

单活性结构域 T7 核酸酶 I 的制备及性质研究*

范三红^{1, 2)} 单丽伟¹⁾ 王保莉¹⁾ 管楚秋^{3)**} 郭蔼光^{1, 2)**}

(¹⁾ 西北农林科技大学生命科学院, 杨凌 712100; (²⁾ 西北农林科技大学陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100;

(³⁾ New England Biolabs Inc., Ipswich 01938, MA USA)

摘要 T7 核酸酶 I (T7E I) 是一种能特异识别并拆分重组中间体 Holliday Junction (HJ) 的多功能核酸酶, 该酶不仅能特异识别和拆分 HJ, 而且能随机切割双链 DNA, 特异识别并切割双链 DNA 中的切刻和单碱基错配位点. 构建了两种原核表达载体用于表达 MBP 和 His-tag 融合的两种 T7E I 突变体, MBP-T7E I (E20K) 和 His6-T7E I (E65K). 每一种融合蛋白形成的同源二聚体不具有核酸酶活性, 通过共表达或两种蛋白质共变性复性、双标签亲和纯化, 最终获得具有单个活性结构域的 T7E I 同源二聚体(T7E I -SAD). 以 pUC(AT) 和 pUC19 为底物测试 T7E I -SAD 的 HJ 拆分活性、随机切刻活性和切刻位点切割活性, 结果显示, T7E I -SAD 可特异识别并切割 HJ 结构, 但丧失了同时引入两个切刻位点的能力, 其对 pUC(AT) 的特异切刻活力和对 pUC19 的随机切刻活力与野生酶相当. 逐级变性梯度洗脱实验显示, T7E I -SAD 的稳定性与野生型酶接近, 二聚体解离需要 5.0~6.0 mol/L 尿素或 1.75~2.0 mol/L 盐酸胍; 凝胶阻滞实验表明 T7E I -SAD 具备与 HJ 结构特异结合的能力. 为具有细胞毒性蛋白的表达提供了一种新策略, 同时提供了一种简便直观的蛋白质二聚体稳定性测试方法.

关键词 T7 核酸酶 I, 结构域交换, 单活性结构域, 二聚体稳定性, 催化特性

学科分类号 Q55

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00580

遗传重组是进化最主要的驱动力之一, 生物通过遗传重组引入或删除遗传信息、维持遗传信息的相对稳定. 重组中间体 Holliday Junction (HJ) 的拆分是 DNA 重组的关键步骤, 参与这一过程的酶称为解离酶(resolvase). 解离酶广泛存于病毒、原核生物和真核生物, 已发现的解离酶均以二聚体形式存在, 它们能特异识别重组中间体 HJ, 并在分枝点附近同时引入两个切刻位点, 将四链交叉结构拆分成两条带有切刻位点的双链 DNA^[1].

T7 核酸酶 I (T7 endonuclease I, T7E I) 由 T7 噬菌体基因 3 编码, 编码产物为包含 149 个氨基酸残基的多肽链, 两条肽链通过结构域交换(domain swapping)方式形成同源二聚体, 该二聚体包含两个活性结构域, 每一个结构域由第一条多肽链的 17~44 片段和第二条肽链的 50~145 片段共同折叠而成, 两个活性结构域通过反向平行 β 折叠片(β -bridge)连接. T7E I 的两个活性中心与限制性内切酶 *EcoRV*、*Bgl I* 类似^[2-4]. 每个活性中心由 4 个氨基酸残基组成, 其中 D55、E65、K67 由一条肽链提供, 而 E20 由另一条肽链提供. 作为解离酶

T7E I 对 HJ 的结合具有高度特异性, 其结合 HJ 的能力是结合线性双链 DNA 的 1 000 倍左右^[5]. 如图 1 所示, T7E I 除了具有专一性的 HJ 结构拆分活性外, 还具备随机在双链 DNA 中引入切刻位点的活性, 专一性识别切刻位点并在另一条 DNA 链上对应位置引入另一切刻位点导致 DNA 双链的断裂, 专一性识别并切割 DNA 双链中的单碱基错配位点^[5-6]. 一定幅度内改变 β -bridge 的长度和氨基酸组成后 T7E I 仍可拆分 HJ 结构, 但其离子依赖性和活力大小有所变化, 说明 T7E I 和 HJ 结合过程中 β -bridge 具有一定程度的柔韧性^[7-8]. 2005 年 Guan 等^[9]制备获得 T7E I 的一个催化结构域(SCD), 证明单个 T7E I 结构域具备随机切刻活性和切刻位点特异切割活性, 并推测具有两个活性结构域的

* 西北农林科技大学青年学术骨干支持计划(QN2009070)资助项目.

** 通讯联系人.

郭蔼光. Tel: 029-87092726, E-mail: guoaignang@yahoo.com.cn

管楚秋. Tel: 1-978-382-7269, E-mail: guan@neb.com

收稿日期: 2009-10-05, 接受日期: 2010-01-19

T7E I 可能是由具有随机切刻活性的单结构域蛋白进化而来. 本研究首次利用 T7E I 的结构域交换二聚体特性设计并制备获得具有单个活性结构域的 T7E I (T7E I -SAD), 并对其稳定性、底物结合专一性和催化特性进行了分析. 本研究结果对 T7E I 及类似酶功能的阐明和利用具有重要参考价值, 并为蛋白质二聚体稳定性测定提供了一种简便方法.

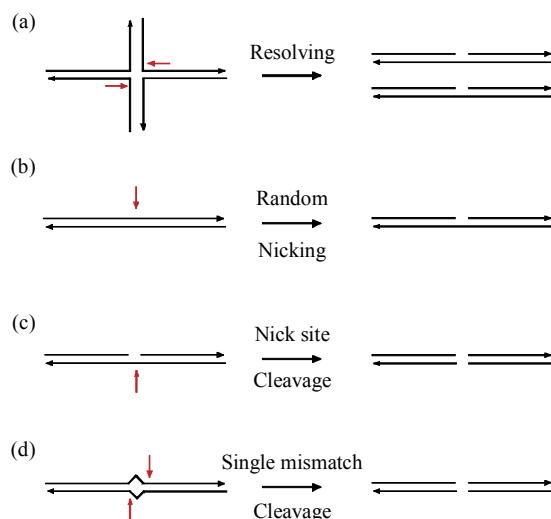


Fig. 1 The activity of T7 endonuclease I

(a) Specific binding and cleavage for "Holliday Junction". (b) Random nicking. (c) Specific recognition and cleavage for "nicked site". (d) Specific recognition and cleavage for "single-base mismatched heteroduplex".

1 材料与方法

1.1 实验材料

限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III、Vent DNA polymerase、宿主菌 *E. coli* ER2566 和 ER2984、十字交叉 DNA 底物 pUC(AT) 和双链 DNA 底物 pUC19、麦芽糖结合蛋白(maltose binding protein, MBP)表达纯化系统、直链淀粉亲和层析介质(amylose resin)均为 NEB 公司产品; Ni-NTA Superflow 亲和层析介质购自 Qiagen 公司; 蛋白质定量试剂 Bio-Rad Protein Assay 为 Bio-Rad 公司产品; 6% DNA Retardation 预制胶购自 Invitrogen 公司; 所有的引物合成和测序由 NEB 公司完成; pET28a 和 pET21a 载体为 Novagen 公司产品, 其中 pET21a 载体进行了改造, 在 *Nde* I 和 *EcoR* I 切点间插入了 MBP 编码区.

1.2 T7E I 突变体的构建

以含有 T7E I 基因的质粒为模板^[7], 采用两步

PCR 法分别将第 20 位和第 65 位的谷氨酸残基突变为赖氨酸残基. 将 E20 突变为 K20 时所用的引物为: E20K-F 5' GAGCGTTTCGCTCTGGC-CTAAGGACAAGGTTTCAAAGCA 3', E20K-R 5' TGCTTTGAAACCTTGTCCTTAGGCCAGAG-CGAAACGCTC 3'. 将 E65 突变为 K65 时所用的引物为: E65K-F 5' TCCAAACGGTATATTC-GTTAAGACAAAGGGTCTGTGGGA 3', E65K-R 5' TCCCACAGACCCTTTGTCTTAACGAATATA-CCGTTTGGGA 3'. 突变后的 T7E I (E20K)基因片段通过 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后与包含 MBP 编码基因的 pET21a 载体连接, 构建获得 pET21a-MBP-T7E I (E20K)质粒; 突变后的 T7E I (E65K)基因片段通过 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后与 pET28a 载体连接, 构建获得 pET28a-T7E I (E65K)质粒. 构建好的重组质粒均通过测序确证.

1.3 T7E I -SAD 的表达与纯化

采用两种方法获得具有单个活性结构域的 T7E I 突变体(T7E I -SAD). a. 共变性复性法. 首先分别表达纯化获得 MBP-T7E I (E20K)和 His6-T7E I (E65K)两种无活性的融合蛋白, 然后将它们等分子数混合变性复性, 复性后的样品经 amylose 和 Ni-NTA 两种亲和介质依次纯化, 最终获得 MBP-T7E I (E20K)/His6-T7E I (E65K) 异源二聚体, 即 T7E I -SAD. 两种无活性的 T7E I 突变体融合蛋白的纯化分别参考 NEB 公司的 MBP 融合蛋白纯化手册和 Qiagen 公司的 His-tag 融合蛋白纯化手册. T7E I -SAD 具体的变性复性纯化细节如下: 将上述两种无活性 T7E I 突变体等分子数混合后置于 8 mol/L 尿素溶液中透析变性, 然后再置于复性缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl pH 7.6, 50 mmol/L NaCl, 2 mmol/L DTT, 5 mmol/L MgCl₂)中透析复性. 复性后的样品首先经 amylose 亲和层析柱进行分离, 去除不包含 MBP 标签的蛋白质, 然后使用含 0.5%麦芽糖的缓冲液洗脱(50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, 0.5%麦芽糖).洗脱后的样品直接加载到 Ni-NTA 亲和层析柱, 使用 10 倍体积清洗缓冲液去除杂蛋白, 再使用包含 250 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液洗脱, 最终获得具有双亲和标签的 T7E I -SAD. b. 共表达法. 将方法 1.2 中构建的 pET21a-MBP-T7E I (E20K)和 pET28a-T7E I (E65K)两种质粒同时导入大肠杆菌 ER2566 菌株中, 在含有 100 mg/L 氨苄青霉素和 50 mg/L 卡那霉素的培养基中 37℃ 培养

至对数生长期, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 室温过夜诱导. 收集菌体, 超声破碎, 12 000 *g* 离心收集上清液. 随后的双亲和标签纯化流程与共变性复性方法一致. 蛋白质纯化过程均在 4℃ 完成.

1.4 T7E I -SAD 活性的测定

以 pUC(AT) 为底物测定其拆分活性, 以 pUC19 为底物测定其随机切割线性 DNA 的能力. pUC(AT) 质粒中包含一段重复序列, 该质粒会自动形成十字交叉结构, 为重组中间体 HJ 结构的类似物. 测定酶活的反应体积为 20 μ l, 其中包含 1 μ g pUC(AT) 或 pUC19 和不等量的酶蛋白. 缓冲体系组成为: 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.6, 50 mmol/L NaCl, 2 mmol/L DTT, 0.1% Triton-X 100, 5 mmol/L MgCl₂ 或者 MnCl₂. 反应温度为 37℃, 反应时间为 30 min. 活力单位定义为: 30 min 内将 1 μ g 超螺旋形式的 pUC(AT) 或 pUC19 转化为非超螺旋形式所需的酶量^[9]. 特别说明: 测定活力时, 琼脂糖凝胶中预先加入了溴化乙锭, 由于溴化乙锭能嵌入 DNA 分子, 增加 DNA 分子内部张力, 因而完整的质粒 DNA 几乎全部以超螺旋形式存在. 当质粒 DNA 中引入一个切刻位点或同时引入两个相邻且相对应的切刻位点, 则质粒 DNA 分子中的张力丧失, 质粒 DNA 以切刻环状或线性形式存在.

1.5 T7E I -SAD 二聚体稳定性分析

本研究建立了一种测定蛋白质亚基间结合强度的简单方法. 首先将 MBP 和 His-tag 双标签标记的异源二聚体 T7E I -SAD 分子结合于 Ni-NTA 亲和层析介质, 然后用含有不同浓度变性剂(盐酸胍或尿素)的洗脱液梯度洗脱. 随着变性剂浓度的增加, 亚基和亚基之间发生解离. 由于 His-tag 融合蛋白在变性条件下可以和 Ni-NTA 介质结合, 而且其结合力大于非变性条件, 因而 MBP 融合的亚基会被洗脱流出, 而 His-tag 融合的亚基始终结合在层析柱上. 最后结合在 Ni-NTA 介质上的 His-tag 融合亚基可通过改变洗脱液的 pH 值(pH 4.5)得以洗脱. 透析去除洗脱所得各组分中的变性剂, 用 SDS-PAGE 分析各组分中的蛋白质含量和组成, 并以其为依据确定拆分蛋白质二聚体所需的变性剂浓度. 实验过程中, 柱体积为 0.5 ml, 每次用 2 ml 含不同浓度变性剂的洗脱液洗脱.

1.6 凝胶阻滞分析 T7E I -SAD 与 Junction3 的特异结合

Junction3(J3)是人工设计的 HJ 底物, 由 4 种寡核苷酸链混合退火获得^[10]. 4 条链的序列分别为:

J3-b-FAM 5' FAM-CCTCCGTCCTAGCAAGGGG-CTGCTACCGGAAGGG 3', J3-h 5' CCCTTCGGTAGCAGCCTGAGCGGTGGTTGAAGG 3', J3-r 5' CCTTCAACCACCGCTCAACTCAACTGCAGTCTGG 3', J3-x 5' CCAGACTGCAGTTGAGTCTTGCTAGGACGGAGG 3'. 其中 J3-b-FAM 链的 5' 端采用 FAM 进行了荧光标记. 将等分子数的 4 种寡核苷酸链混合, 100℃ 加热 10 min, 室温退火 30 min, 即获得荧光标记的 J3. 20 μ l 反应体系中包含 10 nmol/L 荧光标记的 J3, 不同浓度的酶蛋白, 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 50 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA. 25℃ 孵育 30 min 后, 用 6% DNA retardation gel 进行分离, 电极缓冲液为 0.5×TBE, 4℃ 100V 恒压电泳 1 h, 用 GE Typhoon 9400 进行荧光扫描照相, 激发光波长为 488 nm, 发射光波长为 520 nm.

2 结果与分析

2.1 T7E I -SAD 的制备

如图 2a 所示, 野生型的 T7E I 为结构域交换的二聚体, 每一个结构域的形成均需要 2 条肽链共同参与完成, 两个活性结构域由反向平行的 β -bridge 连接. 本实验中设计了两种突变体, 一种是将 E20 突变为 K20, 一种是将 E65 突变为 K65. 当 T7E I (E20K) 或 T7E I (E65K) 各自形成同源二聚体时, 两个活性中心均包含突变残基, 因而两个结

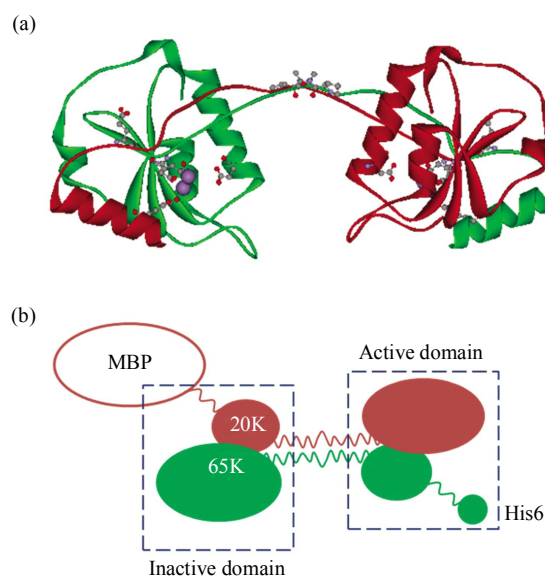


Fig. 2 The structure of T7E I and T7E I -SAD

(a) T7E I exists as a domain swapping dimer. (b) The sketch of double tagged T7E I -SAD.

构域均没有活性. 当 T7E I (E20K) 和 T7E I (E65K) 形成异源二聚体时, 其中一个活性中心包含两个突变残基, 而另一个活性中心无突变残基, 这样便形成了包含两个结构域, 但只有一个活性结构域的 T7E I -SAD, 如图 2b 所示. 为了便于分离纯化, 本实验通过两步 PCR 法构建了 2 种重组质粒 pET21a-MBP-T7E I (E20K) 和 pET28a-T7E I (E65K), 前者可以表达出 MBP 融合的 T7E I (E20K), 后者可以表达出 His-tag 融合的 T7E I (E65K).

本研究采用两种方法制备包含 MBP 和 His-tag 双标签的异源二聚体 T7E I (E20K)/T7E I (E65K). 图 3a 为采用共变性复性方法制备 T7E I -SAD 的 SDS-PAGE 分析结果, 其中 1, 2 泳道分别为两种无活性 T7E I 融合蛋白 MBP-T7E I (E20K) 和 His6-T7E I (E65K), 第 3 泳道为 MBP-T7E I (E20K) 和 His6-T7E I (E65K) 混合变性复性后经两步亲和层析获得的带有 MBP 和 His-tag 双标签的异源二聚体 T7E I -SAD. 将重组质粒 pET21a-MBP-T7E I (E20K) 和 pET28a-T7E I (E65K) 同时转入 ER2566 菌株进行共表达, 然后通过 2 次亲和纯化制备 T7E I -SAD 的 SDS-PAGE 分析结果如图 3b 所示. 其中第 3 泳道为经过直链淀粉亲和柱纯化获得的总蛋白, 第 5、6 泳道为最终获得的异源二聚体 T7E I -SAD.

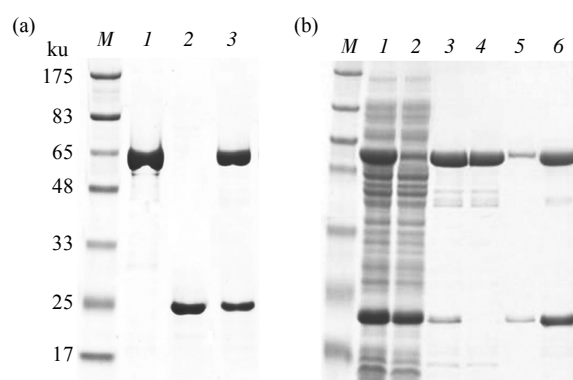


Fig. 3 Different samples from T7E I -SAD preparation process were analyzed by 10%~20% SDS-PAGE

(a) Preparing T7E I -SAD by denaturing, refolding and twice affinity tagging. M: Protein marker; 1: MBP-T7E I (E20K); 2: His6-T7E I (E65K); 3: Purified T7E I -SAD. (b) Preparing T7E I -SAD by co-expression and twice affinity tagging. M: Protein marker; 1: Crude cellular extracts; 2: Flow through from amylose column; 3: Fraction eluted by maltose from amylose column; 4: Flow through from Ni-NTA column; 5: Fraction eluted by imidazole from Ni-NTA column; 6: Fraction eluted by imidazole (concentrated).

2.2 T7E I -SAD 催化活性

T7E I 虽然是多功能酶, 但其主要功能为 HJ 结构的识别和拆分. T7E I 切割 pUC(AT) 时, 如图 4a 所示, 每一泳道中切割环状 DNA (nicked form) 对应条带与参照泳道(第 1 泳道)无明显差异, 即 T7E I 在超螺旋形式 DNA 中同时引入两个切割位点转变为线性 DNA. T7E I -SAD 切割 pUC(AT) 时, 如图 4b 所示, 与参照泳道相比(第 1 泳道)切割环状 DNA 对应条带随着超螺旋形式的减少而逐步增加, 当超螺旋形式完全消失后又逐步减少, 即 T7E I -SAD 在切割 pUC(AT) 时, 首先引入一个切割位点, 将超螺旋转变为切割环状形式, 这与 T7E I -SAD 只有一个活性结构域的特征一致, 形成的切割环状又逐步转变为线性 DNA, 这是由于单个活性结构域仍然具有切割位点特异切割活力.

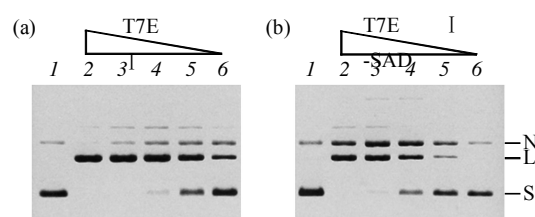


Fig. 4 Comparing the activity of T7E I and T7E I -SAD

In each lane, 1 μ g of pUC(AT) in 20 μ l Mg^{2+} buffer was incubated with various amounts of enzyme at 37 $^{\circ}C$ for 30 min, and then analyzed on 1.2% agarose gel. 2~6: 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 ng enzyme was used respectively. 1: No enzyme was added. (a) Wild-type T7E I. (b) T7E I -SAD. N: Nicked form; L: Linear form; S: Supercoiled form.

表 1 列举了 T7E I 和 T7E I -SAD 催化 pUC (AT) 和 pUC19 的比活力. 从中可以看出, 虽然 T7E I -SAD 只有一个活性结构域, 但其在 Mg^{2+} 缓冲液中将超螺旋 pUC(AT) 或 pUC19 转换为非超螺旋形式的能力与野生型 T7E I 接近. 在 Mn^{2+} 缓冲液中, T7E I -SAD 催化 pUC(AT) 或 pUC19 的能力均高于 T7E I. 以 pUC(AT) 为底物, 野生型的 T7E I 在 Mn^{2+} 缓冲液中的拆分活力远低于其在 Mg^{2+} 缓冲液中的活力, T7E I -SAD 在 Mn^{2+} 缓冲液中活力有所提高, 这不是由于 T7E I -SAD 对 HJ 结构特异识别和切割的能力提高, 而是由于其随机切割能力升高. 这可能与两个活性位点的协同性有关, 如有研究者将 T7E I 两结构域连接区的 P46 残基删除后, 其在 Mn^{2+} 缓冲液中的随机切割能力会显著升高^[7].

Table 1 The specific activity of T7E I and T7E I-SAD

Enzyme	Specific activity/(U·μg ⁻¹)			
	pUC(AT) Mg ²⁺	pUC(AT) Mn ²⁺	pUC19 Mg ²⁺	pUC19 Mn ²⁺
T7E I	800 ± 50	40 ± 5	40 ± 5	40 ± 5
T7E I-SAD	700 ± 50	240 ± 30	40 ± 5	240 ± 30

Unit definition: One unit is defined as the amount of enzyme required to convert 1 μg of supercoiled plasmid pUC(AT) or pUC19 to non-supercoiled form in 1 h at 37°C.

2.3 T7E I-SAD 二聚体稳定性分析

T7E I 的二聚体存在形式是其识别 HJ 结构的基础, 因而二聚体的稳定性直接影响 T7E I 的功能. 图 5a 为使用不同浓度盐酸胍洗脱时各洗脱组分的 SDS-PAGE 分析结果, 可以看出当盐酸胍浓度在 1.75~2.0 mol/L 时, 异源二聚体解离. 图 5b 为使用不同浓度尿素洗脱的各洗脱组分的 SDS-PAGE 分析结果, 可以看出当尿素浓度在 5.0~6.0 mol/L 时, 异源二聚体解离. 1997 年, Parkinson 和 Lilley^[11]发现 T7E I 亚基之间的结合非常牢固, 只在 6 mol/L 尿素溶液才会发生亚基交换; 2007 年, Guo 和 Eisenberg^[12]利用圆二色光谱仪测定 T7E I 在不同浓度盐酸胍溶液中蛋白质结构的稳定性, 研究结果显示当盐酸胍浓度到达 1.5~1.6 mol/L 时, 蛋白质结构中主要的空间结构已几乎全部丧失. T7E I 是结构域交换的二聚体, 结构域解体是亚基解离的前提. 结合上述结果可知 T7E I-SAD 与 T7E I 的稳定性接近.

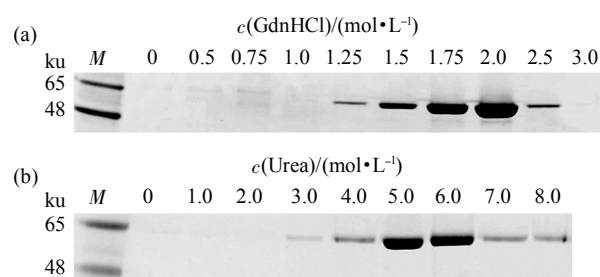


Fig. 5 The fractions from stepwise denaturing and eluting were analyzed by 10%~20% SDS-PAGE

(a) Eluting with different concentration of GdnHCl. (b) Eluting with different concentration of urea. *M* is protein marker, the digit on the top of each lane is the concentration of denaturant.

2.4 凝胶阻滞分析 T7E I-SAD 与 Junction3 的特异结合

2005 年 Guan 等^[9]制备了 T7E I 的一个催化结

构域称之为 SCD (single catalytic domain), 由于其仅包含一个结构域, 因而没有结合和拆分 HJ 的能力. 本研究的创新点在于获得的 T7E I-SAD 包含两个结构域, 一个有活性, 而另一个无活性, 因而其应该具备特异结合 HJ 结构能力. 图 6 为通过凝胶阻滞实验测定的 T7E I 与 Junction3 特异结合能力的结果图. 其中 J3 使用荧光标记, 结合缓冲液中包含 5 mmol/L EDTA 以抑制酶的切割作用. 图 6 中第 1, 2 泳道中出现明显的阻滞条带, 说明 T7E I-SAD 具有与 T7E I 类似的 HJ 结合能力.

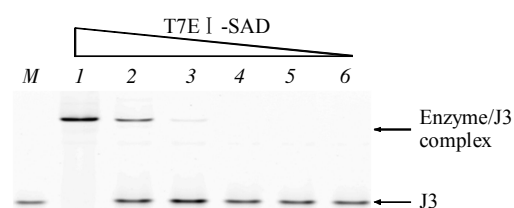


Fig. 6 Probe the specific binding ability of T7E I-SAD to Junction3 by 6% DNA retardation gel

10 nmol/L Junction3 (J3, strand b was labeled with FAM) in the 20 μl binding buffer with various amounts of the enzyme were incubated at 25°C for 30 min. Each mixture was resolved by 6% DNA retardation gel at 4°C. 1~6: 30, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.67 nmol/L of T7E I-SAD. *M*: No enzyme added. The upper band is the complex of T7E I-SAD/J3, the lower band is the free J3.

3 讨 论

本研究通过两种方案制备获得包含双亲和标签的异源二聚体 T7E I-SAD, 并证明其具有特异结合 HJ 结构的能力, 能特异结合并切割 HJ 类似物 pUC(AT). 但其切割 pUC(AT)的方式与 T7E I 不同, T7E I 能同时引入两个切割位点, 使超螺旋形式 pUC(AT)直接转换成线性形式, 而 T7E I-SAD 只具有一个活性结构域, 一次只能引入一个切点, 因而先将超螺旋形式转换为切割环状形式, 然后再利用其切割位点特异切割活性将切割环状质粒再转变为线性形式. T7E I-SAD 在 Mn²⁺ 缓冲液中, 切割 pUC(AT)和 pUC19 的能力均高于 T7E I.

研究中常会遇到一些具有细胞毒性的蛋白质, 如何提高其表达量是不可回避的问题. 常用的方法有 4 种: 其一是通过信号肽和导肽将靶蛋白定位到特定的细胞区间, 如外周质、液泡等; 其二是改变目标基因上游的启动子序列及对应的调控蛋白, 降低目标基因的本底表达, 如使用严谨的 T7启动子;

其三是通过融合肽或另一蛋白质抑制靶蛋白活性或对抗其毒性, 如表达限制性内切酶的菌株中需要同时表达对应的甲基化酶; 其四是利用无细胞表达系统进行表达, 如麦胚表达系统. 本研究利用 T7E I 结构域交换二聚体的特点, 首先获得两种无活性的蛋白质, 通过共变性复性将无活性的蛋白质转变为有活性的蛋白质, 这种思路可为具有细胞毒性蛋白的表达提供参考.

目前测定蛋白质二聚体稳定性的方法并不多, 有的研究者使用不同浓度的 SDS 处理蛋白质样品, 随后用电泳分析二聚体在 SDS 中解离的条件, 也有研究者使用不同的变性剂处理样品, 随后用圆二色光谱仪分析蛋白质二级结构的变化, 进而推测二聚体解离的条件. 本研究提供了一种通过逐级变性洗脱测定蛋白质二聚体稳定性的方法, 虽然该方法还有待进一步完善, 但其简便性和直观性是复杂仪器设备无法相比的.

参 考 文 献

- [1] Declais A C, Lilley D M. New insight into the recognition of branched DNA structure by junction-resolving enzymes. *Curr Opin Struct Biol*, 2008, **18**(1): 86-95
- [2] Hadden J M, Declais A C, Carr S B, *et al.* The structural basis of Holliday junction resolution by T7endonuclease I. *Nature*, 2007, **449**(7162): 621-624
- [3] Hadden J M, Convery M A, Declais A C, *et al.* Crystal structure of the Holliday junction resolving enzyme T7endonuclease I. *Nat Struct Biol*, 2001, **8**(1): 62-67
- [4] Declais A C, Fogg J M, Freeman A D, *et al.* The complex between a four-way DNA junction and T7endonuclease I. *EMBO J*, 2003, **22**(6): 1398-1409
- [5] Mean R J, Pierides A, Deltas C C, *et al.* Modification of the enzyme mismatch cleavage method using T7endonuclease I and silver staining. *Biotechniques*, 2004, **36**(5): 758-760
- [6] Babon J J, McKenzie M, Cotton R G. The use of resolvases T4 endonuclease VII and T7endonuclease I in mutation detection. *Mol Biotechnol*, 2003, **23**(1): 73-81
- [7] Guan C, Kumar S, Kucera R, *et al.* Changing the enzymatic activity of T7endonuclease by mutations at the beta-bridge site: alteration of substrate specificity profile and metal ion requirements by mutation distant from the catalytic domain. *Biochemistry*, 2004, **43**(14): 4313-4322
- [8] Freeman A D, Declais A C, Lilley D M. Metal ion binding in the active site of the junction-resolving enzyme T7endonuclease I in the presence and in the absence of DNA. *J Mol Biol*, 2003, **333**(1): 59-73
- [9] Guan C, Kumar S. A single catalytic domain of the junction-resolving enzyme T7endonuclease I is a non-specific nicking endonuclease. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**(19): 6225-6234
- [10] Guo Z, Eisenberg D. Runaway domain swapping in amyloid-like fibrils of T7endonuclease I. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(21): 8042-8047
- [11] Parkinson M J, Lilley D M. The junction-resolving enzyme T7endonuclease I: quaternary structure and interaction with DNA. *J Mol Biol*, 1997, **270**(2): 169-178
- [12] Guo Z, Eisenberg D. The mechanism of the amyloidogenic conversion of T7endonuclease I. *J Biol Chem*, 2007, **282**(20): 14968-14974

Preparation and Characterization of T7 Endonuclease I With Single Active Domain*

FAN San-Hong^{1,2)}, SHAN Li-Wei¹⁾, WANG Bao-Li¹⁾, GUAN Chu-Di^{3)**}, GUO Ai-Guang^{1,2)**}

¹⁾ College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

²⁾ Shanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

³⁾ New England Biolabs Inc., Ipswich 01938, MA USA)

Abstract T7 endonuclease I (T7E I) is a multiple functional endonuclease from bacteriophage T7, which can act as a resolvase to bind and resolve recombination intermediate Holliday Junction (HJ) specifically, act as a nicking enzyme to nick double-stranded DNA randomly, act as a specific endonuclease to recognize and cleave nicked sites and single-base mismatched sites on duplex DNA. Vector pET21a-MBP-T7E I (E20K) and pET28a-T7E I (E65K) were constructed, and MBP and His6 tagged T7E I mutants MBP-T7E I (E20K) and His6-T7E I (E65K) were expressed and purified respectively. Two T7E I mutants exist as homodimers, two domains of each mutant are inactive. One MBP-T7E I (E20K) subunit and one His6-T7E I (E65K) subunit can form a heterodimer, which have one active domain and one inactive domain (so named T7E I -SAD). T7E I -SAD was obtained by two approaches: The first concerns co-expression of two plasmids in *E. coli* strains ER2566 and purification of T7E I -SAD by amylose and Ni-NTA affinity columns. The second concerns co-denaturing and co-refolding of MBP-T7E I (E20K) and His6-T7E I (E65K) in equal molar and isolation of heterodimer T7E I -SAD by double affinity tagging. Using the cruciform structure-containing plasmid pUC(AT) and general closed circular plasmid pUC19 as substrates, the resolving, random nicking and nicked sites cleavage activity of T7E I -SAD were analyzed. T7E I -SAD can recognize cruciform structure, but it loses the capability to introduce two nicked sites simultaneously. In buffer with Mg^{2+} , the specific nicking activity of T7E I -SAD to pUC(AT) and random nicking activity to pUC19 are close to that of wide-type enzyme. In buffer with Mn^{2+} , the random nicking activity of T7E I -SAD is higher than wide-type T7E I significantly. Results of stepwise denaturing and elution experiment showed that the subunits of T7E I -SAD can disassociate in 5~6 mol/L urea or 1.75~2.0 mol/L guanidine hydrochloride. Gel-shift assay showed T7E I -SAD can binding to four-way junction substrate Junction3 specifically. This study provides an efficient strategy to prepare cytotoxic protein, it provides a sample intuitive approach to probe the stability of protein dimerization too.

Key words T7 endonuclease I, domain swapping, single active domain, dimer stability, catalytic properties

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00580

*This work was supported by a grant from The Program for Excellent Young Research Fellows at the Northwest A&F University(QN2009070).

**Corresponding author.

GUO Ai-Guang. Tel: 86-29-87092726, E-mail: guoaignang@yahoo.com.cn

GUAN Chu-Di. Tel: 86-1-978-382-7269, E-mail: guan@neb.com

Received: October 5, 2009 Accepted: January 19, 2010