

细菌双杂交验证古菌 UDG 与 TRX 相互作用的研究

张璐, 张闻, 陈元晓

(昆明医科大学细胞生物学与医学遗传学系, 云南昆明 650500)

[摘要] **目的** 验证别府硫化叶菌 (*Sulfolobus tokodaii*, *S.tokodaii*) DNA 碱基切除修复中重要的酶 - 尿嘧啶 -DNA 糖基化酶 (uracil - DNA glycosylase, StoUDG) 与硫氧还蛋白 (thioredoxin, StoTRX) 之间的相互作用, **方法** 将 StoUDG 和 StoTRX 的基因分别克隆到细菌双杂交载体上, 共转化至报告菌株, 从筛选平板上检测 StoUDG 和 StoTRX 相互作用的强弱. **结果** (1) pBT-TRX 与 pTRG-UDG 等细菌双杂交质粒共转化至报告菌株, 可使报告菌株在含氯霉素、四环素和卡那霉素的 LB 平板上生长; (2) 含 pBT-TRX 与 pTRG-UDG 质粒的细菌双杂交报告菌株可在筛选平板上缓慢生长, 且不发生自激活. **结论** StoUDG 与 StoTRX 存在较弱的相互作用, 提示 StoTRX 参与依赖于 StoUDG 的 DNA 碱基切除修复过程,

[关键词] 细菌双杂交; DNA 碱基切除修复; 尿嘧啶 -DNA 糖基化酶; 硫氧还蛋白

[中图分类号] Q939.99 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 06 - 0005 - 04

Interaction between Uracil-DNA Glycosylase and Thioredoxin in Archaeon Using Bacterial Two-hybrid System

ZHANG Lu, ZHANG Wen, CHEN Yuan - xiao

(Dept. of Cell Biology and Medical Genetics, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protein-protein interaction (PPI) between an important DNA base excision repair enzyme uracil-DNA glycosylase (StoUDG) and thioredoxin (StoTRX) in hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii*. **Methods** The bacterial two-hybrid reporter strain was co-transformed by pBT recombined with StoUDG gene and pTRG recombined with StoTRX gene. The strength of PPI was detected by observing the bacterial colony in selective plating medium. **Results** (1) The co-transformation of bacterial two-hybrid plasmids enabled reporter strain to resistant to chloramphenicol, tetracycline and kanamycin. (2) The reporter strain which contained pBT-TRX and pTRG-UDG plasmids grew slowly in selective plating medium without self-activation. **Conclusion** The results showed a weak interaction between StoUDG and StoTRX, which indicated that StoTRX played a role in UDG-dependent DNA base excision repair.

[Key words] Bacterial two-hybrid; DNA base excision repair; Uracil-DNA glycosylase; Thioredoxin

自 1998 年 Dove SL 和 Hochschild A 在 *E.coli* 中成功地建立了细菌双杂交系统 (bacterial two-hybrid system, B2HS) 以来^[1], 该系统成为目前应用于体内研究蛋白质之间相互作用的有力工具. 由于其研究周期短, 操作简便, 从而大大节省了筛选和验证相互作用蛋白的时间, 在构建病原菌蛋白互作网络^[2]、验证 DNA 复制相关蛋白互作^[3]等

方面发挥重要的作用.

古菌作为一个特殊的生命形式, 在生理和遗传学特性上不同于真核生物和真细菌, 但在进化上更接近于真核生物. 古菌 DNA 复制不但与真核生物有着惊人的相似之处, 而且反映了真核复制的核心内容^[4]. 生活在地热温泉中的嗜酸嗜热古菌 - *S.tokodaii* 是极端嗜热古菌的典型代表. 由于生活在

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (31160425)

[作者简介] 张璐 (1983 ~), 女, 山西长治市人, 理学硕士, 助教, 主要从事蛋白质相互作用的研究工作.

[通讯作者] 陈元晓. E-mail: cyx616@hotmail.com

高温恶劣的环境下, 极端嗜热古菌中存在一套高效的 DNA 损伤修复机制, 以保证其遗传物质的稳定性. 因此, 对极端嗜热古菌 DNA 复制修复相关蛋白的研究, 为阐明高等真核生物复杂的 DNA 复制及修复机制提供重要线索^[5], 也为癌症等人类疾病的发病机理提供理论支持.

尿嘧啶 -DNA 糖基化酶 (UDG) 是保守的 DNA 碱基切除修复酶^[6]. 在高温环境下, 由于胞嘧啶 (C) 和脱氧胞苷三磷酸 (dCTP) 的脱氨基作用, 将尿嘧啶 (U) 错误掺入到 DNA 分子中, UDG 通过水解 DNA 中的 U 与脱氧核糖间的 N-糖苷键, 移除 U, 从而完成碱基切除修复的第一步^[7-9]. 在火球菌属 *Pyrococcus furiosus* 中, 增殖细胞核抗原 (PCNA) 可以刺激 UDG 的活性^[10]. 在分枝杆菌属 *Mycobacterium smegmatis* 和 *Mycobacterium tuberculosis* 中, 单链结合蛋白 (SSB) 可与 UDG 发生相互作用, 并刺激 UDG 的活性^[11]. 然而, 噬菌体 ϕ 29 中的 p56 蛋白可以抑制其宿主 *Bacillus subtilis* 的 UDG 活性^[12]. 结构分析表明 StoUDG 属于 4 型 UDG 酶家族^[13]. 其结构中有 12 个铁硫簇结合位点, 因此笔者推测 UDG 的酶学特性有可能还

受生物体内一些氧化还原系统的调控^[14]. 笔者采用细菌双杂交系统, 对 *S.tokodaii* 中的尿嘧啶 -DNA 糖基化酶 (StoUDG) 与硫氧还蛋白 (StoTRX) 之间的相互作用进行了初步的研究.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 细菌双杂交报告菌株 XL1-Blue Reporter Strain 购自 Stratagene 公司.

1.1.2 质粒 本实验用于细菌双杂交研究相互作用的重组质粒见表 1^[15].

1.1.3 主要试剂 细菌双杂交系统试剂盒购自 Stratagene 公司, Tryptone、Yeast Extract、抗生素、NaCl 购于 Sigma 及国药集团.

1.1.4 抗生素和培养基 本实验用到的抗生素, 其英文缩写、配置方法、贮存和使用浓度见表 2^[15]. 培养基: 保存平板: LB 平板 (Kan^r + Tet^r + Chlo^r); 细菌双杂交筛选平板: 按 BacterioMatch II Two-Hybrid System Library Construction Kit 说明书配置.

表 1 细菌双杂交实验的质粒

Tab. 1 Plasmids of bacterial two-hybrid system

质粒	酶切位点、用途	抗性	来源
pBT	细菌双杂交 bait 质粒	氯霉素抗性 (Chlo ^r)	Stratagene 公司
pTRG	细菌双杂交 target 质粒	四环素抗性 (Tet ^r)	Stratagene 公司
pBT-LGF2	细菌双杂交重组质粒 阳性对照	氯霉素抗性 (Chlo ^r)	Stratagene 公司
pTRG-Gal11p	细菌双杂交重组质粒 阳性对照	四环素抗性 (Tet ^r)	Stratagene 公司
pBT-TRX	NotI+XhoI 重组质粒	氯霉素抗性 (Chlo ^r)	华中农业大学保存
pTRG-UDG	NotI+XhoI 重组质粒	四环素抗性 (Tet ^r)	华中农业大学保存

表 2 供试抗生素

Tab. 2 Antibiotics used in this study

抗生素名称	英文缩写	溶剂	贮存浓度 (mg/mL)	使用浓度 (μ g/mL)
卡那霉素	Kan	ddH ₂ O	30	30
氯霉素	Chlo	无水乙醇	34	34
四环素	Tet	50%乙醇	12.5	12.5

1.2 方法

1.2.1 共转化子验证 制备 XL1-Blue Reporter Strain 感受态细胞, 将 5 对细菌双杂交质粒: pBT-TRX/pTRG-UDG、pBT-TRX/pTRG (自激活对照)、pBT /pTRG-UDG (自激活对照)、pBT-LGF2/pTRG-Gal11p (阳性对照, CK⁺)、pBT

/pTRG (阴性对照, CK⁻) 分别共转化至感受态细胞中, 培养后挑取单克隆, 液体培养后点板 (保存平板), 倒置, 37 °C 恒温培养 12 h 后观察.

1.2.2 互作蛋白的细菌双杂交验证 将共转化子液体培养后点板 (细菌双杂交筛选平板), 倒置, 30 °C 恒温培养 12 h 后观察, 对照保存平板, 按照

点种的对应位置查看并记录菌落生长情况, 主要包括菌落有无生长以及相对生长趋势. 继续将平板置于 30 °C 恒温培养箱中, 每隔 4 h 观察 1 次并记录筛选平板菌落生长情况, 进行图片采集, 培养至 48 h 结束.

2 结果

2.1 细菌双杂交质粒共转化情况

在保存平板上, 观察到共转化后的 5 株报告菌株皆有菌落生成 (见图 1), 表明: pBT-TRX/pTRG-UDG、pBT-TRX/pTRG (自激活对照)、pBT/pTRG-UDG (自激活对照)、pBT-LGF2/pTRG-Gal11p (阳性对照, CK⁺)、pBT/pTRG (阴性对照, CK⁻) 5 对细菌双杂交质粒成功转化进入报告菌株, 使得该菌株除自身具有的 Kan^r 外, 又增加了 Tet^r、Chlo^r 2 种抗性.

2.2 细菌双杂交报告菌株在筛选平板上的生长情况

在细菌双杂交筛选平板上, 阳性对照和含 pBT-TRX/pTRG-UDG 质粒的报告菌株在 36 h 后有菌落生成 (见图 2). 至培养终止 (48 h), 含 pBT-TRX/pTRG-UDG 质粒的报告菌株生长较为缓慢, 且阴性对照和自激活对照皆无菌落生长 (见图 3). 其表明: 在无自激活干扰的前提下, 含 StoUDG 与 StoTRX 基因的重组质粒在细菌双杂交报告菌株中融合表达并发生相互作用, 从而启动下游报告基因表达, 使报告菌株在筛选平板上生长.

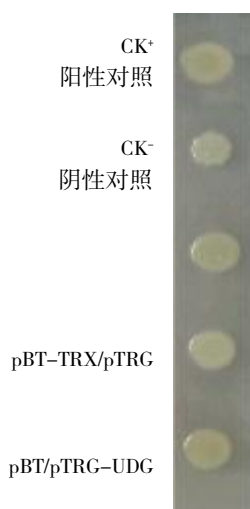


图 1 细菌双杂交质粒共转化情况

Fig. 1 The co-transformation of bacterial two-hybrid plasmids

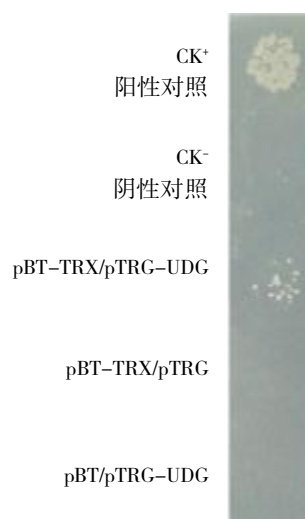


图 2 细菌双杂交验证 StoUDG 与 StoTRX 相互作用情况 (36 h)

Fig. 2 Bacterial two-hybrid assays for the physical interactions between StoUDG and StoTRX (36 h)

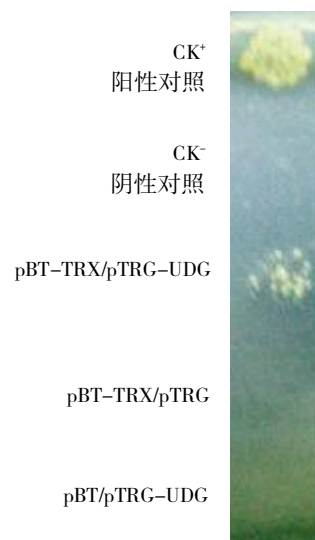


图 3 细菌双杂交验证 StoUDG 与 StoTRX 相互作用情况 (48 h)

Fig. 3 Bacterial two-hybrid assays for the physical interactions between StoUDG and StoTRX (48 h)

3 讨论

StoTRX 是 TRX I 家族的成员, TRX I 是一类古老的小分子蛋白 (约 12 kD), 普遍存在于各种生物的细胞中^[6]. 细胞内的氧化还原状态在细胞的不同时期存在差异, 增殖的细胞与分化的细胞相比, 更需要在还原状态下行使其功能, 因此, TRX 对于细胞内氧化还原状态的维持起着非常重要的作用. TRX 通过还原靶蛋白上处于活性部位的二硫键来调节靶蛋白的活性, 它可以影响酶的活性,

调节转录因子与 DNA 的结合能力,同时在细胞对抗氧化压力时也起着重要的作用。

在人体中,UDG 是肺癌、食管癌等肿瘤组织中的重要标志物之一^[17],成为肿瘤发生及预后的指标。在 T 细胞白血病、肝癌和宫颈癌的组织中,检测到 TRX 的高水平表达,并且 TRX 通过与抑癌因子 p53 相互作用,调节 p53 介导的 DNA 修复^[18],本研究发现,StoTRX 与 StoUDG 之间存在较弱的蛋白质相互作用,推测 StoTRX 可能敏锐地影响着 StoUDG 与 DNA 的结合活力,并调节其在 DNA 碱基切除修复时的活性。StoTRX 参与依赖于 StoUDG 的 DNA 碱基切除修复过程,该过程很有可能与电子传递链偶联,当然,这还需要后续的体内和体外蛋白质互作实验来证明,在模式古菌中 StoUDG 和 StoTRX 相互作用的首次提出和进一步探究,必将为癌症和细胞衰老等人类疾病的发病机制和防治提供重要的理论基础。

(致谢:本实验在华中农业大学农业微生物国家重点实验室完成,感谢何正国教授为本实验提供质粒和菌株。)

[参考文献]

- [1] DOVE S L,HOCHSCHILD A. Conversion of the ω subunit of Escherichia coli RNA polymerase into a transcriptional activator or an activation target[J]. Genes Dev,1998,12(5):745-754.
- [2] YI WANG,TAO CUI,CONG ZHANG,et al. A global protein-protein interaction network in the human pathogen Mycobacterium tuberculosis H37Rv [J]. J Proteome Research,2010,9(12):6 665-6 677.
- [3] LU ZHANG,LEI ZHANG,YI LIU,et al. Archaeal eukaryote-like Orc1/Cdc6 initiators physically interact with DNA polymerase B1 and regulate its functions [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2009,106(19):7 792-7 797.
- [4] DIONNE I,ROBINSON N P,MCGEACH A T,et al. DNA replication in the hyperthermophilic archaeon Sulfolobus solfataricus [J]. Biochem Soc Trans,2003,31(Pt 3):674-676.
- [5] ZHANG C,TIAN B,LI S,et al. Genetic manipulation in Sulfolobus islandicus and functional analysis of DNA repair genes[J]. Biochem Soc Trans,2013,41(1):405-410.
- [6] OLSEN L C,AASLAND R,WITTEWER,et al. Molecular cloning of human uracil-DNA glycosylase, a highly conserved DNA repair enzyme [J]. EMBO J,1989,8(10):3121-3125.
- [7] YANG H,FITZ-GIBBON S,MARCOTTE E M,et al. Characterization of a thermostable DNA glycosylase specific for U/G and T/G mismatches from the hyperthermophilic archaeon Pyrobaculum aerophilum [J]. J Bacteriol,2000,182(5):1 272-1 279.
- [8] SARTORI A A,SCHAR P,FITZ-GIBBON,et al. Biochemical characterization of uracil processing activities in the hyperthermophilic archaeon Pyrobaculum aerophilum [J]. J Biol Chem,2001,276(32):29 979-29 986.
- [9] SARTORI A A,FITZ-GIBBON,YANG H,et al. A novel uracil-DNA glycosylase with broad substrate specificity and an unusual active site [J]. EMBO J,2001,21(12):3 182-3 191.
- [10] KIYONARI S,TAHARA S,UCHIMURA M,et al. Studies on the base excision repair (BER) complex in Pyrococcus furiosus [J]. Biochem Soc Trans,2009,37(Pt 1):79-82.
- [11] ACHARYA N,VARSHNEY U. Biochemical properties of single-stranded DNA-binding protein from Mycobacterium smegmatis, a fast-growing mycobacterium and its physical and functional interaction with uracil DNA glycosylases [J]. J Mol Biol,2002,318(5):1 251-1 264.
- [12] PEREZ-LAGO L,SERRANO-HERAS G,BANOS B,et al. Characterization of Bacillus subtilis uracil-DNA glycosylase and its inhibition by phage ϕ 29 protein p56 [J]. Mol Microbiol,2011,80(6):1 657-1 666.
- [13] KAWAI A,HIGUCHI S,TSUNODA M,et al. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of uracil-DNA glycosylase from Sulfolobus tokodaii strain 7 [J]. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun,2012,68(Pt 9):1 102-1 105.
- [14] BEINERT H,HOLM R H,MUNCK E. Iron-sulfur clusters:nature's modular, multipurpose structures [J]. Science,1997,277(5 326):653-659.
- [15] 蒋培霞. 硫磺矿硫化叶菌Orc1/Cdc6蛋白在DNA复制起始中的调控功能研究 [D]. 武汉:华中农业大学,2008.
- [16] POWIS G,MONTFORT W R. Properties and biological activities of thioredoxins [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol,2001,41(1):261-295.
- [17] BULGAR A D,WEEKS L D,MIAO Y,et al. Removal of uracil by uracil DNA glycosylase limits pemetrexed cytotoxicity: overriding the limit with methoxyamine to inhibit base excision repair [J]. Cell Death Dis,2012,3(1):252.
- [18] UENO M,MASUTANI H,ARAI R J,et al. Thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation [J]. J Biol Chem,1999,274(50):35 809-35 815.

(2013-02-10 收稿)