



Sulfolobus acidocaldarius DHH 超家族核酸酶 Saci0542 的酶学特征研究

王伟玮^{1,2}, 谢娟娟³, 宋吴涛³, 刘喜朋³, 汪启胜^{1,2*}

1 中国科学院上海应用物理研究所, 上海 201800

2 中国科学院大学, 北京 100049

3 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

王伟玮, 谢娟娟, 宋吴涛, 刘喜朋, 汪启胜. *Sulfolobus acidocaldarius* DHH 超家族核酸酶 Saci0542 的酶学特征研究. 微生物学报, 2022, 62(2): 556–566.

Wang Weiwei, Xie Juanjuan, Song Wutao, Liu Xipeng, Wang Qisheng. Enzymatic characterization of *Sulfolobus acidocaldarius* Saci0542 nuclease belonging to DHH superfamily. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 556–566.

摘要:【目的】以嗜酸嗜热硫化叶菌 *Sulfolobus acidocaldarius* 的 DHH 超家族核酸酶(Saci0542) 为例, 研究其核酸外切酶活性特点, 为阐明其在 DNA 代谢中的具体功能提供生化基础。【方法】将嗜酸嗜热硫化叶菌 DHH 超家族核酸酶 Saci0542 基因在大肠杆菌中重组表达, 经亲和层析纯化得到电泳纯的重组蛋白; 利用荧光标记的寡核苷酸作为底物, 用尿素变性聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 鉴定 Saci0542 的酶学特征。【结果】重组表达的 DHH 超家族核酸酶 Saci0542 具有典型的单链核酸特异性的 3'-5'外切酶活性。进一步酶学特征表征结果如下: 酶活性依赖于二价金属离子 Mn^{2+} , 而 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 等二价金属离子对活性没有明显的促进作用; Saci0542 在 pH 5.5–10 的广泛范围内均表现出较高酶活性; 高于 200 mmol/L 的 NaCl 强烈抑制酶活性; 最适反应温度为 50–55 °C; 末端磷酸基团抑制 3'-5'外切酶活性。【结论】本研究证实, Saci0542 是一种 Mn^{2+} 依赖型 3'-5'外切酶, 酶活性与 NrnA 核酸酶相似, 可能在细胞内负责 DNA 修复或 RNA 的降解再循环利用。

关键词: 嗜酸嗜热硫化叶菌; DHH 超家族核酸酶; 酶学特征; 3'-5'外切酶

基金项目: 国家重点研究发展计划(2017YFA0504901)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2017YFA0504901)

*Corresponding author. Tel: +86-21-20304961; Fax: +86-21-20304975; E-mail: wangqisheng@sinap.ac.cn

Received: 22 April 2021; Revised: 14 August 2021; Published online: 28 September 2021

Enzymatic characterization of *Sulfolobus acidocaldarius* Saci0542 nuclease belonging to DHH superfamily

WANG Weiwei^{1,2}, XIE Juanjuan³, SONG Wutao³, LIU Xipeng³, WANG Qisheng^{1,2*}

1 Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

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

Abstract: [Objective] To provide biochemical support for studying the potential function during DNA repair via systematically characterizing the enzymatic properties of the DHH superfamily nuclease (Saci0542) of *Sulfolobus acidocaldarius*. [Methods] Saci0542 was recombinantly expressed in *Escherichia coli* and then purified by affinity chromatography. The enzymatic properties of Saci0542 were characterized *in vitro* with fluorescence-labeled oligonucleotides as substrates by urea-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. [Results] The recombinant Saci0542 had a typical 3'-5' exonuclease activity on ssDNA. Its activity was dependent on the divalent metal ion Mn^{2+} and inhibited by the divalent metal ions such as Ca^{2+} , Mg^{2+} , and Zn^{2+} . Saci0542 showed high activity in a wide range of pH 5.5–10. NaCl above 50 mmol/L strongly inhibited the activity of this enzyme, and the optimum reaction temperature was 50–55 °C. The terminal phosphate group inhibited the 3'-5' exonuclease activity. [Conclusion] This study confirmed that Saci0542 was a Mn^{2+} -dependent 3'-5' exonuclease with the activity similar to that of NrnA nuclease, which may be responsible for DNA repair or RNA degradation and recycling in the cell.

Keywords: *Sulfolobus acidocaldarius*; DHH superfamily nucleases; enzymatic characterization; 3'-5' exonuclease

核酸水解是重要的细胞代谢反应。数量众多的核酸酶参与各种类型的核酸水解反应。其中，天冬氨酸-组氨酸-组氨酸(Asp-His-His, DHH)磷酸酯酶超家族就是负责水解磷酸单酯键或磷酸二酯键的一大类水解酶的总称，参与核酸与核苷酸衍生物的分解代谢^[1]。DHH磷酸酯酶不同的亚家族间氨基酸序列保守性很低，主要分为5类^[1]。5类DHH磷酸酯酶的底物特异性显著不同，但晶体结构总体上相似^[2]。

nanoRNAs是一类短片段RNA分子，长度为几个核苷酸，在RNA代谢过程中发挥着重要作用。例如，nanoRNAs可以作为引物在绿脓杆菌中启动转录，导致基因表达的全局性变化^[3]。然而，nanoRNA对复制和转录也可能有很强的

毒性，因为复制泡和转录泡可以容纳nanoRNA^[4]。有几种特异性的RNase可以降解有害的nanoRNA，包括Nrn和寡核酸酶(oligoribonuclease, Orn)^[5]。在大肠杆菌中，Orn是一种重要的3'-外切核酸酶，可将nanoRNA降解为单核苷酸，属于DEDD(Asp-Glu-Asp-Asp, 天冬氨酸-谷氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸)外切酶超家族，具有典型的DEDD基序^[6-7]。Orn以 Mn^{2+} 作为辅助因子，偏好于3'-OH的短RNA，对特定的3'碱基没有明显的偏好；然而，对2–5 nt的底物而言，Orn对5 nt的寡核苷酸具有更高的亲和力，但当寡核苷酸的长度大于5 nt时，其亲和力随着寡核苷酸的长度增加而降低^[8-9]。此外，Orn还表现出DNase酶的活性，约为RNA底物的十分之一^[10]。

虽然nanoRNA的降解很重要,但许多细菌缺乏Orn同源物^[11]。有些细菌用DHH超家族的nanoRNase(Nrn)外切酶将nanoRNA降解为单核苷酸^[12-13]。Nrn同源物主要存在于细菌中的 *Firmicutes*、*Bacteroidetes*、*Chlorobi*、*Actinobacteria*、*Sigmaproteobacteria* 和 *Epsilonproteobacteria* 以及一些古菌中,在这些物种中都不存在Orn同源物^[14]。根据Nrn蛋白的序列和底物特异性,将Nrn分为NrnA、NrnB和NrnC这3个亚群^[15]。NrnA最早在枯草芽孢杆菌中发现,它优先降解3 bp nanoRNA,活性比降解5 bp nanoRNA高10倍^[16]。NrnA是一种双功能酶,同时具有nanoRNase和CysQ活性,后者可将pAp降解为5'AMP^[12,14]。与NrnA不同,NrnB和NrnC只具有nanoRNase活性^[12,17-18]。枯草芽孢杆菌的NrnB能水解nanoRNA,且偏好5 nt底物^[17]。除nanoRNA外,NrnB能以同样的效率降解5 nt nanoDNA^[17]。尽管NrnA和NrnB属于DHH/DHHA1磷酸酯酶超家族,但它们的序列相似性很低,因此NrnA和NrnB不属于序列同源蛋白^[15]。然而,来自古菌 *Aeropyrum pernix* 的NrnA不能够水解nanoRNA,其nanoRNA由NrnB水解,且水解效率较低^[19]。此外, *A. pernix* 的NrnB更偏好水解ssDNA,包括nanoDNA,因此 *A. pernix* 的NrnB同时具有细菌NrnA和NrnB的综合底物特征^[19]。

嗜酸嗜热硫化叶菌 *Sulfolobus acidocaldarius* 是生活在75 °C、pH 2.0-4.0条件下的一种古菌^[20-21]。在 *S. acidocaldarius* 中,人们通过生物信息学预测Saci0542是NrnA的同源物。我们将嗜酸嗜热硫化叶菌DHH核酸酶Saci0542在大肠杆菌中重组表达,经亲和层析纯化得到电泳纯重组蛋白,并利用荧光标记的寡核苷酸作为底物,鉴定了Saci0542的酶学特征。通过对Saci0542的研究,拓宽了人们对古菌NrnA的认

识,为最终阐明其在细胞内的生物功能提供了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株 *S. acidocaldarius* 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以及大肠杆菌菌株DH5 α 、BL21(DE3) pLysS均为本实验室保存。Saci0542基因扩增引物、Saci0542核酸酶活性测定的寡核苷酸底物由上海 Biosune公司合成,底物序列见表1。KOD plus DNA聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA连接酶、DNA Ladder、蛋白Marker购自TaKaRa公司。基因组提取试剂盒、PCR产物纯化试剂盒、质粒提取试剂盒、Bradford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。用于蛋白纯化的Ni-NTA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Saci0542基因。正向引物序列为5'-TGAAACATATGGATTATTA TGCTATAGTTCA-3';反向引物序列为5'-TTGCTT CGGGATCCTTAGCTGCTCTTTCTGATGTT-3'。PCR扩增条件为95 °C 5 min; 95 °C 0.5 min, 52 °C 0.5 min, 72 °C 1 min, 30个循环; 72 °C 3 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后,使用PCR产物纯化试剂盒进行纯化。首先 *Nde* I 和 *Bam* H I 消化Saci0542基因和pET28a质粒,再用T4 DNA连接酶重组连接限制酶消化的基因和pET28a质粒,最后连接产物转化大肠杆菌DH5 α 。挑取阳性克隆进行DNA测序鉴定Saci0542基因序列,获得表达载体pET28-Saci0542。

表1 核酸酶活性测定的寡核苷酸底物碱基序列

Table 1 Oligonucleotide substrates used for determination of nuclease activity

Names	Sequences (5'→3')	Comments
JL141	TCCGATAGCCAGATATCTTGACA	5'FAM
JL396	AGGCTGCGGTCGAGTT*G*A*C*A*G*C*ACTGCACGCATTACTGAGCT	5'FAM, S (16–22)
JL394	AGGCTGCGGTCGAGTTGACAGCACTGCACGCATTACTGAGCT	5'FAM
JL1336	A*G*G*C*T*G*CGGTCGAGTTGACAGCACTGCACGCATTACTGAGCT	5'FAM, S (1–6)
JL1174	A*G*G*C*T*G*CGGTCGAGTTGACA*G*C*A*C*T*GCACGCATTACTGAGCT	5'FAM, S (1–6, 20–25)
JL1186	A*G*G*C*T*G*CGGTCGAGTTGACAGCACTGCACGCATTAC*T*G*A*G*C*T	5'FAM, S (1–6, 36–41)
JL386	AGGCTGCGGTCGAGTTGACAGCACTGCACGCATTACT*G*A*G*C*T	5'FAM, S (37–41)
JL1166	AGGCTGCGGTCGAGTTGACA*G*C*A*C*T*GCACGCATTACTGAGCT	5'FAM, S (20–25)
JL1162	TCCGATAGCCAGATATCTTGACA	5'FAM, 3'P
JL1172	TCCGATAGCCAGATATCTTGACA	5'FAM
JL1163	TCCGATAGCCAGATATCTTGACA	5'FAM, 5'P
JL1150	CGAT	5'FAM
JL1065	TCCGAT	5'FAM
JL1064	TCCGATAGCCAG	5'FAM
JL174	TCCGATAGCCAGATATC	5'FAM
JL307	CTCCAGTGGTGTTCGGCTCCGATAGCCAGATATCTTGTGACGTGACGTGCGT AATGAC	5'FAM

*represents the phosphorothioate group(S) and FAM (carboxyfluorescein, carboxyfluorescein) represents the fluorescent marker.

1.3 重组蛋白的诱导表达和纯化

将表达载体pET28-Saci0542转入大肠杆菌BL21(DE3) pLysS感受态细胞, 挑取单克隆在LB (含50 μg/mL卡那霉素)中37 °C培养过夜, 转至500 mL液体培养基扩大培养。待 OD_{600} 达到0.8时, 加入终浓度为0.5 mmol/L异丙基硫代半乳糖苷的(isopropyl-β-D-thiogalactoside, IPTG), 于20 °C培养过夜, 诱导重组蛋白表达。4 °C、8 000 r/min收集菌体, 菌体沉淀重悬于50 mL裂解缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 200 mmol/L NaCl, 2 mmol/L PMSF, 10%甘油)。600 W超声3 s, 间歇2 s, 裂解菌体细胞15 min。4 °C、8 000 r/min离心细胞裂解液30 min, 收集上清液。上清液上样至用裂解缓冲液预平衡的1 mL Ni-NTA树脂; 然后利用洗涤缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 200 mmol/L NaCl,

20 mmol/L咪唑, 1 mmol/L PMSF, 10%甘油)洗涤树脂, 除掉非特异性结合的杂蛋白; 最后, 用10 mL洗脱缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 200 mmol/L NaCl, 300 mmol/L咪唑, 1 mmol/L PMSF, 10%甘油)进行洗脱, 0.5 mL/管分部收集Saci0542蛋白。15% SDS-PAGE检测蛋白纯度后, 透析法脱盐除去咪唑, 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 Saci0542 核酸酶活性测定

用于测定Saci0542酶活性的寡核苷酸底物碱基序列见表1。除非特别说明, Saci0542外切核酸酶活性标准反应体系(10 μL)如下: 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 10 mmol/L NaCl, 5.0 mmol/L MnCl₂, 100 mg/L BSA, 100 nmol/L荧光标记底

物。55 °C反应指定时间后，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。利用多功能激光成像仪Typhoon FLA 9500 (通用电气公司)将凝胶扫描成像和分析。

2 结果与分析

2.1 Saci0542 表达纯化和酶活性初步测定

采用pET28a原核表达载体，Saci0542重组蛋白在大肠杆菌BL21(DE3) pLysS菌株中能够成功表达。经过IPTG在20 °C低温诱导过夜后，再经镍柱亲和层析纯化，从500 mL培养液中可以得到大约2 mg的Saci0542蛋白。15% SDS-PAGE检测结果显示，蛋白纯度达到90%以上，通过与蛋白marker比较，该蛋白分子量约为39 kDa，与目的蛋白理论计算值(39.4 kDa)相符(图1A)。

在反应体系中加入不同浓度的Saci0542，在55 °C反应15 min，ssDNA底物JL141的酶切结果如图1B。由于FAM荧光基团标记位于5'端，如果是5'-3'外切酶，在任何酶量下，都将从5'端水解ssDNA，只产生1 nt的FAM荧光标记产物。若是3'-5'外切酶活性，且酶量合适的情况下，将从3'端逐个降解单核苷酸，产生一系列长度的寡核苷酸产物(图1B, lane 7)。本文图1B随着蛋白浓度的降低，出现了长度不同的寡核苷酸产物的混合物，这一结果初步表明Saci0542为3'-5'外切酶。此外，根据酶浓度优化实验，在Saci0542浓度为0.003 μ g时即可发挥高效的酶切活性(图1B, 泳道7)。

2.2 Saci0542 核酸酶活性测定条件的优化

在确定Saci0542核酸酶活性的基础上，对酶促反应条件进行了优化。首先优化反应缓冲液的pH值(pH 5.0–10.5)。结果表明：Saci0542核酸酶的最适pH值为7.5(图2A)；且在pH 5.5–10.0

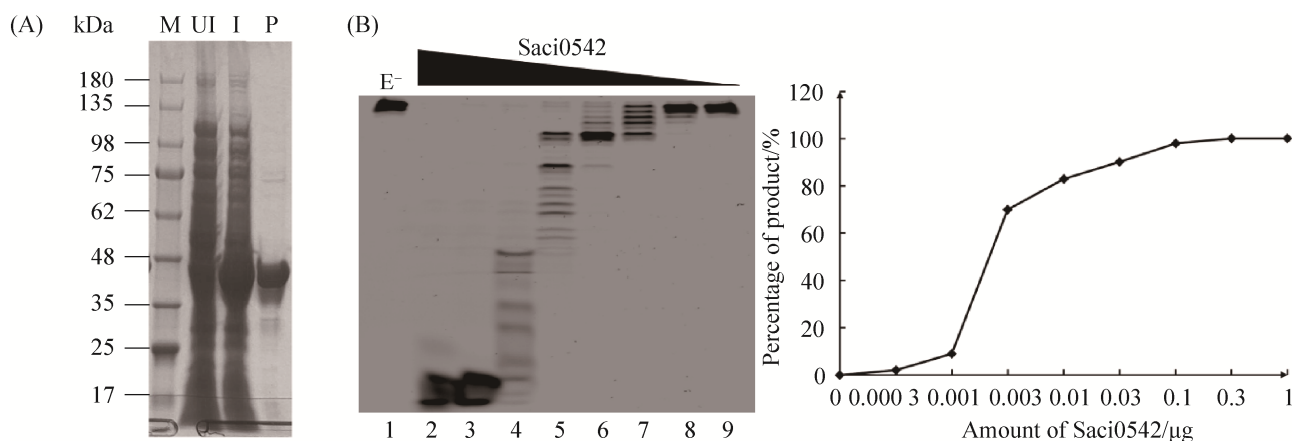


图1 Saci0542的表达纯化和酶活性测定

Figure 1 Expression and purification of Saci0542 and determination of enzyme activity. A: 15% SDS-PAGE analysis of recombinant Saci0542 recovered from induced *Escherichia coli* cells. The gel was stained with Coomassie blue R-250. Lane M: molecular weight marker; lanes P: purified recombinant Saci0542; lanes I and UI denote induced and uninduced *E. coli* total proteins. B: activity assay of Saci0542. The reaction mixtures contained 100 nmol/L JL141, and decreasing Saci0542 (1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01, 0.003, 0.001, 0.0003 μ g, shown in lanes 2–9, respectively) in reaction buffer consisted of 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 10 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MnCl₂, and 100 mg/L BSA. A control without enzyme was included (lane 1). The reactions were performed at 55 °C for 15 min.

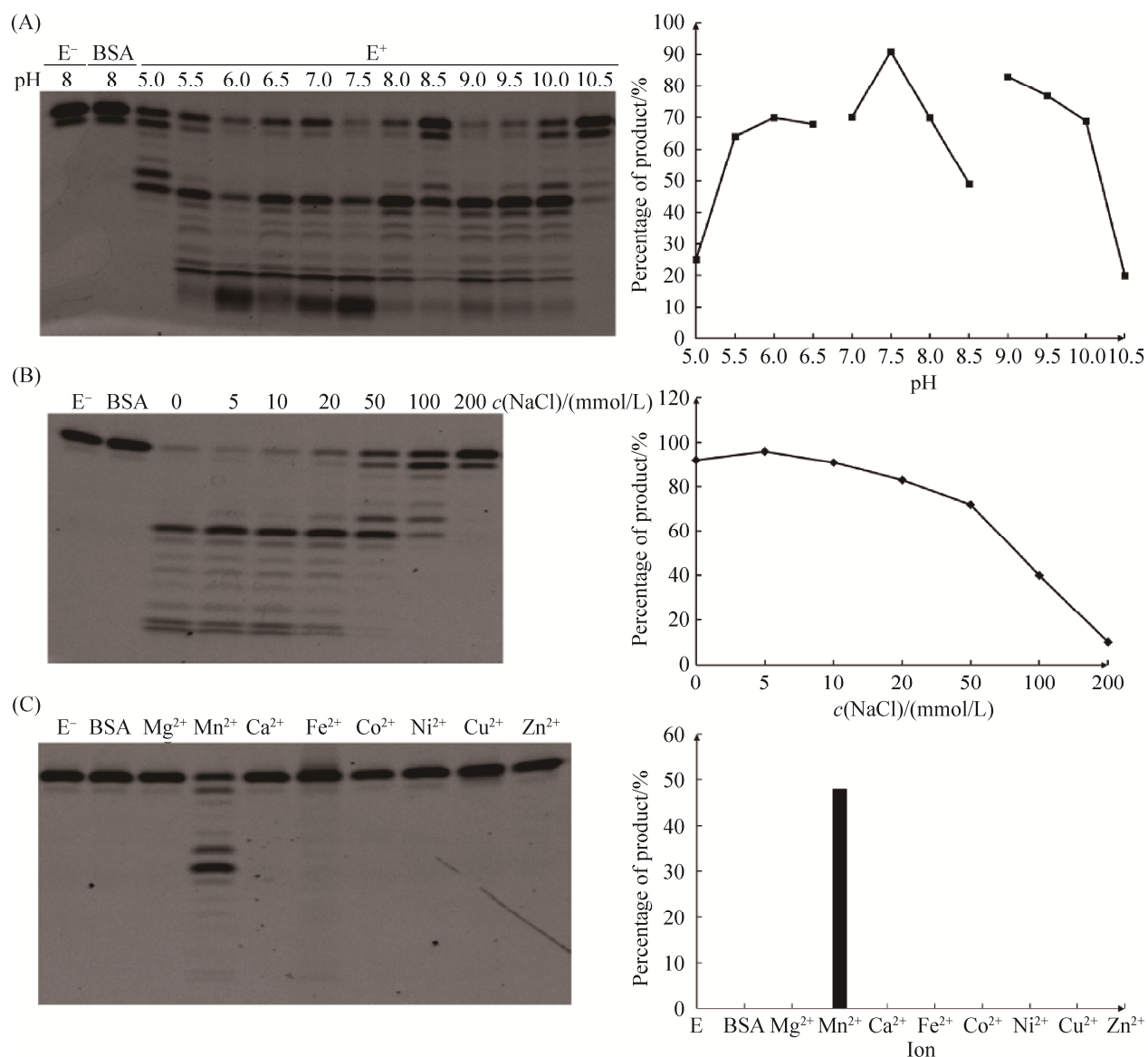


图2 *Saci0542*外切核酸酶活性测定条件的优化

Figure 2 Optimization of *Saci0542* exonuclease activity assay conditions. A: effect of pH on *Saci0542* nuclease. The reaction mixtures contained 100 nmol/L substrate JL141, and 0.003 μg *Saci0542* in reaction buffer consisted of 20 mmol/L buffers with pH value ranged 5.0–10.5 (MES-NaOH (pH 5–6.5), Tris-HCl (pH 7–8.5), and Gly-NaOH (pH 9–10.5)), 10 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MnCl_2 , and 100 mg/L BSA. The reactions were performed at 55 $^\circ\text{C}$ for 15 min. B: effect of ion strength on *Saci0542* nuclease. The reaction mixtures contained 100 nmol/L substrate JL141, and 0.003 μg *Saci0542* in reaction buffer consisted of 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, increased concentration of NaCl (0–200 mmol/L), 5 mmol/L MnCl_2 , and 100 mg/L BSA. The reactions were performed at 55 $^\circ\text{C}$ for 15 min. C: effect of metal ions on *Saci0542* nuclease. The reaction mixtures contained 100 nmol/L substrate JL141, and 0.002 μg *Saci0542* in reaction buffer consisted of 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 10 mmol/L NaCl, 5 mmol/L divalent metal ions of Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} , and 100 mg/L BSA. The reactions were performed at 55 $^\circ\text{C}$ for 15 min.

范围内, Saci0542均能发生高效酶切反应, 说明Saci0542核酸酶的pH值适用性广泛。另外, NaCl浓度(0–200 mmol/L)对Saci0542的核酸酶活性影响明显。随着盐浓度的增加Saci0542外切酶活性随之降低, 200 mmol/L NaCl对其活性产生了严重的抑制作用。该结果表明Saci0542的外切核酸酶活性对高离子强度敏感(图2B)。最后, 鉴定了Saci0542的二价金属离子依赖性。图2C表明二价金属离子 Mn^{2+} 是Saci0542核酸酶活性的必需离子, 而其他二价金属离子 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 均不能激活

Saci0542的核酸酶活性。至此, 我们获得了*S. acidocaldarius* Saci0542核酸酶的最优反应缓冲液: 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 10 mmol/L NaCl, 5 mmol/L Mn^{2+} 。

2.3 Saci0542 核酸酶最优反应温度与热稳定性

鉴于*S. acidocaldarius*最优生长温度为70–75 °C, 对Saci0542核酸酶的最适酶促反应温度和热稳定性进行了鉴定。在优化的核酸酶活性反应缓冲液中, 对Saci0542外切酶活性的最适酶促反应温度的鉴定结果如图3A所示。在

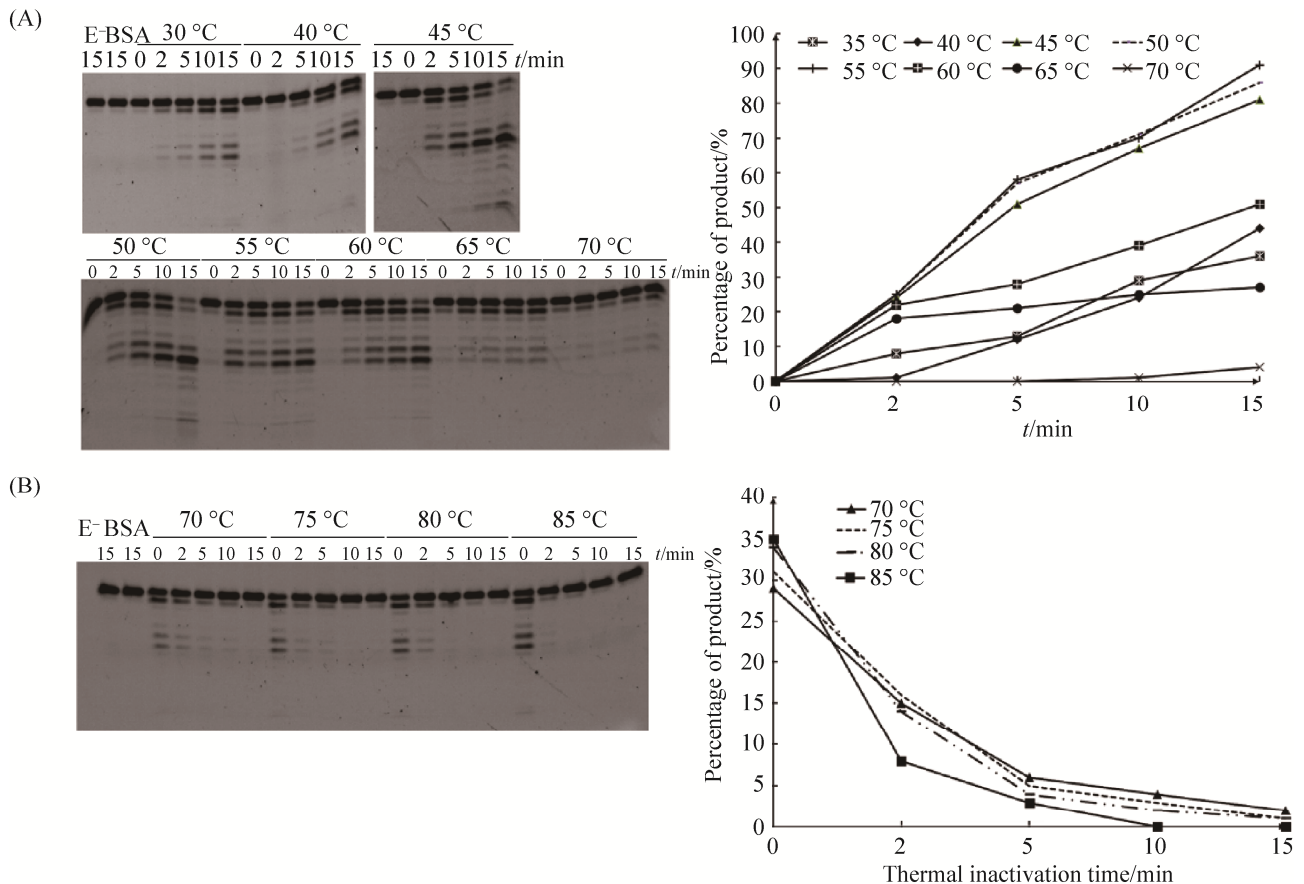


图3 温度对Saci0542活性的影响及其热稳定性

Figure 3 Effect of reaction temperature on Saci0542 activity and the thermostability of Saci0542. A: effect of reaction temperature on Saci0542 activity. B: the thermostability of 3'-5' exonuclease activity of Saci0542. The reaction mixtures contained 100 nmol/L substrate JL141, and 0.002 μ g Saci0542 in reaction buffer consisted of 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 10 mmol/L NaCl, 5 mmol/L $MnCl_2$ and 100 mg/L BSA were incubated at 55 °C for 15 min.

35–70 °C, 该酶都能表现出外切酶活性, 而在45–50 °C下, 该酶的活性最高。当温度 ≥ 65 °C时, 特别是70 °C下, 酶活性大大降低, 该结果表明Saci0542耐热性能并不是很好。

为了详细表征Saci0542的热稳定性, 对其在70–85 °C下的热稳定性进行了详细研究。在向反应体系中加入底物之前, 将酶促反应体系预先在70、75、80和85 °C下分别加热0、2、5、10、15 min, 然后再加入底物JL141, 并在最适反应温度50 °C下反应10 min, 检测Saci0542剩余的外切酶活性。结果表明, 高于70 °C的温度会使Saci0542显著失活, 丧失大部分活性, 当温度为85 °C时, Saci0542会完全失活(图3B)。基于Saci0542核酸酶最适反应温度为45–50 °C, 以及Saci0542的热稳定性分析, 表明Saci0542只具有一定的耐热性, 但不是严格的耐热蛋白。

2.4 Saci0542 核酸外切酶的方向确定

为了准确确定Saci0542水解核酸的方向, 使用特定位点为硫代磷酸酯(phosphorothioated, PT)修饰的ssDNA对Saci0542的外切核酸酶活性进行鉴定。当Saci0542水解PT ssDNA底物时, Saci0542在PT位点停滞, 此时其外切酶活性受到强烈抑制, 导致含有PT修饰的水解产物累积。

由此可以基于不同的硫代磷酸酯修饰底物的水解结果, 判断Saci0542外切酶的水解方向。结果表明, 没有硫代磷酸酯修饰的ssDNA底物(JL394)与Saci0542孵育后, 产生了由各种长度的产物组成的切割模式(图4)。同时, 在5'端和中间位置的硫代磷酸酯基团几乎对Saci0542从3'端水解ssDNA没有产生影响(JL1336, JL1174, JL1166)。然而, 3'端多个连续的硫代磷酸酯基团(JL1186, JL386)、及3'端FAM荧光基团(JL396)几乎完全阻断了磷酸二酯键的水解。这些结果证明, Saci0542从3'端起始ssDNA水解反应, 即Saci0542为3'-5'核酸外切酶。

2.5 末端磷酸基团对 Saci0542 核酸酶活性的影响

由于Saci0542为3'外切核酸酶, 因此我们检测了3'端磷酸修饰基团的存在对核酸酶活性的影响。结果表明, 3'末端磷酸修饰基团抑制Saci0542的酶活性(图5)。考虑到5'磷酸基团促进细菌RecJ的5'外切酶活性, 因此我们也检测了5'磷酸基团是否会使Saci0542能够从5'端水解ssDNA。结果表明5'末端磷酸基团并未使Saci0542显示出明显的5'外切酶活性。这些结果表明Saci0542确实只特异性从3'端水解ssDNA。

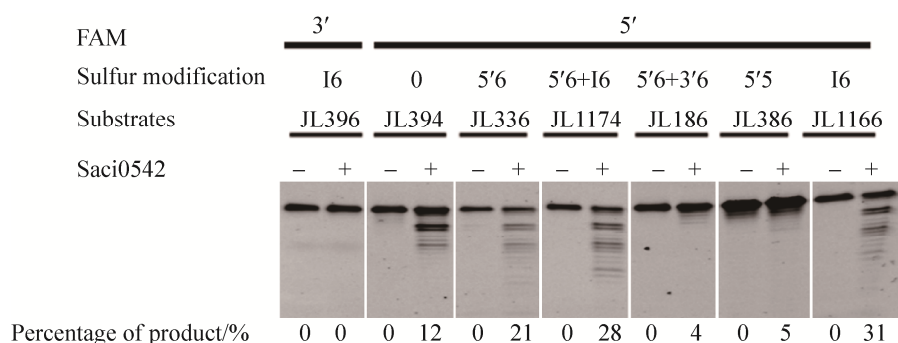


图4 硫代磷酸酯(PT)底物的水解

Figure 4 Hydrolysis of phosphorothioated (PT) ssDNAs. 5'-FAM-labeled 42 nt ssDNA (100 nmol/L) with or without phosphorothioate modification were incubated with 0.003 μ g Saci0542 at 55 °C for 15 min in reaction buffer consisted of 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 10 mmol/L NaCl, 5 mmol/L $MnCl_2$, and 100 mg/L BSA. The sequence and phosphorothioate modification are shown in Table 1.

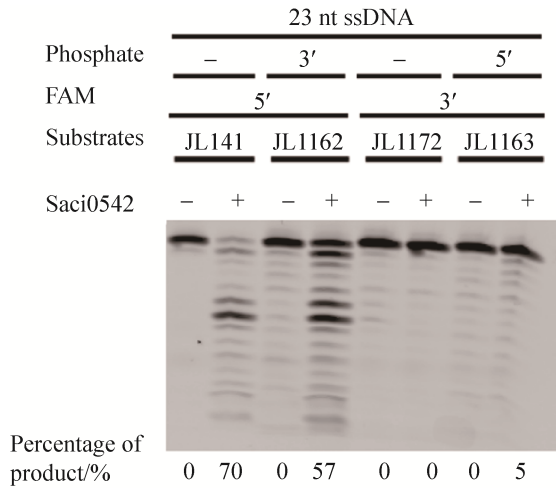


图5 末端磷酸基对Saci0542外切酶活性的影响

Figure 5 Effect of terminal phosphate on the activity of Saci0542 exonuclease. 3'/5'-FAM-labeled ssDNA (100 nmol/L) with or without terminal phosphate modification were incubated with 0.003 μg Saci0542 (1 $\mu\text{mol/L}$) at 55 $^{\circ}\text{C}$ for 15 min. The reaction mixtures contained 100 nmol/L substrate JL141, and 0.003 μg Saci0542 in reaction buffer consisted of 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 10 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MnCl_2 , and 100 mg/L BSA, and were incubated at 55 $^{\circ}\text{C}$ for 15 min.

2.6 不同长度的ssDNA对Saci0542外切酶活性的影响

为了检测不同长度的ssDNA对Saci0542的3'外切酶的影响,设计了一系列不同长度的ssDNA。结果表明,Saci0542偏好中等长度的ssDNA,短于12 nt和长度大于23 nt的ssDNA水解效率显著降低(图6)。

3 讨论

鉴于嗜酸嗜热硫化叶菌*S. acidocaldarius*能够在75 $^{\circ}\text{C}$, pH 2.0–4.0的条件下以相对较低的突变率生存,因此*S. acidocaldarius*在维持基因组稳定性方面一直受到广泛研究^[21–22]。在细菌和古菌中,RecJ核酸酶作为核酸外切酶参与碱基修复过程以维持基因组的稳定性。基于此,本文对*S. acidocaldarius*编码的DHH超家族核酸酶Saci0542进行了重组表达、纯化与酶学特征分析。结果表明,该酶能够在pH 5.0–10.5的Tris缓冲液中发挥核酸外切酶活性,最适pH为

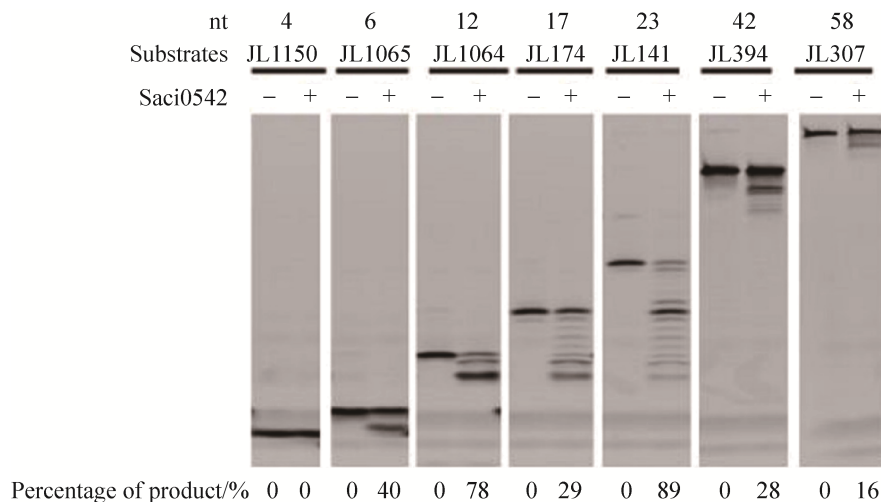


图6 不同长度的ssDNA对Saci0542外切酶活性的影响

Figure 6 Effect of different length of ssDNA on the activity of Saci0542 exonuclease. The reaction mixtures contained 100 nmol/L ssDNA substrates, and 0.003 μg Saci0542 in reaction buffer consisted of 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 10 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MnCl_2 , and 100 mg/L BSA, and were incubated at 55 $^{\circ}\text{C}$ for 15 min.

7.5 (图2)。Saci0542最适pH与其他古菌的Nrn和RecJ核酸酶类似(MjRecJ1、MjRecJ2以及ApeNrn的最适缓冲液pH均为7.5^[19,23])。此外,该研究还表明,在0–20 mmol/L的NaCl存在下,Saci0542能够对ssDNA表现出最强的核酸外切酶活性,而当盐浓度超过50 mmol/L后,Saci0542酶活性显著下降,200 mmol/L NaCl对酶活性的抑制程度达90%,这表明Saci0542对盐的耐受性较低,这与MjRecJ1和MjRecJ2类似,均只能在低盐的情况下显示较高的酶活^[23]。Saci0542的核酸外切酶活性严格依赖于Mn²⁺,最佳浓度为5 mmol/L,在其他金属离子中均未观察到其核酸外切酶活性,这与TaRecJ2是严格的Mn²⁺依赖型外切核酸酶类似^[24]。基于Saci0542的酶学特征的测定,其最适酶促反应体系为20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 10 mol/L NaCl, 5 mmol/L Mn²⁺。

Saci0542最适反应温度和热稳定性分析表明,Saci0542只具有相对较高的耐热性,并不是严格耐热蛋白,这种情况与TaRecJ核酸酶类似。尽管*Thermoplasma acidophilum*是嗜热菌株,但TaRecJ1也不是严格的耐热蛋白,其反应的最适温度为45–55 °C^[11,24]。此外,我们根据Saci0542对硫代磷酸酯底物的水解结果确定了Saci0542是1种3'-5'的核酸外切酶,这与ApeNrnB、MjRecJ2和TaRecJ2等古菌核酸酶的极性相同,但与细菌的RecJ核酸酶水解极性相反^[19,23–24]。末端磷酸基团对Saci0542核酸酶活性也具有影响,3'磷酸基团显著抑制Saci0542的3'-5'外切核酸酶活性,这可能与磷酸基团能够与酶活性中心相互作用有关。

在自然界中,微生物细胞的基因组DNA往往会因各种因素的影响而发生各种损伤,其中腺嘌呤碱基水解脱氨基生成次黄嘌呤碱基dI。dI碱基优先与胞嘧啶碱基C配对,若不被修复的话,则在DNA复制中会造成DNA碱基的改

变,即由A:T到G:C的突变。内切核酸酶V能够识别由腺嘌呤碱基脱氨生成的次黄嘌呤碱基dI,在dI碱基下游的第一个磷酸二酯键处断裂损伤的DNA链,形成一个单链DNA缺口,负责启动dI损伤碱基的修复。然而由于内切核酸酶V没有外切核酸酶活性,并不能将dI损伤碱基从DNA中去除^[25]。Saci0542与内切核酸酶V(Saci0544)在*S. acidocaldarius*基因组中处于同一个操纵子,因此Saci0542可能参与从DNA缺口处切除含dI碱基的核苷酸,然后由DNA聚合酶与连接酶最终完成整个修复反应。后续将利用含有dI碱基的双链DNA作为底物,验证内切核酸酶V、Saci0542核酸酶、DNA聚合酶、DNA连接酶对损伤碱基dI的修活性。同时,Saci0542核酸酶的酶学特性的表征对于阐明DHH超家族磷酸酯酶的底物选择性机制和酶功能多样性分化及在核酸代谢中的具体功能具有一定的意义。

参考文献

- [1] Makarova KS, Koonin EV, Kelman Z. The CMG (CDC45/RecJ, MCM, GINS) complex is a conserved component of the DNA replication system in all archaea and eukaryotes. *Biology Direct*, 2012, 7(1): 1–10.
- [2] Fabrichniy IP, Lehtiö L, Tammenkoski M, Zyryanov AB, Oksanen E, Baykov AA, Lahti R, Goldman A. A trimetal site and substrate distortion in a family II inorganic pyrophosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(2): 1422–1431.
- [3] Goldman SR, Sharp JS, Vvedenskaya IO, Livny J, Dove SL, Nickels BE. NanoRNAs prime transcription initiation *in vivo*. *Molecular Cell*, 2011, 42(6): 817–825.
- [4] Nickels BE, Dove SL. NanoRNAs: a class of small RNAs that can prime transcription initiation in bacteria. *Journal of Molecular Biology*, 2011, 412(5): 772–781.
- [5] Yu D, Deutscher MP. Oligoribonuclease is distinct from the other known exoribonucleases of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(14): 4137–4139.

- [6] Ghosh S, Deutscher MP. Oligoribonuclease is an essential component of the mRNA decay pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(8): 4372–4377.
- [7] Zuo Y, Deutscher MP. Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(5): 1017–1026.
- [8] Niyogi SK, Datta AK. A novel oligoribonuclease of *Escherichia coli*. I. Isolation and properties. *Journal of Biological Chemistry*, 1975, 250(18): 7307–7312.
- [9] Datta AK, Niyogi K. A novel oligoribonuclease of *Escherichia coli*. II. Mechanism of action. *Journal of Biological Chemistry*, 1975, 250(18): 7313–7319.
- [10] Mechold U, Ogryzko V, Ngo S, Danchin A. Oligoribonuclease is a common downstream target of lithium-induced pAp accumulation in *Escherichia coli* and human cells. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(8): 2364–2373.
- [11] Danchin A. A phylogenetic view of bacterial ribonucleases. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 2009, 85: 1–41.
- [12] Mechold U, Fang G, Ngo S, Ogryzko V, Danchin A. YtqI from *Bacillus subtilis* has both oligoribonuclease and pAp-phosphatase activity. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(13): 4552–4561.
- [13] Condon C, Pellegrini O, Mathy N, Bénard L, Redko Y, Oussenko I A, Gintaras D, Bechhofer DH. Assay of *Bacillus subtilis* ribonucleases *in vitro*. *Methods in Enzymology*, 2008, 447: 277–308.
- [14] Uemura Y, Nakagawa N, Wakamatsu T, Kim, K, Montelione GT, Hunt JF, Kuramitsu S, Masui R. Crystal structure of the ligand-binding form of nanoRNase from *Bacteroides fragilis*, a member of the DHH/DHHA1 phosphoesterase family of proteins. *FEBS Letters*, 2013, 587(16): 2669–2674.
- [15] Srivastav R, Kumar D, Grover A, Singh A, Manjasetty BA, Sharma R, Taneja B. Unique subunit packing in mycobacterial nanoRNase leads to alternate substrate recognitions in DHH phosphodiesterases. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(12): 7894–7910.
- [16] Schmier BJ, Nelersa CM, Malhotra A. Structural basis for the bidirectional activity of *Bacillus* nanoRNase NrnA. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 1–13.
- [17] Fang M, Zeisberg WM, Condon C, Ogryzko V, Danchin A, Mechold U. Degradation of nanoRNA is performed by multiple redundant RNases in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(15): 5114–5125.
- [18] Liu MF, Cescau S, Mechold U, Wang J, Cohen D, Danchin A, Boulouis HJ, Biville F. Identification of a novel nanoRNase in *Bartonella*. *Microbiology*, 2012, 158(4): 886–895.
- [19] Deng YJ, Feng L, Zhou H, Xiao X, Wang FP, Liu XP. NanoRNase from *Aeropyrum pernix* shows nuclease activity on ssDNA and ssRNA. *DNA Repair*, 2018, 65: 54–63.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] Yi GS, Song Y, Wang WW, Chen JN, Deng W, Cao WG, Wang FP, Xiao X, Liu, XP. Two archaeal RecJ nucleases from *Methanocaldococcus jannaschii* show reverse hydrolysis polarity: implication to their unique function in archaea. *Genes*, 2017, 8(9): 211.
- [24] Ogino H, Ishino S, Kohda D, Ishino Y. The RecJ2 protein in the thermophilic archaeon *Thermoplasma acidophilum* is a 3'-5' exonuclease that associates with a DNA replication complex. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(19): 7921–7931.
- [25] Huang J, Lu J, Barany F, Cao W. Multiple cleavage activities of endonuclease V from *Thermotoga maritima*: recognition and strand nicking mechanism. *Biochemistry*, 2001, 40(30): 8738–8748.

(本文责编 张晓丽)