



嗜热细菌 *Anaerobaculum hydrogeniforman* Pif1 解旋酶的异源表达与解旋反应特性

段晓雷^{1,2#}, 刘娜女^{2#}, 张涛¹, 曹睿³, 姜钧耀¹, 闵迅^{1*}, 奚绪光^{2*}

¹ 遵义医学院附属医院检验科, 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

³ 河南科技大学动物科技学院, 河南 洛阳 471003

摘要:【目的】原核表达与纯化源自嗜热细菌 *Anaerobaculum hydrogeniforman* 的 Pif1 解旋酶, 从而探究其解旋反应特性。【方法】将重组载体 *pET21a-AnaPif1-TEV/SUMO* 导入大肠杆菌 BL21(DE3) 中诱导表达, 并进行 Ni-NTA 亲和层析、Superdex200 凝胶过滤层析等一系列纯化手段; 再利用快速停留监测技术系统地研究 *Ana.Pif1* 的解旋反应特性, 包括解旋极性、最佳 ATP 浓度、最佳金属辅因子、最佳解旋温度以及解旋复制中间体 DNA 的底物特异性。【结果】通过异源表达与纯化, 获得了无任何标签序列、分子量 59 kDa 的 *Ana.Pif1* 蛋白, 纯度达 97%, 产率为 9.5 mg/L。本研究首先验证 *Ana.Pif1* 具有 5'-3' 的解旋极性, 并发现其解旋反应最佳 ATP 浓度为 2 mmol/L, 其最佳二价金属辅因子为 Mg^{2+} , 最适反应温度为 55 °C。解旋复制中间体的底物特异性显示, Y-S 型复制叉的解旋速率最高, 为 $0.127 s^{-1}$; 而 12 nt-bubble 底物的解旋幅度最大, 达到 78.8%; 暗示这些底物可能是 *Ana.Pif1* 的天然底物。【结论】本文首次较为系统地分析了 *Ana.Pif1* 解旋酶的解旋反应特性, 为阐明此类嗜热细菌 Pif1 解旋酶的分子作用机制奠定了基础。

关键词: Pif1 解旋酶, 嗜热厌氧棒菌, 快速停留检测, 解旋特征参数

DNA 作为生命体最重要的遗传物质, 其主要以 DNA 双螺旋构型等高级结构存在; 当 DNA 在复制与转录过程中需要特异调控时, 首先需要解

链 DNA 高级结构, 这促使生物体进化出许多特异的解旋酶来进行 DNA 解旋反应^[1-2]。其中, Pif1 解旋酶是一类广泛存在且高度保守的解旋蛋白^[3];

基金项目: 国家自然科学基金(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]; 遵义医学院大学生创新创业训练计划(ZKDC2018005)

*通信作者。奚绪光, Tel/Fax: +86-29-87081664, E-mail: xixuguang@nwsuaf.edu.cn; 闵迅, Tel/Fax: +86-851-28642550, E-mail: 2815400619@qq.com

#并列第一作者。

收稿日期: 2018-05-11; 修回日期: 2018-07-13; 网络出版日期: 2018-08-17

该解旋酶家族成员都具有 7 个保守 motif 组成的特异 Pif1 结构域, 并沿 DNA 底物 5'-3' 方向进行解旋反应^[4]。近年来, Pif1 解旋酶的研究主要集中于酵母 Pif1(*Sc.Pif1*) 与人类 Pif1(*hPif1*) 的生理生化特征与遗传学等方面, 揭示出该家族解旋酶存在着共同的生物学功能: 参与核内 DNA 的断裂修复^[5]、有效解旋 DNA-RNA 杂交链^[6]、维持线粒体 DNA 稳定性^[7]、高效识别与解旋 G4 DNA^[8-9] 以及负调控端粒酶活性等^[10]。

然而, 随着对不同来源 Pif1 解旋酶进行更加广泛与系统的分析, 科学家还发现此类解旋酶在不同物种中往往还具有特异的生物学活性^[11-12]。这不仅涉及了裂殖酵母 Pif1(*Pfh1*)、小鼠 Pif1(*mPif1*) 等真核生物 Pif1 解旋酶: 遗传与体外实验表明 *Pfh1* 具有复制蛋白 A(RPA) 依赖作用促进裂殖酵母端粒复制与延伸^[13] 以及推进复制叉迁移等活性^[14], *mPif1* 解旋酶失活可引起小鼠线粒体肌病等^[15]; 而且, 最近的研究已经拓展到原核 Pif1 解旋酶: 拟杆菌 Pif1(*Bs.Pif1*) 的酶学特性与动力学分析揭示出其不同于 *Sc.Pif1* 的解旋特征^[16], 并作为首个 Pif1 蛋白的晶体结构得到解析^[17], 白色念珠菌 Pif1(*Ca.Pif1*) 的研究则发现其具有特殊 3'-5' 核酸外切酶活性等^[18]。但是, 到目前为止, 国内外有关嗜热细菌类 Pif1 解旋酶的研究却鲜有报道^[19-20], 尤其是其相关解旋反应特性的研究更是屈指可数。

本研究针对嗜热细菌中的厌氧棒菌 (*Anaerobaculum hydrogeniformans*) Pif1 解旋酶 (*Ana.Pif1*), 通过异源表达纯化而获取纯度高、活性好的 *Ana.Pif1* 蛋白, 进而系统地对其解旋反应的分子特性进行分析, 以期拓展人们对嗜热微生物 Pif1 解旋酶的认知, 为阐明此类 Pif1 解旋酶的功能和作用机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、引物及菌株: *Ana.Pif1* 解旋酶的全长编码序列由 Biomatik 公司合成; PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, F: 5'-CCCA TATGTCTAAAATCGAACTG-3', R: 5'-CGCGAAT TCGTCCAGAGAGTGCAT-3'。 *pET21a-TEV/SUMO* 载体、*E. coli* BL21(DE3) 表达菌株等均为本课题组保存。

1.1.2 DNA 底物: 快速停留-荧光能量共振转移 (stopped-flow FRET) 检测解旋反应特性所用的 DNA 底物双链分别标记荧光素 (fluorescein, F) 和六氯荧光素 (hexachlorofluorescein, HF), 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成与标记, 其序列信息见表 1。所有反应底物混合于缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 100 mmol/L KCl) 进行退火: 95 °C 水浴 5 min 后冷却至室温, -20 °C 备用。

1.1.3 主要试剂及工具酶: PrimeSTAR HS DNA Polymerase 与 T4 DNA ligase, 以及 *Nde* I、*Eco*R I、*Xho* I 限制性内切酶等均购自宝生物工程(大连)公司。TEV 酶为本实验室自行制备。Ni-NTA 亲和层析、Superdex 200(S200) 凝胶过滤层析柱等购自 GE 公司。

1.2 *Ana.Pif1* 解旋酶的表达载体构建

将合成 *Ana.Pif1* 解旋酶完整的编码序列 (GenBank 登录号: CP003198.1) 和 *pET21a-TEV/SUMO* 表达载体通过 *Nde* I/*Eco*R I 双酶切后用 T4 连接酶连接, 获得 pET21a-*Ana.Pif1*-TEV/SUMO 重组质粒。

1.3 *Ana.Pif1* 蛋白的原核表达与纯化

将构建成功的 pET21a-*Ana.Pif1*-TEV/SUMO 重组质粒转化到大肠杆菌的表达菌株 *E. coli*

表 1. 基于快速停留-荧光能量共振转移检测技术分析 *Ana.Pif1* 解旋反应的 DNA 底物Table 1. DNA substrates used in *Ana.Pif1*-catalyzed unwinding reactions by stopped-flow FRET assay

Abbr.(Name)	Structure	Sequence
5'-Oh _{S12D20} (5'-12 nt-20 bp)		CACTGGCCGTCTTACGGTCGCTCTGCTCGACG-F HF-CGTCGAGCAGAGCGACCGTA
3'-Oh _{S12D20} (3'-12 nt-20 bp)		CACTGGCCGTCTTACGGTCGCTCTGCTCGACG-F HF-CGACCGTAAGACGGCCAGTG
5'-Oh _{S26D17} (5'-26 nt-17 bp)		(dT26)ATGTATGTCAAGGAAGG-F HF-CCTTCCTTGACATACAT
Y-S (Y-structure)		HF-CGTCGAGCAGAGCGACCGTATTATTTTTTTTTT CTCTGGCCGTCTTACGGTCGCTCTGCTCGACG-F
5'-Fork (5'-Flap dsDNA)		HF-CGTCGAGCAGAGCGACCGTATTATTTTTTTTTT CACTGGCCGTCTTACGGTCGCTCTGCTCGACG-F AGACGGCCAGTG
3'-Fork (3'-Flap dsDNA)		AAAAAAAAAATAA HF-CGTCGAGCAGAGCGACCGTATTATTTTTTTTTT CACTGGCCGTCTTACGGTCGCTCTGCTCGACG-F
TWJ (Three-Way-Junction)		AAAAAAAAAATAA HF-CGTCGAGCAGAGCGACCGTATTATTTTTTTTTT CTCTGGCCGTCTTACGGTCGCTCTGCTCGACG-F AGACGGCCAGTG
BS4 (4 nt-bubble)		HF-GCAGTAGGCCTAGCATGAGTTAGGACTGACAGCTGCATGG CCATGCAGCTGTCAGTCCATTGTCATGCTAGGCCTACTGC-F
BS12 (12 nt-bubble)		HF-GCAGTAGGCCTAGCTACTGTTACCTGTGACAGCTGCATGG CCATGCAGCTGTCAGTCCATTGTCATGCTAGGCCTACTGC-F
HJ (Holiday Junction)		ACGTGGGCAAAGGTTTCGTCATGACTGACAGCTGCATGG CCGTGATCACCAATGCACATTGACGAACCTTGGCCACGT CCATGCAGCTGTCAGTCCATTGTCATGCTAGGCCTACTGC-F HF-GCAGTAGGCCTAGCATGACAATCTGCATTGGTGATCACGG

F, Fluorescein; HF, Hexachlorofluorescein.

BL21(*DE3*)中; 当 $OD=0.6$ 时, 在 1 L 的 LB 培养基中加入 1 mol/L 的 IPTG 为 400 μ L (即诱导时 IPTG 工作浓度为 0.4 mmol/L), 进而在低温(22 $^{\circ}$ C)下诱导 14 h 表达重组蛋白。按照改进的文献[19]方法进行分离纯化: 第一次 Ni-NTA 纯化后使用 TEV 酶 4 $^{\circ}$ C 酶切 6 h, 随后再进行第二次 Ni-NTA 纯化以去除 C-端的 SUMO 与 His 标签序列; 并在最后纯化步骤中增加 Supdex 200 凝胶过滤层析。纯化产物由 10% (*W/V*) SDS-PAGE 分析, 并使用 Quantity one 分析软件计算出蛋白条带的纯度; 由

BCA 法测定蛋白浓度。加甘油(终浓度 25%)后超滤浓缩, -80 $^{\circ}$ C 冻存备用。

1.4 基于 Stopped-flow FRET 技术检测 *Ana.Pif1* 解旋反应

利用快速停留-荧光共振能量转移(stopped-flow-FRET)监测技术^[16,22], 参照本实验室先前摸索的 *Ana.Pif1* 最佳解旋条件^[19](20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0), 20 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT), 固定 *Ana.Pif1* 解旋酶与反应底物的工作浓度分别为 100 nmol/L 与 4 nmol/L,

研究 *Ana.Pif1* 解旋反应以下特性: (1) 解旋极性实验, 底物分别为 5'-12 nt-20 bp 与 3'-12 nt-20 bp; (2) 在不同 ATP 浓度(0-5 mmol/L)下, 测试 *Ana.Pif1* 解旋相同浓度 5'-Oh_{S26D17} 底物的反应速率变化; (3) 不同二价金属阳离子(Mg²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、Cu²⁺、Ni²⁺及 Zn²⁺)作为辅酶因子(浓度均为 2 mmol/L)时, 研究 *Ana.Pif1* 解旋 5'-Oh_{S26D17} 底物的特征参数变化; (4) 测试不同温度对 *Ana.Pif1* 蛋白解旋反应的影响: DNA 底物为 5'-Oh_{S26D17}, 反应温度从 20 °C 到 60 °C 逐渐升高, 间隔 5 °C (仅 37 °C 代替 35 °C)检测解旋特征曲线, 使用恒温水浴控制温度; (5) *Ana.Pif1* 与多种模拟复制中间体底物发生解旋反应的特征分析: 对比 Y-S 型 Fork 底物、5'-Fork 底物、3'-Fork 底物和 TWJ 底物, 与模拟复制泡底物(4 nt-bubble 底物与 12 nt-bubble 底物)以及十字交叉(HJ)底物的解旋速率与解旋幅度, 明确其解旋反应最适 DNA 底物。以上 *Ana.Pif1* 解旋反应均在多转换条件下(不加蛋白 Trap)进行; 其解旋特征曲线为至少 10 次独立试验的平均值, 并使用 Bio-Kine (version 4.26;

Bio-Logic)软件中的双指数函数(double-exponential functions)公式(1, 2)进行拟合^[22-23]。

$$y = A1 \times \exp(-x/t1) + A2 \times \exp(-x/t2) + y0 \quad \text{公式(1)}$$

$$A_{\text{tot}} = A1 + A2, \text{Rate} = A1/t1 + A2/t2 \quad \text{公式(2)}$$

在公式(1)中, *A1* 与 *A2* 分别代表快、慢反应的解旋幅度, 1/*t1* 与 1/*t2* 分别为快反应与慢反应速率常数; 通过公式(1)拟合解旋曲线、公式(2)计算总解旋幅度和初始解旋速率(以下简称解旋速率)。

1.5 统计学分析

本研究的解旋反应测试中各实验均至少重复 3 次以上, 取平均值; 并采用 SPSS.16 统计软件, 数据采用单因素方差分析; *P*<0.05 为具有显著统计学意义。

2 结果和分析

2.1 *Ana.Pif1* 表达载体的构建

成功构建 pET21a-*Ana.Pif1*-TEV/SUMO 表达载体(质粒图谱见图 1-A); 其表达产物 C-端融合有

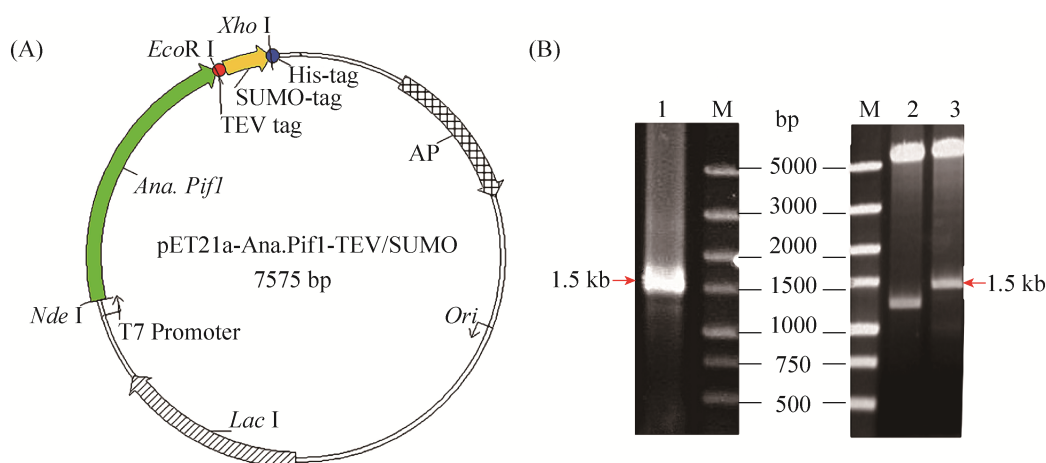


图 1. pET21a-*Ana.Pif1*-TEV/SUMO 表达载体的构建

Figure 1. Construction of expression vector pET21a-*Ana.Pif1*-TEV/SUMO. A: the schematic map of pET21a-*Ana.Pif1*-TEV/SUMO; B: identification of the recombinant vector by PCR and restriction enzyme digestion. Lane 1: the product of colony PCR; lane 2: the digestion of control plasmid; lane 3: the double digestion of pET21a-*Ana.Pif1*-TEV/SUMO by *Nde* I and *Eco*R I; M: DNA DS 5000. The arrows point out the target DNA bands in 1.5 kb.

TEV 标签、SUMO 标签(促溶作用)和 6×His 标签序列,而在 *Ana.Pif1* 序列与标签序列间设计 TEV 酶切位点。通过菌落 PCR 鉴定与重组质粒 *Nde* I、*EcoR* I 双酶切鉴定,结果如图 1-B 所示,靶标基因序列为约 1.5 kb 片段,符合预期(1587 bp)。并进一步进行测序,确认无误,与 *Ana.Pif1* 基因的编码序列(GenBank: CP003198.1)一致,将正确的转化子用于下一步实验。

2.2 *Ana.Pif1* 重组蛋白的表达与纯化

重组大肠杆菌 BL21(*DE3*)经诱导表达后,在细胞破碎液的上清中检测到目标蛋白(*Ana.Pif1*)。重组蛋白经过 Ni-NTA 亲和层析、TEV 酶切标签序列以及 Superdex 200 分子筛层析等一系列纯化(见图 2-A),最终产物经 SDS-PAGE 检测。结果如图 2-B 所示,*Ana.Pif1* 纯化产物为单一条带蛋白,其

分子量与目标蛋白分子量相符(约 59 kDa);经凝胶扫描分析电泳条带纯度与 BCA 试剂盒法测定蛋白的含量,结果显示,本实验纯化的 *Ana.Pif1* 蛋白无标签序列,纯度达到 97%,其表达纯化蛋白的产率为 9.5 mg/L。

2.3 *Ana.Pif1* 解旋酶的解旋极性

Ana.Pif1 蛋白作为解旋酶,在解旋反应中应具有固定的解旋极性(沿 DNA 底物链的解旋方向性)。本研究利用 Stopped-flow FRET 检测技术,分别加入 5'-ssDNA-dsDNA(5'-Oh_{S12D20}) 以及 3'-ssDNA-dsDNA(3'-Oh_{S12D20})底物,对比监测加入 ATP 后解旋两者的荧光信号变化。结果显示(见图 3),*Ana.Pif1* 可有效解旋 5'-ssDNA-dsDNA 而无法解旋 3'-ssDNA-dsDNA 底物,体现出该解旋酶具有沿底物 5'-3'解旋的方向性。

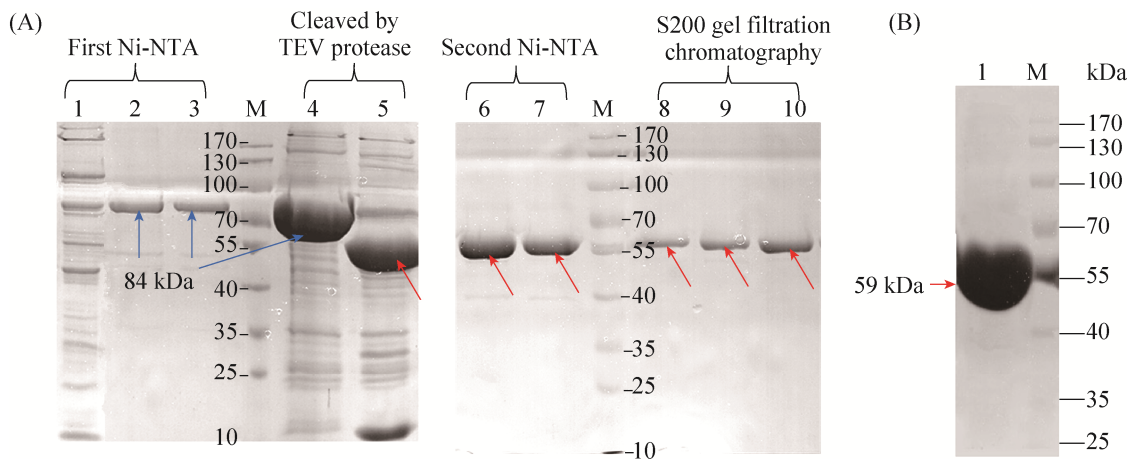


图 2. *Ana.Pif1* 解旋酶重组蛋白的纯化

Figure 2. Purification of the recombinant *Ana.Pif1* helicase was resolved in 10% (*W/V*) SDS-PAGE. A: The whole purification process of recombinant *Ana.Pif1* protein. Lane 1 to lane 3: the first Ni-NTA purification; lane 4 and land 5: cleaved product by TEV protease; lane 6 and land 7: out flow of second round Ni-NTA after TEV protease digestion; lane 8 to lane 10: the elution peaks of Superdex 200 purification. M: retained protein marker. Arrows point out the recombinant proteins with TEV/SUMO tag in 84 kDa and the target proteins without tags in 59 kDa. B: SDS-PAGE analysis of the final purification product of *Ana.Pif1*. Lane 1 was the concentration product of *Ana.Pif1* protein, which loaded 20 µg of protein; M: prestained protein marker.

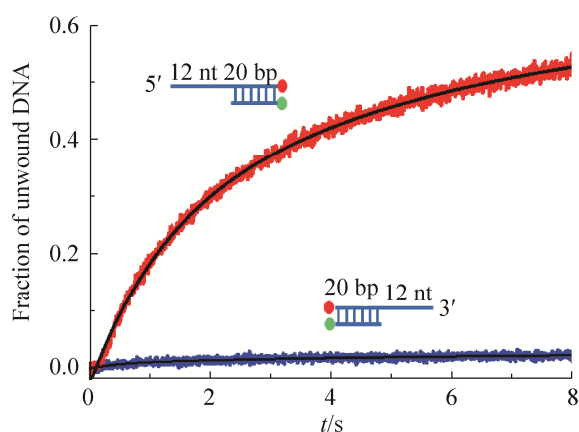


图 3. *Ana.Pif1* 解旋酶的解旋极性

Figure 3. The polarity for *Ana.Pif1*-catalyzed unwinding activity. Determination of the polarity for *Ana.Pif1* unwinding reactions with 5'-OH_{S12D20} (red line) or 3'-OH_{S12D20} (blue line) by stopped-flow FRET.

2.4 ATP 浓度对 *Ana.Pif1* 解旋反应的影响

Ana.Pif1 解旋酶作为分子马达蛋白,其需要生物体内供能才可进行解旋反应。结合本课题组前期研究中所揭示 *Ana.Pif1* 的最佳能量供体为 ATP^[19],本研究进一步探讨其解旋反应的最佳 ATP 浓度。本研究使用相同的 DNA 底物与 *Ana.Pif1* 蛋白,再分别加入 0、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 及 5 mmol/L 的 ATP 启动解旋反应,对比监测相同反应底物的解旋速率与解旋幅度的差异。结果如图 4 所示,只有当 2 mmol/L 的 ATP 参与反应时, *Ana.Pif1* 解旋 5'-OH_{S26D17} 底物的速率与幅度均为最高值 (0.1918 s⁻¹ 和 72.4%),提示出 *Ana.Pif1* 解旋反应的所需最佳 ATP 浓度为 2 mmol/L。

2.5 不同金属辅离子对 *Ana.Pif1* 解旋反应的影响

解旋酶水解 ATP 供能可解链 DNA 底物,但同时还需要加入金属辅因子才能有效地启动解旋反应。本研究通过在相同解旋反应体系中添加不同金属二价阳离子,分析不同金属辅离子参与 *Ana.Pif1* 解旋 5'-OH_{S26D17} 反应特征曲线的差异性。如图 5 所示,当不加入任何金属阳离子时(CK),

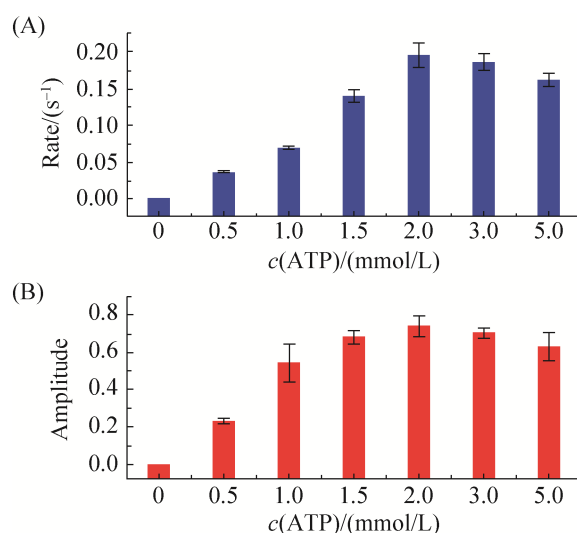


图 4. ATP 浓度对 *Ana.Pif1* 解旋反应的影响

Figure 4. Effect of ATP concentration on *Ana.Pif1*-catalyzed unwinding activity. A: comparison of the *Ana.Pif1* unwinding rates among different concentrations of ATP from 0.5 to 5.0 mmol/L; B: comparison of the *Ana.Pif1* unwinding amplitudes among different concentrations of ATP as mentioned above. The average values from triplicate measurements, and standard error were calculated.

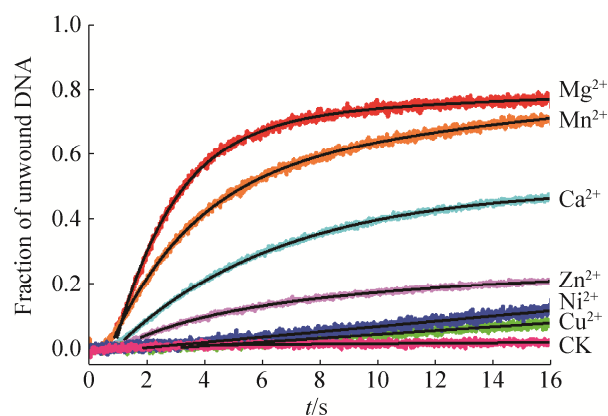


图 5. 不同金属辅离子参与 *Ana.Pif1* 解旋反应的解旋特征曲线对比

Figure 5. Comparison of the characteristic curves for *Ana.Pif1*-catalyzed unwinding activity with different metal ions as cofactors.

不能启动 *Ana.Pif1* 的解旋反应;当加入相同浓度 (2 mmol/L) 的 2 价阳离子时,无论是解旋幅度 (79.4%) 还是解旋速率 (0.158 s⁻¹), Mg²⁺ 都是

Ana.Pif1 解旋反应的最佳金属辅因子; Mn^{2+} 也可以较好地辅助解旋反应, 解旋幅度与解旋速率都较高(74.7%、 0.142 s^{-1}); 研究中还新发现 Ca^{2+} 也具有一定的辅助催化活性, 而 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 与 Cu^{2+} 也具有微弱地辅助催化 *Ana.Pif1* 解旋反应的效果(解旋特征参数见表 2), 可能是因为这些金属阳离子能够不同程度影响解旋酶活力。

2.6 *Ana.Pif1* 解旋反应的嗜热特性

由于 *Ana.Pif1* 解旋酶是源于嗜热细菌 *Anaerobaculum hydrogeniformans* 内编码蛋白, 因此我们探究了不同温度对该解旋酶活性的影响。在不同温度下, Stopped-flow 监测 *Ana.Pif1* 解旋相同底物 5'-Oh_{S26D17} 的特征曲线, 通过拟合与计算, 我们发现: 从 20 °C 至 45 °C 逐步增加反应温度, *Ana.Pif1* 解旋速率会稳步增加(解旋幅度也同时稳定增加); 当反应温度由 45 °C 至 55 °C 继续升温, 解旋速率更是增加明显; 当 60 °C 时, 解旋速率与幅度骤然下降(解旋速率见表 3)。同时, 对比测试 *Ana.Pif1* 与 *Bs.Pif1* 在不同温度下的解旋速率变化, 结果如图 6 所示, 不同于普通细菌 *Pif1* 解旋酶(*Bs.Pif1*)的最佳反应温度为 25 °C, *Ana.Pif1* 解旋酶的最佳反应温度(55 °C)远远高于前者, 这表明该解旋酶具有嗜热特性。

表 2. 不同金属辅因子对 *Ana.Pif1* 解旋反应的影响

Table 2. Effect of different metal cofactors on *Ana.Pif1*-catalyzed unwinding activity

Metal cofactors	Rate/(s ⁻¹)	Amplitude/%
Mg ²⁺	0.158	79.40
Mn ²⁺	0.142	74.70
Ca ²⁺	0.083	47.10
Zn ²⁺	0.034	21.20
Ni ²⁺	0.005	11.60
Cu ²⁺	0.003	8.10
CK	0	0.39

表 3. 温度对 *Ana.Pif1* 与 *Bs.Pif1* 解旋速率的影响

Table 3. Effect of temperature on the unwinding rates (s⁻¹) of *Ana.Pif1*- and *Bs.Pif1*-catalyzed

T/°C	<i>Ana.Pif1</i>	<i>Bs.Pif1</i>
20	0.046	0.770
25	0.060	0.810
30	0.070	0.690
37	0.080	0.220
40	0.092	0.002
45	0.100	0
50	0.140	0
55	0.157	0
60	0.032	0

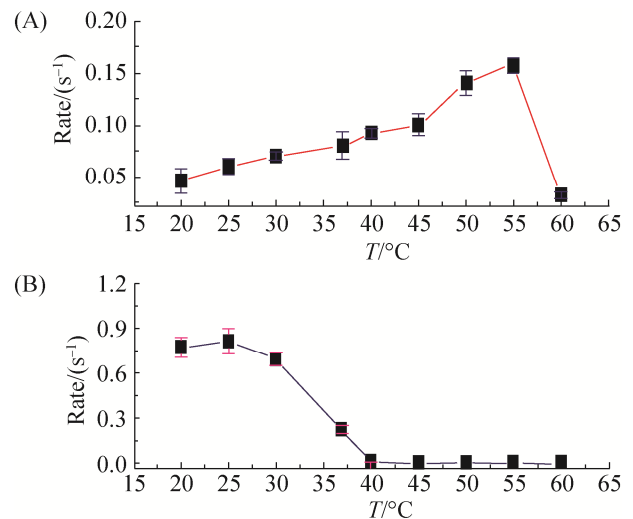


图 6. *Ana.Pif1* 解旋反应的最适催化温度

Figure 6. Optimum temperature of *Ana.Pif1* (A) and *Bs.Pif1* (B)-catalyzed unwinding activity. Data presented are the average values from triplicate measurements.

2.7 *Ana.Pif1* 解旋不同复制中间体的底物特异性

本课题组前期的研究曾揭示出 *Ana.Pif1* 蛋白可以有效解旋 5'-ss-dsDNA 与 5'-ss-G4-dsDNA 底物^[19]; 但是作为 *Pif1* 解旋酶, 其在生物体内最重要的生物学活性应该是参与复制叉或复制泡底物的解旋过程^[12,24], 因此有必要进一步探索 *Ana.Pif1* 解旋多种模拟复制中间体结构 DNA 的底物特异性。结果如图 7-A 所示, 研究发现 *Ana.Pif1* 解旋酶可以解旋所有这些复制中间体底物, 但解旋特征参数相差较大(表 4); 拟合其解旋曲线获得的

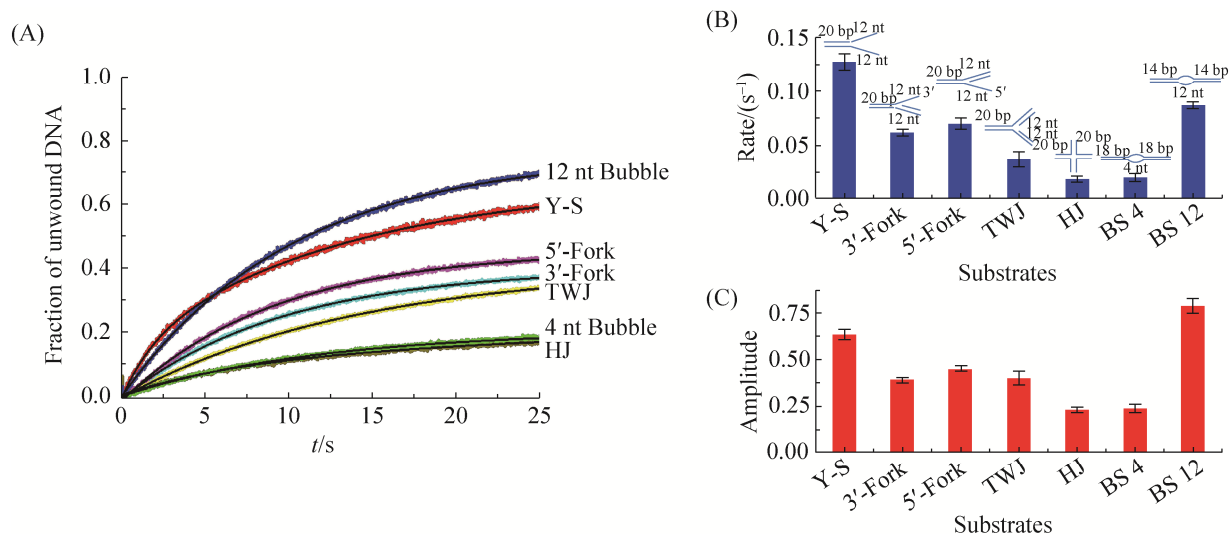


图 7. *Ana.Pif1* 解旋酶不同复制中间体的底物特异性

Figure 7. Substrate specificity of *Ana.Pif1* helicase for unwinding various replicative intermediates. A: Time course of *Ana.Pif1*-catalyzed unwinding reactions with resembled the replication forks or bubble substrates. B and C were the histograms of the unwinding rates and amplitudes with these substrates in A. DNA schematic presentation were shown on the top of B. Values represent results of three independent operations, and standard error were calculated.

表 4. *Ana.Pif1* 解旋不同复制中间体底物的反应特征参数

Table 4. Unwinding characteristic parameters of *Ana.Pif1* with different replicative intermediate substrates

Intermediate substrates	Rate/(s ⁻¹)	Amplitude/%
Y-S	0.127	64.60
5'-Fork	0.062	45.20
3'-Fork	0.070	39.00
TWJ	0.037	36.10
HJ	0.018	20.30
BS 4	0.019	21.00
BS 12	0.086	78.80

解旋速率与幅度差异性见图 7-B 与图 7-C, 对应的底物示意图见图 7-B 的柱形图上方。结果表明, *Ana.Pif1* 解旋 Y-S 底物时速率最快, 为 0.127 s⁻¹, 远超其他复制叉的解旋速率, 而其解旋幅度也较高, 达到 64.6%; 对比模拟复制泡底物的解旋特征参数, 发现 *Ana.Pif1* 解旋 12 nt-Bubble 的幅度最大, 达到 78.8%, 解旋速率也较快, 为 0.086 s⁻¹。

其他模拟复制叉(fork)底物的解旋幅度与速度都较小且相似, 可能因为其双链区(20 bp)较长导致解旋效率较低; 而 HJ 与 4 nt-Bubble 等底物则可能由于结合区为平末端双链, 难以结合, 使得其解旋困难。

3 讨论

Pif1 解旋酶是一类广泛存在于真核生物、原核生物及病毒中、沿底物 5'-3'方向解链的分子马达蛋白, 其主要生物学功能是通过解旋特异结构 DNA 底物来维持基因组与线粒体 DNA 的稳定性^[4,24]。国内外已经报道了不同来源 *Pif1* 解旋酶的分离、纯化及酶学特性的研究, 但对于此类解旋酶的研究过度集中于酵母 *Pif1*(*Sc.Pif1*)与人类 *Pif1*(*hPif1*)等真核生物 *Pif1* 解旋酶^[25-26], 对细菌 *Pif1* 解旋酶研究稀少, 尤其缺乏对嗜热细菌 *Pif1* 解旋特性方面

的研究。嗜热细菌相比于普通细菌(非嗜热细菌), 由于高温而复杂的生长环境, 使得其耐热遗传物质与解旋酶的作用机制近年来被众多科研团队所关注^[27-28]; 而 Pif1 解旋酶作为解旋酶超家族 I (super family I, SF I) 中的重要成员, 可以有效解旋高 G-C 含量的耐热 DNA 底物以及多种类型结构复杂的核酸分子, 所以研究嗜热细菌中 Pif1 解旋酶的解旋特性有助于拓展人们对于嗜热细菌中解旋酶与耐热遗传物质间作用机理的认知, 对今后此类 Pif1 解旋酶解链特殊耐高温 DNA 分子机制的研究具有重要的启示作用。另一方面, *Anaerobaculum hydrogeniformans* 是近年来才新鉴定出的一种嗜热厌氧棒菌^[29], 分离自 Alaska 石油中, 该菌生理生长环境复杂, 且其基因组 GC 含量偏高; 特殊的生长环境可能会产生多种特异 DNA 结构, 需要对其体内 DNA 解旋酶的活性特征进行探讨。因此, 本研究首次针对 *Anaerobaculum hydrogeniformans* 的 Pif1 解旋酶(*Ana.Pif1*) 进行一系列的解旋特性分析。

实验室早前进行了 *Ana.Pif1* 的基因克隆与初步表达纯化研究, 并利用 Stopped-flow FRET 技术明确了最佳解旋条件与能量供体^[19]。但在随后 *Bs.Pif1* 等微生物 Pif1 解旋酶的晶体解析研究中^[17], 我们发现尽管 SUMO 标签序列有利于提高蛋白可溶性, 但是 N-端连接 SUMO-tag (如 pET15b-SUMO-) 可能会影响目的蛋白的起始折叠构象——这也与 Hendriks 等关于 SUMO 位置决定高产的双纯化蛋白策略的报道相一致^[30]。因此, 我们重新构建 pET21a-*Ana.Pif1*-TEV/SUMO 表达载体(C-端连 SUMO-tag)。同时, 本研究还进一步优化了 *Ana.Pif1* 蛋白的纯化过程, 增加了 TEV 酶切、两次 Ni-NTA 纯化以及 Superdex 200 凝胶过滤层析

等纯化步骤, 最终获得产率为 9.5 mg/L、纯度达到 97%、无任何标签序列的 *Ana.Pif1* 蛋白。

近几年来, 利用快速停留检测-荧光能量共振转移(stopped-flow-FRET)技术研究解旋酶的反应动力学特征的报道逐渐增多^[21-22], 已然揭示出原核生物 Pif1 解旋酶往往会具有一些不同于 *Sc.Pif1* (典型的真核生物 Pif1 解旋酶) 的生物学活性分子特征^[16,18]。本研究的特色之一就是使用此类新兴的蛋白-核酸互作实时检测技术, 首次较为系统地分析了 *Ana.Pif1* 的解旋反应特性: 我们验证出所表达纯化的 *Ana.Pif1* 解旋酶具有沿底物链 5'-3' 解旋的反应方向性; 并且该解旋酶作为分子马达蛋白, 我们揭示其所需最佳 ATP 浓度为 2 mmol/L——这些符合 Pif1 解旋酶家族共同的活性特征^[11,21]。本实验还明确了不同金属辅离子对 *Ana.Pif1* 活性的影响不同: Mg^{2+} 是 *Ana.Pif1* 解旋反应的最佳金属辅因子, Mn^{2+} 次之, 这与前人的报道 PcrA 解旋酶研究结果一致^[31]; 尤其是本研究首次发现了 Ca^{2+} 对 *Ana.Pif1* 也具有一定的辅助催化活性(这是此前 Pif1 解旋酶相关研究未报道的)。而我们后期另一种嗜热细菌 *Thermodesulfovibrio yellowstonii* H. 的 Pif1 解旋酶相关研究中也发现了 Ca^{2+} 作用下这类嗜热细菌 Pif1 解旋酶的催化活性较强(未发表); 而 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 与 Cu^{2+} 则较弱地影响 *Ana.Pif1* 解旋反应的发生速率, 我们推测在 *Anaerobaculum hydrogeniformans* 复杂的生理生长环境中, 可能会被利用环境中多种金属离子来辅助解旋反应的进行, 这与魏晓斌等对二价金属离子驱动的白色念珠菌 Pif1 水解活性的研究相类似^[18]。此外, 本研究还首次明确了 *Ana.Pif1* 最佳反应温度为 55 °C, 远高于普通细菌 Pif1 解旋酶(*Bs.Pif1*) 的 25 °C, 该特征与嗜热细菌 *Anaerobaculum*

hydrogeniformans 所报道的最适生理生长环境温度相一致^[29]。

目前, 有关 Pif1 解旋酶的研究大多表明此类解旋酶的天然底物应是 DNA 复制中间体^[23,26]; 而 *Ana.Pif1* 源于嗜热厌氧棒菌, 其生理环境复杂, 除了需要在高温、重金属等极端条件维持基因组稳定性以外, 还决定了 *Ana.Pif1* 可能具有独特的底物特异性。因此, 本文利用 7 种模拟复制中间体底物进行了解旋特征参数的对比分析。研究揭示出 *Ana.Pif1* 解旋这些类型复制中间体底物时, 其解旋 Y-S 结构底物具有最高的解旋速率(0.127 s^{-1}), 此现象可能由于 *Ana.Pif1* 与 Y-S 底物的亲和力较高导致, 使得 *Ana.Pif1* 很容易结合 Y-S 结构 DNA 并发生解旋反应, 该结果与同为原核生物 Pif1 的 *Bs.Pif1* 最佳解旋底物为 Y-S 底物相一致^[16], 但需要进一步的结合反应验证; 而 *Ana.Pif1* 与 12 nt-bubble 底物反应时则具有最高的解旋幅度(78.8%), 我们推测其原因是: 12 nt-bubble 中央区域的 12 nt 单链区足够结合 *Ana.Pif1* 蛋白并启动解旋反应, 且单链区随着解旋反应的进行而增长, 这点可被图 7-A 中特征曲线的快反应与慢反应阶段解旋幅度均匀增加所证实。同时, 底物特异性实验还表明, *Ana.Pif1* 也可以解旋其他模拟复制叉或复制泡底物, 但是解旋活性很弱(见表 4)。这些发现不同于已报道的 Pif1 家族成员解旋的最佳复制中间体底物^[14,26,32], 可能是 *Ana.Pif1* 在其生理环境中存在较多类似 Y-S 复制叉或 12 nt-bubble 结构的复制中间体天然底物, 对这一点还需进一步研究证明。

综上所述, 本研究从大肠杆菌中异源表达纯化而获得纯度高、活性好的嗜热细菌 *Ana.Pif1* 解旋酶, 并利用 Stopped-flow FRET 技术对其解旋反应特性进行了分析, 进而首次揭示出该解旋酶的解旋极性、最佳 ATP 浓度、最佳金属辅因子、最

佳解旋温度与最适复制中间体底物等解旋反应分子特征。这不仅拓展了人们对于嗜热菌 Pif1 解旋酶生物学活性的认识, 而且为阐明 *Ana.Pif1* 解旋反应的分子作用机制奠定了基础。在接下来的实验中, 本课题组将会进一步深入研究 *Ana.Pif1* 解旋酶的结合反应特征与解旋动力学机理并进行改造, 从而研究 *Ana.Pif1* 不同结构域与其对应的生物学功能。

参 考 文 献

- [1] Bleichert F, Botchan MR, Berger JM. Mechanisms for initiating cellular DNA replication. *Science*, 2017, 355(6327): eaah6317.
- [2] Bianco PR, Kowalczykowski SC. Translocation step size and mechanism of the RecBC DNA helicase. *Nature*, 2000, 405(6784): 368–372.
- [3] Paeschke K, Bochman ML, Garcia PD, Cejka P, Friedman KL, Kowalczykowski SC, Zakian VA. Pif1 family helicases suppress genome instability at G-quadruplex motifs. *Nature*, 2013, 497(7450): 458–462.
- [4] Byrd AK, Raney KD. Structure and function of Pif1 helicase. *Biochemical Society Transactions*, 2017, 45(5): 1159–1171.
- [5] Chung WH. To peep into Pif1 helicase: multifaceted all the way from genome stability to repair-associated DNA synthesis. *Journal of Microbiology*, 2014, 52(2): 89–98.
- [6] Boulé JB, Zakian VA. The yeast Pif1p DNA helicase preferentially unwinds RNA-DNA substrates. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(17): 5809–5818.
- [7] Cheng X, Dunaway S, Ivessa AS. The role of Pif1p, a DNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*, in maintaining mitochondrial DNA. *Mitochondrion*, 2007, 7(3): 211–222.
- [8] Paeschke K, Capra JA, Zakian VA. DNA replication through G-quadruplex motifs is promoted by the *Saccharomyces cerevisiae* Pif1 DNA helicase. *Cell*, 2011, 145(5): 678–691.
- [9] Sanders CM. Human Pif1 helicase is a G-quadruplex DNA-binding protein with G-quadruplex DNA-unwinding activity. *Biochemical Journal*, 2010, 430(1): 119–128.
- [10] Stinus S, Paeschke K, Chang M. Telomerase regulation by the Pif1 helicase: a length-dependent effect? *Current Genetics*, 2018, 64(2): 509–513.
- [11] Bochman ML, Judge CP, Zakian VA. The Pif1 family in prokaryotes: what are our helicases doing in your bacteria?

- Molecular Biology of the Cell*, 2011, 22(12): 1955–1959.
- [12] Osmundson JS, Kumar J, Yeung R, Smith DJ. Pif1-family helicases cooperatively suppress widespread replication-fork arrest at tRNA genes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2017, 24(2): 162–170.
- [13] McDonald KR, Sabouri N, Webb CJ, Zakian VA. The Pif1 family helicase Pfh1 facilitates telomere replication and has an RPA-dependent role during telomere lengthening. *DNA Repair*, 2014, 24: 80–86.
- [14] McDonald KR, Guise AJ, Pourbozorgi-Langroudi P, Cristea IM, Zakian VA, Capra JA, Sabouri N. Pfh1 is an accessory replicative helicase that interacts with the replisome to facilitate fork progression and preserve genome integrity. *PLoS Genetics*, 2016, 12(9): e1006238.
- [15] Bannwarth S, Berg-Alonso L, Augé G, Fragaki K, Kolesar JE, Lespinasse F, Lacas-Gervais S, Burel-Vandenbos F, Villa E, Belmonte F, Michiels JF, Ricci JE, Gherardi R, Harrington L, Kaufman BA, Paquis-Flucklinger V. Inactivation of Pif1 helicase causes a mitochondrial myopathy in mice. *Mitochondrion*, 2016, 30: 126–137.
- [16] Liu NN, Duan XL, Ai X, Yang YT, Li M, Dou SX, Rety S, Deprez E, Xi XG. The *Bacteroides* sp. 3_1_23 Pif1 protein is a multifunctional helicase. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(18): 8942–8954.
- [17] Chen WF, Dai YX, Duan XL, Liu NN, Shi W, Li N, Li M, Dou SX, Dong YH, Rety S, Xi XG. Crystal structures of the BsPif1 helicase reveal that a major movement of the 2B SH3 domain is required for DNA unwinding. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(6): 2949–2961.
- [18] Wei XB, Zhang B, Bazeille N, Yu Y, Liu NN, René B, Mauffret O, Xi XG. A 3'-5' exonuclease activity embedded in the helicase core domain of *Candida albicans* Pif1 helicase. *Scientific Reports*, 2017, 7: 42865.
- [19] Guo HL, Liu NN, Duan XL, Xi XG. Expression, purification and activity analysis of a Pif1 helicase from *Anaerobaculum hydrogeniformans*. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2017, 45(6): 206–212. (in Chinese) 郭海磊, 刘娜女, 段晓雷, 奚绪光. 厌氧棒菌 Pif1 解旋酶的表达纯化及解旋条件优化. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2017, 45(6): 206–212.
- [20] Andis NM, Sausen CW, Alladin A, Bochman ML. The WYL domain of the PIF1 helicase from the thermophilic bacterium *Thermotoga elfii* is an accessory single-stranded DNA binding module. *Biochemistry*, 2018, 57(7): 1108–1118.
- [21] Duan XL, Liu NN, Yang YT, Li HH, Li M, Dou SX, Xi XG. G-quadruplexes significantly stimulate Pif1 helicase-catalyzed duplex DNA unwinding. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(12): 7722–7735.
- [22] Yang Y, Dou SX, Xu YN, Bazeille N, Wang PY, Rigolet P, Xu HQ, Xi XG. Kinetic mechanism of DNA unwinding by the BLM helicase core and molecular basis for its low processivity. *Biochemistry*, 2010, 49(4): 656–668.
- [23] Wilson MA, Kwon Y, Xu YY, Chung WH, Chi P, Niu HY, Mayle R, Chen XF, Malkova A, Sung P, Ira G. Pif1 helicase and Pol δ promote recombination-coupled DNA synthesis via bubble migration. *Nature*, 2013, 502(7471): 393–396.
- [24] Bochman ML, Sabouri N, Zakian VA. Unwinding the functions of the Pif1 family helicases. *DNA Repair*, 2010, 9(3): 237–349.
- [25] Lu KY, Chen WF, Rety S, Liu NN, Wu WQ, Dai YX, Li D, Ma HY, Dou SX, Xi XG. Insights into the structural and mechanistic basis of multifunctional *S. cerevisiae* Pif1p helicase. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(3): 1486–1500.
- [26] George T, Wen Q, Griffiths R, Ganesh A, Meuth M, Sanders CM. Human Pif1 helicase unwinds synthetic DNA structures resembling stalled DNA replication forks. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(19): 6491–6502.
- [27] Jiang YJ, Liu J, Dong WL, Zhang WM, Fang Y, Ma JF, Jiang M, Xin FX. The draft genome sequence of thermophilic *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* M5 capable of directly producing butanol from hemicellulose. *Current Microbiology*, 2018, 75(5): 620–623.
- [28] Schermerhorn KM, Tanner N, Kelman Z, Gardner AF. High-temperature single-molecule kinetic analysis of thermophilic archaeal MCM helicases. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(18): 8764–8771.
- [29] Maune MW, Tanner RS. Description of *Anaerobaculum hydrogeniformans* sp. nov., an anaerobe that produces hydrogen from glucose, and emended description of the genus *Anaerobaculum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(4): 832–838.
- [30] Hendriks IA, Vertegaal ACO. A high-yield double-purification proteomics strategy for the identification of SUMO sites. *Nature Protocols*, 2016, 11(9): 1630–1649.
- [31] Soultanas P, Dillingham MS, Velankar SS, Wigley DB. DNA binding mediates conformational changes and metal ion coordination in the active site of PcrA helicase. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 290(1): 137–148.
- [32] Sabouri N. The functions of the multi-tasking Pfh1Pif1 helicase. *Current Genetics*, 2017, 63(4): 621–626.

Heterologous expression and characterization of unwinding reaction of Pif1 helicase from *Anaerobaculum hydrogeniforman*

Xiaolei Duan^{1,2#}, Nanü Liu^{2#}, Tao Zhang¹, Rui Cao³, Junyao Jiang¹, Xun Min^{1#}, Xuguang Xi^{2*}

¹ Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

² College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China

³ College of Animal Science & Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan Province, China

Abstract: [Objective] We expressed and purified a Pif1 helicase from *Anaerobaculum hydrogeniforman* to assess its unwinding characteristics. **[Methods]** Recombinant vector *pET21a-Ana.Pif1-TEV/SUMO* was constructed and expressed in *E. coli* BL21(DE3), and *Ana.Pif1* protein was purified using Ni-NTAs and Superdex 200 column chromatography. We then evaluated the unwinding polarity, optimal ATP concentration, optimal metal cofactor, optimal unwinding temperature, and substrate specificity of *Ana.Pif1* by stopped-flow FRET assay. **[Results]** The molecular weight of *Ana.Pif1* helicase was 59 kDa with no tags, protein yield was 9.5 mg/L, and purity was about 97%. We confirmed the unwinding polarity of *Ana.Pif1* was from DNA 5' to 3' end. And we found the optimal ATP concentration for *Ana.Pif1* unwinding to be 2 mmol/L, the optimal metal cofactor to be Mg²⁺, and the optimal reaction temperature to be 55 °C. The substrate specificity of *Ana.Pif1* unwinding DNA replication intermediates indicated that the Y-S fork substrate had the highest unwinding rate, 0.127 s⁻¹, and 12 nt-bubble substrate had the largest unwinding amplitude, 78.8%, indicating these two substrates could be natural replication intermediates for *Ana.Pif1*. **[Conclusion]** This study is the first to systematically analyze the unwinding characteristics of *Ana.Pif1* helicase. These findings facilitate elucidation of the molecular mechanisms of these thermophilic bacteria Pif1-family helicases.

Keywords: Pif1 helicases, *Anaerobaculum hydrogeniforman*, stopped-flow assay, unwinding characteristic parameters

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31660241), by the Science & Technology Fund Program for Basic Research of Guizhou Province (Guizhou foundation[2018]1196), by the Doctoral Research Start up Fund of Zunyi Medical University [ZMU(2017)05] and by the Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program of Zunyi Medical University (ZKDC2018005)

*Corresponding author. Xuguang Xi, Tel/Fax: +86-29-87081664, E-mail: xixuguang@nwsuaf.edu.cn; Xun Min, Tel/Fax: +86-851-28642550, E-mail: 2815400619@qq.com

#These authors contributed equally to this work.

Received: 11 May 2018; Revised: 13 July 2018; Published online: 17 August 2018