

极端嗜热古菌——芝田硫化叶菌 DNA 解旋酶的分离纯化和性质研究*

李 昉¹ 郝福英¹ 黄 力^{2**}

(¹ 北京大学生命科学学院生物化学及分子生物学系 北京 100871)

(² 中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100080)

摘 要:采用 Q Sepharose 离子交换层析、磷酸纤维素 P11 吸附层析、肝素琼脂糖吸附层析、Superdex 200 凝胶过滤和 Phenyl Superose 疏水层析等步骤,从嗜酸热芝田硫化叶菌细胞裂解液中分离纯化了一个 DNA 解旋酶。该解旋酶具有受 DNA 激活的 ATP 酶活性。根据 SDS-PAGE 测定结果,该酶的分子质量约为 63kD。芝田硫化叶菌 DNA 解旋酶可以解开底物上 70bp 的双链区,其解旋活性依赖于双链区旁的单链分叉。该解旋酶的活性依赖于 Mg^{2+} 和 ATP 的水解,在 NaCl 浓度超过 200mmol/L 时受到抑制。该酶的最适 pH 为 6.7。该酶在 40℃~80℃ 之间均有活性,70℃ 时活性最高。芝田硫化叶菌 DNA 解旋酶是从古菌中分离得到的第一个天然 DNA 解旋酶。

关键词: 极端嗜热古菌, 芝田硫化叶菌, DNA 解旋酶

中图分类号: Q 55 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 03-0340-08

DNA 解旋酶(helicase)能够利用水解 ATP 获得的能量打开 DNA 的互补双链、产生暂时的单链,所以在 DNA 的复制、重组和修复等过程中起重要作用。目前已经从原核和真核生物以及病毒中分离纯化了 60 余种 DNA 解旋酶^[1]。作为生命的第三种形式^[2],古菌尽管在细胞形态和结构上与细菌相似,但在遗传信息的传递(如 DNA 复制、转录和翻译)方面却与真核生物更为接近^[3,4]。因此,研究古菌 DNA 解旋酶不仅对于了解 DNA 解螺旋过程的系统发育,而且对于阐明真核生物 DNA 解螺旋的机制都有意义。B. Stillman 和 J. Hurwitz 的实验室最近克隆表达了古菌 *Methanobacterium thermoautotrophicum* 中真核生物微染色体维持(minichromosome maintenance, MCM)蛋白的一个类似物的编码基因^[5,6],通过研究重组蛋白的性质,他们证明 MCM 蛋白为依赖于 ATP 的 DNA 解旋酶。本研究所使用的嗜酸热芝田硫化叶菌(*Sulfolobus shibatae*)的最适生长温度为 80℃,最适 pH 值为 3。与其它极端嗜热古菌一样,芝田硫化叶菌的染色体 DNA 被认为是以松弛甚至正超螺旋状态存在的^[7]。这种仅见于古菌中的 DNA 拓扑学状态似乎与嗜热古菌对高温生长条件的适应相一致,但对于 DNA 解螺旋却是不利的。因此,研究芝田硫化叶菌的 DNA 解旋酶将有助于认识极端嗜热古菌 DNA 复制等依赖于 DNA 双链解开的基本生物学过程的分子机制和热适应性。在本研究中,我们从芝田硫化叶菌中分离纯化了第一个天然古菌 DNA 解旋酶,并对其性质做了初步探讨。

* 国家自然科学基金资助项目(39970009 和 39925001)

** 通讯作者

作者简介:李 昉(1973-),男,北京人,北京大学生物化学及分子生物学系硕士研究生。

收稿日期:2000-05-23,修回日期:2000-08-22

1 材料和方法

1.1 菌种

芝田硫化叶菌(*Sulfolobus shibatae* ATCC 51178)购自 American Type Culture Collection。

1.2 层析材料、酶和主要试剂

Q Sepharose、Superdex 200 和 phenyl Superose 购自 Pharmacia, 肝素琼脂糖购自 Sigma, 磷酸纤维素 P11 为 Whatman 产品, T4 多聚核苷酸激酶购自 Promega, 聚乙烯亚胺纤维素(PEI)购自 Macherey-Nagel, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 购自北京亚辉生物医药有限公司, 其他化学试剂均为国产分析纯。

1.3 芝田硫化叶菌的培养

采用 Brock 等人^[8]的基础培养基, 添加胰脲(0.2%)及酵母提取物(0.1%), 75℃下在 5L Bioflo 发酵罐(NBS)中搅拌培养至 $A_{600} = 1.2$ 。

1.4 核酸

M13mp19 ssDNA 采用文献[9]中的方法制备。用于构建 DNA 解旋酶底物的寡聚核苷酸由上海生工生物工程有限公司合成, 序列如下: oligo 1, 100mer, 5'-T₁₅ GCCAGTGAAT-TCCAGCTCCGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAAT₁₅-3', 其中核苷酸 16 ~ 85 与 M13mp19 (+ strand) DNA 互补, oligo 2, 70mer, 5'-GCCAGTGAAT-TCCAGCTCCGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAA-3', 与 M13mp19 (+ strand)DNA 互补。

1.5 DNA 解旋酶底物的制备

DNA 解旋酶的底物是 5'端³²P 标记的寡聚核苷酸与 M13mp19 ssDNA 退火而形成的部分双链 DNA。在没有特别注明的情况下, 使用含 oligo 1(100mer)的底物。用 T4 多聚核苷酸激酶和 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 标记 10pmol 寡聚核苷酸, 通过乙醇沉淀去除未掺入的 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP^[9]。将 1pmol 标记寡聚核苷酸和 3pmol M13mp19 ssDNA 混合于 20μL 20mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、10mmol/L MgCl₂ 和 100mmol/L NaCl 溶液中, 加热至 95℃, 然后缓慢冷却至室温。

1.6 解旋酶活性的测定

通过检测从部分双链 DNA 底物上解下的³²P 标记的寡聚核苷酸来进行 DNA 解旋酶活性测定。反应混合液(20μL)中含 20mmol/L Tris-HCl, pH8.2(室温), 3mmol/L ATP, 8mmol/L DTT, 10mmol/L MgCl₂, 150mmol/L NaCl, 10% 甘油, 200μg/mL BSA, 10fmol³²P 标记的 oligo 1 或 2 与 M13mp19 ssDNA 退火而形成的底物和待测样品。在无特别注明情况下, 反应在 70℃下保温 30min。然后加入 5μL 50mmol/L EDTA、30% 甘油、0.25% 溴酚蓝和 1% SDS 终止反应。用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳在不变性条件下分离反应产物, 电泳缓冲液为 89mmol/L Tris/borate、2mmol/L EDTA。电泳后, 采用干胶仪干胶, 对 X 光片曝光, 并进行定量^[10]。解旋酶的 1 个活性单位定义为在上述反应条件下解下 30% 标记寡聚核苷酸所需酶量。

1.7 ATP 酶活性的测定

依赖于 DNA 的 ATP 酶活性测定的反应混合液(20μL)中含 20mmol/L Tris-HCl, pH8.2

(室温), 0.1 mmol/L ATP, 8 mmol/L DTT, 5 nmol/L [γ - 32 P]ATP (5000 Ci/mmol), 10 mmol/L MgCl_2 , 10% 甘油, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA, DNA 和待测样品。反应在 65℃ 下保温 30 min 后, 取 1 μL 反应混合液, 点样在 PEI 薄板上进行薄层层析, 层析所用的移动相为 1 mol/L 甲酸/0.5 mol/L LiCl。ATP 水解的产物通过 PhosphorImager (Molecular Dynamics) 进行定量。ATP 酶的 1 个活性单位定义为在上述反应条件下水解 1 nmol ATP 所需的酶量。

1.8 其他方法

蛋白浓度按文献[11]方法测定, SDS-PAGE 按文献[12]进行, 银染色法参照文献[13]。

2 结果

2.1 芝田硫化叶菌 DNA 解旋酶的纯化

参照文献[14]的方法, 从 20 g 芝田硫化叶菌湿菌体中获得 60 mL 去核糖体裂解上清液, 上清液对缓冲液 A (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.8, 0.1 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L DTT, 10% 甘油) 透析, 得到组分 I。以缓冲液 A 平衡 Q Sepharose 柱 (柱体积为 50 mL), 将组分 I 上柱。用 150 mL 缓冲液 A 洗柱后, 300 mL KCl 梯度 (0 ~ 1 mol/L) 洗脱, 分部收集。通过活性分析发现, 具有解旋酶活性的组分在 0.4 mol/L KCl 处被洗脱下来。合并含 DNA 解旋酶的组分, 得到组分 II。组分 II 对缓冲液 A 透析。以缓冲液 A 平衡磷酸纤维素 P11 柱 (柱体积为 25 mL), 将透析后的组分 II 上柱, 用 100 mL 缓冲液 A 洗柱, 170 mL KCl 梯度 (0 ~ 1 mol/L) 洗脱, 分部收集。DNA 解旋酶在 0.35 mol/L KCl 处洗脱。合并含 DNA 解旋酶的组分后, 得到组分 III。组分 III 对缓冲液 A 透析。用缓冲液 A 平衡肝素琼脂糖柱 (柱体积为 5 mL)。将透析后的组分 III 上柱, 以 50 mL 缓冲液 A 洗柱, 50 mL KCl 梯度 (0 ~ 1 mol/L) 洗脱, 分部收集。DNA 解旋酶在 0.4 mol/L KCl 处洗脱。合并含 DNA 解旋酶的组分, 得到组分 IV。利用 Amicon 离心超滤浓缩管将组分 IV 浓缩至 250 μL 。用缓冲液 A + 0.2 mol/L KCl 平衡 Superdex 200 分子筛柱, 将浓缩后的组分 IV 上柱, 洗脱体积为 9 ~ 10 mL 的组分含有 DNA 解旋酶。合并这些组分, 得到组分 V。组分 V 对缓冲液 B (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.8, 0.1 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L DTT, 10% 甘油, 1.5 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 透析。用缓冲液 B 平衡 phenyl Superose 柱 (柱体积为 1 mL)。将透析后的组分 V 上柱, 以 5 mL 缓冲液 B 洗柱, 12 mL $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 梯度 (1.5 ~ 0 mol/L) 洗脱, 分部收集。DNA 解旋酶在 0.05 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 处洗脱 (图 1)。合并含 DNA 解旋酶组分, 得到组分 VI。表 1 总结了整个纯化过程, 图 2 为 DNA 解旋酶纯化过程中各组分的 SDS-PAGE 图谱。组分 VI 呈现分子质量为 63 kD 的单一一条带。

2.2 芝田硫化叶菌 DNA 解旋酶的反应条件和反应要求

芝田硫化叶菌 DNA 解旋酶的活性依赖于 ATP 的水解。无 ATP 时, DNA 解旋酶无活性; ATP 的浓度为 mmol/L 时, 酶的活性最高; 更高的 ATP 浓度对酶的活性有抑制作用 (图 3-A)。酶的活性同时依赖于 Mg^{2+} 。5 mmol/L EDTA 可以完全抑制酶的活性; MgCl_2 浓度为 20 mmol/L 时, 酶活性最高; MgCl_2 浓度为 60 mmol/L 时, 酶仍然有较微弱的活性 (图 3-B)。在 NaCl 的浓度 0 ~ 200 mmol/L 范围内时, 酶具有相似的活性, 较高的 NaCl 浓度 (700 mmol/L) 会抑制酶的活性 (图 3-C)。在不同 pH 值的 Tris-HCl 缓冲液中测定酶的活性发现, 解旋酶在

pH7.5~9.2时有较强的活性,最适 pH 值为 8.2(图 3-D)。考虑到 Tris 缓冲液的温度效应,在反应温度下的 pH 值比室温下的 pH 值低约 1.5。因此,解旋酶在近中性条件下活性较高,最适 pH 值为 6.7。

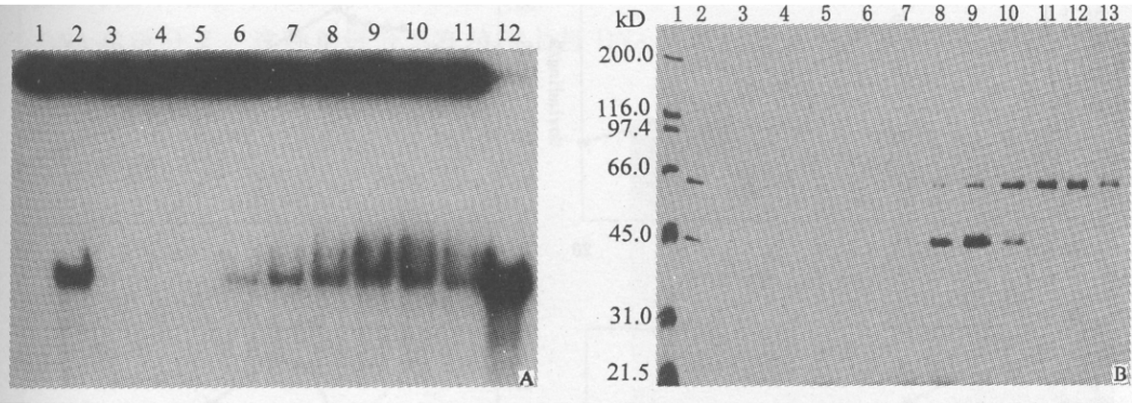


图 1 芝田硫化叶菌 DNA 解旋酶在 phenyl Superose 柱上的疏水层析
Fig.1 Hydrophobic interaction chromatography of an *S. shibatae* DNA helicase sample (Fraction V)
A. Analysis of the DNA helicase activity in fractions:1, Untreated substrate;2, Loading sample;
3~11, Fractions 16~24, respectively;12, Heat-denatured substrate; B. SDS-PAGE analysis of the phenyl
Superose fractions:1, Molecular weight standards;2, Loading sample;3~13, Fraction 14~24, respectively.

表 1 芝田硫化叶菌 DNA 解旋酶的纯化

Table 1 Purification of <i>S. shibatae</i> DNA helicase			
Step	Total protein /mg	Total activity /U	Specific activity ^a /(U·mg ⁻¹)
Crude extract	27.57	b	b
Q Sepharose	8.03	1128.0	140.5
Phosphocellulose	1.24	476.8	384.5
Heparin agarose	0.32	150.0	468.8
Superdex 200 ^c	0.01	26.3	2630.0
Phenyl Superose ^c	0.001	8.6	8600.0

^a Since nucleases interfered with the DNA helicase assay during the early stages of purification, DNA-stimulated ATPase activity was used to determine the total activity and specific activity of each sample.

^b DNA-stimulated ATPase activity could not be determined at this stage because of the presence of other ATP-hydrolyzing enzymes.

^c Protein concentrations were estimated by comparing the staining intensities of known amounts of bovine serum albumin and the DNA helicase samples on silver-stained gels, assuming similar staining efficiencies for the two proteins.

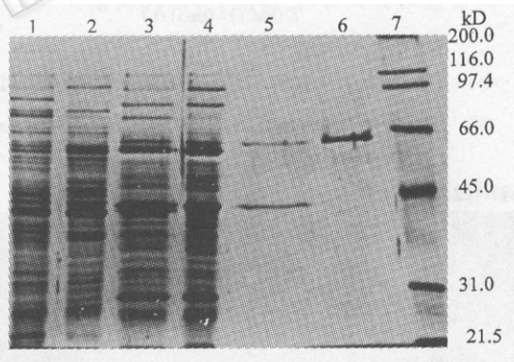


图 2 芝田硫化叶菌 DNA 解旋酶纯化过程中各个步骤所得组分的 SDS-PAGE 图谱

Fig.2 SDS-PAGE analysis of samples taken at various stages during the purification of the *S. shibatae* DNA helicase

1, Cell extract;2, Q Sepharose peak fractions;3, Phosphocellulose P11 peak fractions;4, Heparin agarose peak fractions;
5, Superdex 200 peak fractions;6, Phenyl superose fractions;7, Molecular weight standards.

2.3 温度对芝田硫化叶菌 DNA 解旋酶的影响

芝田硫化叶菌 DNA 解旋酶在室温下完全没有活性,70℃时活性可能接近最大值(图 4)。在温度高达 80℃时仍然具有活性,但由于此时底物自身发生部分变性,所以酶活性

无法准确定量。温度对该酶活性的影响与芝田硫化叶菌对高温生长条件的适应性是一致的。

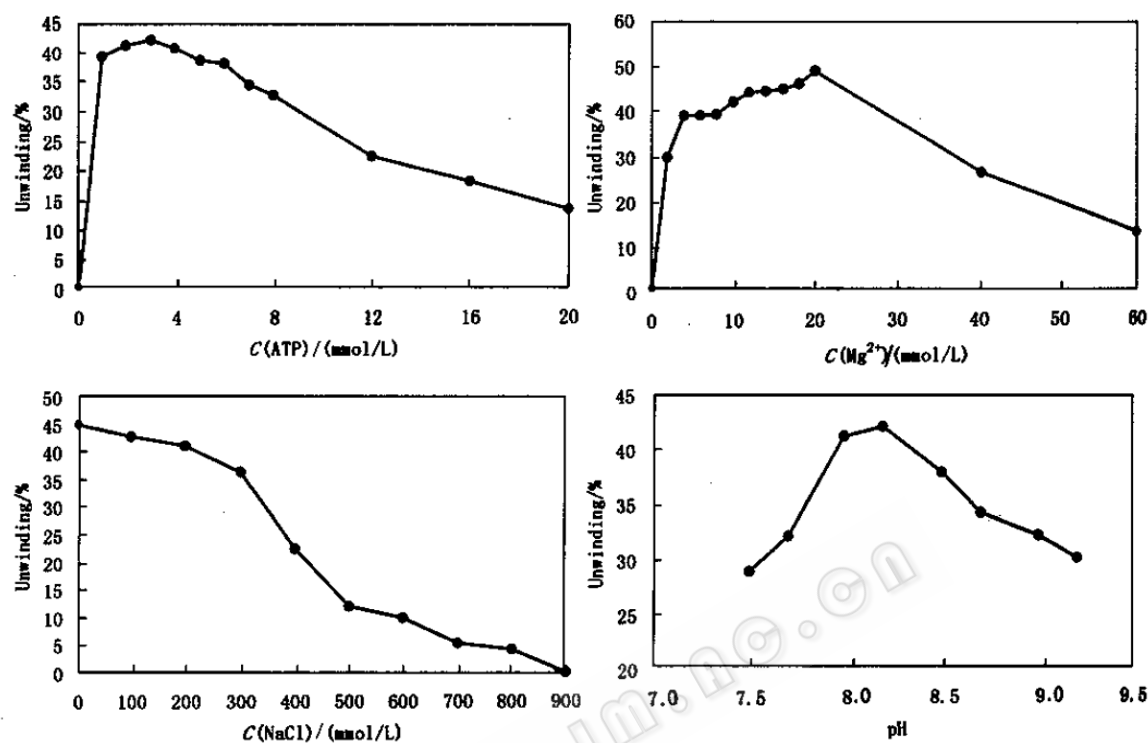


图 3 ATP、 Mg^{2+} 、NaCl 浓度以及 pH 对芝田硫化叶菌 DNA 解旋酶活性的影响

Fig.3 Effects of ATP, Mg^{2+} , NaCl concentrations and pH on the activity of the *S. shibatae* DNA helicase

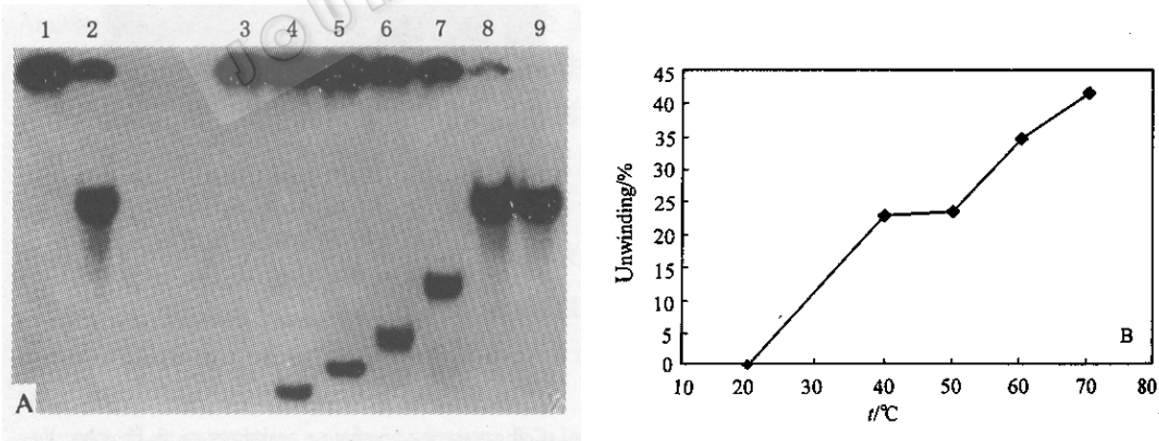


图 4 温度对芝田硫化叶菌 DNA 解旋酶的影响

Fig.4 Effect of temperature on the activity of the *S. shibatae* DNA helicase

A. Analysis of the *S. shibatae* DNA helicase activity at various temperatures: 1, Substrate control (70°C); 2, Substrate control (80°C); 3, 20°C; 4, 40°C; 5, 50°C; 6, 60°C; 7, 70°C; 8, 80°C; 9, Heat denatured substrate; Since samples were loaded at different times, released oligonucleotide migrated to different positions;

B. Quantification of the results in Fig. 4-A.

2.4 芝田硫化叶菌 DNA 解旋酶的底物特异性

³²P 标记的 Oligo 2 与 M13mp19 ssDNA 退火形成的部分双链 DNA 底物的互补双链区的两端不存在不互补的尾巴(图 5-B)。DNA 解旋酶在这样的底物上的活性很低,只相当于在图 5-A 所示 oligo 1/M13mp19 底物上的活性的二十分之一(图 6),表明该酶的活性依赖于 DNA 单链分叉。这种单链分叉在结构上与 DNA 复制时形成的复制叉相似。

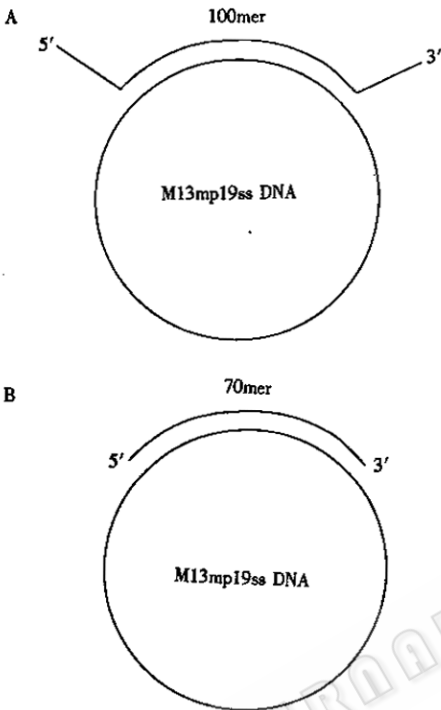


图 5 测定 DNA 解旋酶活性的底物

Fig.5 Substrates used in DNA helicase assay

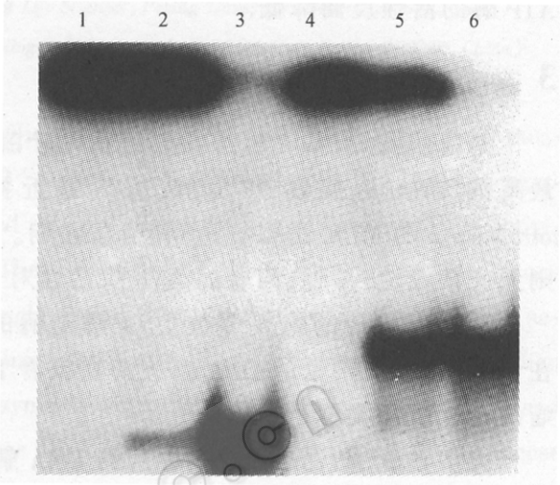


图 6 芝田硫化叶菌 DNA 解旋酶对不具有单链分叉结构的底物(底物 A)和具有单链分叉结构的底物(底物 B)的解旋活性

Fig.6 Unwinding of a substrate without or with single-stranded tails (substrate A and B, respectively) by the *S. shibatae* DNA helicase

1, Substrate A control; 2, Unwinding of substrate A; 3, Heat denatured substrate A; 4, Substrate B control; 5, Unwinding of substrate B; 6, Heat denatured substrate B.

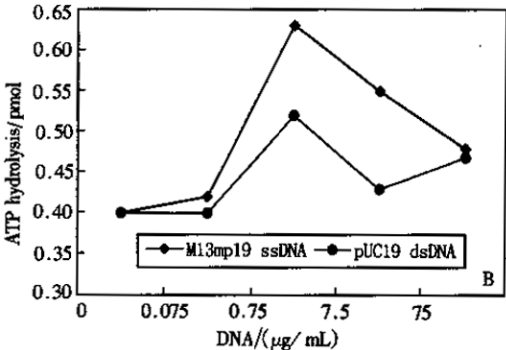
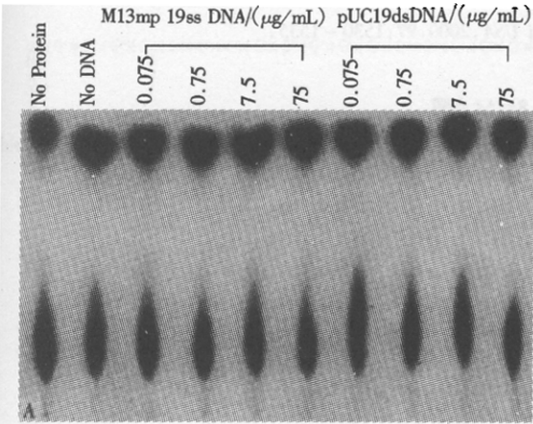


图 7 芝田硫化叶菌 DNA 解旋酶的 DNA 激活的 ATP 酶活性

Fig.7 DNA-stimulated ATPase activity of the *S. shibatae* DNA helicase

A. Analysis of the DNA-stimulated ATPase activity of the *S. shibatae* DNA helicase; B. Effect of DNA concentration on the ATPase activity of the *S. shibatae* DNA helicase.

2.5 DNA 激活的 ATP 酶活性

在不同浓度的单链和双链 DNA 存在的情况下测定纯化的 DNA 解旋酶的 ATP 酶活性发现,虽然解旋酶的 ATP 酶活性不依赖于 DNA,但 DNA 对解旋酶的 ATP 酶活性具有激活作用(图 7-A)。ATP 酶活性的定量分析(图 7-B)显示,无论是单链还是双链 DNA,当 DNA 浓度为 $0.75\mu\text{g/mL}$ 时,ATP 酶的活性最高。随着 DNA 浓度的进一步增加($7.5 \sim 75\mu\text{g/mL}$),ATP 酶的活性反而降低。

3 讨论

据我们所知,本文报道的芝田硫化叶菌 DNA 解旋酶是迄今为止分离纯化的最适温度最高的 DNA 解旋酶^[15,16]。该酶与最近报道的、通过克隆表达得到的 *M. thermoautotrophicum* 的 MCM 类似物^[5,6]有明显区别。例如,前者依赖于具有叉形结构的底物,后者则无此依赖性;另外,两者的 ATP 酶活性对于 DNA 的依赖性也有所不同。

目前所发现的绝大多数 DNA 解旋酶的 ATP 酶活性在很大程度上依赖于 DNA 的存在^[15,16],但本文报道的 DNA 解旋酶在没有 DNA 的情况下也有较高的 ATP 酶活性,这与多瘤病毒 T 抗原类似^[17]。

大多数从 *E. coli* 中分离得到的 DNA 解旋酶在体内的生理功能已经清楚^[15],而真核生物中只有少数几种 DNA 解旋酶的生理功能已知^[16,18]。本文报道的 DNA 解旋酶需要底物具有类似复制叉的结构,因而它有可能是参与 DNA 复制的解旋酶。目前,我们正在对该酶的性质作进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Lohman T M, Bjornson K P. *Annu Rev Biochem*, 1996, **65**:169 ~ 214.
- [2] Woese C R, Kandler O, Wheelis M L. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**:4576 ~ 4579.
- [3] Edgell D R, Doolittle W F. *Cell*, 1997, **89**:995 ~ 998.
- [4] Bernander R. *Mol Microbiol*, 1998, **29**:955 ~ 961.
- [5] Kelman Z, Lee J K, Hurwitz J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**:14783 ~ 14788.
- [6] Chong P J, Hayashi K M, Simon N M, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**:1530 ~ 1535.
- [7] Charbonnier F, Forterre P. *J Bacteriol*, 1994, **176**:1251 ~ 1259.
- [8] Brock T D, Brock K M, Belly R T, et al. *Arch Mikrobiol*, 1972, **84**:54 ~ 68.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor. New York: Cold Spring Laboratory Press, 1989.
- [10] Tuteja N, Tuteja R, Rahman K, et al. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18**:6785 ~ 6792.
- [11] Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976, **72**:248 ~ 254.
- [12] Laemmli U K. *Nature*, 1970, **227**:680 ~ 685.
- [13] 李建武, 余瑞元, 袁明秀, 等. 生物化学实验原理和方法. 北京:北京大学出版社, 1994. 224 ~ 226.
- [14] Mai V, Chen X, Hong R, et al. *J Bacteriol*, 1998, **180**:2560 ~ 2563.
- [15] Matson S W, Kaiser-Rogers K A. *Annu Rev Biochem*, 1990, **59**:289 ~ 329.
- [16] Matson S W, Bean D W, George J W. *BioEssays*, 1994, **16**:13 ~ 22.
- [17] Seki M, Enomoto T, Eki T, et al. *Biochemistry*, 1990, **29**:1003 ~ 1009.
- [18] Thömmes P, Hubscher U. *Chromosoma*, 1992, **101**:467 ~ 473.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A DNA HELICASE FROM THE HYPERTHERMOPHILIC ARCHAEON *SULFOLOBUS SHIBATAE* *

Li Fang¹ Hao Fuying¹ Huang Li^{2**}

(¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

(² State Key Laboratory of Microbial Resource, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: A DNA helicase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae* has been purified to homogeneity by column chromatography on Q Sepharose, phosphocellulose P11, heparin agarose, Superdex 200 and phenyl Superose. The purified enzyme shows DNA-stimulated ATPase activity. The molecular mass of the enzyme is ~ 63kD. The *S. shibatae* DNA helicase is capable of unwinding a 70bp duplex DNA flanked by unpaired single-stranded tails at both ends. The helicase activity requires Mg^{2+} and hydrolysis of ATP, and is inhibited by NaCl at concentrations greater than 200mmol/L. It has an optimal pH of 6.7. The enzyme is active at temperatures between 40 and 80°C, and the activity peaks at 70°C. The *S. shibatae* DNA helicase is the first native DNA helicase to be isolated from archaea.

Key words: Hyperthermophilic archaea, *Sulfolobus shibatae*, DNA Helicase

* Project Granted by Chinese National Natural Science fund (39970009, 39925001)

** To whom correspondence should be addressed.

致 读 者

感谢广大作者、读者多年来对《微生物学报》的关心和支持。为了适应改革开放的需要,使科研成果尽快得到交流,本刊自2001年41卷第1期开始继续扩版,双月刊,每册128面。全部道林纸印刷,内附进口铜版纸印制的黑白图版和彩色图版。发表周期缩短,内容丰富翔实,能及时反映我国微生物学科前沿和最新研究水平。在新的一年里,《微生物学报》将更好的为科研工作者服务,为促进科技资源信息化最大限度的共享做出积极贡献。

欢迎投稿! 欢迎订阅! 欢迎提出宝贵意见!

《微生物学报》编辑部