

网络出版时间:2015-12-02 14:25 DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2016.01.025
网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20151202.1425.050.html

一种嗜热菌 Pif1 解旋酶的表达纯化及活性分析

赵正阳,刘娜女,李海红,奚绪光,范三红

(西北农林科技大学 生命科学学院,陕西 杨凌 712100)

[摘要] 【目的】利用大肠杆菌表达纯化嗜热脱铁去硫弧菌(*Deferribacter desulfuricans*)解旋酶 DePif1,并对其结合与解旋 DNA 的活性进行分析,为 Pif1 家族解旋酶结构和功能的阐明奠定基础。【方法】将促溶标签 SUMO 编码序列和人工合成的 DePif1 解旋酶编码序列依次连入 pET15b 载体,获得重组融合表达载体 pET15b-SUMO-DePif1,然后将其导入 *E. coli* BL21(DE3)菌株进行诱导表达;利用 Ni-NTA 亲和层析柱获得融合蛋白,SUMO 蛋白酶酶切去除融合标签,再经 Heparin 和 Ni-NTA 柱分离获得无标签的纯化重组 DePif1 蛋白;采用荧光各向异性分析,研究 pH 和 NaCl 浓度对 DePif1 与 DNA 结合的影响及 DePif1 与不同底物(单链 DNA、双链 DNA 和 G4-DNA)的结合特性;使用基于荧光共振能量转移的 stopped-flow 技术,分析 DePif1 对不同底物(G4-DNA with 5' 26 nt tail 和 dsDNA with 5' 26 nt tail)的解旋活性。【结果】每升菌液可获得 9 mg 纯度大于 95% 的 DePif1 解旋酶。DePif1 结合不同 DNA 底物的强度依次为 G4-DNA>单链 DNA>双链 DNA,其对 G4-DNA 的解旋活力大于双链 DNA。【结论】成功表达并纯化了嗜热脱铁去硫弧菌 Pif1 解旋酶,并证明其具有特异的 G4-DNA 结合和解旋能力。

[关键词] 嗜热脱铁去硫弧菌;Pif1 解旋酶;G4-DNA;表达纯化;解旋活性

[中图分类号] Q71

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2016)01-0169-08

Expression, purification and activity analysis of Pif1 helicase from thermophile *Deferribacter desulfuricans*

ZHAO Zheng-yang, LIU Na-nü, LI Hai-hong,

XI Xu-guang, FAN San-hong

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

Abstract: 【Objective】This study expressed and purified the Pif1 helicase of thermophile *Deferribacter desulfuricans* in *E. coli* and analyzed its DNA binding and unwinding activity to lay foundation for the elucidation of the structure and function of Pif1 family helicases. 【Method】Based on the expression vector pET15b, a recombinant plasmid pET15b-SUMO-DePif1 was constructed by cloning the SUMO coding sequence and the synthetic *DePif1* gene into the downstream of its His-tag. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* strain BL21 (DE3) and the fusion DePif1 was induced by IPTG. Firstly, DePif1 with His6-SUMO tag from the supernatant of cell lysates was captured by affinity chromatography with a Ni-NTA column. Then, the fusion tag was cleaved by SUMO protease and tag-free DePif1 helicase was obtained by further purification with Heparin Sepharose Fast Flow and Ni-NTA chromatography. Finally, the

[收稿日期] 2014-04-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31370798, 11304252)

[作者简介] 赵正阳(1989—),男,河南洛阳人,在读硕士,主要从事生物大分子结构与功能研究。E-mail: yangokay@yeah.net

[通信作者] 范三红(1971—),男,陕西合阳人,副教授,博士,硕士生导师,主要从事生物化学与生物信息学研究。

E-mail: shfan@nwsuaf.edu.cn

effects of pH and NaCl concentrations on DNA binding, the characteristics of DePif1 binding with different substrates (single-stranded DNA, double-stranded DNA, and G4-DNA) and unwinding activities of DePif1 against different substrates (G4-DNA with 5' 26 nt tail and ds DNA with 5' 26 nt tail) were analyzed by fluorescence anisotropy and stopped-flow based FRET. 【Result】 According to the above protocol, 9 mg DePif1 with >95% purity was obtained for every liter of broth. DePif1 can bind with different DNA substrates with the binding activity in decreasing order of G4-DNA>ss-DNA>ds-DNA. Its unwinding activity to G4-DNA was higher than to ds-DNA. 【Conclusion】 DePif1 helicase was expressed and purified successfully. DePif1 can bind and unwind G4-DNA specially.

Key words: *Deferribacter desulfuricans*; Pif1 helicase; G4-DNA; expression and purification; activity analysis

解旋酶是生物体内一类参与几乎所有核酸代谢过程的分子马达,通常能结合并水解 ATP,并利用水解释放的能量打开核酸双链间的氢键,为复制、转录、修复和重组等过程提供单链模板或反应中间物^[1]。解旋酶编码基因突变常会导致严重遗传病的发生,如人类的 Werner、Bloom、Fanconi 综合症等^[2-3]。根据保守模体数量和序列差异,解旋酶可分为 5 个超家族^[4]。Pif1 家族解旋酶是一类依赖 ATP 的 5'→3'解旋酶,属于解旋酶超家族 I (SF I) 的一个亚家族,广泛存在于原核、真核生物及病毒中。Pif1 家族解旋酶均包含一个由 300~500 个氨基酸残基组成的 Pif1 结构域,该结构域中包含 7 个保守模体,在不同物种间高度保守^[5-6]。

酿酒酵母的 ScPif1 是首个被发现的 Pif1 家族成员,是在研究影响线粒体 DNA 重组频率的基因时分离得到的^[7]。之后的研究证明,ScPif1 具有依赖单链 DNA 的 ATP 水解活性,并且在 ATP 和 Mg^{2+} 存在时,能沿 5'→3'方向解旋 DNA-DNA 或 DNA-RNA 底物^[8-9];除此之外,ScPif1 还能解旋 G-四联体 DNA (G-quadruplex, G4-DNA) 结构,并且解旋速度高于其他双链 DNA 底物^[10]。同时,ScPif1 参与冈崎片段的加工^[11],通过抑制端粒酶的活性来抑制端粒延伸^[8,12],这些功能使其在维持染色体和线粒体 DNA 稳定性方面发挥着重要作用^[13]。酿酒酵母中还存在另一个 Pif1 家族成员 ScRrm3,是在筛选 rDNA 重组相关基因时发现的^[14]。DNA 复制过程中,ScRrm3 全程随复制叉移动,能帮助复制叉通过结合蛋白或特殊的 DNA 结构等障碍,并与 DNA 聚合酶催化亚基 ϵ 作用,是复制体的组成元件^[15]。酵母双杂交和 PULL-DOWN 试验证实,Rrm3p 可直接与增殖细胞核抗原 (Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA) 相互作用^[16]。另一个研究较深入的 Pif1 成员是裂殖酵母

(*Schizosaccharomyces pombe*) 的 Pfh1。截短的 Pfh1 具有依赖 ATP 和 Mg^{2+} 的 5'→3' DNA 解旋酶活力^[17]。当 Pfh1 缺失或突变时,线粒体 DNA 迅速丢失并能导致细胞死亡,因此其对维持酵母细胞核及线粒体基因组的完整是必需的^[13,17]。

哺乳类基因组中只编码一个 Pif1-Like 蛋白,序列分析结果显示,人类与小鼠 Pif1-Like 蛋白(分别为 hPif1 和 mPif1)具有 84% 的序列相似度^[18]。免疫荧光分析显示,hPif1 在细胞核和线粒体中均有存在^[18]。hPif1 在镁离子和单链 DNA 存在下,能有效地水解 ATP,并且以 ATP 水解为动力,沿 5'→3'方向解旋 DNA-DNA 双链、DNA-RNA 杂合链、复制叉状结构和 G4-DNA 结构^[19-21]。在人肿瘤细胞中,过量表达 hPif1 导致端粒缩短,抑制其过表达则端粒长度恢复。结合 hPif1 对 DNA-RNA 杂交链的解链试验、酵母双杂交以及免疫共沉淀试验,研究者认为 hPif1 通过解旋“端粒酶 RNA/端粒 DNA”杂合链来抑制端粒酶活性^[18-19]。小鼠 mPif1 在胚胎和造血细胞中表达,虽然可与端粒酶相互作用,但并不抑制端粒酶活性^[22]。

富含鸟嘌呤(G, guanine)的核酸序列可以通过 4 个鸟嘌呤的自组装产生四链 DNA 结构,即 G4-DNA。全基因序列分析表明,潜在的 G4-DNA 序列不仅存在于真核生物端粒序列中,而且广泛散布在原核和真核基因组中^[23-24]。G4-DNA 的广泛存在暗示其具有特定的生物学功能。研究表明,基因启动子区的 G4-DNA 会影响基因的转录,而 mRNA 中的 G4 结构则影响蛋白质的翻译。G4-DNA 结构的出现会成为复制与转录的障碍,因而需要 G4-DNA 结构特异的解旋酶。目前已发现的具有 G4-DNA 解旋活性的酶包括 FANCI、BLM、WRN 和 Pif1 解旋酶。相对于其他 DNA 底物,Pif1 解旋酶对 G4-DNA 具有更高的结合和解旋活力^[10,21]。

研究表明,Pif1 解旋酶在不同生物体中,甚至同一生物体的不同组织中具有不同的功能^[6]。因此需要对不同来源的 Pif1 解旋酶进行研究,以更全面地了解 Pif1 家族的功能特点和作用机理。蛋白与靶 DNA 晶体的获得与解析对解旋酶功能的阐明具有决定性作用,而嗜热菌蛋白通常具有良好的热稳定性,有利于晶体的形成。已有多种嗜热菌解旋酶获得晶体结构,如 DnaB、RecG 和 XPD 等^[25-27]。本研究以生活在深海热液喷发口的嗜热脱铁去硫弧菌(*Deferribacter desulfuricans*)(最适生活温度 60~65 ℃)的 Pif1 蛋白 DePif1 为对象,利用大肠杆菌系统实现 DePif1 的高效表达纯化,分析其对不同底物的结合和解旋能力,以期为研究 Pif1 家族解旋酶的功能及晶体结构奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒 *E. coli* 2984、BL21(DE3)菌株,pET15b 载体及 PCR 扩增获得的 SUMO 促溶

标签编码序列,均为西北农林科技大学生命科学学院奚绪光教授实验室保存。

1.1.2 工具酶及主要试剂 *Nde* I、*Eco*R I-HF、*Xho* I 等限制性内切酶购自 NEB 公司,Prime STAR DNA Polymerase、T4 DNA ligase 购自 Takara 公司,所有试剂均为分析纯,所有缓冲液均由 Millipore 系统的超纯水配制,Ni-NTA、Heparin Sepharose Fast Flow 等层析柱购自 GE 公司。

1.1.3 DNA 底物 解旋试验中所用的 DNA 底物两条链分别标记荧光素(fluorescein,F)和六氯荧光素(hexachlorofluorescein,H),而 DNA 结合的荧光偏振试验中用到的 DNA 底物只有一条链标记荧光素。制备各种底物的单链 DNA 购自上海生工生物工程公司,均经过 HPLC 纯化,具体序列见表 1。双链和 G4-DNA 底物通过单链 DNA 退火获得,方法是:将单链 DNA 置于退火缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl,100 mmol/L NaCl,pH 8.0)中 90 ℃变性 3 min,然后自然降温退火。

表 1 结合和解旋试验中所用的 DNA 底物

Table 1 DNA substrates used in DNA binding and unwinding assays

底物 Substrate	序列 Sequence(5'→3')
16 nt-ssDNA	CTCTGCTCGACGGATT-F
16 bp-dsDNA	CTCTGCTCGACGGATT-F AATCCTTCGAGCAGAG
G4-DNA	F-TGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG
dsDNA with 5' 26 nt tail	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATGTATGTCAAGGAAGG-F H-CCTTCCTTGACATACAT
G4-DNA with 5' 26 nt tail	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGAAAAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGATGTATGTCAAGG- AAGG-F H-CCTTCCTTGACATACAT

注:F. 荧光素;H. 六氯荧光素。
Note:F. Fluorescein;H. Hexachlorofluorescein.

1.2 方法

1.2.1 DePif1 表达载体的构建 将 SUMO 促溶标签编码序列(上、下游引物中均含 *Nde* I /*Eco*R I 酶切位点)及由 Biomatik 公司合成的全长 DePif1 解旋酶编码序列(上、下游均含 *Eco*R I /*Xho* I 酶切位点),分别用 *Nde* I /*Eco*R I 和 *Eco*R I /*Xho* I 双酶切后,连入 *Nde* I /*Xho* I 双酶切并回收的 pET15b 表达载体,将连接反应产物导入 *E. coli* 2984 菌株,扩增并鉴定,获得 pET15b-SUMO-De-Pif1 重组质粒。

1.2.2 DePif1 解旋酶在大肠杆菌中的表达纯化 用重组质粒 pET15b-SUMO-DePif1 转化 *E. coli* BL21(DE3)菌株,37 ℃、180 r/min 培养至 A₆₀₀ 约为 0.6,加入终浓度为 0.3 mmol/L 的 IPTG,于 28 ℃、

160 r/min 培养 6 h,收集菌体,按照 1(g):8(mL)的比例加入裂解缓冲液 Buffer A(50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0),300 mmol/L NaCl,10 mmol/L imidazole,体积分数 10% Glycerol)重悬,高压破碎,超声裂解打断 DNA 分子降低黏度。然后于 4 ℃、13 000 r/min 离心 30 min,在上清中加入等体积 4 mol/L 硫酸铵溶液,4 ℃搅拌 4 h,13 000 r/min 离心 20 min 收集沉淀。用适当体积 Buffer A 溶解沉淀,透析平衡后载入 Ni-NTA 亲和层析柱,利用 AKTA 蛋白纯化仪梯度洗脱获得 N 端融合有 His-tag 和 SUMO 标签的融合蛋白。按照 1:100 的质量比加入 SUMO 蛋白酶,然后于 4 ℃酶切 16 h 去除蛋白标签。酶切后的反应液载入 Heparin Sepharose Fast Flow 层析柱,再用 AKTA 蛋白纯化仪梯

度洗脱纯化。收集包含目标蛋白的组分载入 Ni-NTA 亲和层析柱,则残留的标签蛋白与亲和柱结合,去标签的 DePif1 存在于穿出液中。使用 10% SDS-PAGE 检测样品纯度,用 nano drop 测定蛋白浓度,样品超滤浓缩后-80℃冻存待用。

1.2.3 DePif1 的 DNA 结合能力检测 采用荧光各向异性(FA)方法对 DePif1 的 DNA 结合活性进行检测^[28-29]。荧光标记的核酸底物不与蛋白结合时,高度自由旋转,表现出低的荧光各向异性;而当其与蛋白结合时,形成的复合物转动性降低,各向异性值增加,因此荧光标记的核酸底物的各向异性变化能反映蛋白与底物的结合情况。测定在 Infinite F200 Pro 型多功能酶标仪(TECAN)上完成,150 μL 的反应体系中有 20 mmol/L MES,5 nmol/L 荧光标记 DNA 底物(分别为 16 nt-ssDNA、16 bp-ds-DNA、G4-DNA),2 mmol/L MgCl₂,2 mmol/L DTT,以及不同浓度的 DePif1 蛋白(0~120 nmol/L)。将反应体系 pH 分别设置为 4.0,5.0,6.0,7.0,8.0 和 9.0,反应体系中的 NaCl 浓度分别为 20,50,80,100,150 和 200 mmol/L,振荡混匀,37℃温育 5 min,然后测定各样品的荧光各向异性值,分析 pH 和 NaCl 浓度对 DePif1 与 G4-DNA 结合的影响,并比较 DePif1 与单链 DNA、双链 DNA 和 G4-DNA 的结合强度。

1.2.4 DePif1 的 DNA 解旋活性检测 采用基于荧光共振能量转移(FRET)的 stopped-flow 技术,对 DePif1 的 DNA 解旋活性进行测定^[30]。在这种方法中,DNA 底物两条链中一条链的 3'端标记有荧光素(F,供体),另一条链的 5'端标记有六氯荧光素(HF,受体)。当两条链结合在一起时,荧光素发射的荧光被六氯荧光素淬灭。而当双链 DNA 被解旋酶分开时,荧光素和六氯荧光素间的能量传递被打破,从而导致荧光素的荧光发射增强。因而 DNA 链的打开与否可通过荧光信号的变化来监测。

为了选择 DePif1 和 G4-DNA 底物在解旋缓冲液中孵育的适宜温度及缓冲液中 NaCl 的适宜浓度,特进行了筛选试验。(1)孵育温度的筛选。将 DePif1 和 G4-DNA 底物(G4-DNA with 5' 26 nt tail)分别置于 40 和 25℃解旋缓冲液中孵育 5 min,然后加入 1 mmol/L ATP 开启解链反应,通过监测激发荧光强度变化来分析解链过程,筛选适宜的孵育温度。

(2)NaCl 浓度的筛选。在筛选出的适宜温度下,将缓冲液中 NaCl 浓度设为 20 和 50 mmol/L,

测定 DePif1 对 G4-DNA 底物的解旋能力,筛选适宜的 NaCl 浓度。测定使用 Bio-logic SFM-400 混合器和 Bio-Logic MOS450/AF-CD 光学系统,反应池为 1.5 mm×1.5 mm 微量比色皿,反应缓冲液包含 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5),20 mmol/L NaCl,2 mmol/L MgCl₂,2 mmol/L DTT。DePif1 解旋酶(100 nmol/L)与双链 DNA 底物(dsDNA with 5' 26 nt tail,4 nmol/L)或 G4-DNA 底物(G4-DNA with 5' 26 nt tail,4 nmol/L)在注射器 3 中预先于 40℃孵育 5 min,ATP(终浓度 1 mmol/L)在注射器 4 中,将 2 个注射器中的样品快速混合后开始检测荧光强度变化,激发波长为 429 nm,发射波长为 525 nm。

2 结果与分析

2.1 DePif1 表达载体的构建

将 *Nde* I/*Eco*R I、*Eco*R I/*Xho* I 双酶切后的 SUMO 标签基因(309 bp)和 DePif1 编码基因(1 533 bp)连入 *Nde* I/*Xho* I 双酶切的 pET15b 表达载体,获得 pET15b-SUMO-DePif1 重组质粒。在目标蛋白 N-端分别融合有 His-tag 和 SUMO 标签,在 SUMO 标签和 DePif1 之间引入了 SUMO 蛋白酶切位点(图 1-A)。重组质粒先通过 PCR 和酶切进行鉴定,最后通过测序确证无误后用于后续试验。图 1-B 为重组质粒 pET15b-SUMO-DePif1 的 PCR 鉴定结果,扩增获得了约 1 800 bp 片段,其包含了 SUMO 和 DePif1 编码区,与预期大小一致。图 1-C 为重组质粒 pET15b-SUMO-DePif1 的 *Eco*R I/*Xho* I 双酶切结果,出现的大小约 1 500 bp 的片段为 DePif1 编码序列。

2.2 DePif1 解旋酶的表达纯化

将构建好的重组质粒 pET15b-SUMO-DePif1 导入大肠杆菌 BL21(DE3)进行诱导表达,然后依次通过 Ni-NAT 柱亲和纯化、SUMO 蛋白酶切除标签、Heparin Sepharose Fast Flow 及 Ni-NTA 柱层析去除 SUMO 蛋白酶和亲和标签等步骤,最终获得无标签的 DePif1。纯化过程中各样品的 SDS-PAGE 分析结果如图 2 所示。由图 2 可见,菌体裂解上清液(泳道 1)和 Ni-NAT 亲和纯化样品(泳道 2)中均出现 70 ku 大小的预期条带(DePif1 分子质量约为 60 ku,SUMO 标签约为 10 ku),SUMO 蛋白酶切后出现预期的 60 和 10 ku 2 条条带(泳道 3)。再经过 Heparin Sepharose Fast Flow 和 Ni-NTA 柱,获得纯度大于 95%的 DePif1 解旋酶,每升

菌液可获得 9 mg 重组 DePif1。

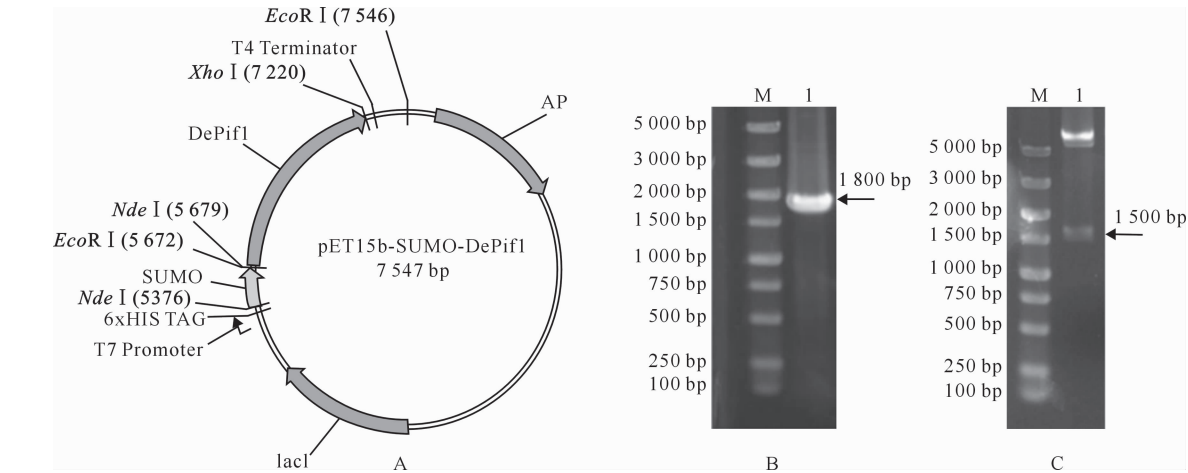


图 1 表达载体 pET15b-SUMO-DePif1 的构建与鉴定
A. 重组载体构建示意图;B. 重组质粒 PCR 鉴定;C. 重组质粒的双酶切鉴定;
M. DS TM 5000 DNA Marker;1. 重组质粒 pET15b-SUMO-DePif1

Fig. 1 Construction of expression vector pET15b-SUMO-DePif1

A. Schematic map of pET15b-SUMO-DePif1;B. Identification of the recombinant vector by PCR;

C. Double digestion of the pET15b-SUMO-DePif1 by *EcoR* I and *Xho* I ; M. DS TM 5000 DNA Marker;1. pET15b-SUMO-DePif1

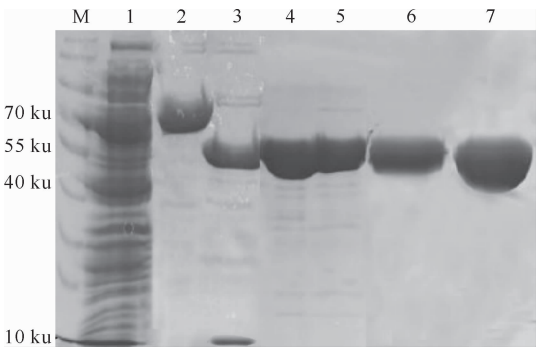


图 2 DePif1 蛋白的 SDS-PAGE 分析

M. Prestained protein ladder;1. 菌体裂解液上清; 2. 第 1 轮 Ni-NTA 纯化;3. SUMO 蛋白酶裂解; 4~5. Heparin 柱纯化; 6. 第 2 轮 Ni-NTA 纯化;7. 浓缩后样品

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of DePif1 protein

M. Prestained protein ladder;1. Supernatant of cell lysates; 2. Purified by first round Ni-NTA column;3. Cleaved by SUMO protease;4~5. Purified by Heparin column; 6. Purified by second round Ni-NTA column; 7. Concentrated DePif1

2.3 DePif1 解旋酶与 DNA 底物的结合活性

首先运用荧光各向异性方法分析 DePif1 与 G4-DNA 结合的最适 pH 和 NaCl 浓度。由图 3-A 可见,pH 为 6.0 时,不同浓度 DePif1 的各向异性值均明显高于其他 pH,因而最适 pH 为 6.0。由图 3-B 可见,当 DePif1 浓度为 20,50,100 nmol/L 时,DePif1 与 DNA 的结合活性在 NaCl 浓度为 20 或 50 mmol/L 时差别不大,但显著高于其他 NaCl

浓度处理,但由于 20 mmol/L 时 DePif1 与单链底物结合不稳定,因此选择 50 mmol/L NaCl 进行试验。根据米氏方程得到 DePif1 对单链底物(16 nt-ssDNA)、双链底物(16 bp-ds DNA)、G4 底物的 K_m 值分别为 3.02 ± 0.65 , 18.82 ± 1.70 和 2.71 ± 0.57 ,表明 DePif1 对不同底物的结合强度依次为 G4-DNA>单链 DNA>双链 DNA(图 3-C)。

2.4 DePif1 的 DNA 解旋活性

从图 4-A 可以看出,DePif1 在 40 ℃ 时的解旋效率明显优于 25 ℃。图 4-B 显示,在 20 mmol/L NaCl 作用下,DePif1 的解旋速度和幅度均高于 50 mmol/L NaCl。因此,将温度设为 40 ℃,NaCl 浓度设置为 20 mmol/L,分析 DePif1 对双链 DNA 底物(dsDNA with 5' 26 nt tail)和 G4-DNA 底物(G4-DNA with 5' 26 nt tail)的解旋能力,结果(图 4-C)显示,2 种底物均能被 DePif1 解旋,但解旋效率存在较明显的差异。利用双指数拟合方法求得 DePif1 对双链 DNA 底物的解旋参数为: $A_{fast} = 21.97\%$, $k_{fast} = 0.7246 \text{ s}^{-1}$, $A_{slow} = 27.72\%$, $k_{slow} = 0.2165 \text{ s}^{-1}$;对 G4-DNA 底物的解旋参数为: $A_{fast} = 79.54\%$, $k_{fast} = 0.5438 \text{ s}^{-1}$, $A_{slow} = 12.07\%$, $k_{slow} = 0.0996 \text{ s}^{-1}$;A 代表解旋幅度,fast、slow 分别指解旋过程中的快反应和慢反应步骤, k 指速率常数。因此,DePif1 对 G4-DNA 的解旋活性高于双链 DNA。

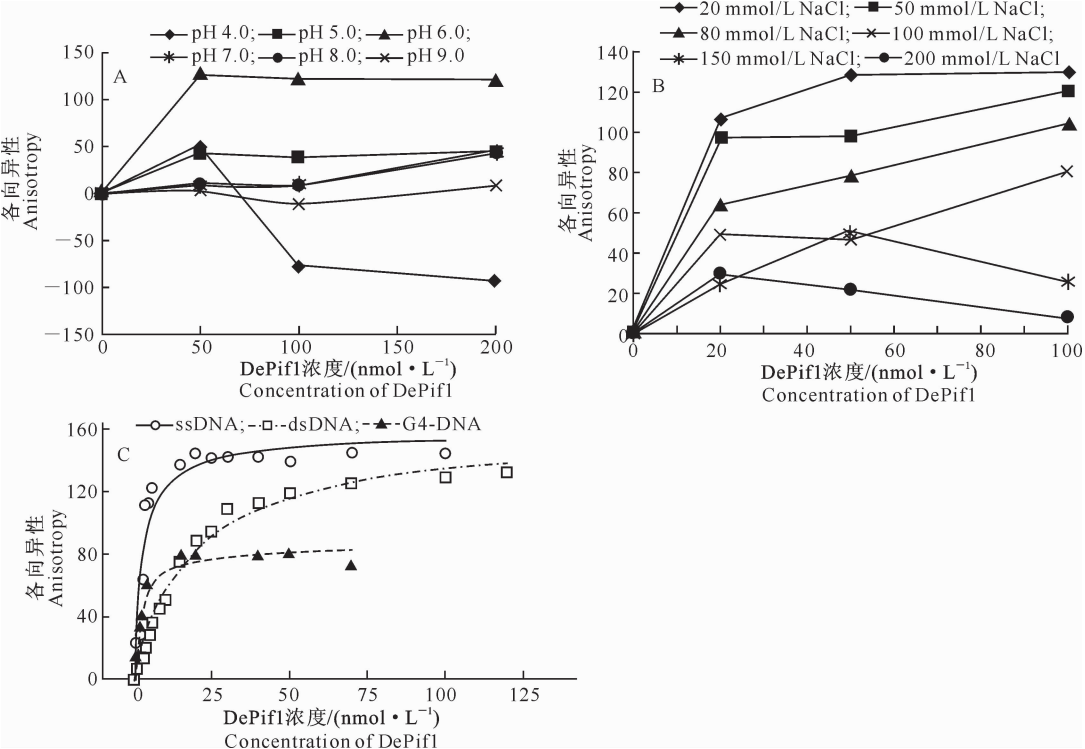


图 3 DePif1 与 DNA 底物结合的条件与强度

A. pH 对 DePif1 与 G4-DNA 结合的影响;B. NaCl 浓度对 DePif1 与 G4-DNA 结合的影响;C. DePif1 与不同底物结合强度的比较

Fig. 3 Binding conditions and strengths of DePif1 with DNA substrates

A. Effects of pH on binding of DePif1 with G4-DNA;B. Effects of NaCl concentration on binding of DePif1 with G4-DNA;
C. Comparison of binding strengths of DePif1 with different substrates

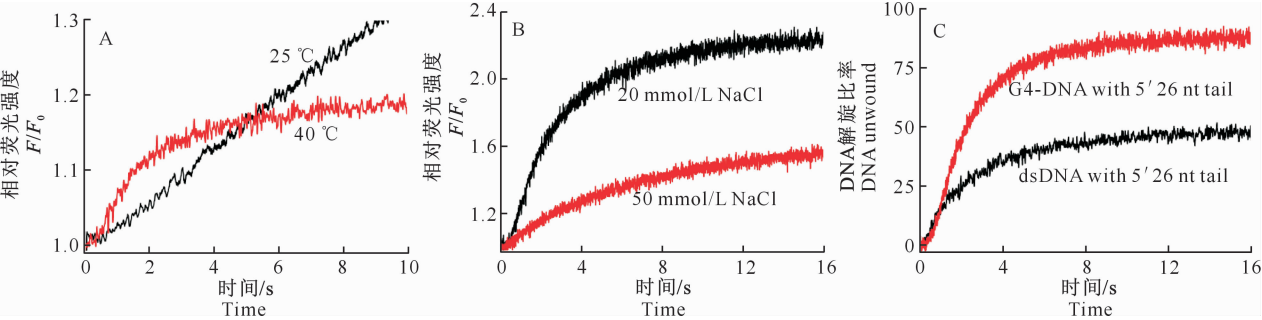


图 4 DePif1 DNA 解旋活性的 FRET 分析

A. 温度对 DePif1 解旋活性的影响;B. NaCl 浓度对 DePif1 解旋活性的影响;C. DePif1 对 G4-DNA 和双链 DNA 底物的解旋活性比较; F_0 为底物自身荧光强度, F 为加入 DePif1 后的实时荧光强度

Fig. 4 DNA unwinding activity of DePif1 by FRET

A. Effects of temperature on unwinding activity of DePif1;B. Effects of NaCl concentration on the unwinding activity of DePif1;
C. Comparison of unwinding activities of DePif1 to G4-DNA and duplex DNA; F and F_0 . The fluorescence intensities of DNA substrates in the presence and absence of DePif1, respectively

3 讨 论

Pif1 家族成员具有依赖 ATP 的 5'→3'解旋活性,其可影响端粒、rDNA 及线粒体 DNA 的复制,参与冈崎片段加工,在维持染色体和线粒体 DNA 稳定性方面发挥重要功能^[6]。本研究建立了一种嗜热

脱铁去硫弧菌 (*Deferribacter desulfuricans*) Pif1 解旋酶(DePif1)的表达纯化流程,利用该流程每升菌液可获得 9 mg 纯度大于 95%且具有生物活性的 DePif1 蛋白,这为后期 DePif1 解旋酶晶体的获得奠定了基础。为了使目标蛋白在大肠杆菌中更好地表达,本研究对 DePif1 的编码序列分析后,利用人工

合成的方法,在不影响蛋白序列的前提下对 DePif1 的编码序列进行了修饰,优化了序列中的部分密码子,并通过序列优化降低了其转录产物的复杂二级结构对表达的不利影响。在表达过程中,目标蛋白 N-端融合了 His-tag 和 SUMO 促溶标签,SUMO 标签可以增加融合蛋白的可溶性,而 His-tag 便于融合蛋白的纯化,以及 SUMO 蛋白酶切后 SUMO 标签的去除。纯化过程中还引入了硫酸铵沉淀、复溶步骤,这有利于核酸、酯类等杂质的去除,避免对后续结合和解旋试验产生影响。

荧光各向异性(FA)是一种快速、灵敏的监测分子运动及其影响因素的方法,监测浓度可低至“nmol/L”级别^[28-29]。本研究采用荧光各向异性法,确定了 DePif1 与 G4-DNA 底物结合的最适 pH 为 6.0,最适 NaCl 浓度为 20 mmol/L。但 NaCl 浓度为 20 mmol/L 时,DePif1 与单链 DNA 结合不稳定。NaCl 浓度为 50 mmol/L 时,DePif1 对不同底物的结合强度顺序为 G4-DNA > 单链 DNA > 双链 DNA。相较于传统的 EMSA 方法,基于荧光共振能量转移(FRET)的 stopped-flow 检测技术,能够在低浓度核酸条件下实时监测蛋白与核酸的反应过程。本研究采用此方法,对 DePif1 的解链活性进行了分析,结果表明在 ATP 和 5'-单链存在的条件下,DePif1 能有效解旋双链 DNA 和 G4 结构,且解旋 G4 结构的能力高于双链 DNA。此外,DePif1 在 40 ℃时的解链活性高于 25 ℃,这与其来自嗜热菌的实际相符。综上所述,DePif1 结合和解旋 G4-DNA 的能力高于其他底物,而 DePif1 本身又是易结晶的嗜热菌蛋白,因而适用于解旋酶/G4-DNA 共结晶研究。

[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, 1994, 16(1): 13-22.
- [2] 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.
- [3] Gray M D, Shen J C, Kamath-Loeb A S, et al. The Werner syndrome protein is a DNA helicase [J]. Nature Genetics, 1997, 17(1): 100-103.
- [4] Caruthers J M, McKay D B. Helicase structure and mechanism [J]. Current Opinion in Structural Biology, 2002, 12(1): 123-133.
- [5] Bessler J B, Zakian V A. The Pif1p subfamily of helicases; Region-specific DNA helicases [J]. Trends in Cell Biology, 2001, 11(2): 60-65.
- [6] Bochman M L, Sabouri N, Zakian V A. Unwinding the functions of the Pif1 family helicases [J]. DNA Repair, 2010, 9(3): 237-249.
- [7] Foury F, Kolodnynski 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, 1983, 80(17): 5345-5349.
- [8] Zhou J Q, Monson E, Teng S C, et al. Pif1p helicase, a catalytic inhibitor of telomerase in yeast [J]. Science, 2000, 289(5480): 771-774.
- [9] Boulé J B, Zakian V A. The yeast Pif1p DNA helicase preferentially unwinds RNA-DNA substrates [J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(17): 5809-5818.
- [10] Ribeyre C, Lopes J, Boulé J B, et al. The yeast Pif1 helicase prevents genomic instability caused by G-quadruplex-forming CEB1 sequences *in vivo* [J]. PLoS Genetics, 2009, 5(5): e1000475.
- [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 δ [J]. Molecular and Cellular Biology, 2006, 26(7): 2490-2500.
- [12] Schulz V P, Zakian V A. The *Saccharomyces* PIF1 DNA helicase inhibits telomere elongation and de novo telomere formation [J]. Cell, 1994, 76(1): 145-155.
- [13] 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.
- [14] Keil R L, McWilliams A D. A gene with specific and global effects on recombination of sequences from tandemly repeated genes in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Genetics, 1993, 135(3): 711-718.
- [15] 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.
- [16] 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]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(47): 45331-45337.
- [17] 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.
- [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] 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.

- [20] George T, Wen Q, Griffiths R, et al. Human Pif1 helicase unwinds synthetic DNA structures resembling stalled DNA replication forks [J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(19): 6491-6502.
- [21] Sanders C. Human Pif1 helicase is a G-quadruplex DNA-binding protein with G-quadruplex DNA-unwinding activity [J]. *Biochem J*, 2010, 430:119-128.
- [22] Snow B E, Mateyak M, Paderova J, et al. Murine Pif1 interacts with telomerase and is dispensable for telomere function *in vivo* [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2007, 27(3): 1017-1026.
- [23] Rawal P, Kummarasetti V B R, Ravindran J, et al. Genome-wide prediction of G4 DNA as regulatory motifs: Role in *Escherichia coli* global regulation [J]. *Genome Research*, 2006, 16(5): 644-655.
- [24] Johnson J E, Smith J S, Kozak M L, et al. *In vivo* veritas: Using yeast to probe the biological functions of G-quadruplexes [J]. *Biochimie*, 2008, 90(8): 1250-1263.
- [25] 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(11): 1695-1696.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] Dou S X, Wang P Y, Xu H Q, et al. The DNA binding properties of the *Escherichia coli* RecQ helicase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(8): 6354-6363.
- [29] Xi X G, Deprez E. Monitoring helicase-catalyzed DNA unwinding by fluorescence anisotropy and fluorescence cross-correlation spectroscopy [J]. *Methods*, 2010, 51(3): 289-294.
- [30] Zhang X D, Dou S X, Xie P, et al. RecQ helicase-catalyzed DNA unwinding detected by fluorescence resonance energy transfer [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2005, 37(9): 593-600.

(上接第 161 页)

- [18] 周春生, 尹 军. TTC-脱氢酶活性检测方法的研究 [J]. *环境科学学报*, 1996, 16(4): 400-405.
Zhou C S, Yin J. A method for measurement of TTC-dehydrogenase activity [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 1996, 16(4): 400-405. (in Chinese)
- [19] 齐鲁青, 汪晓军, 詹德明. 优化 TTC-脱氢酶还原法测定陶粒负载微生物活性 [J]. *现代化工*, 2012, 32(3): 93-96.
Qi L Q, Wang X J, Zhan D M. Study on determination of bio-film activity in BAF by TTC-dehydrogenase assay [J]. *Modern Chemical Industry*, 2012, 32(3): 93-96. (in Chinese)
- [20] 周 恢, 左永生, 赵怀颖, 等. MBR 中污泥脱氢酶活性测定方法的改进 [J]. *中国环保产业*, 2006(12): 31-33.
Zhou H, Zuo Y S, Zhao H Y, et al. Improvement of determination on sludge dehydrogenase activity in MBR [J]. *China Environmental Protection Industry*, 2006(12): 31-33. (in Chinese)
- [21] 黄春花, 郑壮丽, 梅彩英, 等. 蝇虫草 TTC-脱氢酶测定方法的优化 [J]. *环境昆虫学报*, 2011, 33(3): 321-328.
Huang C H, Zheng Z L, Mei C Y, et al. The optimization of TTC-dehydrogenase assay in *Cordyceps militaris* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2011, 33(3): 321-328. (in Chinese)

(上接第 168 页)

- [52] Bondy G, Mehta R, Caldwell D, et al. Effects of long term exposure to the mycotoxin fumonisin B₁ in p53 heterozygous and p53 homozygous transgenic mice [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50(10): 3604-3613.
- [53] 张岳平. 镰刀菌真菌毒素产生与调控机制研究进展 [J]. *生命科学*, 2011(3): 311-316.
Zhang Y P. The research advance of biosynthesis and regulation mechanism on *Fusarium mycotoxins* [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2011(3): 311-316. (in Chinese)
- [54] Lanubile A, Bernardi J, Marocco A, et al. Differential activation of defense genes and enzymes in maize genotypes with contrasting levels of resistance to *Fusarium verticillioides* [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2012, 78: 39-46.
- [55] 徐 瑾, 伍松陵, 常晓娇, 等. 伏马毒素生物合成和降解的研究进展 [J]. *中国粮油学报*, 2013(7): 119-123.
Xu J, Wu S L, Chang X J, et al. The research progress of fusarium toxin biosynthesis and degradation [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2013(7): 119-123. (in Chinese)
- [56] 叶火春, 赖先文, 王艳丽, 等. 1 株抑制镰刀菌生长及产生伏马菌素链霉菌的分离和鉴定 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2013, 41(7): 150-156.
Ye H C, Lai X W, Wang Y L, et al. Isolation and identification of a *Streptomyces* strain capable of inhibiting growth and fumonisin production of mycotoxigenic *Fusarium species* [J]. *Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition*, 2013, 41(7): 150-156. (in Chinese)