文章编号:1000-5404(2009)05-0379-04

论著

推定铜绿假单胞菌噬菌体 PaP3 末端酶小亚单位的 DNA 结合能力检测

申晓冬[1],张克斌[2],李 明[1],胡晓梅[1],周莹冰[1],陈志瑾[1],胡福泉[1] (第三军医大学:[1]基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室,重庆 400038,[2]新桥医院医学实验技术中心,重庆 400037)

摘 要:目的 检测理论推定的铜绿假单胞菌噬菌体 PaP3 末端酶小亚单位(pap3p01 基因)编码蛋白对特异性 DNA 的结合能力。**方法** 通过 PCR 从噬菌体 PaP3 基因组扩增出 pap3p01 基因,克隆至表达载体 pQE31,转化入大肠杆菌 JM109 后,IPTG 诱导表达目的蛋白,超声裂菌后发现目的蛋白质 H6-PaP3P01 存在于上清中,进而利用 Ni-NTA 亲合层析纯化蛋白。利用 PCR 与酶切方法获取可能含有末端酶小亚单位结合位点的 DNA 片段,并对其 3′端进行生物素标记。最后采用凝胶迁移率改变实验检测 H6-PaP3P01 的 DNA 结合能力。**结果** 成功构建了 pQE-PaP3P01 表达载体,获得的融合蛋白 H6-PaP3P01 表达量较高且全部存在于菌体超声后的上清中。经亲和层析初步纯化及脱盐处理后,H6-PaP3P01 可与 263 bp 特异性 DNA 片段结合。**结论** 成功构建并表达了推定的 PaP3 末端酶小亚单位重组蛋白 H6-PaP3P01,并且检测到了该蛋白质对特异 DNA 的结合能力,初步证实了理论推定的正确性,为完善 PaP3 噬菌体包装机制的研究奠定了基础。

关键词: 末端酶小亚单位;噬菌体 PaP3;EMSA;蛋白表达
中图法分类号: Q75;Q782;Q939.48 **文献标识码:** A

Determination of binding ability to specific DNA sequence of putative small subunit of terminase of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage PaP3

SHEN Xiao-dong[1], ZHANG Ke-bin[2], LI Ming[1], HU Xiao-mei[1], ZHOU Ying-bing[1], CHEN Zhi-jin[1], HU Fu-quan[1] ([1]Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Center of Medical Experiments and Technique, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the binding ability to specific DNA sequence of the putative small subunit of the terminase of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage PaP3. **Methods** The fragment of pap3p01 was amplified from the genome of bacteriophage PaP3 and cloned into expression plasmid pQE31. The recombinant vector pQE31-PaP3p01 was transformed to *E. coli* JM109. After induction with IPTG, the expressed bacteria was dissolved with lysis buffer, then the tagged protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography. The DNA fragment carrying the putative small subunit binding site was gained by PCR and restrictive enzyme digestion, and marked with biotin in 3′-end, finally the DNA-binding ability of the fusion protein H6-PaP3P01 was determined by EMSA. **Results** The expression plasmid pQE31-PaP3p01 was successfully constructed. The fusion protein H6-PaP3P01 was highly expressed and in the suspended layer. After purified by Ni-NTA affinity chromatography and desalted, the H6-PaP3P01 protein can bind to the specific DNA fragment. **Conclusion** The fusion protein H6-PaP3P01 was successfully expressed and purified, and it has the specific DNA-binding activity. Our present work lays the foundation for the further research of packaging mechanism of bacteriophage PaP3.

Key words: terminase small subunit; bacteriophage PaP3; electrophoretic mobility shift assay; protein expression and purification

末端酶为双链 DNA 噬菌体包装过程中的重要功能蛋白。本室前期的工作完成了铜绿假单胞菌噬菌体 PaP3 的全基因组测序和初步注释(GenBank 登录号:AY078382)[1],对基因组初步注释发现有 71 个推定编码基因,经 BLASTp 检索总共明确了 6 个功能蛋白质的编码基因[2],其中 pap3p03 基因被推定为末端酶大亚单位的编码基因,并经实验证实了该推论的正确性[3,4]。然而,末端酶通常由大小两个亚单位组成,两者相辅相成发挥包装蛋白(packaging protein)的功能。大亚单位剪切多串联拷贝基因组 DNA(concatemer DNA),并将单拷贝的基因组装填入预先组装的前衣壳中;而小亚单位则结合至基因组包装位点上启动包

基金项目:国家自然科学基金(30470082)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30470082)
作者简介:申晓冬,女,重庆市铜梁县人,博士,讲师,主要从事微生物与分子生物学方面研究。电话:(023)68752239,E-mail: shenxiaodong77@yahoo.com.cn
通信作者:胡福泉,电话:(023)68752240,E-mail: hoofuquan@yahoo.com.cn
收稿日期:2008-06-19;修回日期:2008-09-12

装,并稳定复合物的结合[5-7]。

为了完善对噬菌体 PaP3 末端酶的认识,寻找并鉴定小亚单位的编码基因显得十分必要。因此,本研究在理论分析(基因组功能基因的排列、保守性结构域检索及二级结构的预测分析)的基础上,初步推定 pap3p01 基因可能编码末端酶小亚单位。本研究经克隆表达获得该基因编码产物重组蛋白质 H6-PaP3P01,EMSA 实验证实 H6-PaP3P01 能特异性结合含有包装信号 DNA,具有末端酶小亚单位的功能,初步证实理论推论的正确性,为进一步验证与研究该基因的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和试剂

表达载体 pQE31 为 Qiagen 公司产品,克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司,大肠杆菌 JM109 表达菌株由我室保存,铜绿假单胞菌噬菌体 PaP3 基因组 DNA 由本室制备并保存,限制性内切酶、DNA 连接酶、PCR 扩增试剂盒均为 Takara Biotechnology 公司产品,Bio-Gel P6 DG 分子筛填料为美国 Bio-Rad 公司产品,Ni-NTA 亲和层析填料为德国 Qiagen 公司产品,生物素 3′端 DNA 标记试剂盒和 EMSA 反应试剂盒为美国 Pierce 公司产品。其他试剂为国产分析纯试剂。

1.2 DNA 操作

DNA 片段的提取、酶切、鉴定、连接和转化按常规方法进行,DNA 结合片段的 3′末端标记按试剂盒说明书进行。

1.3 PCR 扩增 pap3p01 片段

首先依据测序和注释结果确定的 pap3p01 基因序列(位于基因组 1 979 ~ 2 437 bp 位置,产物含 158 个氨基酸),设计 1 对引物,并在 5′端引入内切酶 *Bam*H 和 *Hind*Ⅲ酶切位点。引物序列为:P1:5′-GGATCCAGATACCCAAGAGCGGTT-3′(下划线为 *Bam*HⅠ酶切位点);P2:5′-AAGCTTTAGACAATACTCCCAAAC-3′(下划线为 *Hind*Ⅲ酶切位点)。PCR 的反应条件为 PCR 反应条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 40 s,55 ℃ 40 s,72℃ 90 s,共 3 个循环;94 ℃ 40 s,65 ℃ 40 s,72 ℃ 90 s,共 20 个循环;72 ℃ 10 min。

1.4 pQE31-pap3p01 重组质粒的构建及其在 JM109 中的诱导表达

经 PCR 扩增出 pap3p01 序列连接至 pMD-T18 载体中,筛选出阳性克隆后提取质粒并以 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ酶切分离纯化出 458 bp 左右的片段,连接至经同样的酶处理的 pQE31 质粒,经 Amp 抗性选择出阳性克隆并测序确定序列的正确性。然后将 pQE31-pap3p01 重组质粒转化入 JM109 菌株, 37 ℃,160 r/min,培养至吸光度值 $D(600)\approx0.6$,加入终浓度为 100 μmol/L 的 IPTG 诱导表达 5 h,取样行 12% Tris-Tricine 电泳分析。

1.5 重组 H6-PaP3P01 蛋白质的分离与纯化

以最佳条件扩大蛋白表达,离心菌液收集菌体沉淀,用 20 ml 天然条件亲和裂解缓冲液吹打混匀,超声裂菌后离心分离产物,收集上清备用。由于 pQE31 载体会使目标蛋白在 N 端产生 6 个组氨酸的标签,因此采用 Ni-NTA 纯化系统纯化 6×His 融合蛋白,收集洗脱峰备用。然后依据目标蛋白相对分子质量(15.3×10^3),采用的 Bio-Rad 公司的 Bio-Gel P6 DG[分离范围($1\sim6$)$\times10^3$]聚丙烯酰胺凝胶对蛋白质样本进行进一步纯化与脱盐,冷冻干燥制备得到纯化蛋白质粉末[8]。

1.6 小亚单位结合靶 DNA 片段的制备与标记

末端酶小亚单位的最重要的功能体现在对包装位点 DNA 的结合能力上,其结合的位点一般都位于大亚单位剪切的 cos 位点左右约 100 bp 片段上,通过小亚单位对该片段的结合可以使 DNA 的构型发生改变,利于大亚单位的结合与剪切。因此,本研究选择 PaP3 基因组 -100 ~ +238 bp 的 239 bp 的片段(cosN 位点 5-GCCGGCCCCTTTCCGCGTTA-3 位于基因组中 0 ~ 20 bp 位置)作为 H6-PaP3P01 融合蛋白结合的靶片段。

1.6.1 引物设计 依据基因组末端的编码序列,在 cos 位点两端设计 1 对引物 P1:5-TGCCGTTGTCTAGAACCAATG-3;P2:5-CGGCATAACGTGCATGACTCCT-3。PCR 反应条件:94℃ 5 min;94 ℃ 40 s,60℃ 40 s,72℃ 90 s,共 20 个循环;72℃ 10 min。利用胶回收试剂盒将 PCR 产物回收纯化。

1.6.2 小亚单位结合片段的制备 依据该 PCR 片段的测序结果分析,采用 *Hind*Ⅲ酶切该片段分离并回收 690 bp 片段,再用 *BseX*Ⅰ酶切该片段,分离其中 239 bp 的片段,该片段即为小亚单位结合片段。另外回收下游的 100 bp 的片段,作为非特异性对照。

1.6.3 小亚单位结合片段的标记 依据美国 Pierce 公司生物素 3′端 DNA 标记试剂盒的操作说明进行。该试剂盒的主要成分为末端脱氧核糖核苷转移酶(TdT,202 U/μl),生物素-N4-CTP,5×TdT 反应缓冲液。

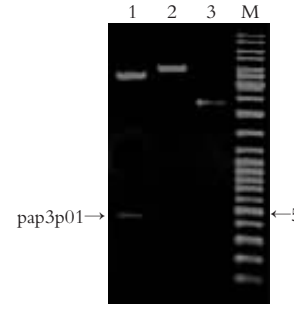
1.7 重组 H6-PaP3P01 蛋白 DNA 结合能力的检测

采用凝胶迁移率改变实验(electrophoretic mobility shift assay,EMSA)来检测重组 H6-PaP3P01 融合蛋白质对特异性 DNA 片段的结合能力。分别选用 239 bp 作为特异性结合片段,以及相邻的 100 bp 的片段作为非特异对照,以提高实验结果的说服力。实验过程按照 Pierce 公司的 EMSA 反应试剂盒和化学荧光核酸检测试剂盒说明书进行。

2 结果

2.1 pQE31-pap3p01 重组质粒的构建与鉴定

通过对 PCR 反应体系和条件的优化,从 PaP3 基因组 DNA 模板中扩增到了 pap3p01 全长结构基因。由图 1 中的泳道 1 可见,重组质粒可切出与预期大小的一致片段(理论值为 459 bp)。进一步对重组质粒进行核苷酸测序,结果表明,重组质粒的序列和阅读框均完全正确。

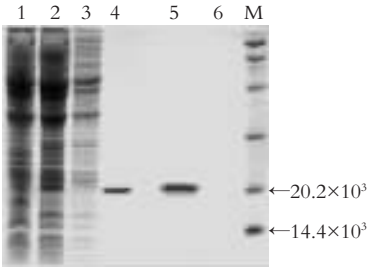


1:pQE31-pap3p01/*Bam* HⅠ + *Hind* Ⅲ;2:pQE31-pap3p01/*Bam*HⅠ;3:pQE31-pap3p0;M:DNA 标准

图 1 pQE31-pap3p01 重组质粒酶切鉴定

2.2　重组 pQE31-pap3p01/JM109 重组菌融合蛋白 H6-PaP3P01 的诱导表达及纯化

将阳性 pQE31-pap3p01/JM109 工程菌扩大培养并加入 IPTG 诱导表达后收集菌体,通过超声波裂解后离心发现目的蛋白质主要存在于超声裂解物的上清中,如图 2 中泳道 2 所示。收集超声裂解物上清加至已平衡好的 Ni-NTA 亲和层析柱,经 250 mmol/L 咪唑洗脱缓冲液洗脱后,电泳分析发现目的蛋白质主要存在于洗脱峰中,且纯度达 90% 以上。进而,利用低分子量分辨率的分子筛过滤凝胶对目的蛋白亲和洗脱峰溶液进行脱盐处理,最后冷冻干燥获得高纯度的目标蛋白质。

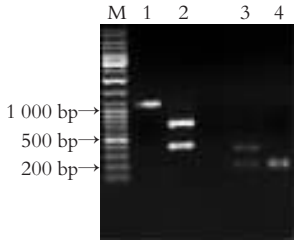


1: pQE31 /JM109 阴性对照菌;2:pQE31-PaP3P01/JM109 菌液超声上清;3:亲和穿过峰;4:亲和洗脱峰;5:脱盐峰 1;6:脱盐峰 2;M:蛋白质低分子量标准

图 2　重组 H6-PaP3P01 亲和纯化结果的 Tris-Tricine 电泳分析

2.3　小亚单位结合靶 DNA 片段的制备与标记

按照操作步骤,首先通过 PCR 扩增出含有基因组末端的 1 050 bp 的片段,如图 3 中泳道 1 所示;泳道 2 中 *Hind*Ⅲ将该片段酶切成 690 bp 和 460 bp 两个片段;回收 690 bp 的片段再用 *BseX* Ⅰ酶切为 390 bp 和 239 bp 的可见片段(泳道 3 所示,另外一个 61 bp 片段因分子量太小而不为肉眼所见);回收其中 239 bp即泳道 4 中的片段,作为小亚单位结合的靶 DNA。另外采用 *Bam*H Ⅰ酶切,回收 239 bp 下游的 100 bp 片段作为非特异 DNA 对照片段。



M:DNA 标准;1:PCR 结果;2:*Hind*Ⅲ酶切结果;3:*Bse*X Ⅰ酶切 690 bp 片段;4:小亚单位结合靶 DNA 片段即 239 bp 片段的回收后结果

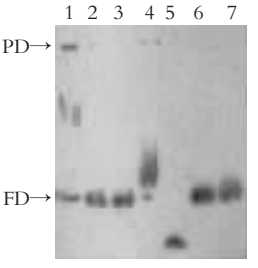
图 3　小亚单位结合片段的制备

2.4　重组 H6-PaP3P01 蛋白 DNA 结合能力的检测

为了检测并充分说明重组 H6-PaP3P01 蛋白的 DNA 结合能力,分别设定以下 3 组实验及 2 种不同的对照: ①仅含有 Mg^{2+} 的缓冲体系,能否促成结合反应的进行; ②同时含有 Mg^{2+} 和 K^+ 的缓冲体系对结合反应的影响; ③同时含有 Mg^{2+} 和 Na^+ 的缓冲体系对结合反应的影响; ④2 种不同的非特异对照组:一个为非特异性蛋白质对照组,采用 BSA 代替重组 H6-PaP3P01,观察 239 bp 靶 DNA 片段是否会与之发生非特异性结合;另一个为非特异性 DNA 对照组,用小亚单位结合片段下游的 100 bp 片段代替靶 DNA 与重组 H6-PaP3P01 反应,观察二者之间是否会有非特异性结合。

实验结果如图 4 所示,泳道 1 为含有 Mg^{2+} 和 K^+ 的缓冲体系结合反应结果,在该体系中重组 H6-PaP3P01 蛋白能与靶 DNA 片段结合,形成的 H6-PaP3P01 ·DNA 复合物(protein · DNA complex,PD)能产生一个明显的后滞条带;而泳道 2、3 为仅含有 Mg^{2+} 的缓冲体系,增大蛋白质的浓度,二者不发生结合,无后滞条带形成;泳道 4 所显示的结果则为同时含有 Mg^{2+} 和 Na^+ 的缓冲体系中,重组 H6-PaP3P01 蛋白同样能与目标 DNA 结合,但其结合能力远远低于在 Mg^{2+} 和 K^+ 的缓冲体系,形成一个不规则的拖尾,而 H6-PaP3P01 ·DNA 复合物的量明显低于泳道 1;泳道 5 ~7f 分别为 3 个对照:泳道 5 为非特异性的 100 bp 的 DNA,在相同的反应体系下 H6-PaP3P01 不与之结合;泳道 6 为非特异性蛋白质对照,加入的 BSA 蛋白也不与小亚单位结合片段发生反应;而泳道 7 为无蛋白对照,在整个反应体系中,仅有小亚单位结合片段而无蛋白质。

因此,图 4 的结果说明重组 H6-PaP3P01 蛋白能与含包装位点的特异性 DNA 片段结合,而且该结合反应在 Mg^{2+} 和 K^+ 共存的缓冲体系中效率较高,同时重组 H6-PaP3P01 不与非特异性片段结合,而 BSA 在该反应体系中也不会与小亚单位结合片段发生结合反应。说明重组 H6-TSS 具有与小亚单位结合片段发生特异性结合的能力,初步证明 pap3p01 就为噬菌体 PaP3 的末端酶小亚单位的编码基因。



1:Mg^{2+} 和 K^+ 缓冲体系结合反应结果;2、3:Mg^{2+} 缓冲体系结合反应结果;4:Mg^{2+} 和 Na^+ 的缓冲体系结合反应结果;5:非特异性 100 bp DNA 对照;6:非特异性蛋白质 BSA 对照;7:无蛋白质对照;PD: 蛋白质 DNA 复合物;FD: 游离 DNA

图 4　重组 H6-PaP3P01 融合蛋白与小亚单位结合片段的结合

3　讨论

dsDNA 噬菌体的包装始于末端酶对多串联拷贝体 DNA 的结合与剪切,其中只有小亚单位预先结合至包装位点上,引发序列引导的 DNA 弯曲,才可以暴露出大亚单位的作用位点,使之准确的定位在目标序列上启动包装的进行[8,9]。因此,对特异性 DNA 的结合能力被视为小亚单位的重要功能。分析已研究的末端酶小亚单位发现,这些蛋白质的 N 端都含有一个 DBD (DNA binding domain)结构域,结构域中的 HTH

(helix-turn-helix motif)为结合 DNA 的主要功能单位[10]。对λ噬菌体小亚单位 gpNu1 的35号赖氨酸的缺失或突变可严重影响全酶对 DNA 的特异性结合[11]。然而,在对 pap3p01 编码蛋白质的分析发现,该蛋白虽然与地衣杆菌 ATCC14580 株的前噬菌体末端酶小亚基 Xtma(5－54 aa)有27.9%的同源性,而且还具有 CCM(coiled coil motif,109－140 aa)等 T4 族噬菌体小亚单位的特殊结构[12],但是却缺乏典型的 DNA 结合基序,为了验证 PaP1P01 蛋白的功能,本研究选择检测其编码蛋白质 DNA 结合能力入手。结果显示,重组 H6-TSS 蛋白质具有结合特异性 DNA 的能力,与以往研究的λ、T4,SPP1 噬菌体小亚单位的离体反应一致[13,14]。这一结果充分的说明 pap3p01 基因编码产物具有小亚单位的功能,同时也提示,噬菌体 PaP3 的末端酶小亚单位具有其结构的特异性,为进一步的研究提供了线索。

小亚单位所结合的位点通常都位于基因组的末端,在大亚单位剪切位点的两端或一侧。λ噬菌体的小亚单位 gpNu1 结合的 DNA 位点 cosB(+51～+160 bp),在大亚单位剪切位点 cosN(－22～+24 bp)的下游[8]。在另一种常见包装模型头部包装模型(headful packaging)中,小亚单位与包装位点 pac 中更多的位点结合,以辅助大亚单位的结合剪切,这主要由于在头部包装模型中,进入衣壳中的基因组长度为102%～104%,大亚单位的剪切位点不固定,因此,小亚单位为了稳固全酶的功能,与 DNA 的结合区域更广泛[13]。以噬菌体 SPP1 为例,其小亚基 G1P 的结合位点 pacL,pacR 分列于大亚单位 G2P 剪切片断 pacC 的两端约100 bp[15]。鉴于此,本研究选用基因组末端剪切位点左右各约100 bp 共200 bp 左右的片段,这涵盖了可能的 PaP3 小亚单位的结合位点,以此作为待测底物 DNA。同时,还将与之相邻的下游约100 bp 片段作为非特异性对照。2个片段分别经过生物素3′端标记后,通过 EMSA 试验可以看到重组 H6-PaP3P01 蛋白质可与239 bp 靶 DNA 片段结合,使其迁移率发生改变,产生一条明显后滞的条带,而在加入非特异性蛋白 BSA 却无滞后,并且不与非特异性对照片段结合。同时,重组 H6-PaP3P01 蛋白质只有在 Mg^{2+} 和 K^{+} 离子缓冲液中才能完成与 DNA 的特异性结合,这特点也与已研究的λ噬菌体类似,进一步证实了该基因的功能。

总之,本研究以实验初步证据证实了 pap3p01 基因编码蛋白具有小亚单位的功能,能够与特异性 DNA 片段(小亚单位结合片段)结合,证实了理论推导的正确性,为 PaP3 基因组的注释,以及包装系统的认识奠定了基础。由于 PaP3 末端酶小亚单位的结构与功能的特殊性,也为噬菌体包装蛋白的研究开辟了新的领域。

参考文献:

[1] 张克斌,金晓琳,朱军民,等. 铜绿假单胞菌噬菌体 PaP3 基因组测序[J]. 第三军医大学学报, 2002,24(4):378－380.

[2] 张克斌,金晓琳,朱军民,等. 铜绿假单胞菌噬菌体 PaP3 基因组的初步注释[J]. 第三军医大学学报, 2002,24(4):381－384.

[3] 申晓冬,张克斌,李 明,等. 铜绿假单胞菌噬菌体 PaP3 末端酶大亚单位 DNA 结合能力的测定[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(22):2205－2208.

[4] 申晓冬,胡福泉,李 明,等. 噬菌体 PaP3 推定基因 tls 核酸内切酶活性的初步验证[J]. 解放军医学杂志, 2006, 31(3):196－198.

[5] Becker A, Murialdo H. Bacteriophage lambda DNA: the beginning of the end[J]. J Bacteriol, 1990,172(6):2819－2824.

[6] Smith D E, Tans S J, Smith S B, *et al*. The bacteriophage straight phi29 portal motor can package DNA against a large internal force[J]. Nature, 2001, 413(6857): 748 752.

[7] Bogner E. Human cytomegalovirus terminase as a target for antiviral chemotherapy[J]. Rev Med Virol, 2002, 12(2): 115－127.

[8] Cue D, Feiss M. Genetic analysis of cosB, the binding site for terminase, the DNA packaging enzyme of bacteriophage lambda[J]. J Mol Biol, 1992, 228(1):58－71.

[9] Gottesman M E, Weisberg R A. Little lambda, who made thee? [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2004, 68(4): 796－813.

[10] de-Beer T, Fang J, Ortega M, *et al*. Insights into specific DNA recognition during the assembly of a viral genome packaging machine [J]. Mol Cell, 2002, 9(5): 981－991.

[11] Hwang Y, Feiss M. Mutations affecting Lysine-35 of gpNu1, the small subunit of bacteriophage lambda terminase, alter the strength and specificity of holoterminase interactions with DNA[J]. Virology, 1997, 231(2): 216－230.

[12] Kondabagil K R, Rao V B. A critical coiled coil motif in the small terminase, gp16, from bacteriophage T4: insights into DNA packaging initiation and assembly of packaging motor[J]. J Mol Biol, 2006, 358(1): 67－82.

[13] Lin H, Simon M N, Black L W. Purification and characterization of the small subunit of phage T4 terminase, gp16, required for DNA packaging[J]. J Biol Chem, 1997, 272(6): 3495－3501.

[14] Yang Q, de-Beer T, Woods L, *et al*. Cloning, expression, and characterization of a DNA binding domain of gpNu1, a phage lambda DNA packaging protein[J]. Biochemistry, 1999, 38(1): 465－477.

[15] Chai S H, Lurz R, Alonso J C. The small subunit of the terminase enzyme of Bacillus subtilis bacteriophage SPP1 forms a specialized nucleoprotein complex with the packaging initiation region[J]. J Mol Biol, 1995, 252(4): 386－398.

(编辑 汪勤俭)