

recA 基因的克隆及其在 λ 溶原菌中的生物学功能

黄劲毅, 方呈祥**, 李菁芳, 张珞珍, 王丽萨, 鲁玲

(武汉大学生命科学院, 武汉, 430072)

Cloning of *recA* Gene and Its Biological Function in λ Lysogenic Bacteria

HUANG Shao-yi, FANG Cheng-xiang**, LI Jing-fang, ZHANG Luo-zhen, WANG Li-sa, LU Ling

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan, 430072)

Abstract: With a pair of primers and the *E. coli* chromosome DNA as the template, an intact *recA* gene was obtained by PCR. The recombinant plasmid was constructed by ligating the PCR product and pUC18 *in vitro* and then transformed into *E. coli* DH5 α and *E. coli* k12(λ^+), respectively. The plasmid pUR4 containing the *recA* gene has been screened. The biological function of *recA* gene in different strains was determined with or without UV induction. The results indicated that the *recA* gene showed a remarkable physiological function in the λ lysogenic bacteria. It could induce the λ prophage to enter the lysis cycle from lysogenic state. This recombinant plasmid will be a useful tool in the studies of the inductive mechanism of λ prophage and the repair of cells damaged by UV-irradiation.

Key words: *recA* gene; λ lysogenic bacteria; Plasmid pUR4; UV induction

摘要: 通过一对自行设计的引物, 以 *E. coli* 染色体 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 获得完整的 *recA* 基因。将 PCR 产物和 pUC18 在体外进行连接后, 并分别转入 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* k12(λ^+), 筛选出含重组质粒(pUR4) 的转化子。在诱导条件和非诱导条件下, 分别测定 *recA* 基因在不同转化子中的生物学功能。结果表明 *recA* 基因在溶原菌中表现出明显的生理功能, 能使 λ 原噬菌体从溶原状态进入裂解循环。这种重组质粒将在进一步研究 λ 原噬菌体的诱导机理以及受紫外辐射损伤细胞的修复作用等方面成为有效的工具。

关键词: *recA* 基因; λ 溶原菌; 质粒 pUR4; 紫外诱导

中图分类号: Q939.48

文章标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004)04-0394-04

当 λ 噬菌体感染大肠杆菌宿主后, 其 DNA 整合进宿主的染色体组, 以原噬菌体状态存在于宿主细胞中, 称之为建立溶原化, 宿主被称为溶原菌^[1]。为维持溶原化, 早期合成的阻遏蛋白 CI 分别与 λ DNA 的左右操纵子 O_L^1 、 O_L^2 和 O_R^1 、 O_R^2 结合, 阻止宿主细胞的 RNA 聚合酶与 P_L 、 P_R 启动子的结合, 使 λ 原噬菌体的其他基因被关闭, 特别是使 N 蛋白和 Cro 蛋白无法合成, 从而抑制 λ 原噬菌体进入裂解生长途径。同时 CI 二聚体与 O_R^1 、 O_R^2 位点的结合也促进了 RNA 聚合酶与 P_{RM} 启动子的结合, 可低水平合成 CI 阻遏蛋白, 使细胞内的 CI 蛋白浓度维持一定的水平^[2]。

RecA 蛋白是由 *recA* 基因编码的单亚基蛋白,

分子量约为 38 KD, 广泛存在于各类生物中。RecA 蛋白具有多种生物学功能, 包括参与同源 DNA 的遗传重组、激活 DNA 损伤的 SOS 修复以及诱导蛋白质抑制物的自发裂解^[3]。在 λ 原噬菌体紫外诱导的过程中, RecA 蛋白主要具有下面的作用: 诱导 CI 阻遏物单体自我切割, 致使 λ 原噬菌体进入裂解循环^[4]。在正常的 λ 溶原细胞中, RecA 蛋白处于低活性状态, CI 蛋白单体的自我切割速度小于其合成速度, 因此 CI 蛋白浓度仍可维持溶原状态。当细胞受到紫外辐射后, 宿主的染色体 DNA 受损而出现单链 DNA (ssDNA)。RecA 蛋白与 ssDNA、ATP 三者结合形成三联体辅蛋白酶, 促进阻遏蛋白 CI 单体的 N 端与 C 端之间的连接部分发生自我切割

收稿日期: 2004-02-27, 修回日期: 2004-03-05

作者简介: 黄劲毅 (1979-), 男, 湖北十堰籍, 硕士研究生, 主要从事微生物遗传学研究。

** 通讯作者。Corresponding author. Tel: 87682319, E-mail: cxfang@whu.edu.cn

[5]。由于 CI 蛋白自我切割的速度大于其合成的速度, 细胞内 CI 二聚体的浓度随之下降, 使得结合在 O_L 和 O_R 上的 CI 二聚体脱落下来, 关闭建立溶原性。从而 P_L 、 P_R 启动的转录得以重新进行, 产生 O、P、Q 基因的产物使晚期基因表达, λ 原噬菌体进入裂解途径, 导致 λ 溶原菌裂解并释放出 1~200 个成熟的噬菌体颗粒^[6,7]。另外, RecA 蛋白切割宿主细胞内的 LexA 阻遏物, 使得宿主的 *recA* 基因得以大量表达, 溶原细胞内的 RecA 蛋白浓度迅速上升, 加快了 CI 蛋白单体的切割速度, 从而促进 λ 原噬菌体进入裂解途径^[8,9]。

本研究通过在溶原细胞中克隆 *recA* 基因, 提高其细胞内 RecA 蛋白的浓度。通过以前建立的平板计数法^[10]检测到 RecA 在溶原菌中表现出有效的生理活性, 促使 λ 原噬菌体进入裂解途径, 这将有助于我们进一步了解 RecA 在 λ 原噬菌体调控机制中的作用。

1 材料与方 法

1.1 菌株和质粒

E. coli C600、 λ 溶原菌 *E. coli* K12 (λ^+) 均由中国典型培养物保藏中心 (CCTCC) 提供, 质粒 pUC18 购自华美公司。

1.2 培养基及试剂

LB 培养基、YT 培养基、磷酸缓冲液 (0.1 mol/mL) 均按常规配制。限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶和 DNA 标准分子量均购自 TaKaRa 公司; 少量质粒抽提试剂盒, 胶回收试剂盒均购自 Omega 公司; 其它分子生物学试剂的配制均参照文献^[11]。

1.3 *recA* 基因的克隆

1.3.1 引物的设计与合成: 按照文献^[11]制备 *E. coli* C600 染色体 DNA。根据 *E. coli* 的 *recA* 基因的序列设计并合成了一对引物 (由北京三博远志生物技术公司合成): 上游引物 P1: 5'-GGC GAG CTC AGT AAAAAT GGC TA-3', 下游引物 P2: 5'-GCG TCT AGA TTA AAA ATC TTC GTT AGT T-3', 下划线处分别为限制性内切酶 *Xba*I, *Sac*I 的酶切位点。

1.3.2 PCR 扩增: 使用 TaKaRa 公司的 Taq Premix Kit 进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件: 先于 94°C 变性 7 min, 然后进行 PCR 循环, 94°C 变性 30 s, 56°C 退火 30 s, 72°C 延伸 45 s, 共 35 个循环, 最后一个循环于 72°C 延伸 7 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖电泳检测并回收纯化。

1.3.3 含 *recA* 基因质粒的构建与转化: 用限制性内切酶 *Xba*I 和 *Sac*I 双酶切 PCR 产物和 pUC18 载体,

0.7% 琼脂糖电泳检测并回收纯化酶切后的片段。T₄ DNA 连接酶 14°C 过夜连接。连接产物用 CaCl₂ 转化法分别转化 *E. coli* DH5 α 和溶原菌 *E. coli* K12 (λ^+) 感受态细胞, 涂布在含 X-gal、IPTG、100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上, 置 37°C 培养过夜。随机挑选平板上白色菌落培养, 抽提质粒 DNA, 经限制性内切酶分析和多次测序验证 (DNA 序列由中科开瑞生物技术公司测定)。

1.4 *recA* 基因在 λ 溶原菌细胞内的生物学作用

1.4.1 紫外诱导条件: 按文献^[10]制备菌悬液。将 37°C 培养过夜的溶原菌液按 1:10 的比例转入新鲜的 YT 培养液中, 培养 3 h 后 4000 g 离心 10 min 收集菌体, 用磷酸缓冲液 (0.1 mol/L, pH 7.0) 重新悬浮并调节其 OD₆₀₀ 值至 1.0。将 2 mL 菌悬液转入培养皿 (Φ 6 cm) 中, 在 15 W 紫外灯下 30 cm 处边搅拌边照射 30 s。照射后加入等体积 2 \times LB 培养液, 混匀后立即稀释, 涂布在 LB 平板上。同时以未经过紫外辐射的菌悬液为对照涂布 LB 平板。所有平板置 37°C 暗培养过夜。根据紫外诱导前后的菌落形成单位 (CFUs), 按下列公式计算其紫外诱导效率^[11]:

$$\text{诱导率 } 1\% = (\text{CFUs 对照} - \text{CFUs 诱导}) / \text{CFUs 对照} \times 100\%$$

1.4.2 非诱导条件: 在不经紫外诱导的条件下, 按上述方法分别测定携带有 pUC18 和重组质粒的溶原菌和对照菌株 *E. coli* DH5 α 的 CFUs。同时将 37°C 培养过夜的分别含有 pUC18 和重组质粒的溶原菌培养液按 1:100 的比例转入 50 mL 新鲜的 LB 培养液中, 37°C 振荡培养 (200 r/min), 隔时取样测定 OD₆₀₀ 值, 绘制生长曲线。

2 结 果

2.1 *recA* 基因的 PCR 扩增

以 *E. coli* C600 染色体 DNA 为模板, 通过一对引物 P1、P2 进行 PCR 扩增。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检验, 在凝胶上可见一条清晰的 DNA 带, 分子量大小约 1.0 Kb, 与文献报道的 *recA* 基因大小相同。

2.2 含 *recA* 基因的重组质粒的克隆与鉴定

将 PCR 产物和 pUC18 质粒分别用 *Xba*I 和 *Sac*I 双酶切后进行体外连接。用连接产物转化 *E. coli* DH5 α 和 λ 溶原菌 *E. coli* K12 (λ^+)。从转化平板上随机挑选白色菌落, 增殖后抽提其质粒 DNA, 经限制性内切酶酶解, 酶切产物再经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 与 pUC18 的 *Xba*I 单酶切产物进行比较。如图

1 所示, 重组质粒经 *Xba* I 酶切后在凝胶上只呈现一条带 (泳道 2), 分子量大小约为 3.7 Kb; 而经 *Sac* I 和 *Xba* I 双酶切后, 便可见两个 DNA 片段 (泳道 1), 其中小片段分子量大小约为 1.0 Kb, 与 *recA* 基因大小一致, 另一片段与 pUC18 的 *Xba* I 单酶切片段 (泳道 3) 平行, 分子量约为 2.7 Kb。



图 1 重组质粒限制性酶切检测

Fig. 1 Restriction endonuclease analysis of the plasmids

1. *Sac* I, *Xba* I digestion of recombinant plasmid; 2. *Xba* I digestion of recombinant plasmid; 3. *Xba* I digestion of pUC18; 4. DNA Marker λ DNA/*Hind* III

从电泳结果可知, 重组质粒的 DNA 分子量约为 3.7 Kb, 正好是 *recA* 基因与 pUC18 质粒的分子量之和, 而且插入片段连接在 pUC18 的 *Sac* I、*Xba* I 位点之间。

为了确认重组质粒上的插入片段为完整的 *recA* 基因, 对插入 DNA 片段进行序列测定。测序结果表明插入的片段大小为 1, 075 bp, 其序列与 *E. coli recA* 基因序列完全相同。由此可见, 转化子中的重组质粒含有完整的 *recA* 基因, 将该重组质粒定名为质粒 pUR4。相应的转化子分别称为 *E. coli* DH5 α /pUR4 和 *E. coli* K12 (λ^+)/pUR4。

2.3 *recA* 基因在 λ 溶原菌细胞内的生物学作用

2.3.1 在非诱导条件下: λ 溶原菌导入 *recA* 基因后, 其生长状况略有改变。含不同质粒的溶原菌的生长曲线表明, 同 *E. coli* K12 (λ^+)/pUC18 相比, *E. coli* K12 (λ^+)/pUR4 进入对数生长期的时间稍有提前, 最大 OD 值有所提高, 其生长速率则大体一致 (图 2)。通过镜检发现, 在对数生长期的前期, *E. coli* K12 (λ^+) 及 *E. coli* K12 (λ^+)/pUC18 的菌体比较长, 而 *E. coli* K12 (λ^+)/pUR4 的菌体较短; 从对数生长期晚期到稳定期, 三者的形态逐渐一致。

为了检测在非诱导条件下 *recA* 在溶原菌细胞中的生物学功能, 分别将含质粒 pUC18 和重组质粒 pUR4 的 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* K12 (λ^+) 涂布在 LB 平板上, 过夜培养后统计 CFUs。从表 1 可以看出,

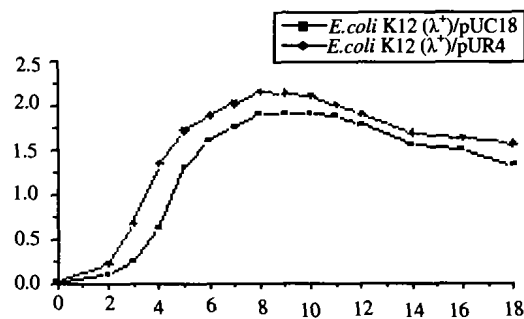


图 2 *E. coli* K12 (λ^+)/pUC18 及 *E. coli* K12 (λ^+)/pUR4 的生长曲线

Fig. 2 The growth curve of *E. coli* K12 (λ^+)/pUC18 and *E. coli* K12 (λ^+)/pUR4

在同等条件下, *E. coli* K12 (λ^+)/pUC18 和 *E. coli* K12 (λ^+)/pUR4 的 CFUs 有较大差异。其中含 pUR4 溶原菌的 CFUs 仅为 0.94×10^9 个/mL, 而含 pUC18 的溶原菌的 CFUs 却高达 1.65×10^9 个/mL。但是, 我们发现同样含有这两种质粒的 *E. coli* DH5 α 在 LB 平板上的 CFUs 数量没有明显的差别。

表 1 不同菌株 CFUs 数量的比较

Host cell	With plasmid pUC18	With plasmid pUR4
<i>E. coli</i> K12 (λ^+)	1.65×10^9 /mL	0.94×10^9 /mL
<i>E. coli</i> DH5 α	0.34×10^9 /mL	0.33×10^9 /mL

2.3.2 在诱导条件下: 分别将 *E. coli* K12 (λ^+)/pUC18 和 *E. coli* K12 (λ^+)/pUR4 在相同条件下进行紫外辐射, 然后测定其 CFUs。如表 2 所示, 两种不同溶原菌的诱导率都很高, *E. coli* K12 (λ^+)/pUC18 的诱导率为 98.29%, 而 *E. coli* K12 (λ^+)/pUR4 的诱导率则为 99.64%。两者差别仅有 1.35%。

表 2 不同条件下溶原菌的 CFUs

Table 2 CFUs of lysogenic bacteria under different conditions

	<i>E. coli</i> K12 (λ^+)/pUC18	<i>E. coli</i> K12 (λ^+)/pUR4
Control	1.65×10^9 /mL	0.94×10^9 /mL
Induced	2.82×10^7 /mL	0.339×10^7 /mL
Induction rate	98.29%	99.64%

3 讨论

根据 GeneBank 中 *E. coli* K12 *recA* 基因的序列, 我们自行设计了一对引物。上下游引物分别含有 *Xba*I 和 *Sac*I 限制性内切酶的酶切位点, 便于连接到现在常用的各种载体上。使用该引物扩增 *recA* 基因使用方便, 效果良好。

为了检测重组质粒中 *recA* 基因的生物学功能, 分别对含重组质粒 pUR4 和质粒 pUC18 的宿主细胞进行比较。我们发现, 在非诱导条件下, *E.coli* K12 (λ^+)/pUR4 在 LB 平板上形成的菌落数 (CFUs) 比 *E.coli* K12 (λ^+)/pUC18 的减少 43%, 而两者的唯一区别是前者的质粒中含有 *recA* 基因。从生长速率来看, *E.coli* K12 (λ^+)/pUR4 的生长速率反而略快于 *E.coli* K12 (λ^+)/pUC18, 而且最大 OD 值也高于后者, 说明 RecA 在溶原菌内具有生物学活性。同时, *E.coli* DH5 α /pUR4 和 *E.coli* DH5 α /pUC18 在 LB 平板上的 CFUs 数量基本一致, 个体形态和生长速率都没有明显差别, 说明 RecA 蛋白对于 *E.coli* 的生长繁殖并没有明显影响, *E.coli* K12 (λ^+)/pUR4 形成菌落数的减少是由于 RecA 对于胞内 λ 原噬菌体的作用。由此表明 RecA 在溶原菌 *E.coli* K12 (λ^+)/pUR4 中表现出酶活性, 能促使 λ 原噬菌体进入裂解生长, 导致部分宿主细胞被裂解, 因而在平板上不能形成菌落, 致使含重组质粒 pUR4 的溶原菌在平板上形成的菌落数明显低于仅含质粒 pUC18 的溶原菌形成的菌落数。

在溶原菌中, RecA 蛋白的浓度较低, 只需少量的 RecA 蛋白即可在溶原菌中实现其正常的功能。在诱导条件下, 无论是 *E.coli* K12 (λ^+)/pUR4 还是 *E.coli* K12 (λ^+)/pUC18 中都会产生足够浓度有活性的 RecA 蛋白, 从而导致溶原菌细胞的裂解, 因此两者在 LB 平板上形成的 CFUs 数量基本相近。但由于前者细胞内 RecA 蛋白浓度相对较高, 致使溶原菌细胞裂解的机率相应增加, 因此其 CFUs 数量也略有减少, 紫外诱导率较高。

综上所述, 本研究所克隆的 *recA* 基因在溶原菌中能表现有效的生物学功能, 能促进 λ 原噬菌体进

入裂解途径。这种含 *recA* 基因的质粒为 λ 原噬菌体的诱导机理以及受辐射损伤细胞的修复等方面的进一步研究提供了一种有效的工具。

参考文献

- [1] 沈萍. 微生物遗传学[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1995. 221-224.
- [2] Kudell N, Hochschild A. Amino acid substitutions in the -35 recognition motif of δ^{70} that result in defect in phage λ repressor-stimulated transcription[J]. J Bacteriology, 1994, 176: 2991-2998
- [3] Clark A J, Sandler S J. Homologous genetic recombination: the pieces begin to fall into place[J]. Crit Rev Microbiol, 1994, 20(2): 125-142.
- [4] Little J W. Autodigestion of *lexA* and phage lambda repressors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81(5): 1375-1379.
- [5] Katsumi M, Toshihiro H. Analysis of the DNA Binding Site of *Escherichia coli* RecA protein[J]. Adv Biophys, 1995, 31:23-48.
- [6] 贾盘兴. 噬菌体分子生物学—基本知识和技能[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 195-207.
- [7] Johnson, A D, Poteete, A R, Lauer, G, et al. Lambda Repressor and Cro-Components of an Efficient Molecular Switch[J]. Nature, 1981, 294: 217-233.
- [8] Jukka T K, Karen E S, Joan-Beth G E. Efficient repair of hydrogen peroxide-induced DNA damage by *Escherichia coli* requires SOS induction of RecA and RuvA proteins[J]. DNA Repair Mut Res, 2000, 459: 187-194.
- [9] Julie A M, John W L. Analysis of *Escherichia coli* RecA Interactions with LexA, λ CI, and UmuD by Site-Directed Mutagenesis of *recA*[J]. J Bacteriol, 2000, 182(6): 1659-1670.
- [10] 范成鹏、方呈祥、张珞珍, 等. 测定 λ 原噬菌体诱导频率的新方法[J]. 中国病毒学, 2002 17(4): 367-370.
- [11] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 第三版 北京: 科学出版社, 2002.