



灭癌素链霉菌中磷硫酰化修饰 DNA 结合结构域的功能分析

陈英, 孔令新, 邓子新, 由德林*

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 200030

陈英, 孔令新, 邓子新, 由德林. 灭癌素链霉菌中磷硫酰化修饰 DNA 结合结构域的功能分析. 微生物学报, 2022, 62(2): 543–555.

Chen Ying, Kong Lingxin, Deng Zixin, You Delin. Functional analysis of the sulfur-binding domain for specifically recognizing phosphorothioate modified DNA in *Streptomyces gancticus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 543–555.

摘要: 【目的】DNA 磷硫酰化(phosphorothioation, PT)是由硫原子取代 DNA 骨架磷原子上的非桥联氧原子形成的一种新型 DNA 修饰。PT 修饰除参与组成限制修饰系统外, 其更为广泛的生物学功能仍有待揭示。PT 修饰现有的检测方法操作复杂、成本高、耗时长, 而具有操作简便、成本低、耗时短等特点的酶联免疫检测(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)成为新 PT 检测方法开发的优选。灭癌素链霉菌(*Streptomyces gancticus*)中具有天蓝色链霉菌中 PT 修饰依赖的 IV 型限制酶(ScoMcrA)的同源酶, 暗示其同样含有特异性结合 PT 修饰 DNA 的硫结合结构域(sulfur binding domain, SBD)。本文对灭癌素链霉菌中的 SBD (简称为 Sg-SBD)与 PT 修饰 DNA 的亲合力进行定性检测与定量表征, 评估其用于 PT 修饰 ELISA 方法开发的潜力。【方法】对 ScoMcrA-SBD 和 Sg-SBD 的氨基酸序列进行比对分析, 利用 ScoMcrA-SBD 为模板进行同源建模。在大肠杆菌中异源表达 Sg-SBD, 利用纯化的 Sg-SBD 进行凝胶迁移(electrophoresis mobility shift assays, EMSA)检测。利用生物膜层干涉(bi-layer interferometry, BLI)技术进行 Sg-SBD 结合 PT 修饰 DNA 的定量表征。【结果】生物信息学分析揭示了 Sg-SBD 含有结合硫原子的保守的氨基酸残基, 同时表明 Sg-SBD 具有与 ScoMcrA-SBD 相似的结构。EMSA 实验发现 Sg-SBD 可以结合 PT 修饰 DNA 形成明显的迁移带, 初步证实 Sg-SBD 结合 PT 修饰 DNA 的活性。BLI 数据显示, Sg-SBD 具有比 ScoMcrA-SBD 更强的 PT 修饰 DNA 结合能力, 其与 PT 修饰 DNA 的亲合力常数在 nmol/L 级别, 并且 Sg-SBD 不结合非 PT 修饰 DNA。【结论】Sg-SBD 结合 PT 修饰 DNA 活性接近抗原-抗体的反应水平, 可用于 PT 修饰 DNA

基金项目: 国家自然科学基金(31630002, 317700038)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31630002, 317700038)

*Corresponding author. Tel: +86-21-62932943; E-mail: dlyou@sjtu.edu.cn

Received: 31 March 2021; Revised: 25 April 2021; Published online: 11 May 2021

ELISA 快速检测方法的开发。

关键词： DNA 磷硫酰化修饰；硫结合结构域；凝胶迁移；生物膜层干涉；酶联免疫检测

Functional analysis of the sulfur-binding domain for specifically recognizing phosphorothioate modified DNA in *Streptomyces gancidicus*

CHEN Ying, KONG Lingxin, DENG Zixin, YOU Delin*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China

Abstract: [Objective] DNA phosphorothioation (PT) is a novel DNA modification in which a non-bridging oxygen atom on the phosphodiester bond is replaced with sulfur atom. PT modification serves as a constitute element of bacterial restriction-modification (R-M) defensive system, but more biological functions of PT modification are awaiting exploration. The methods currently used for the identification of PT-DNA are complicated, time-consuming and labor-intensive. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has been known for its merits of easy handling, low cost and time-saving, which could be used for new PT-DNA identification method development. The homologous protein of PT-dependent REase ScoMcrA from *Streptomyces coelicolor* can be found in *Streptomyces gancidicus*, which suggested that this homologous protein presumably encodes the sulfur-binding domain (SBD) to specifically recognize sulfur atom on PT-DNA. In this study, the PT-DNA binding activity of SBD from *S. gancidicus* (Sg-SBD) was characterized qualitatively and quantitatively, respectively, which served as an assessment of its potential for the PT-DNA ELISA method development. [Methods] Sequence alignment of ScoMcrA-SBD and Sg-SBD was conducted. The homology modeling was used to compare the possible structure of Sg-SBD with that of ScoMcrA-SBD. ScoMcrA-SBD and Sg-SBD were heterologously expressed in *E. coli* and purified. Using the purified Sg-SBD, the electrophoresis mobility shift assays (EMSA) was conducted firstly. Then, the bilayer interferometry (BLI) analysis was used to confirm the binding affinity of Sg-SBD for PT-DNA quantitatively. [Results] Bioinformatics analysis revealed that Sg-SBD contains conserved amino acid residues that bind to sulfur atoms, and the structure of Sg-SBD was similar with that of ScoMcrA-SBD. The EMSA showed that Sg-SBD can bind PT-DNA and form an obvious migration band, suggesting its PT-DNA binding activity. BLI data further confirmed that Sg-SBD possessed higher binding affinity to PT-DNA than that of ScoMcrA-SBD. Moreover, Sg-SBD exhibited no affinity to non-PT-DNA. [Conclusion] Sg-SBD could specifically bind PT-DNA, and the binding affinity could be comparable to that of antigen and antibody, which suggested the potent potential for ELISA method development for rapid detection of PT-DNA.

Keywords: DNA phosphorothioation; sulfur binding domain (SBD); electrophoresis mobility shift assays (EMSA); bilayer interferometry (BLI); enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

DNA 磷硫酰化(PT)修饰是指硫原子替代 DNA 骨架上的非桥接氧原子而形成的一种新型 DNA 骨架修饰。PT 修饰是目前在 DNA 骨架上发现的唯一一种生理修饰,是对 DNA 结构的一个新补充^[1]。这种新型 DNA 修饰的调控^[2-4]和相关修饰酶的功能已经得到初步研究^[5-8]。PT 修饰广泛分布于原核生物中^[9-10],基于序列分析发现大约一半的 PT 修饰基因(*dndA-E*)与限制基因(*dndFGH*)共存,共同组成一个限制修饰系统,具有限制外源基因转入、保护遗传稳定的生理功能^[11-12]。另外 45%的修饰基因不与限制基因偶联而单独存在,暗示 PT 修饰在这些微生物中可能具有其他的生物学作用。探究这些微生物中 PT 修饰的生物学功能,以及在其他生物中是否广泛存在 PT 修饰,无疑需要开发除序列同源分析之外的 PT 修饰 DNA 检测和鉴定方法。目前 PT 修饰 DNA 的检测方法包括液相色谱质谱联用检测分析(LC-MS)^[1]、单分子实时测序(SMRT 测序)^[13]、碘切割依赖的深度测序(ICDS 测序)^[13]和基于碘对 PT 位点的特异性切割的高通量测序技术(PT-IC-seq)^[14-15]。这些检测方法高度依赖大型仪器设备,并且操作相对复杂、成本高、耗时长,限制了 PT 修饰相关生物学研究。因此,快速、简单、高效的 PT 修饰检测和鉴定方法的开发是该领域研究亟待解决的问题。

在诸多检测分析技术中,酶联免疫吸附分析(ELISA)凭借其灵敏度高、特异性好、检测速度快、成本低等优势已被广泛应用于各种生化分析。受 ELISA 技术广泛应用于 DNA 甲基化修饰检测的启发^[16],拟建立 PT 修饰 DNA 的 ELISA 检测方法。然而,由于结合 PT 修饰 DNA 的特异性抗体难以制备,我们将特异性结合 PT 修饰 DNA 的分子锁定在天蓝色链霉菌中发现

的 PT 修饰依赖的 IV 型限制酶 ScoMcrA 上。ScoMcrA 不仅可以切割 DNA 碱基上发生了甲基化修饰的 DNA,还可以切割 DNA 骨架上发生了 PT 修饰的 DNA^[17], ScoMcrA 的结构生物学研究^[18]表明,该蛋白以同源二聚体形式发挥功能,在其每个单体上都含有 4 个结构域: PT 修饰 DNA 结合结构域(sulfur binding domain, 简称 SBD)、SRA 结构域、HNH 结构域和 N 端结构域。其中, SBD 通过疏水作用将硫原子包裹在疏水口袋中,从而实现 PT 修饰 DNA 的特异性结合。初步研究表明,来自灭癌素链霉菌(*Streptomyces gancidicus*)中的 ScoMcrA 同源蛋白,其含有的 Sg-SBD 或许具有更高的特异性结合 PT 修饰 DNA 的能力。为了确认 Sg-SBD 与 PT 修饰 DNA 的亲和力是否达到抗原-抗体的亲和力水平,从而开发 PT 修饰 DNA 的 ELISA 检测方法,本文开展了 Sg-SBD 的功能分析研究。利用大肠杆菌异源表达了 Sg-SBD,定性并定量地研究了 Sg-SBD 结合 PT 修饰 DNA 的能力。研究表明,该 Sg-SBD 与 PT 修饰 DNA 的亲和力接近抗原-抗体的亲和力水平,具备用于 ELISA 快速检测 PT 修饰 DNA 的潜力。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株与质粒

质粒 pET28a 和菌株 *Escherichia coli* DH10B、*Escherichia coli* BL21(DE3)均由本实验室保存,用于 Sg-SBD 的表达。

1.1.2 主要试剂和仪器

Luria-Bertani (LB)培养基(胰蛋白胨 10.0 g, 酵母提取物 5.0 g, 氯化钠 10.0 g, 加蒸馏水溶解并定容至 1 000 mL)用于 Sg-SBD 的表达;镍离子亲和层析凝胶 Ni-NTA 柱(QIAGEN)购自上

海翊瑞生物科技有限公司;截留分子量为 3 kDa 的蛋白超滤管(Millipore)和蛋白脱盐柱 PD-10 (GE Healthcare)以及质粒小提试剂盒(OMEGA)均购自上海新启生物科技有限公司;辣根过氧化酶标记的链霉亲和素购自上海索莱宝生物科技有限公司; Micro BCA™ 蛋白定量试剂盒 (Thermo)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。细菌培养摇床为上海知楚仪器有限公司产品;高压破碎仪为上海永联生物科技有限公司产品;超速冷冻离心机 Centrifuge 5810 R (Eppendorf)为艾本德中国有限公司产品;荧光凝胶成像系统 Tanon 5200 Multi 为上海天能科技有限公司产品;生物膜层干涉实验使用上海交通大学分析测试中心的 Fortebio & Octet RED 96 相互作用分析仪;多功能酶标仪 BioTeck Synergy 2 为基因有限公司产品。

1.2 Sg-SBD 表达质粒的构建

来源于灭癌素链霉菌 (*Streptomyces gancidicus*)的 ScoMcrA 同源蛋白(NCBI 号: WP_006134840)的第 124–293 位氨基酸参与形成特异性结合硫原子的 SBD 结构域,即为 Sg-SBD。因此,本研究选取 WP_006134840 的第 124–293 位氨基酸序列,利用 Serial Cloner 软件将其转化为对应的核苷酸序列,全基因合成后克隆至 pET28a 载体上,构建成 Sg-SBD 表达载体 pCY01。同样的,根据 ScoMcrA-SBD (PDB:5ZMO)的氨基酸序列,对其进行基因序列全合成后利用 pET28a 载体构建了 ScoMcrA-SBD 的表达载体 pCY02。

1.3 Sg-SBD 重组蛋白的表达与纯化

将构建好的 pCY01 转化至 *E. coli* BL21(DE3) 菌株中,挑选单克隆接种于含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 100 mL LB 中, 37 °C、220 r/min 培养过夜。次日,按照 1%的接种量转接入 1 000 mL LB 中,同样条件下培养至

OD_{600} 为 0.6 左右时,加入终浓度为 0.2 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)诱导, 16 °C 诱导 18 h。培养结束后,离心收集菌体(4 000 r/min 离心 20 min),并用 Buffer A (20 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 8.0)悬浮菌体。所得菌液在低温(4 °C)条件下利用高压破碎仪进行破碎(破碎压力为 600 bar),然后低温离心(4 °C, 10 000 r/min) 60 min,收集上清。

收集离心后的上清过 0.45 μm 的水相滤膜,然后利用 Ni-NTA (nitrilotriacetic acid)亲和柱进行蛋白的纯化。蛋白样品上柱前,用 Buffer A 平衡柱子。然后等待所有含有 Sg-SBD 的上清液上样完成后,使用 6 倍柱体积的含有不同咪唑浓度(60 mmol/L-180 mmol/L)的 Buffer A 进行梯度洗脱。利用 12%的 SDS-PAGE 进行目的蛋白跟踪检测。批量制备高纯度的 Sg-SBD 时,先用 6 倍柱体积含有终浓度为 60 mmol/L 咪唑的 Buffer A 冲洗杂蛋白,最后用 6 倍柱体积含有终浓度为 120 mmol/L 咪唑的 Buffer A 洗脱目的蛋白。纯化得到的 Sg-SBD 通过超滤浓缩后,利用 PD-10 脱盐柱进行脱盐处理。Sg-SBD 最终溶解于 PBS 溶液(10 mmol/L NaH_2PO_4 , 1 mmol/L K_2HPO_4 , 137 mmol/L NaCl, 3 mmol/L KCl, pH 7.4)中,于-80 °C 冷冻保存。

1.4 Sg-SBD 蛋白与 DNA 结合的凝胶迁移实验(electrophoresis mobility shift assays, EMSA)

参考 ScoMcrA-SBD 与 PT 修饰 DNA 的共晶结构表征^[19]中所用的 DNA 序列,设计并合成两条用于制备 EMSA 实验所需 DNA 探针的引物 FAM-PT-F 和 FAM-PT-R (表 1)。两条引物都是以 $\text{G}_{\text{PS}}\text{GCC}$ 为核心序列、5'端带有 5-羧基荧光素(5-carboxyfluorescein, FAM)标记且总长度为 20 nt。EMSA 实验用 FAM 标记 PT 修饰的

表 1 本研究所使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Description
FAM-PT-F	ACGGCG _{PS} GCCGCGGCGGCCGG (FAM)	Double-strand FAM labeled DNA probe with one PT-modification site for EMSA
FAM-PT-R	CCGGCCGCCGCG _{PS} GCCGCCGT	
PT-F	ACGGCG _{PS} GCCGCGGCGGCCGG	Double-strand DNA with one PT-modification site for BLI
PT-R	CCGGCCGCCGCG _{PS} GCCGCCGT	
non-PT-F	ACGGCGGCCGCGGCCGG	Double-strand DNA without PT-modification for BLI
non-PT-R	CCGGCCGCCGCGGCCGG	
Bio-PT-F	ACGGCG _{PS} GCCGCGGCGGCCGG (biotin)	Double-strand biotin labeled DNA with one PT-modification site for ELISA

双链 DNA 探针制备方法如下: 分别取 10 μL 母液浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 引物 FAM-PT-F、FAM-PT-R (表 1) 溶解于 5 μL 退火反应缓冲液 (150 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L MgCl_2 , 240 mmol/L NaCl, pH 7.4) 中。反应体系于 95 $^\circ\text{C}$ 条件下温浴 15 min, 然后自然冷却至室温, 得到终浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 的储存母液。摸索容易检测的探针 DNA 最低用量: 将终浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 的储存母液分别用反应缓冲液稀释至浓度为 4、2、1、0.5、0.1 $\mu\text{mol/L}$, 分别取上述浓度梯度的 DNA 20 μL 进行 6% PAGE 胶电泳, 120 V 恒压预电泳 30 min, 使用凝胶成像系统进行扫描分析。

DNA 与 Sg-SBD 的 EMSA 实验: 终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ (即 0.2 μg) FAM 标记的双链 DNA 探针、不同用量的 Sg-SBD (0、2、4、8、16、20 μg) 溶解于 20 μL EMSA 反应缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mmol/L dithiothreitol (DTT), 4% (V/V) 甘油, pH 7.5) 中。反应体系在 4 $^\circ\text{C}$ 条件下温浴 30 min。配置 6% PAGE 胶, 用预冷的 1 \times TBE buffer (90 mmol/L Tris-base, 90 mmol/L 硼酸, 2 mmol/L EDTA, pH 8.0), 120 V 恒压预电泳 30 min。将 EMSA 反应产物上样, 继续低温恒压 (120 V) 电泳 60 min, 使用凝胶成像系统进行扫描分析。

1.5 SBD 蛋白与 DNA 结合的生物膜层干涉 (biolayer interferometry, BLI) 实验

双链含有 PT 修饰和不含 PT 修饰 DNA 探针的制备方法同 1.5, 使用的引物分别为 PT-F/R 和 non-PT-F/R (表 1)。制备所得 DNA 探针用水稀释至 5 $\mu\text{mol/L}$ 备用。经 BCA 定量试剂盒测定 ScoMcrA-SBD、Sg-SBD 蛋白浓度, 制备成 20 $\mu\text{g/mL}$ 母液备用。使用 96 孔酶标板进行实验样品配制, 每 1 行为 1 组实验, 每 1 组实验分别选取 5 列设置 5 个不同体系。其中, ScoMcrA-SBD、Sg-SBD 与 PT 修饰 DNA 结合能力测定的 BLI 实验的体系设置为: 第 1 列设置为 200 μL PBS 缓冲液、第 2 列为 20 μg SBD (溶于 200 μL PBS 缓冲液)、第 3 列为 200 μL PBS-T 缓冲液、第 4 列为 2 μg DNA 样品 (溶于 200 μL PBS 缓冲液)、第 5 列为 200 μL PBS 缓冲液。分别选取 A、B、C、D 4 行设计 4 组实验: 其中 A、B 组实验中第 2 列均为 Sg-SBD, 第 4 列分别为 PT 修饰的 DNA 样品和 PBS 缓冲液, 其余组成相同; C、D 组实验第 2 列均为 ScoMcrA-SBD, 第 4 列分别为 PT 修饰的 DNA 样品和 PBS 缓冲液, 其余组成相同。5 个阶段中 NTA 传感器探针在不同体系中的停留时间为: 传感器平衡 (baseline) 阶段, 停留 300 s; 传感器结合蛋白 (loading) 阶段, 停留 300 s; 传感

器平衡(baseline)阶段,停留 300 s;蛋白与 DNA 结合(association)阶段,停留 300 s;蛋白与 DNA 解离(dissociation)阶段,停留 600 s。

Sg-SBD 与 PT 修饰 DNA、非 PT 修饰 DNA 结合能力测定的 BLI 实验:第 1 列设置为 200 μL PBS 缓冲液、第 2 列为 10 μg Sg-SBD (溶于 200 μL PBS 缓冲液)、第 3 列为 200 μL PBS-T 缓冲液、第 4 列为 2 μg DNA 样品(溶于 200 μL PBS 缓冲液)、第 5 列为 200 μL PBS 缓冲液。分别选取 A、B、C 3 行设计 3 组实验:A-C 3 组实验中除第 4 列加入不同的 DNA 样品(A 组用 PBS 缓冲液替代 DNA 样品、B 组使用含有 PT 修饰的 DNA 样品、C 组使用不含有 PT 修饰的 DNA 样品)之外,其他体系均相同。5 个阶段中 NTA 传感器探针在不同体系中的停留时间为:传感器平衡(baseline)阶段,停留 60 s;传感器结合蛋白(loading)阶段,停留 300 s;传感器平衡(baseline)阶段,停留 60 s;蛋白与 DNA 结合(association)阶段,停留 300 s;蛋白与 DNA 解离(dissociation)阶段,停留 600 s。

1.6 Sg-SBD 与 DNA 的酶联免疫检测

借鉴酶联免疫检测原理,设计 Sg-SBD 与

DNA 相互作用检测体系(图 1A)。用辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记链霉亲和素(streptavidin) (上海索莱宝生物科技有限公司)(相当于抗体)。在生物素(biotin)-链霉亲和素(streptavidin)系统中,借助所形成的亲和素-生物素-酶复合物,通过酶催化底物显色,可检出含有生物素标记的 PT 修饰 DNA(相当于抗原)。方法简述如下:①Sg-SBD 包被酶标板:添加 100 μL 含有终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Sg-SBD 的包被缓冲液(15 mmol/L Na_2CO_3 , 35 mmol/L NaHCO_3 , pH 9.6)在 4 $^\circ\text{C}$ 条件下包被 12 h;②封闭:使用 200 μL PBS 缓冲液润洗并拍干,每孔加入 200 μL 封闭液(含有终浓度为 5%牛血清白蛋白的 PBS 缓冲液),于 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 h;③加样:先用 200 μL PBS-T 洗涤液(含有终浓度为 0.05% Tween-20 的 PBS 缓冲液)洗涤,然后加入标准生物素 PT 修饰 DNA 样品常温反应 1 h;④加入抗体:使用 200 μL PBS-T 洗涤液洗涤后,加入 100 μL 含有 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗体,常温反应 1 h;⑤显色:使用 200 μL PBS-T 洗涤液洗涤,加入 100 μL 利用 A 液(330 mmol/L 乙酸钠, 16 mmol/L 柠檬酸, 0.06% (V/V) 30%双氧水)、B

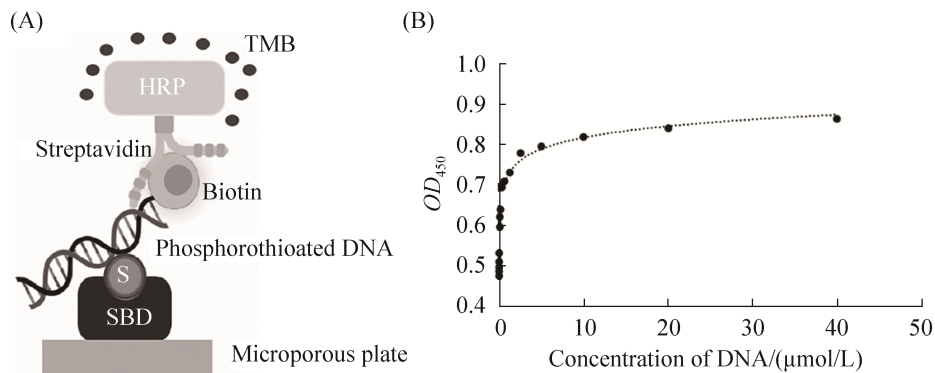


图 1 PT-DNA 的 ELISA 检测体系

Figure 1 The ELISA system for detection of PT-DNA. A: The schematic depiction of the ELISA system for detection of PT-DNA; B: The curve of the response signal value changes with the concentration of PT modified DNA. The horizontal axis represents DNA concentration (converted to a logarithm based on e), the vertical axis represents the mean OD_{450} .

液(1 mmol/L EDTA, 9.8 mmol/L 柠檬酸, 1/10 (V/V)甘油, 1 mmol/L 四甲基联苯胺(tetramethyl benzidine, 简称 TMB) (溶于 3 mL DMSO))按照 1:1 比例新鲜配制的 TMB 显色液, 37 °C 避光反应 15 min; ⑥终止:加入 100 μ L 终止液(2 mol/L H₂SO₄), 室温反应 3–5 min; ⑦测定:利用多功能酶标仪进行 OD₄₅₀ 数值检测。

生物素标记的含有 PT 修饰双链 DNA 的制备方法同 1.5, 使用的引物为 Bio-PT-F/PT-R (表 1)。检测反应唯一变量为生物素标记 PT 修饰 DNA 的使用终浓度(样品经过 2 倍梯度稀释, 浓度分别为 40、20、10、5、2.5、1.25、0.625 μ mol/L 以及 312、156、78、39、19、9.7、4.8、2.4、1.2 nmol/L), 每一个浓度设置 8 个平行重复, 在相同条件下进行检测。最终得到每一个生物素标记 PT 修饰 DNA 使用终浓度下的 8 个复孔中 OD₄₅₀ 数值的平均值。将 DNA 浓度数值进行 ln 对数换算, 然后进行对数模型拟合。

1.7 Sg-SBD 生物信息学分析

Sg-SBD 氨基酸序列同源性分析使用 NCBI 中的 BLAST 引擎(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>); 多序列比对利用 BioEdit 软件; 结构预测利用 SWISS-MODEL 在线软件(<https://swissmodel.expasy.org>)。

2 结果与分析

2.1 Sg-SBD 的生物信息学分析

为了考察来源于灭癌素链霉菌的 Sg-SBD 特异性结合 PT 修饰 DNA 的能力, 首先在序列水平分析了其可能参与结合硫原子的保守氨基酸残基。通过 BLASTp 序列比对分析发现, Sg-SBD 与 ScoMcrA-SBD (PDB:5ZMO)具有一定的序列相似性(34% identity, 47% similarity)。同时, 在 Sg-SBD 中也发现可能参与形成结合

硫原子疏水口袋的几个保守的氨基酸残基, 包括 H26、Y73 和 P74, 分别与已获晶体结构的 ScoMcrA-SBD 中 H26、Y74 和 P75 相对应。ScoMcrA-SBD 的晶体结构研究已经表明, 该蛋白中 Y74 的芳香环和 P75 的吡咯烷环参与形成 SBD 表面的一个疏水空腔, H26 的侧链参与形成该空腔的盖。硫原子与 P75 的吡咯烷环、Y74 和 H26 的 β -亚甲基基团存在疏水相互作用^[17], 这些结果暗示 Sg-SBD 与 ScoMcrA-SBD 具有相似的结合硫原子的疏水口袋。这些重要氨基酸残基的存在初步暗示 Sg-SBD 可能具有结合 PT 修饰 DNA 的能力。

为了进一步研究 Sg-SBD 结合 PT 修饰 DNA 的可能性, 我们以 ScoMcrA-SBD 为模板进行了 Sg-SBD 结构的模拟。通过 SWISS-MODEL 在线分析, 得到如图 2B-ii 所示的 Sg-SBD 结构。通过与 ScoMcrA-SBD 结构比对分析发现, Sg-SBD 整体结构相比于 ScoMcrA-SBD 较为松散, 参与组成结合硫原子所需疏水口袋的氨基酸(H26、Y73 和 P74)处于与 ScoMcrA-SBD 中对应相同氨基酸的相似位置。另外, Sg-SBD 中与 ScoMcrA-SBD 中 S⁹²RGRR⁹⁶基序相对应的基序 L⁹³AMRM⁹⁷参与形成的 loop 区域更为宽松。Sg-SBD 与 ScoMcrA-SBD 相似的结构进一步暗示 Sg-SBD 可能具有结合 PT 修饰 DNA 的能力, 而 Sg-SBD 更为宽松的 loop 区域表明其具有更大的柔性空间, 暗示着其可能具有更强的 PT 修饰 DNA 结合能力。

2.2 Sg-SBD 的表达和纯化

为了实验验证 Sg-SBD 结合 PT 修饰 DNA 的能力, 对 Sg-SBD 进行了克隆和异源表达。根据 Sg-SBD 的氨基酸序列, 利用 Serial Cloner 软件将其转化为对应的核苷酸序列, 全基因合成后将该序列克隆至 pET28a, 构建成 Sg-SBD 表达载体 pCY01 (图 3A)。pCY01 转化大肠杆菌

后, 在 16 °C 条件下, 添加终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG, 进行 18 h 诱导表达。表达的 Sg-SBD 经镍柱纯化, SDS-PAGE 分析(图 3B), 显示 Sg-SBD 蛋白的分子量在 20 kDa 左右, 与软件 Serial Cloner 预测 Sg-SBD 的 19.94 kDa 的分子量基本一致。Sg-SBD 蛋白的纯度在 80% 以上, 1 L 大肠杆菌发酵液获得纯化的 Sg-SBD 蛋白约为 8.5 mg。

2.3 Sg-SBD 与 PT 修饰 DNA 结合活性的定性分析

利用获得纯化的 Sg-SBD 蛋白, 按照方法 1.5 所述, 利用羧基荧光素(FAM)标记的 PT 修

饰 DNA 作为探针进行凝胶迁移实验。首先, 本研究摸索了易于观察的 DNA 探针使用浓度。从图 4A 所示的结果可以看出, 当使用的 DNA 探针浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ (0.2 μg) 时, 显色程度中等, 易于观察。因此, 将进行 EMSA 实验中所用 DNA 探针用量固定为 1 $\mu\text{mol/L}$ (0.2 μg), 通过与不同浓度的 Sg-SBD 混合, 定性分析 Sg-SBD 与 DNA 的结合能力。从图 4B 可以看出, Sg-SBD 用量为 8 μg 时开始出现明显凝胶滞留现象。这些实验结果从定性的角度表明, Sg-SBD 与 PT 修饰 DNA 有明显的结合能力, 但具体的亲和力大小需要通过定量测量进行分析。

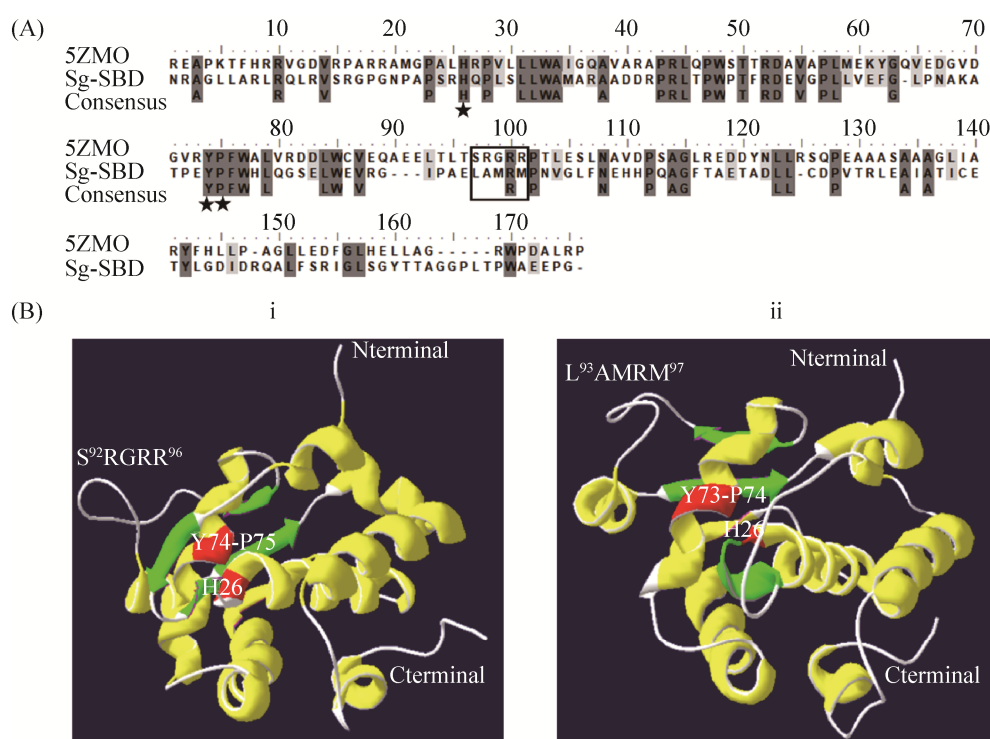


图 2 Sg-SBD 的生物信息学分析

Figure 2 The bioinformatics analysis of Sg-SBD. A: sequence alignment of Sg-SBD with ScoMcrA-SBD (PDB:5ZMO). The same amino acids for binding PT-DNA in Sg-SBD and ScoMcrA-SBD were marked with black stars and the motif composed of five amino acids was marked with a black rectangle. B: homology-modeled structure of Sg-SBD. i: depicted structure of ScoMcrA-SBD with data downloaded from PDB (PDB:5ZMO). ii: homology-modeled structure of Sg-SBD. The α -helices were shown in yellow, the β sheets were shown in green, and the conservative amino acids were highlighted in red.

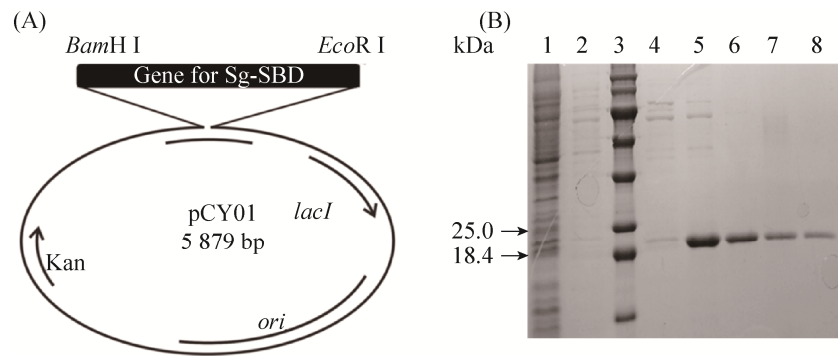


图3 Sg-SBD 蛋白的表达和纯化

Figure 3 The expression and purification of Sg-SBD. A: the schematic construction of Sg-SBD expression plasmid pCY01. B: the SDS-PAGE analysis of Sg-SBD. Lane 1, the soluble supernatant fraction of BL21/pCY01; lane 2, fraction after flow through the column; lane 4, fraction eluted with 60 mmol/L imidazole; lane 5, fraction eluted with 120 mmol/L imidazole; lane 6, fraction eluted with 140 mmol/L imidazole; lane 7, fraction eluted with 160 mmol/L imidazole; lane 8, fraction eluted with 180 mmol/L imidazole; Lane 3, protein marker.

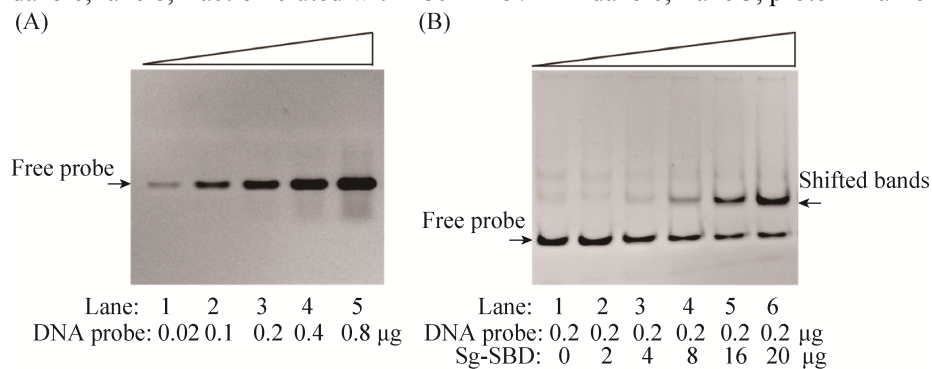


图4 Sg-SBD 结合 DNA 的 EMSA 检测

Figure 4 EMSAs of Sg-SBD binding to DNA. A: the optimization of FAM-labeled PT-DNA concentration for EMSAs analysis. Lanes 1–5: loaded with increasing concentrations of PT-DNA. B: EMSAs of Sg-SBD binding to FAM-labeled PT-DNA. 0.2 μ g FAM-labeled PT-DNA was incubated with increasing concentrations of Sg-SBD (lanes 2–6: lanes contain 2, 4, 8, 16, 20 μ g Sg-SBD, respectively). Lane 1: negative control without proteins. The probes and shifted bands are indicated by arrows.

2.4 Sg-SBD 与 PT 修饰 DNA 结合的定量分析

为了定量检测分析 Sg-SBD 与 PT 修饰 DNA 的结合能力, 本研究设计并开展了 BLI 实验。BLI 检测实验流程如图 5A 所示, 在平衡阶段(baseline) Ni-NTA (nitrilotriacetic acid) 传感器浸泡于 PBS 溶液中, 加载阶段(loading) SBD 结合至 NTA 传感器上, 再次进入平衡阶段(baseline) 洗去非特异性吸附, 结合阶段

(association) DNA 与 SBD 结合, 解离阶段(dissociation) DNA 与 SBD 解离。生物分子结合到传感器表面形成生物膜, 生物膜对透过传感器的光波造成干涉现象, 干涉现象通过相位移动的方式被检测, 基于 5 个阶段的干涉光谱图的位移变化来检测 SBD 与 DNA 分子间的相互作用。利用表达载体 pCY02, 参考 ScoMcrA-SBD 的表达和纯化方法, 得到 ScoMcrA-SBD。利用 BLI 分别对 ScoMcrA-SBD 和 Sg-SBD 与

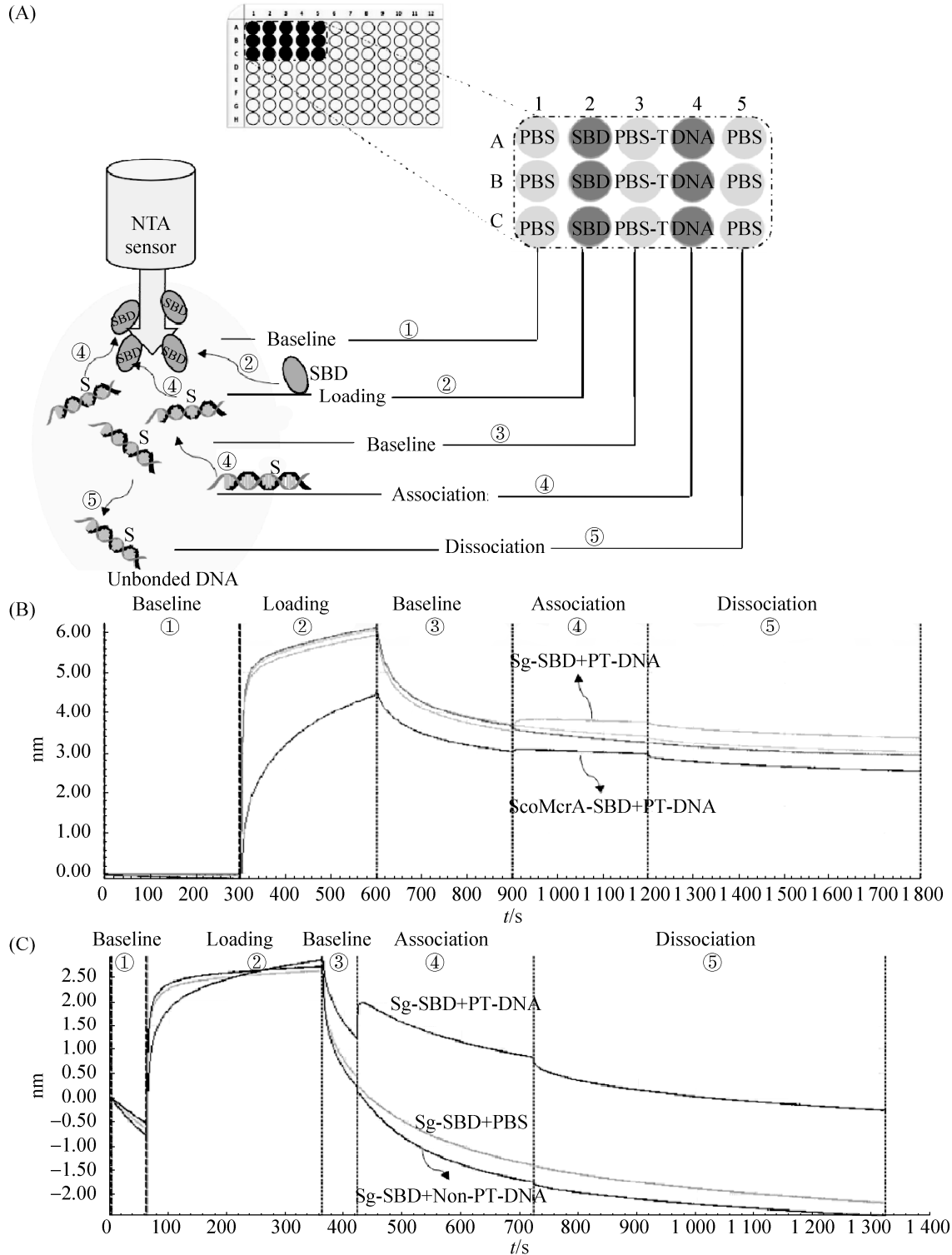


图 5 Sg-SBD 与 DNA 相互作用的 BLI 检测

Figure 5 BLI assay to determine the interaction between Sg-SBD and DNA. A: schematic procedure of biolayer interferometry; B: the binding profile of ScoMcrA-SBD, Sg-SBD to PT-DNA; C: the binding profile of Sg-SBD to different DNA. Sg-SBD showed obvious difference between the binding of PT-DNA and non-PT-DNA in 420–720 seconds. PBS buffer was used as negative control.

PT 修饰 DNA 的亲和力常数进行测定(图 5B)。对结合段曲线进行拟合, 测得 Sg-SBD 与 PT 修饰 DNA 的亲和力常数为 9.08×10^{-9} mol/L, 而 ScoMcrA-SBD 与 PT 修饰 DNA 的亲和力常数为 1.83×10^{-6} mol/L。也就是说, Sg-SBD 与 PT 修饰 DNA 的亲和力常数在 nmol/L 水平, ScoMcrA-SBD 与 PT 修饰 DNA 的亲和力常数在 μ mol/L 水平。这就意味着相比于 ScoMcrA-SBD, Sg-SBD 具有更强的结合 PT 修饰 DNA 的能力。

为了进一步探索 Sg-SBD 与 PT 修饰 DNA 以及非 PT 修饰 DNA 结合能力的差异, 同时进行了 Sg-SBD 与 PT 修饰 DNA 以及非 PT 修饰 DNA 的结合能力定量检测。结果如图 5C 所示, 其中空白对照为 DNA 样品列为不加入任何 DNA 的 PBS 缓冲液。观察 420–720 s 这段区间 (association) 的曲线变化可知, Sg-SBD 与 PT 修饰 DNA 有明显的结合, 而 Sg-SBD 与非 PT 修饰 DNA 几乎没有结合。根据曲线进行拟合的计算结果也表明, Sg-SBD 与 PT 修饰 DNA 结合的亲和力常数在 nmol/L 级别, 而 Sg-SBD 与非 PT 修饰 DNA 的亲和力常数则无法得到拟合结果。由此可见, Sg-SBD 对于 PT 修饰 DNA 和非 PT 修饰 DNA 的结合存在明显的差异, 这为其在 PT 修饰 DNA 的检测方法开发的应用探索奠定了基础。

3 讨论

DNA 是重要的遗传物质, 储存着所有蛋白质和 RNA 的全部遗传信息。DNA 上的任何一个微小的变化都有可能影响生命活动。PT 修饰的发现拓展了经典的 DNA 组成, 引起国内外的高度关注。PT 修饰广泛存在于细菌中, 研究发现修饰基因与限制基因组成一个新颖的 PT 修饰依赖的限制系统, 起到限制外源 DNA、保护自身 DNA 的作用。但是, 所有具有 PT 修饰的

细菌中, 大约一半仅含有 PT 修饰基因, 暗示这种新型 DNA 修饰可能还有其他未知的生理功能。因此, 开发简单、快捷、高效的 PT 修饰检测分析技术, 对于探究 PT 修饰的生物学作用, 以及拓展 PT 修饰可能存在的生物领域具有重要意义。

本文选取了来源于灭癌素链霉菌中的 Sg-SBD, 通过 BLASTp 序列比对分析, 发现 Sg-SBD 与 ScoMcrA-SBD (PDB:5ZMO) 具有 47% 的序列相似性, 在 Sg-SBD 中也发现可能参与形成结合疏原子疏水口袋的几个保守的氨基酸残基 H26、Y73 和 P74 (图 2A), 暗示 Sg-SBD 可能具有结合 PT-DNA 的能力。对 Sg-SBD 的同源建模揭示该蛋白含有比 ScoMcrA-SBD 更为宽松的 loop 区域, 暗示着可能具有更强的 PT 修饰 DNA 结合能力。EMSA 实验分析表明, Sg-SBD 与 PT 修饰 DNA 能够发生相互作用(图 4B)。通过 BLI 数据的对比分析, 发现 Sg-SBD 与 PT 修饰 DNA 的亲和力常数为 9.08×10^{-9} mol/L, 该数值远小于 ScoMcrA-SBD 与 PT 修饰 DNA 的亲和力常数(图 5B), 说明 Sg-SBD 具有更强的 PT 修饰 DNA 结合能力, 并且该亲和力达到抗原-抗体的亲和力水平, 具备用于 ELISA 技术检测 PT 修饰 DNA 的潜力。基于此, 我们对 Sg-SBD 应用于 PT 修饰 DNA ELISA 方法开发进行了初步探索。根据 ELISA 原理^[20], 设计 Sg-SBD 用于 PT 修饰 DNA 的检测体系(图 1A): 首先在酶标板上包被 Sg-SBD, 然后加入不同浓度的 DNA 标准品, 经过孵育洗涤后加入辣根过氧化物标记的链霉亲和素, 再次孵育后洗涤, 加入 TMB 显色液进行显色。预期最终的显色程度能够与加入的生物素标记的 PT 修饰 DNA 的量成正比。为了进一步验证最终的信号值能否真实反映目标分子配体受体偶联物的量, 绘制反应信号值随反应配体增加的变化曲线, 并利

用对数模型对该曲线进行拟合^[21]。结果如图 1B 所示，横轴表示不同的标准品 DNA 浓度，纵轴表示反应信号值，从该图中曲线趋势可以看出，随着加入生物素标记的 PT 修饰 DNA 浓度的升高，反应信号值逐步升高，意味着在整个检测过程中，酶联复合物能够成功地在酶标板上保留，而最终的信号值能够有效地反映 PT 修饰 DNA 的量。这些反应信号值随 PT 修饰 DNA 浓度的增加而变大，表明 Sg-SBD 具备用于开发 ELISA 检测 PT 修饰 DNA 的潜力。后续研究有望在该体系建立的基础上，进行 PT 修饰 ELISA 检测技术的深度开发和优化，从而实现 PT 修饰 DNA 的高通量快速检测，并作为有效的定量手段推动 PT 修饰研究的进程。

参考文献

- [1] Wang LR, Chen S, Xu TG, Taghizadeh K, Wishnok JS, Zhou XF, You DL, Deng ZX, Dedon PC. Phosphorothioation of DNA in bacteria by *dnd* genes. *Nature Chemical Biology*, 2007, 3(11): 709–710.
- [2] Cheng QX, Cao B, Yao F, Li JL, Deng ZX, You DL. Regulation of DNA phosphorothioate modifications by the transcriptional regulator DptB in *Salmonella*. *Molecular Microbiology*, 2015, 97(6): 1186–1194.
- [3] He W, Huang T, Tang Y, Liu YH, Wu XL, Chen S, Chan W, Wang YJ, Liu XY, Chen S, Wang LR. Regulation of DNA phosphorothioate modifications in *Salmonella enterica* by DndB. *Scientific Reports*, 2015, 5: 12368.
- [4] 王俞苹, 孔令新, 郑涛, 李金丽, 孙溢华, 由德林. 假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 中转录调控因子 SpfB 负调控 DNA 磷硫酰化修饰. *微生物学报*, 2019, 59(5): 851–862.
Wang YP, Kong LX, Zheng T, Li JL, Sun YH, You DL. The transcriptional regulator SpfB negatively regulates DNA phosphorothioate modification in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(5): 851–862. (in Chinese)
- [5] Cao B, Zheng XQ, Cheng QX, Yao F, Zheng T, Ramesh Babu I, Zhou HC, Dedon P, You DL. *In vitro* analysis of phosphorothioate modification of DNA reveals substrate recognition by a multiprotein complex. *Scientific Reports*, 2015, 5: 12513.
- [6] Yao F, Xu TG, Zhou XF, Deng ZX, You DL. Functional analysis of *spfD* gene involved in DNA phosphorothioation in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *FEBS Letters*, 2009, 583(4): 729–733.
- [7] You DL, Wang LR, Yao F, Zhou XF, Deng ZX. A novel DNA modification by sulfur: DndA is a NifS-like cysteine desulfurase capable of assembling DndC as an iron-sulfur cluster protein in *Streptomyces lividans*. *Biochemistry*, 2007, 46(20): 6126–6133.
- [8] Zheng T, Jiang P, Cao B, Cheng QX, Kong LX, Zheng XQ, Hu QH, You DL. DndEi exhibits helicase activity essential for DNA phosphorothioate modification and ATPase activity strongly stimulated by DNA substrate with a GAAC/GTTC motif. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(3): 1492–1500.
- [9] Tong T, Chen S, Wang LR, Tang Y, Ryu JY, Jiang SS, Wu XL, Chen C, Luo J, Deng ZX, Li ZQ, Lee SY, Chen S. Occurrence, evolution, and functions of DNA phosphorothioate epigenetics in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(13): E2988–E2996.
- [10] Sun YH, Kong LX, Wu GJ, Cao B, Pang XY, Deng ZX, Dedon P, Zhang CH, You DL. DNA phosphorothioate modifications are widely distributed in the human microbiome. *Biomolecules*, 2020, 10(8): 1175.
- [11] Cao B, Cheng QX, Gu C, Yao F, DeMott MS, Zheng XQ, Deng ZX, Dedon PC, You DL. Pathological phenotypes and *in vivo* DNA cleavage by unrestrained activity of a phosphorothioate-based restriction system in *Salmonella*. *Molecular Microbiology*, 2014, 93(4): 776–785.
- [12] Xu TG, Yao F, Zhou XF, Deng ZX, You DL. A novel host-specific restriction system associated with DNA backbone S-modification in *Salmonella*. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(20): 7133–7141.
- [13] Cao B, Chen C, DeMott MS, Cheng QX, Clark TA, Xiong XL, Zheng XQ, Butty V, Levine SS, Yuan G, Boitano M, Luong K, Song Y, Zhou XF, Deng ZX, Turner SW, Korlach J, You DL, Wang LR, Chen S, Dedon PC. Genomic mapping of phosphorothioates reveals partial modification of short consensus sequences. *Nature Communications*, 2014, 5: 3951.

- [14] Li JL, Chen Y, Zheng T, Kong LX, Zhu SC, Sun YH, Deng ZX, Yang LT, You DL. Quantitative mapping of DNA phosphorothioate reveals phosphorothioate heterogeneity of low modification frequency. *PLoS Genetics*, 2019, 15(4): e1008026.
- [15] Zhu SC, Zheng T, Kong LX, Li JL, Cao B, DeMott M, Sun YH, Chen Y, Deng ZX, Dedon P, You DL. Development of methods derived from iodine-induced specific cleavage for identification and quantitation of DNA phosphorothioate modifications. *Biomolecules*, 2020, 10(11): 1491.
- [16] Dong JJ, He LL, Yu F, Yu SC, Liu L, Tian YM, Wang YL, Wang J, Qu LB, Wu YJ, Han RP. Enhanced chemiluminescence enzyme-linked immunoassay for the determination of DNA methyltransferase 1 in human serum. *Luminescence*, 2019, 34(3): 368–374.
- [17] Liu G, Ou HY, Wang T, Li L, Tan HR, Zhou XF, Rajakumar K, Deng ZX, He XY. Cleavage of phosphorothioated DNA and methylated DNA by the type IV restriction endonuclease ScoMcrA. *PLoS Genetics*, 2010, 6(12): e1001253.
- [18] Liu G, Zhang ZY, Zhao G, Deng ZX, Wu G, He XY. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the type IV restriction endonuclease ScoMcrA from *Streptomyces coelicolor*, which cleaves both Dcm-methylated DNA and phosphorothioated DNA. *Acta Crystallographica Section F*, 2015, 71(1): 57–60.
- [19] Liu G, Fu WC, Zhang ZY, He Y, Yu H, Wang YL, Wang XL, Zhao YL, Deng ZX, Wu G, He XY. Structural basis for the recognition of sulfur in phosphorothioated DNA. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 4689.
- [20] Crowther JR. ELISA. Theory and practice. *Methods in Molecular Biology*, 1995, 42: 1–218.
- [21] Findlay JWA, Dillard RF. Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. *The AAPS Journal*, 2007, 9(2): E260–E267.

(本文责编 张晓丽)