



Sulfolobus acidocaldarius DNA 聚合酶 IV 跨越损伤合成能力的酶学特征

王伟玮, 王风平, 刘喜朋*

上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

摘要:【目的】以嗜酸嗜热硫化叶菌 *Sulfolobus acidocaldarius* 的 DNA 聚合酶 IV (Saci_0554) 为例, 表征其跨越模板上损伤碱基的 DNA 合成效果。【方法】将 DNA 聚合酶 IV (SacpolIV) 在大肠杆菌中进行重组表达, 经亲和层析纯化得到 SacpolIV 蛋白; 利用人工合成的带有不同损伤的寡核苷酸片段作为模板 DNA, 用尿素变性聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 鉴定 SacpolIV 在体外跨越各种损伤碱基进行跨损伤合成的催化能力。【结果】SacpolIV 重组蛋白能够不同程度地跨越嘌呤和嘧啶损伤, 跨越能力的高低取决于损伤碱基与正常碱基形成氢键的能力。本研究还发现, SacpolIV 能够在 DNA 链中掺入核糖核苷酸, 但掺入核糖核苷酸的效率低于脱氧核糖核苷酸。【结论】本研究证实 SacpolIV 具有很强的跨越损伤合成能力, 能够跨越多种氢键配对能力减弱的损伤碱基, 为其在细胞内的跨越损伤合成功能提供了生化证据。

关键词: 嗜热古菌, 嗜酸嗜热硫化叶菌, DNA 聚合酶 IV, 跨越损伤合成, 损伤碱基

DNA 损伤主要是指由环境中物理和化学因素引起 DNA 化学结构的改变, 对细胞有潜在的诱变和毒害作用。DNA 损伤主要包括: 碱基的氧化、烷基化、水解脱氨、碱基水解脱落等单碱基损伤, 碱基错配、DNA 链的断裂与交联等多碱基损伤^[1-2]。每个哺乳动物细胞每天会自发地产生大约 3.0×10^4 个 DNA 损伤^[2]。DNA 损伤能够阻止 DNA 复制, 破坏细胞基因组的完整性和稳定性, 严重的 DNA 损伤会导致细胞的死亡或疾病的产生。生物体细

胞在进化的过程中, 形成了两种应对 DNA 损伤的策略: DNA 损伤修复(DNA damage repair)和 DNA 损伤容忍(DNA damage tolerance)^[3-5]。DNA 损伤修复指通过 DNA 修复酶修复损伤, 从而保证 DNA 复制继续进行。DNA 损伤修复能够清除大多数类型的 DNA 损伤, 包括碱基切除修复(Base excision repair)、直接修复(Direct reversal)、核苷酸切除修复(Nucleotide excision repair)、错配修复(Mismatch repair)、同源重组修复(Homologous recombination

基金项目: 国家自然科学基金(31371260)

*通信作者。Tel: +86-21-34204378; Fax: +86-21-34207205; E-mail: xpliu@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2018-04-23; 修回日期: 2018-05-22; 网络出版日期: 2018-06-25

repair)等多种修复途径^[6-7]。DNA 损伤容忍, 也称为 DNA 损伤跨越, 指当 DNA 损伤在逃脱上述损伤修复系统后, 细胞中具有跨越损伤能力的酶绕过 DNA 链中的这些损伤继续复制, 随后再通过 DNA 修复系统将这些损伤切除, 从而保证了 DNA 复制的持续性^[8-9]。DNA 损伤容忍主要通过两种途径来实现: 错误避免型途径(The error-free pathways)与错误倾向型途径(The error-prone pathways)^[9]。错误避免途径通常指跨越损伤合成(Trans-lesion synthesis, TLS)聚合酶能够掺入与损伤碱基正确配对的脱氧核糖核苷酸^[10]; 错误倾向型途径(The error-prone pathways)是指特定的 TLS 型 DNA 聚合酶利用损伤的 DNA 模板进行易错倾向 DNA 复制。与复制型 DNA 聚合酶严格遵循碱基互补配对原则不同, TLS 聚合酶并不完全遵守氢键配对规则^[10]。TLS 聚合酶具有超柔性的催化中心, 同时缺少外切酶校对活性, 这些特征能够允许其在损伤模板指导下掺入非严格配对的脱氧核糖核苷酸。虽然 TLS 型 DNA 聚合酶的这种特性有产生突变的危险, 但由于其催化效率和持续合成能力均较低, 因此它们结合或停留在复制叉上仅仅执行几个碱基对的合成, 反而有利于损伤 DNA 的复制^[7,11-12]。

TLS 聚合酶多属于 Y 家族 DNA 聚合酶^[9-10]。根据氨基酸序列差异, Y 家族 DNA 聚合酶主要包括六大类: 原核生物 DNA 聚合酶 IV(也称为 DinB)与 DNA 聚合酶 V(其催化中心为 UmuC 亚基), 真核生物的四类 TLS 型 DNA 聚合酶 pol η 、pol ι 、pol κ 以及 Rev1^[3-4]。Y 家族 DNA 聚合酶无 3'→5'外切酶校正活性, 其 DNA 合成忠实性、聚合效率、持续合成能力均较低^[4]。Y-家族的 DNA 聚合酶具有 2 个功能区: 由 350–500 个氨基酸残基组成的催化结构域、由 10–600 个氨基酸残基组成的调控结构

域^[13]。不同亚类 Y 型 DNA 聚合酶可有效跨越的 DNA 损伤类型不同。大肠杆菌的 UmuC 和人的 pol η 能够跨越嘧啶二聚体损伤^[14-16]。大肠杆菌的 DinB、古菌的 Dpo4 以及真核生物的 pol κ 能够有效地跨越环境污染形成的 DNA 加合物(如 N2-dG 加合物)^[17-19]。人的 Rev1 特异性地掺入 dCMP 到模板中的脱碱基位点、模板 G、少数 DNA 加合物以及部分 UV 损伤^[4,20-21]。人的 pol η 、pol ι 和 Rev1 以及古菌的 Dpo4 和 Dbh 均能够跨越细胞内常见的 7,8-二氢-8-氧脱氧鸟苷(7,8-dihydro-8-oxo-deoxyguanosine, 8-oxo-dG)损伤^[22-25]。古菌的 Dpo4 还能够跨越脱碱基位点^[26-27]。

嗜酸嗜热硫化叶菌 *Sulfolobus acidocaldarius*, 能够在 75 °C、pH 2.0–4.0 的条件下以相对较低的突变率生存^[28-30], 因此该古菌被人们作为研究高温条件下维持基因组完整性的经典模式菌株之一。前人报道在 *S. acidocaldarius* 中共有 3 种 DNA 聚合酶, 分别为 DNA 聚合酶 IV (Saci_0554)、DNA 聚合酶 B1 (Saci_1537)、DNA 聚合酶 B3 (Saci_0074), 其中聚合酶 B1 和 B3 同时具有 DNA 聚合酶和 3'外切酶活性, 但是聚合酶 B1 的活性显著高于聚合酶 B3^[31]。嗜热嗜酸古菌的 TLS 聚合酶 IV, 包括来自 *Sulfolobus solfataricus* 的 Dpo4 和来自 *Sulfolobus acidocaldarius* 的 Dbh, 为大肠杆菌 DinB 和真核 pol κ 的同源蛋白^[13]。*S. acidocaldarius* DNA 聚合酶 IV (SacpolIV, Dbh)作为 Y 家族的一员, 具有 TLS 聚合酶活性, 它能够跨越脱嘌呤/脱嘧啶位点(AP site)类似物^[31-32]和 8-oxo-dG 两种损伤^[33]。SacpolIV 对其他类型 DNA 损伤的跨越合成能力尚不清楚。因此, 本文主要研究了 SacpolIV 对各种碱基损伤的跨越合成能力, 分析了其对不同损伤跨越能力差异的原因, 为 DNA 聚合酶 IV 的研究提供了新的启示。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验所用的 *S. acidocaldarius* 菌株为德国马普研究所 Albers 教授馈赠, *S. acidocaldarius* 基因组 DNA 抽提于其菌体培养物。表达载体 pET28a, 大肠杆菌菌株 DH5 α 、BL21(DE3)pLysS 均为本实验室保存。用于扩增 *SacpolIV* 基因的引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。用于测定聚合酶活性的损伤寡核苷酸底物由上海 Biosune 公司合成, 底物序列见表 1。PrimSTAR DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNA Ladder、蛋白 Marker、限制性内切酶购自 TaKaRa 公司。基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化和胶回收试剂盒、Brandford 蛋白浓度测定试剂盒及其他生化试剂均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。Ni-NTA 蛋白纯化树脂为 Bio-Rad 公司产品。

1.2 表达载体构建

以 *S. acidocaldarius* 基因组 DNA 作为模板, 利用 KOD plus DNA 聚合酶, 扩增 DNA 聚合酶 IV 基因。正向引物序列为 5'-TGAAACATATGATAGTG ATATTCGTTGATTT-3'; 反向引物序列为 5'-TTGCT TCGGGATCCTTAAATGTCGAAGAAATCAG-3'。

PCR 扩增条件为 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 3 min。PCR 产物经 PCR 产物纯化试剂盒纯化。用 *Nde* I 和 *Bam*H I 消化基因产物和 pET28a 质粒, 再用 T4 DNA 连接酶连接基因片段和线性化的 pET28a 质粒, 取连接产物转化入大肠杆菌 DH5 α , 挑取单克隆菌落 PCR 鉴定阳性克隆, 并进行 DNA 测序, 确定 DNA 聚合酶 IV 的基因序列是否准确无误, 最终获得表达载体 pET28-SacpolIV。

1.3 重组蛋白的诱导表达和纯化

将表达载体 pET28-SacpolIV 转入大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 感受态细胞中, 菌体逐步扩大培养至 200 mL 液体 LB (含 50 μ g/mL 卡那霉素)培养基中。待 OD_{600} 达到 0.6–0.8 时, 加入终浓度 0.5 mmol/L 的 IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactoside, 异丙基硫代半乳糖苷), 20 °C 培养 16 h, 诱导重组蛋白表达。将菌体沉淀悬浮于 30 mL 裂解缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 300 mmol/L NaCl, 2 mmol/L PMSF, 10%甘油)。按如下条件冰上超声裂解细菌: 600 W 功率下超声 3 s, 间歇 2 s, 共超声裂解 30 min。将细胞裂解液 70 °C 温育 20 min, 失活绝大部分大肠杆菌自身蛋白(SacpolIV 为热稳定性蛋白), 在 4 °C 下 8000 r/min 离心 30 min, 收集

表 1. 跨越损伤合成活性底物序列

Table 1. Substrates used for analyzing translesion synthesis activity

Sequences (5'→3')	Damages	Comments
GTCTCACT <u>I</u> AGCCGACTCGCCACAGT	No damage	Normal strand
GTCTCACT <u>X</u> AGCCGACTCGCCACAGT	X=8-amino-dA	
GTCTCACT <u>X</u> AGCCGACTCGCCACAGT	X=Formyl indole	
GTCTCACT <u>X</u> AGCCGACTCGCCACAGT	X=5-Nitroindole	Damaged purines
GTCTCACT <u>X</u> AGCCGACTCGCCACAGT	X=3-Deaza-dA	
GTCTCACT <u>X</u> AGCCGACTCGCCACAGT	X=N4-ethyl-dC	
GTCTCACT <u>X</u> AGCCGACTCGCCACAGT	X=N3-Cyanoethyl-dT	Damaged pyrimidines
GTCTCACT <u>X</u> AGCCGACTCGCCACAGT	X=2'-deoxyZebularine	
FAM-ACTGTGGCGAGTCGGCT		Primer strand

上清液。预先用 5 倍树脂体积的裂解缓冲液平衡 Ni-NTA 树脂 30 min。将上清液倒入平衡好的树脂中, 然后分别用含 10、20、40 mmol/L 咪唑的裂解缓冲液梯度洗涤树脂, 除去非特异性结合的杂蛋白, 再用 5 mL 洗脱缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 300 mmol/L NaCl, 300 mmol/L 咪唑, 1 mmol/L PMSF, 10%甘油)洗脱目标蛋白, 1 mL/管分步收集。通过 SDS-PAGE 检测纯度后, 透析法除去咪唑, 并最终交换到储存缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 100 mmol/L NaCl, 50%甘油)中, 于-20 °C 保存。Bradford 法测定蛋白浓度。

1.4 SacpolIV 跨越损伤活性测定与比较

用于制备 DNA 聚合酶底物的寡核苷酸片段见表 1, 其中, X 代表损伤碱基, FAM 是指荧光标记。将 5'FAM 标记的引物链与模板链按分子数比 1.0:1.2 混合于退火缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 50 mmol/L NaCl)后, 在 80 °C 加热 5 min, 自然降温至室温, 退火形成双链底物。配好的底

物于-20 °C 避光储存。SacpolIV 的 DNA 聚合反应体系(10 μ L)包括: 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5), 50 mmol/L KCl, 2.0 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT, 100 ng/ μ L BSA, 100 nmol/L 荧光标记底物, 10 μ mol/L dNTP 混合物或单一 dNTP, 20 nmol/L DNA 聚合酶。45 °C 反应指定时间, 加入 10 μ L 反应终止液(95%甲酰胺, 100 mmol/L EDTA, 0.2% SDS, 0.02%溴酚蓝)。利用 8 mol/L 尿素 15%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离反应底物与产物。电泳结束后将凝胶在多功能激光成像仪 Typhoon FLA 9500 (通用电器公司)中扫描成像和分析。

2 结果和分析

2.1 SacpolIV 表达纯化及活性鉴定

SacpolIV 的表达纯化结果见图 1-A。在 20 °C 经 IPTG 低温诱导过夜后, 再经镍柱亲和层析纯化, 从 300 mL 培养液中可以得到大约 1 mg 的 SacpolIV 蛋白。15% SDS-PAGE 检测结果表明,

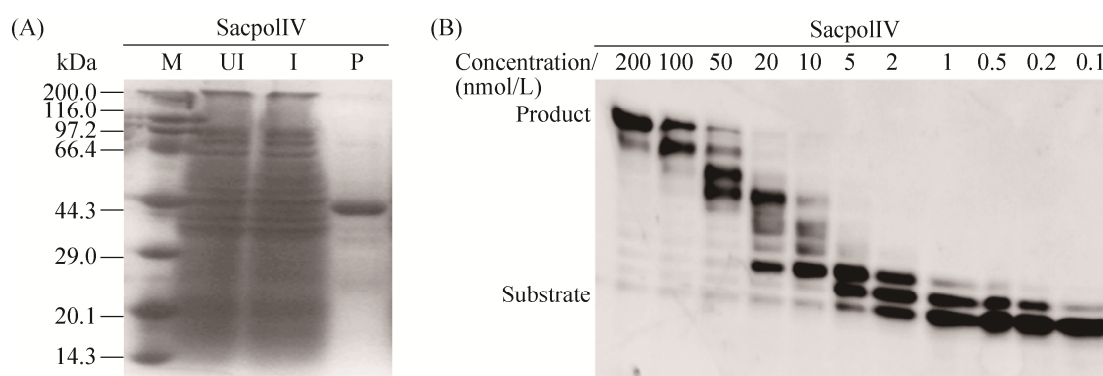


图 1. SacpolIV 的表达纯化和酶活性滴定

Figure 1. Expression and purification of SacpolIV and activity titration. A: 15% SDS-PAGE analysis of recombinant SacpolIV recovered from induced *E. coli* cells. The gel was stained with Coomassie blue R-250. Lane M, molecular weight marker; lane P, purified recombinant SacpolIV; lanes I and UI denote induced and uninduced *E. coli* total proteins. B: Activity titration of SacpolIV. The reaction mixtures contained 100 nmol/L primer-template substrate, 10 μ mol/L dNTP, and increasing SacpolIV in reaction buffer consisted of 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.5, 50 mmol/L KCl, 2.0 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT and 100 ng/ μ L BSA. The reactions were performed at 45 °C for 5 min.

蛋白的纯度达到 90%以上, 通过与蛋白 Marker 比较, SacpolIV 的分子量约为 40.0 kDa, 与其理论计算值(40.0 kDa)相符。在反应体系中加入不同浓度的 SacpolIV, 在 45 °C 反应 5 min, 引物延伸结果如图 1-B。结果表明 SacpolIV 具有 DNA 聚合酶活性, 不具有 polB1、polB3 的外切酶活性^[33]。在后续 SacpolIV 跨越各种损伤模板的活性测定中, SacpolIV 的酶浓度为 20 nmol/L。

2.2 *S. acidocaldarius* 聚合酶 IV 对不同嘧啶损伤的跨越能力的比较

利用带有不同损伤嘧啶碱基的寡核苷酸作为

模板, 鉴定 SacpolIV 对嘧啶碱基损伤的跨越能力。嘧啶碱基损伤的单核苷酸结构与正常碱基对 C:G 间的氢键配对准则见图 2-A, SacpolIV 对不同嘧啶损伤的跨越能力见图 2-B。从图中可以看出, SacpolIV 对嘧啶损伤的跨越能力差异较大, 跨越效率依次为 N4-ethyl-dC>N3-Cyanoethyl-dT>2'-deoxyZebularine。SacpolIV 对 N4-ethyl-dC 的跨越能力较强, 反应 30 min 能够合成全长的 DNA 链; 对 N3-Cyanoethyl-dT 和 2'-deoxyZebularine 的跨越能力很弱, 基本上不能进行跨越损伤合成。在此基础上研究了 SacpolIV 跨越嘧啶损伤时, 新

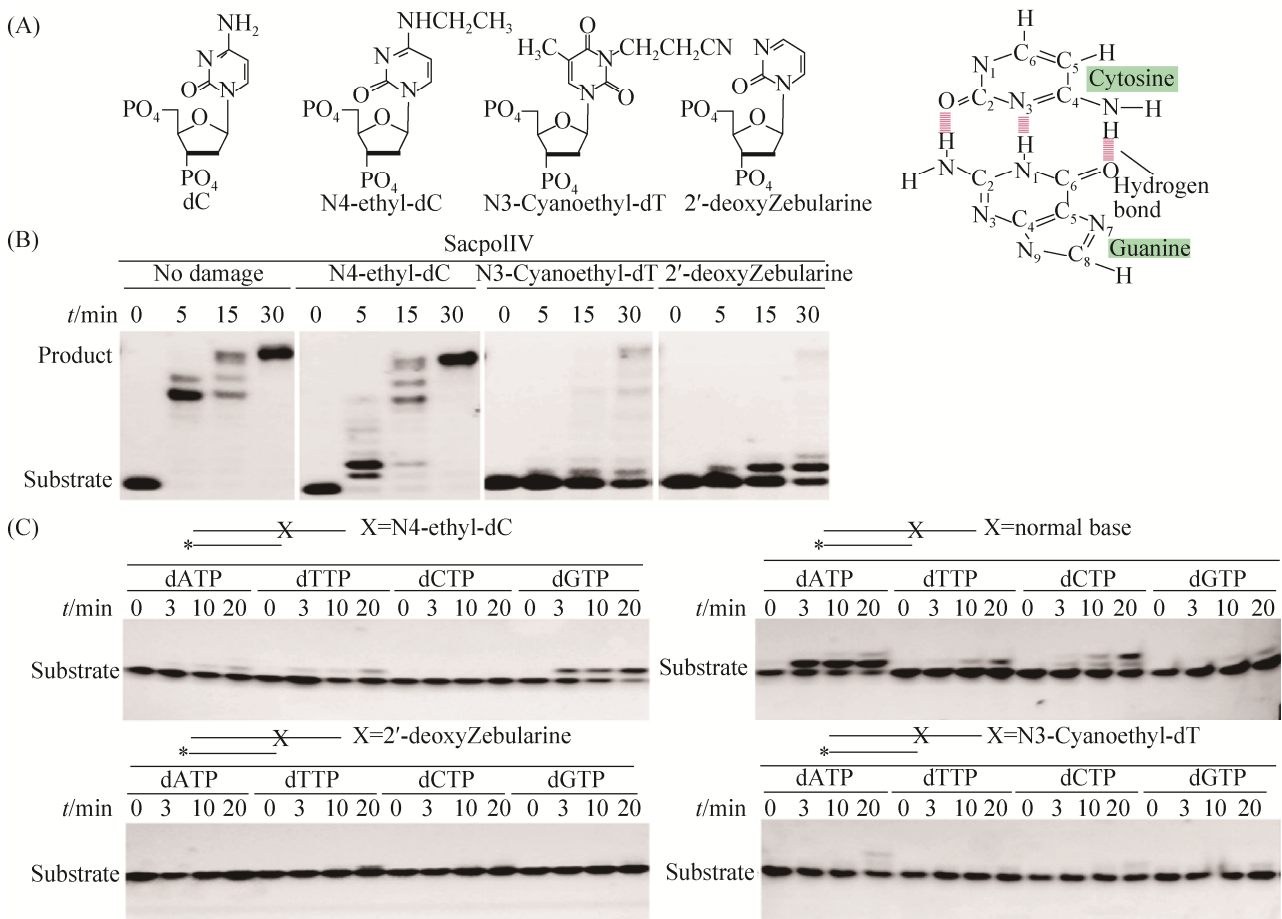


图 2. SacpolIV 对不同嘧啶损伤的跨越合成特征

Figure 2. Characteristics of SacpolIV translesion synthesis to different damages on pyrimidine. A: the structure of normal purine and damaged pyrimidines in mononucleotide; B: the characteristic of SacpolIV translesion synthesis with dNTP; C: the characteristic of SacpolIV translesion synthesis with dATP, dTTP, dCTP and dGTP.

掺入核苷酸与损伤嘧啶碱基之间的碱基配对特性, 结果见图 2-C。结果表明含 N4-ethyl-dC 损伤的寡核苷酸为模板时, N4-ethyl-dC 与 dG 优先配对, 以 dGMP 形式掺入 DNA 中。4 种核苷三磷酸的利用效率为: dGTP>dATP≈dTTP>dCTP。该结果表明 N4-ethyl-dC 损伤碱基并未改变碱基配对原则, 与正常碱基 dC 的碱基配对原则一致。当以含 N3-Cyanoethyl-dT 损伤的寡核苷酸作为模板时, N3-Cyanoethyl-dT 与 dA 优先配对, 以 dAMP 形式掺入 DNA 中, 4 种核苷三磷酸的利用效率: dATP>

dCTP>dGTP>>dTTP; 当以含 2'-deoxyZebularine 损伤的寡核苷酸为模板时, 4 种碱基都很难与损伤碱基配对, 导致任一种 dNMP 都不能被有效掺入引物链。

2.3 *S. acidocaldarius* 聚合酶 IV 对不同嘌呤损伤的跨越能力的比较

利用带有不同嘌呤损伤碱基的寡核苷酸作为底物, 比较 SacpolIV 对不同嘌呤损伤的跨越能力。嘌呤损伤单核苷酸结构与正常碱基对 T:A 间的氢键配对准则见图 3-A, SacPolIV 对不同嘌呤损伤

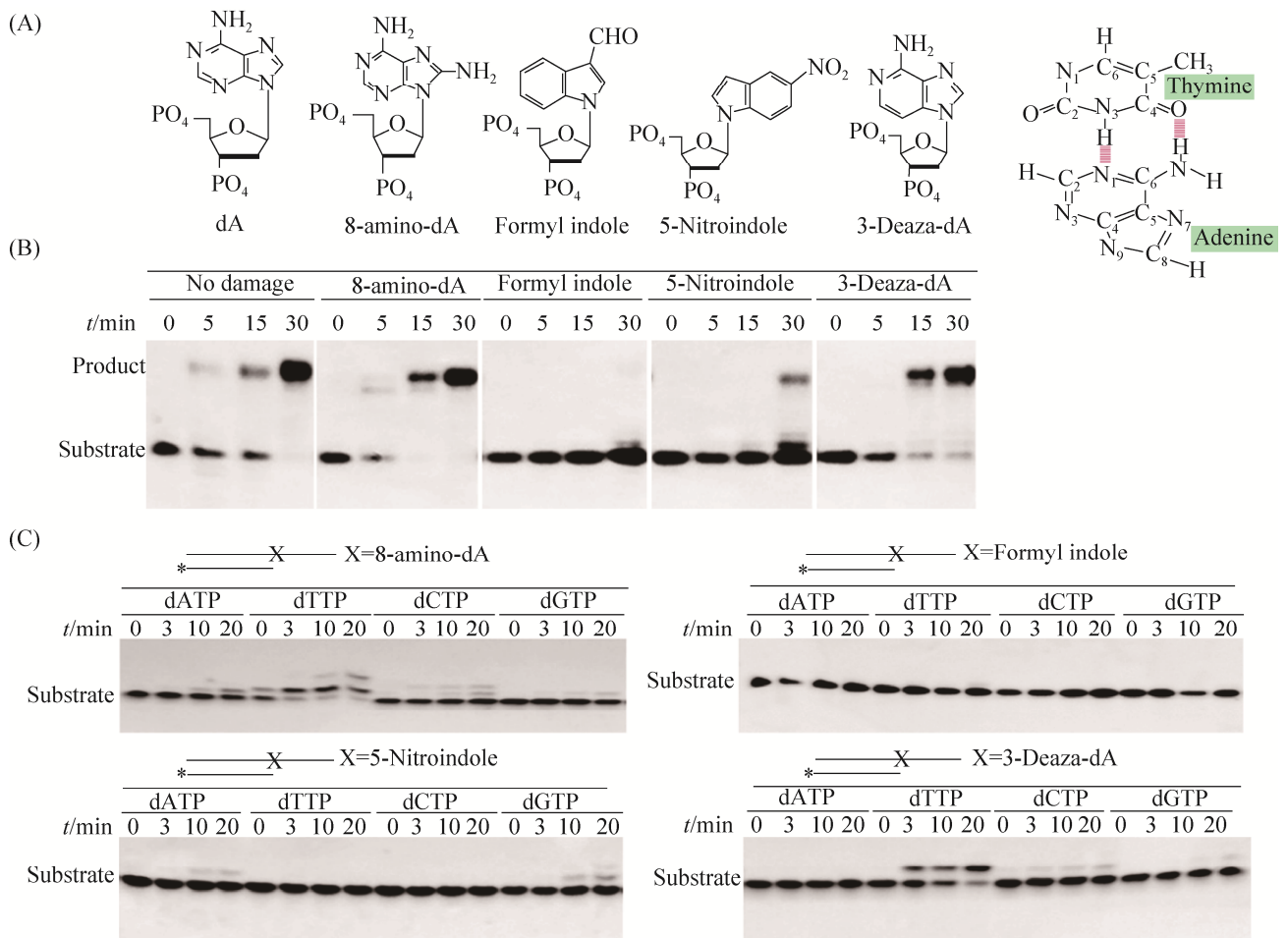


图 3. SacpolIV 对不同嘌呤损伤的跨越合成特征

Figure 3. Characteristics of SacpolIV translesion synthesis to different damages on purine. A: The structure of normal purine and damaged purines in mononucleotide; B: The characteristic of SacpolIV translesion synthesis with dNTP; C: The characteristic of SacpolIV translesion synthesis with dATP, dTTP, dCTP and dGTP.

的跨越情况见图 3-B。从图中可以看出, SacpolIV 对 4 种嘌呤损伤的跨越能力差异巨大, 跨越顺序为 8-amino-dA>3-Deaza-dA>5-Nitroindole>Formyl indole。SacpolIV 对 8-amino-dA、3-Deaza-dA 的跨越能力很强, 对 5-Nitroindole 的跨越能力很弱, 对 Formyl indole 基本没有跨越合成能力。

在确定跨越损伤合成能力的基础上, 进一步研究了 SacpolIV 跨越嘌呤损伤时, 新掺入碱基与模板上损伤嘌呤碱基间的配对规律, 结果见图 3-C。当以含 8-amino-dA 损伤的寡核苷酸为模板时, 8-amino-dA 损伤的碱基配对规则与正常 dA 碱基相同, 4 种核苷三磷酸的利用效率: dTTP>dCTP>dATP>dGTP, 即 8-amino-dA 与 dT 优先配对, 以 dTMP 形式掺入 DNA 中。3-Deaza-dA 损伤的碱基配对原则也未发生改变, 3-Deaza-dA 与 dT 优先配对, 以 dTMP 形式掺入 DNA 中, 4 种核苷三磷酸的利用效率为 dTTP>dCTP>dGTP>dATP。5-Nitroindole 损伤与新掺入核苷酸的配对特性没有表现出明显的选择性, 与 4 种碱基都能够低效配对, 导致 4 种核苷三磷酸的利用效率总体都很低, 具体顺序为: dTTP>dCTP>dATP>dGTP。Formyl indole 损伤的寡核苷酸为模板时, 4 种

dNTP 都很难被利用, 不能以 dNMP 形式掺入引物链 3'末端。

2.4 *S. acidocaldarius* 聚合酶 IV 掺入 dNMP 与 rNMP 能力的比较

在正常细胞内, DNA 聚合酶能够特异性识别脱氧核糖核苷三磷酸 dNTP, 并聚合成 DNA; RNA 聚合酶特异性识别核糖核苷三磷酸 rNTP, 聚合成 RNA。核糖的 2'位为-OH, 而脱氧核糖为-H, 正常的脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸结构见图 4-A。大多数的 DNA 聚合酶只能够利用 dNTP, 但酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) polIV 除了能够利用 dNTP 外, 还能够利用 rNTP^[34]。以正常的 DNA 链为模板, 加入各种单一的 dNTP 和 rNTP, 检测 SacpolIV 掺入 dNMP 与 rNMP 的能力, 即 SacpolIV 区别核糖与脱氧核糖的能力, 结果见图 4-B。可以看出 SacpolIV 优先利用 dNTP, 但也能够在一定程度上利用 rNTP, 按照 C:G、T/U:A 配对原则延伸引物链。4 种 rNTP 中, rGTP 与 rUTP 的利用效率高于 rATP 与 rCTP, 总体顺序为 rGTP≈rUTP>rCTP>rATP。另外, 由于模板链 T 中第 2 个碱基也为 T, 因此当加入正常 dATP 时, 会连续掺入 2 个 dAMP。

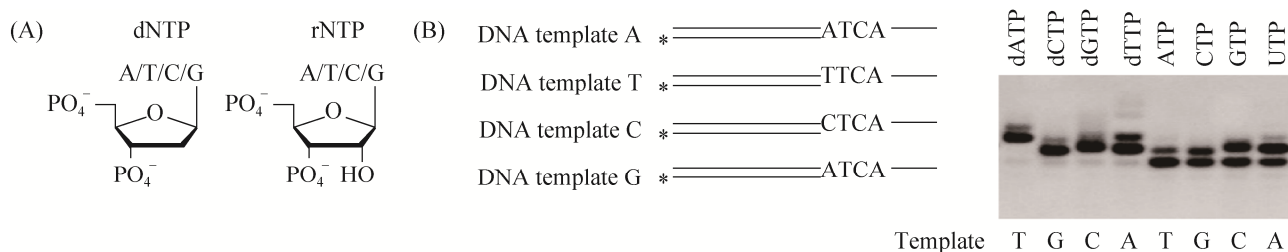


图 4. SacpolIV 掺入 dNTP/rNTP 的效率比较

Figure 4. Primer extension by SacpolIV with dNTP and rNTP. A: the structure of normal dNTP and rNTP; B: the incorporation of dNMP and rNMP by SacpolIV.

3 讨论

鉴于 SacpolIV 作为古菌 TLS 型 DNA 聚合酶, 本文重点研究了其跨越不同嘧啶损伤(N4-ethyl-dC, N3-Cyanoethyl-dT, 2'-deoxyZebularine)和嘌呤损伤(8-amino-dA, Formyl indole, 5-Nitroindole, 3-Deaza-dA)以及利用核糖核苷三磷酸 rNTP 的能力。相比非 TLS 型 DNA 聚合酶, SacpolIV 对 DNA 模板链上的嘌呤或嘧啶损伤具有很强的跨越能力。其中嘧啶损伤 N4-ethyl-dC 的氢键成键氨基的 1 个氢被乙基取代(图 2-A), 导致成键能力减弱, 造成被 SacpolIV 跨越效率低于正常碱基 dC (图 2-B), 但并未改变与正常碱基 dG 的氢键配对原则(图 2-C)。N3-Cyanoethyl-dT 的 3 位氢键成键氮原子上的氢被氰乙基取代, 2'-deoxyZebularine 的 2 位碳所连接的氢键成键氧原子缺失, 这些改变破坏了二者与 dA 间氢键的形成, 因此 SacpolIV 跨越 N3-Cyanoethyl-dT 与 2'-deoxyZebularine 的能力极弱。8-amino-dA 的腺嘌呤环 8 位碳原子上多一个氨基, 但 8 位氨基并不参与氢键配对, 因此 8-amino-dA 能够被 SacpolIV 有效跨越(图 3-B); 且 8-amino-dA 与 dTTP 优先配对形成氢键(图 3-C), 表明 8-amino-dA 损伤类似于 dA。3-Deaza-dA 的腺嘌呤环的 3 位的氮原子换成了碳原子, 该改变并未涉及氢键配对, 因此 3-Deaza-dA 也能够以 3-Deaza-dA:T 碱基对形式被 SacpolIV 有效跨越(图 3-B, 3-C), 即 3-Deaza-dA 损伤也类似于 dA。Formyl indole 和 5-Nitroindole 分别为甲酰基吲哚和 5-硝基吲哚, 这两种损伤的碱基结构发生了巨大变化(图 3-A), 无法形成配对氢键, 因此, SacpolIV 跨越这两种损伤的能力极其微弱。复制型 DNA 聚合酶只能利用 dNTP, 利用 rNTP 的能力极低。不同于酿酒酵母的 polIV 高效利用 rNTP^[36], SacpolIV

利用 rNTP 的能力较低, 且 rNTP 利用效率显著低于 dNTP。该结果对研究 DNA 与 RNA 聚合酶的核糖区分机制和特性具有一定借鉴意义。

尽管各种 Y 型 DNA 聚合酶都具有跨越损伤合成能力, 负责细胞内的 TLS 修复; 但它们有着不同的损伤选择性。SacpolIV 能够跨越 8-oxo-dG 和 AP 位点类似物, 但不能跨越 UV 照射形成的嘧啶二聚体损伤^[31-33], 而大肠杆菌的 UmuC 和人的 polη 能够高效跨越嘧啶二聚体^[14-16]。S. acidocaldarius 生存在酸性热泉等极端环境中, 该环境导致嘧啶二聚体损伤的频率较低, 而氧化损伤 8-oxo-dG 和脱碱基(AP 位点)损伤含量非常高。由此推断, SacPolIV 在进化出高效跨越 8-oxo-dG 和 AP 位点损伤的基础上, 由于很少遇到跨越嘧啶二聚体的需求, 所以在进化过程中失去了跨越嘧啶二聚体的能力。此外, 尽管 S. acidocaldarius 和 S. solfataricus 同属于硫化叶菌属, 但 S. solfataricus 的 Dpo4 跨越 AP 位点的能力大大强于 S. acidocaldarius 的 SacPolIV^[36]。虽然 SacpolIV 可以跨越不能够形成正常氢键配对的 AP 位点, 但对于同样不能形成氢键配对的 N3-Cyanoethyl-dT、2'-deoxyZebularine、Formyl indole、5-Nitroindole 这 4 种碱基, SacpolIV 的跨越能力极弱, 这表明其跨越这 4 种碱基的机制与 AP 位点不同。由于 AP 位点不能够指导碱基配对, 且很小, 一般认为 SacpolIV 与 Dpo4 遇到 AP 位点时, AP 位点会发生滑动, 从而使 AP 位点下游的正常碱基作为模板指导 DNA 合成。而上述 4 种损伤碱基虽不能形成碱基对, 但其远大于 AP 位点, 因此导致其不能像 AP 位点那样有效滑动, 使得 SacpolIV 不能够跨越这几种损伤。

极端微生物生活在海底火山口、盐湖、酸性热泉等极端环境, 对于研究极端微生物对生命的

起源、生物进化与适应性等多方面具有重要意义；同时还是各种极端酶的主要来源。极端嗜酸嗜热菌 *S. acidocaldarius* 生长在 75–85 °C 的高温环境下。鉴于高温下 DNA 的不稳定性, *S. acidocaldarius* 面临巨大的 DNA 损伤压力。在嗜酸嗜热硫化叶菌细胞内, polB1 和 polB3 是复制型 DNA 聚合酶, 同时具有聚合酶和 3'-5'外切酶活性, 能够高忠实性地复制 DNA^[31,35], 而 SacpolIV 是跨越损伤型 DNA 聚合酶, 当一些 DNA 损伤没有得到 DNA 修复酶及时修复时, SacpolIV 可以跨越损伤, 保证复制的持续进行。

参 考 文 献

- [1] Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD. DNA repair and mutagenesis. 2nd Edition. Washington: American Society for Microbiology Press, 2005.
- [2] Lindahl T, Barnes DE. Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 2000, 65: 127–134.
- [3] Ohmori H, Friedberg EC, Fuchs RPP, Goodman MF, Hanaoka F, Hinkle D, Kunkel TA, Lawrence CW, Livneh Z, Nohmi T, Prakash L, Prakash S, Todo T, Walker GC, Wang ZG, Woodgate R. The Y-family of DNA polymerases. *Molecular Cell*, 2001, 8(1): 7–8.
- [4] Sale JE, Lehmann AR, Woodgate R. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2012, 13(3): 141–152.
- [5] Yang W, Woodgate R. What a difference a decade makes: insights into translesion DNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(40): 15591–15598.
- [6] Muniandy PA, Liu J, Majumdar A, Liu ST, Seidman MM. DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells: step by step. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 45(1): 23–49.
- [7] Sale JE. Competition, collaboration and coordination—determining how cells bypass DNA damage. *Journal of Cell Science*, 2012, 125(7): 1633–1643.
- [8] Andersen PL, Xu F, Xiao W. Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. *Cell Research*, 2008, 18(1): 162–173.
- [9] Lehmann AR, Niimi A, Ogi T, Brown S, Sabbioneda S, Wing JF, Kannouche PL, Green CM. Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA Repair*, 2007, 6(7): 891–899.
- [10] Izhar L, Ziv O, Cohen IS, Geacintov NE, Livneh Z. Genomic assay reveals tolerance of DNA damage by both translesion DNA synthesis and homology-dependent repair in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(16): E1462–E1469.
- [11] Pata JD. Structural diversity of the Y-family DNA polymerases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2010, 1804(5): 1124–1135.
- [12] Jarosz DF, Godoy VG, Walker GC. Proficient and accurate bypass of persistent DNA lesions by DinB DNA polymerases. *Cell Cycle*, 2007, 6(7): 817–822.
- [13] Yang W. An overview of Y-family DNA polymerases and a case study of human DNA polymerase η . *Biochemistry*, 2014, 53(17): 2793–2803.
- [14] Johnson RE, Kondratyck CM, Prakash S, Prakash L. *hRAD30* mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum. *Science*, 1999, 285(5425): 263–265.
- [15] Masutani C, Kusumoto R, Yamada A, Dohmae N, Yokoi M, Yuasa M, Araki M, Iwai S, Takio KJ, Hanaoka F. The *XPV* (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase η . *Nature*, 1999, 399(6737): 700–704.
- [16] McDonald JP, Frank EG, Plosky BS, Rogozin IB, Masutani C, Hanaoka F, Woodgate R, Gearhart PJ. 129-derived strains of mice are deficient in DNA polymerase ι and have normal immunoglobulin hypermutation. *Journal of Experimental Medicine*, 2003, 198(4): 635–643.
- [17] Xu PN, Oum L, Geacintov NE, Broyde S. Nucleotide selectivity opposite a benzo[*a*]pyrene-derived N^2 -dG adduct in a Y-family DNA polymerase: a 5'-slippage mechanism. *Biochemistry*, 2008, 47(9): 2701–2709.
- [18] Ling H, Sayer JM, Plosky BS, Yagi H, Boudsocq F, Woodgate R, Jerina DM, Yang W. Crystal structure of a benzo[*a*]pyrene diol epoxide adduct in a ternary complex with a DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(8): 2265–2269.
- [19] Walsh JM, Ippoliti PJ, Ronayne EA, Rozners E, Beuning PJ. Discrimination against major groove adducts by Y-family polymerases of the DinB subfamily. *DNA Repair*, 2013, 12(9): 1124–1135.

- 713–722.
- [20] Zhou Y, Wang JL, Zhang YB, Wang ZG. The catalytic function of the Rev1 dCMP transferase is required in a lesion-specific manner for translesion synthesis and base damage-induced mutagenesis. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(15): 5036–5046.
- [21] Guo CX, Fischhaber PL, Luk-Paszyc MJ, Masuda Y, Zhou J, Kamiya K, Kisker C, Friedberg EC. Mouse Rev1 protein interacts with multiple DNA polymerases involved in translesion DNA synthesis. *The EMBO Journal*, 2003, 22(24): 6621–6630.
- [22] Maga G, Villani G, Crespan E, Wimmer U, Ferrari E, Bertocci B, Hübscher U. 8-oxo-guanine bypass by human DNA polymerases in the presence of auxiliary proteins. *Nature*, 2007, 447(7144): 606–608.
- [23] Haracska L, Yu SL, Johnson RE, Prakash L, Prakash S. Efficient and accurate replication in the presence of 7,8-dihydro-8-oxoguanine by DNA polymerase η . *Nature Genetics*, 2000, 25(4): 458–461.
- [24] Zahn KE, Wallace SS, Doublé S. DNA polymerases provide a canon of strategies for translesion synthesis past oxidatively generated lesions. *Current Opinion in Structural Biology*, 2011, 21(3): 358–369.
- [25] Kirouac KN, Ling H. Unique active site promotes error-free replication opposite an 8-oxo-guanine lesion by human DNA polymerase ι . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(8): 3210–3215.
- [26] Lindahl T, Nyberg B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 1972, 11(19): 3610–3618.
- [27] Kokoska RJ, McCulloch SD, Kunkel TA. The efficiency and specificity of apurinic/apyrimidinic site bypass by human DNA polymerase η and *Sulfolobus solfataricus* Dpo4. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(50): 50537–50545.
- [28] Brock TD, Brock KM, Belly RT, Weiss RL. *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Archiv für Mikrobiologie*, 1972, 84(1): 54–68.
- [29] Chen LM, Brügger K, Skovgaard M, Redder P, She QX, Torarinsson E, Greve B, Awayez M, Zibat A, Klenk HP, Garrett RA. The genome of *Sulfolobus acidocaldarius*, a model organism of the *Crenarchaeota*. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(14): 4992–4999.
- [30] Wagner M, van Wolferen M, 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.
- [31] Peng L, Xia X, Liu XP. Biochemical characterization of translesion synthesis by *Sulfolobus acidocaldarius* DNA polymerases. *Chemical Research in Chinese Universities*, 2016, 32(2): 226–233.
- [32] Lindahl T, Nyberg B. Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 1974, 13(16): 3405–3410.
- [33] Cadet J, Berger M, Douki T, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 1997, 131: 1–87.
- [34] Bebenek K, Garcia-Diaz M, Patishall SR, Kunkel TA. Biochemical properties of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase IV. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(20): 20051–20058.
- [35] Zhang LK, Lou HQ, Guo L, Zhan ZY, Duan ZH, Guo X, Huang L. Accurate DNA synthesis by *Sulfolobus solfataricus* DNA polymerase B1 at high temperature. *Extremophiles*, 2010, 14: 107.
- [36] Boudsocq F, Kokoska RJ, Plosky BS, Vaisman A, Ling H, Kunkel TA, Yang W, Woodgate R. Investigating the role of the little finger domain of Y-family DNA polymerases in low fidelity synthesis and translesion replication. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(31): 32932–32940.

Enzymatic characterization of translesion synthesis by *Sulfolobus acidocaldarius* DNA polymerase IV

Weiwei Wang, Fengping Wang, Xipeng Liu*

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

Abstract: [Objective] To characterize the translesion synthesis of different damages by DNA polymerase IV from thermophilic archaea *Sulfolobus acidocaldarius*. [Methods] We detected the translesion synthesis ability of *Sulfolobus acidocaldarius* polymerase IV (SacpolIV) using fluorescence labeled oligonucleotides as substrates through denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. [Results] We successfully purified SacpolIV from induced *E. coli* and confirmed SacpolIV possessed strong translesion synthesis ability to DNA damages on purines and pyrimidines. The TLS ability depends on whether damaged bases can pair normal bases perfectly. Besides, we found SacpolIV can incorporate rNMP into DNA strand. [Conclusion] We confirmed that SacpolIV is a typical TLS DNA polymerase with the abilities of bypassing damaged purines and pyrimidines on DNA, and incorporating rNMP into DNA.

Keywords: thermophilic archaea, *Sulfolobus acidocaldarius*, DNA polymerase IV, translesion synthesis, damaged bases

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31371260)

*Corresponding author. Tel: +86-21-34204378; Fax: +86-21-34207205; E-mail: xpliu@sjtu.edu.cn

Received: 23 April 2018; Revised: 22 May 2018; Published online: 25 June 2018