

DOI:CNKI:61-1390/S.20111025.2130.028

网络出版时间:2011-10-25 21:30

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20111025.2130.028.html>

# 切刻核酸内切酶 PNE45 的原核表达与活性鉴定

梁亚峰<sup>1</sup>, 张超<sup>1</sup>, 王亚楠<sup>1</sup>, 范三红<sup>1,2</sup>

(1 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100; 2 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

**【摘要】** **【目的】** 对大肠杆菌噬菌体 phiV10 第 45 个基因编码蛋白 PNE45 进行原核表达, 并检测其酶活性。**【方法】** 设计并合成 10 段密码子优化的寡核苷酸序列, 采用重叠延伸 PCR 技术, 将其拼接克隆, 获得人工合成的 PNE45 基因, 然后将其整合入含有 MBP 纯化标签的 pET21a 原核表达载体中, 构建重组载体 pET21a-MBP-PNE45, 诱导表达后获得融合蛋白 MBP-PNE45。利用 Amylose 亲和层析纯化融合蛋白 MBP-PNE45, 以 pUC19 为底物, 分别在  $Mg^{2+}$  和  $Mn^{2+}$  参与下对 MBP-PNE45 活性进行初步鉴定。**【结果】** 融合蛋白 MBP-PNE45 主要以可溶性形式表达, 其表达量占细胞总蛋白的 35% 左右。PNE45 融合蛋白在  $Mg^{2+}$  缓冲液中具有 DNA 随机切刻活性, 在  $Mn^{2+}$  存在时还具有切刻位点对位切刻活性。**【结论】** 首次成功表达并制备了 PNE45, 并初步证明其是一种新的随机性切刻核酸酶。

**【关键词】** PNE45; 重叠延伸 PCR; 表达纯化; DNA 切刻核酸酶

**【中图分类号】** Q556<sup>+</sup>.1

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2011)12-0196-05

## Prokaryotic expression and activity identification of DNA nicking endonuclease PNE45

LIANG Ya-feng<sup>1</sup>, ZHANG Chao<sup>1</sup>, WANG Ya-nan<sup>1</sup>, FAN San-hong<sup>1,2</sup>

(1 College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** **【Objective】** In this study, we attempted to express and purify protein PNE45, which is encoded by gene 45 of *Escherichia* phage phiV10, and further to identify its function. **【Method】** Using overlapping PCR, 10 codon optimized oligonucleotides were spliced to get a synthetic PNE45 gene. The pET21a-MBP-PNE45 expression recombinant vector was constructed. The fusion proteins MBP-PNE45 were purified by Amylose affinity chromatography, and activities identification was carried out using pUC19 as substrate in  $Mg^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  respectively. **【Result】** MBP-PNE45 was soluble, and the percentage of fusion protein was up to about 35%. PNE45 exhibited random DNA nicking activity in  $Mg^{2+}$  buffer, while also counter nicking activity in  $Mn^{2+}$  buffer. **【Conclusion】** The novel random nicking endonuclease PNE45 was expressed, purified and functionally identified.

**Key words:** PNE45; overlapping PCR; expression and purification; DNA nicking endonuclease

根据 Roberts 等 2003 年公布的核酸酶命名法则<sup>[1-2]</sup>, 切刻核酸内切酶 (Nicking endonuclease, NEases) 是只切断双链 DNA 中一条链的核酸酶, 主

要包括 2 类: 一类是指与 5-甲基胞嘧啶 (m5-cytosine) DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferases, MTase) 协同作用的内切酶, 它们在 MTase 识别的

\* [收稿日期] 2011-05-10

[基金项目] 中央高校基本科研业务专项 (QN2009070)

[作者简介] 梁亚峰 (1985—), 男, 山西平遥人, 在读硕士, 主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: liangyafeng@hotmail.com

[通信作者] 范三红 (1971—), 男, 陕西合阳人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事生物化学与分子生物学研究。

E-mail: sanhong.fan@gmail.com

m5-cytosine 脱氨基序列的非配对 G-T 碱基对附近将一条链切断;另一类切刻酶与限制性内切酶类似,识别双链 DNA 中特定的短序列,切刻位点相对灵活,这种内切酶多数与异源二聚体限制性内切酶的亚基同源<sup>[3-4]</sup>。

虽然现在已经发现具有专一性的Ⅱ型限制性内切酶(REases)有 240 多种,但是具有商业用途的位点专一性 NEases 只有少数几种,且多是现有 REases 的基因工程衍生物<sup>[5]</sup>。因此,通过基因工程改造现有的 REases 或从细菌、病毒中筛选新酶,努力开发更多的 NEases 非常必要。NEases 不仅可用于基因工程实验,同时也可用于该类核酸酶的功能和进化研究。目前发现的切刻酶均是位点专一性核酸酶,所以探寻更多的具有随机切刻活性的 NEases,对基因工程和该类酶的进化研究具有重要意义。

PNE45 是大肠杆菌 O157:H7 噬菌体 phiV10 第 45 个基因编码的一个酶,属功能未知的 DUF1046 蛋白家族的一员,而且具有典型的 PD-(D/E)XK 特征基序<sup>[6]</sup>,笔者推测其可能是一个核酸内切酶。PD-(D/E)XK 蛋白超家族包括限制性内切酶和许多参与基因重组和修复的核酸酶<sup>[7]</sup>。所有 PD-(E/D)XK 蛋白超家族成员具有相同的核心结构,即由 2 段  $\alpha$ -helices 将 4 股  $\beta$ -sheets 相夹组成的结构,它可以作为弱保守活性中心的支架结构,通常包括 2 个或 3 个酸性氨基酸残基(Asp 或 Glu)和 1 个 Lys 残基,它们共同构成了标志性的催化基序<sup>[8-10]</sup>。

本研究拟表达纯化大肠杆菌噬菌体 phiV10 中

推测的核酸酶 PNE45,并对其催化特性进行鉴定,以阐明 DUF1046 蛋白家族功能,为 PD-(D/E)XK 蛋白超家族的结构和功能进化研究奠定基础,同时为基因工程研究提供更多的具有新的特殊活性的核酸酶。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌克隆菌株 Turbo、表达菌株 ER2566、质粒 pET21a-MBP 和 pUC19,均由西北农林科技大学生命科学学院保存;质粒 DNA 小量提取试剂盒和凝胶回收试剂盒,购自 Axygen 公司;快速连接酶 Quick Ligase、聚合酶 Vent (exo-) DNA Polymerase、 $5\times$  Taq polymerase Mixs,购自 NEB 公司;限制性内切酶 HindⅢ、EcoRⅠ,购自 MBI 公司;直链淀粉(Amylose)亲和层析试剂盒,购自 NEB 公司;蛋白质定量试剂,购自 Bio-Rad 公司;其他试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 PNE45 基因的扩增与重组质粒 pM-PNE45 的构建 以 GenBank 中 PNE45 基因序列(GenBank 号:3953001)为依据,设计 p1~p10 共 10 条寡核苷酸片段(表 1,由华大基因公司合成),首尾 2 个片段 p1、p10 分别含 EcoRⅠ和 HindⅢ酶切位点,片段之间两两部分互补。每个片段在原基因中的位置如图 1 所示。所有的寡核苷酸序列均经过密码子优化和退火温度平均化处理,其退火温度均在 60℃左右。各片段的核苷酸序列见表 1。

表 1 用于 PNE45 基因合成的寡核苷酸序列

Table 1 Oligonucleotides sequences for PNE45 gene synthesis

| 序列编号<br>Sequence No. | 序列(5'→3')<br>Sequence                                      |
|----------------------|------------------------------------------------------------|
| p1                   | CAGTGAATTCATGCGCAAACAGATCCAGGCCCTGGGTCG                    |
| p2                   | TGCAGATTCGGTTTTATTTCATCTGACCAAGTTTTCAGACGACCCAGGGCCT       |
| p3                   | TGAATAAAACGGAATCTGCATACTGCCAGCACCTGGAACAGCGCAAACGTGCCGGTG  |
| p4                   | CGCAGTTTGATGCCTTCGAAACGGTACCACGCGACTTCACCGGCACGTTTG        |
| p5                   | AAGGCATCAAACCTGCGCCTGGCTGACAACACCTTCTACACGCCAGACTTTGCC     |
| p6                   | CTTCGTGCAGTTCCATTTACCCGTCGCCAGCATCACGGCAAAGTCTGGCGT        |
| p7                   | AAATGGAACCTGCACGAAGTAAAGGTTTCTGGACTGATGATGCCCGTGCAAAAC     |
| p8                   | GATAATACGGAACGGGTACTGGTCGGCGGCGACTTTAGTTTGTACACGGGCAT      |
| p9                   | CAGTACCCGTTCCGTATTATCGGCGTGACCGTTAAACCGAAGAAAGCTGGTGGCGGCT |
| p10                  | CGCCAAGCTTAAACCTCTTCAATGTTCCAGCCGCCACCAGC                  |

注:p1、p10 中下划线碱基分别为 EcoRⅠ和 HindⅢ酶切位点。  
Note:The underlined bases in p1,p10 represent EcoRⅠ and HindⅢ cutting site respectively.

利用重叠 PCR 技术,通过 2 轮 PCR,扩增获得 PNE45 基因片段。第 1 轮 PCR 体系为 50  $\mu$ L:p2~p9(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L,p1 和 p10(10  $\mu$ mol/L)各 10  $\mu$ L,5  $\times$  反应 Buffer 10  $\mu$ L,dNTP (10 mmol/L)2  $\mu$ L,聚合酶 Vent (2 000 U/mL)1  $\mu$ L,补加双蒸水至 50  $\mu$ L。反应程序为:94℃预变性 3

min;94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,30 个循环;72 ℃延伸 5 min。第 2 轮 PCR 体系为 50 μL:p1 和 p10(10 μmol/L)各 1 μL,第 1 轮 PCR 产物 10 μL,5 × 反应 Buffer 10 μL,dNTP (10 mmol/L) 2 μL,聚合酶 Vent (2 000 U/mL)1 μL,补加双蒸水至 50 μL。反应程序同第 1 轮 PCR。取

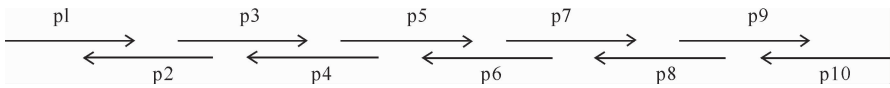


图 1 PNE45 基因的拼接示意图

1.2.2 重组蛋白 MBP-PNE45 的表达与纯化 将重组质粒 pM-PNE45 转化表达菌 ER2566 感受态细胞,氨苄青霉素(100 μg/mL)抗性筛选阳性克隆。挑取阳性克隆,接入含氨苄青霉素(100 μg/mL)的 LB 培养基,37 ℃条件下摇菌过夜,按 1:100 体积比转接到 200 mL LB 培养基中,摇菌到 OD<sub>600</sub> 约为 0.5,加入 IPTG 至其终浓度为 0.5 mmol/L,28 ℃诱导 8 h。取诱导培养物,12 000 r/min 离心 5 min,收集菌体,加入 20 mL 平衡缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl,50 mmol/L NaCl,pH 7.2)重新悬浮菌体,超声破碎(功率 400 W,超声 2 s,停 2 s,冰浴)直至菌体完全破碎,4 ℃下 12 000 r/min 离心 20 min 回收上清液,利用 Amylose 亲和层析纯化目标蛋白,12% SDS-PAGE 电泳检测纯化效果。用 Quantity One 凝胶定量软件扫描电泳结果,分析目标蛋白占总蛋白的百分比。纯化的蛋白用 Bio-Rad 蛋白质定量试剂检测浓度,然后加入甘油至其体积分数达 50%,−20 ℃条件下保存。

1.2.3 PNE45 的酶活性鉴定 酶活性检测原理是基于切刻核酸内切酶可以在超螺旋的质粒上随机或者专一性地将其中一条链切断,从而使超螺旋解旋,变为环状,但是当切口靠得太近时会将 DNA 切为线性,琼脂糖凝胶电泳检测时会出现 3 条带,从前到后依次为超螺旋条带、线性条带、切刻环状质粒条带。如果内切酶具有切刻位点对位切刻活性,则会将质粒进一步降解为更小的片段。许多试验表明,内切酶都依赖金属离子 Mg<sup>2+</sup>,Mn<sup>2+</sup> 也可能作为辅基存在<sup>[11]</sup>,故本试验分别在 Mg<sup>2+</sup> 或 Mn<sup>2+</sup> 的参与下进行酶切反应,以比较 PNE45 在 2 种条件下切刻活性的差异。取 1 μg pUC19 质粒作为底物,分别与不同质量浓度(2.5,1.25,0.625,0.313,0.156,0.078,0.039,0.020,0.010 μg/mL)的 PNE45 酶在 Mg<sup>2+</sup> 参与下进行酶切反应,反应体系为 20 μL:20 mmol/L Tris-HCl pH 7.6,50 mmol/L NaCl,2

第 2 轮 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,回收目的基因片段,经 Hind III 和 EcoR I 双酶切后,利用 Quick Ligase 连接到 pET21a-MBP 载体,构建重组质粒 pET21a-MBP-PNE45 (pM-PNE45),对其进行 PCR 扩增与 Hind III 和 EcoR I 双酶切电泳检测,并送华大基因公司进行测序鉴定。

mmol/L DTT,5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,体积分数 0.125% Triton-X 100;反应条件为 37 ℃温浴 1 h,试验同时设立不做酶处理的对照。取酶切产物,用 10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳(100 V,45 min),检测 PNE45 的随机切刻活性和切刻位点对位切刻活性。Mn<sup>2+</sup> 参与下的酶切反应体系与条件同上,只是将体系中 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 换为 5 mmol/L MnCl<sub>2</sub>,酶质量浓度分别为 1.25,0.625,0.313,0.156 和 0.078 μg/mL。

2 结果与分析

2.1 PNE45 基因的扩增与重组质粒 pM-PNE45 的鉴定

从图 2 可以看出,第 1 轮 PCR 产物电泳检测不到特异的条带,第 2 轮 PCR 产物检测到了 345 bp 左右的 DNA 片段,与目的基因长度一致。重组质粒 pM-PNE45 的双酶切鉴定结果(图 3)显示,酶切获得了 345 bp 的条带,与预期结果一致。酶切鉴定后的质粒送华大基因公司进行测序鉴定,结果与设计序列一致。

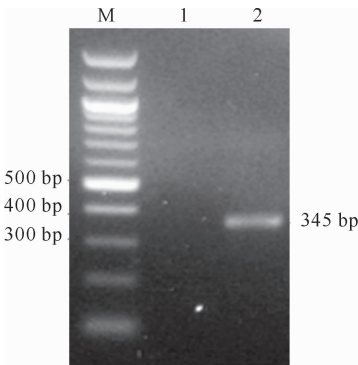


图 2 PNE45 基因的 PCR 扩增

M. 2-log DNA Marker;1. 第 1 轮 PCR 产物;2. 第 2 轮 PCR 产物

Fig. 2 PCR amplification of the gene PNE45

M. 2-log DNA Marker;1. Products of the first round PCR;  
2. Products of the second round PCR

2.2 PNE45 蛋白的表达与纯化

SDS-PAGE 电泳检测结果(图 4)表明,表达纯化后获得了 56 ku 融合蛋白 MBP-PNE45,其分子质量大小与设计结果一致,表明该蛋白在细胞中主要以可溶性形式表达。Quantity One 凝胶定量软件分

析结果显示,融合蛋白占总蛋白的 35%左右。对纯化的目标蛋白使用 Bio-Rad 蛋白质定量试剂检测其质量浓度,结果显示,蛋白质质量浓度约为 0.568 mg/mL,总共纯化到约 0.8 mg 的目标蛋白。

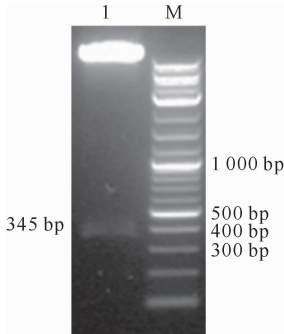


图 3 重组质粒 pM-PNE45 的双酶切鉴定  
M, 2-log DNA ladder;1. *EcoR* I 和 *Hind* III  
双酶切的重组质粒 pM-PNE45

Fig. 3 Double digestion identification of recombinant plasmid pM-PEN45  
M. Marker 2-log DNA ladder;  
1. pM-PEN45 digested by *EcoR* I and *Hind* III

2.3 PNE45 的酶活鉴定

由图 5 可知,在含  $Mg^{2+}$  的缓冲溶液中,PNE45 可切刻超螺旋的 pUC19 质粒解旋变为切刻环状,并且随着 PNE45 质量浓度的增加开始出现了少量线性质粒,表明 PNE45 蛋白具有切刻核酸内切酶活

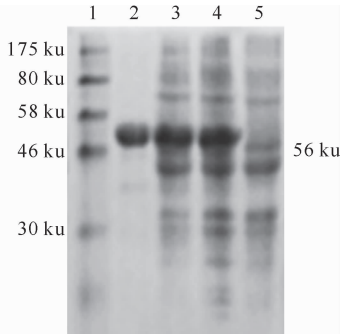


图 4 纯化重组蛋白 MBP-PNE45 的 SDS-PAGE 电泳检测  
1. 蛋白 Marker;2. 纯化后的蛋白;3. 上清液;  
4. 总蛋白;5. 未诱导对照

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant protein expression  
1. Protein Marker;2. Purified protein;3. Supernatant;  
4. Total protein;5. Control

性。由图 6 可知,在含  $Mn^{2+}$  的缓冲溶液中,PNE45 还可以将质粒进一步降解为小片段,表现出对位切刻的活性。本研究同时检测了 PNE45 对 Holliday junction 和单碱基错配底物的切割活性,结果表明,PNE45 不能识别切割上述 2 种底物。

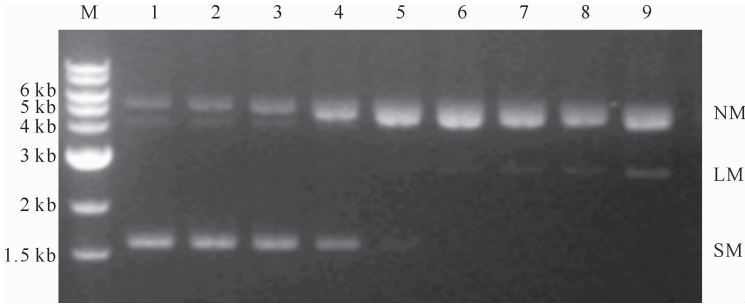


图 5 PNE45 在  $Mg^{2+}$  缓冲液中的酶活检测  
M. DNA Marker;1~9. 分别为 2.5,1.25,0.625,0.313,0.156,0.078,0.039,0.020,0.010  $\mu\text{g/mL}$  PNE45 切刻结果;  
NM,LM,SM. 分别为切刻环状、线性、超螺旋质粒条带

Fig. 5 Enzyme activity checking in  $Mg^{2+}$  buffer

M. DNA Marker;1-9. The enzyme concentration is 2.5,1.25,0.625,0.313,0.156,0.078,0.039,0.020,0.010  $\mu\text{g/mL}$  respectively;  
NM,LM,SM. Indicates nicked,linear and supercoiled plasmids band respectively

3 讨论

本试验成功地克隆并表达纯化了大肠杆菌噬菌体 phiv10 基因 45 编码的蛋白 PNE45,催化特性分析结果显示,其是一种新的随机切刻 NEases。在  $Mg^{2+}$  存在条件下,该酶具有 DNA 随机切刻活性,

而在  $Mn^{2+}$  存在条件下,其又具有切刻位点对位切刻活性。与此前发现的 2 类切刻核酸酶不同的是:PNE45 对 DNA 的切刻具有随机性,而此前发现的 2 类切刻核酸酶对 DNA 的切刻具有序列特异性<sup>[2]</sup>;PNE45 与已发现的 2 类切刻核酸酶序列相似度很低,分别属于不同的蛋白家族。PNE45 属于一个功

能未知的 DUF1064 蛋白家族,该家族成员具有 PD-(D/E)XK 特征基序,该基序也出现在许多限制性内切酶和重组修复酶中。PNE45 是 DUF1046 蛋白家族中第 1 个被证实的核酸酶,该核酸酶的进一步研究对 DUF1046 蛋白家族和 PD-(D/E)XK 超家族的功能和进化研究具有重要的意义。

切刻内切酶的应用还处于初级阶段,但已有一些成功的实例,如 Nt. BbvCI 已被应用于 NEB US-ER \* 克隆试剂盒,用于引入长的非互补性黏性末

端<sup>[12]</sup>。NEases 还被用于恒温 DNA 扩增技术,用于引入位点特异性切刻,并利用该切刻位点在 DNA 聚合酶的催化下实现靶序列的扩增<sup>[13]</sup>,如 Nt. Bst-NBI 和 Vent (exo-)DNA Polymerase 合用的恒温扩增技术<sup>[14]</sup>,与 Nt. CviP II 和 Bst DNA Polymerase I 合用的恒温扩增技术<sup>[15]</sup>。本研究开发的 PNE45 是一种具有潜力的工具酶,其切刻核酸酶活性在新的基因组测序技术和人工重组(DNA shuffling)技术的 DNA 前处理中具有潜在的应用价值<sup>[16]</sup>。

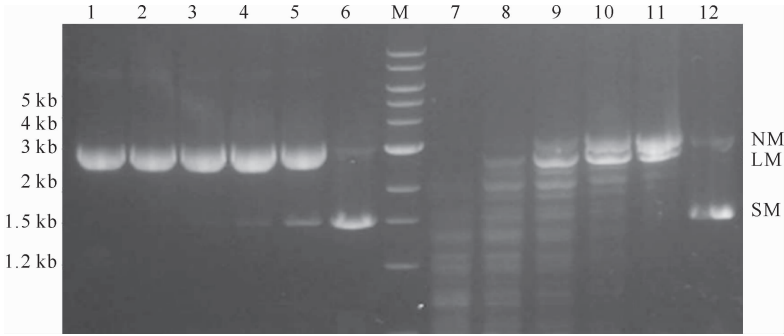


图 6 PNE45 在  $Mg^{2+}$  和  $Mn^{2+}$  缓冲液中的酶活性比较

M. DNA Marker;1~5. 为  $Mg^{2+}$  缓冲液中 PNE45 的酶活性;7~11. 为  $Mn^{2+}$  缓冲液中 PNE45 的酶活性;  
6,12. 为对照;1,7. 1.25  $\mu g/mL$  PNE45 切刻结果;2,8. 0.625  $\mu g/mL$  PNE45 切刻结果;3,9. 0.313  $\mu g/mL$  PNE45 切刻结果;  
4,10. 0.156  $\mu g/mL$  PNE45 切刻结果;5,11. 0.078  $\mu g/mL$  PNE45 切刻结果;NM,LM,SM. 分别为切刻环状、线性、超螺旋质粒条带

Fig. 6 The enzyme activity comparison of PNE45 in  $Mg^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  buffer

M. DNA Marker;1—5. The activity of PNE45 in  $Mg^{2+}$  buffer;7—11. The activity of PNE45 in  $Mn^{2+}$  buffer;6,12. Control;  
1,7. 1.25  $\mu g/mL$  PNE45;2,8. 0.625  $\mu g/mL$  PNE45;3,9. 0.313  $\mu g/mL$  PNE45;4,10. 0.156  $\mu g/mL$  PNE45;  
5,11. 0.078  $\mu g/mL$  PNE45;NM,LM,SM. Indicates nicked,linear and supercoiled plasmid band respectively

[参考文献]

[1] Roberts R J,Belfort M,Bestor T,et al. A nomenclature for restriction enzymes.DNA methyltransferases,homing endonucleases and their genes [J]. Nucleic Acids Res,2003,31:1805-1812.

[2] Zheleznyaya L A,Kachalova G S,Artyukh R I,et al. Nicking endonucleases [J]. Biochemistry (Moscow),2009,74(13):1457-1466.

[3] Yunusova A K,Rogulin E A,Artyukh R I,et al. Nickase and a protein encoded by an open reading frame downstream from the nickase BspD6I gene form a restriction endonuclease complex [J]. Biochemistry (Moscow),2006,71(7):815-820.

[4] Stankevicius K,Lubys A,Timinskas A,et al. Cloning and analysis of the four genes coding for Bpu10I restriction-modification enzymes [J]. Nucleic Acids Res,1998,26(4):1084-1091.

[5] Higgins L S,Besnier C,Kong H M. The nicking endonuclease N. BstNBI is closely related to Type IIs restriction endonucleases MlyI and PleI [J]. Nucleic Acids Res,2001,29(12):2492-2501.

[6] Perry L L,Miguel P S,Minocha U,et al. Sequence analysis of *Escherichia coli* O157:H7 bacteriophage phiV10 and identifica-

tion of a phage-encoded immunity protein that modifies the O157 antigen [J]. Fems Microbiology Letters,2009,292(2):182-186.

[7] Kosinski J,Feder M,Bujnicki J M. The PD-(D/E)XK superfamily revisited: identification of new members among proteins involved in DNA metabolism and functional predictions for domains of (hitherto) unknown function [J]. BMC Bioinformatics,2005,6:172.

[8] Aggarwal A K. Structure and function of restriction endonucleases [J]. Curr Opin Struct Biol,1995,5:11-19.

[9] Bujnicki J M. Molecular phylogenetics of restriction endonucleases [J]. Restriction Endonucleases,2004,14:63-87.

[10] Venclovas C,Timinskas A,Siksnys V. Five-stranded beta-sheet sandwiched with two alpha-helices;a structural link between restriction endonucleases *EcoR* I and *EcoR* V [J]. Proteins,1994,20:279-282.

[11] Guan C,Sanjay K. A single catalytic domain of the junction-resolving enzyme T7 endonuclease I is a non-specific nicking endonuclease [J]. Nucleic Acids Research,2005,33(19):6225-6234.

[12] Yang J,Zhang Z H,Zhang X A,et al. A ligation-independent cloning method using nicking DNA endonuclease [J]. Bio-Techniques,2010,49(5):817-821. (下转第 206 页)