

• 基础实验研究论著 •

## 耻垢分枝杆菌 DNA 末端结合蛋白 Ku 的表达、纯化及酶学性质研究

林雅宁<sup>1</sup>, 董智聪<sup>2</sup>, 占景华<sup>2</sup>, 徐忠玉<sup>1,2,△</sup>

(中国人民解放军第一七五医院/厦门大学附属东南医院:1. 检验科;2. 细胞生物治疗中心,福建漳州 363000)

**摘要:**目的 构建耻垢分枝杆菌末端结合蛋白 Ku 原核表达载体,并进行表达纯化及酶学测定。方法 以耻垢分枝杆菌 str. MC2 155 基因组 DNA 为模板,PCR 法扩增 ku 基因,构建 pQE-30-ku 重组质粒,在表达宿主菌 *E. coli* M15 中诱导表达蛋白, Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和层析柱纯化,最后通过凝胶迁移电泳实验测定 Ku 蛋白与 5' 粘末端、3' 粘末端和平末端 3 种不同末端 DNA 结合情况。结果 成功构建了 ku 原核表达载体 pQE-30-ku,并能在宿主菌 *E. coli* M15 中表达,纯化后具有结合不同末端 DNA 的酶活性。结论 Ku 基因克隆到原核宿主菌中能进行表达、纯化,纯化后的蛋白具有结合不同末端 DNA 的生物学活性,为分枝杆菌非同源末端连接的研究奠定了基础。

**关键词:**分枝杆菌属; 基因; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.07.009

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)07-0782-02

**Study on expression, purification and identification of DNA terminal binding protein Ku from mycobacterium smegmatis**Lin Ya'ning<sup>1</sup>, Dong Zhicong<sup>2</sup>, Zhan Jinghua<sup>2</sup>, Xu Zhongyu<sup>1,2,△</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Cell Biotherapy, the 175th Hospital of PLA / Affiliated Dongnan Hospital of Xiamen University, Zhangzhou, Fujian 363000, China)

**Abstract: Objective** To construct the prokaryotic expression vector of Ku binding protein of mycobacterium smegmatis terminal, and expressed determination of purification and characterization. **Methods** Ku gene was amplified from *Mycobacterium smegmatis* str. MC2 155 genomic DNA by PCR and then cloned into expression vector pQE-30. Finally the recombinant plasmid was expressed in *E. coli* M15. After induction by IPTG, the fusion protein of Ku was produced, the protein was purified by Ni<sup>2+</sup>-NTA affinity chromatography, detected it by EMSA. **Results** Ku was successfully constructed and expressed in *E. coli* M15. It could be purified and bind different terminal DNA (5' overhangs, 3' overhangs and blunts). **Conclusion** Ku gene could be cloned into the host bacterium and successfully expressed and purified, the purified protein was biologically active, it could bind different terminal DNA, which might be provide a foundation for further research.

**Key words:** mycobacterium; genes; polymerase chain reaction

结核病是由结核分枝杆菌(MTB)引起的人兽共患的慢性传染病,MTB的DNA修复中缺乏错配修复<sup>[1-3]</sup>,但是它有低忠实性的非同源末端连接修复途径(NHEJ),Ku蛋白是该系统中使断链的DNA链彼此靠近的一个关键酶<sup>[4-6]</sup>。MTB生长周期长,耻垢分枝杆菌(Mse)是MTB耐药分子机制研究的理想模式生物。本文以大肠杆菌为表达宿主菌,表达纯化了具有结合不同末端DNA酶学活性的可溶性重组耻垢分枝杆菌Ku蛋白,为进一步研究其生物学活性及TB耐药机制奠定基础。

**1 材料与方 法**

**1.1 材料** 耻垢分枝杆菌 MC2 155 菌株,用于克隆、表达的质粒 pQE-30,大肠杆菌菌株 *E. coli* M15 均由本实验室保存。

**1.2 仪器与试剂** PCR 仪购自美国 ABI, Ni<sup>2+</sup>-NTA 树脂购自 Novagen 公司,电泳装置购自 BIO-RAD 公司。DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶均为 Takara 公司产品。琼脂糖,丙烯酰胺, N,N'-亚甲双丙烯酰胺均为 Biolin 公司产品。PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒,质粒提取试剂盒为 Omega 公司产品。

**1.3 方 法**

**1.3.1 ku 基因扩增和克隆** 从 Genebank 中获得耻垢分枝杆菌的 ku 基因的全核苷酸序列,使用 Primer 5.0 软件设计引物扩增,上游引物:5'-TTT TGG ATC CAT GAA CCG TGC

GGT ACG CCA TA-3'和下游引物:5'-AAA AAA GCT TCT ACG ACT TCT TCG CAG CTG-3'。PCR 扩增循环条件为:95 ℃ 5 min,1 个循环;95 ℃ 50 s,60 ℃ 50 s,72 ℃ 1 min 30 s,进行 30 个循环反应;最后 72 ℃ 延伸 7 min。基因 PCR 扩增后琼脂糖凝胶电泳回收目标条带。

**1.3.2 Ku 蛋白表达和纯化** 重组菌株在相应的抗菌药物 LB 培养基中培养过夜后接种于新鲜的 LB 中,OD<sub>600</sub> 为 0.5 时加入 0.4 mmol/L 的 IPTG,20 ℃ 诱导 10 h。利用 Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和层析柱纯化蛋白。SDS-PAGE 检测纯度,用 Bio-Rad 公司生产的蛋白质浓度测定试剂盒测定蛋白质的浓度。

**1.3.3 EMSA 检测** 按照参考文献[7]进行 5'粘末端、3'粘末端和平末端三种不同末端 DNA 的制备,6 kb 质粒 pJRL 分别被 pspomI 消化成 5'粘末端, ApaI 3'粘末端, SmaI 平末端片段。DNA 片段与 Ku 蛋白 25 ℃ 孵育 30 min,然后在 16 ℃,3% 琼脂糖电泳,20 V 电泳 10 h,凝胶成像系统观察。

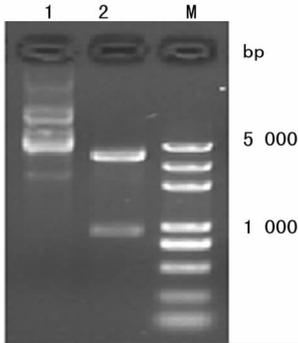
**2 结 果**

**2.1 PCR 扩增产物的序列分析** 来源于耻垢分枝杆菌 ku 基因扩增产物通过基因工程连接到 pQE-30 质粒中,酶切验证后进行全基因测序,见图 1。

**2.2 Ku 的表达及纯化** 将 pQE-30-ku 重组子进行诱导表达经过 Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和层析柱纯化,SDS-PAGE 电泳,见图 2。

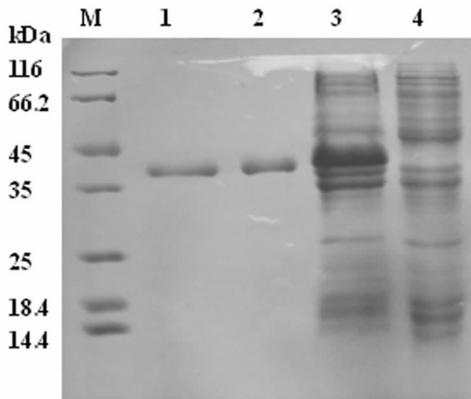
**2.3 Ku 蛋白与不同末端 DNA 的相互作用** 凝胶电泳迁移

实验结果表明 Ku 蛋白能与 5' 粘末端、3' 粘末端和平末端 3 种不同末端 DNA 结合, 结果只能定性 Ku 与这三种不同末端 DNA 都有结合活性, 还无法比较它们结合能力的强弱, 见图 3。



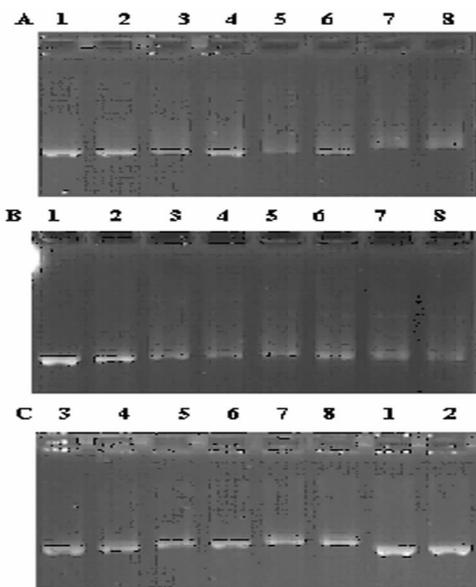
泳道 M: DNA 标记物 DL 2000 plus; 泳道 1: 重组质粒 pQE30-ku; 泳道 2: 重组质粒 pQE30-ku BamH I 和 Hind III 双酶切。

图 1 pQE30-ku 重组质粒的鉴定



泳道 M: 蛋白标记物; 泳道 1 和 2: 纯化的 Ku 蛋白; 泳道 3: pQE-30-ku 重组子; 泳道 4: pQE-30 菌株对照。

图 2 SDS-PAGE 分析 Ku 蛋白



A: 3' 粘末端 DNA 100 ng 与不同浓度 Ku 蛋白反应; B: 5' 粘末端 DNA 100 ng 与不同浓度 Ku 蛋白反应; C: 平末端 DNA 100 ng 与不同浓度 Ku 蛋白反应; 其中 Ku 蛋白浓度泳道 1 和 2 是 0 nmol/L, 3 和 4 是 200 nmol/L, 5 和 6 是 400 nmol/L, 7 和 8 是 800 nmol/L。

图 3 3 种不同末端 DNA 结合情况

### 3 讨论

MTB 的耐药机制与其药物敏感性相关基因突变、缺失和插入及其菌体本身的 DNA 修复能力有关<sup>[8]</sup>。Ku 蛋白作为分枝杆菌 NHEJ 修复的关键酶, 以二聚体的形式结合 DNA 断裂处, 然后招募 ligD 等催化断裂 DNA 的封闭<sup>[9-10]</sup> 目前尚不清楚 Ku 只是 ligD 的招募因子还是有别构效应, 它对不同 DNA 双链断裂修复的能力及其忠实度问题仍值得讨论<sup>[11-12]</sup>。MTB 本身培养周期长、体外培养营养要求高等特点, Mse 作为它的一种模式生物, 具有基因组同源性强、易培养、周期短等特点, 在 MTB 耐药的分子机制研究中深受科学家的欢迎。

本实验构建了 Mse 的原核表达载体 pQE-30-ku, 并在表达宿主菌 *E. coli* M15 中诱导表达。通过优化诱导剂 IPTG、温度、菌浓度等条件, 使表达的蛋白可溶性提高, 有利于蛋白质的纯化和保持生物学功能。通过 EMSA 实验, 初步表明了纯化的 Ku 蛋白具有结合不同末端 DNA 的能力。Ku 蛋白在分枝杆菌的 NHEJ 修复的作用已经受到越来越多研究者的关注, 大量表达纯化 Ku 蛋白对 MTB 有效防治的研究具有重要科学价值。

### 参考文献

- [1] 朱友生. 抗结核药物研究新进展[J]. 中国防痨杂志, 2007, 29(4): 348-351.
- [2] 董海燕, 万康林. 分子生物学技术用于结核分支杆菌耐药性检测的研究进展[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(9): 811-813.
- [3] Mizrahi V, Andersen SJ. DNA repair in *Mycobacterium tuberculosis*. What have we learnt from the genome sequence? [J]. Mol Microbiol, 1998, 29(6): 1331-1339.
- [4] Gong C, Bongiorno P, Martins A, et al. Mechanism of nonhomologous end-joining in mycobacteria; a low-fidelity repair system driven by Ku, ligase D and ligase C [J]. Nat Struct Mol Biol, 2005, 12(4): 304-312.
- [5] Bowater R, Doherty AJ. Making ends meet; repairing breaks in bacterial DNA by non-homologous end-joining [J]. PLoS Genet, 2006, 2(2): e8.
- [6] Stephanou NC, Gao F, Bongiorno P, et al. Mycobacterial nonhomologous end joining mediates mutagenic repair of chromosomal double-strand DNA breaks [J]. J Bacteriol, 2007, 189(14): 5237-5246.
- [7] Aniukwu J, Glickman MS, Shuman S. The pathways and outcomes of mycobacterial NHEJ depend on the structure of the broken DNA ends [J]. Genes Dev, 2008, 22(4): 512-527.
- [8] 李召东, 陈瑜, 王明法, 等. 结核杆菌耐药的分子机制研究 [J]. 中国医药导报, 2007, 4(01Z): 15-17.
- [9] Della M, Palmos PL, Tseng HM, et al. Mycobacterial Ku and ligase proteins constitute a two-component NHEJ repair machine [J]. Science, 2004, 306(5696): 683-685.
- [10] Pitcher RS, Tonkin LM, Green AJ, et al. Domain structure of a NHEJ DNA repair ligase from *Mycobacterium tuberculosis* [J]. J Mol Biol, 2005, 351(3): 531-544.
- [11] Pitcher RS, Brissett NC, Doherty AJ. Nonhomologous end-joining in bacteria; a microbial perspective [J]. Annu Rev Microbiol, 2007, 61(1): 259-282.
- [12] Li Z, Wen J, Lin Y, et al. A Sir2-Like Protein Participates in Mycobacterial NHEJ [J]. PLoS ONE, 2011, 79(2): 316-330.