并打开损伤位点附近的单链 DNA, 并与其他 NER 蛋白结合形成剪切复合体, 再由核酸内切酶 XPF-ERCC1 和 XPG 分别在损伤单链 DNA 的 5'端和 3'端进行切割^[1]。比较基因组学分析发现, 绝大多数古菌拥有在真核生物 NER 途径中发挥作用的蛋白 XPB、XPD、XPF 和 XPG 的同源蛋白, 但是它们缺乏大量能够在 NER 途径的调控回路中发挥作用的蛋白。因此, 古菌的 NER 途径被认为是由真核系统中不可或缺的关键组分组成, 它是研究复杂的真核 NER 机制的简易模型。

嗜嗜热泉古菌冰岛硫化叶菌(*Sulfolobus islandicus*)野生型菌株 REY15A 的基因组测序工作已经完成^[2], 并且在该菌中已建立了稳定的遗传操作工具和成熟的基因敲除方法^[3-4]。生物信息学分析发现, *S. islandicus* REY15A 基因组中 *xpb1* 和

xpb2 基因编码真核生物 NER 解旋酶 XPB 的同源蛋白。本研究拟采用张昌毅等^[5]建立的基因敲除方法, 在冰岛硫化叶菌基因组中分别缺失基因 *xpb1* 和 *xpb2*, 并通过观察 DNA 损伤试剂 4-硝基喹啉-1-氧化物(4-nitroquinoline 1-oxide, 4-NQO)对目的基因缺失突变体的影响, 从而在体内分析 *xpb1* 和 *xpb2* 基因的功能。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

野生型菌株 *S. islandicus* REY15A、基因缺陷型菌株 *S. islandicus* E233S($\Delta pyrEF \Delta lacS$)及 *E. coli* DH5 α 为笔者所在实验室保存; 大肠杆菌克隆载体 pMID-*xpf* 为笔者所在实验室基于载体 pUC19 构建。

1.2 主要试剂

PCR 产物纯化试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司; 基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; 限制性内切酶、*Pyrobest* DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; DNA 标准品购自北京全式金生物技术有限公

收稿日期: 2011-04-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(31100050, 31128011)

李素明, 硕士研究生。研究方向: 古菌分子生物学。E-mail: lisuming_mailbox@126.com

通讯作者: 余群新, 博士, 教授。研究方向: 古菌分子生物学。E-mail: qunxin@bio.ku.dk

表 1 引物名称与序列¹⁾

Table 1 Name and sequence of primers

引物名称 Name	引物序列(5' - 3') Sequence
xpb1-L- <i>Nco</i> I	AGTCCATGGTCTTTTACTTCCCTTAATACCTCTTC
xpb1-L- <i>Xho</i> I	CTGCTCGAGGAGAACAATAATAATCTCTTGAAATC
xpb1-R- <i>Xho</i> I	GACCTCGAGCTTCGATAAAGGATCAAGATAAACTTAG
xpb1-R- <i>Sph</i> I	TCAGCATGCCGTGGGAGTAGATTTTGGAGAC
xpb1-G- <i>Sal</i> I	ATAGTCGACAGTGGACGAAGTTCATCATTTACC
xpb1-G- <i>Mlu</i> I	TGGCACGCGTATATTCTATATTTTACTACATAAAATCCATC
xpb2-L- <i>Sph</i> I	TATGCATGCTCTAGGCCCTCCCTCCATAGTCTC
xpb2-L- <i>Xho</i> I	TATCTCGAGTCGTACCACGATATAATGAATAGTTTTTC
xpb2-R- <i>Xho</i> I	TAACCTCGAGGCTAGATTGATAGAAAATAAACTAAAGG
xpb2-R- <i>Nco</i> I	ATTCCATGGTTCGAGAGTTCAGTCTATAGGTTCC
xpb2-G- <i>Mlu</i> I	ATTAACGCGTATCATATTTAAACATTTCTAAACATCTC
xpb2-G- <i>Sal</i> I	TATGTCGACGCTTCTCTAACTTTGCCTTGG
xpb1-Check-F	TTCCCTTGGTTGAGATGTTATC
xpb1-Check-R	CAAGAACTCCACTATGTTGCTG
xpb2-Check-F	CAGTCACTAACGCAGTAGGGTC
xpb2-Check-R	CCTTCTGAACTCCTCGTAAAAC

1)下划线处为酶切位点序列; Check 引物在基因组上扩增位点见图 1。Restriction sites are on underline; Check primer sets are shown in Fig. 1.

司;引物及测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.3 基因敲除载体的构建

以野生型菌株 REY15A 基因组 DNA 为模板, 使用表 1 中引物 xpb1-L-*Nco* I 和 xpb1-L-*Xho* I PCR 扩增基因 *xpb1* 上游序列(L1-arm), xpb1-R-*Xho* I 和 xpb1-R-*Sph* I 扩增基因 *xpb1* 下游序列(R1-arm), xpb1-G-*Sal* I 和 xpb1-G-*Mlu* I 扩增基因 *xpb1* 序列(xpb1-arm); 同理, 使用表 1 中引物 xpb2-L-*Sph* I 和 xpb2-L-*Xho* I 扩增基因 *xpb2* 上游序列(L2-arm), xpb2-R-*Xho* I 和 xpb2-R-*Nco* I 扩增基因 *xpb2* 下游序列(R2-arm), xpb2-G-*Mlu* I 和 xpb2-G-*Sal* I 扩增基因 *xpb2* 序列(xpb2-arm)。将以上 PCR 产物进行相应双酶切、回收处理, 依次替换已构建载体 pMID-xpf 的相应片段, 完成基因敲除载体 pMID-xpb1 和 pMID-xpb2 的构建(图 1), 并经测序确定插入片段序列的正确性。

1.4 基因敲除载体的电转化

将基因敲除载体 pMID-xpb1 和 pMID-xpb2 用限制性内切酶 *Sal* I 分别作线性化处理, 电转化宿主菌 E233S($\Delta pyrEF \Delta lacS$)。冰岛硫化叶菌培养方法和电转化步骤等参见文献[6-7]。

1.5 同源重组转化子的筛选和验证

将在不含尿嘧啶固体培养基上生长的转化子用 2 mg/mL 的 X-gal 在 75 °C 染色 1 h, 筛选蓝色菌落培养, 并用表 1 中验证引物 xpb1-Check-F 和 xpb1-

Check-R PCR 扩增转化了线性化载体 pMID-xpb1 的转化子(Tb1)基因组 DNA, 用验证引物 xpb2-Check-F 和 xpb2-Check-R 扩增转化了线性化载体 pMID-xpb2 的转化子(Tb2)基因组 DNA。

1.6 目的基因缺失突变体的筛选和验证

将 PCR 验证正确的转化子在添加 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5-FOA 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 尿嘧啶的固体培养基中反筛选, 获得的突变体用 2 mg/mL 的 X-gal 在 75 °C 染色 1 h, 筛选未变色的菌落培养, 并用表 1 中验证引物 xpb1-Check-F 和 xpb1-Check-R PCR 扩增基因缺失突变体 Mb1($\Delta xpb1$)基因组 DNA, 用验证引物 xpb2-Check-F 和 xpb2-Check-R 扩增突变体 Mb2($\Delta xpb2$)基因组 DNA。

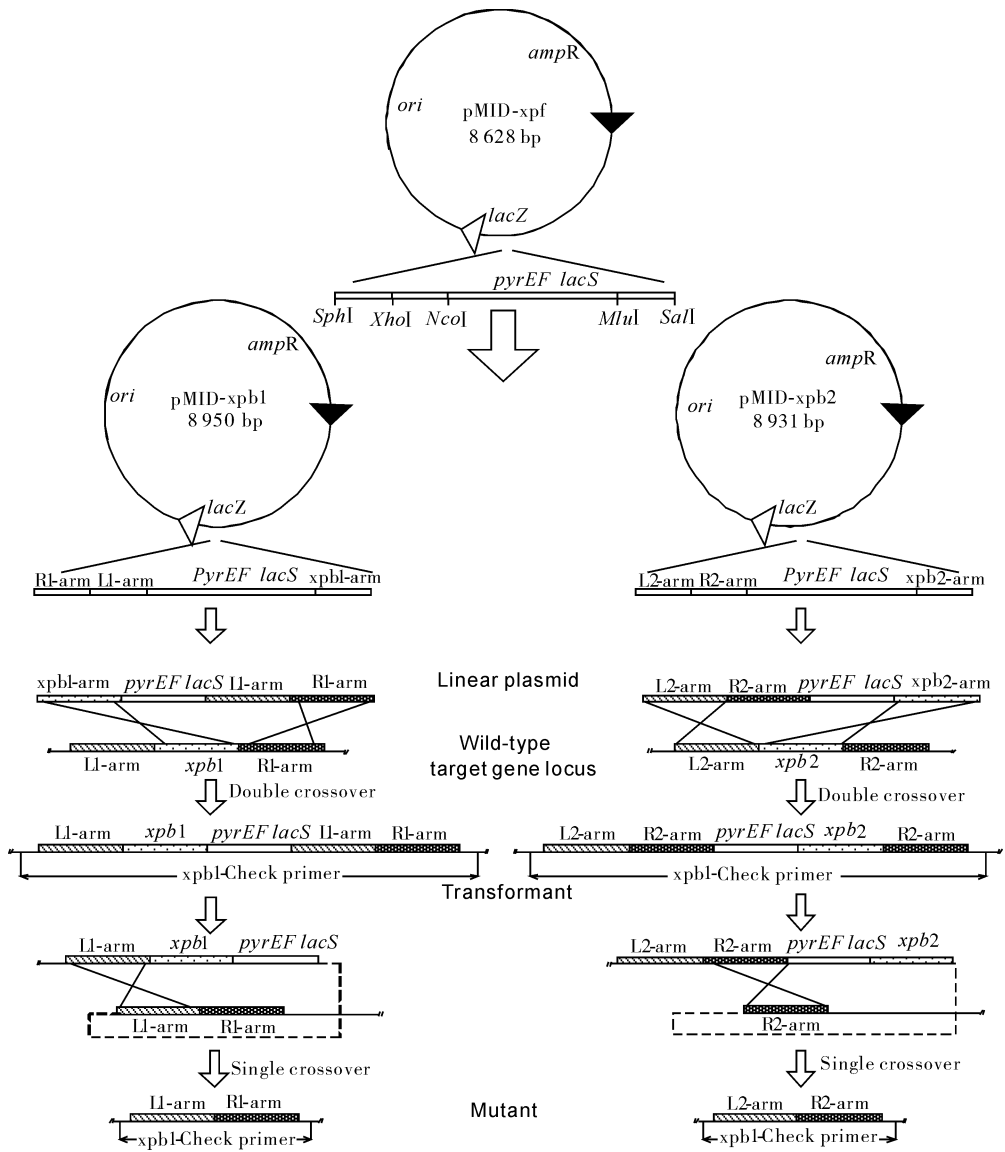
1.7 4-NQO 处理试验

将突变体菌株 Mb1($\Delta xpb1$)、Mb2($\Delta xpb2$)和野生型菌株 REY15A 经 2 次转接活化至培养物 $D_{600 \text{ nm}}$ 值到达对数生长期 0.2, 然后用冰岛硫化叶菌液体培养基对培养物进行 10 倍梯度稀释, 使细胞数由高到低依次为 2×10^7 、 2×10^6 、 2×10^5 、 2×10^4 和 $2 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$, 最后在 4-NQO 平板上各点样 10 μL , 75 °C 倒置培养 14 d。

2 结果与分析

2.1 基因敲除载体的酶切验证与测序分析

按照序列 xpb1-arm、L1-arm 和 R1-arm 的顺



ampR: 氨苄抗性基因 Ampicillin-resistance gene; *ori*: 大肠杆菌复制起点 *E. coli* replication origin; *lacZ*: β -半乳糖苷酶基因 β -galactosidase gene; *lacS*: β -糖苷酶基因 β -glycosidase gene; *pyrEF*: 乳清昔磷酸核糖转移酶和乳清昔-5'-单磷酸脱羧酶基因 Orotidine phosphoribosyltransferase and orotidine-5'-monophosphate decarboxylase genes.

图 1 目的基因敲除载体和缺失突变体的构建流程

Fig. 1 Construction flow chart of gene knock-out plasmids and gene deletion mutants

序依次替换载体 pMID-xpf 相应酶切位点处的片段后, 获得 *xpb1* 基因敲除载体 pMID-xpb1。用 *Mlu* I 和 *Xho* I 双酶切该载体, 经琼脂糖凝胶电泳分析, 获得大小约为 0.9、3.5 和 4.6 kb 的 3 条带, 与预期条带大小一致, 说明载体 pMID-xpb1 构建成功。同理构建 *xpb2* 基因敲除载体 pMID-xpb2, 经 *Mlu* I 和 *Xho* I 双酶切获得大小约为 0.5、3.7 和 4.7 kb 的 3 条带, 与预期条带大小一致, 说明载体 pMID-xpb2 构建成功。使用质粒 pUC19 通用引物

测序两载体中插入片段, 均无突变, 可用于后续电转化。

2.2 同源重组转化子的 PCR 验证

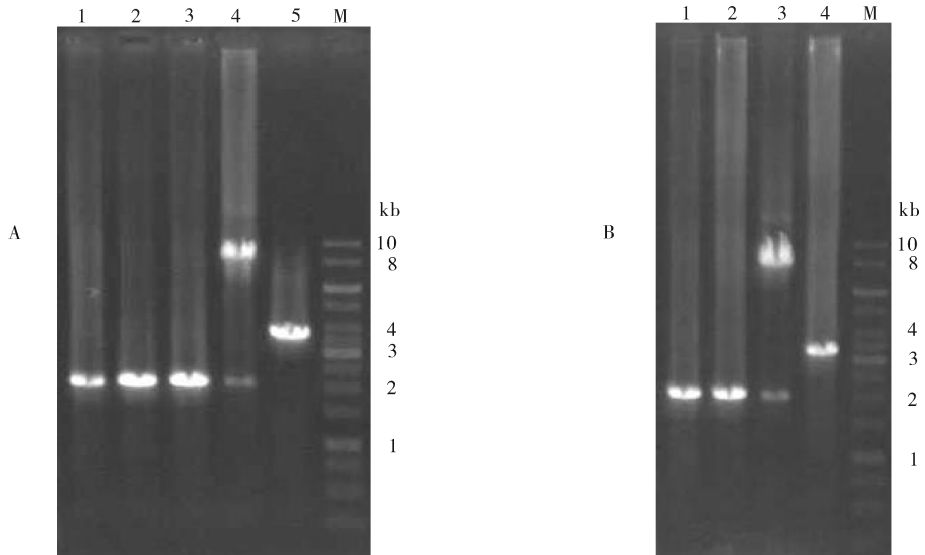
宿主菌 E233S(Δ *pyrEF* Δ *lacS*) 由于缺失基因 *pyrEF*, 自身无法合成生长必需的尿嘧啶, 且由于缺失基因 *lacS*, 无法经 X-gal 染色变蓝。通过线性化敲除载体同源重组(图 1)获得的转化子, 基因组上互补了 *pyrEF* 和 *lacS* 基因, 能够在不添加尿嘧啶的培养基中生长, 并能够经 X-gal 染色变蓝。线性

化载体 pMID-*xpb1* 转化 E233S($\Delta pyrEF \Delta lacS$) 后, 在不含尿嘧啶固体培养基上获得的转化子经 X-gal 染色均变蓝, 随机挑选 3 株转化子提取基因组 DNA, 用引物 *xpb1*-Check-F 和 *xpb1*-Check-R 进行 PCR 扩增, 电泳显示清晰的 8.1 kb 和较暗的 2.1 kb 条带。8.1 kb 的主带为转化子预期条带大小, 2.1 kb 的副带与突变体预期条带吻合, 说明获得了正确转化子 Tb1, 且伴随着转化子自发的基因组同源重组, 已产生了基因缺失突变体 Mb1($\Delta xpb1$)。同理, 发现用引物 *xpb2*-Check-F 和 *xpb2*-Check-R 扩增转化子 Tb2 产生 7.5 kb 的亮带和 2.0 kb 的暗带。由于 PCR 扩增均无宿主菌 E233S($\Delta pyrEF \Delta lacS$) 预期条带, 说明转化子 Tb1 和 Tb2 均较纯, 从中各选取 1 株菌反筛选目的基因缺失突变体。

2.3 目的基因缺失突变体的 PCR 验证

同源重组转化子由于互补了 *pyrEF* 基因, 在含

有 5-FOA 的培养基中致死。通过转化子自发的基因组同源重组(图 1)获得的目的基因缺失突变体, 丢失了 *pyrEF* 和 *lacS* 基因, 能够在添加 5-FOA 和尿嘧啶的培养基中生长, 且不能经 X-gal 染色变蓝。转化子 Tb1 经 5-FOA 和尿嘧啶反筛选获得的突变体用 X-gal 染色多数均不变色, 随机挑选 3 株菌提取基因组 DNA, 用引物 *xpb1*-Check-F 和 *xpb1*-Check-R 进行 PCR 扩增, 结果显示单一的 2.1 kb 条带(图 2-A), 与基因缺失突变体 Mb1($\Delta xpb1$) 预期条带吻合, 说明获得了正确的突变体。同理, 引物 *xpb2*-Check-F 和 *xpb2*-Check-R 扩增 2 株基因缺失突变体 Mb2($\Delta xpb2$) 产生单一的与预期大小吻合的 2.0 kb 条带(图 2-B), 说明获得正确的突变体。突变体 Mb1($\Delta xpb1$) 和 Mb2($\Delta xpb2$) 的顺利构建也暗示基因 *xpb1* 或 *xpb2* 对于冰岛硫化叶菌的存活不是必需的。由于两突变体均较纯, 经一次划线纯化后进行 4-NQO 处理。



A: 验证引物 *xpb1*-Check-F 和 *xpb1*-Check-R 扩增 *xpb1* 基因缺失突变体 Mb1-1、Mb1-2 和 Mb1-3 及双交换转化子 Tb1 和转化宿主菌 E233S PCR analysis of *xpb1* gene deletion mutants Mb1-1, Mb1-2, Mb1-3, double crossover transformant Tb1 and host strain E233S using primers *xpb1*-Check-F and *xpb1*-Check-R; 1: Mb1-1; 2: Mb1-2; 3: Mb1-3; 4: Tb1; 5: E233S; M: Marker; B: 验证引物 *xpb2*-Check-F 和 *xpb2*-Check-R 扩增 *xpb2* 基因缺失突变体 Mb2-1 和 Mb2-2 及双交换转化子 Tb2 和转化宿主菌 E233S PCR analysis of *xpb2* gene deletion mutants Mb2-1, Mb2-2, double crossover transformant Tb2 and host strain E233S using primers *xpb2*-Check-F and *xpb2*-Check-R; 1: Mb2-1; 2: Mb2-2; 3: Tb2; 4: E233S; M: Marker.

图 2 基因缺失突变体的 PCR 验证

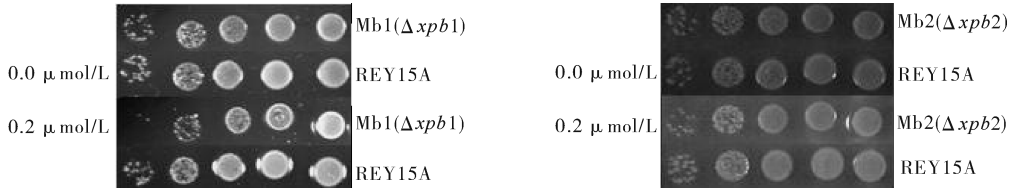
Fig. 2 PCR analysis of gene deletion mutants

2.4 4-NQO 处理结果

DNA 损伤试剂 4-NQO 在基因组上催化的喹啉衍生物通常经过 NER 途径得以修复。理论上, NER 途径中相应基因缺失形成的突变体经过

4-NQO 的处理, 会表现出不同于野生型的表型。在未添加 4-NQO 的平板上, 突变体 Mb1($\Delta xpb1$) 和 Mb2($\Delta xpb2$) 与野生型菌株 REY15A 长势上并无差别(图 3), 说明蛋白 XPB1 或 XPB2 的缺失并不影

响冰岛硫化叶菌正常条件下的生长。在 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 4-NQO 平板上, Mb1 ($\Delta xpb1$) 相较 REY15A 大概减少了 1 个菌圈, 表现出对 4-NQO 的



冰岛硫化叶菌细胞浓度从右向左依次为 2×10^7 、 2×10^6 、 2×10^5 、 2×10^4 和 $2 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$, 4-NQO 添加量分别为 0.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 。The concentrations of serially diluted *S. islandicus* cells are 2×10^7 、 2×10^6 、 2×10^5 、 2×10^4 and $2 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$ from right to left, there are no 4-NQO treatment and 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 4-NQO treatment.

图 3 基因缺失突变体对 4-NQO 的敏感性分析

Fig. 3 Drop dilution assay for sensitivities of gene deletion mutants to 4-NQO

3 讨论

对于真核生物和原核生物来说, 致癌物质 4-NQO 能够催化 DNA 在嘌呤核苷酸处产生多种体积庞大的喹啉衍生物, 从而造成 DNA 损伤, 这种损伤通常能够经过 NER 途径得以修复。在原核生物中, 主要由 UvrABC 等蛋白参与 NER 途径。这些蛋白在少数嗜盐和产甲烷古菌中发现过, 但在绝大多数古菌中并未发现, 意味着古菌普遍具有不同于细菌的 NER 途径。而在包括冰岛硫化叶菌在内的大部分古菌基因组中发现了编码真核生物 NER 蛋白 XPB 和 XPD 等同源蛋白的基因, 暗示古菌可能具有类似真核生物的 NER 途径。但是, 这种途径应该也是区别于真核生物的, 因为目前所有完成基因组测序的古菌都缺乏编码真核生物蛋白 XPA、XPC 和 XPE 同源蛋白的基因, 而这几个蛋白对于真核生物的 NER 途径不可或缺^[8]。近期, 有研究小组提出了古菌 NER 蛋白的进化和作用机制, 在他们建立的模型中, 古菌蛋白 XPB 和 XPD 均发挥解旋酶的作用; 蛋白 XPF 和 Bax1 均具有核酸内切酶的功能^[9]。

本研究利用笔者所在实验室自建的基因敲除方法, 在超嗜热泉古菌冰岛硫化叶菌基因组中分别成功缺失了编码真核生物 NER 解旋酶 XPB 同源蛋白的基因 *xpb1* 和 *xpb2*, 之后经 DNA 损伤试剂 4-NQO 处理发现, 基因缺失突变体 Mb1 ($\Delta xpb1$) 相较野生型菌株 REY15A 表现出轻微的敏感性, 而突变体 Mb2 ($\Delta xpb2$) 与野生型无明显差异。这种现象可能是因为在冰岛硫化叶菌的 NER 途径中有多个

轻微敏感性, 而 Mb2 ($\Delta xpb2$) 并未表现出与 REY15A 的显著差别(图 3)。

蛋白同时发挥解旋酶的功能, 如前面提到的蛋白 XPB 和 XPD, 仅单一缺失蛋白 XPB1 或 XPB2 不能中断该途径, 所以突变体 Mb1 ($\Delta xpb1$) 和 Mb2 ($\Delta xpb2$) 对 4-NQO 的敏感性与野生型区别不大。如果进一步进行基因敲除, 获得基因 *xpb1*、*xpb2* 和 *xpd* 均缺失的突变体, 应该会观察到 NER 途径因解旋酶缺失而被破坏的表型。从另一个角度讲, 冰岛硫化叶菌 NER 途径中蛋白功能的多重冗余使得该途径不会被轻易中断, 也暗示了古菌 NER 途径在 DNA 损伤修复中的重要性。

参 考 文 献

- [1] TAPIAS A, AURIOL J, FORGET D, et al. Ordered conformational changes in damaged DNA induced by nucleotide excision repair factors[J]. J Biol Chem, 2004, 279(18): 19074-19083.
- [2] GUO L, BRUGGER K, LIU C, et al. Genome analyses of icelandic strains of *Sulfolobus islandicus*, model organisms for genetic and virus-host interaction studies[J]. J Bacteriol, 2011, 193(7): 1672-1680.
- [3] PENG N, XIA Q, CHEN Z, et al. An upstream activation element exerting differential transcriptional activation on an archaeal promoter[J]. Mol Microbiol, 2009, 74(4): 928-939.
- [4] SHE Q, ZHANG C, DENG L, et al. Genetic analyses in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus islandicus* [J]. Biochem Soc Trans, 2009, 37(Pt 1): 92-96.
- [5] ZHANG C, 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] DENG L, ZHU H, CHEN Z, et al. Unmarked gene deletion and host-vector system for the hyperthermophilic crenarchaeon

- Sulfolobus islandicus* [J]. *Extremophiles*, 2009, 13 (4): 735-746.
- [7] 田斌, 张昌毅, 余群新, 等. 泉古菌 *Sulfolobus islandicus* PC-NA1 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] FUJIKANE R, ISHINO S, ISHINO Y, et al. Genetic analysis of DNA repair in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* [J]. *Genes Genet Syst*, 2010, 85 (4): 243-257.
- [9] ROUILLON C, WHITE M. The evolution and mechanisms of nucleotide excision repair proteins[J]. *Res Microbiol*, 2011, 162 (1): 19-26.

Construction of deletion mutants and genetic analysis of *xpbs* genes in *Sulfolobus islandicus*

LI Su-ming ZHANG Chang-yi PENG Nan LIANG Yun-xiang SHE Qun-xin

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

Abstract Genome analyses suggested that archaea could possess a eukaryotic-type nucleotide excision repair (NER) pathway because they encode homologs of several eukaryotic NER proteins. To investigate the archaeal nucleotide excision repair pathway *in vivo*, the genes encoding the potential NER helicases in the genome of the hyperthermophilic crenarchaeon *Sulfolobus islandicus* were deleted via a gene knock-out strategy and deletion mutants of the *xpb1* and *xpb2* genes were isolated, indicating that they were not essential to the survival of *S. islandicus*. Phenotypic analysis of deletion mutants showed that the *xpb1* mutant was only slightly sensitive to 4-NQO, as compared with the wild-type strain REY15A, while the *xpb2* mutant showed no sensitivity to 4-NQO. It is the first genetic study of the crenarchaeon NER pathway.

Key words nucleotide excision repair (NER); hyperthermophilic archaea; *xpb* gene; gene knock-out; deletion mutant; 4-NQO

(责任编辑: 张志钰)