

网络出版时间:2016-08-09 09:41

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2016.09.028

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20160809.0941.056.html>

热脱硫弧菌解旋酶基因 *TyPif1* 的原核表达、 纯化及功能分析

王帅锋,刘娜女,段晓磊,罗亦欣,范三红,奚绪光

(西北农林科技大学 生命科学学院,陕西 杨凌 712100)

【摘要】【目的】通过原核表达系统获得热脱硫弧菌(*Thermodesulfovibrio yellowstonii* H.) Pif1 解旋酶(TyPif1),研究 TyPif1 解旋酶的嗜热特性和解旋机理。【方法】将 *TyPif1* 解旋酶编码区和 SUMO 促溶标签编码区融合连入 pET15b 获得重组表达载体 pET15b-SUMO-TyPif1,将该重组载体导入大肠杆菌 BL21(DE3)菌株诱导表达,经 Ni-NTA 柱亲和和纯化获得融合蛋白,SUMO 蛋白酶切除标签,再经 Ni-NTA 柱去除标签蛋白及 SUMO 蛋白酶,经 Heparin 柱进一步纯化最终获得 TyPif1 全长蛋白。通过荧光各向异性、圆二色谱(CD)和荧光共振能量转移(FRET)分析 TyPif1 解旋酶的 DNA 结合活性、解旋活性以及二级结构的热稳定性。【结果】获得了纯度大于 95% 的 TyPif1 蛋白,1 L 培养基可以获得约 10 mg 纯度大于 95% 的蛋白;TyPif1 解旋酶结合单链 DNA 和 G4 DNA 的活性明显高于双链 DNA;TyPif1 具有较高的解旋 G4 DNA 的活性,在 25~60 °C 下其二级结构相对稳定,且解旋速率随温度升高而增大,25~50 °C TyPif1 的解旋速率由 0.09 s⁻¹ 增大到 0.23 s⁻¹。【结论】表达纯化了热脱硫弧菌 TyPif1 解旋酶,其不仅具有良好的热稳定性,同时具有特异的结合和解旋 G4 DNA 的能力。

【关键词】 热脱硫弧菌;Pif1 解旋酶;蛋白表达纯化;DNA 结合活性;DNA 解旋活性

【中图分类号】 Q781;Q814.1

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2016)09-0207-07

Prokaryotic expression, purification and functional analysis of *Thermodesulfovibrio yellowstonii* H. *TyPif1*

WANG Shuaifeng, LIU Nanü, DUAN Xiaolei,

LUO Yixin, FAN Sanhong, XI Xuguang

(College of Life Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 This research used prokaryotic expression system to obtain Pif1 helicase from *Thermodesulfovibrio yellowstonii* H. (TyPif1), and studied the mechanism of thermophilic characteristic and unwinding mechanism of TyPif1 helicase. 【Method】 The *Pif1* gene of *Thermodesulfovibrio yellowstonii* H. (TyPif1) and a SUMO protein folding tag gene were synthesized to pET15b to construct recombinant plasmid pET15b-SUMO-TyPif1. Then, the plasmid was transformed into *Escherichia coli* host strain BL21 (DE3), and the TyPif1 helicase was purified by two-step Ni-NTA affinity chromatography and one-step Heparin chromatography at 4 °C using FPLC. Fluorescence anisotropy, fluorescence resonance energy transfer (FRET) and circular dichroism spectrum (CD) were used to analyze the DNA binding and unwinding activity of TyPif1 as well as the stability of its secondary structure. 【Result】 The full-length TyPif1

【收稿日期】 2015-03-06

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31370798, 11304252)

【作者简介】 王帅锋(1989—),男,河南平顶山人,在读硕士,主要从事生物大分子结构与功能研究。E-mail: phoonwang@163.com

【通信作者】 奚绪光(1958—),男,吉林公主岭人,教授,博士,博士生导师,主要从事生物大分子结构及功能研究。

E-mail: xxi01@ens-cachan. fr

helicase with high purity of $>95\%$ was obtained. Its binding activity with ssDNA and G-quadruplex (G4) DNA was much higher than that of dsDNA. TyPif1 has high activity to unwind G4 DNA. The secondary structure was relatively stable under $25-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, and the unwinding rate increased from 0.09 s^{-1} to 0.23 s^{-1} with the increase of temperature from 25 to $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. 【Conclusion】 TyPif1 helicase was expressed and purified. TyPif1 helicase not only had good thermal stability, but also had specific ability of binding and unwinding G4 DNA.

Key words: *Thermodesulfovibrio yellowstonii* H.; Pif1 helicase; protein expression and purification; DNA binding activity; DNA unwinding activity

解旋酶是一类利用水解 NTP 释放的能量沿着 DNA 磷酸骨架移动的分子“马达”,参与核酸复制、转录、重组与修复等过程,在生物体内扮演着重要的角色^[1-2]。其相关基因突变会导致遗传病的发生,如 Werner 综合症、Bloom 综合症等^[3-4]。Pif1 解旋酶是高度保守的 $5'\rightarrow 3'$ 方向解旋酶,属于解旋酶超家族 I 的一个亚家族,广泛存在于病毒、原核和真核生物中^[5-6]。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* H.) *Pif1* 是第一个被发现的 *Pif1* 基因(*ScPif1*),其编码蛋白 ScPif1 参与线粒体 DNA 的复制、重组^[7-9];随后的研究表明,ScPif1 也参与了端粒长度调控及核内 DNA 的断裂修复^[10-12],说明 ScPif1 同时参与了线粒体和核基因组稳定性的维持。酿酒酵母中还存在另一种 Pif1-like 蛋白 Rrm3,其作为复制体的一部分,可以与聚合酶 ϵ 的催化亚基 Pol2 作用并在复制过程中随着复制叉移动^[13];同时,酵母双杂交试验表明,Rrm3 N 端保守的 motif(模体)可以与 PCNA(增殖细胞核抗原)相互作用^[14-15]。裂殖酵母(*Schizosaccharo mycespombe* H.)中只存在一个 Pif1 家族解旋酶基因 *Pfh1*^[5],该基因编码两种形式的 Pfh1 蛋白,一种定位于线粒体,一种定位于细胞核,缺失线粒体定位 Pfh1 会引起线粒体 DNA 丢失,并最终导致细胞死亡;缺失核定位异构体会导致细胞停滞在 G2 期,并引起核 DNA 损伤位点的累积^[16-17]。哺乳动物中人类和小鼠基因组都只编码单一的 Pif1-like 蛋白,序列比对发现人类和小鼠 Pif1 蛋白相似度高达 84% ,人类 Pif1(hPif1)同其他 Pif1-like 蛋白相似,其作用靶点在细胞核和线粒体^[18-19];而小鼠 Pif1 可以与端粒酶相互作用,但对端粒长度没有明显影响^[5]。

生化研究表明,Pif1 解旋酶具有依赖 ATP 和 Mg^{2+} 的 $5'\rightarrow 3'$ 方向的解旋活性,ScPif1 和 hPif1 均可以解旋 DNA/DNA、DNA/RNA 和 G4 DNA 底物,且 ScPif1 解旋 DNA/RNA 杂合底物的速度要快于 DNA/DNA 底物^[12,20-21];近期研究发现,ScPif1

更偏好解开 G4 DNA 结构,其解旋 G4 DNA 的速度高于双链 DNA,且 G4 DNA 的存在能够激活对双链 DNA 的解旋活力^[22]。进化分析发现,原核生物中同样存在 Pif1 家族解旋酶,它们也具有双链 DNA 和 G4 DNA 解旋活力^[23]。

获取酶蛋白甚至蛋白/底物共结晶对于阐明特定酶的催化机理具有关键性作用,而嗜热菌蛋白具有易表达纯化、结构稳定、易结晶等优点,通常被用于大分子结构解析,如已报道的 DnaB、RecG 和 XPD 等嗜热菌蛋白^[24-26]。本研究以一种热脱硫弧菌(*Thermodesulfovibrio yellowstonii* H.)(最适生长温度为 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$)*Pif1* 基因 *TyPif1*^[27] 为材料,利用蛋白原核表达系统获得高纯度 TyPif1 蛋白,并对其热稳定性、DNA 结合活性和解螺旋活性进行分析,以期拓展原核生物 Pif1 家族解旋酶活性研究,并为 Pif1 家族解旋酶结构解析提供素材。

1 材料与方法

1.1 材料

表达载体 pET15b、克隆菌株 *E. coli* 2984、表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)均为本实验室保存;限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、*Xho* I 购自 NEB 公司;T4 DNA 连接酶、Prime STAR HS DNA polymerase 购自大连宝生物公司;PageRuler 预染蛋白 Ladder 购自 Thermo Scientific 公司;Ni-NTA Beads 购自 QIAGEN 公司;HiTrap Heparin HP 5 mL 预装柱购自 GE 公司;其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 底物制备 用于底物制备的荧光标记和非标记单链 DNA 由上海生工生物公司合成;制备双链和带有 G4 结构的 DNA 底物时,将对应寡核苷酸溶于包含 100 mmol/L KCl 的 Tris-HCl (50 mmol/L , pH 8.0)缓冲液中, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min ,然后缓慢冷却至室温。DNA 底物的序列长度见表 1,其中前 5 种底物用于 DNA 结合活性测定,第 6~8 种

底物用于 DNA 解旋活性测定。

表 1 试验所用的 DNA 底物信息
Table 1 DNA oligonucleotides used in the study

编号 No.	底物名称 Substrate name	序列(5'→3') Sequence(5'→3')
1	16nt ssDNA	ctctgctcgacggatt-F
2	18nt ssDNA	gcctcgctgccgtcgcca-F
3	24nt ssDNA	gccctggtgccgacaacgaaggt-F
4	G4 DNA	F-tgggttagggtagggtaggg
5	24bp dsDNA	gccctggtgccgaccaacgaaggt-F accttcgttggtcggcaccagggc
6	14nt-38bp	tttttttttttttactcgatcaccatggcggactctctgctctgctc-F HF-gagcacgagagcagagagtcgccatgggtgatccgagt
7	50nt-16bp	tttaatccgtcgagcagag-F HF-ctctgctcgacggatt
8	26nt-3G4-17bp	aagcagtggtatcaacgcagagaaaagggtagggtagggtagggatgtatgtcaaggaagg-F HF-cttctctgcacatacat

注:F 代表荧光素;H 代表六氯荧光素。
Note:F represents fluorescein;HF represents hexachloro fluorescein.

1.2.2 表达载体的构建 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切 pBMH-TyPif1 质粒(该质粒中包含 TyPif1 解旋酶编码序列,由 BioMatik 公司合成),获得 TyPif1 基因编码区序列;对编码序列进行 PCR 扩增获得 SUMO 编码序列(本实验室保存),并用 *Nde* I 和 *EcoR* I 双酶切,将获得的 2 个基因片段与同样经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切的 pET15b 载体混合连接;经菌落 PCR、双酶切检测及测序确证后,最终获得重组表达载体 pET15b-SUMO-TyPif1。

1.2.3 重组 TyPif1 解旋酶在大肠杆菌中的过量表达和纯化 将重组载体 pET15b-SUMO-TyPif1 转化入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中,挑取单克隆活化,37 ℃扩大培养至 OD_{600} 为 0.6~0.8 时加入 IPTG(终浓度 0.2 mmol/L),28 ℃诱导培养 6~8 h。离心收获菌体并称质量,按照 1:5~1:10 的质量体积比加入 lysis Buffer(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,300 mmol/L NaCl,体积分数 10% 甘油,10 mmol/L 咪唑),高压破碎细胞,并进一步超声断裂 DNA,以降低溶液黏度,12 000 r/min 离心 20 min 后用 0.45 μm 滤膜过滤,所得上清载入 Ni-NTA 亲和柱,使用 Elute Buffer(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,300 mmol/L NaCl,体积分数 10% 甘油,300 mmol/L 咪唑)洗脱。按照 1:1 000 物质的量比加入 SUMO 蛋白酶,4 ℃过夜酶切,透析除去咪唑后再次载入 Ni-NTA 亲和柱,收集穿出液;用无盐缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,体积分数 10% 甘油)稀释 1 倍,然后载入 Heparin 柱进一步纯化。收集目标蛋白组分,使用 30 ku 的 Millipore 超滤管离心浓缩,分装后液氮冷冻,-80 ℃保存备用。分

离过程中使用 10%SDS-PAGE 电泳检测各步骤获得样品的纯度。

1.2.4 TyPif1 解旋酶的 DNA 结合活性测定 用 Infinite F200/M200 型多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司)测定 TyPif1 解旋酶的 DNA 结合活性,反应体系 150 μL,其中包含 5 nmol/L 荧光标记 DNA 和 TyPif1 解旋酶,37 ℃孵育 5 min 后测定每一个反应体系的各向异性值。由于盐浓度和 pH 对解旋酶与 DNA 结合活性的影响很大,因此首先以 18nt ssDNA 为参考测定 TyPif1 结合 DNA 的最适缓冲液组分(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.5,50 mmol/L NaCl,2 mmol/L MgCl₂,2 mmol/L DTT)。在此条件下分别测定 5 种底物(表 1 中 1~5 底物)的各向异性值,用米氏方程拟合试验结果,Binding size(结合步长)参考 Dou 等^[28]的方法计算。

1.2.5 TyPif1 解旋酶的热稳定性分析 使用 Bio-Logic MOS450/AF-CD 光学系统(法国 Bio-Logic 公司),检测 TyPif1 在波长 190~260 nm 下的圆二色光谱(CD)值,以在 25 ℃生活的拟杆菌(*Bacteroides* spp.)Pif1 解旋酶(BsPif1)(本实验室制备,分子量 50 ku)为对照。测定时将 Pif1 蛋白稀释至 0.5 mg/mL,注入厚度为 1 mm 的石英杯中,在不同温度(25,30,37,45,50,55,60 ℃)下分别进行样品的 CD 测试,每个温度处理预平衡 3 min,检测步长 1 nm,分辨率 0.1 nm,扫描速度 100 nm/min,每试验重复 3 次。使用公式: $\theta_{\text{molar},\lambda}=\theta_{\lambda}\times 100/m\times d$ 处理数据,其中, θ_{λ} 为不同波长下的 CD 吸收峰(mdeg), m 为样品的物质的量(mol), d 为石英杯的厚度(cm)^[29]。

1.2.6 TyPif1 解旋酶的 DNA 解旋活性测定 使用 Bio-Logic SFM-400 混合仪(法国 Bio-Logic 公司),利用荧光共振能量转移(FRET)原理测定 TyPif1 解开 DNA 螺旋的活性,以 BsPif1 为对照。DNA 底物的 2 条链分别用荧光素和六氯荧光素标记,激发波长 492 nm,检测波长 525 nm。反应体系缓冲液包含 25 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5)、10 mmol/L NaCl、5 mmol/L MgCl₂、1 mmol/L ATP,解旋酶浓度为 100 nmol/L,底物浓度为 4 nmol/L。用 14nt-38bp 底物研究温度对 Pif1 蛋白解旋活性的影响,温度设置为 25,30,37,45,50,55 ℃;50nt-16bp 和 26nt-3G4-17bp 底物用于 TyPif1 的解旋底物偏好性测定,解旋试验数据处理参考 Zhang 等^[30]的方法。

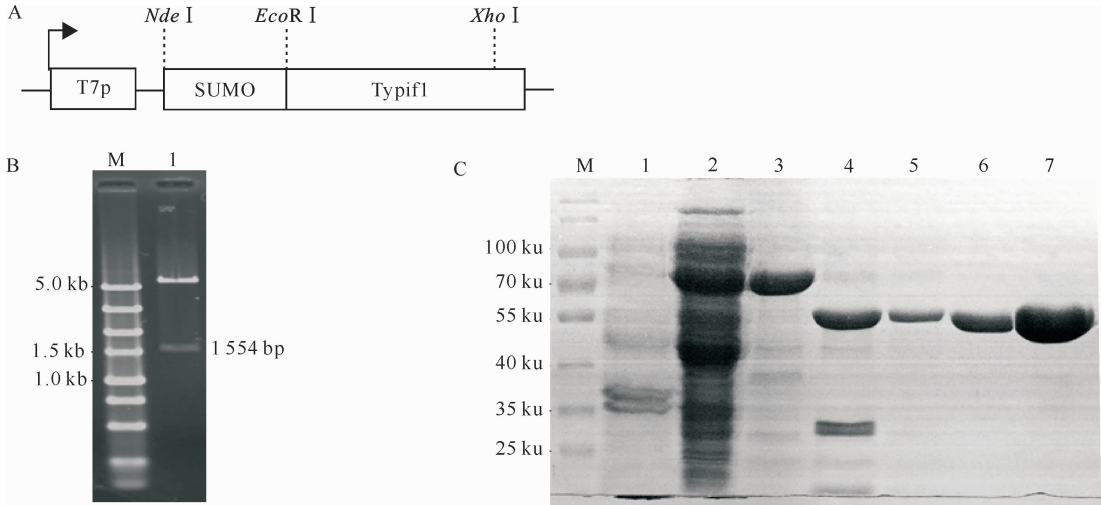


图 1 pET15b-SUMO-TyPif1 载体构建(A)、双酶切检测(B)及 TyPif1 蛋白的表达纯化(C)

(B)M. DS5000 DNA Marker,1. *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切的 pET15b-SUMO-TyPif1 载体;(C)M. 蛋白 Marker,1. 不溶蛋白,2. 可溶蛋白,3. Ni-NTA 磁珠纯化的重组蛋白,4. SUMO 酶切的重组蛋白,5. 再次被 Ni-NTA 磁珠纯化的 TyPif1 蛋白,6. 被 Heparin 柱纯化的 TyPif1 蛋白,7. 纯化后的 TyPif1 蛋白

Fig. 1 Construction and double digestion of recombination vector(A),expression (B) and purification (C)of TyPif1 helicase analyzed by SDS-PAGE

(B)M. DS5000 DNA Marker,1. pET15b-SUMO-TyPif1 digested with *EcoR* I and *Xho* I ;(C)M. Protein Marker,

1. Insoluble protein induced by IPTG,2. Soluble protein induced by IPTG,3. Recombinant protein purified by Ni-NTA beads,4. Recombinant protein cleaved by SUMO protease,5. TyPif1 re-purified by Ni-NTA beads,6. TyPif1 purified by Heparin column,7. TyPif1 after final concentration

2.2 TyPif1 解旋酶的 DNA 结合活性

酶标仪试验结果表明,TyPif1 解旋酶结合单链、双链以及 G4 螺旋 DNA 底物的活力具有差异性,依据米氏方程拟合,得到 TyPif1 结合 24nt ssDNA、G4 DNA、24bp dsDNA 的米氏常数 K_m 依次为 14.03 ± 1.69 , 13.97 ± 2.92 , 223.79 ± 54.61 ,由 K_m 值可知,解旋酶对不同底物的结合活性强弱依次为 G4 DNA > 24nt ssDNA >> 24bp dsDNA(图 2-A)。TyPif1 解旋酶结合 16、18、24 nt ssDNA 的各向异

2 结果与分析

2.1 TyPif1 基因表达载体构建及编码蛋白的表达纯化

构建表达载体 pET15b-SUMO-TyPif1 的流程见图 1-A,该载体经 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切检测获得预期条带(图 1-B)。将重组质粒导入大肠杆菌 BL21(DE3)表达菌,28 ℃诱导表达后重组蛋白大部分以可溶形式存在(图 1-C 泳道 2)。上清经过 Ni-NTA 亲和柱纯化、SUMO 蛋白酶切并再次过 Ni-NTA 亲和柱及 Heparin 柱,纯化后再用 10%SDS-PAGE 电泳检测(图 1-C)。最终在 1 L 发酵 LB 培养基中获得了约 10 mg 纯度大于 95%的蛋白。

性值经过数据处理后结果如图 2-B 所示。由图 2-B 可见,随着 DNA 长度的延长,结合相同总量的底物所需要的解旋酶增多,表明 DNA 底物越长需要结合解旋酶的分子数量越多。数据处理后得到 TyPif1 结合单链 DNA 的化学计量数(N)与单链长度的线性关系,当化学计量数 $N=1$ 时,表明在底物上只结合 1 个解旋酶分子,根据线性关系得出底物长度为 11.27 nt,即 Binding size=11.27 nt(图 2-C)。

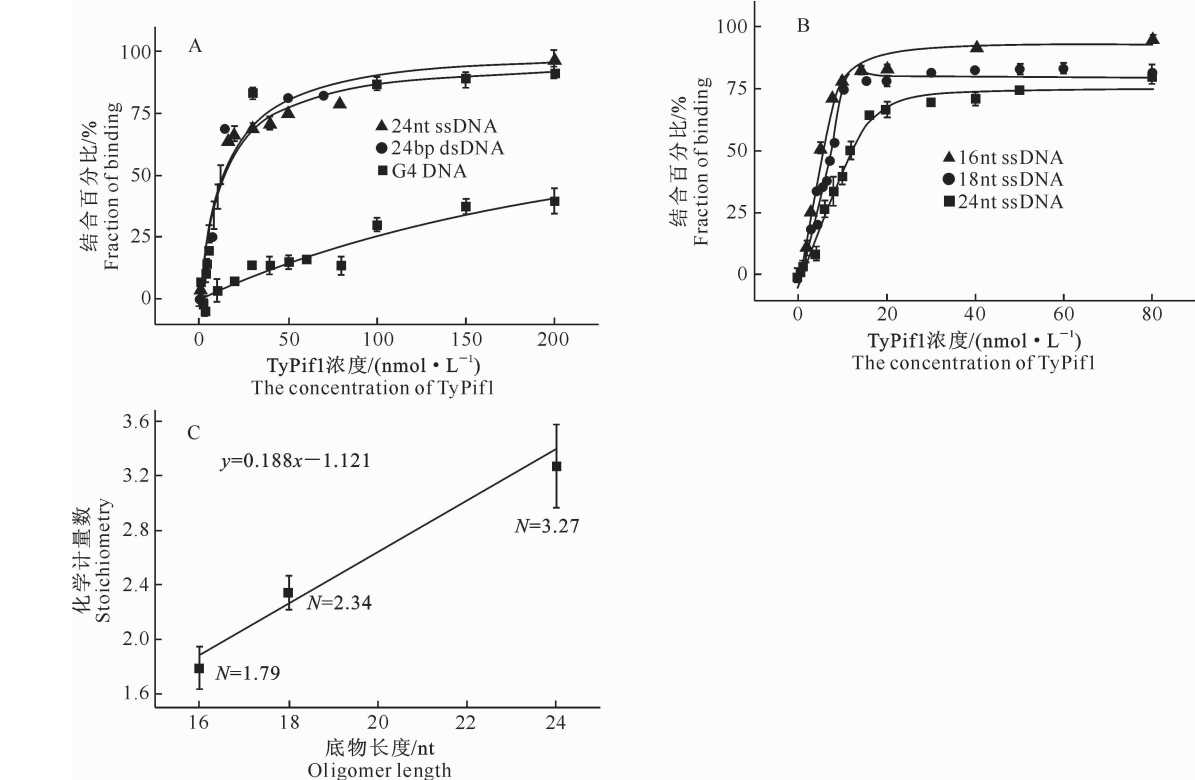


图 2 TyPif1 解旋酶的 DNA 结合活性

(A)TyPif1 解旋酶结合单链 DNA、双链 DNA 和 G4 DNA 的比较;(B)TyPif1 解旋酶结合不同单链 DNA 底物的比较;(C)单链 DNA 底物与化学计量数的线性关系

Fig. 2 DNA binding activity of TyPif1

(A)Comparison of binding to ssDNA,dsDNA and G4 DNA to TyPif1 helicase;(B)Comparison of TyPif1 helicase

binding to different length ssDNA helicase;(C) The linear relationship of ssDNA substrate and number of stoichiometry

2.3 TyPif1 解旋酶的热稳定性

由图 3-A 可知,TyPif1 在 216 nm 处有一个强负峰,且随着温度升高其负峰强度逐渐减小,表明其二级结构以 β 折叠为主,且随温度升高 β 折叠含量逐渐减少;但是 TyPif1 随温度改变呈现相似的 CD

曲线,说明其二级结构在 25~60 °C 变化不大。而 BsPif1 的 CD 图谱随着温度升高负峰强度减小且温度高于 45 °C 后出现峰迁移现象(图 3-B),由此可知 BsPif1 在温度高于 45 °C 后二级结构发生剧烈变化。

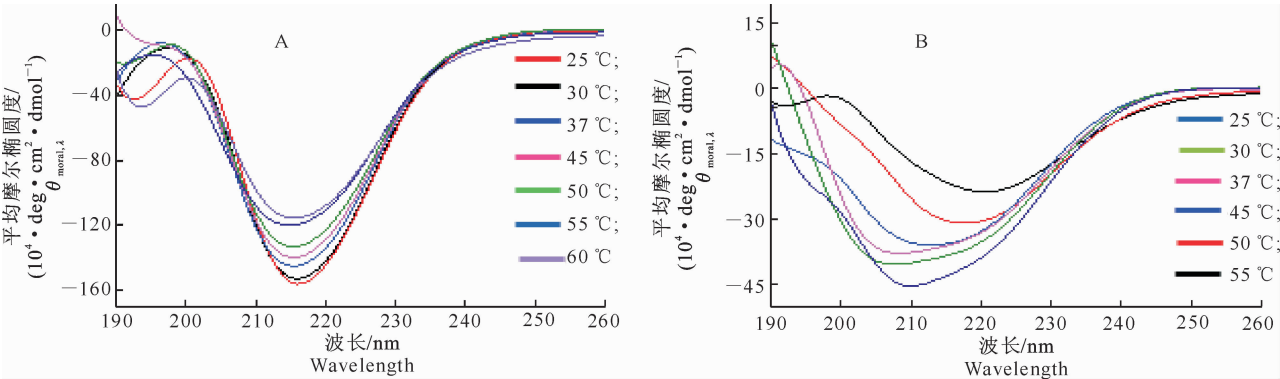


图 3 不同温度下 TyPif1(A)和 BsPif1(B)二级结构的 CD 图谱

Fig. 3 CD spectra of TyPif1(A) and BsPif1(B) at different temperatures

2.4 TyPif1 解旋酶的解旋活性

使用 FRET 方法检测 TyPif1 解旋的 DNA 底

物,结果如图 4 所示。由图 4-A 可知,嗜热菌 TyPif1 的解旋速率低于 BsPif1,然而温度升高时

TyPif1 解旋 DNA 双链的速率由 25 ℃ 时的 0.09 s⁻¹ 增加到 50 ℃ 时的 0.23 s⁻¹, 而 BsPif1 的解旋速率则随着温度升高而降低, 高于 45 ℃ 解旋活性完全丧失。这表明温度对 TyPif1 解旋酶具有激活作用, 温度升高有利于解旋反应的进行, 这与该嗜热细菌

生活环境中的生长和代谢规律相吻合。图 4-B 反映了 TyPif1 解旋 G4 DNA 和双链 DNA 的差异, 数据经双指数拟合得到 TyPif1 解开 G4 DNA 和双链 DNA 的速率分别为 0.546 和 0.301 s⁻¹, 表明 TyPif1 解旋 G4 DNA 的活力明显高于双链 DNA。

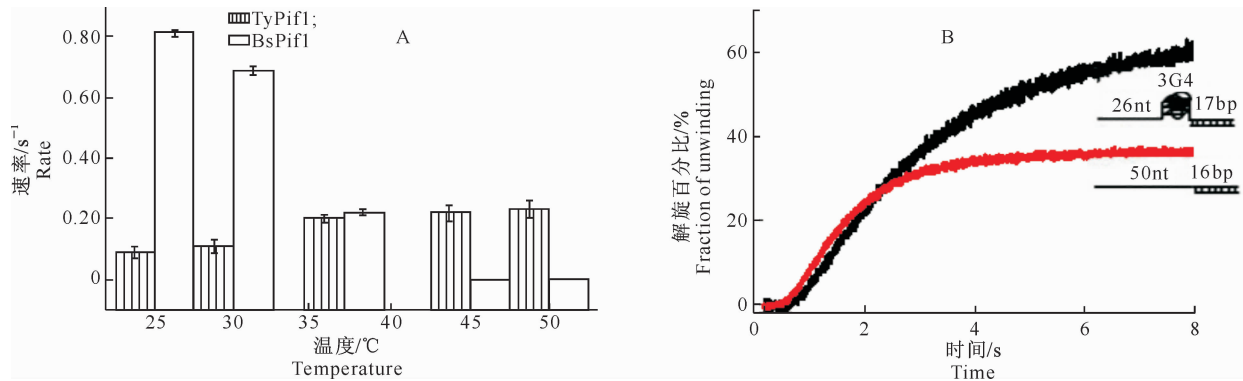


图 4 TyPif1 酶在不同温度(A)和 DNA 底物(B)下的解旋活性

Fig. 4 Unwinding activity of TyPif1 helicase at different temperatures (A) and with different substrates(B)

3 讨 论

本研究利用原核系统表达纯化了一种热脱硫弧菌 Pif1 解旋酶, 利用优化的纯化方法可从 1 L 菌液中得到约 10 mg 纯度大于 95% 的全长 TyPif1 蛋白。试验测定了 TyPif1 解旋酶与不同 DNA 底物的结合活性, 发现其结合 G4 DNA 和单链 DNA 的活性要高于双链 DNA, TyPif1 对 G4 DNA 的高亲和力和是其特异性解旋 G4 DNA 的保证。Dou 等^[28] 研究大肠杆菌 RecQ 解旋酶的 DNA 结合特性时, 得到大肠杆菌 RecQ 解旋酶的 Binding size 为 8~12 nt。本研究通过对不同长度单链 DNA 结合活性的测定, 得出 TyPif1 结合 DNA 底物的 Binding size 为 11.27 nt, 但是由于使用单链较少, 获得的 Binding size 可能会有所偏差。

Paeschke 等^[23] 研究表明, Pif1 解旋酶解旋 G4 DNA 的活力是 RecQ 家族解旋酶的 1 000 倍, 此外, 通过对比不同的解旋底物发现, RecQ 家族解旋酶擅长解旋 Y-结构底物, 而 Pif1 家族擅长解旋 G4 DNA 底物。最新研究表明, ScPif1 解旋酶以单体形式发挥作用, 同时研究还证明, G4 结构的存在能够强烈激活 ScPif1 解旋酶的解旋双链 DNA 底物活力^[22]。本研究发现, TyPif1 解旋酶同样能解旋双链 DNA 和 G4 DNA, 且解旋 G4 DNA 的速率高于双链 DNA, 表明其更偏好于解旋含有 G4 结构的 DNA 底物, 这与最近报道的 ScPif1 解旋酶的特性一致, 然而 ScPif1 解旋酶解旋 G4 DNA 底物的速度高于

TyPif1 解旋酶^[22-23]。TyPif1 解旋酶基因来自于一种生活在黄石湖热水口的热脱硫弧菌^[27], 本研究通过圆二色谱(CD)分析发现, TyPif1 解旋酶在 25~60 ℃ 内二级结构稳定, 其 DNA 解螺旋活性随着温度升高而增大; 而在 25 ℃ 环境中生活的拟杆菌 BsPif1 解旋酶活力随着温度升高逐渐丧失。TyPif1 的这一现象与其在生活环境中的生长和代谢规律吻合, 而有关真核生物 Pif1 解旋酶如 ScPif1 和 hPif1 却无此报道。

Pif1 解旋酶家族其他成员如 hPif1、Rrm3、Pfh1 不能获得全长蛋白^[23], 而 TyPif1 解旋酶具有该家族成员共有的 DNA 结合特性和解旋活性, 同时具有良好的热稳定性。选择热脱硫弧菌 Pif1 解旋酶作为研究材料, 一方面可拓展 Pif1 解旋酶的研究范围, 另一方面则是由于嗜热菌蛋白相对容易结晶。本研究建立的表达纯化体系为后续功能和结构研究提供了一个理想的素材, 为基于 Pif1 解旋酶的新药开发提供了理论依据。

[参考文献]

[1] Matson S W, Bean D W, George J W. DNA helicases: enzymes with essential roles in all aspects of DNA metabolism [J]. BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology, 1994, 16(1): 13-22.

[2] Wong I, Lohman T M. ATPase activity of *Escherichia coli* Rep helicase crosslinked to single-stranded DNA: implications for ATP driven helicase translocation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,

- 1996,93(19):10051-10056.
- [3] Ellis N A, Groden J, Ye T Z, et al. The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases [J]. *Cell*, 1995, 83(4):655-666.
- [4] Yu C E, Oshima J, Fu Y H, et al. Positional cloning of the Werner's syndrome gene [J]. *Science*, 1996, 272(5259):258-262.
- [5] Bochman M L, Sabouri N, Zakian V A. Unwinding the functions of the Pif1 family helicases [J]. *DNA Repair*, 2010, 9(3):237-249.
- [6] Bessler J B, Torre J Z, Zakian V A. The Pif1p subfamily of helicases: region-specific DNA helicases? [J]. *Trends in Cell Biology*, 2001, 11(2):60-65.
- [7] Foury F, Kolodnyski J. Pif mutation blocks recombination between mitochondrial rho+ and rho- genomes having tandemly arrayed repeat units in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1983, 80(17):5345-5349.
- [8] Lahaye A, Stahl H, Thines-Sempoux D, et al. PIF1: a DNA helicase in yeast mitochondria [J]. *The EMBO Journal*, 1991, 10(4):997-1007.
- [9] Foury F, Dyck E V. A PIF-dependent recombinogenic signal in the mitochondrial DNA of yeast [J]. *The EMBO Journal*, 1985, 4(13A):3525-3530.
- [10] Boule J B, Vega L R, Zakian V A. The yeast Pif1p helicase removes telomerase from telomeric DNA [J]. *Nature*, 2005, 438(7064):57-61.
- [11] Budd M E, Reis C C, Smith S, et al. Evidence suggesting that Pif1 helicase functions in DNA replication with the Dna2 helicase/nuclease and DNA polymerase delta [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2006, 26(7):2490-2500.
- [12] Boule J B, Zakian V A. The yeast Pif1p DNA helicase preferentially unwinds RNA DNA substrates [J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(17):5809-5818.
- [13] Azvolinsky A, Dunaway S, Torres J Z, et al. The *S. cerevisiae* Rrm3p DNA helicase moves with the replication fork and affects replication of all yeast chromosomes [J]. *Genes & Development*, 2006, 20(22):3104-3116.
- [14] Bessler J B, Zakian V A. The amino terminus of the *Saccharomyces cerevisiae* DNA helicase Rrm3p modulates protein function altering replication and checkpoint activity [J]. *Genetics*, 2004, 168(3):1205-1218.
- [15] Schmidt K H, Derry K L, Kolodner R D. *Saccharomyces cerevisiae* RRM3, a 5' to 3' DNA helicase, physically interacts with proliferating cell nuclear antigen [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(47):45331-45337.
- [16] Zhou J Q, Qi H, Schulz V P, et al. *Schizosaccharomyces pombe* pfh1+ encodes an essential 5' to 3' DNA helicase that is a member of the PIF1 subfamily of DNA helicases [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2002, 13(6):2180-2191.
- [17] Pinter S F, Aubert S D, Zakian V A. The *Schizosaccharomyces pombe* Pfh1p DNA helicase is essential for the maintenance of nuclear and mitochondrial DNA [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2008, 28(21):6594-6608.
- [18] Mateyak M K, Zakian V A. Human PIF helicase is cell cycle regulated and associates with telomerase [J]. *Cell Cycle*, 2006, 5(23):2796-2804.
- [19] Futami K, Shimamoto A, Furuichi Y. Mitochondrial and nuclear localization of human Pif1 helicase [J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2007, 30(9):1685-1692.
- [20] Zhang D H, Zhou B, Huang Y, et al. The human Pif1 helicase, a potential *Escherichia coli* RecD homologue, inhibits telomerase activity [J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(5):1393-1404.
- [21] Gu Y, Masuda Y, Kamiya K. Biochemical analysis of human PIF1 helicase and functions of its N-terminal domain [J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(19):6295-6308.
- [22] Duan X L, Liu N N, Yang Y T, et al. G-Quadruplexes significantly stimulate Pif1 helicase-catalyzed duplex DNA unwinding [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(12):7722-7735.
- [23] Paeschke K, Bochman M L, Garcia P D, et al. Pif1 family helicases suppress genome instability at G-quadruplex motifs [J]. *Nature*, 2013, 497(7450):458-462.
- [24] Singleton M R, Scaife S, Raven N D, et al. Crystallization and preliminary X-ray analysis of RecG, a replication-fork reversal helicase from *Thermotoga maritima* complexed with a three-way DNA junction [J]. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2001, 57(Pt 11):1695-1696.
- [25] Bailey S, Eliason W K, Steitz T A. The crystal structure of the *Thermus aquaticus* DnaB helicase monomer [J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(14):4728-4736.
- [26] Fan L, Fuss J O, Cheng Q J, et al. XPD helicase structures and activities: insights into the cancer and aging phenotypes from XPD mutations [J]. *Cell*, 2008, 133(5):789-800.
- [27] Henry E A, Devereux R, Maki J S, et al. Characterization of a new thermophilic sulfate-reducing bacterium *Thermodesulfovibrio yellowstonii*, gen. nov. and sp. nov.: its phylogenetic relationship to *Thermodesulfo* bacterium commune and their origins deep within the bacterial domain [J]. *Archives of Microbiology*, 1994, 161(1):62-69.
- [28] Dou S X, Wang P Y, Xu H Q, et al. The DNA binding properties of the *Escherichia coli* RecQ helicase [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(8):6354-6363.
- [29] Kelly S M, Jess T J, Price N C. How to study proteins by circular dichroism [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1751(2):119-139.
- [30] Zhang X D, Dou S X, Xie P, et al. *Escherichia coli* RecQ is a rapid, efficient, and monomeric helicase [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(18):12655-12663.