

人类重组 PIF1 蛋白的表达纯化和解螺旋酶活性的分析

顾永清^{1,2}

1 石河子大学医学院, 石河子 832002

2 Department of Experimental Oncology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University, Hiroshima 734-8553, Japan

摘要: Pif1 解螺旋酶家族在酵母到人的进化中非常保守, 在生物体内具有很多重要的生理作用。为了从生物化学水平研究人类 PIF1 的功能, 从 HeLa 细胞的 cDNA 文库中克隆得到人类 PIF1 全长基因, 通过共转化一个携带稀有遗传密码 tRNA1 的质粒和一个编码分子伴侣的质粒, 增加了 PIF1 蛋白在大肠杆菌中的表达, 最后通过快速液相色谱纯化系统, 采用亲和层析和凝胶过滤, 纯化了人类重组 PIF1 蛋白。生物化学活性检测证明了纯化的人类 PIF1 蛋白具有 ATP 酶及解螺旋酶活性。人类 PIF1 蛋白的纯化为我们从分子水平理解 PIF1 在体内的功能奠定了基础。

关键词: PIF1 解螺旋酶, 蛋白表达和纯化, ATP 酶活性, 解螺旋酶活性

Overexpression, purification and helicase activity analysis of recombinant human PIF1 protein

Yongqing Gu^{1,2}

1 School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832002, China

2 Department of Experimental Oncology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University, Hiroshima 7348553, Japan

Abstract: Pif1 subfamily helicase is conserved from yeast to humans with a lot of cellular functions. In order to elucidate the function of human PIF1 helicase from biochemical level, we cloned human *PIF1* gene by PCR from HeLa cell cDNA library. We co-transformed a pMStRNA1 plasmid encoding rare tRNA codons and a plasmid encoding molecular chaperon to greatly enhance the overexpression of human PIF1 protein. Finally we purified full-length PIF1 helicase by column chromatograph carried out at 4°C using fast protein liquid chromatograph (FPLC) system. The human PIF1 protein was purified in enough quantity for detailed biochemical analysis. Biochemical assay showed that PIF1 had ATPase activity and helicase activity. The purification and biochemical properties analysis of human PIF1 helicase will allow us to understand how, at the molecular and mechanistic level, this conserved helicase operates in the cell.

Keywords: PIF1 helicase, overexpression and purification, ATPase activity, helicase activity

生物的遗传信息被锁在 DNA 双链内部的碱基序列中, 在几乎所有的包括 DNA 复制、转录、重组、修复的核酸代谢过程中, DNA 双链都要被瞬间解形成单链以露出碱基作为模版。催化 DNA 双链解

Received: September 11, 2008; Accepted: November 28, 2008

Corresponding author: Yongqing Gu. Tel: +86-993-2057766; E-mail: yqgu96@yahoo.com

开的酶是解螺旋酶, 在生物体内具有重要的生理功能^[1]。一些解螺旋酶的突变会导致人类遗传病, 包括着色性干皮肤病、Werner 综合症、Bloom 综合症等^[2]。

解螺旋酶是单一方向作用的酶, 根据其作用方向, 被分为 5'到 3'或 3'到 5'解螺旋酶。Pif1 解螺旋酶家族是 5'到 3'解螺旋酶, 在从酵母到人的进化中非常保守, 在生物体内具有很多重要的生理作用。酿酒酵母的 Pif1p 在线粒体和细胞核内都有表达, 具有多种生理功能。线粒体 Pif1p 参与线粒体 DNA 的重组及线粒体 DNA 的稳定^[3], 协同碱基切除修复以拮抗 DNA 自发的氧化损伤^[4,5], 参与双链 DNA 断裂的修复从而增加细胞对溴化乙锭引起损伤的抗性^[6]。细胞核 Pif1 蛋白能抑制端粒酶活性, 参与 DNA 修复, 参与冈崎片段的成熟, 维持基因组的稳定^[7-9]。

裂殖酵母编码一个 Pif1 同源蛋白质—pfh1p, 是裂殖酵母的生长必须蛋白, 对维持酵母细胞核及线粒体基因组的完整是必须的^[10]。Pfh1p 参与 DNA 损伤的修复, 也参与冈崎片段的加工^[11,12]。由于 Pif1 解螺旋酶家族蛋白水溶性低、易于凝集, 使得 Pif1 蛋白的纯化非常困难。目前为止, 对 Pif1 蛋白的研究主要来自遗传学数据, 生物化学的研究数据非常有限。

有关人类 PIF1 蛋白的功能目前尚不清楚。为了从分子水平阐明人类 PIF1 解螺旋酶的生理功能, 本研究克隆了人类全长 PIF1 基因, 并使其在大肠杆菌中得到表达, 通过优化蛋白纯化程序, 纯化了重组的人类全长 PIF1 蛋白, 并对其生物化学活性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 质粒构建

以 HeLa 细胞的 cDNA 文库为模板, PCR 扩增全长 PIF1 开放阅读框, 经 DNA 测序证明序列正确后, 插入带有六聚组氨酸标签的表达蛋白载体 pET15b (Novagen), 产生重组表达质粒 pET15b-PIF1。

1.2 重组蛋白 PIF1 在大肠杆菌中的过量表达和纯化

重组质粒 pET15b-PIF1 转化 *E. coli* BL21(DE3) (Promega) 菌株, 此菌株同时转化了一个携带稀有遗传密码 tRNA1 的质粒和另一个编码分子伴侣的质粒。于

15°C, 3 L 含有 250 μg/mL 氨苄青霉素、30 μg/mL 卡那霉素和 30 μg/mL 氯霉素的 LB 培养液中培养, 当细菌培养物生长到分光光度计(U-2800, Hitach High-Technologies Corporation, Japan)波长为 600 nm, 吸光度值为 0.6 时加入 IPTG(200 μmol/L)和阿拉伯糖(1%)。继续培养 10 h, 收获细胞, 并悬溶于 Buf I [50 mmol/L Hepes NaOH (pH 7.5), 0.1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L β-巯基乙醇, 1 mol/L NaCl], 于液氮中冷冻。冷冻细胞(7.5 g)于冰水融化, 加入 2.5 mL Buf I (含有 100 mmol/L 亚精胺, 4 mg/mL 溶菌酶), 热裂解法裂解细胞, 得到细胞裂解液。细胞裂解液通过快速液相色谱(FPLC)系统 (GE Healthcare), 4°C 经过一系列层析柱层析纯化。具体过程为: 1 mL HiTrap 螯合柱(GE Healthcare)经 0.1 mol/L NiSO₄ 处理与镍离子螯合, 细胞裂解液上样于镍亲和柱, 用含 100 mmol/L/300 mmol/L 咪唑的 Buf 洗脱, PIF1 蛋白主要在 300 mmol/L 咪唑处被洗脱出来。收集 100 mmol/L 咪唑洗脱的 PIF1 蛋白和杂蛋白的混合液, 再上柱于镍亲和柱, 收集 300 mmol/L 咪唑洗脱的 PIF1 蛋白, 上样于 Superdex 200 柱(GE Healthcare), 收集含 PIF1 蛋白的洗脱峰, 于液氮中冷冻, 再储存于 -80°C 备用。

1.3 ATP 酶活性的测定

ATP 酶活性的测定是在标准的反应混合液 (20 μL) 含有 50 mmol/L Tris·HCl (pH 8.0), 2 mmol/L DTT, 1.2 mmol/L MgCl₂, 0.25 mg/mL BSA, 0.5 mmol/L [γ-³²P]ATP, M13 mp18 单链 DNA 及 1 μL PIF1 蛋白。反应在 30°C, 10 min 后由 20 mmol/L EDTA (pH 8.0) 终止。反应终止液用薄层层析法加以分离, 分离产物用 Bio-Imaging Analyzer BAS2000 (Fuji Photo Film Co., Ltd.) 分析, ATP 水解的程度由无机磷酸的放射活性与未水解 ATP 的放射活性的比例测得。

1.4 解螺旋酶活性的测定

解螺旋酶活性是在标准的反应混合液(20 μL)含有 50 mmol/L Tris·HCl (pH 8.0), 2 mmol/L DTT, 1.2 mmol/L MgCl₂, 0.25 mg/mL BSA, 2 mmol/L ATP, 5'-³²P 标记的叉状结构的底物(1F: 2F)及 1 μL PIF1 蛋白。30°C、10 min。产物经 15%~25%的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 用 Bio-Imaging Analyzer BAS2000 (Fuji Photo Film Co., Ltd.) 进行分析。

2 结果

2.1 重组 PIF1 在大肠杆菌中的表达

为了纯化全长 PIF1 蛋白, 本实验尝试了杆状病毒昆虫细胞表达系统及大肠杆菌原核表达系统。但是 PIF1 蛋白在真核细胞和原核细胞中的表达量都非常低。为了增加 PIF1 的表达, 在传统的大肠杆菌表达菌株 BL21(DE)3 中转入携带稀有遗传密码的 tRNA 的 pMS_tRNA1 质粒和 pTF16 分子伴侣质粒, 从而使重组 PIF1 蛋白的表达得到提高(图 1)并增加了它的水溶性。表达蛋白经 SDS-PAGE 电泳再由考马斯亮蓝染色, 表明 PIF1 蛋白分子量约为 71 kD, 与计算值一致。

2.2 重组 PIF1 蛋白的纯化

人类 PIF1 蛋白因为表达量少、水溶性低、易于凝集变性, 使得纯化 PIF1 蛋白十分困难。本研究通过转化携带稀有遗传密码的 tRNA 的 pMS_tRNA1 质粒, 提高了其表达量, 又通过携带分子伴侣的 pTf16 质粒促进了其蛋白正确折叠, 从而增加了其水溶性。然后通过快速液相色谱(FPLC, GE Healthcare)蛋白纯化系统, 建立了纯化 PIF1 蛋白的方法。

含有 PIF1 蛋白的大肠杆菌培养物热裂解法裂菌, 得到细胞裂解液, 细胞裂解液上样于镍螯合柱, 于 100 mmol/L 和 300 mmol/L 的咪唑洗脱, 虽然 PIF1 蛋白大多在 300 mmol/L 处被洗脱(图 2A, 组分 14-17), 但是这里含有大量的降解蛋白在随后的纯

化中不能被去掉。于是收集 100 mmol/L 咪唑洗脱的 PIF1 蛋白和杂蛋白的混合液, 组分 3-12(图 2A), 再上样于镍亲和柱, 用 100 mmol/L 和 300 mmol/L 的咪唑洗脱, PIF1 蛋白被 300 mmol/L 的咪唑被洗脱出来, 而且成功地除去了大量的降解蛋白(图 2B), 得到 PIF1 蛋白洗脱液(组分 14, 15)。因为 PIF1 蛋白极易凝集变性, 因此此蛋白洗脱液实际含有大量无活性的凝集蛋白和少量活性蛋白。再将 PIF1 蛋白洗脱液(组分 14, 15)上柱于 Superdex 200 进行凝胶过滤, 大量凝集蛋白因为体积增加而首先被洗脱出来, 第 1 个洗脱峰为凝集蛋白:组分 2~8(图 3)。

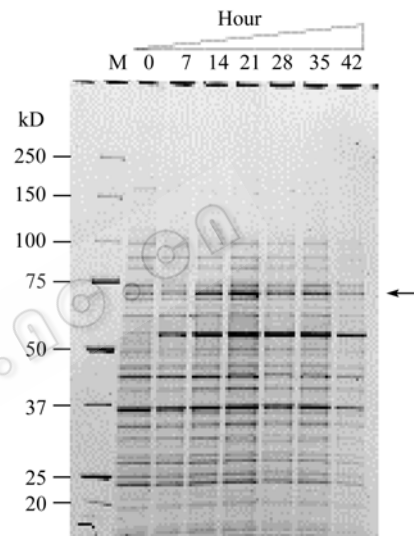


图 1 人类重组 PIF1 在大肠杆菌中的表达

Fig. 1 Overexpression of recombinant PIF1 in *E. coli*. M: protein marker; arrow: induced PIF1 protein; hour means the time after IPTG induction.

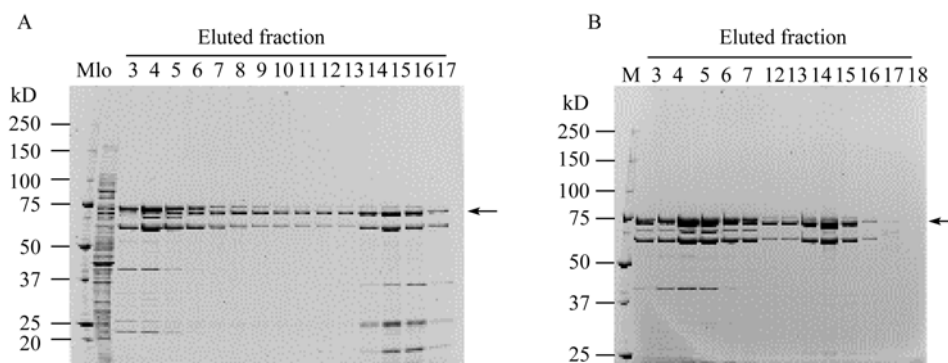


图 2 人类 PIF1 蛋白的镍亲和层析纯化

Fig. 2 Purification of human PIF1 by Nickel affinity. M: protein marker; arrow: recombinant human PIF1 protein. (A) The first nickel affinity chromatograph; lo: load fraction. (B) The second nickel affinity chromatograph.

活性蛋白 PIF1 单体在大约 13 mL 处被洗脱出来, 收集洗脱峰 12、13 组分, 即为纯化的 PIF1 蛋白单体 (图 3)。

2.3 ATP 酶活性

解螺旋酶一般都偶联有 ATP 酶活性, 纯化的人类重组 PIF1 解螺旋酶在镁离子和单链 DNA 存在时, 具有 ATP 酶活性 (图 4), 在反应的前 15 min 之内是一级反应。

2.4 解螺旋酶活性

在标准的解螺旋酶反应体系中, 在 ATP 存在的情况下, 以同位素 ³²P 标记的叉状结构 (1F: 2F) 为底物, 同时在反应体系中加入未标记的 2F 链, 防止解开的单链复性形成双链。结果显示在加入纯化 PIF1 蛋白的反应体系中, 双链 DNA 能够被有效地解开成单链 (图

5), 而未加入 PIF1 的对照组, 则不能发生解链反应。

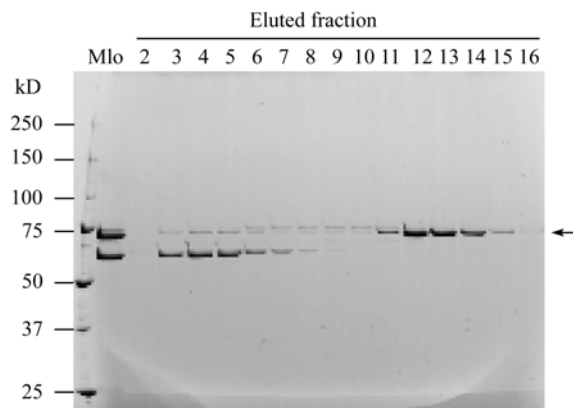


图 3 人类 PIF1 蛋白的凝胶过滤纯化
Fig. 3 Gel filtration of huam PIF1 protein. M: protein marker; lo: load fraction; arrow: recombinant human PIF1 protein.

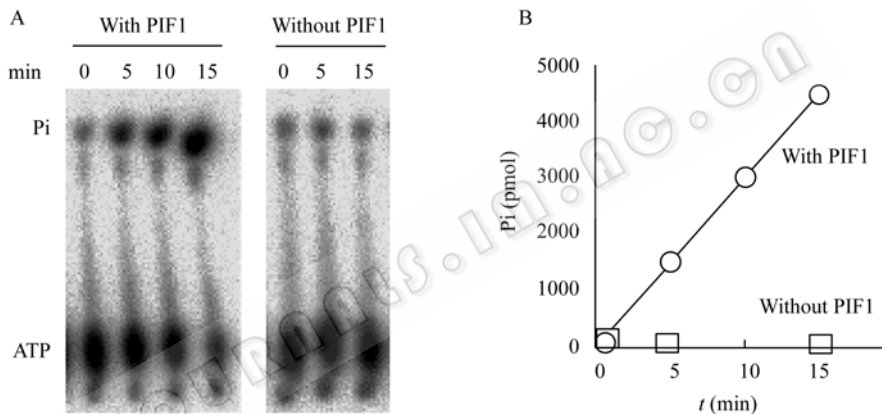


图 4 PIF1 蛋白的 ATP 酶活性

Fig. 4 ATPase activity of PIF1 protein. (A) ATPase activity assay in the presence or absence of PIF1 protein. (B) The graphically shown quantified data of A.

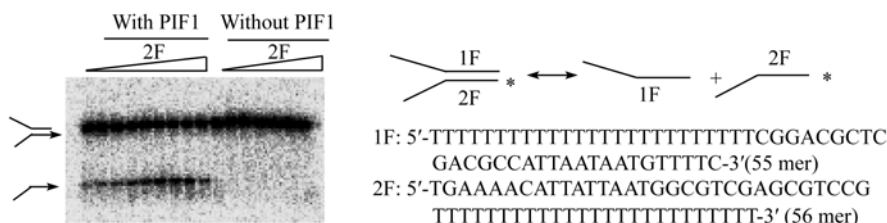


图 5 PIF1 的解旋酶活性

Fig. 5 Helicase activity of PIF1.

3 讨论

DNA 解螺旋酶在所有的已知生物中广泛存在,

并且参与几乎所有的需要暂时解开 DNA 双链的 DNA 代谢, 因此, 在生物体内具有重要的生理功能。Pif1 解旋酶家族在进化中非常保守, 酵母 Pif1

蛋白具有参与 DNA 损伤修复、参与 DNA 复制及调节端粒酶活性等众多的生理功能^[7-9]。尽管人们对酵母 Pif1 解螺旋酶的研究已经较为详尽,但对人类 PIF1 解螺旋酶的功能几乎一无所知。

为了探讨人类 PIF1 解螺旋酶的生物化学功能,在我们的前期研究中,通过 5'-RACE 得到了全长的 PIF1 cDNA 序列。随后设计引物从 HeLe 细胞 cDNA 文库中 PCR 扩增得到此 DNA 序列, DNA 测序证明序列正确后,此 cDNA 序列被释放到 GenBank 数据库(Accession No. EU084033)。PIF1 基因全长 2682 bp,开放阅读框(ORF)长 1926 bp,编码一个含有 641 个氨基酸的蛋白质,其中侧链带正电荷的氨基酸(也称作碱性氨基酸,包括赖氨酸、精氨酸和组氨酸)共占蛋白总量的 29%,侧链带负电荷的氨基酸(也称作酸性氨基酸,包括谷氨酸和天冬氨酸)共占蛋白总量的 8.2%。计算 PIF1 蛋白的等电点(pI)为 10.1,分子量为 70 kD。接着本实验构建了 PIF1 六组氨酸的融合质粒。一直以来的 PIF1 蛋白在大肠杆菌中的低表达,可能是由于大肠杆菌缺乏某些转运 PIF1 氨基酸的稀有 tRNA^[13],为了提高 PIF1 在大肠杆菌中的表达,通过转化携带稀有遗传密码的 tRNA 的 pMStRNA1 质粒,提高了其表达量,又通过转化携带分子伴侣的 pTF16 质粒促进了其蛋白正确折叠,从而增加了其水溶性(图 1)。大肠杆菌细胞收集液经热裂解法裂解后,经镍螯合的层析柱进行亲和层析,本实验没有采取传统的收集方法,而是收集 100 mmol/L 咪唑洗脱的 PIF1 蛋白和杂蛋白的混合物,进行第 2 次镍亲和层析,再收集 300 mmol/L 咪唑洗脱的 PIF1 蛋白,这样有效地除去了以前不能除去的 PIF1 降解蛋白。再经 supedex 凝胶过滤,去除凝集沉淀的 PIF1 变性蛋白,收集到了高纯度的重组全长人类 PIF1 蛋白(图 2,3)。

解螺旋酶的解开双链的作用需要消耗 ATP 水解时释放的能量,所以一般解螺旋酶都偶联有 ATP 酶活性。经检测纯化的重组 PIF1 蛋白也具有依赖镁离子和 DNA 的 ATP 酶活性(图 4),在 15 min 内反应是一级反应。解螺旋酶实验结果表明(图 5),PIF1 具有依赖 ATP 的解开 DNA 双链的能力。

以上结果显示,本研究得到了有活性的、高纯

度的重组全长人类 PIF1 蛋白。人类 PIF1 蛋白的纯化为从分子水平理解 PIF1 在体内的功能奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Matson SW, George JW, Bean DW. DNA helicases: enzymes with essential roles in all aspects of DNA metabolism. *Bioessays*, 1994, **16**(1): 13–22.
- [2] Hanada K, Hickson ID. Molecular genetics of RecQ helicase disorders. *Cell Mol Life Sci*, 2007, **64**(17): 2306–2322.
- [3] Foury F, Lahaye A. Cloning and sequencing of the PIF gene involved in repair and recombination of yeast mitochondrial DNA. *EMBO J*, 1987, **6**(5): 1441–1449.
- [4] Doudican NA, Song B, Shadel GS, et al. Oxidative DNA damage causes mitochondrial genomic instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 2005, **25**(12): 5196–5204.
- [5] O'Rourke TW, Doudican NA, Zhang H, et al. Differential involvement of the related DNA helicases Pif1p and Rrm3p in mtDNA point mutagenesis and stability. *Gene*, 2005, **354**: 86–92.
- [6] Cheng X, Dunaway S, Ivessa AS. The role of Pif1, a DNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae* in maintaining mitochondrial DNA. *Mitochondrial*, 2007, **7**(3): 211–222.
- [7] Boule JB, Vega LR, Zakian VA. The yeast Pif1p helicase removes telomerase from telomeric DNA. *Nature*, 2005, **438** (7064): 57–61.
- [8] Budd ME, Reis CC, Smith S, et al. Evidence suggesting that Pif1 helicase functions in DNA replication with the Dna2 helicase/nuclease and DNA polymerase Delta. *Mol Cell Biol*, 2006, **26** (7): 2490–2500.
- [9] Boule JB, Zakian VA. The yeast Pif1p DNA helicase preferentially unwinds RNA DNA substrates. *Nucleic Acids Res*, 2007, **35** (17): 5809–5818.
- [10] Stefan FP, Sarah DA, Virginia AZ. The *Schizosaccharomyces pombe* Pfh1p DNA helicase is essential for the maintenance of nuclear and mitochondrial DNA. *Mol Cell Biol*, 2008, **28**(21): 6594–6608.
- [11] Ryu GH, Tanaka H, Kim DH, et al. Genetic and biochemical analyses of Pfh1 DNA helicase function in fission yeast. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32**(14):

4205-4216.

30(21): 4728-4739.

[12] Tanaka H, Ryu GH, Seo YS, *et al.* The fission yeast pfh1+ gene encodes an essential 50 to 30 DNA helicase required for the completion of S-phase. *Nucleic Acids Res*, 2002,

[13] Kim S, Lee SB. Rare codon clusters at 5-end influence heterologous expression of archaeal gene in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2006, 50(1): 49-51.

© 2009 年《生物工程学报》栏目设置

2009 年《生物工程学报》栏目设置

栏目中文名称	栏目英文名称	具体涵盖内容
综述	Reviews	内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 必须包含作者自己的工作内容和见解
小综述	Mini-review	能尽快反映生物学领域的最新进展的小型综述
科学进展/名家论坛	Perspective	邀请生物领域专家对最新生物技术科研成果进行评述
动物及兽医生物技术	Animal and Veterinary Biotechnology	转基因动物; 动物生物反应器; 动物疾病控制、免疫生物技术
海洋生物技术	Marine Biotechnology	海洋生物资源; 海洋生物基因组学、蛋白质组学和代谢组学; 海水养殖生物技术; 藻类生物技术; 海洋天然产物; 海洋生物产品、生物材料和生物能源
环境生物技术	Environmental Biotechnology	微生物多样性; 分子生物学方法及应用; 环境过程的生物监测; 污染控制新工艺; 生物修复
工业生物技术	Industrial Biotechnology	工业酶和微生物; 代谢工程与应用; 生物催化剂与生物转化; 工业生物原料、生物燃料、生物能源和生物基化学品; 生物过程工程; 生物工程控制及优化
农业生物技术	Agricultural Biotechnology	农业功能基因组; 植物生物反应器; 转基因作物; 转基因产品的生物安全及转化; 农业重组微生物
食品生物技术	Food Biotechnology	食品微生物及功能性食品; 转基因食品; 食品安全及公众健康
系统生物技术	Systems Biotechnology	系统生物学理论在工业、医药、环境、农业生物技术领域的应用
医学与免疫生物技术	Medical and Immunological Biotechnology	基因治疗和干细胞治疗 RNAi 技术及应用; 生物标记与诊断; 单克隆抗体; 工程蛋白和疫苗
组织工程与细胞培养	Tissue Engineering and Cell Cultivation	细胞发育与生物材料; 干细胞工程; 细胞培养工程
生物技术与方法	Methods in Biotechnology	生物技术各个领域中的方法学