

极端嗜热古菌—芝田硫化叶菌反向旋转酶的快速纯化^{*}

戴鹏高 黄 力^{**}

(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 反向旋转酶是一种 I 型拓扑异构酶, 它可以利用 ATP 水解的能量向 DNA 分子中引入正超螺旋。通过阴离子交换层析、亲和层析、聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)从芝田硫化叶菌(*Sulfolobus shibatae*)中分离得到一种反向旋转酶。SDS-PAGE 显示, 该酶分子量约为 126 kD, N-末端序列测定结果表明, 该酶为芝田硫化叶菌中一种新的反向旋转酶。

关键词 极端嗜热古菌 拓扑异构酶 反向旋转酶 SDS-PAGE 纯化

中图分类号: Q814.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2003)02-0241-04

DNA 拓扑异构酶(Topoisomerase, EC 5.99.1.3)是催化 DNA 拓扑异构体之间互相转化的酶类, 在 DNA 复制、重组等遗传活动中起重要作用^[1]。反向旋转酶(Reverse gyrase)属于 I 型拓扑异构酶^[2], 它可以利用通过水解 ATP 获得的能量向 DNA 分子中引入正超螺旋, 由于其独特的催化性质, 反向旋转酶引起了许多人的兴趣^[3]。

反向旋转酶最早发现于极端嗜热古菌-硫化叶菌中^[3], 后来发现它存在于所有嗜热古菌和细菌中。因此, 反向旋转酶的存在被认为是嗜热微生物的一个特征^[4]。Nadal 等从芝田硫化叶菌中分离纯化了一种分子量为 130kD 的反向旋转酶^[5]。常用的反向旋转酶的纯化方法步骤繁多、回收率很低^[5]。这一技术困难在一定程度上影响了对极端嗜热古菌中反向旋转酶的分离和研究。

本文将变性条件下的聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)引入反向旋转酶的纯化过程, 大大简化了纯化步骤。通过 Q Sepharose, Heparin agarose 柱层析和 SDS-PAGE 进行组分分离后, 再经过蛋白的变性和复性, 从芝田硫化叶菌中分离得到了一个反向旋转酶。对纯化蛋白进行的 N-末端序列测定表明, 该酶为芝田硫化叶菌中一个新的反向旋转酶。

1 材料和方法

1.1 材料:

1.1.1 菌种 :*Sulfolobus shibatae* 购自 American Type Culture Collection(51178)。

1.1.2 材料 :SDS 购自 Gibco, PVDF 膜、分子量标准购自 BioRad, 层析材料均购自 Pharmacia, Triton X-100 购自 Farco, 盐酸胍购自 Promega, 其它化学试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 酶活测定 标准反应体系(20 μ L)包括 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.8, 1 mmol/L 二硫苏

^{*} 国家自然科学基金重点项目(30030010)和杰出青年基金(39925001)资助

^{**} 通讯作者。E-mail: huangl@sun.im.ac.cn

作者简介 戴鹏高(1973 -)男, 陕西蓝田人, 中国农业大学生物学院博士研究生, 主要从事古菌生化及分子生物学的研究。E-mail: daipg@sohu.com

收稿日期 2002-07-11, 修回日期 2002-12-09

糖醇, 0.1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L $MgCl_2$, 90 mmol/L NaCl, 30 $\mu g/mL$ 牛血清白蛋白, 12% (v/v) 乙二醇, 1 mmol/L ATP, 0.5 μg 负超螺旋的 pUC18 质粒, 5 μL 酶组分。在反应混合物的上面覆盖 30 μL 石蜡油以防止蒸发。75℃保温 30min 后, 加入 1% SDS, 0.2 mmol/L EDTA, 1 mg/mL 蛋白酶 K, 50℃保温 30min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测反应产物。

1.2.2 细胞粗提液的制备: 从 12L 发酵液中离心收集芝田硫化叶菌的菌体。参照文献 [6] 的方法, 将菌体悬浮在 5~10 倍体积的 0℃裂解缓冲液中(20 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L 二硫苏糖醇)中, 加入 Triton X-100(10%)至终浓度为 0.1%。冰浴 30min, 4℃, 30 000g 离心 30min, 取上清液, 4℃, 150 000g 离心 2.5h 以去除核糖体, 保留上清液, 对缓冲液 A(50mmol/L Tris-HCl, pH 7.8, 0.1mmol/L EDTA, 0.1mmol/L DTT, 10% 甘油)透析, 得到细胞粗提液。

1.2.3 柱层析 细胞粗提液上 Q-Sepharose 柱(30 mL), 用 50 mL 的缓冲液 A 洗去未结合的蛋白后, 再用 300 mL KCl 浓度梯度(0~1 mol/L)洗脱, 分部收集。合并 0.4~0.6 mol/L 盐洗脱组分, 对缓冲液 A 透析, 样品浓缩后上 Heparin agarose 柱(5 mL), 用 10 mL 的缓冲液 A 洗去未结合的蛋白后, 再用 50 mL KCl 浓度梯度(0~1 mol/L)洗脱, 分部收集。合并 0.6~0.7 mol/L 盐洗脱组分, 对缓冲液 A 透析、浓缩。

1.2.4 SDS-PAGE、转膜^[7,8]、蛋白洗脱和复性^[9]: 部分纯化的蛋白样品经 SDS-PAGE 分离并转移到 PVDF 膜上以后, 0.001% 氨基黑染色约 20~30min, 蒸馏水反复脱色至蛋白条带清晰, 从浓缩胶与分离胶的分界处起, 将 PVDF 膜每隔 0.5 cm 均匀切成 10 等份, 将每一膜片按 0.2~0.5 mL/cm² 浸泡于洗脱缓冲液(2% SDS, 1% Trion X-100, 50 mmol/L Tris-HCL, pH 9.5)中, 振荡 10min 后, 离心, 向上清中加入 4 倍体积 0℃丙酮, -20℃ 30min 后离心, 去上清, 用 6mol/L 盐酸胍悬浮沉淀, 室温静置 15min 后, 加入 50 倍体积的复性缓冲液(50 mmol/L Tris-HCL, pH 7.5, 0.1% Triton X-100, 60 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L 二硫苏糖醇, 0.2 mmol/L PMSF), 室温或 4℃放置过夜。

1.2.5 双向电泳: 反应产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶, 0.5 × TPE, 3V/cm 的电压下电泳 8h 后, 溴化乙锭染色, 在长波紫外灯下切下电泳条带, 将凝胶条垂直放于第二向电泳的凝胶中, 0.5 × TPE, 3V/cm 的电压下电泳 12h, 通常在第二向电泳缓冲液中加入 3 $\mu g/mL$ 氯喹, 电泳结束后, 经溴化乙锭染色, 1 mmol/L $MgSO_4$ 脱色, 在紫外灯下照相。

2 结果

2.1 拓扑异构酶的初步分离

芝田硫化叶菌细胞提取液经过 Q-Sepharose, Heparin agarose 柱层析后得到初步纯化(图 1), 部分纯化样品经 SDS-PAGE 分离后转膜, 再将膜切成 10 等份, 对膜上的蛋白进行变性、复性处理后测定反向旋转酶活性。结果显示, 组分 2 有明显的拓扑异构酶活性(图 2)。

2.2 反向旋转酶的 SDS-PAGE 纯化

SDS-PAGE 结果显示, 在第 2 膜片上存在两个明显蛋白条带, 分子量分别约为 110 kD 和 126 kD。分别切下这两个条带, 再经过洗膜、变性和复性, 得到两个纯化蛋白。采用琼脂糖双向电泳方法对两个蛋白进行拓扑异构酶活性分析。在第二向电泳中加入 3 $\mu g/mL$ 的氯喹, 区分出正负超螺旋。结果表明, 分子量为 126 kD 左右的蛋白有明显的反向旋转

酶活性,它可以向 DNA 分子中引入正超螺旋(图 3)。

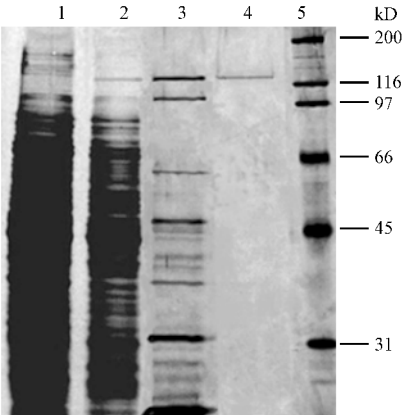


图 1 反向旋转酶的纯化

Fig.1 Purification of reverse gyrase
1. Crude extract 2. Q Sepharose fraction ;
3. Heparin agarose fraction ;
4. Purified reverse gyrase after SDS-PAGE
purification ; 5. Markers.

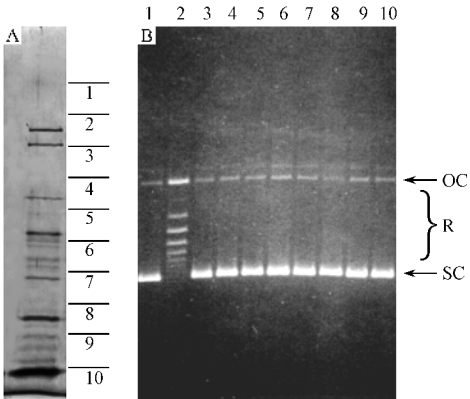


图 2 反向旋转酶的 SDS-PAGE 纯化及活性测定

Fig.2 Purification of reverse gyrase by SDS-PAGE and determination of its activity
Proteins in the 3rd lane of the gel in Fig. were transferred to a PVDF membrane, and the membrane was sliced as indicated in (A). Proteins recovered from the membrane pieces were assayed for topoisomerase activity after renaturation. Numbers on top of the gel in (B) correspond to those to the right of the gel in (A). OC, Open circular DNA ;SC, Negatively supercoiled DNA ;R, Relaxed DNA.

2.3 拓扑异构酶 N-末端序列

经测序发现,分子量约为 126kD 的纯化蛋白的 N-末端序列为 TSIDKVPPSIYTRSC。对 GenBank 进行同源搜索后发现,该序列与已经完成基因组序列测定的硫磺矿硫化叶菌(*S. solfataricus*)中的一个反向旋转酶基因编码的蛋白的 N-末端(MT-SINKVPPSIYTRSC)非常相似。而该序列与先前从该菌中得到的反向旋转酶 N-末端序列(MINVMYKSCPNCGGD)有很大差异。根据上述结果,确定纯化的芝田硫化叶菌蛋白为该菌中另一种反向旋转酶。

3 讨 论

通过 Q-Sepharose, Heparin agarose 柱层析, SDS-PAGE 3 个步骤,从芝田硫化叶菌中快速纯化得到了一种拓扑异构酶,即反向旋转酶。Q-Sepharose, Heparin agarose 这两个柱层析步骤有效地减少了样品中蛋白的数目,使通过 SDS-PAGE 最终纯化目标蛋白成为可能。这一方法有可能适用于其他极端嗜热微生物中反向旋转酶、甚至别的酶的快速纯化。

活性分析和 N-末端序列测定结果表明,本文得到的拓扑

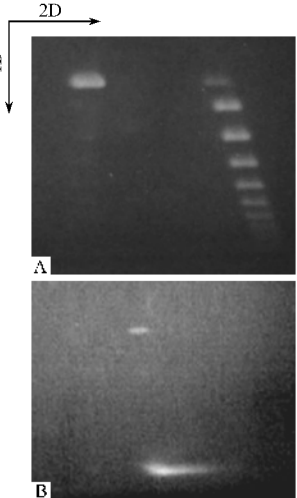


图 3 反向旋转酶活性测定

Fig.3 Reverse gyrase activity of the 126kD protein and 110kD proteins
(A). Activity of the 126kD protein ;
(B). Activity of the 110kD protein.

异构酶为反向旋转酶。先前,在芝田硫化叶菌中已经分离得到了一种分子量为 128 kD 的反向旋转酶并克隆得到了反向旋转酶基因^[5]。这一基因编码的蛋白质的 N-末端序列与本研究分离纯化的反向旋转酶的末端序列有很大差异,表明该菌中至少存在两种反向旋转酶。芝田硫化叶菌中这两种反向旋转酶在表达调控以及生理功能方面的异同还需要进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Wang J C. topoisomerase. *Annu Rev Biochem*, 1996, **65** :635 ~ 682.
- [2] Forterre P, Mirambeau G, Jaxel C, *et al.* High positive supercoiling in vitro catalyzed by an ATP and polyethylene glycol-stimulated topoisomerase from *Sulfolobus acidocaldarius*. *EMBO J*, 1985, **4** :2123 ~ 2128.
- [3] Kikuchi A, Asai K. Reverse gyrase-a topoisomerase which introduces positive superhelical turns into DNA. *Nature*, 1984, **309** :677 ~ 681.
- [4] Bouthier de la tour C, Duguet M. Reverse gyrase, a hallmark of the hyperthermophilic archaeobacteria. *J Bacteriol*, 1990, **172** (12): 6803 ~ 6808.
- [5] Nadal M, Couderc E, Duguet M. Purification and characterization of reverse gyrase from *Sulfolobus shibatae*. Its proteolytic product appears as an ATP-independent topoisomerase. *J Biol Chem*, 1994, **269** (7): 5255 ~ 5263.
- [6] Bergerat A, Gadelle D, Forterre P. Purification of a DNA topoisomerase II from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae*. A thermostable enzyme with both bacterial and eucaryal features. *J Biol Chem*, 1994, **269** (44): 27663 ~ 27669.
- [7] Laemmli U K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227** :680 ~ 685.
- [8] Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 891 ~ 893.
- [9] Richard R E, Bogenhagen D F. A high molecular weight topoisomerase I from *xenopus laevis* ovaries. *J Biol Chem*, 1989, **264** (8): 4704 ~ 4709.

Purification of a Reverse Gyrase from the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus Shibatae* Using a Simple Procedure

Dai Penggao Huang Li*

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

Abstract : Reverse gyrases are type I topoisomerases capable of introducing positive supercoils into DNA at the expense of ATP. By using ion exchange, heparin agarose chromatography and SDS-PAGE, a reverse gyrase was purified to homogeneity from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae*. The molecular mass of the enzyme is ~ 126 kD, as judged by SDS-PAGE. N-terminal amino acid sequence analysis shows that the enzyme is different from a reverse gyrase isolated previously from *S. shibatae*.

Key words : Hyperthermophilic archaea, Topoisomerase, Reverse gyrase, SDS-PAGE, Purification

* Corresponding author. E-mail: huangli@sun.im.ac.cn