

网络出版时间:2019-11-04 15:56 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2020.05.007
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.s.20191101.0929.014.html

牛、果蝇 DHX36 解旋酶的表达纯化及活性比较

李 康,郭海磊,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】**探索牛和果蝇 DHX36 解旋酶的表达纯化条件及底物结合活性,为深入研究 DEAH-box 解旋酶提供理论参考。**【方法】**以较高等动物牛(*Bos taurus*)和较低等动物黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)RNA 解旋酶 BtDHX36 和 DmDHX36 为研究对象,首先,构建重组表达载体 pET15b-sumo-BtDHX36 和 pET15b-sumo-DmDHX36,将 2 种质粒分别转入表达菌株 BL21(DE3)中,诱导表达 2 种目的蛋白,利用 Ni-NTA 层析柱、HisTrap SP HP 柱纯化得到目的蛋白。然后,采用荧光各向异性法(FA)研究溶液和温度条件对 2 种蛋白底物结合活性的影响,以及二者的底物结合偏好性。最后利用快速停流-荧光共振能量转移(FRET)技术对 2 种 DHX36 的双链底物解旋活性进行比较。**【结果】**获得了纯度大于 95%的全长 BtDHX36 和 DmDHX36 蛋白,2 种 DHX36 解旋酶的最佳底物结合条件为:20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、50 mmol/L NaCl、2 mmol/L MgCl₂、反应温度 37 ℃。在此条件下,2 种同源 DHX36 均可结合多种类型核酸底物(ssRNA、ssDNA、parallel G4、anti-parallel G4),且 BtDHX36 结合平行结构 G4 底物(parallel G4)的倾向更明显,DmDHX36 无此趋势;2 种 DHX36 解旋酶结合不同长度 ssDNA 的能力不同,BtDHX36 更倾向于结合较长的单链 DNA 底物,而 DmDHX36 更倾向于结合较短的单链 DNA 底物;二者均能高效解旋 dsRNA 和 dsDNA 底物,DmDHX36 更倾向于解旋 dsDNA,而 BtDHX36 无明显倾向性。**【结论】**成功表达并纯化了 BtDHX36 和 DmDHX36 蛋白,确定了其最适结合条件,比较了 2 种 DHX36 解旋酶对不同底物的结合及解旋偏好。

[关键词] 牛 DHX36 解旋酶;果蝇 DHX36 解旋酶;蛋白表达纯化;底物结合;底物解旋
[中图分类号] Q291 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2020)05-0049-08

Expression, purification and activity comparison of DHX36 helicase between *Bos taurus* and *Drosophila melanogaster*

LI Kang, GUO Hailei, XI Xuguang

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

Abstract: **【Objective】** This study explored the conditions for expression, purification and substrate binding activity of DHX36 helicase of cattle and drosophila to provide reference for further study of DEAH-box helicase. **【Method】** RNA helicases BtDHX36 and DmDHX36 of higher animal cattle (*Bos taurus*) and lower animal drosophila (*Drosophila melanogaster*) were selected for recombinant expression vectors pET15b-sumo-BtDHX36 and pET15b-sumo-DmDHX36. The two plasmids were transferred into the expression strain BL21(DE3) to induce expression of proteins. Target proteins were purified by a Ni-NTA column and a HisTrap SP HP column. Then, the effect of solution and temperature conditions on the binding ability of the two protein substrates and the substrate binding preferences were studied by fluorescence anisotropy (FA). Finally, the double chain desorption ability of DHX36 was compared and analyzed using

[收稿日期] 2019-04-12
[基金项目] 国家自然科学基金项目(31370798,11304252)
[作者简介] 李 康(1992—),男,河北曲阳人,在读硕士,主要从事生物大分子结构与功能研究。E-mail:likang153710@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的结构及功能研究。
E-mail:xxi01@ens-cachan. fr

fast stop current fluorescence resonance energy transfer (FRET) technique. 【Result】 Full length BtDHX36 and DmDHX36 proteins with greater than 95% purity were obtained. The influence of solution and temperature conditions on the binding activity of the two DHX36 substrates was determined, and the optimal substrate binding conditions were 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 50 mmol/L NaCl, 2 mmol/L $MgCl_2$, and reaction temperature 37 °C. Under these conditions, both homologous DHX36 were bind to various nucleic acid substrates (ssRNA, ssDNA, parallel G4 and anti-parallel G4), and the tendency of BtDHX36 to bind parallel G4 substrate (parallel G4) was more obvious while DmDHX36 had no such trend. The ability to bind ssDNA with different lengths was different. BtDHX36 was more likely to bind longer single-stranded DNA substrates, while DmDHX36 was more likely to bind shorter single-stranded DNA substrates. Both can efficiently unwind dsRNA and dsDNA substrates. DmDHX36 was more inclined to unwind dsDNA, while BtDHX36 had no tendency. 【Conclusion】 The BtDHX36 and DmDHX36 proteins were successfully expressed and purified, and the optimal binding conditions were determined. The binding and unwinding preferences of two DHX36 substrates to different substrates were also compared.

Key words: *Bos taurus* DHX36 helicase; *Drosophila melanogaste* DHX36 helicase; protein expression purification; substrate binding; substrate unwinding

解旋酶广泛存在于病毒、原核生物及真核生物细胞中,在维持细胞正常生命活动中有着重要作用^[1];对于打开细胞内的核酸二级结构,维持基因组完整性以及转录和翻译的正常启动至关重要,解旋酶不仅参与 DNA 的复制、重组、修复、转录、翻译和 RNA 剪接等多种生命活动,而且与人类的一些疾病密切相关^[2-5]。在 DNA 修复过程中,相关解旋酶的突变可能导致多种人类病症,如免疫缺陷、智力迟钝、过早衰老和易患癌症等症状^[6-7]。在核酸复制、重组、修复、转录、翻译过程中都涉及氢键打开,解旋酶可以打开 DNA 及双链 RNA,为反应提供需要的单链模板或中间体。

基于初级序列中保守基序序列和结构特征不同,可将解旋酶蛋白质分为 3 个超家族和 2 个家族(即 SF1—SF5)^[4]。所有解旋酶保守基序中都具有 Walker A 和 B 基序,这些基序也普遍存在于许多 Ntpase 中^[8]。此外, SF1 和 SF2 这 2 个超家族保守基序高度相似,所有结构都呈现相同的整体折叠,且具有 2 个 α - β 再整合域^[9]。SF2 解旋酶作为最大的一个超家族,包含 DEAH-box RNA 解旋酶家族、Rec Q 样家族和 Snf2 样家族等几个研究较为深入的亚家族^[10-12]。

DHX36 解旋酶也被称为 Rhau 或 G4R1,属于 SF2 家族中的 DEAH-box 系列,是对 DNA 和 RNA G-四联体(G4S)具有高度特异性的 ATP 依赖性的 RNA 解旋酶^[13-14]。由核心结构域和两侧 N 端、C 端的延伸结构组成,其核心结构域负责 ATP 的结合、水解和解旋, N 端可以特异性地结合 G4 结构, C

端的功能尚不明确^[15-16]。科学家们发现, DHX36 解旋酶不但在 RNA 代谢、DNA 代谢上发挥重要作用,还可以通过识别外来病毒或者细菌的 Cp G-A 来调控 Myd88 依赖的天然免疫反应^[17]。Cp G-A 是含有丰富鸟嘌呤(G)碱基的序列, DHX36 解旋酶可能可以特异性地识别富含 G 的序列来调控免疫反应^[18]。有研究表明, DHX36 解旋酶与癌症相关, rG4 解旋酶 DHX36 和 DHX9 的消耗会促进 rG4 解旋酶相关的上游开放阅读框(uORF)的翻译,同时阻碍包含原癌基因、转录因子和表观遗传调节因子转录物的编码区的翻译^[19]。DHX36 解旋酶可能对底物类型以及碱基类别有偏好性。据报道,黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*) DHX36 解旋酶(DmDHX36)在体外可以特异性识别富含 G 的核酸序列,且优先识别和结合到 N 端,增强 DmDHX36 解旋酶对 DNA 底物的结合和解旋活性^[20]。

由于人类(*Homo sapiens*) DHX36 (hDHX36) 蛋白在原核表达系统中表达量过低,纯化难度高,不易获取,而且 hDHX36 的 N 端含有大量富含甘氨酸的序列,导致 hDHX36 不适于蛋白结晶。氨基酸序列比对结果显示,高等哺乳动物牛(*Bos taurus*) DHX36 解旋酶(BtDHX36)和较低等生物黑腹果蝇 DmDHX36 与 hDHX36 有较高的相似度,且三者 N 端序列高度保守,对 BtDHX36 和 DmDHX36 氨基酸密码子进行优化后发现,二者在原核表达系统中均可以获得大量表达,经纯化可以获取高纯度蛋白。因此,本研究以 BtDHX36 和 DmDHX36 为材料,采用原核表达系统获得高纯度 BtDHX36 和 Dm-

DHX36 蛋白,利用荧光各向异性法(FA)和快速停流-荧光共振能量转移(FRET)技术,比较这 2 种 DHX36 解旋酶在相同条件下底物的结合和解旋特征,以期为 DEAH-box 蛋白的研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材 料

BtDHX36 和 DmDHX36 蛋白质编码序列由 BioMatik 公司合成,表达载体 pET15b、克隆菌株 *E. coli* 2984 菌株、表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)均为本实验室保存,限制性内切酶 *EcoR* I、*Xho* I、*Nde* I 购自 NEB 公司,T4 DNA 连接酶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 QIA-

GEN 公司,HiTrap SP 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 底物的制备 试验所用 DNA 荧光底物均由上海生物公司合成,RNA 底物由南京金斯瑞生物公司合成,详细序列见表 1。将底物用 ddH₂O 溶解,制成浓度为 100 μmol/L 的储备液。制备 ssRNA 以及 ssDNA 底物时吸取一定量底物储备液,用含 100 mmol/L KCl 的 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)缓冲液稀释成终浓度为 2 μmol/L 的工作母液,parallel G4、anti-parallel G4 以及双链底物用相同方法稀释至 2 μmol/L 后,100 ℃加热 5 min 后自然冷却至室温。

表 1 试验所用 DNA 和 RNA 底物
Table 1 DNA and RNA substrates used in the experiments

序号 No.	底物名称 Substrate name	底物序列 Sequence(5'→3')	序号 No.	底物名称 Substrate name	底物序列 Sequence(5'→3')
1	ssDNA-12nt	gtgtgtgtgtg -F	6	ssDNA-24nt	gccctgggtgccgacaacgaaggtc-F
2	ssRNA-12nt	cucugcucgacg-F	7	ssDNA-32nt	gccctgggtccgacaacgaaggatatgctgtcg-F
3	parallel G4	F-ttgggtgggtgggtggg	8	ssDNA-42nt	gccctgggtccgacaacgaaggatatgctgtcgga-cggtgact-F
4	anti-parallel G4	F-ttgggttagggttagggttaggg	9	dsDNA	HF-cgucgagcagaguuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuucucugcucgacg-F
5	ssDNA-16nt	gccctgggtccgacag-F	10	dsRNA	HF-aatccgtcgacgacagaggtgtggtgtgtgtgtgtgtgtgtctctgctcgacggatt-F

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

1.2.2 表达载体的构建 将经过氨基酸密码子优化的目的基因载体 pBMH-BtDHX36 和 pBMH-DmDHX36 分别用 *EcoR* I 和 *Xho* I 进行双酶切,将切出的目的基因片段 BtDHX36 和 DmDHX36 经胶回收纯化后备用;用特异引物扩增具有增强蛋白可溶性的 sumo 基因片段,进行 *Nde* I 和 *EcoR* I 双酶切;pET15b 载体用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切,进行线性化处理;将目的基因片段(BtDHX36 和 DmDHX36)、线性化载体 pET15b、促溶基因片段 sumo 按照物质的量比 3 : 1 : 3 加入连接体系中,16 ℃过夜连接;经菌落 PCR、质粒提取双酶切检测和测序,确认重组表达载体 pET15b-sumo-BtDHX36 和 pET15b-sumo-DmDHX36 的正确性。

1.2.3 重组载体的表达及纯化 将成功构建的载体 pET15b-sumo-BtDHX36 和 pET15b-sumo-DmDHX36 分别转入表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)后,挑取单克隆进行活化,将活化后的菌液按体积比 1 : 1 000 接入具有 Amp 抗性的 LB 培养基中,37 ℃下 140 r/min 扩大培养,当 OD₆₀₀ 值至 0.6 时,加入 IPTG(终浓度 0.3 mmol/L)于 18 ℃、140 r/min 诱

导 15 h;5 000 r/min 离心 10 min 收菌称质量;按质量体积比 1 : 10 用 lysis buffer(20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5,500 mmol/L NaCl,体积分数 10%甘油,5 mmol/L 咪唑)复溶菌体,高压破菌 4 轮打碎细胞释放胞内物质,超声波破菌 3 轮打碎核酸物质降低溶液的黏稠度;12 000 r/min 离心 30 min,上清用 0.45 μm 滤膜过滤并进行 Ni-NTA 亲和层析纯化,使用 Wash Buffer(20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5,300 mmol/L NaCl,体积分数 10%甘油,5 mmol/L 咪唑)洗脱 10 倍柱体积,去除杂蛋白,使用 Elute Buffer(20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5,300 mmol/L NaCl,体积分数 10%甘油,300 mmol/L 咪唑)洗脱 5 倍柱体积并收集;按 1 : 1 000 摩尔质量比,在含有目的蛋白组分中加入 sumo 酶 4 ℃过夜酶切;用稀释 buffer(20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5,体积分数 10%甘油)稀释蛋白样品至 NaCl 终浓度为 100 mmol/L,之后过 HisTrap SP HP 柱梯度洗脱纯化;将得到的蛋白样品用 10% SDS-PAGE 电泳检测,合并较纯组分并用 30 ku Millipore 超滤管离心浓缩,分装后液氮冷冻,-80 ℃保存备用。

1.2.4 BtDHX36 和 DmDHX36 结合及解旋活性的测定 用 Infinite F200/M200 型多功能酶标仪,利用荧光各向异性法(FA)来测定 DHX36 蛋白与底物的结合活性。以 ssDNA-12nt 为底物,改变溶液条件及反应温度,将拟合得到的米氏常数 K_m (nmol/L)作为判定指标,研究 DHX36 在体外的最佳底物结合条件。首先调节溶液中氯化钠浓度分别为 0,20,50,75,100,150,200 mmol/L,判定最佳氯化钠浓度;在最佳氯化钠浓度下设氯化镁浓度为 0,1,2,4,10 mmol/L,设 pH 为 6.5,7.0,7.5,8.0,8.5,确定最佳水平;最后设置反应温度为 25,30,37,42 ℃,确定最佳结合温度。在最佳底物结合条件下,测定 2 种 DHX36 蛋白与不同类型(ssRNA、ssDNA、parallel G4、anti-parallel G4)和不同长度(ssDNA-16、24、32、42nt)底物的结合活性,判定其结合倾向性。

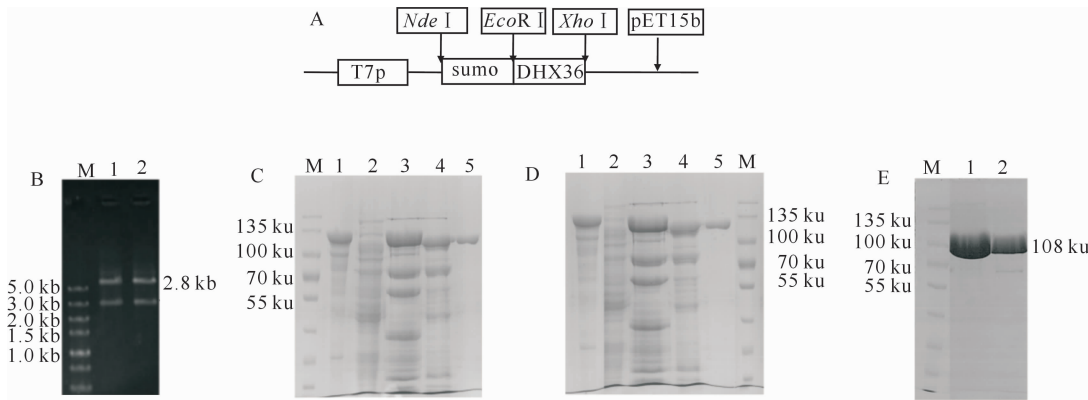
使用 Bio-Logic SFM-400 停流装置,根据荧光共振能量转移(FRET)原理测定 DHX36 的解旋活性。双链底物两条链分别用荧光素和六氯荧光素标记。激发波长和检测波长分别为 492 和 525 nm。

反应前将蛋白与所用底物于 37 ℃下孵育 5 min,蛋白与底物的终浓度分别为 20 和 4 nmol/L,以其反应动力学曲线拟合得到的反应速率常数判定蛋白解旋的偏好性。

2 结果与分析

2.1 2 种 DHX36 解旋酶的载体构建和蛋白表达纯化

BtDHX36 和 DmDHX36 表达载体构建过程见图 1-A。用 *EcoR* I、*Xho* I 对重组载体进行双酶切鉴定,切出大小约为 2.8 kb 的 BtDHX36 和 DmDHX36 基因片段(图 1-B)。将重组表达载体转入表达菌 *E. coli* BL21(DE3)18 ℃下诱导 14 h,目的蛋白 BtDHX36 和 DmDHX36 大部分在沉淀中,上清中也有部分,经 Ni-NTA 亲和柱纯化可得到富含目的蛋白的洗脱液,经 sumo 酶切后切去 sumo 标签;经过 HisTrap SP HP 柱梯度洗脱得到纯度>95%的蛋白(图 1-C—D)。最后浓缩得到 BtDHX36 和 DmDHX36 解旋酶(图 1-E),大小约为 108 ku。将 BtDHX36 和 DmDHX36 解旋酶蛋白浓缩到 10 mg/mL 左右,分装后液氮速冻,−80 ℃保存。



A. pET15b-sumo-DHX36 表达载体构建示意图;B. 1 和 2 分别为 pET15b-sumo-BtDHX36 和 pET15b-sumo-DmDHX36 载体双酶切鉴定结果;C、D. BtDHX36 和 DmDHX36 蛋白经 Ni-NTA 亲和柱纯化以及 HisTrap SP HP 离子柱结果,其中 M 为蛋白 Marker,1 为沉淀,2 为上清液,3 为 Ni-NTA 亲和柱洗脱液,4 为 sumo 酶切后的蛋白,5 为 HisTrap SP HP 离子柱纯化后的蛋白;E. 1 和 2 分别为 BtDHX36 和 DmDHX36 浓缩后的蛋白

A. Schematic diagram of construction of pET15b-sumo-DHX36 expression vector;B. Lanes 1 and 2 are identified by double restriction enzyme digestion of pET15b-sumo-BtDHX36 and pET15b-sumo-DmDHX36 vectors, respectively;C, D. BtDHX36 and DmDHX36 proteins purified by Ni-NTA affinity column and the HisTrap SP HP ion column, M is protein Marker, 1 is precipitate, 2 is supernatant, 3 is Ni-NTA affinity column eluent, 4 is a protein after digestion with sumo, and 5 is a protein purified by HisTrap SP HP ion column;E. Lanes 1 and 2 are proteins concentrated after BtDHX36 and DmDHX36, respectively

图 1 pET15b-sumo-BtDHX36 和 pET15b-sumo-DmDHX36 表达载体构建(A)、双酶切检测(B)及蛋白表达纯化结果(C、D、E)

Fig. 1 Schematic diagram for construction (A), double enzyme digestion detection (B) and protein expression purification (C, D and E) of pET15b-sumo-BtDHX36 and pET15b-sumo-DmDHX36 vectors

2.2 2 种 DHX36 解旋酶结合活性的条件优化

测定 DHX36 与底物的结合活性,将得到的各

向异性值归一化并用米氏方程拟合,可得 DHX36 在不同条件下的米氏常数 K_m ,结果见图 2。由图 2

可知,氯化钠浓度、氯化镁浓度、pH 以及温度均对 DHX36 的结合活性有一定影响,且对 2 种 DHX36 解旋酶的影响趋势一致。当氯化钠浓度为 50 mmol/L 时,BtDHX36 和 DmDHX36 的 K_m 均达到最小值,分别为 (20.0 ± 3.1) 和 (10.2 ± 1.5) nmol/L,表明此时 2 种蛋白的结合活性最强,氯化钠浓度过高或过低均会造成 K_m 值升高,蛋白结合底物能力下降;氯化镁存在与否对 DHX36 的结合

活性强弱至关重要,但其浓度在 1~3 mmol/L 时,DHX36 的 K_m 值趋稳,2 mmol/L $MgCl_2$ 下最小,结合活性最强;当 pH 为 7.5 时,DHX36 解旋酶的结合活性最强;DHX36 解旋酶在 37 ℃ 下的 K_m 最小,结合活性最强。因此确定 2 种 DHX36 解旋酶体外发挥结合活性的最佳条件为:20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5、50 mmol/L NaCl、2 mmol/L $MgCl_2$ 、反应温度 37 ℃。

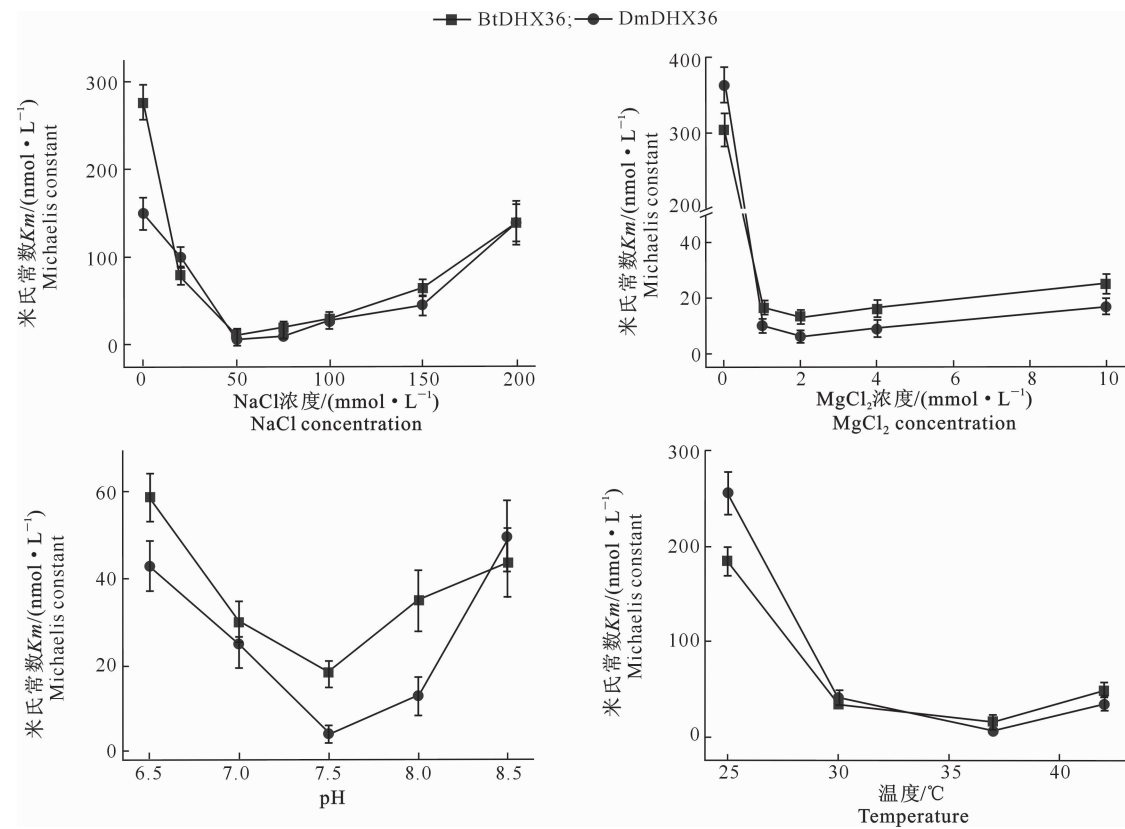


图2 BtDHX36 和 DmDHX36 解旋酶结合活性的条件优化

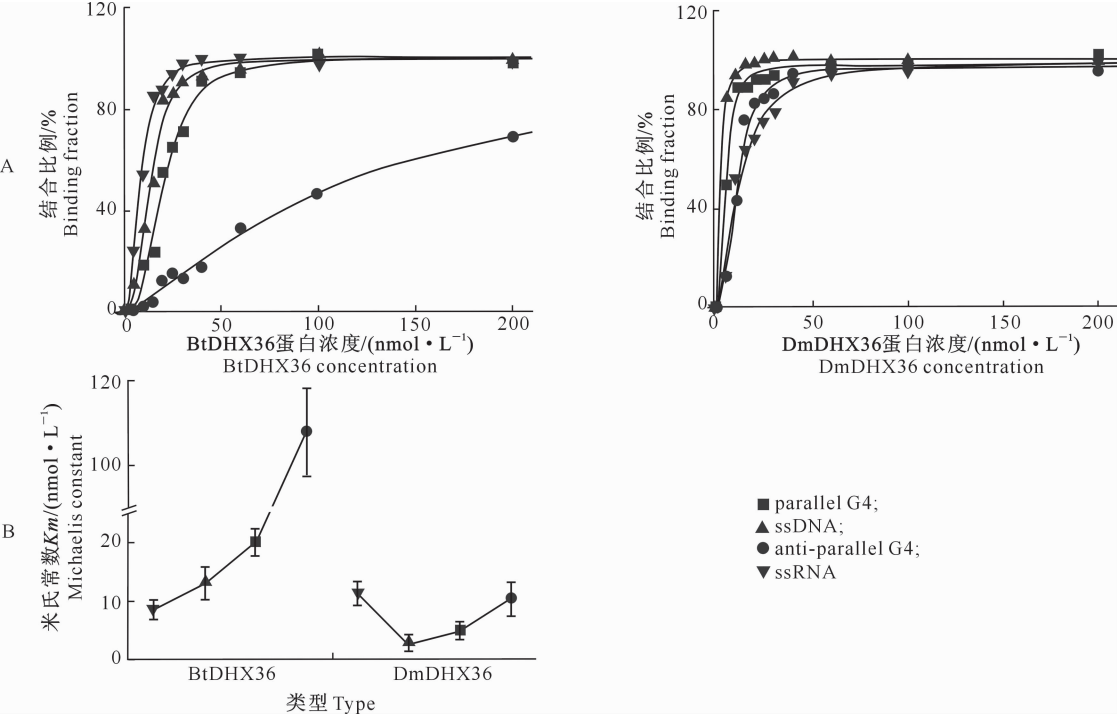
Fig. 2 Optimal conditions for binding activity of BtDHX36 and DmDHX36 racemase

2.3 2 种 DHX36 解旋酶对不同类型底物的结合偏好

在最佳底物结合条件下分别测定 ssRNA、ssDNA、parallel G4、anti-parallel G4 与 2 种 DHX36 解旋酶的结合活性,结果(图 3)显示,2 种 DHX36 均可与这 4 种底物结合,在 ssRNA、ssDNA 2 种底物中,DmDHX36 解旋酶更倾向于结合 ssDNA, K_m 为 (2.0 ± 0.5) nmol/L, BtDHX36 解旋酶更倾向于结合 ssRNA, K_m 为 (9.2 ± 1.0) nmol/L;在 parallel G4、anti-parallel G4 2 种底物中,BtDHX36 更倾向于识别 parallel G4, K_m 为 (20.1 ± 2.2) nmol/L,其结合 anti-parallel G4 的 K_m 为 (108.0 ± 10.5) nmol/L,偏好性差;而 DmDHX36 与 2 种 G4 底物的选择性结合趋势不明显。

2.4 ssDNA 底物长度对 2 种解旋酶结合活性的影响

用 16,24,32,42 nt ssDNA 测定底物长度对 BtDHX36 和 DmDHX36 结合活性的影响,结果如图 4 所示。由图 4 可知,2 种同源蛋白都能较好地结合 4 种 ssDNA;对 BtDHX36 而言,16,24,32,42 nt ssDNA 的 K_m 依次为 (31.0 ± 2.1) , (30.3 ± 2.5) , (25.1 ± 2.2) , (11.5 ± 1.8) nmol/L(图 4-B),说明随着 ssDNA 长度延长,BtDHX36 蛋白的结合活性也相应增强;而与 BtDHX36 蛋白不同的是,DmDHX36 对 4 种底物的 K_m 依次为 (5.0 ± 1.2) , (9.2 ± 1.0) , (11.0 ± 2.2) , (13.6 ± 1.5) nmol/L(图 4-B),说明随着 ssDNA 长度延长,DmDHX36 蛋白的结合活性有下降趋势。

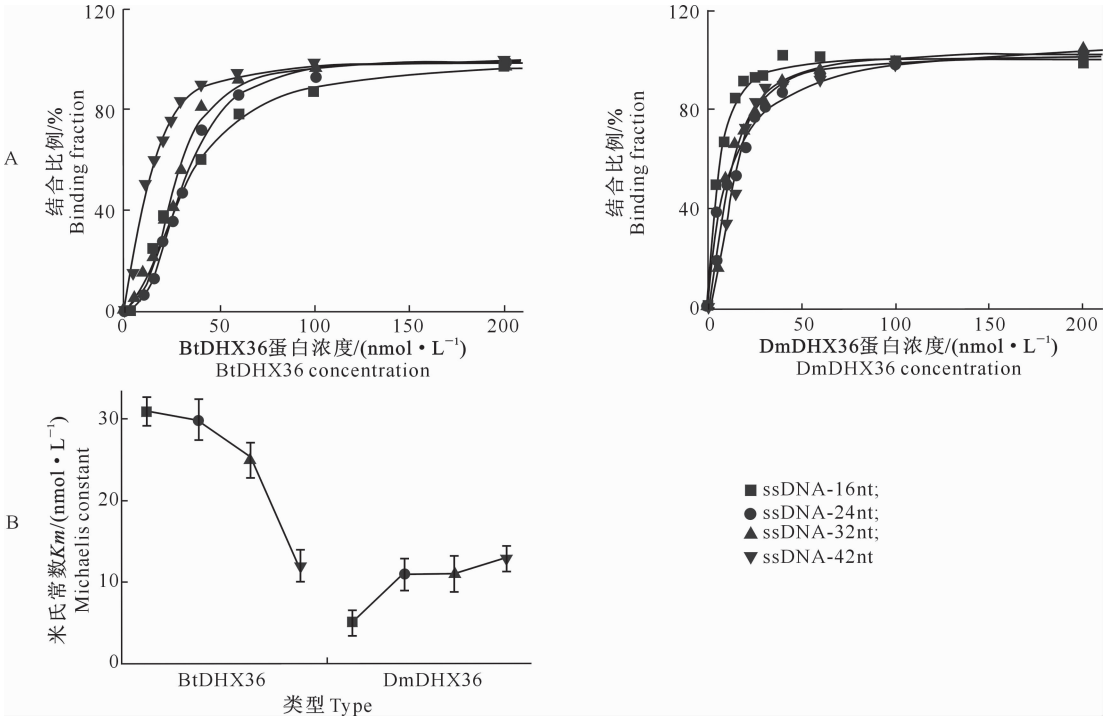


A. 2 种 DHX36 解旋酶结合不同类型底物的活性;B. 2 种 DHX36 解旋酶结合不同类型底物的米氏常数

A. Activity of two DHX36 helicases binding to different substrates;B. Michaelis constants of two DHX36 helicases binding to different substrates

图 3 BtDHX36 和 DmDHX36 解旋酶的底物结合偏好性比较

Fig. 3 Comparison of substrate binding preference between BtDHX36 and DmDHX36 racemase



A. 2 种 DHX36 解旋酶结合不同长度底物的活性;B. 2 种 DHX36 解旋酶结合不同长度底物的米氏常数

A. Activity of two DHX36 helicases binding to substrates with different lengths;B. Michaelis constants of two DHX36 helicases binding to substrates with different lengths

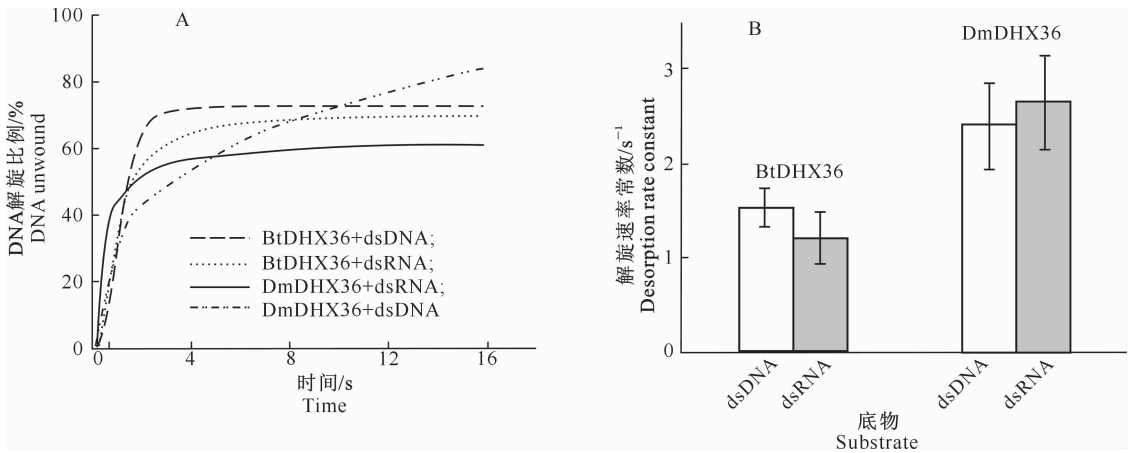
图 4 ssDNA 底物长度对 2 种 DHX36 解旋酶结合活性的影响

Fig. 4 Effect of substrate length of ssDNA on binding ability of two DHX36 decomposing enzymes

2.5 2 种 DHX36 解旋酶解旋偏好性比较

为了验证 2 种 DHX36 解旋酶发挥解旋作用时是否对双链 RNA 或 DNA 底物有偏好性,相同条件下用 DHX36 分别解旋 dsRNA 和 dsDNA 底物,比较二者解旋速率差异,结果如图 5 所示。由图 5 可见,BtDHX36 和 DmDHX36 解旋酶均能高效解旋 dsRNA 和 dsDNA 底物(图 5-A),且 DmDHX36 解旋双链底物速率总体高于 BtDHX36(图 5-B);就 BtDHX36 而言,其解旋 dsDNA 的速率常数为

$(1.5 \pm 0.3) s^{-1}$,解旋 dsRNA 的速率常数为 $(1.2 \pm 0.2) s^{-1}$ (图 5-B),解旋比例均在 70% 左右(图 5-A),表明 BtDHX36 蛋白对 dsRNA 或 dsDNA 无明显选择性;DmDHX36 解旋这 2 种底物的速率常数均在 $2.5 s^{-1}$ 左右,但反应结束时(16 s),其解旋 dsDNA 的比例(85%) 高于解旋 dsRNA 的比例(60%) (图 5-A)。据此判断,DmDHX36 解旋酶更倾向于解旋 dsDNA 底物。



A. 2 种解旋酶对 dsRNA 和 dsDNA 的解旋动力学曲线;B. 在 dsRNA 和 dsDNA 条件下 2 种 DHX36 解旋酶的解旋速率常数

A. Desorption kinetic curves of dsRNA and dsDNA by two kinds of lysozyme;B. Desorption rate constants of two DHX36 racemases under dsRNA and dsDNA condition

图 5 2 种 DHX36 解旋酶的解旋偏好性比较

Fig. 5 Comparison of hydrolytic preferences between two DHX36 racemases

3 讨 论

前期试验表明,DHX36 参与造血作用、心脏发育、精原细胞分化和神经元前体微 RNA 的树突状定位等多种生命发育过程^[21-22]。本研究建立了 DHX36 蛋白的原核表达系统,得到了纯度大于 95%、且具有生物活性的 BtDHX36 和 DmDHX36 蛋白。BtDHX36 和 DmDHX36 与 hDHX36 的一致性分别为 96% 和 58%,且三者 N 端序列高度保守^[15],暗示不论在较低等的果蝇还是较高等的哺乳动物(牛或人)细胞中,DHX36 不仅行使着广泛的基本生理活性,可能还在不同生物体内进化出更为独特的生化特点,进而帮助生物适应不同环境。

本试验利用荧光各向异性法(FA)确定了 DHX36 体外结合的最佳条件为:20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5、50 mmol/L NaCl、2 mmol/L MgCl₂、反应温度 37 ℃。在此条件下,2 种同源 DHX36 均能结合多种类型核酸底物(ssRNA、ssDNA、parallel

G4、anti-parallel G4),与反平行结构 G4 底物(anti-parallel G4)相比,BtDHX36 结合平行结构 G4 底物(parallel G4)的倾向更为明显,但 DmDHX36 的表现不同。BtDHX36 疏水核心由 α-螺旋 DSM 残基 Ile65、Trp68、Tyr69 和 Ala70 形成;与 DmDHX36 DSM 活性区域的保守序列不同,BtDHX36 为疏水性氨基酸 Tyr69,而 DmDHX36 为亲水性氨基酸 Arg,DHX36 与 G4 结构相互作用尚不明确,可能是因为二者保守序列不同造成其结合平行与反平行 G4 结构能力的差异^[23]。ssDNA 底物的长度也会影响 DHX36 的结合活性,BtDHX36 更倾向于结合较长的单链 DNA 底物,而 DmDHX36 更倾向于结合较短的单链 DNA 底物。这可能是由于 BtDHX36 与 DmDHX36 相比有额外的未知的结合位点,因此更倾向于结合长链底物。利用快速停流-荧光共振能量转移(FRET)技术发现,BtDHX36、DmDHX36 均能高效解旋 dsRNA 和 dsDNA 底物,BtDHX36 解旋这 2 种底物的速率常数和比例差异不大;但就

解旋比例而言,DmDHX36 更倾向于解旋 dsDNA,可能是因为 DmDHX36 与 DNA 底物的结合位点比 RNA 底物作用多。本研究结果可为后续此类蛋白活性及晶体结构研究提供理论依据。

[参考文献]

- [1] Watson J D,Crick F H. Molecular structure of nucleic acids;a structure for deoxyribose nucleic acid [J]. *Nature*,1953,171(4356):737-738.
- [2] Matson S W,Bean D W,George J W. DNA helicases; enzymes with essential roles in all aspects of DNA metabolism [J]. *Bioessays*,2010,16(1):13-22.
- [3] Matson S W,Kaiser-Rogers K A. DNA helicases [J]. *Annual Review of Biochemistry*,1990,59(1):289-329.
- [4] Goralenya A E,Koonin E V. Helicases amino acid sequence comparisons and structure function relationships [J]. *Current Opinion In Structural Biology*,1993,3(3):419-429.
- [5] Lohman T M,Ferrari M E. *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein;multiple DNA binding modes and cooperativities [J]. *Annual Review of Biochemistry*,1994,63:527-570.
- [6] Andressoo J O,Hoeijmakers J H. Transcription-coupled repair and premature ageing [J]. *Mutat Res*,2005,577(1/2):179-194.
- [7] Andressoo J O,Hoeijmakers J H,de Waard H. Nucleotide excision repair and its connection with cancer and ageing [J]. *Adv Exp Med Biol*,2005,570:45-83.
- [8] Walker J E,Saraste M,Runswick M,et al. Distantly related sequences in the alpha-and beta-subunits of ATP synthase,myosin,kinases and other ATP-requiring enzymes and a comol/Lon nucleotide binding fold [J]. *The EMBO Journal*,1982,1(8):945-951.
- [9] Caruthers J M,Mckay D B. Helicase structure and mechanism [J]. *Current Opinion in Structural Biology*,2002,12(1):123-133.
- [10] Cordin O,Banroques J,Tanner,et al. The DEAD-box protein family of RNA helicases [J]. *Gene*,2006,367(1):17.
- [11] Bennett R J,Keck J L. Structure and function of Rec Q DNA helicases [J]. *Critical Reviews in Biochemistry & Molecular Biology*,2004,39(2):79-97.
- [12] Flaus A,Owen-Hughes T. Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling;farewell to the tuna-can octamer [J]. *Current Opinion in Genetics & Development*,2004,14(2):165.
- [13] Linder P,Fuller-Pace F. Happy birthday:25 years of DEAD-boxproteins methods [J]. *Mol Biol*,2015,1259:17-33.
- [14] Tran H,Schilling M,Wirbelauer C H,et al. Facilitation of mRNA deadenylation and decay by the exosome-bound,DEXH protein RHAU [J]. *Mol Cell*,2004,13:101-111.
- [15] Lattmann S,Giri B,Vaughn J P,et al. Role of the amino terminal RHAU-specific motif in the recognition and resolution of guanine quadruplex-RNA by the DEAH-box RNA helicase RHAU [J]. *Nucleic Acids Res*,2010,38(18):6219-6233.
- [16] Meier M,Patel T R,Booy E P,et al. Binding of G-quadruplexes to the N-terminal recognition domain of the RNA helicase associated with AU-rich element (RHAU) [J]. *Journal of Biological Chemistry*,2013,288(49):35014-35027.
- [17] Kim T,Pazhoor S,Bao M,et al. Aspartate-glutamate-alanine-histidine box motif (DEAH)/RNA helicase A helicases sense microbial DNA in human plasmacytoid dendritic cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2010,107(34):15181-15186.
- [18] Kim H N,Lee J H,Bae S C,et al. Histone deacetylase inhibitor MS-275 stimulates bone formation in part by enhancing Dhx36-mediated TNAP transcription [J]. *Bone Miner Res*,2011,26(9):2161-2173.
- [19] Murat P,Marsico G,Herdy B,et al. RNA G-quadruplexes at upstream open reading frames cause DHX36- and DHX9-dependent translation of human mRNAs [J]. *Genome Biology*,2018,19(1):41-64.
- [20] Chen W F,Rety S,Guo H L,et al. Molecular mechanistic insights into, *Drosophila*, DHX36-mediated G-quadruplex unfolding;a structure-based model [J]. *Structure*,2018,26(3):403-415.
- [21] Lai J C,Ponti S,Pan D,et al. The DEAH-box helicase RHAU is an essential gene and critical for mouse hematopoiesis [J]. *Blood*,2012,119(18):4291-4300.
- [22] Bicker S,Khudayberdiev S,Weiss K,et al. The DEAH-box helicase DHX36 mediates dendritic localization of the neuronal precursor-micro RNA-134 [J]. *Genes Dev*,2013,27(9):991-996.
- [23] Chen M C,Ramreddy T,Demeshkina N A,et al. Structural basis of G-quadruplex unfolding by the DEAH/RHA helicase DHX36 [J]. *Nature*,2018,558(7710):465-469.