

# WEB2 基因在酿酒酵母 S 期检查点通路上 调控 RNR3 基因表达

李新鸣<sup>1</sup> 孙黎光\* 刘 萍 付 玥 白抚生<sup>2</sup> 宣忠信

(中国医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,<sup>1</sup>病原微生物教研室,  
沈阳 110001; <sup>2</sup>辽宁省金秋医院神经内科, 沈阳 110016)

**摘要** WEB2 基因参与酿酒酵母 S 期检查点调控机制, 而 RNR3 基因位于该调控通路末端, DNA 损伤或合成阻断时, S 期检查点通路诱导 RNR3 过度表达。因此, 通过确定 WEB2 在该检查点通路上是否参与调控 RNR3 基因的表达, 将有助于进一步明确 WEB2 基因在检查点通路上的工作位点, 了解 WEB2 基因如何发挥检查点调控功能。构建 RNR3-LacZ 基因融合质粒, 用于检测酵母细胞内 RNR3 基因的诱导性。诱导性可以通过测定  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性而得知。利用 DNA 损伤药物甲磺酸甲酯(MMS)及 DNA 合成阻断剂羟基脲(HU)处理酵母细胞, 测定 WEB2 基因突变株和野生株细胞内 RNR3 基因的诱导性。结果, WEB2 突变株细胞中诱导活性分别增加(8.27±0.38)倍和(9.55±0.24)倍, 而野生株分别增加了(83.32±2.42)倍和(124.67±2.87)倍。反映 RNR3 基因在 WEB2 突变株中的诱导性低于野生株。同 RAD53 突变株相比, 后者的 RNR3 基因的诱导性更低, 仅为(2.37±0.18)倍和(2.91±0.13)倍。说明 WEB2 基因突变影响 S 期检查点通路的信号传递至 RNR3 基因, 所以在酿酒酵母 S 期检查点通路上, WEB2 工作在 RNR3 基因上游, 参与调控 RNR3 的表达, 但调控能力不如 RAD53 基因强。

**关键词** WEB2 基因; S 期检查点; RNR3 基因; 酿酒酵母

对于任何细胞来说, 只有 DNA 正常复制才能保证细胞的正常增殖。细胞内多种因素共同确保 DNA 的忠实复制, 其中检查点是各种感知 DNA 复制压力的调控通路, 通过诱导细胞修复相关基因的转录表达和阻断细胞周期在 G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>/M 或 S 期调控细胞应对复制压力。在酿酒酵母中检查点调控通路有两种: 一种是在整个细胞周期中都发挥调控作用, 另外一种是在 S 期发挥作用的 S 期检查点通路<sup>[1-3]</sup>。该检查点通路由多个参与 DNA 复制的基因构成<sup>[4]</sup>, 其中 POL2, 编码 DNA 聚合酶  $\epsilon$ , 可以感知发生在 S 期的 DNA 损伤或合成阻断, 通过 DPB11、RFC5 等检查点通路的上游调控基因, 依赖 MEC1-RAD53 基因的调控作用使细胞周期阻滞<sup>[3-5]</sup>, 激活的 Rad53 蛋白作为调控中枢, 一方面使细胞阻滞在 S 期, 另一方面则诱导特殊基因的转录, 即与 DNA 修复相关基因的转录<sup>[6,7]</sup>。WEB2(Wants E1A Badly 2, WEB2)基因, 也称 DNA2 基因<sup>[8]</sup>, 编码产物具有 DNA 解链酶作用和核酸酶活性, 参与冈崎片段的成熟过程, 在 DNA 复制延伸阶段发挥重要功能<sup>[8-10]</sup>。

研究还发现 WEB2 突变株对 DNA 损伤及复制阻断敏感, 表现为存活率的下降<sup>[8,11,12]</sup>, 本课题组研究发现 WEB2 突变株, 在 DNA 合成阻断剂羟基脲(hydroxyurea, HU)作用条件下表现出 S 期检查点功能失调, 无法阻滞在 S 期, 而是携带未完成复制的 DNA 进入有丝分裂期<sup>[13]</sup>。因此, 确定 WEB2 在 S 期检查点通路上的工作位点及与其他检查点基因的作用关系, 明确 WEB2 基因在 S 期检查点信号转导通路的调控作用是非常重要的。

在复制压力下, 检查点通路所诱导的特殊基因的转录中, 最受关注的是 RNR3 基因的诱导性<sup>[1,6]</sup>。RNR 基因属于核糖核酸还原酶(ribonucleotide reductase, RNR)系统的一员, 其中 RNR1 和 RNR3 编码该酶的大亚基, RNR2 和 RNR4 编码小亚基<sup>[6,14-16]</sup>。正常生长条件下, 细胞中几乎检测不到 RNR3 的表达。但是 DNA 损伤或是合成阻断时可诱导其大量表

收稿日期: 2005-07-04 接受日期: 2005-08-23

国家自然科学基金资助项目(No.39870384)

\* 通讯作者。Tel: 024-23256666-5297, E-mail: ydslg@163.com

达,因此,常被用作分子工具,用于分析及检测检查点基因的调控功能<sup>[14-16]</sup>。本课题组构建了 *RNR3* 基因 5' 端启动子序列与 *LacZ* 基因融合质粒,在 DNA 合成阻断剂 HU 作用下,或是损伤剂甲磺酸甲酯 (methyl methanesulfonate, MMS) 造成的 S 期 DNA 损伤条件下,证明 *WEB2* 基因是否通过参与调控 *RNR3* 基因的诱导转录,来实现其 S 期检查点调控功能。由于 *RAD53* 基因突变导致无法调控 *RNR3* 基因的诱导表达,因此,在检测 *WEB2* 基因对 *RNR3* 基因调控功能的同时,还利用一个 *RAD53* 缺失突变株 *cry3*, 作为调控 *RNR3* 表达功能缺陷的参照,来比较 *WEB2* 基因和 *RAD53* 基因在 S 期检查点通路上,对 *RNR3* 表达调控能力的强弱。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与质粒

酵母菌野生株 YMW2 (*MATa ade2-1 ade3Δ22 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100*); 突变株 *web2* (*MATa, web2, ade2 his2 trp1 ura3*); *cry3* (*MATa ade2-1 ade3Δ22 his3-11, 15 leu2-3,112 rad53, trp1-1 ura3-1 can1-100*), 质粒 pBS KS+, pNN407 (*RNR2-lacZ*), 美国西南医学中心宣忠信博士惠赠; *E.coli* JM109 菌株,用于质粒的构建及扩增,中国医科大学微生物实验室保存。

### 1.2 培养基

酵母 YPD、YPG 培养基, SG 选择性培养基,即根据酵母菌株的营养缺陷型添加相应的氨基酸和碱基。*E.coli* 培养使用的是 LB 培养基。

### 1.3 试剂

限制性核酸内切酶, HU、MMS、T4 DNA 连接酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶购自 Sigma 公司。DNA 分子量标记物购自 TaKaRa 公司。ONPG (O-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside)、醋酸锂等试剂、DNA 快速纯化回收试剂盒 (QIAprep spin plasmid Kit) 购自华美生物公司。由 TaKaRa 公司合成 PCR 引物。

### 1.4 *RNR3-LacZ* 基因融合质粒的构建

以 *Bam*HI 消化的酵母染色体 DNA 为模板, PCR 扩增 *RNR3* 基因 5' 启动子序列, 所用引物:

有义: 5'-GGATCCAGAAGGAAACACTC-3'

*Bam*HI

反义:

5'-CTGCAGGTCATTTGTGTGGGAGTATTTG-3'

*Pst*I

所得 720 bp 的 PCR 片段经 *Bam*HI 和 *Pst*I 消化, 克隆到 *Bam*HI 和 *Pst*I 消化的 pBS KS+ 质粒载体的多克隆位点接头上, 构建成 pBRNR3 质粒, 目的是利用 pBS KS+ 上的 *Xho*I 位点, 调整 *RNR3* 的读码框架, 以适应 pNN407 质粒上的 *LacZ* 片段。经 *Bam*HI-*Xho*I 消化 pBRNR3 质粒得到 *RNR3* 片段, 将其克隆到 *Bam*HI-*Xho*I 消化的 pNN407 质粒, pNN407 质粒为一个 *URA3 CEN4 ARS1 RNR2-LacZ* 融合子载体<sup>[14]</sup>, 取代其上的 *RNR2* 基因, 构建成 *RNR3-LacZ* 融合基因质粒, 即 pNRNR3 质粒。

### 1.5 重组质粒的鉴定

用 *E.coli* JM109 进行质粒扩增, 参照 QIAprep Spin Plasmid Kits 说明提取质粒。利用 PCR 扩增 *RNR3* 基因 5' 端启动子序列及限制性核酸内切酶酶切鉴定质粒。

### 1.6 酵母菌株构建及筛选

根据醋酸锂介导的酵母细胞转染法<sup>[11]</sup>, 将 pNRNR3 重组质粒转入 YMW2, *cry3* 酵母细胞, 接种 SG-URA 平板; 转入 *web2* 细胞接种 SG-URA-LEU 平板, 30 °C 培养 48 h, 生长的菌落即为转化菌落, 分别构建成 RYMW2、R*cry3* 和 R*web2* 菌株。

### 1.7 利用 $\beta$ -半乳糖苷酶活性进行 *RNR3* 诱导性测定

将 RYMW2、R*web2* 和 R*cry3* 培养到对数早期, 加入新的培养基培养至对数中期 ( $A_{600}=0.6$ ), 取 2 ml 培养物, 分别加入 HU (终浓度 200 mmol/L) 或 MMS (终浓度 0.5%), 30 °C 培养 4 h, 测定  $\beta$ -半乳糖苷酶活性<sup>[9,10]</sup>。

$\beta$ -半乳糖苷酶活性的单位数 =  $1000 \times (A_{420} - 1.75 \times A_{500}) / (t \times 0.1 \times A_{600})$ , 式中 t 为时间 (min)。

阴性对照: 1 ml Z 缓冲液、50  $\mu$ l 氯仿、25  $\mu$ l 0.1% SDS、200  $\mu$ l ONPG、0.5 ml 的 1 mol/L  $\text{NaCO}_3$ 。阳性对照: 1 ml Z 缓冲液、50  $\mu$ l 氯仿、25  $\mu$ l 0.1% SDS、200  $\mu$ l ONPG、0.5 ml 的 1 mol/L  $\text{NaCO}_3$ 、1  $\mu$ l  $\beta$ -半乳糖苷酶 (50 u/ $\mu$ l)。

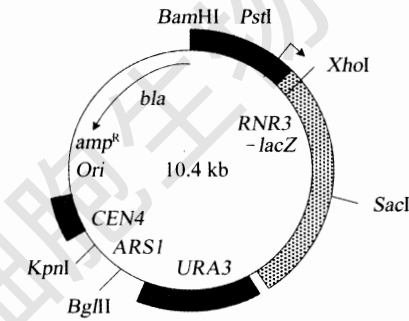
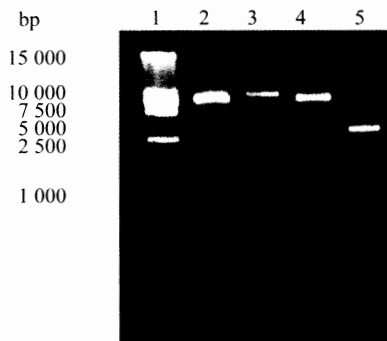
## 2 结果

### 2.1 *RNR3* 重组质粒结构图

重组 pNRNR3 质粒产生 *RNR3* 与 *LacZ* 的融合蛋白 Rnr3-LacZ, 携带 *URA3* 基因作为选择性标记, *LacZ* 基因编码  $\beta$ -半乳糖苷酶 (图 1)。

### 2.2 酶切图谱分析

经过 *Xho*I、*Bam*HI 双酶切后, 重组质粒切成 800 bp 和 9 500 bp 两个片段, 分别为目的基因和载

图1 *RNR3* 重组质粒结构图图2 *RNR3* 重组质粒限制性内切酶酶切分析

1: DL15000 DNA 标准; 2: pNRNR3 质粒经 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切; 3: pNRNR3 质粒经 *Alu*I 消化; 4: pNN407 质粒经 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切; 5: pBRNR3 质粒经 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切。

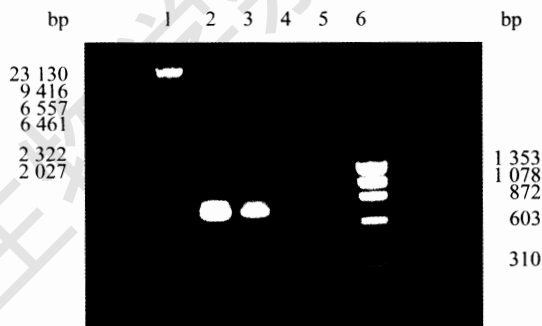


图3 产物的琼脂糖凝胶电泳

1: DNA 标准( $\lambda$ DNA/*Hind*III); 2: pNRNR3 为模板; 3: pBRNR3 为模板; 4: pNN407 为模板; 5: pBS KS+ 为模板; 6: DNA 标准( $\phi$ X174 DNA/*Hae*III)。

体; 而 *Alu*I 酶切位点只存在于目的基因中, 为单一位点, 载体中无此酶切位点, 所以 *Alu*I 可将重组质粒切成 10.4 kb 的线形片段(图 2)。

### 2.3 PCR 鉴定重组质粒

以 pNRNR3、pBRNR3 质粒为模板特异性扩增 *RNR3* 基因 5' 端启动子序列, 结果为一 730 bp 的 DNA 片段。与以酿酒酵母 DNA 为模板扩增结果一致。

表1 HU 和 MMS 作用下各种 *RNR3-LacZ* 转化菌株的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性

	$\beta$ -半乳糖苷酶活性单位		
	RYMW2	Rweb2	Rcry3
无	1.80 $\pm$ 0.06	3.22 $\pm$ 0.11	1.41 $\pm$ 0.13
200 mmol/L HU	145.56 $\pm$ 5.84	26.72 $\pm$ 1.81	3.40 $\pm$ 0.58
0.5% MMS	224.18 $\pm$ 2.85	30.70 $\pm$ 0.66	4.05 $\pm$ 0.16

表中各数值为均值  $\pm$  标准误, 为分别挑选 4 个独立克隆进行  $\beta$ -半乳糖苷酶活性测定而来。

表2 HU 和 MMS 对各种 *RNR3-LacZ* 转化菌株  $\beta$ -半乳糖苷酶活性的诱导作用

菌株	$\beta$ -半乳糖苷酶活性诱导率(诱导值/基础值)	
	HU	MMS
RYMW2	83.32 $\pm$ 2.42	124.67 $\pm$ 2.87
Rweb2	8.27 $\pm$ 0.38*	9.55 $\pm$ 0.2*
Rcry3	2.37 $\pm$ 0.18**	2.91 $\pm$ 0.13**

表中各数值为均值  $\pm$  标准误。在 HU 作用下, 与 RYMW2 组比较, \* $P < 0.001$ ; 与 RYMW2 组和 Rweb2 组比较, \*\* $P < 0.001$ 。在 MMS 作用, 与 RYMW2 组比较, \* $P < 0.001$ ; 与 RYMW2 组和 Rweb2 组比较, \*\* $P < 0.001$ 。

以质粒载体为模板, 特异性扩增结果为阴性(图 3)。

### 2.4 $\beta$ -半乳糖苷酶活性测定

pNRNR3 质粒重组有 *RNR3-LacZ* 基因, *RNR3* 基因转录水平的提高可通过  $\beta$ -半乳糖苷酶活性的增加得到反映。在 HU、MMS 作用下, RYMW2 的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性显著增加, 由基础值为 1.80  $\pm$  0.06, 分别增加至 145.56  $\pm$  5.84 和 224.18  $\pm$  2.85(表 1), 反映 *RNR3-LacZ* 基因受诱导大量表达, 说明所构建的 *RNR3-LacZ* 质粒, 可以作为一个 *RNR3* 基因诱导性报告质粒。利用这一报告质粒, 分别检测了在 HU 或 MMS 作用下, Rweb2 和 Rcry3 突变株细胞内  $\beta$ -半乳糖苷酶活性。其诱导率分别为(8.27  $\pm$  0.38)、(9.55  $\pm$  0.24)倍和(2.37  $\pm$  0.18)、(2.91  $\pm$  0.13)倍。经 *t* 检验, 结果分别为  $P < 0.001$ , 反映出在 HU 或 MMS 作用下, 与野生株细胞相比, 两种突变株细胞均不能实现正常的 *RNR3* 基因转录诱导(表 2)。HU 或 MMS 作用下, web2 和 cry3 两种突变细胞相比, 后者的诱导率更低, 经 *t* 检验,  $P < 0.001$ 。说明 *RAD53* 基因突变对 *RNR3* 诱导表达的影响比 *WEB2* 更为显著。

## 3 讨论

在芽殖酵母中, DNA 损伤或是合成阻断时, 通过各种检查点通路的调控作用, 可以阻止细胞在细胞周期的不同时期, 同时诱导多个基因的转录表

达, 以提高细胞的修复能力。DNA 复制阻断仅发生在 S 期, 因此 S 期检查点通路的主要功能是应答发生在 S 期的 DNA 损伤及合成阻断, 使细胞从这种 DNA 复制压力下恢复出来<sup>[1]</sup>, 确保染色体忠实复制及分离。很多种药物可导致 DNA 损伤或合成阻断, 如 MMS 为一种碱性试剂导致 DNA 聚合体形成, 引起 DNA 损伤; HU 为核糖核酸还原酶抑制剂, 可阻断 DNA 合成<sup>[1]</sup>。RNR3 基因不同于其他受诱导而大量转录表达的基因之处在于 RNR3 基因的诱导不受细胞周期调控。在正常生长条件下, 细胞内 RNR3 基因表达水平极低, 但 DNA 损伤或是合成阻断时, 经 RAD53 基因的调控, 可被诱导大量表达<sup>[14-16]</sup>。因此通过检测细胞内 RNR3 基因转录表达水平, 就可以反映出细胞内 DNA 损伤或是合成阻断的压力以及细胞应对这种压力的能力如何。根据已有的研究结果, RNR3 基因编码区上游约 720 bp 的启动子序列, 是诱导 RNR3 基因的大量转录表达所必需的, 而且该区的诱导转录足以反映整个 RNR3 基因的转录诱导性<sup>[17-20]</sup>。本课题组根据文献提供的引物序列<sup>[18, 19]</sup>, 经 PCR 扩增了 RNR3 基因 5' 端启动子序列构建 RNR3-LacZ 融合基因质粒。通过测定  $\beta$ -半乳糖苷酶活性, 就可以检测 RNR3 基因的诱导性。当野生株 RYMW2 受 DNA 损伤剂 MMS 作用 4 h 后, 细胞内  $\beta$ -半乳糖苷酶活性增强了近 125 倍; DNA 合成阻断剂 HU 作用下, 其活性增强了约 83 倍。因为在无药物作用下, 细胞内  $\beta$ -半乳糖苷酶活性非常低, 仅为 1.8 左右。因此细胞内  $\beta$ -半乳糖苷酶活性增强是由于 MMS 或 HU 诱导 RNR3 基因的转录表达所致。所构建的 RNR3-LacZ 融合质粒 pNRNR3, 可以作为一个 RNR3 基因转录诱导的报告质粒, 用于检测 DNA 复制压力下, 细胞内 RNR3 基因的受诱导而转录表达的水平, 反映不同细胞株应答 DNA 复制压力的能力。本研究利用这一报告质粒, 检测了不同条件下 web2 细胞中 RNR3 基因的诱导性。由于 web2 细胞表现出 S 期检查点功能缺陷, 利用 a 因子处理细胞使其同步于 G<sub>1</sub> 期后进入 S 期, 以检测 WEB2 基因突变如何影响 S 期检查点调控功能的发挥。在 HU 阻断 DNA 合成, 突变株 web2 细胞中  $\beta$ -半乳糖苷酶活性有所增强, 但诱导率仅为野生株的 1/10, 说明突变株 web2 细胞内 RNR3 基因的转录诱导性明显低

于野生型细胞。在 MMS 作用下, 也就是对于发生在 S 期的 DNA 损伤, 突变株 web2 细胞也不能正常的诱导 RNR3 基因的转录表达。反映出在 S 期的 DNA 复制压力下, RNR3 基因在 web2 突变株中的诱导性低于野生株的。这就意味着 WEB2 基因突变, 影响 S 期检查点通路的信号传递及功能的发挥, 不能正常诱导 RNR3 基因的转录。因此, 在酿酒酵母 S 期检查点通路上, WEB2 工作在 RNR3 基因上游, 参与调控 RNR3 的表达。同时, 本研究还检测了 DNA 复制压力下, 突变株 cry3 细胞内  $\beta$ -半乳糖苷酶活性。其活性较 web2 细胞更低, 仅为基础值的 2~3 倍左右。由于 cry3 细胞为 RAD53 基因突变株, 而 RAD53 基因在 S 期检查点通路上发挥重要作用, 调控多个检查点基因来实现细胞周期的阻滞及包括 RNR3 在内的多种基因的转录诱导。因此, 本研究结果不仅再次验证了 RAD53 对 RNR3 转录诱导的调控; 而且提示, 在酿酒酵母 S 期检查点通路上, WEB2 基因的调控作用没有 RAD53 基因强, 至少是在调控 RNR3 基因的诱导转录方面。由此可对 Foss 等<sup>[1]</sup>提出的 S 期检查点通路给予补充, 以加深对酿酒酵母检查点的认识为探索真核细胞的细胞周期调控提供依据。

#### 参考文献 (References)

- [1] Foss EJ. *Genetics*, 2001, **157**: 567
- [2] Zhao XL et al. *EMBO J*, 2001, **20**: 3544
- [3] Osborn AJ et al. *Genes Dev*, 2003, **17**: 1755
- [4] Krishnan V et al. *Mol Cell*, 2004, **16**: 687
- [5] Bachant J et al. *J Cell Biol*, 2005, **168**: 999
- [6] Huang M et al. *Cell*, 1998, **94**: 595
- [7] Khanna KK et al. *Nat Genet*, 2001, **27**: 247
- [8] Fiorentino DF et al. *Mol Biol Cell*, 1997, **8**: 2519
- [9] Choe W et al. *Mol Cell Biol*, 2002, **22**: 4202
- [10] Kao HI et al. *J Biol Chem*, 2004, **279**: 50840
- [11] Budd ME et al. *Mutat Res*, 2000, **459**: 173
- [12] Imamura O et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 8193
- [13] 李新鸣等. *细胞生物学杂志*, 2002, **24**: 121
- [14] Zhou Z et al. *Genetics*, 1992, **131**: 851
- [15] Domkin V et al. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 18574
- [16] Yao R et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 6628
- [17] Yagle K et al. *Mol Cell Biol*, 1990, **10**: 5553
- [18] Endo-Ichikawa Y et al. *Biochem Pharmacol*, 1995, **50**: 1695
- [19] Endo-Ichikawa Y et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **222**: 280
- [20] Li B et al. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 33788

## *RNR3* Gene Expression is Regulated by *WEB2* Gene in S Checkpoint Pathway of *S.cerevisiae*

Xin-Ming Li<sup>1</sup>, Li-Guang Sun\*, Ping Liu, Yue Fu, Fu-Sheng Bai<sup>2</sup>, Zhong-Xin Xuan

(*Department of Biochemistry and Molecular Biology, <sup>1</sup>Department of Microbiology and Parasitology, China Medical University, Shenyang 110001, China; <sup>2</sup>Department of Neurology, Liaoning Provincial Jinqiu Hospital, Shenyang 110016, China*)

**Abstract** Previous works suggest the role of *WEB2* in S checkpoint regulation, it is necessary to make sure its location and interactions with other checkpoint genes in this signal transduction pathway. *RNR3* gene is an important effector at the end of this pathway. The transcription of *RNR3* gene is induced in response to DNA damage or DNA replication block. So we detect if *WEB2* gene involves in *RNR3* induction. The induction of *RNR3* gene was investigated in *S.cerevisiae* using *RNR3-LacZ* fusion plasmid. Gene induction was monitored by measuring the  $\beta$ -galactosidase activity. When *WEB2* mutant and wild type were exposed to hydroxyurea (HU) or methyl methanesulfonate (MMS), induction of *RNR3* were observed. The  $\beta$ -galactosidase activity is  $8.27 \pm 0.38$  or  $9.55 \pm 0.24$  fold to basal levels in *WEB2* mutant, but is far lower than in wild type, which are  $83.32 \pm 2.42$  or  $124.67 \pm 2.87$  fold. *RAD53* mutant has lower induction of *RNR3*,  $2.37 \pm 0.18$  and  $2.91 \pm 0.13$  fold, respectively. The results suggest that *WEB2* gene mutation blocks the checkpoint signal transduction to *RNR3* gene. *WEB2* gene acts upstream of *RNR3* gene, less important than *RAD53*, may function together with other genes in regulation of *RNR3* expression.

**Key words** *WEB2* gene; S checkpoint; *RNR3* gene; *Saccharomyces cerevisiae*

Received: July 4, 2005 Accepted: August 23, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.39870384)

\*Corresponding author. Tel: 86-24-23256666-5297, E-mail: ydslg@163.com