



研究报告

IV 型限制酶 ScoMcrA 中 SRA 结构域介导的二聚体化对硫结合结构域功能的影响机制

杨炳旭 胡雯月 刘光 邓子新 贺新义*

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

摘要:【背景】部分细菌的 DNA 骨架会发生磷硫酰化修饰, 硫结合结构域(Sulfur Binding Domain, SBD)可以特异性识别这种生理修饰。与绝大多数 SBD-HNH 双结构域核酸酶不同, ScoMcrA 的 SBD 和 HNH 结构域中间插入了一个特异性识别 5-甲基胞嘧啶(5mC)修饰 DNA 的 SET and RING-Associated (SRA)结构域。晶体结构显示, 单独的 SBD 是单体, 而 SBD-SRA 是双体。【目的】探究 ScoMcrA 中 SRA 结构域的存在对 SBD 识别硫修饰 DNA 的影响及影响方式。【方法】凝胶迁移实验(Electrophoresis Mobility Shift Assay, EMSA)比较 SBD、SBD-SRA 对硫修饰 DNA 结合力的差异; 对参与 SBD-SRA 二聚体化的关键氨基酸残基突变, 并检测点突变对 SBD-SRA 蛋白二聚体化及结合硫修饰 DNA 的影响。【结果】相较于 SBD 结构域, SBD-SRA 双结构域对磷硫酰化修饰 DNA 的结合能力明显增强。对 SBD-SRA 双体互作界面进行单点突变基本不影响其对硫修饰 DNA 的结合, 当二聚体化界面连续的 L₂₆₁LGET₂₆₅ 突变成 A₂₆₁AAAA₂₆₅ 时, 突变体对硫修饰 DNA 的结合力下降到与 SBD 相似的水平。【结论】根据 EMSA 实验结果可以初步判断, SRA 结构域介导的 SBD-SRA 双体化能增强 SBD 对硫修饰 DNA 的结合力; L₂₆₁LGET₂₆₅ 是 SRA 结构域上影响 SBD 对硫修饰 DNA 结合力的关键氨基酸位点。

关键词: 磷硫酰化修饰, 硫结合结构域, 定点突变, 凝胶迁移

SET and RING-associated domain-mediated dimerization in type IV restriction enzyme ScoMcrA promotes the affinity of sulfur binding domain to sulfur modified DNA

YANG Bingxu HU Wenyue LIU Guang DENG Zixin HE Xinyi*

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

Abstract: [Background] Some bacterial DNA skeleton undergo phosphorothioate modification, sulfur binding domain (SBD) can specifically recognize this physiological modification. Unlike most SBD-HNH

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31871250, 31900060); Shanghai Natural Science Foundation (20ZR1414500)

*Corresponding author: Tel: 86-21-62932418; E-mail: xyhe@sjtu.edu.cn

Received: 15-01-2021; Accepted: 11-03-2021; Published online: 29-03-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31871250, 31900060); 上海市自然科学基金(20ZR1414500)

*通信作者: Tel: 021-62932418; E-mail: xyhe@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2021-01-15; 接受日期: 2021-03-11; 网络首发日期: 2021-03-29

di-domain nucleases, SET and RING-associated (SRA) domain, specifically recognize DNA 5-methylcytosine (5mC), is inserted between SBD and HNH domains of ScoMcrA. The crystal structures show that single SBD is a monomer and SBD-SRA is a dimer. **[Objective]** The effects of the presence of SRA domain on the binding of sulfur modified DNA by SBD, and the way SRA domain affect the phosphorothioated DNA recognition. **[Methods]** Electrophoresis mobility shift assay (EMSA) was applied to compare binding affinity of SBD and SBD-SRA to sulfur modified DNA respectively. The key amino acid residues involved in dimerization of SBD-SRA were mutated to examine the binding affinity of mutant proteins to phosphorothioated DNA. **[Results]** Compared with SBD domain alone, the di-domain protein SBD-SRA showed enhanced affinity to sulfur modified DNA. The single point mutation of ten amino acid residues at the dimer-forming interface of SBD and SRA domain seldom affect its binding affinity to sulfur modified DNA. By comparison, L₂₆₁LGET₂₆₅ are simultaneously mutated to A₂₆₁AAAA₂₆₅ on SBD-SRA, the binding affinity of the mutant to sulfur modified DNA decreased to a level similar to that of SBD. **[Conclusion]** According to EMSA results, we primarily came to the conclusion that SRA domain can improve the binding ability of SBD to sulfur modified DNA in SBD-SRA di-domain protein; L₂₆₁LGET₂₆₅ is the key amino acid sites in the SRA domain that affects the binding ability of SBD to sulfur modified DNA.

Keywords: phosphorothioate modification, sulfur binding domain, site-directed mutagenesis, EMSA

DNA 甲基化在生物体的生理过程中有着十分重要的作用, 其与基因调控^[1]、X 染色体的失活^[2]、细胞分化及癌症的发生密切相关^[3], 并且参与形成原核生物的限制-修饰系统^[4]。DNA 甲基化修饰, 特别是 5-甲基胞嘧啶(5mC)的生理功能实现依赖于一种能够特异性识别 5mC 的蛋白^[5], 这类蛋白都具有一个空间结构保守的 SET and RING-Associated (SRA)结构域, 能以一种“翻转”机制来特异性地高效识别 5mC^[6]。SRA 结构域作为一段高度保守的区域, 经常与具有不同功能的蛋白结构域相连。在细菌中, SRA 经常与核酸酶结构域偶联构成甲基化修饰依赖型的 IV 型限制酶, 比如 MspJI/SRA-HNH^[7-8]和 PvuRtsII/AbaSI 家族^[9-10]。

DNA 硫修饰是在 *dnd* 基因簇编码蛋白的作用下, 将细菌基因组 DNA 磷酸二酯键上的非桥联氧原子替换为硫原子并形成 Rp 构型的磷硫酰化修饰^[11-12]。DNA 上的硫修饰能够提高细菌的抗氧化能力^[13], 参与形成细菌的限制-修饰系统^[14], 并且在古菌中可以帮助抵抗病毒入侵, 起到防御作用^[15]。我们前期发现天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)编码的 IV 型限制酶 ScoMcrA 能够同时识别和切割 5mC 及硫修饰 DNA^[16], 通过蛋白与硫修饰 DNA 的共晶结构以及凝胶迁移实验

(Electrophoresis Mobility Shift Assay, EMSA)结果发现其包含 4 个可能的结构域: 未知功能结构域(Head)、硫结合结构域(Sulfur Binding Domain, SBD)、5mC 识别结构域(SET and RING-Associated, SRA)及核酸酶结构域(HNH); 与硫修饰 DNA 的共晶结构中 SBD 是单体, 而 SBD-SRA 是二聚体(图 1), 但是在 2 个共晶结构中, SBD 均只结合带有硫修饰的那条 DNA 链, 而不与其互补链接触, 并且通过 5 个空间上保守的氨基酸残基组成的疏水口袋精确定位到 Rp 构型的硫原子, 实现对硫修饰 DNA 的特异性识别^[17]。ScoMcrA 是发现的第一例有 2 种识别结构域的 IV 型限制酶, 研究 2 种识别结构域在底物识别中的协作关系, 对进一步探究细菌的限制-修饰系统具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及质粒

E. coli DH10B, 无抗性, 用于蛋白定点突变载体的构建; *E. coli* BL21(DE3), 用来表达蛋白, 无 Dcm 修饰, 无抗性, 由上海交通大学分子微生物学实验室保存。

通过 PCR 扩增 ScoMcrA₉₀₋₂₆₀ 基因片段(对应

SBD 结构域)时,在片段的 5'和 3'端分别引入 *Nde* I 识别序列 CATATG 和 *Eco*R I 识别序列 GAATTC,并在蛋白的 C 端加上 6 个连续的组氨酸标签;将利用 *Nde* I 和 *Eco*R I 消化后的 PCR 产物和 pET44b 载体 DNA 分别纯化,通过酶连得到 SBD 结构域的表达载体 pYBX1。pYBX2 类似于 pYBX1,插入的片段是 ScoMcrA₉₀₋₄₄₂ (对应 SBD-SRA 结构域),为 SBD-SRA 的表达载体。点突变蛋白的表达载体 pYBX3-12 均衍生于 pYBX2 质粒,定点突变的引物见表 1。

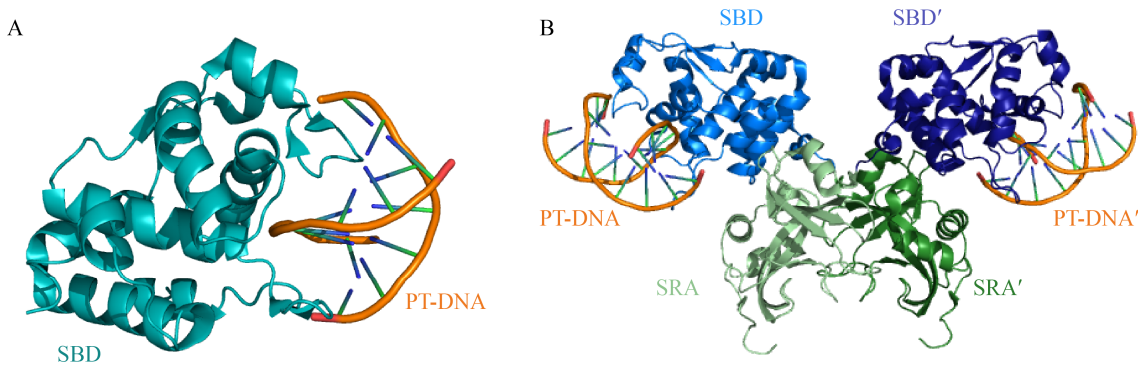


图 1 SBD (A)、SBD-SRA 双结构域(B)与硫修饰 DNA 的共晶结构
Figure 1 The structure of SBD (A) and SBD-SRA (B) in complex with sulfur DNA
注: PT-DNA: 磷硫酰化修饰 DNA
Note: PT-DNA: Phosphorothioated DNA

表 1 基因克隆及定点突变引物
Table 1 Primers used for site-directed mutagenesis and gene cloning

引物名称 Primers name	序列 Sequence (5'→3')	用途 Usage
ScoMcrA-1-F/R	CATATGATCAGGGAGGCCCAAGACCTTT/GAATTCTCAAT GATGATGATGATGATGGGACGGGTCTACTGCGTTGA	Construction of pYBX1
ScoMcrA-2-F/R	CATATGATCAGGGAGGCCCAAGACCTTT/GAATTCTCAAT GATGATGATGATGATGTCGCCTGTAAGCTTCGTCGT	Construction of pYBX2
ScoE264A-F/R	TTGCTCGGTGCGACCTTCAAGGACCGGG/CTTGAAGGTTCGC ACCGAGCAACGGCCGC	Construction of pYBX3
ScoY302A-F/R	AAGGGCCCCGCCCGGATGGGCGGATCCC/CCCATCGGCGG CGGGGCCCTTGTCATCCG	Construction of pYBX4
ScoT311A-F/R	CCAGATACCGCTTGATCGCCTACGTAGG/GGCGATCCAAGC GGTATCTGGGATCCGCC	Construction of pYBX5
ScoQ351A-F/R	AAGCCGTTTCGCGGGCAATGGAGCTTCG/CCATTGCCCCGCG AACGGCTTGTCAG	Construction of pYBX6
ScoQ353A-F/R	TTCCAGGGGGCATGGAGCTTCGAAACCTG/GAAGCTCCATGC CCCCTGGAACGGCTTG	Construction of pYBX7
ScoE399A-F/R	TGGCCCCCGCGGTGCTTGAAGCGCTGG/TTCAAGCACCGC GGGGGGCCACGTCTCAC	Construction of pYBX8
ScoT265A-F/R	CTCGGTGAGGCCTTCAAGGACCGGGATGC/GTCCTTGAAGG CCTCACCGAGCAACGGCC	Construction of pYBX9
ScoR306A-F/R	GCCGATGGGGCGATCCCAGATAACCACTTG/ATCTGGGATCGC CCCATCGGCGTAGGGGC	Construction of pYBX10
ScoD309A-F/R	CGGATCCCAGCTACCACTTGGATCGCCTAC/CCAAGTGGTAG CTGGGATCCGCCATCGG	Construction of pYBX11
ScoLLGET261-265AAAAA-F/R	CTGCGGCCGGCGCCGCTGCGGCCTTCAAGGACCGGGATGC/ CGGATGCTCTGCGGCCGGCGCCGCTGCGGCCTTCAAGGAC	Construction of pYBX12

1.1.2 主要试剂和仪器

PCR 所用试剂、限制性内切酶, TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒, 南京诺唯赞生物科技有限公司。电泳仪, Tanon 公司; 高压液相色谱, 安捷伦科技有限公司; 快速蛋白液相色谱, GE 公司; 凝胶成像分析系统, Bio-Rad 公司; 台式超声波细胞破碎仪, QSONICA 公司; PCR 仪, ABI 公司。

1.1.3 培养基

LB 液体培养基: 胰蛋白胨 10.0 g, 酵母提取物 5.0 g, NaCl 5.0 g, 蒸馏水定容至 1 L, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min; LA 固体培养基: 在 LB 液体培养基中加入终浓度为 15 g/L 的琼脂粉。

镍柱亲和层析平衡液: 20 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 50 mmol/L 咪唑; 镍柱亲和层析洗脱液: 20 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 200 mmol/L 咪唑; 0.8 mol/L 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(Isopropyl-Beta-D-Thiogalactopyranoside, IPTG)贮存液: IPTG 用纯水配成 0.8 mol/L, 用 0.22 μ m 针式滤器过滤除菌, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存; Tris Acetate-EDTA (TAE)缓冲液(50 \times): 242.0 g Tris 碱, 57.1 mL 冰乙酸, 200 mL 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0); 甘氨酸缓冲液(5 \times): Tris 15.1 g, 甘氨酸 94.0 g, SDS 5.0 g, 加水至 1 L; EMSA 缓冲液: 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 50 mmol/L NaCl, 2 mmol/L DTT, 5%甘油; 肝素柱亲和层析平衡液: 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 50 mmol/L NaCl; 肝素柱亲和层析洗脱液: 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 2 mol/L NaCl。

1.1.4 实验所用 DNA 序列

构建定点突变的 SBD-SRA 蛋白表达载体所用的引物, 由苏州金唯智科技有限公司合成, 如表 1 所示。

10 nt 磷硫酰化修饰和非磷硫酰化修饰 DNA 寡聚核苷酸由苏州金唯智科技有限公司合成, 按照 1.2.2 的方法制备成凝胶迁移实验需要的寡核苷酸双链, 如表 2 所示。

表 2 凝胶迁移实验所用寡核苷酸双链

Table 2 DNA oligonucleotides used for EMSA

寡核苷酸 Oligonucleotides	序列 Sequence	用途 Usage
GGCC	5'-CCC <u>GGCC</u> GCC-3' 3'-GGG <u>CCCG</u> CGG-5'	EMSA
GGCC-Rp	5'-CCC <u>G_{ps}GCC</u> GCC-3' 3'-GGG <u>CCCG_{ps}</u> GCGG-5'	EMSA
GGCC-Hemi-Rp	5'-CCC <u>G_{ps}GCC</u> GCC-3' 3'-GGG <u>CCCG_{ps}</u> GCGG-5'	EMSA
GGCC-Sp	5'-CCC <u>G_{ps}GCC</u> GCC-3' 3'-GGG <u>CCCG_{ps}</u> GCGG-5'	EMSA
GGCC-Hemi-Sp	5'-CCC <u>G_{ps}GCC</u> GCC-3' 3'-GGG <u>CCCG_{ps}</u> GCGG-5'	EMSA
GTTC-Rp	5'-CAC <u>G_{ps}TTC</u> GCC-3' 3'-GTG <u>CAA_{ps}</u> GCGG-5'	EMSA
GTTC-Sp	5'-CAC <u>G_{ps}TTC</u> GCC-3' 3'-GTG <u>CAA_{ps}</u> GCGG-5'	EMSA
GATC-Rp	5'-GAT <u>G_{ps}ATC</u> CTA-3' 3'-CTA <u>CTA_{ps}</u> GGAT-5'	EMSA
GATC-Sp	5'-GAT <u>G_{ps}ATC</u> CTA-3' 3'-CTA <u>CTA_{ps}</u> GGAT-5'	EMSA

注: 天然的硫修饰核心序列用下划线表示, 磷硫酰化修饰用 ps 表示

Note: The natural sulfur modified core sequence is underlined, and the phosphorylation modification is represented by ps

1.2 方法

1.2.1 蛋白表达纯化

将表达目标蛋白的质粒通过钙转入 *E. coli* BL21(DE3)中, 挑取多个长出来的单菌落接种到 LB 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养过夜。随后按照 1:100 的比例转接到 1 L LB 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.6, 然后加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG, 在 $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 条件下培养 20 h。

在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以 4 500 r/min 离心 15 min 收集菌体, 除去上清液, 将菌体用镍柱亲和层析平衡液重悬, 然后使用高压破碎仪以 800 MPa 的压力破碎细胞直至澄清透明, 将破碎后的细胞裂解液在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以 10 000 r/min 离心 1 h, 收集上清液。将上清液在超声波细胞破碎仪中以 25%的频率超声 4 min, 打断其中的 DNA 片段。然后将超声后的上清液通过 0.45 μ m 滤膜上样到经镍柱亲和层析平衡液处理过的镍柱亲和层析柱, 利用镍柱亲和层析平衡液除杂之后, 用镍柱亲和层析洗脱液进

行洗脱。将洗脱下来的蛋白稀释到 NaCl 浓度为 50 mmol/L, 上样到肝素柱, 用 20 倍柱体积的洗脱液从 0–100% 的线性梯度进行洗脱, 收集在 OD_{280} 有吸收峰样品, 并用 SDS-PAGE 进行检测。

经肝素柱纯化得到的蛋白, 利用超滤浓缩法将蛋白溶液加入到相应分子量的超滤离心管中, 在 4 °C 以 4 000 r/min 离心 2 h, 将样品浓缩到目标体积。然后利用 PD-10 脱盐柱进行除盐, 除盐后加入终浓度为 50% 的甘油保存在 -40 °C。

1.2.2 单一手性磷硫酰化修饰 DNA 的纯化

人工合成的磷硫酰化修饰 DNA 存在 Rp、Sp 这 2 种不同的构型, 为了分离纯化单一构型的磷硫酰化修饰 DNA, 先使用 NanoDrop 测定单链 DNA 的摩尔浓度, 将互补配对的 2 条 DNA 单链按照 1:1 的摩尔分数加入到 EP 管中混合, 加入终浓度为 100 mmol/L 的 NaCl, 随后将 EP 管放入水浴锅中, 在 100 °C 状态下加热 10 min, 将水浴锅放置过夜, 自然降温退火。形成的双链 DNA 通过高效液相色谱进行构型分离, 使用的柱子为 DNA Pac PA-100 Analytical Column, 流动相 A 为 10 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl; 流动相 B 为 10 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 和 1 mol/L NaCl。磷硫酰化修饰双链 DNA 会在 30%–70% 的 B 相之间被洗脱下来, Rp 构型的磷硫酰化修饰双链 DNA 保留时间较短, Sp 构型的磷硫酰化修饰双链 DNA 保留时间较长。

1.2.3 DNA 除盐及浓缩

通过高效液相色谱纯化得到的单一手性磷硫酰化修饰 DNA 需要进行除盐。首先用甲醇活化 C18 填料柱, 然后用纯水冲洗 5 个柱体积除去甲醇。将高效液相色谱洗脱下来的 DNA 加入 C18 填料柱中, 随后用 5 个柱体积的纯水冲洗填料柱除去 NaCl, 再用 3 个柱体积左右的 50% 甲醇进行洗脱, 收集洗脱液。将富含单一手性磷硫酰化修饰 DNA 的洗脱液用真空旋转蒸发仪浓缩至干粉状, 然后用适量的纯水溶解, 保存在 -40 °C。

1.2.4 凝胶迁移实验 (Electrophoresis Mobility Shift Assay, EMSA)

将蛋白与 DNA 按照 2:1 的摩尔分数混合进行结合反应, 蛋白加入浓度为 6.6 pmol/L, DNA 加入浓度为 3.3 pmol/L, 反应体系为 20 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT, 5% 甘油。体系配制完成后在冰上放置 10 min, 用 12% 的 TAE-PAGE 进行电泳检测, 将电泳仪在 12 mA 的恒流条件下运行 70 min, 电泳槽要始终保持在低温环境。电泳结束后将凝胶放置在含有终浓度 0.01% SYBR Gold 荧光染料的 TAE Buffer 中避光染色 8 min 左右, 用凝胶成像仪拍照。

1.2.5 基因定点突变

在突变位点处设计正、反 2 条引物(表 2), 每条引物均在突变位点 5' 端延伸 9 个碱基, 在突变位点 3' 端延伸 17 个碱基。以待突变质粒 pYBX2 DNA 作为模板, 使用这对引物在高保真酶 PrimeSTAR Max 体系中进行反向 PCR 扩增得到全长质粒线性片段。用限制性内切酶 *Dpn* I 在 37 °C 下处理 1 h 以消化 PCR 反应体系中的原始模板(即野生型质粒), 取 10 μ L 适量消化后的 PCR 产物转化到 *E. coli* DH10B 感受态细胞, 突变后的线性片段会发生重组并环化。将转化后的平板于 37 °C 培养 12 h, 然后挑取转化子进行培养, 将培养得到的菌液提质粒后测序, 最后把测序验证正确的突变质粒转化到 *E. coli* BL21(DE3) 中进行点突变蛋白的异源表达。

2 结果与分析

2.1 双结构域蛋白 SBD-SRA 对硫修饰 DNA 的结合力比 SBD 强

为确定 ScoMcrA 中负责结合硫修饰 DNA 的最小功能片段, 基于 ScoMcrA 全长的晶体结构, 表达并纯化了 SBD-SRA 和 SBD 这 2 个截短的蛋白, 与不同核心序列的硫修饰 DNA (Rp 和 Sp 2 种构型) 进行凝胶迁移实验, 图 2 结果显示: SBD-SRA 和 SBD 都不结合 Sp 构型的 DNA, 只结

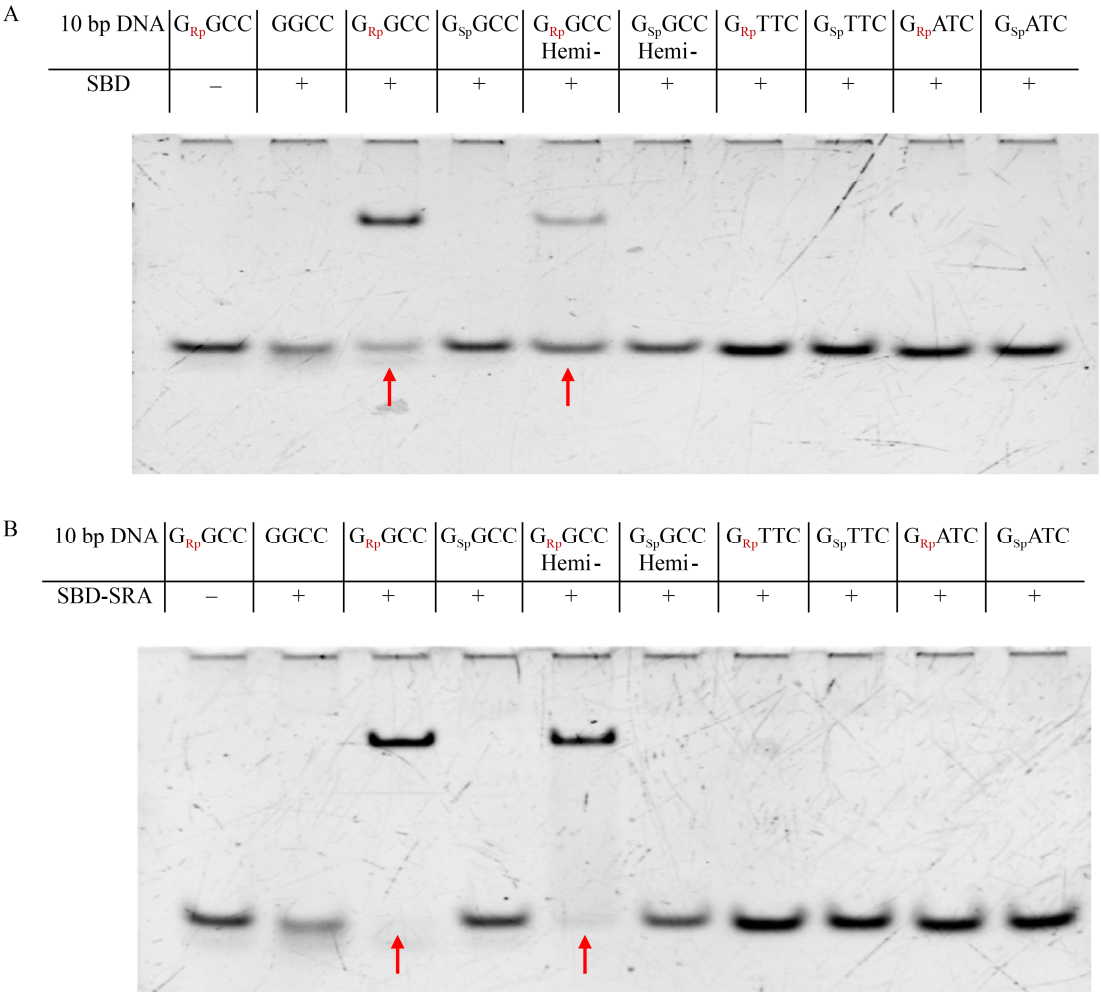


图 2 SBD 和 SBD-SRA 与不同磷硫酰化修饰 DNA 序列的凝胶迁移阻滞比较

Figure 2 Comparison of EMSA between SBD and SBD-SRA with different phosphothioated DNA sequences

注：A：SBD 结构域对不同磷硫酰化修饰 DNA 的结合；B：SBD-SRA 结构域对不同磷硫酰化修饰 DNA 的结合；Hemi 表示 DNA 双链中只有一条链带有磷硫酰化修饰

Note: A: The binding of SBD domain to different phosphothioated DNA; B: The binding of SBD-SRA domain to different phosphothioated DNA; Hemi represents that only one strand in 10 bp DNA was phosphothioated

合 *Rp* 构型的 DNA；而且只有 *Rp* 构型的硫原子位于 GGCC 核心序列的时候才能被 2 种蛋白结合，这和以前报道的体内限制实验结果是一致的^[17]。

相较于 SBD-SRA 结构域，相同摩尔分数的 SBD 结构域只能结合约 70% 的双链硫修饰 DNA 和 33% 的单链硫修饰 DNA，而约有 95% 的双链硫修饰 DNA 和 90% 的单链硫修饰 DNA 被 SBD-SRA 结合迁移，说明 SBD-SRA 对硫修饰 DNA 的结合力比单独的 SBD 要高。

2.2 参与蛋白二聚体化的位点点突变蛋白的构建和纯化

我们在比较 SBD/G_{ps}GCC 和 SBD-SRA/G_{ps}GCC 的共晶结构时发现：SBD-SRA 呈现一种 Y 字形构型的二聚体，2 个 SBD 分开形成 2 个分支，并各自结合一分子硫修饰 DNA，而且在 SBD 和 SRA 的连接处以及 SRA 的 N 端部分参与形成了 SBD-SRA 蛋白的二聚体化(图 1)，并且在 2 个共晶结构中，硫修饰 DNA 均未与 SRA 有直接的接

触。我们推测可能是蛋白的二聚体化让 SBD-SRA 的三维结构变得更稳定,从而表现出更强的结合硫修饰 DNA 的能力。基于此假设,对参与二聚体化的一些氨基酸残基进行点突变和组合突变(图 3),并进行突变体蛋白的表达纯化。

我们利用定点突变的方法构建了突变体蛋白的表达质粒,将突变基因连接到表达载体 pET44b 上获得重组质粒。然后通过 PCR 和测序验证质粒的正确性。随后将正确的重组质粒导入到 *E. coli* BL21(DE3)中诱导表达蛋白。按照 1.2.1 的方法进

行表达纯化,所得样品处理后进行 SDS-PAGE 电泳分析,共得到 10 个纯度在 90%以上的点突变蛋白,分别是 E264A、Y302A、T311A、Q351A、Q353A、E399A、T265A、R306A、D309A、LLGET261-265AAAAA,结果如图 4 所示。

2.3 SBD-SRA 蛋白及其突变体对磷硫酰化修饰 DNA 的结合

在配制好凝胶迁移实验的缓冲液后,将蛋白与核心序列为 G_{ps}GCC 的 Rp 构型 10 bp 的硫修饰双链 DNA (S10)按照 2:1 的摩尔比进行混合,每个

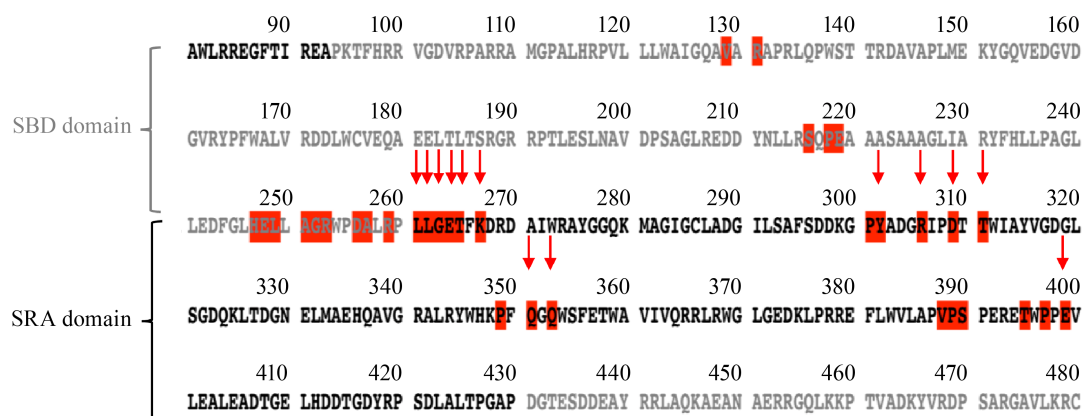


图 3 SBD-SRA 结构域中参与蛋白二聚体化的主要氨基酸残基

Figure 3 The amino acid residue sites involved in SBD-SRA dimerization

注:红色区域为 SBD-SRA 结构域中参与蛋白二聚体化的主要氨基酸残基;箭头指向进行点突变氨基酸残基的位置

Note: The amino acid residues involved in dimerization are marked in red; The arrow points to the position of the amino acid residue for site-directed mutation

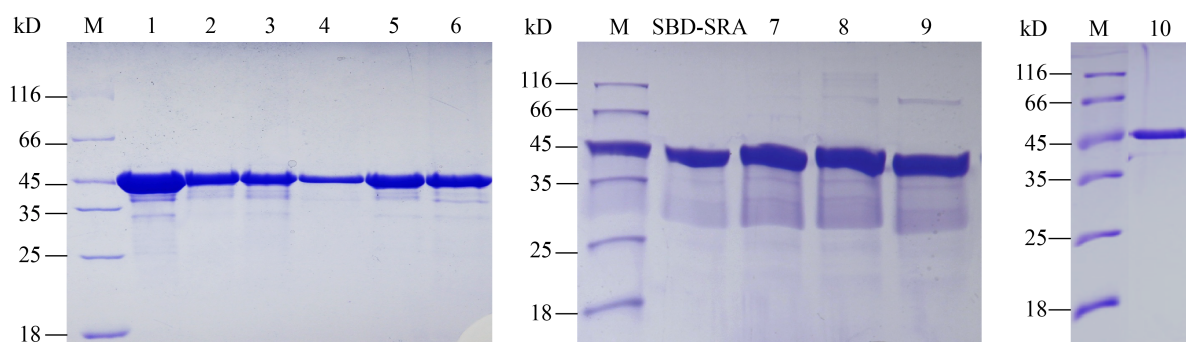


图 4 SBD-SRA 及突变体蛋白纯化后的 SDS-PAGE 分析

Figure 4 SDS-PAGE analysis of purified protein of the SBD-SRA and its variants

注: M: 蛋白质标准品; 1: E264A; 2: Y302A; 3: T311A; 4: Q351A; 5: Q353A; 6: E399A; 7: T265A; 8: R306A; 9: D309A; 10: LLGET261-265AAAAA

Note: M: Protein Marker; 1: E264A; 2: Y302A; 3: T311A; 4: Q351A; 5: Q353A; 6: E399A; 7: T265A; 8: R306A; 9: D309A; 10: LLGET261-265AAAAA

样本都以非硫修饰的 10 bp DNA (U10)作为阴性对照, 放置在冰上 15 min 后, 用 TAE-PAGE 进行 EMSA 检测, 结果如图 5 所示。

从图 5 结果可见, 泳道 4 (Q351A)、5 (Q353A)、6 (E339A)的点突变蛋白结合硫修饰 DNA 时, 会有少部分硫修饰 DNA 不能被结合, 而且结合在蛋白上的硫修饰 DNA 在迁移过程中也会解离下来, 在泳道中形成拖尾现象, 表明这几个氨基酸位点的突变微弱降低了 SBD-SRA 蛋白对于硫修饰 DNA 的结合能力; 当将 SRA 结构域中靠近 SBD 结构域 C 末端区域的连续 5 个氨基酸残基突变之后, 突变蛋白对硫修饰 DNA 的结合明显下降, 约

有 60%的硫修饰 DNA 未被结合, 与单独的 SBD 结合单链硫修饰 DNA 的结合力大约在同一水平。

2.4 SBD-SRA 蛋白及其突变体二级结构预测

利用 PSIPRED 在线预测工具对 SBD-SRA 蛋白及其突变体二级结构进行预测发现, 当 $L_{261}LGET_{265}$ 突变成 $A_{261}AAAA_{265}$ 时, SBD-SRA 的二级结构发生了改变, 结果如图 6 所示。与 SBD-SRA 结构域相比, 突变体 $LLGET_{261-265}AAAAA$ 在 243–244、246–250、262–265 处氨基酸位点的二级结构由无规则卷曲变成了 α 螺旋, 由此可能导致这部分连续的互作界面被破坏, 使得 SBD-SRA 的二聚体化不能形成或稳定性下降。

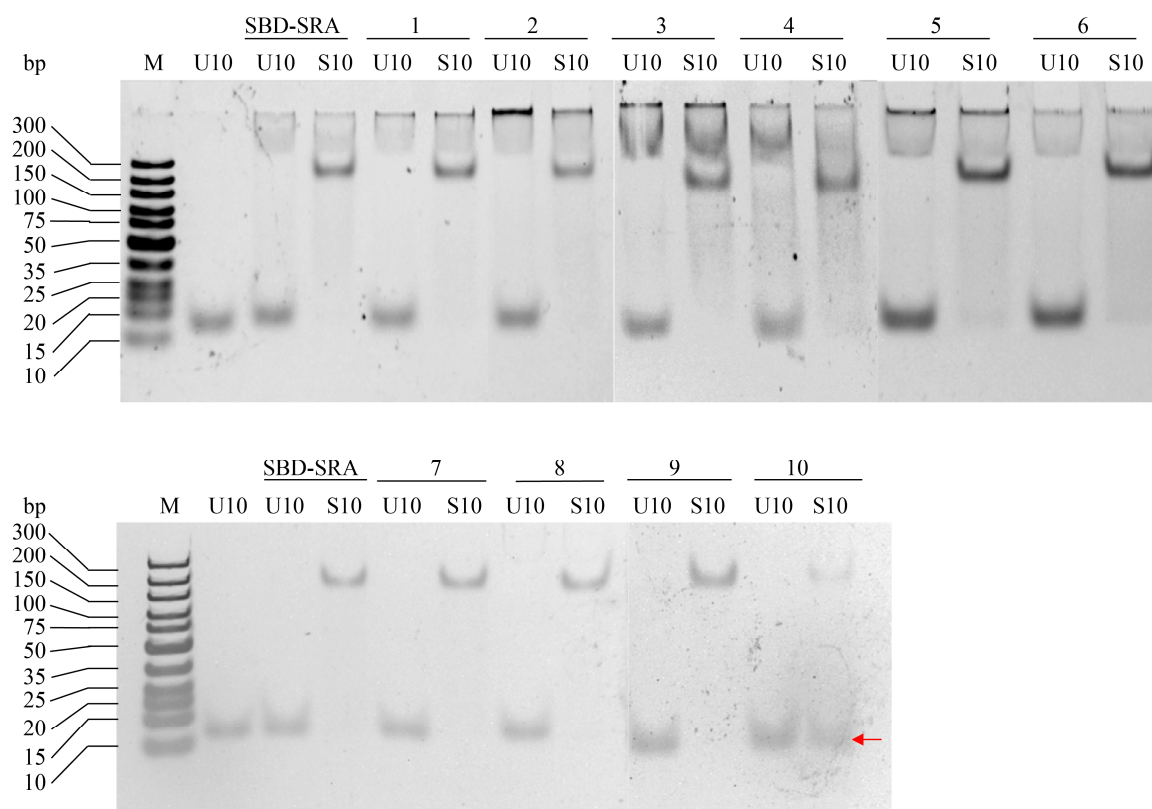


图 5 突变体蛋白对磷硫酰化修饰 DNA 的结合

Figure 5 Effects of the mutations at the interface on the binding affinity to phosphorothioated DNA

注: M: DNA 标准品; U10: 未修饰 10 bp DNA; S10: 磷硫酰化修饰 10 bp DNA; 泳道 1–10 的突变蛋白依次是 E264A、Y302A、T311A、Q351A、Q353A、E339A、T265A、R306A、D309A、LLGET261-265AAAAA

Note: M: DNA Marker; U10: Unmodified DNA of 10 bp; S10: Phosphorothioated DNA of 10 bp; Protein in lane 1 to 10 is mutant of E264A, Y302A, T311A, Q351A, Q353A, E339A, T265A, R306A, D309A and LLGET261-265AAAAA, respectively

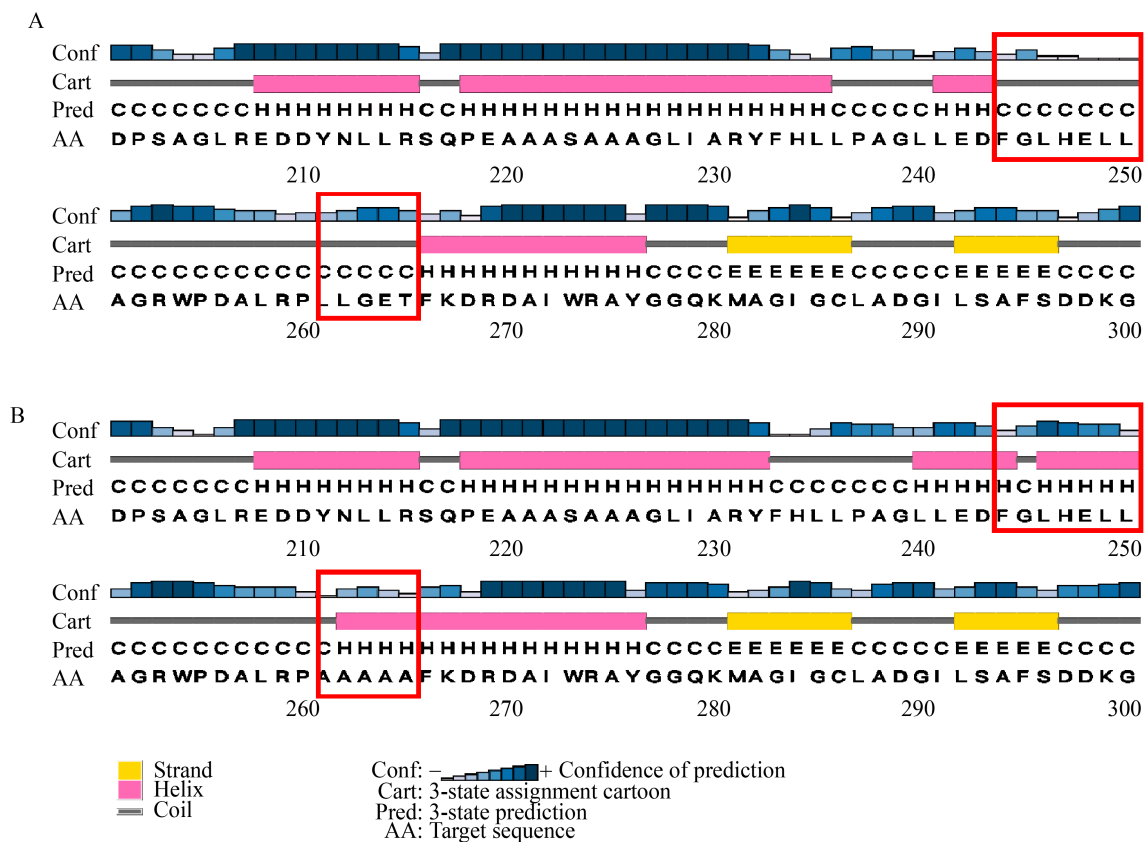


图 6 SBD-SRA 及突变体蛋白二级结构预测

Figure 6 Prediction of the secondary structure of SBD-SRA and its variant

注: A: SBD-SRA 二级结构预测; B: LLGET261-265AAAAA 二级结构预测; H 表示 α 螺旋结构, E 表示 β 折叠结构, C 表示无规则卷曲结构

Note: A: Prediction of the secondary structure of SBD-SRA; B: Prediction of the secondary structure of LLGET261-265AAAAA; H represents an α -helical structure, E represents a β -sheet structure, and C represents a random coil structure

3 讨论与结论

修饰依赖型限制酶 ScoMcrA 在体内既可以限制 5mC 修饰的 DNA, 也可以限制硫修饰的 DNA。其编码了 2 个独立的 SBD 结构域和 SRA 结构域, 分别负责识别硫修饰 DNA 和 5mC 修饰 DNA, 并在末端共用一个核酸酶结构域 HNH, 单独表达的 SBD 或 SRA 可以分别结合硫修饰 DNA 和甲基化 DNA^[17]。本研究通过 EMSA 实验初步证明, 单独的 SBD 结构域对磷硫酰化修饰 DNA 的结合力较弱, 与 SBD 结构域相比, SBD-SRA 结构域在体外对磷硫酰化修饰 DNA 的结合能力明显增强。针对 SBD-SRA 双体互作界面的氨基酸残基

位点进行系列点突变, 当将 SRA 与 SBD 结构域偶联区域连续的 5 个氨基酸残基位点同步突变后, SBD-SRA 蛋白对硫修饰 DNA 的结合力下降到了与单独 SBD 相近的水平, 我们推测 L₂₆₁LGET₂₆₅ 是 SRA 结构域上影响 SBD 对硫修饰 DNA 结合力的关键氨基酸位点。

3.1 ScoMcrA 中 SRA 结构域影响 SBD 结合硫修饰 DNA 的方式

在 SBD/G_{ps}GCC 和 SBD-SRA/G_{ps}GCC 的共晶结构中, DNA 并未与 SRA 有直接相互作用, 因此我们认为 SRA 结构域介导的二聚体化可能是影响 SBD 对硫修饰 DNA 结合力的原因。通过对

SBD-SRA 双体交互界面的氨基酸残基进行定点突变,我们发现当 L₂₆₁LGET₂₆₅ 突变成 A₂₆₁AAAA₂₆₅ 时,突变的 SBD-SRA 对硫修饰 DNA 的结合力下降到与 SBD 相似的水平。当用分子筛检测野生型和突变体蛋白分子量的时候,意外发现 SBD-SRA 也是单体形式存在,这和我们在 SBD-SRA/G_{ps}GCC 共晶结构中观测到的二聚体不太一致。我们推测有可能在溶液中 SBD-SRA 的二聚体化的作用力不够强,在经过分子筛的时候发生了解离。然而在结晶过程中,随着蛋白浓度的增高,这种弱相互作用力在蛋白分子的堆积作用下会呈现出来。当我们将参与二聚体化的连续氨基酸残基 L₂₆₁LGET₂₆₅ 突变成 A₂₆₁AAAA₂₆₅ 时, SBD-SRA 的二级结构发生了改变。因为此处非常靠近 SBD 结构域,这些二级结构的变化也可能影响了 SBD 结构域的功能,只有对该突变体蛋白与硫修饰 DNA 进行共晶实验才能了解到哪种解释更加合理。

3.2 ScoMcrA 中 SRA 结构域与 SBD 结构域偶联的意义

有研究表明,细菌中的甲基化和磷硫酰化修饰会在演变过程中占据在相同的基因组位点上,并且用甲基化取代硫修饰位点还可以避免硫修饰依赖型限制酶切割 DNA,这些发现表明了细菌限制-修饰系统的不断进化^[18]。SRA 结构域与 SBD 结构域的偶联可能会在细菌演变的过程中相互作用,使宿主能高效限制不同类型修饰的 DNA,以免遭受外来 DNA 比如噬菌体的侵染,从而保证宿主基因组的稳定性。

目前发现的 IV 型限制酶大多只有一个识别结构域, ScoMcrA 是发现的第一例同时拥有 2 种识别结构域的 IV 型限制酶。因此,探究 SRA 结构域在 SBD 结构域结合硫修饰 DNA 过程中发挥的作用,对于进一步研究细菌中的限制-修饰系统具有重要意义。我们通过对 SBD-SRA 及其突变体蛋白的凝胶迁移实验初步判断,当 SRA 结构域中的 L₂₆₁LGET₂₆₅ 突变为 A₂₆₁AAAA₂₆₅ 时,会影响

SBD-SRA 中 SBD 对硫修饰 DNA 的结合力,并通过二级结构预测发现该突变体在 243–244、246–250、262–265 氨基酸位点的二级结构由无规则卷曲变为了 α 螺旋,我们推测这些二级结构的变化影响了 SBD 结构域的空间结构,从而影响了 SBD 对硫修饰 DNA 的结合力,这些推测需要后续的实验进行验证。

REFERENCES

- [1] Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2012, 13(7): 484-492
- [2] Jeltsch A, Jurkowska RZ. New concepts in DNA methylation[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2014, 39(7): 310-318
- [3] Robertson KD. DNA methylation and human disease[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2005, 6(8): 597-610
- [4] Loenen WAM, Dryden DTF, Raleigh EA, Wilson GG, Murray NE. Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(1): 3-19
- [5] Bostick M, Kim JK, Estève PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE. UHRF₁ plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells[J]. *Science*, 2007, 317(5845): 1760-1764
- [6] Avvakumov GV, Walker JR, Xue S, Li YJ, Duan SL, Bronner C, Arrowsmith CH, Dhe-Paganon S. Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF₁[J]. *Nature*, 2008, 455(7214): 822-825
- [7] Horton JR, Nugent RL, Li A, Mabuchi MY, Fomenkov A, Cohen-Karni D, Griggs RM, Zhang X, Wilson GG, Zheng Y, et al. Structure and mutagenesis of the DNA modification-dependent restriction endonuclease AspBHI[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 4246
- [8] Han TS, Yamada-Mabuchi M, Zhao G, Li L, Liu G, Ou HY, Deng ZX, Zheng Y, He XY. Recognition and cleavage of 5-methylcytosine DNA by bacterial SRA-HNH proteins[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(2): 1147-1159
- [9] Horton JR, Borgaro JG, Griggs RM, Quimby A, Guan SX, Zhang X, Wilson GG, Zheng Y, Zhu ZY, Cheng XD. Structure of 5-hydroxymethylcytosine-specific restriction enzyme, AbaSI, in complex with DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(12): 7947-7959
- [10] Kazrani AA, Kowalska M, Czapinska H, Bochtler M. Crystal structure of the 5hmC specific endonuclease PvuRts1I[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(9): 5929-5936
- [11] Zhou XF, He XY, Liang JD, Li AY, Xu TG, Kieser T, Helmann JD, Deng ZX. A novel DNA modification by

- sulphur[J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 57(5): 1428-1438
- [12] 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[J]. *Nature Chemical Biology*, 2007, 3(11): 709-710
- [13] Xie XQ, Liang JD, Pu TN, Xu F, Yao F, Yang Y, Zhao YL, You DL, Zhou XF, Deng ZX, et al. Phosphorothioate DNA as an antioxidant in bacteria[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(18): 9115-9124
- [14] Xu TG, Yao F, Zhou XF, Deng ZX, You DL. A novel host-specific restriction system associated with DNA backbone S-modification in *Salmonella*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(20): 7133-7141
- [15] Xiong L, Liu SY, Chen S, Xiao Y, Zhu BC, Gao YL, Zhang YJ, Chen BB, Luo J, Deng ZX, et al. A new type of DNA phosphorothioation-based antiviral system in archaea[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 1688
- [16] 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[J]. *PLoS Genetics*, 2010, 6(12): e1001253
- [17] Liu G, Fu WC, Zhang ZY, He Y, Yu H, Wang YL, Wang XL, Zhao YL, Deng ZX, Wu G, et al. Structural basis for the recognition of sulfur in phosphorothioated DNA[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 4689
- [18] Chen C, Wang LR, Chen S, Wu XL, Gu MJ, Chen X, Jiang SS, Wang YF, Deng ZX, Dedon PC, et al. Convergence of DNA methylation and phosphorothioation epigenetics in bacterial genomes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(17): 4501-4506