技术方法

DOI:10.16016/j.1000-5404.201504010

基于远红外荧光标记的脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶活性检测方法的建立

程 燚,王 东,李梦侠 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心)

[摘要] **目的** 建立远红外荧光标记的脱嘌呤脱嘧啶(apurinic/apyrimidinic,AP)核酸内切酶活性检测方法。**方法** 通过5′标记远红外荧光基团(IR700)合成得到AP核酸内切酶活性检测底物,并通过与经典的同位素法对比,检验此方法的可靠性、灵敏度及实用性。**结果** 远红外荧光标记法较传统的同位素法检测AP核酸内切酶更为敏感(10%上升到30%),且操作时间从传统的1 d缩减至2 h。**结论** 远红外荧光标记法检测AP核酸内切酶活性更敏感,且操作方便、无放射性污染,易于推广。

[关键词] 脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶;活性检测;远红外荧光标记

[中图法分类号] R394-33 [文献标志码] B

脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶1(apurinic/apyrimidinic endonuclease 1,APE1)是DNA碱基切除修复(base excision repair, BER)的核心修复酶,其活性直接决定了细胞BER的整体功能。现有的研究显示,APE1是一个多功能蛋白,主要功能有C端的脱嘌呤脱嘧啶(apurinic/apyrimidinic,AP)核酸内切酶和N端的氧化还原功能[1]。APE1在肿瘤组织的高表达与肺癌、肝癌、卵巢癌及骨肉瘤患者预后差呈正相关,提示其在肿瘤发生、发展中具有重要作用。进一步功能研究提示,APE1与肿瘤细胞耐药、血管形成、放疗耐受等重要的肿瘤生物学特征也密切相关,以APE1为抗癌靶点具有潜在研究价值[2-4]。AP核酸内切酶活性是APE1核心功能,也是哺乳动物细胞生存所必需的生物学活性。在肿瘤学研究中,AP核酸内切酶活性的测定对于分析肿瘤细胞DNA修复能力强弱,发现APE1抑制剂等都十分重要,是DNA修复研究的重要研究方法。目前AP核酸内切酶活性的检测主要依赖与同位素标记的探针底物,在推广应用上受到了很大的限制。因此,本研究拟建立一种基于远红外荧光的AP核酸内切酶检测方法。

1 材料与方法

1.1 主要材料

γ-^{32}P-ATP 250 μCi(Perkin Elmer公司,美国),含有AP位点的DNA探针,序列如下:5′-GTGGATCCGTACTCTGFGTACGTGTCAACACGAATTCGA-3′(F代表AP位点),其互补链序列为:5′-TCGAATTCGTGTTGACACGTACCCAGAGTACGGATCCAC-3′,由TaKaRa公司(大连)合成,含AP位点的探针5′端由IR700标记(美国IDT公司专利),由IDT公司(美国)合成。T_4 PNK试剂盒(NEB公司,美国),UreaGel变性丙烯酰胺凝胶制胶试剂盒(National Diagnostics公司,美国),10×TBE(Life Technologies公司,美国),过硫酸铵(APS)、四甲基乙二胺(TEMED)(Sigma Aldrich公司,美国)。

1.2 自制APE1纯化蛋白

含有APE1全场表达序列的pET11a-hAPE1载体由美国NIH老化研究所David Wilson Ⅲ教授馈赠。该载体可表达无任何外源性多肽标签的野生型人APE1蛋白,与内源性APE1蛋白一致。将pET11a-hAPE1质粒转化至BL21(DE3)大肠杆菌中,得到单克隆扩增并作为种子菌液接种至1 L LB培养基中,37 ℃振摇3~4 h至培养液光密度值为0.6,加入0.5 mmol/L IPTG继续在20 ℃振摇过夜。收集细菌,用30 mL Buffer A[50 mmol/L两性离子缓冲剂-氢氧化钾(HEPES-KOH),pH=7.5,5%甘油(glycerol),50 mmol/L KCl]重悬细菌沉淀。用超声法破碎细菌释放蛋白,而后以20 000×g离心去除碎片及未破碎细菌,上清用于离子交换法纯化。首先将上清上柱至Q20阴离子交换柱,监测UV吸收值直至恒定不变。收集穿透液并上柱至S10阳离子交换柱,监测UV吸收值直至恒定不变,而后用Buffer B(50 mmol/L HEPES-KOH,pH=7.5,5% glycerol,700 mmol/L KCl)与Buffer A梯度混合液洗脱结合在S10阳离子交换柱上的蛋白

[通信作者] 李梦侠,E-mail:mengxia.li@outlook.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151118.1513.023.html(2015-11-18)

(>95%为APE1蛋白),用4 mL组分分离收集管收集各个组分,并提取峰值对应的洗脱组分进行进一步浓度、纯度及活性的检测。

1.3 远红外荧光探针制备

反应体积20 μL,IR700标记的、含AP位点的DNA探针(10 pmol/μL) 2 μL,10×PNK Buffer 2 μL,互补探针(10 pmol/μL) 4 μL,超纯水12 μL,放入PCR仪,95 ℃ 5 min,由95 ℃降到25 ℃,每循环(1 min)降1 ℃,共70个循环。制备好后置于4 ℃避光保存备用,可保存1个月。

1.4 同位素标记探针

反应体积20 μL,含AP位点的DNA探针(10 pmol/μL)2 μL,超纯水5 μL,10×PNK Buffer 1 μL,γ-^{32}P-ATP(10 μCi/μL 1 uL,T_4 PNK 1 μL,混匀后瞬时离心后放于PCR仪,37 ℃ 30 min,95 ℃ 10 min,4 ℃ 6 min,反应完成后加入2倍量互补探针(10 pmol/μL) 4 μL,超纯水6 μL,再次放入PCR仪,95 ℃ 5 min,由95 ℃降到25 ℃,每循环(1 min)降1 ℃,共70个循环。

1.5 同位素探针法检测AP内切酶活性

反应体积10 μL,含不同量(10~1 000 pg)的APE1纯化蛋白,1 pmol γ-32P-ATP标记的底物和AP反应缓冲液(10 mmol/L HEPES-NaOH, pH=7.5, 100 mmol/L NaCl, 2 mmol/L $MgCl_2$);37 ℃孵育10 min,加入10 μL 2×Stop Buffer甲酰胺终止反应后于95 ℃变性5 min,含有8 mol/L尿素的15%变性聚丙烯酰胺凝胶预电泳30 min,冲孔,上样,电泳300 V 70 min后,于暗室中X光胶片-70 ℃压片过夜,第2天显影、定影。

1.6 荧光探针法检测AP内切酶活性

反应体积10 μL,含不同量(10~1 000 pg)的APE1纯化蛋白,1 pmol荧光标记的底物和AP反应缓冲液(10 mmol/L HEPES-NaOH, pH=7.5, 100 mmol/L NaCl, 2 mmol/L $MgCl_2$);37 ℃孵育10 min,加入10 μL 2×Stop Buffer甲酰胺终止反应95 ℃ 5 min,含有8 mol/L尿素的15%变性聚丙烯酰胺凝胶先冲孔预电泳30 min,取10 μL反应产物,上样电泳300 V 70 min,切下凝胶荧光扫描(LI-COR ODYSSEY红外线双色扫描激光成像系统)。

2 结果

2.1 同位素法检测AP核酸内切酶活性

用同位素法检测AP内切酶活性,不同量APE1蛋白可以将不同比例的底物转化为产物,10 pg APE1蛋白转化的底物在同位素法的结果中无法显示,100 pg大致能转化10%的产物,而1 000 pg则可将全部1 pmol的底物转化为产物。从图1中可以看出,同位素法得到的图像清晰,无杂带,便于计算转化率和酶活性。但由于同位素显影过程需放置于-70 ℃过夜成像,因此整个操作过程大约需要1 d,而且受到同位素半衰期的影响,实验安排受到极大限制。

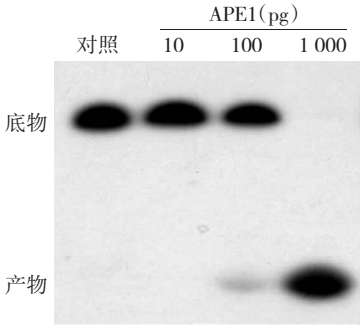


图1 同位素法检测AP内切酶活性

2.2 远红外荧光法检测AP核酸内切酶活性

用远红外荧光法检测AP内切酶活性,不同量APE1蛋白可以将不同比例的底物转化为产物,在同位素法的结果中无法显示的10 pg APE1蛋白转化的底物在远红外荧光法中可清晰显示,100 pg大致能转化30%的产物,而1 000 pg则可将接近95%的1 pmol的底物转化为产物,但仍有少部分无法转换为产物,更加符合酶促反应的规律。从图2中可以看出,远红外法由于探针为商业化合成,灵敏度较高,因此底物出现了双条带,分子量较大的为未变性的底物,为双链DNA,在PAGE胶中泳动速度较慢。整个操作过程大约需要2 h,而且实验安排非常灵活,不受场地、底物批号的影响。

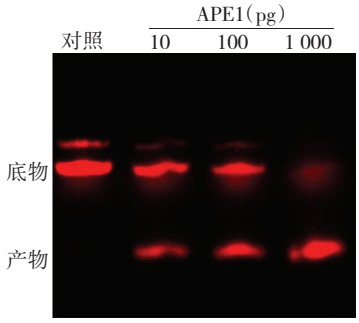


图2 远红外法检测AP内切酶活性

3 讨论

AP核酸内切酶活性是APE1核心功能,也是哺乳

动物细胞生存所必需的生物学活性。Xanthoudakis等[5]的研究显示,AP核酸内切酶活性位点E96、Y177等突变的小鼠均无法存活,亦凸显了AP核酸内切酶的活性。在人类细胞中,APE1承担了>95%的AP核酸内切酶活性,仅有少数的候选酶具有替代的微弱的活性,在Li等[6]的研究中也提示用纯化蛋白和细胞核提取物进行AP核酸内切酶检测具有同等的趋势,再次确证了APE1在细胞内的重要性。

AP核酸内切酶活性的检测是一个在APE1研究中非常重要的手段,目前基本的方法主要包括同位素标记法和分子信标法。同位素标记法是在一段含有AP位点的寡核苷酸的5′端用γ-^{32}P-ATP标记,而后将该底物与纯化APE1蛋白或细胞核提取物进行反应,将反应物用变性PAGE胶分离后进行同位素显影,通过比对具有不同分子质量的产物和底物的量来测定AP内切酶活性的方法。而分子信标法则利用5′端荧光标记的AP位点探针(AP位点距5′端<5 nt)与3′含有荧光淬灭基团进行退火得到无荧光信号的底物,当AP位点被加入的APE1蛋白切开后,则释放荧光标记的产物,从而测定AP核酸内切酶的活性[7]。两种方法各有优缺点,同位素法较灵敏,可靠性高,可重复性好,但操作繁琐,对身体和环境均有不利影响;分子信标法无辐射污染,定量方便、快速,但重复性较差,灵敏度不如同位素法。本研究正是结合两种方法创立了一种基于远红外标记的AP核酸内切酶活性的检测方法,该方法具有很好的可重复性,较同位素法具有灵敏度更高、无放射污染、操作快速等特点,适合普通实验室推广。

参考文献:

[1] Li M, Wilson D M 3rd. Human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20(4): 678-707.

[2] Wang D, Luo M, Kelley M R. Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition[J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(6): 679-686.

[3] Wang D, Zhong Z Y, Li M X, *et al*. Vector-based Ape1 small interfering RNA enhances the sensitivity of human osteosarcoma cells to endostatin in vivo[J]. Cancer Sci, 2007, 98(12): 1993-2001.

[4] Wang D, Xiang D B, Yang X Q, *et al*. APE1 overexpression is associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and targeted inhibition of APE1 enhances the activity of cisplatin in A549 cells[J]. Lung Cancer, 2009, 66(3): 298-304.

[5] Xanthoudakis S, Smeyne R J, Wallace J D, *et al*. The redox/DNA repair protein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(17): 8919-8923.

[6] Li M, Völker J, Breslauer K J, *et al*. APE1 incision activity at abasic sites in tandem repeat sequences[J]. J Mol Biol, 2014, 426(11): 2183-2198.

[7] Simeonov A, Kulkarni A, Dorjsuren D, *et al*. Identification and characterization of inhibitors of human apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1[J]. PLoS One, 2009, 4(6): e5740.

(**收稿**:2015-04-02;**修回**:2018-07-14)

(编辑 郭建秀)