

嗜热厌氧杆菌 *Ana. Pif1* 解旋酶核心结构域蛋白与 DNA 底物结合的反应特性*

段晓雷^{1,2}, 许欢¹, 姚森¹, 曾洁¹, 申丽¹, 刘娜女², 张涛^{1**}, 肖代敏^{1**}

(1. 遵义医学院 检验医学院, 贵州 遵义 563000; 2. 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 目的: 探究嗜热厌氧杆菌的 *Ana. Pif1* 解旋酶核心结构域蛋白 (*Ana. Pif1*-HD) 与 DNA 底物结合的反应特性。方法: 利用 DNAMAN、ClustalX 等软件, 对 *Ana. Pif1* 的核心结构域蛋白进行系统进化树分析与同源序列比对; *Ana. Pif1*-HD 表达载体构建后转入大肠杆菌进行原核表达, 并通过 Ni-NTA、SUMO 酶切、S200 分子筛等层析柱纯化获得 *Ana. Pif1*-HD 蛋白; 利用 Stopped-flow FRET 技术监测 *Ana. Pif1*-HD 蛋白的解旋活性, 利用荧光偏振检测技术分析 *Ana. Pif1*-HD 与不同长度、不同结构 DNA 底物的结合反应各向异性值, 并进行拟合分析与统计。结果: *Ana. Pif1* 的核心结构域蛋白为靠近 N-端的 448 氨基酸, 通过原核表达与纯化获得纯度为 97%、浓度为 5 g/L 的 *Ana. Pif1*-HD 蛋白, 并利用 Stopped-flow FRET 与荧光偏振等技术验证其具有 *Ana. Pif1* 全长蛋白 90% 的解旋活性与 95% 的结合活性; *Ana. Pif1*-HD 的最佳结合反应条件是 42 °C 在 pH 6.0 含 20 mmol/L NaCl 及 3 mmol/L MgCl₂ 的溶液中进行; *Ana. Pif1*-HD 与不同长度 ssDNA 底物结合时的解离速率常数递增, 并明确其 ss-DNA 的 binding-size 为 10.34 nt; 研究首次揭示 *Ana. Pif1*-HD 与不同复制中间体 DNA 结合反应的底物特异性 ss-G4 DNA > G4 DNA > 3'-ssDNA-dsDNA ≈ Y-型 > 其它底物。结论: 成功表达纯化具有全长活性的 *Ana. Pif1* 解旋酶核心结构域蛋白, 首次揭示该解旋酶核心蛋白与各类不同 DNA 底物的结合反应特性。

[关键词] *Pif1* 解旋酶; 嗜热厌氧杆菌; 荧光偏振技术; 结合反应

[中图分类号] R34-33; Q71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)11-1269-10

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.11.006

Characteristic Analysis of Binding Reactions of *Anaerobaculum Hydrogeniforman Pif1* Helicase's Core Domain

DUAN Xiaolei^{1,2}, XU Huan¹, YAO Miao¹, ZENG Jie¹, SHEN Li¹, LIU Nan², ZHANG Tao¹, XIAO Daimin¹

(1. School of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou, China;

2. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the characteristics of binding reactions of *Anaerobaculum hydrogeniforman Pif1* helicase's core domain (*Ana. Pif1*-HD). **Methods:** The conserved *Ana. Pif1*-HD was analyzed through homology sequence alignment and phylogenetic tree by bioinformatics software DNAMAN and ClustalX. The constructed *Ana. Pif1*-HD was inducible expressed in *E. coli*, and purified through Ni-NTA, SUMO protease cleaved, Superdex 200 gel filtration chromatography. Stopped-flow FRET was used to detect the unwinding activity of *Ana. Pif1*-HD, and the characteristics of such helicase binding reactions were mainly measured by fluorescence polarization technique. **Result:** The *Ana. Pif1*-HD protein was confirmed as 448aa in the N-terminal region. By inducible expression and

*[基金项目] 国家自然科学基金项目(31660241); 贵州省科技合作基础研究项目[黔科合基础(2018)1196]; 遵义医学院博士科研启动资金[院字(2017)05号]

** 通信作者 E-mail: zhang760@hotmail.com; 372422022@qq.com

网络出版时间: 2018-11-15 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20181115.2127.018.html>

purification, *Ana. Pif1*-HD protein with 97% purity and 5 mg/mL concentration was obtained, and this purified product was confirmed with above 90% unwinding activity and 95% binding activity. The optimum binding conditions of *Ana. Pif1*-HD were pH = 6.0 PBS buffer contains 20 mmol/L NaCl and 3 mmol/L MgCl₂ under 42 °C. Our research showed the dissociation rate constant (*K_d*) gradually increased with the increase in length of ssDNA, and the binding-size of *Ana. Pif1*-HD with ssDNA was 10.34 nt. Furthermore, the DNA-binding substrates specificity of *Ana. Pif1*-HD was revealed that ss-G4 DNA > G4 DNA > 3'-ssDNA-dsDNA ≈ Y-structure > Other substrates. **Conclusions:** The *Ana. Pif1*-HD with *Ana. Pif1*-full protein's activity is successfully purified, and this research systematically analyzes the binding characteristics of the *Ana. Pif1* helicase for the first time. It is helpful in providing good experimental base for the further elucidation of the molecular mechanism of thermophiles' helicases.

[**Key words**] *Pif1* helicase; *Anaerobaculum hydrogeniforma*; fluorescence polarization method; binding reaction

解旋酶作为细胞内专一解旋核酸链间氢键的分子马达蛋白,参与了 DNA 复制、重组、修复、转录等维持染色体稳定性的众多遗传与 DNA 代谢过程^[1-3],*Pif1* 解旋酶是其中一类广泛存在于各类生物中的 5'-3'方向解旋酶^[4],属于解旋酶超家族 I (SF I),具有高度保守 *Pif1* 结构域(300 ~ 500 氨基酸残基组成)^[5]。有关芽殖酵母 *Pif1* (*Sc. Pif1*) 与人类 *Pif1* (*hPif1*) 的研究揭示,*Pif1* 解旋酶家族成员拥有一些共同的生物学活性,即维持基因组与线粒体 DNA 稳定性^[6]、参与染色体断裂修复^[7]、有效结合与解旋复制中间体过程中的 G4 DNA 结构^[8-9]等。近年来,科技的创新加速了人们对不同来源 *Pif1* 解旋酶的认知与功能探究^[10-12],有关 *Pif1* 功能特点与作用机理研究已经从真核生物 *Pif1* 拓展到多种原核生物 *Pif1* 解旋酶^[13-15]。但迄今为止,有关嗜热细菌类 *Pif1* 解旋酶反应分子特性的研究仍然鲜有报道^[16-17]。*Ana. Pif1* 蛋白是一种新近被鉴定出的嗜热厌氧杆菌 *Anaerobaculum hydrogeniformans*^[18] 中的 *Pif1* 解旋酶,该嗜热细菌生长在高温环境(>55 °C)且异常复杂(分离自石油层中),导致其基因组 GC 含量偏高,易产生多种特异 DNA 结构;因此对 *Ana. Pif1* 解旋酶的生物学活性分子特征进行研究,有助于揭示此类嗜热细菌在高温特异环境中维持基因组稳定性的内在分子机制。本课题组前期研究已成功获得 *Ana. Pif1* 的全长基因序列,并对其异源表达纯化条件的优化、最佳能量供体、解旋反应分子特征动力学参数等进行了报道^[16],目前还缺乏对该解旋酶核心结构域的分析与相关结合反应分子特性的研究。因此,本研究针对上述科学问题,首次探究 *Ana. Pif1* 解旋酶的保守核心结构域蛋白(*Ana. Pif1*-HD)与不同类

型 DNA 底物发生结合反应的分子特性,以期拓展人们对 *Ana. Pif1* 解旋酶功能结构区域与作用机制的认知。

1 材料与方法

1.1 材料




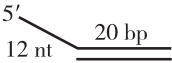
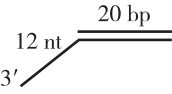
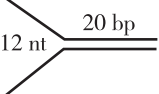
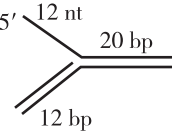
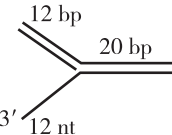
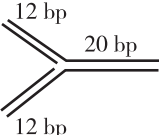
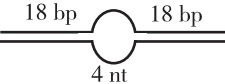
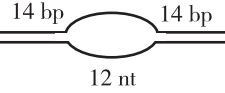
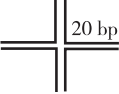
1.1.1 引物、质粒与菌株 *Ana. Pif1* 解旋酶的开放阅读框(ORF)序列由美国 Biomatik 公司合成。*Ana. Pif1*-HD 进行 PCR 扩增的引物 F:5'-CCCATA TGTCTAAATCGAACTG-3',引物 R:5'-CGCGAAT-TCGATTTTGTCTGCCAGAGAG-3',由上海生工公司合成。重组表达载体 pET15b-SUMO-以及表达菌株 BL21(*DE3*)等为本课题组保存。

1.1.2 工具酶与主要试剂 高保真酶 PrimeSTAR Max DNA Polymerase、T4 DNA ligase,限制性内切酶 *Nde* I、*Bam* H I、*Xho* I 等均购自 TAKARA 公司;SUMO 蛋白酶由本实验室自行纯化。Ni-NTA、Superdex 200 HR、Heparin-Sepharose FF 等纯化层析柱均购自美国 GE 公司。所有缓冲液均使用超纯水配制。

1.1.3 DNA 底物 分别标记荧光素基团(fluorescein, F)和六氯荧光素基团(hexachlorofluorescein, HF)的 DNA 底物用于快速停留-荧光共振能量转移检测(Stopped-flow FRET);只标记荧光素基团(F)的 DNA 底物用于荧光偏振检测,均由上海生工公司合成,其序列信息见表 1。G4 DNA 及双链底物溶解于缓冲液[20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 100 mmol/L KCl]中以适当比例混匀,95 °C 以上水浴 5 min 后再冷却至室温, -20 °C 保存备用;并由圆二色光谱技术检测 G4 DNA 是否折叠出正确构象。

表 1 在结合反应与解旋反应中使用的 DNA 底物

Tab. 1 DNA substrates used in DNA unwinding or binding assay

Name	Structure	Sequence
S12(12 nt ssDNA)	<u>12 nt</u>	CTGCCGTCGCCA-F
S24(24 nt ssDNA)	<u>24 nt</u>	GCCCTGGTGCCGACAACGAAGGTA-F
S36(36 nt ssDNA)	<u>36 nt</u>	CTCACACTGGCCGTCTTACGGTCGCTCTGCTCGACG-F
D18(18 bp dsDNA)	<u><u>20 bp</u></u>	CATACTCGCTGCCGTCGC-F GCGACGGCAGCGAGTATG
5'-G4(5'-10 nt -G4)		F-GGAAGGAACTGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG
3'-G4(3'-10 nt -G4)		^a GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTCAAGGAAGG-F
G4(Only G4)		F-TGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG
5'-Oh _{S12D20} (5'-12 nt -20 bp)		CACTGGCCGTCTTACGGTCGCTCTGCTCGACG-F HF ^b -CGTCGAGCAGAGCGACCGTA
3'-Oh _{S12D20} (3'-12 nt -20 bp)		CACTGGCCGTCTTACGGTCGCTCTGCTCGACG-F HF ^b -CGACCGTAAGACGGCCAGTG
Y-S(Y-structure)		CGTCGAGCAGAGCGACCGTATTATTTTTTTTT CTCTGGCCGTCTTACGGTCGCTCTGCTCGACG-F
5'- Fork(5'-Flap dsDNA)		CGTCGAGCAGAGCGACCGTATTATTTTTTTTT CACTGGCCGTCTTACGGTCGCTCTGCTCGACG-F AGACGGCCAGTG
3'- Fork(3'-Flap dsDNA)		AAAAAAAAAATAA CGTCGAGCAGAGCGACCGTATTATTTTTTTTT CACTGGCCGTCTTACGGTCGCTCTGCTCGACG-F
TWJ(Three-Way-Junction)		AAAAAAAAAATAA CGTCGAGCAGAGCGACCGTATTATTTTTTTTT CTCTGGCCGTCTTACGGTCGCTCTGCTCGACG-F AGACGGCCAGTG
BS4(Bubble-4 nt)		GCAGTAGGCCTAGCATGAGTTAGGACTGACAGCTGCATGG CCATGCAGCTGTCAGTCCATTGTCATGCTAGGCCTACTGC-F
BS12(Bubble-12 nt)		GCAGTAGGCCTAGCTACTGTTACCTGTGACAGCTGCATGG CCATGCAGCTGTCAGTCCATTGTCATGCTAGGCCTACTGC-F ACGTGGGCAAAGGTTCTGTAATGGACTGACAGCTGCATGG
HJ(Holiday Junction)		CCGTGATCACCAATGCACATTGACGAACCTTTGCCACGT CCATGCAGCTGTCAGTCCATTGTCATGCTAGGCCTACTGC-F GCAGTAGGCCTAGCATGACAATCTGCATTGCTGATCACGG

注:F 为荧光素, HF 为六氯荧光素, ^a 标记的是形成 G4 结构的 DNA 序列(G4 部分已标下划线及加粗), ^b 标记的底物是既参与解旋反应测试(HF 与 F 双荧光标记) 又参与结合反应测试(F 单荧光标记) 的 DNA 序列

1.2 方法

1.2.1 *Ana. Pifl* 蛋白核心结构域的获取 使用 ClustalX 对 *Bs. Pifl* 的开放阅读框 (ORF) 序列 (Genebank: WP008647876.1)、*Ana. Pifl* 的 ORF 序列 (Genebank: CP003198.1)、*Defe. Pifl* 的 ORF 序列 (Genebank: AP011529.1) 及 *Therm-yellow. Pifl* 的 ORF 序列 (Genebank: WP012546127.1) 进行多重序列比对, 并利用 MAGE4.0 软件构建系统进化树以确定进化关系远近及基因序列保守性。进一步使用 DNAMAN 软件对这些细菌 *Pifl* 蛋白的氨基酸序列进行同源序列分析, 从而获得 *Ana. Pifl* 蛋白核心结构域信息, 并设计特异性 PCR 引物。

1.2.2 *Ana. Pifl*-HD 表达载体的构建 以 *Ana. Pifl* 的 ORF 序列 (Genebank: CP003198.1) 为 PCR 模板, 利用新设计 PCR 引物, 在 PrimeSTAR Max DNA Polymerase 说明书指导下进行核心结构域的序列扩增, PCR 产物与 pET15b-SUMO-表达载体均由 *Nde* I/ *Eco* R I 双酶切, 再利用 T4 ligase 连接过夜, 转化后获得 pET15b-SUMO-*Ana. Pifl*-HD 重组质粒。

1.2.3 *Ana. Pifl*-HD 蛋白的异源诱导表达与纯化 将鉴定成功的重组表达载体 pET15b-SUMO-*Ana. Pifl*-HD 转化到表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3) 中, 经 0.3 mmol/L IPTG 在 22 °C、160 r/min 条件下诱导表达 14 h。重组蛋白的表达纯化过程主要参考本课题组之前发表相关论文^[16], 改进之处如下: 第 1 次 Ni-NTA 纯化后, 使用 SUMO 蛋白酶去除 SUMO-Tag 及 N-端的 His-tag 序列; 并增加 Supdex 200 凝胶过滤层析以进一步除杂蛋白和小分子的杂质。最终纯化产物以 10% SDS-PAGE (W/V) 和 NanoDrop2000 超微分光光度计分别检测蛋白纯度和浓度, 再经超滤浓缩, 加甘油至终浓度 25%, -80 °C 冻存备用。

1.2.4 *Ana. Pifl*-HD 解旋活性的验证 利用 Stopped-flow-FRET 技术^[8,13], 参照本实验室先前摸索的 *Ana. Pifl* 全长蛋白的最佳解旋条件^[16], 分别监测 *Ana. Pifl*-full (课题组自行纯化) 与 *Ana. Pifl*-HD 的解旋特征曲线。

1.2.5 基于荧光偏振检测分析 *Ana. Pifl* 与不同 DNA 底物的结合反应 利用荧光偏振原理, 监测 *Ana. Pifl* 解旋酶与多种单荧光标记 DNA 底物发生结合反应的荧光各向异性 (Anisotropy) 变化^[8,17]。本研究中首先证实 *Ana. Pifl*-N-Short、*Ana. Pifl*-HD 与 *Ana. Pifl*-full 3 种蛋白的结合活性差异: 在 *Pifl*

解旋酶的常规反应条件^[13-14] 测试其各向异性值, 再比较 3 者平衡解离常数 (equilibrium dissociation constant, *Kd*) 的差异性。利用 TECAN 公司 Infinite F200Pro 型多功能酶标仪监测明确 *Ana. Pifl*-HD 蛋白的最佳结合反应条件, 依次探索缓冲溶液 pH 值、结合反应孵育温度、NaCl 浓度、MgCl₂ 浓度等关键参数。在平衡状态, 利用该荧光偏振多功能酶标仪监测 *Ana. Pifl*-HD 蛋白与 5 nmol/L 不同 DNA 发生结合反应后 (温浴 5 min) 的各向异性值。所有 Binding 测试均为独立试验 3 ~ 4 次以上。不同 DNA 底物与 *Ana. Pifl*-HD 蛋白发生结合反应的 *Kd* 值根据方程 (1) 拟合计算获得^[8,14]。

$$A = A_{\min} + (A_{\max} - A_{\min}) \frac{\Delta - \sqrt{\Delta^2 - 4N[ST][ET]}}{2N[ST]}$$

注: 在公式中, *A* 表示给定酶浓度下的荧光各向异性值, *A*_{max} 为在饱和状态荧光各向异性值, *A*_{min} 是初始状态荧光各向异性值, $\Delta = N[ST] + [ET] + Kd$ DNA (其中 *N* 是化学计量比, [ST] 为 DNA 底物浓度, [ET] 为蛋白浓度)。

1.3 统计学分析

结合反应监测中各次实验均独立测试 3 次以上, 取均值; 并利用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行单因素方差分析, *P* < 0.05 时为差异有统计学意义。

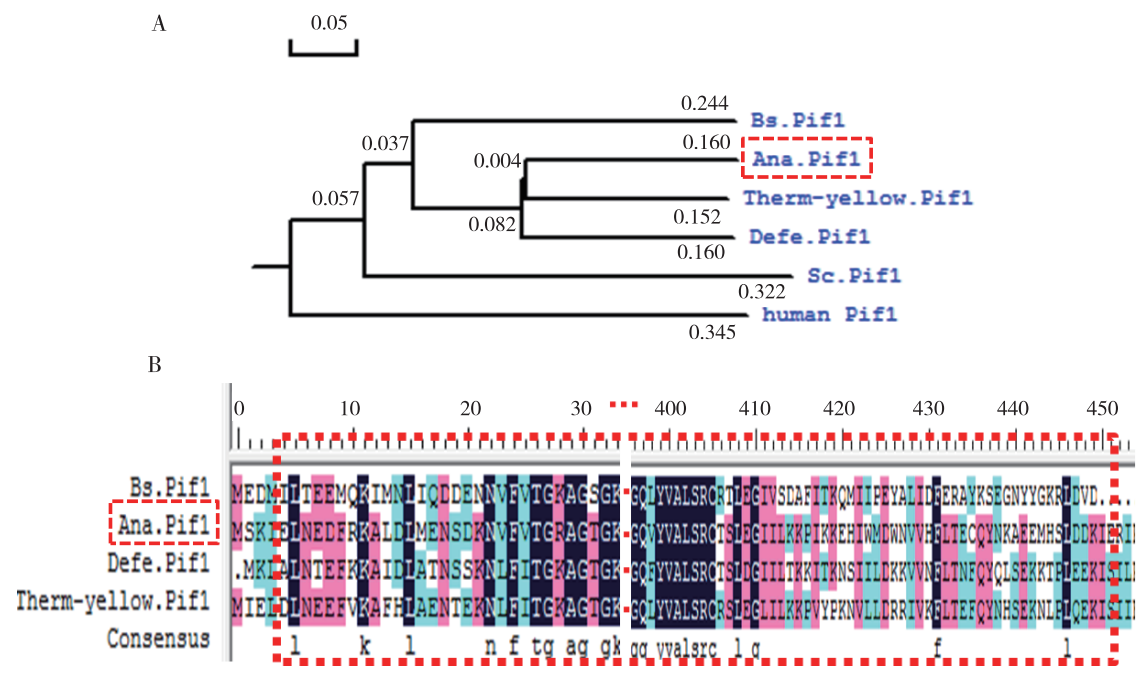
2 结果

2.1 *Ana. Pifl* 核心结构域分析

对来自不同物种的 *Pifl* 解旋酶的核酸序列进行多重序列比对, 并用邻近法构建系统进化树。结果如图 1A 所示, *Ana. Pifl* 与同属嗜热细菌的 *Therm-yellow. Pifl*、*Defe. Pifl* 的关系最近, 与普通细菌 *Bs. Pifl* 亲缘也较近, 提示这几种原核生物 *Pifl* 解旋酶应具有更为保守的核心结构域序列; 这 4 种 *Pifl* 蛋白的全长氨基酸序列进行同源序列比对, 结果显示它们的解旋酶核心结构域相似度较高 (图 1B)——对应的 *Ana. Pifl* 核心结构域 (*Ana. Pifl* helicase domain, *Ana. Pifl*-HD) 处于 N-端的 448 氨基酸区域。

2.2 *Ana. Pifl* 核心结构域蛋白表达载体的构建与纯化

Ana. Pifl-HD 的重组表达质粒图谱如图 2A 所示, 表达产物 N-端融合 SUMO 标签 (促溶作用) 和组氨酸标签序列, 易于蛋白纯化。菌落 PCR 和 *Bam*H I/ *Xho* I 双酶切进行双重鉴定, 结果如图 2B



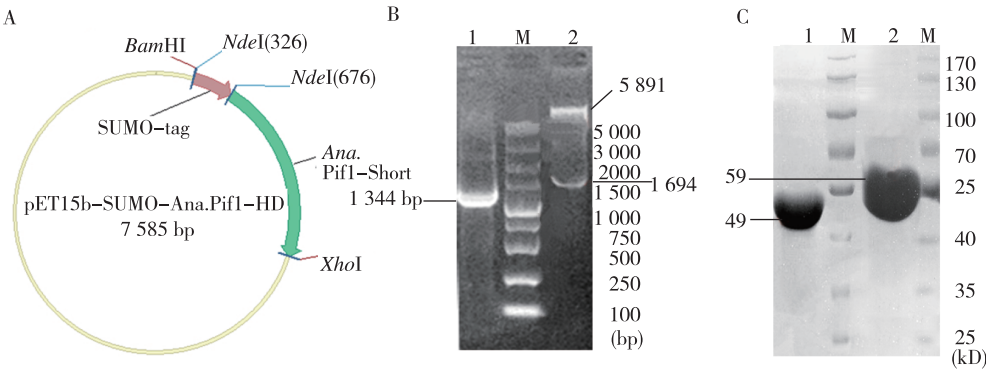
注:A 为 *Ana. Pif1* (红虚线框内) 与多个物种 *Pif1* 解旋酶基因序列利用 N-J 法构建的系统进化树,其中树枝上的数字为遗传变异系数;B 为 *Ana. Pif1* (红虚线框内) 与 *Bs. Pif1*、*Defe. Pif1* 及 *Therm-yellow. Pif1* 的氨基酸序列进行的同源序列图,比对氨基酸的阴影,黑色为完全一致,粉色为同性氨基酸,蓝色为 4 条氨基酸序列至少 2 个以上完全一致,红色点虚线框内显示出 *Ana. Pif1* 与这些同源 *Pif1* 解旋酶的核心保守区域

图 1 *Ana. Pif1* 的系统进化树与同源序列比对结果

Fig. 1 The phylogenetic tree and homologous sequence alignment of *Ana. Pif1*.

所示,PCR 产物为 1 344 bp, SUMO + *Ana. Pif1*-HD 重组片段的酶切产物为 1 694 bp,分子量符合预期,并通过测序确认。*Ana. Pif1*-HD 重组蛋白诱导表达后,经过 2 次 Ni-NTA 亲和层析及 SUMO 蛋白酶切 N-端促溶标签、凝胶过滤层析等一系列纯化,

最终纯化产物经 SDS-PAGE 及凝胶扫描分析,结果如图 2C 所示,获得无标签的、纯度超过 97 %、分子量约为 49 kD 的 *Ana. Pif1*-HD,测其蛋白浓度为 5 g/L;计算其发酵 1 L 产量为 10 mg 目的蛋白。*Ana. Pif1* 全长蛋白(*Ana. Pif1*-full, 59 kD)与 *Ana. Pif1*-



注:A 为重组载体 *pET15b-Ana. Pif1-HD-SUMO* 的质粒图谱,B 为该重组载体 PCR 鉴定与质粒双酶切鉴定的琼脂糖凝胶电泳图,泳道 1 为菌落 PCR 产物、泳道 2 为质粒由 *Xho I* 与 *BamH I* 双酶切的鉴定产物、M 泳道为 DS5000 的 DNA ladder,C 为 *Ana. Pif1* 蛋白的最终纯化产物的 SDS-PAGE 电泳图,泳道 1 为 *Ana. Pif1*-HD 纯化终产物(49 kD)、泳道 2 为 *Ana. Pif1*-full 纯化终产物(59 kD)、M 泳道为预染蛋白 marker

图 2 *Ana. Pif1*-HD 表达载体构建与重组蛋白纯化后的 SDS-PAGE 结果

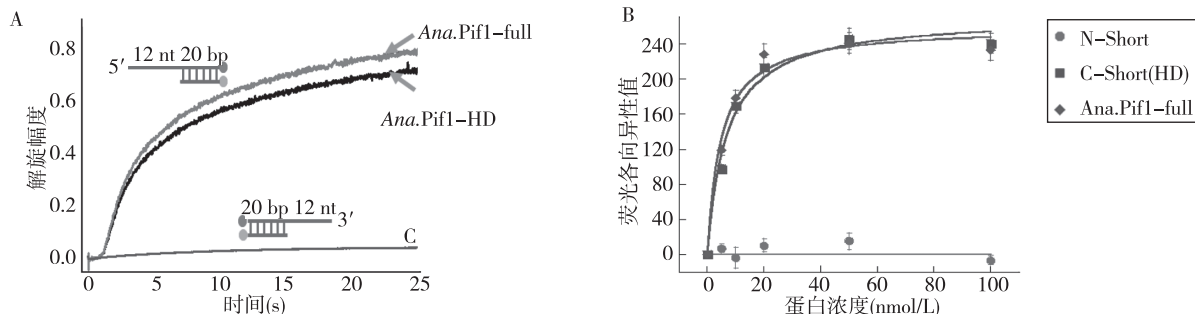
Fig. 2 Construction of expression vector *pET15b-Ana. Pif1-HD-SUMO* and purification of the recombinant *Ana. Pif1*-HD protein was resolved in 10% (W/V) SDS-PAGE.

N-Short 蛋白也依据类似的方法自行纯化(蛋白纯化结果未列出,可参看本课题组此前报道^[16,19])。

2.3 Ana. Pif1 蛋白核心结构域蛋白的活性验证

利用 Stopped-flow FRET 检测技术,对比监测 Ana. Pif1-full 与 Ana. Pif1-HD 两种蛋白解旋 5'-ssDNA-dsDNA 与 3'-ssDNA-dsDNA 底物。结果如图 3A,两种蛋白均可以有效解旋 5'-ssDNA-dsDNA 而无法解旋 3'-ssDNA-dsDNA 底物;拟合解旋特征曲线并计算得到, Ana. Pif1-full 与 Ana. Pif1-HD 解旋

反应的快反应速率几乎一致,而解旋幅度上 Ana. Pif1-HD 大约为全长蛋白的 90%。进一步研究 Ana. Pif1-full、Ana. Pif1-HD 以及 Ana. Pif1-N-Short 3 种纯化蛋白与 ssDNA 发生结合反应的差异性(见图 3B),结果显示 Ana. Pif1-full 与 Ana. Pif1-HD 都具有较好的结合特性,两者拟合曲线几乎重叠, *K_d* 差异表明 Ana. Pif1-HD 具有全长蛋白 95% 以上的结合活性,而 N 端截短的 Ana. Pif1-N-Short 蛋白丧失结合活性(难以获得 binding 拟合曲线)。



注:A 显示 Ana. Pif1-full 及 Ana. Pif1-HD 蛋白与 5'-Oh_{S12D20} 底物反应的解旋特征曲线及这两种解旋酶蛋白与 3'-Oh_{S12D20} 底物反应的解旋特征曲线;B 为 Ana. Pif1-N-Short, Ana. Pif1-HD (C-short) 及 Ana. Pif1-full 3 种蛋白与 16 nt ssDNA 结合反应后各向异性值的拟合曲线图,C 为解旋特征曲线

图 3 Ana. Pif1-HD 与 Ana. Pif1 全长蛋白的解旋活性与结合活性对比分析

Fig. 3 Comparation of unwinding and binding activities between Ana. Pif1-full and Ana. Pif1-HD.

2.4 Ana. Pif1 核心结构域蛋白发生结合反应的条件优化

本研究参考荧光偏振技术检测其他 Pif1 解旋酶结合活性的报道^[8,17],首先必须明确 Ana. Pif1 与 ssDNA 结合反应的最佳反应条件。图 4 显示,

Ana. Pif1 蛋白结合反应的最佳试剂条件为 pH 6.0 的磷酸缓冲体系中含 20 mmol/L NaCl 与 3 mmol/L MgCl₂,最佳温度条件是在该设备允许的最高稳定监测温度 42 ℃,反应 5 min 后测定各向异性值,并经过计算获得各自反应的 *K_d* 值。

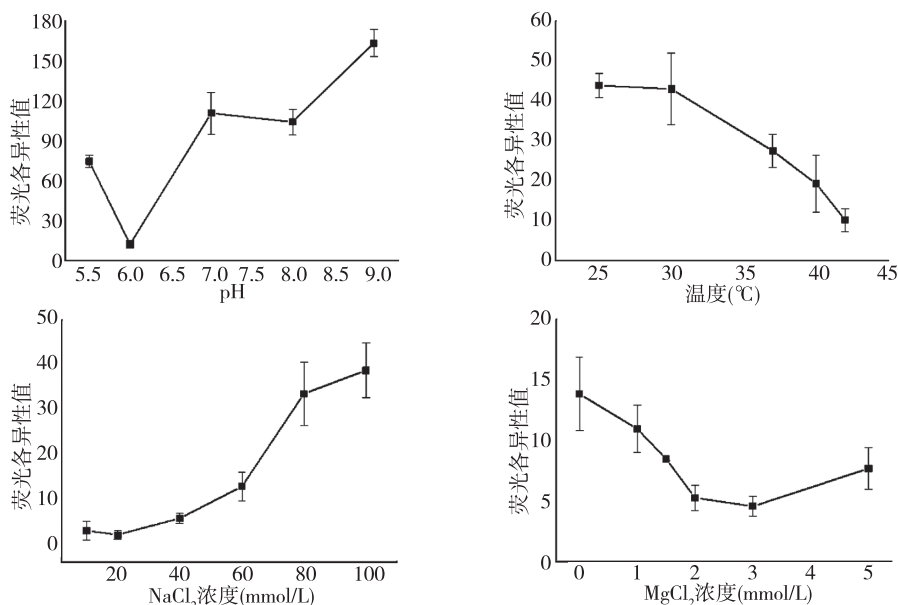


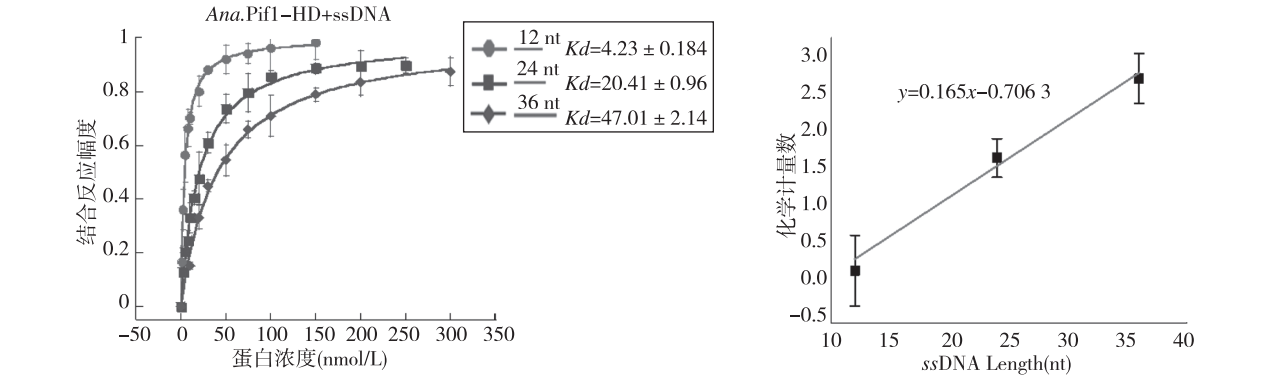
图 4 Ana. Pif1-HD 结合活性测试条件优化

Fig. 4 Determination of the optimal conditions for Ana. Pif1-HD binding activity.

2.5 *Ana. Pif1* 核心结构域蛋白与不同长度单链 DNA 结合反应特性分析

由于 *Pif1* 解旋酶更倾向于结合单链 DNA (ssDNA)^[6],本研究优先探索 *Ana. Pif1*-HD 与不同长度 ssDNA 的结合反应特性。结果如图 5A 所示, *Ana. Pif1*-HD 蛋白结合短链 ssDNA 的活性较强,尤其是 12 nt ssDNA 亲和力极强 ($K_d \approx 4.23$ nmol/L),随着底物单链长度的增加,亲和力逐渐降低,

结合 24 nt ssDNA 的 K_d 值为 20.41 nmol/L,36 nt ssDNA 的 K_d 值则为 47.01 nmol/L,提示 ssDNA 底物越长需结合的 *Ana. Pif1*-HD 蛋白分子数量越多。*Ana. Pif1*-HD 结合 ssDNA 的化学计量数(N)与底物单链长度呈线性关系(图 5B):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,根据线性关系计算出其结合 ssDNA 的 Binding size = 10.34 nt,即每个蛋白结合 ssDNA 长度为 10.34 nt。



注:A 显示 *Ana. Pif1*-HD 与 12nt ssDNA、24nt ssDNA 及 36nt ssDNA 的结合反应拟合曲线, 相对应的 K_d 值显示在每种 DNA 底物示意图之后;B 显示单链 DNA 底物长度与 *Ana. Pif1*-HD 结合反应的化学计量数之间的线性关系

图 5 *Ana. Pif1*-HD 蛋白与不同单链 DNA 的结合反应特性

Fig. 5 The binding activity of *Ana. Pif1*-HD with ssDNA in different length.

2.6 *Ana. Pif1* 核心结构域蛋白与不同复制中间体底物的结合反应底物特异性

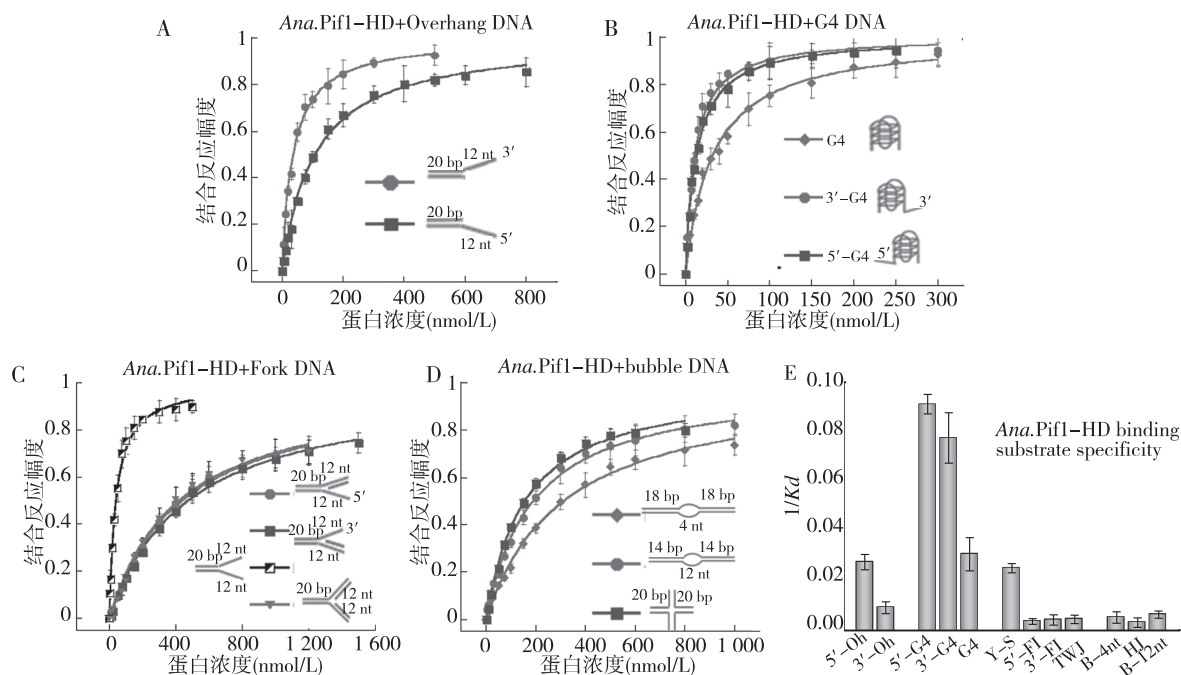
本研究重点检测与分析 *Ana. Pif1*-HD 蛋白与不同类型复制中间体 DNA 底物的结合活性。结果如图 6 与表 2 所示,与 G4 DNA 亲和力的强度依次 $5'-G4 \geq 3'-G4 > \text{Only G4}$ (图 6A),提示尾链会增加 G4 DNA 的结合作用;*Ana. Pif1*-HD 蛋白结合 3'-ssDNA-dsDNA 的 K_d 值仅是 5'-ssDNA-dsDNA K_d 值的 1/3(图 6B),其结合反应极性明显;*Ana. Pif1*-HD 与复制叉/复制泡类底物的结合反应强弱,发现 *Ana. Pif1*-HD 对分叉结构(Y-S)复制中间体的亲和力较高,与其余复制分叉底物结合的 K_d 值变化不大且较低(图 6C),而对所有复制泡(bubble)及十字交叉结构(HJ)的亲和力均较弱,相对而言 12nt-Bubble 亲和力稍强(图 6D)。综合分析,以 $1/K_d$ 作为纵轴,将 *Ana. Pif1*-HD 与不同类型复制中间体底物的结合力强弱显示在一张柱形图中(Fig. 6(E)), $1/K_d$ 值越高表示亲和力越大: ss-G4 DNA > G4 DNA > 3'-ssDNA-dsDNA \approx Y-structure > Other substrates;同时,各个底物结合反应的 K_d 值见表 2。

表 2 *Ana. Pif1*-HD 与不同 DNA 底物的结合反应特征参数($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Binding characteristic parameters of *Ana. Pif1*-HD for different DNA substrates

DNA 底物	K_d 值
3'Oh	36.31 \pm 1.99
5'Oh	108.41 \pm 6.07
Y-S	39.86 \pm 1.75
5'-FL	236.68 \pm 19.53
3'-FL	220.16 \pm 15.67
TWJ	273.93 \pm 10.25
5'-G4	10.97 \pm 0.86
3'-G4	12.89 \pm 0.69
G4	32.51 \pm 1.97
BS4	190.49 \pm 9.21
HJ	313.8 \pm 21.4
BS12	156.68 \pm 10.37

注:结合反应底物特异性统计表的横坐标显示各个特异性底物缩写名称(可见表 1);各个底物结合反应 K_d 值均为 3~5 次独立测试取得结果



注:A 显示 *Ana. Pif1*-HD 与 3'-OH_{S12D20} 及 5'-OH_{S12D20} 底物结合反应的拟合曲线;B 显示 *Ana. Pif1*-HD 与 3'-G4,5'-G4 及 only G4 DNA 底物结合反应的拟合曲线;C 显示 *Ana. Pif1*-HD 与复制叉底物的结合反应拟合曲线,Y-S 底物、3'-F1 底物、5'-F1 底物以及 TWJ 底物;D 显示 *Ana. Pif1*-HD 与复制泡底物的结合反应拟合曲线,4 nt-bubble 底物、12nt-bubble 底物以及 10 bp-holiday junction 底物;E 为上述所有这些 DNA 底物与 *Ana. Pif1*-HD 发生结合反应后计算的 1/Kd 的柱状统计结果

图 6 *Ana. Pif1*-HD 蛋白与不同 DNA 底物的结合反应特性

Fig. 6 Binding characteristics of *Ana. Pif1*-HD using various DNA substrates by steady-state fluorescence anisotropy

3 讨论

近年来,Pif1 解旋酶作为一类广泛存在于生物体内的、可高效解旋特异结构 DNA 复制中间体(尤其是 G4 DNA)的、解旋酶超家族 I 蛋白而被科学界所关注^[4,7,11]。嗜热细菌类 Pif1 解旋酶的活性与功能研究目前正呈方兴未艾之势^[16-19],其来源细菌特殊的生长环境决定此类解旋酶往往具有特殊的生理生化反应特征。*Ana. Pif1* 解旋酶源自嗜热厌氧棒菌 *Anaerobaculum hydrogeniformans*^[18],其分离自美国阿拉斯加的石油层中,生理生长环境复杂,基因组 GC 含量高,易产生多种特异 DNA 结构。因此探究 *Ana. Pif1* 解旋酶的生化反应分子特征有助于拓展对于此类嗜热细菌中解旋酶与耐高温遗传物质间作用机理的认知。然而,国内外有关 *Ana. Pif1* 解旋酶的研究却鲜有报道;本研究是首次对 *Ana. Pif1* 解旋酶与多种 DNA 底物间结合反应特

性进行的探索。

此前本课题组有关 *Ana. Pif1* 解旋酶的研究主要成功构建异源表达纯化体系(*E. coli*)与解旋反应条件的优化等^[16];随后进行了较为系统的 *Ana. Pif1* 解旋反应特性研究,揭示出其嗜热解旋特性、特异金属辅因子影响等,并探明其解旋多种复制中间体 DNA 的底物特异性。然而,*Ana. Pif1* 蛋白解旋 DNA 底物,必须首先发生结合反应;因此本研究展开了 *Ana. Pif1* 结合反应特性的探索。通过系统进化树构建与同源氨基酸序列比对,不仅发现 *Ana. Pif1* 与人类 Pif1 解旋酶存在较高同源性;而且分析出 *Ana. Pif1* 解旋酶的保守核心结构域(2 ~ 448 氨基酸),并顺利表达纯化出 *Ana. Pif1* 核心结构域蛋白(*Ana. Pif1*-HD)。Stopped-flow 与荧光偏振检测表明 *Ana. Pif1*-HD 几乎具有全长蛋白完整的结合与解旋活性,而相对应的 *Ana. Pif1* 的 N-端缺失片段蛋白则不具有结合活性——说明 *Ana. Pif1*-HD 为 *Ana. Pif1* 解旋酶结合反应保守功

能区;同时,95% 以上的结合活性表明 *Ana. Pifl*-HD 足以代表 *Ana. Pifl* 解旋酶全长蛋白进行进一步的结合反应特性分析。

为了准确分析 *Ana. Pifl*-HD 与不同 DNA 底物链发生的结合作用,本研究首先确定了体外条件下 *Ana. Pifl*-HD 结合反应的最佳反应条件,即偏酸性 pH 缓冲体系(pH 6.0)中含较低浓度 NaCl(20 mmol/L)与偏高浓度的 $MgCl_2$ (3 mmol/L)。这些反应参数与前期报道的 *Ana. Pifl* 的最佳解旋条件类似^[16],但 pH 偏低——其可能原因是 *Ana. Pifl*-HD 的等电点较 *Ana. Pifl*-full 蛋白更低,在相对较低 pH 溶液下,蛋白更易于结合 DNA 底物^[19];最佳结合反应温度为 42 °C,这与所用荧光偏振多功能酶标仪可检测反应最高温度有关,尽管低于已报道的最佳 *Ana. Pifl* 解旋温度(50 °C),但符合中等嗜热细菌体内蛋白维持结合-解离平衡的常规温度(≤ 45 °C)^[20]。随后,在最佳结合反应条件下,完成对 *Ana. Pifl*-HD 与不同长度单链 DNA 结合反应特性分析,结果表明该解旋酶蛋白与 ssDNA 结合时会随着长度增加而 *Kd* 逐渐增大,提示出 ssDNA 链的增长可结合的 *Ana. Pifl* 解旋酶的分子数量逐渐增多;进而拟合与计算出 *Ana. Pifl*-HD 与 ssDNA 结合的 binding-size 为 10.34 nt,表明每个 *Ana. Pifl*-HD 蛋白结合的 ssDNA 长度约为 10 nt——这一特征与前人报道嗜热细菌(*Therm. -yellow.*) *Pifl* 解旋酶的 ssDNA binding-size 相类似^[21];同时这个 binding-size 结果从侧面验证本课题组之前所报道的 12 nt-bubble 的单链区足够结合 *Ana. Pifl* 蛋白从而启动解旋反应的结果。

进一步探讨 *Ana. Pifl* 解旋酶与不同结构复制中间底物的结合特性,本研究发现 *Ana. Pifl*-HD 结合反应的底物特异性 G4 DNA 最佳,其次 3'-ssDNA-dsDNA 与 Y-structure 分叉底物,其它含双链区较长的 DNA 亲和力较小。综合比较这些底物结合反应的 *Kd* 值,分析其亲和力差异的可能原因。(1) *Ana. Pifl*-HD 蛋白结合 G4 DNA 底物时优先结合于带尾链的 G4 DNA,提示尾链对 *Ana. Pifl* 与 G4 DNA 亲和力有增强作用,这与前人报道原核 *Bs. Pifl* 的 G4 底物亲和性类似^[13];同时这一结合反应特征也解释了课题组前期关于 *Ana. Pifl* 解旋 ss-dsDNA 或 ss-G4-dsDNA 底物选择无明显偏好性的原因。(2) *Ana. Pifl* 蛋白与 Y-S 复制叉的亲和力远远高于其它复制叉底物,这一特点与前人报道 *hPifl* 底物亲和性特征相符合^[22],同时也回答了课

题组前期 *Ana. Pifl* 解旋 Y-S 底物速率与幅度较高的疑问;而其余复制叉底物结合活性都极弱,有可能是分叉双链区阻碍了 *Ana. Pifl*-HD 蛋白的结合,这与前人报道其他 *Pifl* 解旋酶的结合反应特征相似^[23-24]。(3) HJ 结构以及 4 nt-bubble 底物则可能是由于平末端双链区过长而难以结合 *Ana. Pifl*-HD 蛋白——本研究也做了普通平末端 dsDNA 结合反应实验(图表数据未给出,但 *Kd* 超过 125.33 nmol/L),这点与多种解旋酶结合反应结果一致^[25-26]。

综上所述,本研究利用荧光偏振检测技术,首次对嗜热细菌 *Ana. Pifl* 核心结构域蛋白的结合反应分子特征进行了较为系统地分析。该研究不仅拓展了人们对于 *Ana. Pifl*-HD 为代表的嗜热菌 *Pifl* 解旋酶生物学活性的认知,而且为阐明此类解旋酶的分子作用机制提供了实验数据支持。

4 参考文献

- [1] WONG I, LOHMAN T M. Allosteric effects of nucleotide cofactors on *Escherichia coli* Rep helicase-DNA binding [J]. *Science*, 1992, 256(5055):350-355.
- [2] BIANCO P R, KOWALCZYKOWSKI S C. Translocation step size and mechanism of the RecBC DNA helicase [J]. *Nature*, 2000, 405(6784):368-372.
- [3] SCHLIERF M, HA T. A helicase with an extra spring in its step [J]. *Cell*, 2012, 151(2):244-246.
- [4] BOCHMAN M L, JUDGE C P, ZAKIAN V A. The *Pifl* family in prokaryotes: what are our helicases doing in your bacteria? [J]. *Mol Biol Cell*, 2011, 22(12):1955-1959.
- [5] BYRD A K, RANEY K D. Structure and function of *Pifl* helicase [J]. *Biochem Soc Trans*, 2017, 45(5):1159-1171.
- [6] CHUNG W H. To peep into *Pifl* helicase: multifaceted all the way from genome stability to repair-associated DNA synthesis [J]. *J Microbiol*, 2014, 52(2):89-98.
- [7] WILSON M A, KWON Y, XU Y, et al. *Pifl* helicase and *Polδ* promote recombination-coupled DNA synthesis via bubble migration [J]. *Nature*, 2013, 502(7471):393-396.
- [8] DUAN X L, LIU N N, YANG Y T, et al. G-quadruplexes significantly stimulate *Pifl* helicase-catalyzed duplex DNA unwinding [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(12):7722-7735.
- [9] 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.
- [10] HOU X M, WU W Q, DUAN X L, et al. Molecular mechanism of G-quadruplex unwinding helicase: sequential and repetitive unfolding of G-quadruplex by Pif1 helicase[J]. *Biochem J*, 2015, 466(1):189 – 199.
- [11] STINUS S, PAESCHKE K, CHANG M. Telomerase regulation by the Pif1 helicase: a length-dependent effect [J]. *Current Genetics*, 2018, 64(2):509 – 513.
- [12] LU KY, CHEN WF, RETY S, et al. Insights into the structural and mechanistic basis of multifunctional *S. cerevisiae* Pif1p helicase[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(3):1486 – 1500.
- [13] LIU N N, DUAN X L, AI X, et al. The *Bacteroides* sp. 3_1_23 Pif1 protein is a multifunctional helicase [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(18):8942 – 8954.
- [14] WEI X B, ZHANG B, BAZEILLE N, et al. A 3′–5′ exonuclease activity embedded in the helicase core domain of *Candida albicans* Pif1 helicase[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42865.
- [15] SABOURI N. The functions of the multi-tasking Pfh1Pif1 helicase[J]. *Curr Genet*, 2017, 63(4):621 – 626.
- [16] 郭海磊, 刘娜女, 段晓雷, 等. 厌氧棒菌 Pif1 解旋酶的表达纯化及解旋条件优化[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2017, 45(6):206 – 212.
- [17] 段晓雷, 刘娜女, 付怡欣, 等. 嗜热脱铁去硫弧菌 Pif1 解旋酶生物学活性的分子特征分析[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2018, 34(1):77 – 88.
- [18] MAUNE M W, TANNER R S. Description of *Anaerobaculum hydrogeniformans* sp. nov., an anaerobe that produces hydrogen from glucose, and emended description of the genus *Anaerobaculum*[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2012, 62(Pt 4):832 – 838.
- [19] SANDERS C M. Human Pif1 helicase is a G-quadruplex DNA-binding protein with G-quadruplex DNA-unwinding activity[J]. *Biochem J*, 2010, 430(1):119 – 128.
- [20] DONATI E R, CASTRO C, URBETA M S. Thermophilic microorganisms in biomineralization [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2016, 32(11):179.
- [21] 王帅锋, 刘娜女, 段晓雷, 等. 热脱硫弧菌解旋酶基因 TyPif1 的原核表达、纯化及功能分析[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2016, 44(9):207 – 212.
- [22] GEORGE T, WEN Q, GRIFFITHS R, et al. Human Pif1 helicase unwinds synthetic DNA structures resembling stalled DNA replication forks[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(19):6491 – 6502.
- [23] OSMUNDSON J S, KUMAR J, YEUNG R, et al. Pif1-family helicases cooperatively suppress widespread replication-fork arrest at tRNA genes[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, 24(2):162 – 170.
- [24] SINGH S P, KOC K N, STODOLA J L, et al. A Monomer of Pif1 Unwinds Double-Stranded DNA and It Is Regulated by the Nature of the Non-Translocating Strand at the 3′-End[J]. *J Mol Biol*, 2016, 428(6):1053 – 1067.
- [25] 骆衡, 许厚强, 陈祥, 等. 荧光偏振技术研究 Bloom 解旋酶催化核心与双链 DNA 的相互作用[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2013, 40(3):255 – 265.
- [26] PATEL D S, MISENKO S M, HER J, et al. BLM helicase regulates DNA repair by counteracting RAD51 loading at DNA double-strand break sites[J]. *J Cell Biol*, 2017, 216(11):3521 – 3534.

(2018-09-02 收稿, 2018-11-03 修回)

中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 丁廷森