

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (8) :1036 – 1041; 4 August 2015
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140468

嗜酸嗜热古菌 *Sulfolobus acidocaldarius* 编码尿嘧啶 DNA 糖苷酶表达, 纯化与酶学特征

王婧^{1,2}, 易刚顺¹, 欧杰², 刘建华¹, 刘喜朋^{1*}

¹上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240

²上海海洋大学食品学院, 上海 201306

摘要: 【目的】嗜高温微生物面临 dC 脱氨基生成 dU 损伤的巨大压力, 鉴定嗜酸嗜热古菌 *S. acidocaldarius* 来源的尿嘧啶 DNA 糖苷酶 (UDG) 切除 dU 损伤的酶学活性。【方法】重组表达来源于 *S. acidocaldarius* 的 IV 和 V 型 UDG, 经亲和纯化得到电泳纯重组蛋白。然后利用人工合成的 dU (deoxyuracil) 修饰寡核苷酸片段作为底物, 体外鉴定两种重组 UDG 的酶学特性。【结果】来源于 *S. acidocaldarius* 的 IV 和 V 型重组 UDG 具有相似的酶学特性。IV 型 UDG 催化效率更高, 比活性是 V 型重组 UDG 的 750 倍左右。作为来自嗜热微生物的蛋白, *S. acidocaldarius* 的 IV 和 V 型 UDG 的最适反应温度为 65 – 75 °C。【结论】IV 型 UDG 比 V 型 UDG 水解 dU 碱基和脱氧核糖之间糖苷键的能力更强。

关键词: 古菌, 嗜酸嗜热硫化叶菌, dU 碱基损伤, DNA 修复, 尿嘧啶 DNA 糖苷酶

中图分类号: Q936 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 08-1036-06

古菌多生长于高温、极度酸碱、高盐等极端自然环境。这些极端环境容易造成微生物基因组的各种损伤。例如高温导致碱基环外氨基水解生成羰基的反应速率大大加快^[1]。在碱基脱氨基损伤中, dC (deoxycytidine) 水解脱氨基生成 dU (deoxyuracil) 是发生频率最高的一种脱氨基损伤形式^[1]。

极端嗜热微生物为了应对 DNA 损伤压力, 进化出了多种修复机制。其中尿嘧啶 DNA 糖苷酶 (Uracil-DNA glycosylase, UDG) 是应对高温所致 dU 损伤的核心修复因子。UDG 可以水解脱氧核糖和 dU 碱基间的糖苷键, 形成无碱基的脱氧核糖磷酸骨架, 即 AP (apurinic/aprimidinic) 位点^[2]。然后 AP

内切核酸在无碱基位点水解磷酸二酯键, 形成 3' – OH, 随后 DNA 聚合酶合成新的互补 DNA 链, 最后 DNA 连接酶缝合 DNA 缺口, 完成整个修复反应^[3]。因此, 为了应对高频率 dU 损伤, 嗜高温微生物编码多种处理 dU 的 DNA 糖苷酶, 包括 IV 和 V 型 UDG、胸腺嘧啶 DNA 糖苷酶 (thymidine DNA glycosylase, TDG)^[4-5]。TDG 主要负责切除 T/G 错配中的 T 碱基、U/G 错配中的 U 碱基^[6]。另外, 细胞内的 dUTPase 可以将 dUTP 水解成 dUMP, 防止 DNA 聚合酶以 dUTP 为底物, 在 DNA 中掺入 dUMP 损伤^[7]。

常温微生物很少编码 UDGIV 和 UDG V, 一般只编码 I 型 UDG^[2]。而 IV 型和 V 型 UDG 广泛存在

基金项目: 国家自然科学基金 (J1210047), 上海市自然科学基金 (12ZR1413700)

* 通信作者。Tel: +86-21-34204787; E-mail: xpliu@sjtu.edu.cn

作者简介: 王婧 (1988 –), 女, 甘肃人, 硕士研究生, 研究方向为微生物与食品科学。E-mail: lindawangj@yeah.net

收稿日期: 2014-10-02; 修回日期: 2015-03-11

于嗜热微生物中,包括古菌和细菌^[3-5]。嗜热细菌 *Thermus thermophilus* 的 *udgIV* 和 *udgV* 基因删除结果表明,二者都参与细胞内的 dU 损伤切除修复^[8]。UDGIV 和 UDGIV 在嗜热古菌中的分布没有明显的规律性。UDGIV 存在于绝大部分嗜热古菌中^[3-5], UDGIV 的存在没有 UDGIV 普遍,只存在于少部分嗜热古菌中^[5]。

Sulfolobus 是一类嗜热嗜酸古菌,属于泉古菌门。*Sulfolobus* 是目前能够进行遗传操作的少数古菌之一^[9-11]。*Sulfolobus acidocaldarius* (*S. acidocaldarius*) 是从美国黄石国家公园分离到的一种 *Sulfolobus*, 已开发成功遗传操作系统^[9]。*S. acidocaldarius* 全基因组测序 BLAST 结果表明其含有 IV 型和 V 型 UDG 编码基因^[12]。为了确定 *S. acidocaldarius* 的 IV 型和 V 型 UDG 能否水解 dU 碱基与脱氧核糖间的糖苷键,我们克隆、表达、纯化了 *S. acidocaldarius* 的这两种 UDG, 结果表明二者都具有 UDG 活性,而且 UDGIV 的活性高于 UDGIV, 二者最高酶活性在 65 - 75 °C 范围内。

1 材料和方法

1.1 材料

S. acidocaldarius 菌株为德国马普研究所 Albers 教授馈赠。*S. acidocaldarius* 基因组 DNA 抽提自菌体培养物。表达载体 pET28a, 大肠杆菌菌株 DH5 α 、BL21 (DE3) Rosetta-pLysS 为本实验室保存。用于构建 *S. acidocaldarius* 编码的 IV 型和 V 型 UDG 重组表达载体的引物为上海生工公司合成。用于测定 UDG 活性的 dU 修饰寡核苷酸在 TaKaRa (大连) 公司合成。Ni-NTA 蛋白纯化树脂为 Biorad 公司产品。KOD plus DNA 聚合酶为 Toyobo 公司产品。限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。

1.2 表达载体构建

首先,利用 KOD plus DNA 聚合酶,按 PCR 标准程序扩增 *S. acidocaldarius* *udgIV* 和 *udgV* 基因。PCR 扩增条件:98 °C 3 min;95 °C 0.5 min, 50 °C 0.5 min,72 °C 1 min,30 个循环;72 °C 3 min。利用限制性内切酶克隆方法,把扩增的 *udgIV* 和 *udgV* 基因插入 pET28a 原核表达载体,得到表达载体 pET28-*udgIV* 和 pET28-*udgV*。利用 *Taq* DNA 进行菌落 PCR 鉴定阳性克隆;选取阳性克隆抽提质粒;

送测序公司进行 DNA 序列测定,验证基因序列和表达框是否正确。

1.3 重组蛋白表达纯化

首先将表达载体 pET28-*udgIV* 和 pET28-*udgV* 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) Rosetta-pLysS 感受态细胞。挑取单克隆菌落接种于 25 mL 含卡那霉素和氯霉素的 LB 培养基,37 °C 培养过夜。过夜培养物接种于 300 mL 培养基,30 min 后加入终浓度 0.5 mmol/L 的 IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside, 异丙基硫代半乳糖苷),37 °C 继续培养 3 h, 诱导重组蛋白表达。9600 \times g 离心 5 min 收集菌体沉淀,进行蛋白纯化。将菌体悬浮于 25 mL 裂解缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 300 mmol/L NaCl, 5 mmol/L 咪唑, 10 mmol/L 苯甲基磺酰氟, 10% 甘油), 在冰上超声波裂解菌体。细胞裂解液离心前,在 70 °C 保温 20 min, 失活绝大部分大肠杆菌自身蛋白。在 4 °C 下,12000 \times g 离心 30 min, 收集上清液。上清液流经裂解缓冲液预平衡的 Ni-NTA 树脂 (1 mL); 然后用洗涤缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, 5 mmol/L 苯甲基磺酰氟, 10% 甘油) 洗涤树脂, 除去非特异性结合的杂蛋白; 用 5 mL 洗脱缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟, 10% 甘油) 洗涤树脂, 分部收集 (1.0 mL/管) 目标蛋白。经 SDS-PAGE 检测纯度后, 蛋白在储存缓冲液透析除去咪唑, 置于 -20 °C。利用 Bradford 法测定蛋白浓度。

1.4 DNA 糖苷酶活性测定

尿嘧啶 DNA 糖苷酶活性测定反应缓冲液: 20 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT。dU 损伤底物 TET-dU 碱基序列: 5'-GCTGCAGGAAdUTCGATATCAA-3', 其 5' 末端为荧光分子 TET 标记。测定反应 (10 μ L) 组成如下: 1 \times 反应缓冲液, 150 nmol/L TET-dU, 指定量 UDG。除非特殊说明, 反应在 65 °C 保温 10 min, 然后加入终浓度 50 mmol/L 的 NaOH 溶液, 混匀后在 95 °C 加热 5 min, 最后加入上样缓冲液 (90% formamide, 100 mmol/L EDTA, 0.2% SDS, 10% glycerol)。反应产物经 7 mol/L 尿素 15% 变性聚丙烯酰胺凝胶分离, 凝胶在多功能激光成像仪 Typhoon 9500 中扫描成像和定量分析。

2 结果

2.1 表达载体 pET28-*udgIV* 与 pET28-*udgV* 构建

pET28-*udgIV* 与 pET28-*udgV* 重组表达载体的克隆构建结果见图 1。利用 *S. acidocaldarius* 基因组 DNA 作为模板,成功扩增出了 UDGI V 和 UDGV 的基因片段(图 1,泳道 1,2)。基因片段和 pET28a 载体经限制性内切酶 *Nde* I 和 *Hind* III 消化后,由 T4 DNA 连接酶插入了 pET28a 载体。经菌落 PCR 鉴定,表明构建成功了两种表达载体 pET28-*udgV* (图 1,泳道 3-5) 与 pET28-*udgIV* (图 1,泳道 6,8)。同时 DNA 测序结果表明 UDGI V 和 UDGV 的基因中没有引入任何突变碱基。

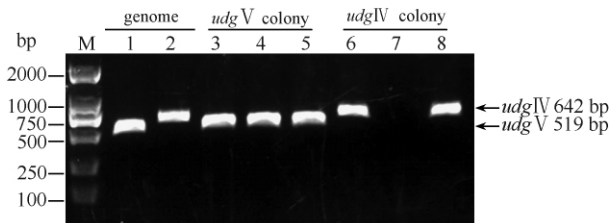


图 1. 嗜酸古菌 *S. acidocaldarius* 尿嘧啶 DNA 糖苷酶表达载体构建

Figure 1. Cloning of *udgIV* and *udgV* from *S. acidocaldarius* into vector of pET28a. The bands corresponding to *udgV* and *udgIV* were marked by two arrows, respectively.

2.2 *S. acidocaldarius* 的 IV 和 V 型 UDG 的表达与纯化

将构建的 pET28-*udgIV* 与 pET28-*udgV* 表达载体在 BL21 (DE3) Rosetta-pLysS 中表达重组 UDGI V 和 UDGV 的表达纯化结果见图 2。图 2 表明 IPTG 诱导表达后, BL21 (DE3) Rosetta-pLysS 可以高效地表达 UDGI V 和 UDGV 重组蛋白。表达的 UDGI V 蛋白 N 端具有来源于载体的 20 个氨基酸(含 6 个组氨酸纯化标签),与 Ni-NTA 树脂上的 Ni^{2+} 离子特异性结合用于亲和纯化。在非变性条件下,通过 Ni-NTA 亲和色谱,从 300 mL 培养液中大约可以得到 5-6 mg UDGI V 和 UDGV 蛋白。15% SDS-PAGE 结果显示 UDGI V 和 UDGV 纯度达电泳纯,通过与蛋白 Marker 比较,估测两种重组蛋白大小分别约为 29.23 kDa,与目的蛋白大小计算值相符。高纯度 UDGI V 和 UDGV 的获得为鉴定二者酶学性质提供了足量蛋白。

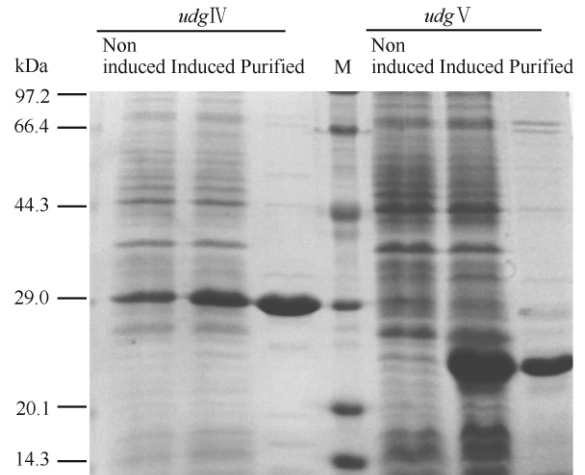


图 2. 嗜酸古菌 *S. acidocaldarius* 编码 IV 和 V 型尿嘧啶 DNA 糖苷酶表达纯化

Figure 2. Expression and purification of *S. acidocaldarius* UDGI V and UDGV.

2.3 *S. acidocaldarius* 编码的 UDGs 具有 dU 切割活性

利用带有 dU 损伤碱基的寡核苷酸作为底物,测定纯化的 UDGI V 和 UDGV 是否能够水解 dU 碱基和脱氧核糖之间的 DNA 糖苷键。*S. acidocaldarius* UDGI V 和 UDGV 水解糖苷键的结果见图 3。从图中可以看出两种 UDGI V 均可以水解 dU 碱基和脱氧核糖之间的 DNA 糖苷键,水解产物之一为无碱基的磷酸脱氧核糖骨架(另一产物为尿嘧啶小分子),磷酸脱氧核糖骨架由于缺少碱基的保护作用,对热碱处理相当敏感,导致 DNA 在磷酸脱氧核糖处断裂成 10 nt 的单链 DNA。将在反应体系为 20 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT 下,65 °C 为催化温度时,每 10 min 切割 1 pmole 底物所需要的酶量定义为 1 个单位 (1U)。则据蛋白浓度梯度活性测定实验推测 UDGI V 比活性约为 1000000 U/mg (1 ng 酶量反应产物量约为 1.0 pmole), UDGV 比活性为 1333 U/mg (300 ng 酶量反应产物量约为 0.4 pmole)。所以 *S. acidocaldarius* UDGI V 的催化效率高于 UDGV,约为 UDGV 的 750 倍。

2.4 反应温度对 UDGs 切割 dU 的影响

由于 *S. acidocaldarius* 的最适生长温度为 75 °C,其编码的蛋白在常温下活性并不高,通常在高温下显示较高的活性。*S. acidocaldarius* UDGI V

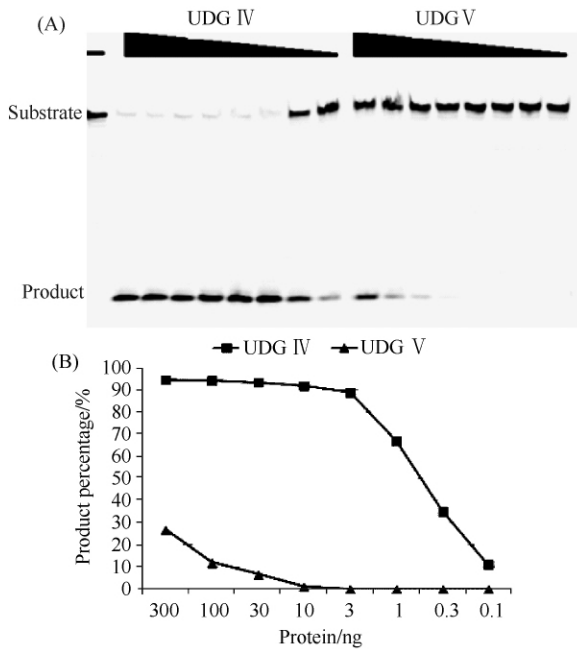


图 3. *S. acidocaldarius* 的 IV 和 V 型 UDGI 的 dU 糖苷键水解活性

Figure 3. Uracil removal activity of UDGI V and UDGV from *S. acidocaldarius*. A: The dU removal by *S. acidocaldarius* UDGI V. B: Quantity analysis of the product band in plat A. Various concentrations of *S. acidocaldarius* UDGI V and UDGV were incubated with 150 mmol/L dU-carrying oligonucleotides of TET-dU in reaction buffer consisting of 20 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT for 10 min at 65 °C. The X-axis is the concentration of UDGI V and Y axis is the percentage of product.

和 UDGV 的最适反应温度优化结果见图 4。从图中可以看出二者均在较高温度下显示了最佳酶活性, 最适温度范围为 65 - 75 °C, 这一最适反应温度与 *S. acidocaldarius* 的生长温度区间相一致。而在低温下, 可能由于蛋白的结构过于紧凑, 不利于底物结合和水解反应的进行, 只表现出较低活性。

3 讨论

S. acidocaldarius 生长在 75 °C 高温环境下, 高温会大大加速碱基水解脱氨基反应, 生成非天然损伤碱基。DNA 碱基水解脱氨基反应包括 dC、dA (deoxyadenine) 水解脱氨基生成 dU、dI (deoxyinosine) 损伤碱基。细胞中最主要的脱氨基损伤是 dU 碱基, 但对极端嗜热微生物而言, dI 损伤也是一种常见的脱氨基损伤。为了研究嗜高温微生物如何应对

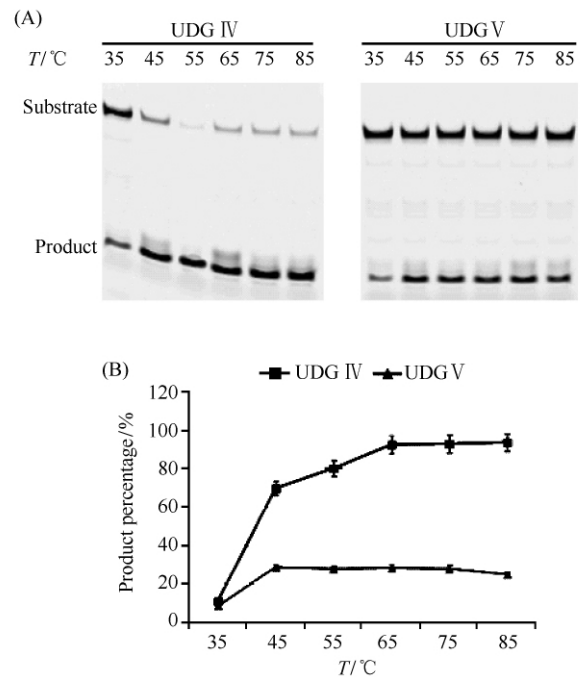


图 4. *S. acidocaldarius* UDGI s 移除 dU 碱基的反应温度曲线

Figure 4. The optimization of reaction temperature for dU removal by *S. acidocaldarius* UDGI V and UDGV. A: Activity of UDGI V in different reaction temperature. B: Quantity analysis of the product band in plat A. *S. acidocaldarius* UDGI V (1 ng/reaction) and UDGV (300 ng/reaction) were incubated with 150 nmol/L dU-carrying oligonucleotides in reaction buffer consisting of 20 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT for 10 min at 35, 45, 55, 65, 75, 85 °C, respectively. The X-axis is the reaction temperature and Y axis is the percentage of product.

碱基脱氨基损伤, 我们克隆了来源于 *S. acidocaldarius* 可能参与这一损伤过程的多种蛋白的编码基因。除了尿嘧啶 DNA 糖苷酶 UDGI 外, 这些修复蛋白还包括: 修复 dI 损伤的内切核酸酶 V 和 DNA 糖苷酶 AlkA^[13-14]、具有脱氨基碱基探测识别功能的 B1 和 B3 型 DNA 聚合酶等^[15-16], 以及负责清除尿嘧啶脱氧核糖核苷三磷酸的水解酶 dUPTase 等^[7]。通过体外研究这些蛋白修复 dU、dI 损伤碱基的酶促反应机制, 并结合基因敲除等分子遗传学手段, 研究结果将有助于阐明嗜热微生物如何处理、应对、适应高温生存环境的生理生化机制。

本研究表明 *S. acidocaldarius* 编码的 IV 和 V 型 UDGI 都能够水解 dU 和脱氧核糖之间糖苷键。这一结果也提示二者均在细胞内负责 dU 损伤碱基的切除, 并且可能与碱基切除修复反应的其它修复蛋白

间存在相互作用,并一起协调完成整个修复反应。虽然 UDGI 和 UDG 都具有 dU 切割活性,但二者在细胞内的功能分工方式还有待进一步研究。这些问题的阐明有赖于构建 *S. acidocaldarius* 的 *udgIV* 和 *udgV* 的基因删除突变株,测定突变株 dU 损伤修复表型的变化,确定 UDGI 和 UDG 在 dU 修复中的贡献程度。

参考文献

- [1] Lindahl T, Nyberg B. Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 1974, 13(16): 3405-3410.
- [2] Varshney U, Hutcheon T, van de Sande JH. Sequence analysis, expression, and conservation of *Escherichia coli* uracil DNA glycosylase and its gene (*ung*). *The Journal of Biological Chemistry*, 1988, 263(16): 7776-7784.
- [3] Kiyonari S, Tahara S, Shirai T, Iwai S, Ishino S, & Ishino Y. Biochemical properties and base excision repair complex formation of apurinic/aprimidinic endonuclease from *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic Acids Reserach*, 2009, 37(19): 6439-6453.
- [4] Sartori AA, Schär P, Fitz-Gibbon S, Miller, JH, Jiricny J. Biochemical characterization of uracil processing activities in the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(32): 29979-29986.
- [5] Sartori AA, Fitz-Gibbon S, Yang H, Miller JH, Jiricny J. A novel uracil-DNA glycosylase with broad substrate specificity and an unusual active site. *The EMBO Journal*, 2002, 21(12): 3182-3191.
- [6] Yang H, Fitz-Gibbon S, Marcotte EM, Tai JH, Hyman EC, Miller JH. Characterization of a thermostable DNA glycosylase specific for U/G and T/G mismatches from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(5): 1272-1279.
- [7] Hogrefe HH, Hansen CJ, Scott BR, & Nielson KB. Archaeal dUTPase enhances PCR amplifications with archaeal DNA polymerases by preventing dUTP incorporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(2): 596-601.
- [8] Sakai T, Tokishita S, Mochizuki K, Motomiya A, Yamagata H, Ohta T. Mutagenesis of uracil-DNA glycosylase deficient mutants of the extremely thermophilic eubacterium *Thermus thermophilus*. *DNA Repair*, 2008, 7(4): 663-669.
- [9] Wagner M, M van Wolferen, Wagner A, Lassak K, Meyer BH, Reimann J, Albers SV. Versatile Genetic Tool Box for the Crenarchaeote *Sulfolobus acidocaldarius*. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 214.
- [10] Zheng T, Huang Q, Zhang C, Ni J, She Q, Shen Y. Development of a simvastatin selection marker for a hyperthermophilic acidophile, *Sulfolobus islandicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(2): 568-574.
- [11] Deng L, Zhu H, Chen Z, Liang YX, She Q. Unmarked gene deletion and host-vector system for the hyperthermophilic crenarchaeon *Sulfolobus islandicus*. *Extremophiles*, 2009, 13(4): 735-746.
- [12] Chen L, Brügger K, Skovgaard M, Redder P, She Q, Torarinsson E, Garrett RA. The genome of *Sulfolobus acidocaldarius*, a model organism of the Crenarchaeota. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(14): 4992-4999.
- [13] Hitchcock TM, Gao H, Cao W. Cleavage of deoxyoxanosine-containing oligodeoxyribonucleotides by bacterial endonuclease V. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(13): 4071-4080.
- [14] Mansfield C, Kerins SM, McCarthy TV. Characterisation of *Archaeoglobus fulgidus* AlkA hypoxanthine DNA glycosylase activity. *FEBS Letters*, 2003, 540(1/3): 171-175.
- [15] Fogg MJ, Pearl LH, Connolly BA. Structural basis for uracil recognition by archaeal family B DNA polymerases. *Nature Structural Biology*, 2002, 9(12): 922-927.
- [16] Greagg MA, Fogg MJ, Panayotou G, Evans SJ, Connolly BA, Pearl LH. A read-ahead function in archaeal DNA polymerases detects promutagenic template-strand uracil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(16): 9045-9050.

Cloning, expression, purification and characterization of two uracil-DNA glycosylases from *Sulfolobus acidocaldarius*

Jing Wang^{1,2}, Gangshun Yi¹, Jie Ou², Jianhua Liu¹, Xipeng Liu^{1*}

¹State Key Laboratory of Microbial Metabolism & School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

²College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: [Objective] To characterize uracil-DNA glycosylase from acidophilic and thermophilic *Sulfolobus acidocaldarius*. [Methods] We cloned *udgIV* and *udgV* genes from *S. acidocaldarius*, expressed the two recombinant UDG proteins in *E. coli* species BL21 (DE3) Rosetta-pLysS, purified the recombinant UDGs and characterized the removal of dU by UDGs. [Results] We successfully expressed two *S. acidocaldarius* UDGs and found both UDGs having the activity of dU removal. In comparison to UDG_V, UDG_{IV} was more efficient in dU removal, with a 750-fold activity. [Conclusion] In comparison to UDG_V, UDG_{IV} from *S. acidocaldarius* was a more efficient enzyme responsible for the removal of dU from DNA *in vitro*.

Keywords: Archaea, *Sulfolobus acidocaldarius*, dU (deoxyuracil) damage, DNA repair, uracil-DNA glycosylase

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (J1210047) and by the Shanghai Municipal Natural Science Foundation (12ZR1413700)

* Corresponding author. Tel: +86-21-34204787; E-mail: xpliu@sjtu.edu.cn

Received: 2 October 2014/Revised: 11 March 2015