

荧光偏振技术研究 Bloom 解旋酶催化 核心与双链 DNA 的相互作用 *

骆 衡^{1, 2, 3)} 许厚强^{1, 2)**} 陈 祥^{1, 2)} 刘朝前^{1, 2)} 许庆贺^{1, 2)} 李 坤^{1, 2)}

⁽¹⁾ 贵州大学动物科学学院, 高原山地动物遗传育种与繁殖省部共建教育部重点实验室, 贵阳 550025;

⁽²⁾ 贵州大学动物科学学院, 贵州省动物遗传育种与繁殖重点实验室, 贵阳 550025;

⁽³⁾ 贵州大学农学院, 贵州省山地农业病虫害重点实验室, 贵阳 550025)

摘要 Bloom 综合症(BLM)解旋酶是 RecQ 家族 DNA 解旋酶中的一个重要成员, 参与了 DNA 复制、修复、转录、重组以及端粒的维持等细胞代谢过程, 在维持染色体的稳定性中具有重要的作用. BLM 解旋酶的突变可导致 Bloom 综合症, 患者遗传不稳定易患多种类型癌症. 本研究运用荧光偏振技术研究 BLM 解旋酶催化核心(BLM^{642~1290})与双链 DNA(dsDNA)的相互作用, 分析其相关特征参数, 了解 BLM^{642~1290} 解旋酶与 dsDNA 的结合和解链特性. 结果表明: BLM^{642~1290} 解旋酶与 dsDNA 的结合和解链与 dsDNA 3'端的单链 DNA(ssDNA)长度有关; 解旋酶优先结合于 dsDNA 底物的 ssDNA 末端, 且每分子解旋酶可结合 9.6 nt 的 ssDNA; dsDNA 3'端 ssDNA 的长度为 9.6 nt 时, 解旋酶的解链效率达到最大且不再随其长度而变化. 另外, BLM^{642~1290} 解旋酶也能够结合和解链钝末端 dsDNA, 但其结合亲和力和解链效率低于有 3'端 ssDNA 的 dsDNA. 推测 BLM^{642~1290} 解旋酶在与 dsDNA 底物结合和解链时是单体形式, 可能以尺蠖的形式解开 dsDNA. 这些结果可为进一步研究 BLM 解旋酶的功能特征提供理论基础.

关键词 Bloom 解旋酶, DNA 结合, DNA 解链, 荧光偏振技术

学科分类号 O657.32

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00612

DNA 解旋酶在 DNA 的复制、修复、重组、转录及端粒的维持等细胞代谢过程中具有非常重要的作用^[1-3]. RecQ 家族解旋酶是 DNA 解旋酶中的一个重要保守家族, 从细菌到人都具有很高的保守性, 以最先在大肠杆菌中发现的 RecQ 解旋酶命名. RecQ 家族解旋酶在维持各种生物体的遗传稳定性中具有重要作用, 也在许多细胞代谢过程中起着关键作用^[4]. RecQ 家族从 1978 年第一次在真核生物百合中发现 RecQ 以来, 大量的 RecQ 解旋酶在原核生物、单细胞真核生物及脊椎生物中被陆续发现, 到目前为止, 成员还在不断增多^[5-6]. 自从发现了与 RecQ 解旋酶家族成员相关的人类疾病后, 很多科学工作者对 RecQ 解旋酶家族进行了深入研究. 在人类中已经确定了 RECQ1、BLM、WRN、RECQ4 和 RECQ5 5 种 RecQ 解旋酶^[7]. 其中 BLM、WRN、RECQ4 缺陷会相应地引起 Bloom、

Werner 和 Rothmund-Thomson 综合症. 这些疾病有早衰、易患癌症和发育畸形等特征^[8].

BLM 解旋酶具有 ssDNA 依赖的 ATP 酶活性、ATP 依赖的 3'~5'方向的 DNA 解链活性^[9-12]. BLM 解旋酶可以解开多种 DNA, 包括 3'端有缺口的 dsDNA、泡状 DNA、带有复制叉的 dsDNA、G- 四链体 DNA、D 型环状 DNA 及霍利迪结构 DNA^[2, 13-14]. 研究表明 BLM 解旋酶的催化核心区域(642~1290 氨基酸序列, BLM^{642~1290})具有与全酶相似的活性.

* 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2010CB534912), 教育部博士点基金(200806570003), 贵州省优秀人才省长资金(200822), 贵州省国际合作项目(黔科合外 G 字[2011]7008 号)和贵州大学研究生创新基金(农科 2012027)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0851-8292183, E-mail: houqiang0524@yahoo.com

收稿日期: 2012-07-04, 接受日期: 2012-09-13

BLM^{642~1290}解旋酶含有解旋酶中心结构域(helicase)、RecQ-Ct(RecQ family C-terminal)结构域、HRDC(helicase RNase D C-terminal)结构域^[15]。解旋酶中心结构域由7个高度保守的氨基酸基序(I、I a、II~VI)组成,基序I a、III、V有能与ssDNA直接结合的氨基酸残基,基序I、II~IV和VI则构成了一个能与ATP结合的特定部位^[15]。许多 Bloom 综合症患者正是因该结构域发生突变,失去 ATP 酶活性和解链活性,从而引发病患^[16]。C 端的 RQC 结构域主要是介导蛋白质之间的互作^[17],也是 RecQ 家族解旋酶的特征结构。HRDC 结构域是解旋酶和核酸酶 D 家族的一个同源结构域,HRDC 结构域在这两个酶家族中都参与了核酸代谢,其作用是介导酶与核酸的结合^[18]。

运用电子显微镜研究证明,全长的 BLM 解旋酶在水溶液中形成六聚体环状结构^[19]。然而,分子筛层析分析和 DNA 解链特征研究显示 BLM 解旋酶在解链时是单体状态^[16]。另外,分离一个寡聚解旋酶的亚单位一般没有活性^[20-21],而为什么分离的六聚体 BLM 解旋酶的催化核心区域在解开 dsDNA 时是一个单体?为了进一步了解 BLM 解旋酶核心区域的解链机制,对酶与 dsDNA 的结合和解链时的状态需要进行深入研究。本文运用荧光偏振技术研究 BLM 解旋酶催化核心(BLM^{642~1290})与具有不同

长度的 3'端 dsDNA 的结合和解链特性,分析其相关特征参数,探讨其与 dsDNA 的结合模型和解链模型,为进一步研究 BLM 解旋酶的功能特征提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)购自中国北京 Solarbio 公司; ATP(ATP-Na₂)购于美国 Sigma 公司。整个实验采用 Milli-Q 超纯水系统制成的超纯水作为实验用水。本研究的其他化学试剂全部为分析纯级别。解链活性检测缓冲液和 DNA 结合活性检测缓冲液为同一缓冲液,其组成为 25 mmol/L Tris-HCl, 3 mmol/L NaCl, 3 mmol/L MgCl₂ 和 0.1 mmol/L DTT, pH 7.9。DNA 底物杂交缓冲液为 20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, pH 7.9。

1.2 DNA 底物的准备

PAGE 纯化带有荧光标记的 DNA 底物合成于北京鼎国生物技术有限公司,其序列和长度见表 1。分别取单链 DNA(ssDNA)A2、A3、A4、A5、A6、A7、B1、B2、B3、B4、B5、B6、B7、B8 在底物缓冲液中与 A1 等量混合,85℃水浴 5 min,室温缓慢冷却。复性后的 dsDNA 作为检测解旋酶 DNA 结合活性和解链活性的底物^[22]。

Table 1 Oligonucleotide sequences used in this study

Substrate	Length (mer)	Sequence
A1	21	3' FAM-TTAGGCAGCTCGTCTCAATCC 5'
A2	21	5' AATCCGTCGAGCAGAGTTAGG 3'
A3	26	5' AATCCGTCGAGCAGAGTTAGGttttt 3'
A4	31	5' AATCCGTCGAGCAGAGTTAGGttttttttt 3'
A5	41	5' AATCCGTCGAGCAGAGTTAGGttttttttttttttttt 3'
A6	51	5' AATCCGTCGAGCAGAGTTAGGttttttttttttttttttttttt 3'
A7	61	5' AATCCGTCGAGCAGAGTTAGGttttttttttttttttttttttttttttt 3'
B1	27	5' AATCCGTCGAGCAGAGTTAGGtttttt 3'
B2	28	5' AATCCGTCGAGCAGAGTTAGGttttttt 3'
B3	29	5' AATCCGTCGAGCAGAGTTAGGtttttttt 3'
B4	30	5' AATCCGTCGAGCAGAGTTAGGtttttttttt 3'
B5	32	5' AATCCGTCGAGCAGAGTTAGGttttttttttt 3'
B6	33	5' AATCCGTCGAGCAGAGTTAGGtttttttttttt 3'
B7	34	5' AATCCGTCGAGCAGAGTTAGGttttttttttttt 3'
B8	36	5' AATCCGTCGAGCAGAGTTAGGttttttttttttttt 3'

FAM represents the fluorescein chemical group.

1.3 BLM^{642~1290} 解旋酶的制备

BLM^{642~1290}重组大肠杆菌 BL21 菌株由法国巴黎第十一大学居里研究所的奚绪光主任研究员馈赠. 含有 6 个组氨酸串联标签(6×His)的 BLM 重组大肠杆菌, 在 17℃ 的 LB 培养基中用异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达 20 h, 收集菌体超声破碎(美国 Sonics 公司), 离心收集上清液在 AKTA purifier100 蛋白纯化仪上用镍亲和层析柱和 Superdex 200(美国 GE Healthcare 公司)进行分离纯化, 获得可用于开展生物学特性研究的 BLM^{642~1290}解旋酶^[13].

1.4 DNA 结合活性检测

利用荧光偏振技术来检测 BLM^{642~1290}解旋酶的 DNA 结合活性^[21]. 在含有 2 nmol 荧光标记的 dsDNA 反应缓冲液中, 用 100 nmol/L 解旋酶进行滴定(总计 150 μl), 在 25℃ 迅速检测荧光偏振值的变化, 直到其荧光偏振值不再变化时表示 2 nmol dsDNA 完全被酶结合. 在同样的条件下, 加入使 2 nmol dsDNA 完全结合时的酶量, 在 25℃ 条件下迅速检测其荧光偏振值的变化, 每 8 s 检测 1 次, 直到其稳定. 解旋酶与 DNA 结合的解离常数(K_d 值)可根据方程(1)和(2)计算获得^[15]:

$$\alpha D_T = NP_T \frac{\alpha}{1-\alpha} + K_d \quad (1)$$

$$\alpha = \frac{A_{\max} - A}{A_{\max} - A_{\min}} \quad (2)$$

式中 D_T 和 P_T 分别为 dsDNA 和解旋酶的总浓度, A 是任一浓度解旋酶与 DNA 结合的荧光偏振值, $A_{\max}$ 是 dsDNA 完全被酶结合时的荧光偏振值, $A_{\min}$ 为 dsDNA 的荧光偏振值, N 是化学计量比.

1.5 DNA 解链活性检测

在含有 2 nmol 荧光标记的 dsDNA 解链缓冲液中, 加入 BLM^{642~1290}解旋酶使 dsDNA 完全与酶结合, 在 25℃ 迅速检测荧光偏振值的变化, 直到其稳定. 加入不同浓度的 ATP, 总反应体积为 150 μl, 在 25℃ 条件下迅速检测其荧光偏振值的变化, 每 8 s 检测 1 次, 直到其稳定. DNA 解链的速率常数可根据方程(3)得到^[23]:

$$A_t = A_1 \exp(-k_{\text{obs}}t) \quad (3)$$

式中 A_t 是解链时间为 t 时的荧光偏振值; A_1 是 dsDNA 完全与解旋酶结合时的荧光偏振值.

1.6 电泳迁移率检测

运用电泳迁移率实验对 BLM^{642~1290}解旋酶与不

同长度 3'端的 dsDNA 的结合和解链结果进行验证. dsDNA 底物采用荧光偏振实验中的 DNA 序列, 但单链 DNA A1 未进行荧光标记. 检测解旋酶与 dsDNA 的结合效果, 实验方案如下: 10 μmol/L BLM^{642~1290}解旋酶分别与 20 μmol/L 不同长度 3'端的 dsDNA 混合, 总反应体系为 25 μl, 在室温下反应 30 min 后加入 5 μl 上样缓冲液(40 mmol/L Tris-HCl pH 7.9、50%甘油和 0.25% (w/v)溴酚蓝)终止反应. 在 TAE 缓冲液(40 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA, pH 8.3)中用 6%非变性聚丙烯酰胺凝胶于 100 V 下电泳 1 h, 用溴酚蓝进行染色. 为了检测解旋酶与 dsDNA 的解链效果, 与检测解旋酶和 dsDNA 的结合效果的实验方案唯一不同的是, 在 10 μmol/L BLM^{642~1290}解旋酶分别与 20 μmol/L 不同长度 3'端的 dsDNA 混合反应 30 min 后, 加入 10 mmol/L ATP 于室温下静置 30 min.

1.7 统计学分析

所有的数据处理采用 SPSS 13.0 软件(SPSS 13.0, 2005, SPSS Inc., Chicago, USA)采用 F 检验分析其差异. 在实验中运用一般的线性模型分析数据. 显著差异表示为 $P < 0.05$ (F -检验), 极显著差异表示为 $P < 0.01$ (F -检验).

2 结 果

2.1 BLM^{642~1290} 解旋酶与不同长度 3'端 dsDNA 的结合特性

用解旋酶滴定 2 nmol 不同长度 3'端的 dsDNA, 其滴定曲线见图 1a. 由图 1a 可知, 不同的 dsDNA 作为底物, 2nmol/L DNA 生成 DNA-酶复合物过程中, 其荧光偏振值的变化和 2 nmol/L DNA 总共需要结合的酶量具有极显著的差异($P < 0.01$, 图 1b): 3'端 ssDNA 长度越长, 2 nmol/L dsDNA 完全被结合需要的酶量就越大, 且完全结合时的荧光偏振值也越大. EMSA 的实验结果也说明随着 dsDNA 3'端 ssDNA 长度增加, dsDNA 与解旋酶完全结合形成复合物的分子质量也随之增加(图 2). 另外, 解旋酶能够与钝末端 dsDNA 结合, 但完全结合后的荧光偏振值明显要低于与具有 3'端 dsDNA 结合的荧光偏振值. 单独分析不同长度 3'端的 dsDNA 荧光偏振值的变化见图 3, 发现荧光偏振值随着 3'端 ssDNA 长度的增加而增加: 3'端 ssDNA 的长度从 0 nt 增加到 40 nt 时, 荧光偏振值大约从 112 上升到 128. 这是因为 dsDNA 3'端具有不同长度的

ssDNA, 其分子质量和在溶液中的移动速率具有差异性. 用酶与 dsDNA 完全结合后的荧光偏振值减去相应的 dsDNA 的荧光偏振值可得到酶与 dsDNA 结合的程度差异, 结果表明, 解旋酶与 dsDNA 完全结合的荧光偏振值增长程度与 dsDNA 的 3' 端 ssDNA 的长度呈正相关: 3' 端 ssDNA 的长度从 0 nt 增加到 40 nt 时, 荧光偏振值的增加程度大约从 100 增加到 140.

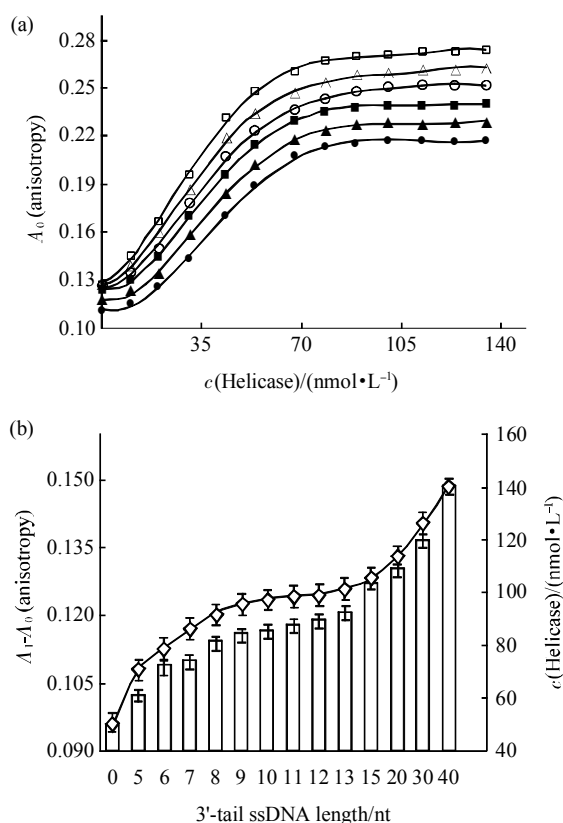


Fig. 1 The binding properties of BLM^{642~1290} helicase and dsDNA with fluorescence polarization technology

(a) The binding curves of the helicase with different 3'-tail ssDNA length of dsDNA. ●: 0 nt; ▲: 5 nt; ■: 10 nt; ○: 20 nt; △: 30 nt; □: 40 nt. (b) Comparison of DNA-binding activity of the helicase with different 3'-tail ssDNA length of dsDNA. Fluorescence anisotropy was measured as a function of BLM^{642~1290} helicase concentration at fixed dsDNA concentration (2 nmol/L). The concentration of the helicase was 10 $\mu\text{mol/L}$. Titrations of different 3-fluorescein-labeled dsDNAs with the helicase were performed at constant DNA concentrations under standard conditions (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9, 25 °C). Data shown are $\bar{x} \pm s$ using five replicates, same as below in this paper. A_0 is the fluorescence anisotropy of fluorescein-labeled dsDNA; A_1 is the fluorescence anisotropy of the helicase-dsDNA complex. □: Anisotropy; ◇: Helicase concentration.

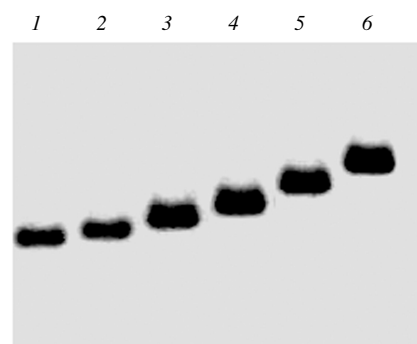


Fig. 2 The binding of BLM^{642~1290} helicase and dsDNA with the electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

The helicase-dsDNA complex migration distance was determined from the EMSA. 20 $\mu\text{mol/L}$ of the unlabelled different 3' tailed length of dsDNAs were incubated at room temperature for 30 min with 10 $\mu\text{mol/L}$ BLM in binding buffer. Bound dsDNAs were separated by electrophoresis on a non-denaturing 6% polyacrylamide gel and detected by bromophenol blue staining. 1 ~ 6: The 3'-tail ssDNA lengths of dsDNA were 0, 5, 10, 20, 30, 40 nt, respectively.

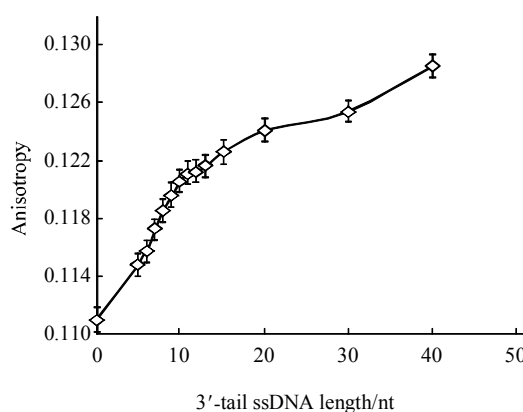


Fig. 3 The change of anisotropy of different 3'-tail ssDNA length of dsDNA

The relationship was determined with fluorescence polarization assays between the changed anisotropy of the different dsDNA and 3' ssDNA tail lengths.

根据公式(1)和(2), 分别计算了解旋酶与不同长度的 3' 端 dsDNA 结合的 K_d 值和 N 值, 其线性模拟方程和相关数据见表 2, K_d 值的变化见图 4. 结果显示, 酶与 dsDNA 结合的 K_d 值与其 3' 端 ssDNA 长度呈负相关, 表明解旋酶与 dsDNA 结合的分子亲和力与其 3' 端的 ssDNA 的长度有关, 同时也表

明解旋酶优先结合于 ssDNA. 另外, 对与 dsDNA 结合的 N 值与其 3'端 ssDNA 长度进行线性模拟, 其线性方程为 $y=-0.0949x+0.0911$, 当 y 等于 1(即 N 值等于 1)时, x 等于 9.6(即 3'端 ssDNA 长度为 9.6 nt), 表明每分子解旋酶结合 9.6 nt 的 ssDNA.

Table 2 The relative constants of binding between BLM^{642~1290} helicase and dsDNA

3'-tail ssDNA length/nt	r^2	N	$K_d/(\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})$
0	0.9844	0.2131 ± 0.0334	4.534 ± 0.543
5	0.9933	$0.5924 \pm 0.1045^*$	$1.728 \pm 0.134^{**}$
10	0.9943	$0.9945 \pm 0.1367^{**}$	$0.306 \pm 0.096^{**}$
20	0.9973	$1.9799 \pm 0.1876^{**}$	$0.298 \pm 0.065^{**}$
30	0.9899	$2.9177 \pm 0.1345^{**}$	$0.292 \pm 0.057^{**}$
40	0.9943	$3.9193 \pm 0.1087^{**}$	$0.278 \pm 0.046^{**}$

*, **: $P < 0.05$, $P < 0.01$, compared with the control group. Data shown are $\bar{x} \pm s$ using five replicates.

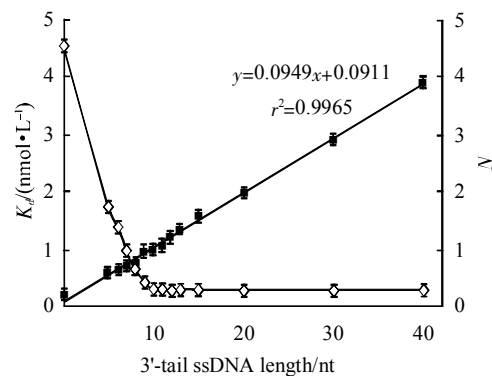


Fig. 4 The change of K_d values and N values between BLM^{642~1290} helicase and different 3'-tail ssDNA lengths of dsDNA

The values of K_d and N were obtained from equations (1) and (2). K_d represents the intensity of binding between the helicase and DNA substrate, the smaller the K_d , the stronger the intensity of binding. N represents the ratio of the helicase and DNA helicase. $\diamond-\diamond$: K_d ; $\bullet-\bullet$: N .

2.2 BLM^{642~1290} 解旋酶与不同长度 3'端 dsDNA 的解链特性

解旋酶对不同长度 3'端的 dsDNA 解链特性结果见图 5. 由图 5 结果可知, 2 nmol dsDNA 完全与解旋酶结合后, 加入 ATP, 随着 ATP 浓度的增

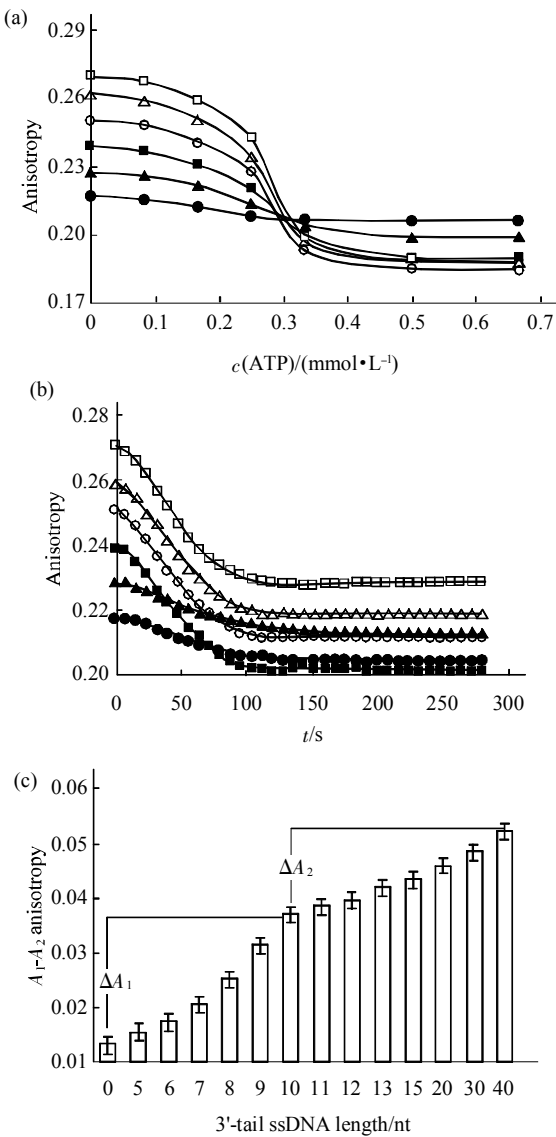


Fig. 5 The unwinding of BLM^{642~1290} helicase to different 3'-tail ssDNA lengths of dsDNA

(a) Unwinding courses of DNA by the helicase to different 3'-tail ssDNA lengths of dsDNA. $\bullet-\bullet$: 0 nt; $\blacktriangle-\blacktriangle$: 5 nt; $\blacksquare-\blacksquare$: 10 nt; $\circ-\circ$: 20 nt; $\triangle-\triangle$: 30 nt; $\square-\square$: 40 nt. (b) Time courses of DNA unwinding by the helicase to different 3'-tail ssDNA lengths of dsDNA. $\bullet-\bullet$: 0 nt; $\blacktriangle-\blacktriangle$: 5 nt; $\blacksquare-\blacksquare$: 10 nt; $\circ-\circ$: 20 nt; $\triangle-\triangle$: 30 nt; $\square-\square$: 40 nt. (c) The unwinding extent of the helicase to different 3'-tail ssDNA lengths of dsDNA. The unwinding of the dsDNA by the helicase was determined using the fluorescence polarization assay described in the Materials and methods. Fluorescence anisotropy as a function of the concentration of the helicase at fixed G4DNA concentrations (2 nmol/L). The concentration of the helicase was 10 $\mu\text{mol/L}$. Experiments were performed in the helicase activity assay buffer (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9) at 25°C. Note. A_1 is the fluorescence anisotropy of the helicase-dsDNA complex. A_2 is the fluorescence anisotropy of the helicase after the addition of ATP.

加, 其荧光偏振值迅速下降(图 5a), 最终降到一个稳定的水平. 但对于 3'端 ssDNA 长度小于 10 nt(0 和 5 nt)的 dsDNA 底物, 解旋酶对其解链后的荧光偏振值要高于 3'端 ssDNA 长度大于 10 nt 的 dsDNA 底物, 说明解旋酶对 3'端 ssDNA 长度小于 10 nt 的 dsDNA 没有完全解链. 特别有意思的是, 酶也能够解链钝末端 dsDNA, 但其解链程度非常低, 说明解旋酶能够部分解链钝末端 dsDNA. 解旋酶对不同长度 3'端的 dsDNA 解链需要一定的时间(图 5b), 随着解链时间的增加其荧光偏振值逐渐降低, 最终达到平衡. dsDNA 3'端 ssDNA 长度不同, 完全解链需要的 ATP 量与 dsDNA 3'端 ssDNA 长度的相关性具有显著差异($P < 0.05$), 但完全解链需要的时间差异不显著. dsDNA 3'端 ssDNA 长度为 0 nt 时, 其解链降低的荧光偏振值为 13.2 ± 1.2 ; 当其长度增加到 10 nt 时, 降低的荧光偏振值为 37.2 ± 1.4 , 两者之间的差值(ΔA_1)为 24.2 ± 1.5 ; 而 dsDNA 3'端 ssDNA 长度从 0 nt 增加到 10 nt 时, DNA 的荧光偏振值只增加了 9.8 ± 1.3 , 表明 3'端 ssDNA 长度小于 10 nt 的 dsDNA 没有被解旋酶完全解链(图 5c). 当 ssDNA 长度达到 40 nt 时, 因酶对 dsDNA 的解链降低的荧光偏振值为 51.2 ± 1.7 , 因此, ssDNA 长度从 10 nt 增加到 40 nt 时, 其解链降低的荧光偏振值(ΔA_2)增加了 14.2 ± 1.7 , 而 dsDNA 3'端 ssDNA 长度从 10 nt 增加到 40 nt 时, DNA 的荧光偏振值增加了 13.8 ± 1.9 , 这两者之间的差异极不显著, 表明 3'端 ssDNA 长度大于 10 nt 的 dsDNA 被解旋酶完全解链. 从以上的结果分析, 可推测 dsDNA 3'端 ssDNA 长度约为 10 nt 时, 解旋酶能够将 dsDNA 完全解链.

因为对于不同 3'端 ssDNA 长度的 dsDNA 来说, 其在未解链前的荧光偏振值不同, 而当 dsDNA 被解旋酶完全解链成 ssDNA 之后, 由于所生成的荧光标记的 ssDNA, 即 3'-FAM-A1 都是一样的, 所以在整个反应过程中, 不同长度的 DNA 荧光偏振的绝对数值变化是不同的. 因此, 为了进一步确定上述结果, 特设计了 EMSA 实验(图 6)及根据方程(3)分别模拟了不同长度 3'端 ssDNA 的 dsDNA 作为底物时解旋酶的解链速率(K_{obs})与时间的关系(图 7 和表 3). EMSA 实验结果表明, dsDNA 3'端 ssDNA 的长度达到 10 nt 时, 其解链的效果明显好于长度为 0 和 5 nt 的 dsDNA, 当 3'端 ssDNA 长度从 10 nt 增加到 40 nt 时, 解链的效果没有明显的差异. 另外, 根据线性模拟方程计算的

结果显示, $\ln(A_t/A_1)$ 与时间 t 具有非常好的线性关系(r^2 接近 0.99). dsDNA 3'端 ssDNA 的长度为 0 和 5 nt 时, 解旋酶的 K_{obs} 分别为 $(0.565 \pm 0.045) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 和 $(0.603 \pm 0.029) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, 而 3'端 ssDNA 的长度从 10 nt 增加到 40 nt 时, 其 K_{obs} 没有明显差异, 约为 $(1.8 \pm 0.018) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, 几乎是 3'端 ssDNA 的长度为 0 和 5 nt 时的 3 倍. 分别线性模拟 dsDNA 3'端 ssDNA 的长度在 0~10 nt、10~40 nt 之间 K_{obs} 的变化(图 8), 得到两个线性方程, 求解两个线性方程的解, 得 $x = 9.64$ 、 $y = 1.822 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, 说明了 BLM^{642~1290}解旋酶对 dsDNA 有效解链需要其 3'端 ssDNA 长度为 9.6 nt. 与解旋酶与 dsDNA 结合的实验结果是一致的.

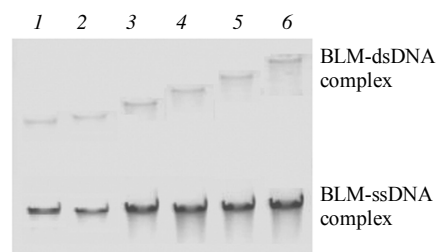


Fig. 6 Unwinding of dsDNA by BLM^{642~1290} helicase with EMSA

Unwinding activity of the BLM^{642~1290} helicase to the unlabelled different 3' tailed length of dsDNA substrates was determined with EMSA experiments. 1~6: The 3'-tail ssDNA lengths of dsDNA substrates were 0, 5, 10, 20, 30, 40 nt, respectively. 20 $\mu\text{mol/L}$ of the dsDNAs were incubated with 10 $\mu\text{mol/L}$ the helicase at room temperature for 30 min in binding buffer (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9). 10 mmol/L ATP was added to the reactions and incubated for 30 min at room temperature. The samples were analyzed by electrophoresis on a 6% nondenaturing polyacrylamide gel.

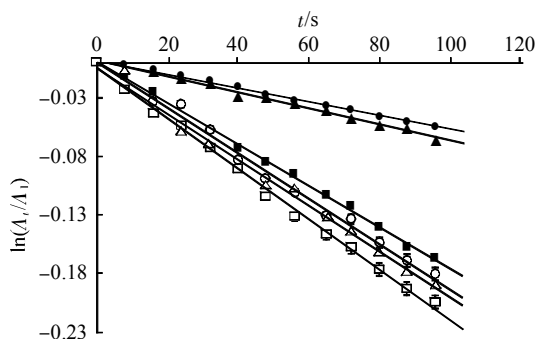


Fig. 7 The linear fits between $\ln(A_t/A_1)$ and time were preceded on conditions using different lengths of ssDNA 3'-tails based on equation (3)

DNA and the helicase concentrations were 2 nmol/L of 3'-fluorescent-labelled dsDNA and 50 nmol/L helicase. All experiments were carried out as per the conditions indicated in the Materials and methods. ●—●: 0 nt; ▲—▲: 5 nt; ■—■: 10 nt; ○—○: 20 nt; △—△: 30 nt; □—□: 40 nt.

Table 3 The relative constants of unwinding between BLM⁶⁴²⁻¹²⁹⁰ helicase and dsDNA

3'-tail ssDNA length /nt	ln(A ₀ /A _t)-t equations	r ²	Unwinding extent (anisotropy×10 ³) ¹⁾	K _{obs} (10 ⁻³ s ⁻¹)
0	y=(-5.650±0.45)×10 ⁻⁴ x	0.9965	(13.2±4.3)	(0.565±0.045)
5	y=(-6.030±0.29)×10 ⁻⁴ x	0.9941	(15.7±4.9)*	(0.603±0.029)*
10	y=(-1.832±0.16)×10 ⁻³ x	0.9894	(38.5±5.9)**	(1.832±0.016)**
20	y=(-1.829±0.18)×10 ⁻³ x	0.9876	(38.9±5.7)**	(1.829±0.018)**
30	y=(-1.789±0.24)×10 ⁻³ x	0.9945	(39.1±4.4)**	(1.789±0.078)**
40	y=(-1.826±0.19)×10 ⁻³ x	0.9946	(39.8±3.9)**	(1.826±0.019)**

¹⁾ Data were obtained by the unwinding curves in Figure 5(a). *, **: P < 0.05, P < 0.01, compared with the control group.

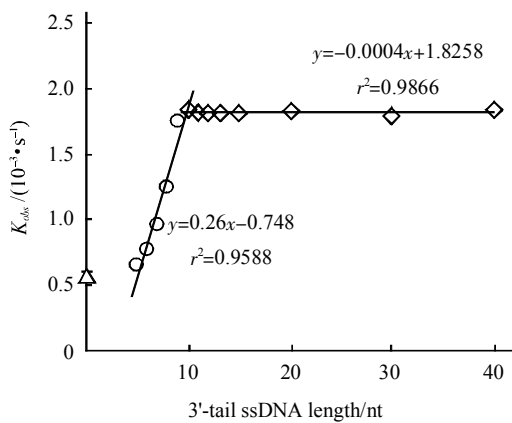


Fig. 8 The change of K_{obs} values of the unwinding between BLM⁶⁴²⁻¹²⁹⁰ helicase and different 3'-tail ssDNA length of dsDNA

The values of K_{obs} were obtained from equation (3). DNA and the helicase concentrations were 2 nmol/L of 3'-fluorecent-labelled dsDNA and 50 nmol/L helicase. According to the values of K_{obs}, the efficiency of unwinding was indirectly determined: about 10 nt length of 3'-tail ssDNA in the dsDNA was necessary for the unwinding of the 3'-tailed dsDNA by the helicase. All experiments were carried out as per the conditions indicated in the **Materials and methods**.

3 讨 论

为了探讨 BLM 解旋酶的生物学特性, 本研究采用荧光偏振技术分析了 BLM 解旋酶催化核心与具有不同长度 3'端 ssDNA 的 dsDNA 底物的结合和解链特性. 结果表明: BLM⁶⁴²⁻¹²⁹⁰解旋酶的 DNA 结合活性和解链活性与 dsDNA 3'端的 ssDNA 长度有关; 解旋酶优先结合于 dsDNA底物的 ssDNA 末

端, 且每分子解旋酶可结合 9.6 nt 的 ssDNA; dsDNA 3'端 ssDNA 的长度为 9.6 nt 时, 解旋酶的解链效率达到最大且不再随其长度而变化. 另外, BLM⁶⁴²⁻¹²⁹⁰解旋酶也能够结合和解链钝末端 dsDNA, 但其结合亲和力和解链效率远低于有 3'端 ssDNA 的 dsDNA.

根据 BLM⁶⁴²⁻¹²⁹⁰解旋酶与具有不同长度 3'端 ssDNA 的 dsDNA 结合达到饱和时所需酶量、荧光偏振值增加程度、K_d 和 N 值的比较(图 1 和图 3), 解旋酶与 dsDNA 结合和解链具有依赖于 3'端 ssDNA 长度的特性. dsDNA 3'端 ssDNA 长度越长, 解旋酶与底物结合达到饱和时所需酶量越大, 其荧光偏振值增加的程度也越大, 其 K_d 值逐渐降低, 相应的 N 值则增高. 这些结果可确定解旋酶的 DNA 结合活性与 dsDNA 3'端 ssDNA 的长度呈正相关(P < 0.01). 比较 K_d 值的变化, 发现 dsDNA 3'端 ssDNA 长度越长, 酶与 dsDNA 的分子亲和力越大, 表明酶更容易与 3'端 ssDNA 长度长的 dsDNA 底物结合. 当 dsDNA 3'端 ssDNA 长度小于 10 nt 时, 酶与 DNA 的 K_d 值明显高于其长度大于 10 nt 时的 K_d 值, 说明 3'端 ssDNA 会增强酶与 dsDNA 的分子亲和力. 有研究表明, 有 3'端 ssDNA 的 dsDNA 是 BLM 解旋酶有效解链的潜在底物^[10, 16]. BLM 解旋酶的同源解旋酶大肠杆菌 RecQ 解旋酶与 DNA 结合特性研究证明, 一个酶分子可以结合约 10nt ssDNA, 且与 ssDNA 和 dsDNA 结合是同一位点^[24]. 由于 BLM⁶⁴²⁻¹²⁹⁰解旋酶与大肠杆菌 RecQ 解旋酶具有很高的序列和结构相似性, 且二者的氨基酸序列和长度也极相似, 我们期望用荧光偏振值技术研究 BLM⁶⁴²⁻¹²⁹⁰解旋酶结合 ssDNA 的长短. 进一步分析解旋酶与 dsDNA 结合的 N 值, 发现 ssDNA 每增加 10 nt 其 N 值也相应

地增加 1. 因此, 根据两者之间的关系进行了线性模拟, 计算出一个 BLM^{642~1290}解旋酶分子完全结合在 dsDNA 上则需要 ssDNA 的长度为 9.6 nt.

比较 BLM^{642~1290}解旋酶对具有不同长度 3' 端 ssDNA 的 dsDNA 的解链效率和所需 ATP 浓度, 可知解旋酶对 dsDNA 有效解链需要其 3' 端 ssDNA 长度为 10 nt. 主要有以下两方面的实验结果可以说明这个结论: a. 解旋酶对 3' 端 ssDNA 长度达到 10 nt 的 dsDNA 的解链效率明显高于小于 10 nt 的 dsDNA. b. 解旋酶解链不同 3' 端 ssDNA 长度的 dsDNA 达到最大程度时所需 ATP 的量不同, 其长度达到 10 nt 时, 解链需要的 ATP 的量几乎相近, 而小于 10 nt 时, 解链需要的 ATP 量要少得多. 研究证明, 具有催化 ATP 水解和能量偶联作用的精氨酸指位于 BLM 解旋酶的解旋酶中心结构域和 RecQ-Ct 结构域的分界面^[25], 因此, BLM^{642~1290}解旋酶的 ATP 酶活性和解链活性不需要其形成低聚物. 如一个 BLM^{642~1290}解旋酶分子完全结合在 ssDNA 上需要 ssDNA 的长度为 9.6 nt, 则可以推测 BLM^{642~1290}解旋酶在解链 dsDNA 时是单体. 这与噬菌体 T7 基因 4^[26-27]和牛乳头瘤病毒 E1^[28]等解旋酶的六聚体解链形成鲜明对比, 这是因为其精氨酸指位于两个相邻的解旋酶亚单位的分界面, 其催化 ATP 水解和解链 dsDNA 必须要解旋酶形成聚合体才能完成.

另外, 本研究结果显示, BLM^{642~1290}解旋酶能够结合并有效地部分解链钝末端 dsDNA, 但其结合的亲和力和解链的效率低于与有 3' 端 ssDNA 的 dsDNA 的结合和解链. 解旋酶对钝末端 dsDNA 的解链效率要比对 3' 端 ssDNA 长度达到 10 nt dsDNA

的解链效率低约 42%. 可推测解旋酶与 dsDNA 结合时解旋酶分子不需要一定结合在 ssDNA 上, 还可结合在 dsDNA 的双链部分. 研究表明大肠杆菌 RecQ 解旋酶与 ssDNA 或 dsDNA 缺口的亲和力比与钝末端 dsDNA 的要高得多^[24]. 本研究结果显示, BLM^{642~1290}解旋酶与 dsDNA 结合特征与大肠杆菌 RecQ 解旋酶具有相似性.

目前, 仅有少数解旋酶被证实与 dsDNA 结合的亲和力和解链效率是核苷酸依赖性的, 其特征更是很少被研究. 因此, 目前还没有一个共同的模型来解释解旋酶与 dsDNA 结合解链的工作机理. 不同解旋酶结合和解链的机制可能不同. 例如, DnaB^[29]和噬菌体 T7 解旋酶^[30], 在 ATP 不存在的情况下, 其 ssDNA 结合状态差, 而 PriA^[31]、Rep^[32]和 NS3h^[33]解旋酶, 则是在 ATP 存在的情况下, 其 ssDNA 结合状态差. 对于 DNA 解旋酶, 目前有两种流行的模型能很好地描述 DNA 解旋酶解链机制: 尺蠖模型^[34]和滚动模型(图 9)^[35]. 在尺蠖模型中, 解旋酶通过 2 个位点与 ssDNA 结合, 这 2 个位点在 ATP 酶循环过程中, 通过偶联核苷酸形态的变化来改变解旋酶与 DNA 的强相互作用和弱相互作用来控制解旋酶在 DNA 上的相对移动, 因此, 导致了解旋酶在 ssDNA 上的易位和对 dsDNA 的解链具有方向性, 且在工作时解旋酶为单体形式. 而滚动模型最早是在 HCV 解旋酶的解链机制中提出来的, 解旋酶具有一个单一的由核苷酸形态调节的 DNA 结合位点. 滚动模型为二聚体解旋酶, 需要 2 个酶分子共同作用才能够在 DNA 上移动. 二聚体解旋酶的前一个解旋酶分子与 ssDNA 强烈结合时, 解旋酶利用催化水解 ATP 释放的能

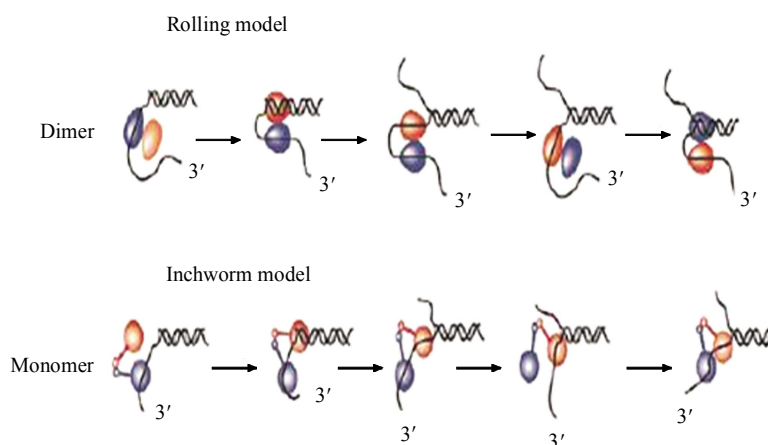


Fig. 9 Two DNA unwinding models of DNA helicase^[35]

量解开 dsDNA 且按一定的方向性前进, 当与 DNA 弱结合时, 后一个解旋酶分子利用 ATP 催化水解的能量随机地移动来调节解旋酶在 ssDNA 上的位置以备进入下一个循环^[35]. 而 BLM^{642~1290}解旋酶与 DNA 底物的复合物或 BLM^{642~1290}解旋酶的晶体结构研究还未见报道. 但大肠杆菌 RecQ 解旋酶的催化核心与 BLM 解旋酶核心区域具有很高的同源性, 其在没有 DNA 存在的情况下的结构已经得到确认^[36], 是由两个 RecA 相似的结构域和一个 RecQ 保守结构域 (RecQ-Ct) 组成, 后者又分成两个亚结构域. 基于结构和突变体的研究, 提出了 RecQ 对 dsDNA 的解链模型为尺蠖模型^[37-38]. 因此, 推测 BLM^{642~1290}解旋酶对 dsDNA 解链模型与大肠杆菌 RecQ 解旋酶是相同的, 更适合用尺蠖模型来解释.

参 考 文 献

- [1] Bachrati C Z, Hickson I D. RecQ helicases: suppressors of tumorigenesis and premature aging. *Biochemistry*, 2003, **374**(Pt3): 577-606
- [2] Mounira A G. Bloom syndrome, genomic instability and cancer: the SOS-like hypothesis. *Cancer Letters*, 2006, **236**(1): 1-12
- [3] Wong I, Moore K J M, Bjornson K P, *et al.* ATPase activity of *Escherichia coli* rep helicase is dramatically dependent on DNA ligation and protein oligomeric states. *Biochemistry*, 1996, **35**(18): 5726-5734
- [4] Lindor N M, Furuichi Y, Kitao S, *et al.* Rothmund-Thomson syndrome due to RECQ4 helicase mutations: report and clinical and molecular comparisons with Bloom syndrome and Werner syndrome. *Am J Med Genet*, 2000, **90**(3): 223-228
- [5] Wu L, Hickson I D. RecQ helicase and cellular responses to DNA damage. *Mutat Res*, 2002, **509**(12): 35-47
- [6] Hickson I D. RecQ helicase: caretakers of the genome. *Nature Reviews Cancer*, 2003, **3**(3): 169-179
- [7] Kitao S, Ohsugi I, Ichikawa K, *et al.* Cloning of two new human helicase genes of the RecQ family: biological significance of multiple species in higher eukaryotes. *Genomics*, 1998, **54**(3): 443-452
- [8] Van Maldergem L, Siitonen H A, Jalkh N, *et al.* Revisiting the craniosynostosis-radial ray hypoplasia association: Baller- Gerold syndrome caused by mutations in the RECQL4 gene. *Med Genet*, 2006, **43**(2): 148-152
- [9] Karow J K, Chakraverty R K, Hickson I D. The Bloom's syndrome gene product is a 3'-5' DNA helicase. *J Biol Chem*, 1997, **272**(49): 30611-30614
- [10] Lohman T M, Bjornson K P. Mechanisms of helicase-catalyzed DNA unwinding. *Annu Rev Biochem*, 1996, **65**: 169-214
- [11] Wu L, Davies S L, Levitt N C, *et al.* Potential role for the BLM helicase in recombinational repair *via* a conserved interaction with RAD51. *Biol Chem*, 2001, **276**(2): 19375-19381
- [12] Dutertre R, Sekhri L A, Tintignac R, *et al.* Dephosphorylation and subcellular compartment change of the mitotic Bloom's syndrome DNA helicase in response to ionizing radiation. *J Biol Chem*, 2002, **277** (8): 6280-6286
- [13] Guo R B, Rigolet P, Ren H, *et al.* Structural and functional analyses of disease-causing missense mutations in Bloom syndrome protein. *Nucleic Acids Res*, 2007, **35**(18): 6297-6310
- [14] Sharma S, Kevin M D, Robert M B Jr. DNA Helicases as targets for anti-cancer drugs. *Curr Med Chem-Anti-Cancer Agents*, 2005, **5**(3): 183-199
- [15] Dou S X, Wang P Y, Xu H Q, *et al.* The DNA binding properties of the *Escherichia coli* RecQ helicase. *J Biol Chem*, 2004, **279** (8): 6354-6363
- [16] Yang Y, Dou S X, Xu Y N, *et al.* Kinetic mechanism of DNA unwinding by the BLM helicase core and molecular basis for its low processivity. *Biochemistry*, 2010, **49**(4): 656-668
- [17] Janscak P, Garcia P L, Hamburger F, *et al.* Characterization and mutational analysis of the RecQ core of the Bloom syndrome protein. *Mol Biol*, 2003, **330**(5): 29-42
- [18] Janscak P, Abadjieva A, Firman K. The type I restriction endonuclease R.EcoR124I: over-production and biochemical properties. *Mol Biol*, 1996, **257**(5): 977-991
- [19] Karow J K, Newman R H, Freemont P S, *et al.* Oligomeric ring structure of the Bloom's syndrome helicase. *Curr Biol*, 1999, **9**(11): 597-600
- [20] Singleton M R, Dillingham M, Wigley D B. Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu Rev Biochem*, 2007, **76**(7): 23-50
- [21] Lohman T M, Tomko E J, Wu C G. Non-hexameric DNA helicases and translocases: mechanisms and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, **9**(5): 391-401
- [22] Xu H Q, Zhang A H, Auclair C, *et al.* Simultaneously monitoring DNA binding and helicase-catalyzed DNA unwinding by fluorescence polarization. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31**(14): 70-76
- [23] Zhang B, Zhang A H, Chen L, *et al.* Inhibition of DNA helicase, ATPase and DNA -binding activities of *E. coli* RecQ helicase by chemotherapeutic agents. *Biochemistry*, 2008, **143**(6): 773-779
- [24] Zhang X D, Dou S X, Xie P, *et al.* *Escherichia coli* RecQ is a rapid, efficient, and monomeric helicase. *J Biol Chem*, 2006, **281** (52): 12655-12663
- [25] Ren H, Dou S X, Rigolet P, *et al.* The arginine finger of the Bloom syndrome protein: its structural organization and its role in energy coupling. *Nucleic Acids Res*, 2007, **35**(18): 6029-6041
- [26] Singleton M R, Sawaya M R, Ellenberger T, *et al.* Crystal structure of T7 gene 4 ring helicase indicates a mechanism for sequential

- hydrolysis of nucleotides. *Cell*, 2000, **101**(6): 589–600
- [27] Crampton D J, Guo S, Johnson D E, *et al.* The arginine finger of bacteriophage T7 gene 4 helicase: role in energy coupling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(13): 4373–4378
- [28] Enemark E J, Joshua-Tor L. Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase. *Nature*, 2006, **442**: 270–275
- [29] Jezewska M J, Bujalowski W. Global conformational transitions in *Escherichia coli* primary replicative helicase DnaB protein induced by ATP, ADP, and single-stranded DNA binding. *Biol Chem*, 1996, **271**(2): 4261–4265
- [30] Hingorani M M, Patel S S. Interactions of bacteriophage T7 DNA primase/helicase protein with single-stranded and double-stranded DNAs. *J Biochemistry*, 1993, **32**(46): 12478–12487
- [31] Jezewska M J, Bujalowski W. Interactions of *Escherichia coli* replicative helicase PriA protein with single-stranded DNA. *Biochemistry*, 2000, **39**(34): 10454–10467
- [32] Wong I, Lohman T M. Allosteric effects of nucleotide cofactors on *Escherichia coli* Rep helicase-DNA binding. *Science*, 1992, **256**(5055): 350–355
- [33] Levin M K, Gurjar M M, Patel S S. ATP binding modulates the nucleic acid affinity of hepatitis C virus helicase. *J Biol Chem*, 2003, **278**(26): 23311–23316
- [34] Kim J L, Morgenstern K A, Griffith J P, *et al.* Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure*, 1998, **6**(1): 89–100
- [35] Velankar S S, Soultanas P, Dillingham M S, *et al.* Crystal structures of complexes of PcrA DNA helicase with a DNA substrate indicate an inchworm mechanism. *Cell*, 1999, **97**(1): 75–84
- [36] Lee J Y, Yang W. UvrD helicase unwinds DNA one base pair at a time by a two-part power stroke. *Cell*, 2006, **127**(7): 1349–1360
- [37] Bernstein D A, Zittel M C, Keck J L. High-resolution structure of the *E. coli* RecQ helicase catalytic core. *EMBO J*, 2003, **22**(6): 4910–4921
- [38] Zittel M C, Keck J L. Coupling DNA-binding and ATP hydrolysis in *Escherichia coli* RecQ: role of a highly conserved aromatic-rich sequence. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**(22): 6982–6991

Study on The Interactions of Bloom Helicase Catalytic Core With Double-Stranded DNA by Fluorescence Polarization Technology*

LUO Heng^{1,2,3)}, XU Hou-Qiang^{1,2)**}, CHEN Xiang^{1,2)}, LIU Chao-Qian^{1,2)}, XU Qing-He^{1,2)}, LI Kun^{1,2)}

⁽¹⁾ Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in the Plateau Mountainous Region,
Ministry of Education, College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

²⁾ Guizhou Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding Reproduction, College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

³⁾ The Provincial Key Laboratory for Agricultural Pest Management of Mountainous Region,
Agricultural College, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract Bloom syndrome helicase (BLM) is an important member of RecQ family of DNA helicases. It participates in cell metabolism including DNA repair, recombination, transcription, telomere maintenance, and plays key roles in maintaining chromosome stability. The mutation of BLM helicase may lead to Bloom syndrome that characterized by genomic instability and a strong predisposition to many types of cancer. This study was studied the interaction of BLM helicase catalytic core (BLM^{642~1290}) with double-stranded DNA (dsDNA) by fluorescence polarization technology, and analyzed the related characteristic parameters to understand the DNA-binding and unwinding properties of BLM^{642~1290} helicase. The results indicated that the binding and unwinding of the helicase and dsDNA was related to the length of 3'-tailed single-stranded DNA (ssDNA) in dsDNA substrates; the helicase preferred to bind the ssDNA tails of dsDNA substrates, and every helicase molecule may bind 9.6 nt ssDNA; the unwinding efficiency was the highest level when the 3'-tail ssDNA length of dsDNA substrates was 10nt, no longer increasing with the length. In addition, the blunt dsDNA was also bound and unwound by BLM^{642~1290} helicase, but the binding affinity and the unwinding efficiency were smaller than 3'-tailed dsDNA. It may be concluded that BLM^{642~1290} helicase was monomer in binding and unwinding to dsDNA substrates, and may unwind dsDNA in an inchworm manner. These results will provide the theoretical foundation for further studying the unwinding mechanism of BLM helicase.

Key words Bloom helicase, DNA binding, DNA unwinding, fluorescence polarization technology

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00612

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2010CB534912), The Doctoral Program of the Ministry of Education (200806570003), The Governor of Guizhou Province Talents Fund (200822), International Cooperative Projects of Guizhou Province ([2011] 7008), Guizhou University Innovation Funds of Graduate Student (nongke 2012027).

**Corresponding author.

Tel: 86-851-8292183, E-mail: houqiang0524@yahoo.com

Received: July 4, 2012 Accepted: September 13, 2012