

DinB 基因的超表达短期内可显著降低大肠杆菌的死亡率

席云¹, 肖刚¹, 吴坚², 林美玲¹

(中山大学附属第三医院 1.检验科, 2.口腔科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】探讨大肠杆菌 *dinB* 基因在进化上的选择优势。【方法】应用竞争共培养和超表达的策略, 测定共培养后含 *dinB* 基因的目的菌株和对照菌株的生长优势。第 1 组为含质粒 pUC-*dinB*-*rrnB* 的 *E. coli* AB1157+含质粒 pUC-*dinBR*-*rrnB* 的 *E. coli* YG7207; 第 2 组为含质粒 pUC-*dinB*-*rrnB* 的 *E. coli* AB1157+含质粒 pUC-*phoE*-*rrnB* 的 *E. coli* YG7207; 第 3 组为含质粒 pUC-*phoE*-*rrnB* 的 *E. coli* AB1157+含质粒 pUC-*dinBR*-*rrnB* 的 *E. coli* YG7207; 第 4 组为卡那霉素抗性(K^+)菌株 YG7207 与无卡那霉素抗性菌株 AB1157。【结果】第 4 组中, 卡那霉素抗性菌株 YG7207 与无卡那霉素抗性菌株 AB1157 在培养物中的比例保持着良好的稳定。第 1 组和第 2 组混合培养中, K^+ 抗性的菌株在培养物中的比例急剧下降, 并很快接近或等于 0; 第 3 组培养物中, K^+ 菌株(YG7207)的比例呈明显上升。【结论】超表达 *dinB* 基因的大肠杆菌菌株的生长优势不是由于对数期的生长速率提高所造成, 对数后期细胞死亡率降低应该是超表达 *dinB* 基因的大肠杆菌菌株的生长优势的主要原因。

关键词: *dinB* 基因; 大肠杆菌; 超表达

中图分类号: R378

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)04-0423-04

Overexpression of *dinB* in *E. coli* Can Significantly Reduce Cell Death RateXI Yun¹, XIAO Gang¹, WU Jian², LIN Mei-ling¹

(1.Department of Medical Laboratory, 2.Department of Stomatology, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract:【Objective】To study the biological significance and selection advantage of *dinB* gene in *Escherichia coli*.【Methods】Determine the growth advantage of *E. coli* strains with and without *dinB* by using co-culture competition strategy. Group 1 was *E. coli* AB1157 with pUC-*dinB*-*rrnB* + *E. coli* YG7207 with pUC-*dinBR*-*rrnB*; Group 2 was *E. coli* AB1157 with pUC-*dinB*-*rrnB* + *E. coli* YG7207 with pUC-*phoE*-*rrnB*; Group 3 was *E. coli* AB1157 with pUC-*phoE*-*rrnB* + *E. coli* YG7207 with pUC-*dinBR*-*rrnB*; group 4 is YG7207 + AB1157.【Result】In group 4, the proportion between YG7207 and AB1157 was maintained at a stable level. In Group 1 and Group 2, colonies of strain resistant against kalamycin reduced abruptly to 0. In Group 3, colonies of strain resistant against kalamycin increase significantly.【Conclusion】The reduction in mortality during the stationary phase is the main reason leading to the growth advantage of *dinB*-overexpressing *E. coli* strains.

Key words: *dinB*; *Escherichia coli*; overexpression

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2006, 27(4):423-426]

1999 年一种新的 DNA 聚合酶 Pol IV 在大肠杆菌中被鉴定, 该酶是由 SOS 调控下的 *dinB* 基因编码, 是一种错误趋向性(error-prone)DNA 聚合酶^[1,2]。错误趋向性 DNA 聚合酶基因的发现给科学界带来了极大的震动。本文以错误趋向性 DNA 聚合酶 *dinB* 基因为例, 利用基因的体内超表达方法对错误趋向性 DNA 聚合酶的生物学意义进行了初步

的探索, 以探寻其对病原生物防治的意义。现报道如下。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种与质粒

大肠杆菌 AB1157 和大肠杆菌 YG7207

收稿日期: 2005-09-08

作者简介: 席云(1969—), 女, 陕西西安人, 副主任技师; 肖刚, 主管技师, 通讯作者. E-mail: xiaogang1993@hotmail.com

(*dinB*: kan derivative of AB1157) 由东京大学 Nohmi 教授惠赠; 质粒 pUC19 由本实验室保存。

1.2 工具酶及其它试剂

限制性内切酶 *Sal* I、*Eco*R I、*Bam*H I、*Hind* III 购自 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶购自 New England Biolab 公司; Pfu 酶和 Taq Plus 酶购自上海生工; 所有 PCR 引物由上海生工合成; 质粒提取及 DNA 胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司。

1.3 重组质粒 pUC-*dinB*-*rrnB*、pUC-*dinBR*-*rrnB* 和 pUC-*phoE*-*rrnB* 的构建

构建过程如图 1, 箭头方向指代启动序列 (promoter) 或编码序列 (CDS) 的工作方向。由图 1 可知, 在 pUC-*dinB*-*rrnB* 和 pUC-*phoE*-*rrnB* 中由 *dinB* 启动序列启动转录出的编码序列可以被翻译成功能蛋白, 而 pUC-*dinBR*-*rrnB* 中由 *dinB* 启动序列启动转录出的是 *dinB* 编码序列的反义链, 该转录本不可能被翻译成 *dinB* 功能蛋白。

以 pBV220 为模板用 PCR 扩增出转录终止信号 *rrnB* 片段 (引物见表 1)。扩增得到的约 450 bp 的片段经 *Hind* III 和 *Sal* I 酶切插入 pUC19 的 *Hind* III+*Sal* I 窗口, 转化大肠杆菌 Top 10 菌株, 得到重组质粒 pUC-*rrnB*。

包含自身启动序列的 *dinB* 基因由 PCR 从大肠杆菌 AB1157 的基因组中扩增得到 (引物见表 1)。扩增得到的约 1 kb 的片段经 *Eco*R I 和 *Sal* I 酶切插入 pUC-*rrnB* 的 *Eco*R I+*Sal* I 窗口, 转化大肠杆菌 Top 10 菌株, 得到重组质粒 pUC-*dinB*-*rrnB*。

从质粒 pUC-*dinB*-*rrnB* 中分别扩增出 *dinB* 基因的启动序列和 *dinB* 基因的编码区 (引物见表 1)。长约 300 bp 的启动序列扩增产物, 长约 600 bp 的 *dinB* 编码区扩增产物与质粒 pUC-*rrnB* 做 3 片段连接后, 转化大肠杆菌 Top 10 菌株, 得到重组质粒 pUC-*dinBR*-*rrnB*。该质粒中 *dinB* 基因的编码区是以反向接入其启动序列的下游^[3]。

表 1 所用到的 PCR 引物

Table 1 Primers used in this study

Amplified products	primers
<i>rrnB</i> fragment	Up: 5 TAAGTCGACCTGTTTTGGCGGATGAGAG3 Down: 5 CCCAAGCTTAAACAAAAGAGTTTTGTAGAA 3
<i>dinB</i> gene	Up: 5 TCGGAATTCGGTGGAGCTCGCGCCAGTG 3 Down: 5 CATGTCGACATACATCATAATCCAGCACC3
<i>dinB</i> promoter	Up: 5 TCGGAATTCGGTGGAGCTCGCGCCAGTG 3 Down: 5 CGCGGATCCTGCTCACCTCTCAACTG3
<i>dinB</i> coding segment	Up: 5 AGCGGATCCATGCGTAAAATCATTTCAT3 Down: 5 CATGTCGACATACATCATAATCCAGCACC3

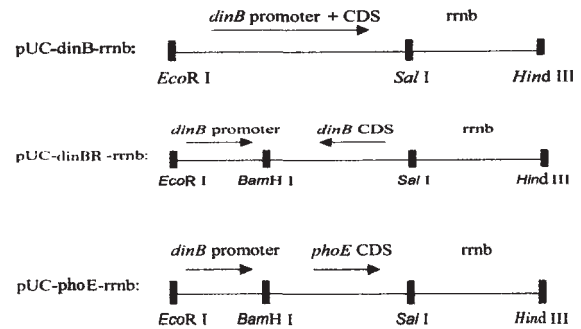


图 1 重组质粒 pUC-*dinB*-*rrnB*、pUC-*dinBR*-*rrnB* 和 pUC-*phoE*-*rrnB* 中的插入片段结构

Fig1 Frame of inserting fraction of the rearrangement plasmid pUC-*dinB*-*rrnB*, pUC-*dinBR*-*rrnB* and pUC-*phoE*-*rrnB*

从大肠杆菌 AB1157 的基因组中扩增该基因。将扩增得到的约 600 bp 的片段经 *Bam*H I+*Sal* I 酶切插入 pUC-*dinBR*-*rrnB* 的 *Bam*H I+*Sal* I 窗口, 转化大肠杆菌 Top 10 菌株, 得到重组质粒 pUC-*phoE*-*rrnB*。

1.4 混合连续培养与细胞计数

不同的质粒与不同的菌株交错组合, 分为 4 组: 第 1 组为含质粒 pUC-*dinB*-*rrnB* 的 *E. coli* AB1157 + 含质粒 pUC-*dinBR*-*rrnB* 的 *E. coli* YG7207; 第 2 组为含质粒 pUC-*dinB*-*rrnB* 的 *E. coli* AB1157+含质粒 pUC-*phoE*-*rrnB* 的 *E. coli* YG7207; 第 3 组为含质粒 pUC-*phoE*-*rrnB* 的 *E. coli* AB1157 + 含质粒 pUC-*dinBR*-*rrnB* 的 *E. coli* YG7207; 第 4 组为不带质粒的 *E. coli* AB1157+ *E. coli* YG7207。混合培养前各菌株活化过夜, 然后对应菌株按 1:1 等体积混合, 再以 1:100 的比例接入 3 mL 新鲜 LB (Luria-Bertani) 培养基中, 37 °C 震荡培养, 每 24 h 按 1:100 的比例转接入 3 mL 新鲜 LB 培养基中; 每次转接同时取少量培养物涂布 LB 平板, 37 °C 培养 8~12 h, 挑取 100~120 个单克隆, 点种至含 40 μg/mL 卡那霉素的 LB 平板上, 37 °C 培养 8~12 h, 计数长出的克隆数目。

1.5 生长曲线的测定

取连续培养 72 h 后的第 1 组混合培养物和第 2 组混合培养物, 利用菌株 AB1157 和 YG7207 对卡那霉素的敏感差异分离出 pUC-*dinB*-*rrnB*/AB1157、pUC-*dinBR*-*rrnB*/YG7207、pUC-*dinB*-*rrnB*/AB1157 和 pUC-*phoE*-*rrnB*/YG7207 4 种重组菌株。将 4 重组菌 37 °C 活化培养过夜后, 按 1:1000 的比例分别接至 3 mL LB(A⁺)培养液中, 37

培养并从 2.5 h 开始每隔 1 h 测定 1 次 A_{600} 。

2 结果

在第 4 组混合培养中, 菌株 YG7207 (卡那霉素抗性, K^+) 与菌株 AB1157 (无卡那霉素抗性, K^-) 在培养物中的比例保持着良好的稳定。第 1、第 2 组混合培养中, K^+ 抗性的菌株在培养物中的比例急剧下降, 并很快接近或等于零; 第 3 组培养物中, K^+ 菌株 (YG7207) 的比例在整体上呈现明显上升 (图 2)。对培养 72 h 后的第 1、第 2 组培养物中的 4 个菌株分别测定了其生长曲线, 结果显示 4 个菌株之间在生长速率上并无明显差别 (图 3)。

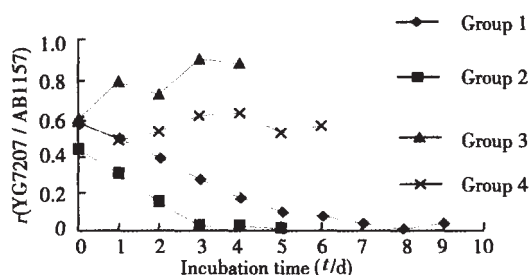


图 2 共培养时间与 K^+ 菌株 (YG7207) 在共培养物中的比例关系

Fig.2 Total incubation time and proportion of K^+ -strain in co-incubation.

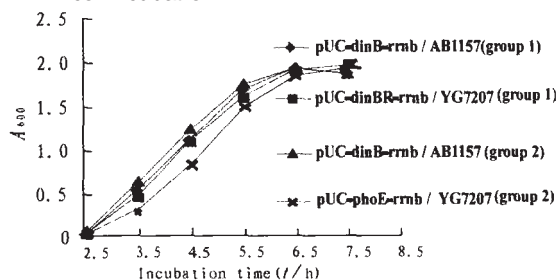


图 3 72 h 共培养后第 1、2 组 4 菌株的生长曲线

Fig.3 Growth curve of the rearrangement strains after co-incubated for 72 h

3 讨论

1999 年一种错误趋向性 (error-prone) DNA 聚合酶被发现以后, 一系列类似的 DNA 聚合酶陆续被发现, 如大肠杆菌中的 UmuC, 酿酒酵母中的 Rev1p 和 Rad30p 以及人的 Rad30A 蛋白, 这些聚合酶在氨基酸水平上都具有一定同源性, 属于同一基因家族 [4-7]。细胞学家和进化学家对错误趋向性 DNA 聚合酶基因广泛存在的生物学原因和意义展

开了激烈的争论 [8]。以 *dinB* 基因为例, 由于在压力存在情况下, 其表达产物 Pol IV 可以为细胞引入大量突变, 从而提高细胞获得适应性突变以度过压力的机会 [9-12]。

第 4 组混合培养中, 菌株 YG7207 (卡那霉素抗性, K^+) 与菌株 AB1157 (无卡那霉素抗性, K^-) 在培养物中的比例保持着良好的稳定。这一点与我们预期的相符, 因为菌株 YG7207 是菌株 AB1157 在 *dinB* 基因被卡那霉素抗性基因 *kan* 替换后的衍生物, 两者之间只有 1 个拷贝的 *dinB* 基因的不同, 因此应该不会在如此短的混合培养期间产生显著的生长优势的差别。这同时也佐证了我们的检测方法可行, 检测样本数目具有良好的统计意义。

第 1、第 2 组混合培养中, K^+ 抗性的菌株在培养物中的比例急剧下降, 并很快接近或等于零。第 2 组培养物中, K^+ 菌株 (YG7207) 所携质粒分别为 pUC-*dinBR-rrnB* 和 pUC-*phoE-rrnB*, 而 K^- 菌株 (AB1157) 所携质粒均为 pUC-*dinB-rrnB*。这 3 种质粒均起源于 pUC19, 大小几乎一样, 因此质粒的拷贝数和复制速率应该不是菌体生长差别的原因; 另外, 虽然我们不能确定 pUC-*phoE-rrnB* 中 *phoE* 基因的表达会否对细胞产生不利影响, 但我们可以确定质粒 pUC-*dinBR-rrnB* 的存在对细胞生长至少是中性的, 因为该质粒 *dinB* 启动序列下游是反向插入的带移码突变的 *dinB* 基因。综上, 我们认为第 1、第 2 组混合培养中 K^+ 菌株 (YG7207) 的比例下降应该是由 K^- 菌株 (AB1157) 的生长优势所造成, 而这种优势则是由其所携质粒 pUC-*dinB-rrnB* 上的 *dinB* 基因的表达产物 Pol IV 所赋予。

第 3 组培养物中, K^+ 菌株 (YG7207) 的比例在整体上呈现明显上升, 原因可能是该组 K^- 菌株 (AB1157) 所携质粒 pUC-*phoE-rrnB* 中的 *phoE* 基因的过量表达对细胞有一定毒害作用。在第 1、2 组培养物中, 后者 K^+ 菌株比例下降较前者快应该也与此有关。

第 1、第 2 组培养物中 *dinB* 基因的超表达赋予了 K^- 菌株 pUC-*dinB-rrnB*/AB1157 混合培养中明显的生长优势; 一种直接的解释是由于 *dinB* 基因的作用, K^- 菌株在共培养中快速的获得了适应性突变。但我们对培养 72 h 后的第 1、第 2 组培养物中的 4 个菌株之间在生长速率上并无明显差别, 这提示 K^- 菌株 pUC-*dinB-rrnB*/AB1157 的生长优势并非由 *dinB* 基因所导致的适应性突变的积累所造成; 因为基因水平的适应性突变在一定时间内应该是稳定遗传的, 这种适应性突变如果存在, 则应该在

K⁻ 菌株的生长曲线中得到体现。

由此, 同时考虑到 *dinB* 基因编码的 Pol IV 是一种负责 DNA 损伤修复的聚合酶, 我们认为上述 K⁻ 菌株 pUC-*dinB*-*rrnB*/AB1157 的生长优势是由于 *dinB* 基因赋予该菌株高效率的 DNA 损伤修复的能力, 从而降低细胞死亡率所造成的。

本研究中, 带多拷贝 *dinB* 基因的菌株 pUC-*dinB*-*rrnB*/AB1157 在如此短的时间内展示出如此显著的生存优势让我们震惊。我们认为这种优势应该不是由于突变率的提高从而导致适应性突变的快速积累所造成的。为了确定这一推测, 我们对第 1、第 2 组共培养物中的共 4 株菌株 pUC-*dinB*-*rrnB*/AB1157 (第 1 组)、pUC-*dinB*-*rrnB*/YG7207、pUC-*dinB*-*rrnB*/AB1157 (第 2 组) 和 pUC-*phoE*-*rrnB*/YG7207 分别测定生长曲线, 结果提示该生长优势并非获得于可稳定遗传的适应性突变。

根据 *dinB* 基因产物的 DNA 修复酶的特性, 我们推测这种生存优势应该是由于细胞死亡率的降低而造成。*dinB* 是我们所知的除抗性基因外的第一个可通过增加基因剂量显著降低细胞死亡率从而短期内就使细胞获得如此生存优势的基因。同时, 我们认为该基因的效果与剂量可能是成正相关的; 第 4 组培养物中未观察到显著的生存差异, 其原因估计就是在该组共培养物中 K⁻ 菌株 (AB1157) 比 K⁺ 菌株 (YG7207) 只多一个拷贝的 *dinB* 基因, 该剂量不足以让菌株在短期内表现出明显生存优势。当然在自然界的长期进化中拥有这一个拷贝的 *dinB* 基因的菌株应该是足够体现出其选择优势的。

dinB 基因和其蛋白产物是 Walker s 实验室 1980 年第一次发现的, 其后相当长的时间里人们未能了解其功能。但是在 2006 年, 对 *dinB* 基因的研究取得了突破性的成就。Daniel 及其同事证实了 *dinB* DNA 聚合酶专门负责特定损伤 DNA 的精确复制^[13]。研究中所见到的 *dinB* 基因超表达大肠杆菌菌株的明显生长优势与该发现是一致的。

参考文献:

- [1] WAGNER J, GRUZ P, KIM S R, et al. The *dinB* gene encodes a novel *E. coli* DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis [J]. *Mol Cell*, 1999, 4(2):281-286.
- [2] BUNTING K A, ROE S M, PEARL L H. Structural basis for recruitment of translesion DNA polymerase Pol IV/ DinB to the beta-clamp [J]. *EMBO J*, 2003, 22(21):5883-5892.
- [3] 晏辉钧, 赵卫, 方丹云, 等. SARS 冠状病毒 M 基因在

大肠杆菌中的表达及其免疫学特性初步研究[J]. 中山大学学报 医学科学版, 2005, 26(1):38-41.

- [4] GERLACH V L, ARAVIND L, GOTWAY G, et al. Human and mouse homologs of *Escherichia coli* DinB (DNA polymerase IV), members of the UmuC/DinB superfamily [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(21):11922-11927.
- [5] ROUSH A A, SUAREZ M, FRIEDBERG E C, et al. Deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* gene RAD30 encoding an *Escherichia coli* DinB homolog confers UV radiation sensitivity and altered mutability [J]. *Mol Gen Genet*, 1998, 257(6):686-692.
- [6] SUNG H M, YEAMANS G, ROSS C A, et al. Roles of YqjH and YqjW, homologs of the *Escherichia coli* UmuC/DinB or Y superfamily of DNA polymerases, in stationary-phase mutagenesis and UV-induced mutagenesis of *Bacillus subtilis* [J]. *J Bacteriol*, 2003, 185(7):2153-2160.
- [7] BOUDSOCQ F, IWAI S, HANAOKA F, et al. *Sulfolobus solfataricus* P2 DNA polymerase IV (Dpo4): an archaeal DinB-like DNA polymerase with lesion-bypass properties akin to eukaryotic poleta [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(22):4607-4616.
- [8] ROSENBERG S M. Evolving responsively: adaptive mutation [J]. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(7):504-515.
- [9] KIM S R, MAENHAUT-MICHEL G, YAMADA M, et al. Multiple pathways for SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: an overexpression of *dinB*/*dinP* results in strongly enhancing mutagenesis in the absence of any exogenous treatment to damage DNA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(25):13792-13797.
- [10] OGI T, KATO T JR, KAT T J, et al. Mutation enhancement by DINB1, a mammalian homologue of the *Escherichia coli* mutagenesis protein *dinB* [J]. *Genes Cells*, 1999, 4(11):607-618.
- [11] STRAUSS B S, ROBERTS R, FRANCIS L, et al. Role of the *dinB* gene product in spontaneous mutation in *Escherichia coli* with an impaired replicative polymerase [J]. *Bacteriology*, 2000, 182(23):6742-6750.
- [12] SLECHTA E S, BUNNY K L, KUGELBERG E, et al. Adaptive mutation: general mutagenesis is not a programmed response to stress but results from rare coamplification of *dinB* with *lac* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(22):12847-12852.
- [13] JAROSZ D F, GODOY V G, DELANEY J C, et al. A single amino acid governs enhanced activity of DinB DNA polymerases on damaged templates [J]. *Nature*, 2006, 439(7301):217-224.

(编辑 黄小延)