



火球菌 *Pyrococcus furious* 瓣状核酸内切酶 1 的表达纯化及酶学特征

谢娟娟, 王风平, 刘喜朋*

上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

摘要:【目的】克隆表达和纯化火球菌 *Pyrococcus furious* 来源的瓣状核酸内切酶 1 基因 *pFEN1* (PF1414), 对该蛋白的活性和酶学特征进行鉴定和分析。【方法】将 *pFEN1* 在大肠杆菌中进行重组表达, 经亲和层析纯化得到电泳纯蛋白; 利用人工合成的荧光标记的寡核苷酸片段作为底物, 用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定 pFEN1 在体外的酶学特性以及与其他蛋白的相互作用。【结果】pFEN1 重组蛋白能在大肠杆菌中进行高效表达; 高于 100 mmol/L 的 NaCl 会抑制 pFEN1 的活性; pFEN1 的核酸酶活性依赖于金属离子 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} , 且 Mn^{2+} 的催化效率优于 Mg^{2+} ; 来自嗜热古菌的 pFEN1 是一种耐高温蛋白, 最适反应温度为 60–65 °C; 增殖细胞核抗原(PCNA)能促进 pFEN1 的内切酶活性。【结论】本研究证实 pFEN1 是一种 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 依赖的核酸内切酶, 且 PCNA 能促进该酶的活性。

关键词: 嗜热古菌, 火球菌, 瓣状核酸内切酶 1, 增殖细胞核抗原

在所有生物体内, DNA 复制和修复过程的精确性对于维持基因组的稳定具有重要的作用, 而这些过程都需要一系列核酸酶的参与, 瓣状核酸内切酶 1 (flap endonuclease 1, FEN1) 就是其中之一。FEN1 广泛存在于古菌、细菌和真核生物中, 是一种结构特异的多功能核酸酶(瓣状核酸内切酶、5'核酸外切酶、缺口内切酶)^[1–4], 能识别和切割双链 DNA 骨架上游离的 5'单链核酸(DNA 或 RNA), 即所谓的瓣状(flap)结构, 在 DNA 复制过程中复制叉的生长^[5]以及后随链中 RNA 引物的

切除^[6]、DNA 碱基错配切割修复(base excision repair)^[7–8]、防止重复序列扩张(repeat sequence expansion)^[9]、双链 DNA 断裂(double-strand break)修复^[10]、维持基因组的稳定性^[11]以及防止肿瘤发生^[12]等过程中扮演着重要的角色。

DNA 复制和修复过程涉及到多种蛋白质的参与, 这些蛋白之间往往存在着相互作用。迄今为止, 已发现至少有 20 多种蛋白质与 FEN1 存在着相互作用^[13], 包括 PCNA (proliferating cell nuclear antigen)^[14]、解螺旋酶 Dna2^[15]、RPA (replication

基金项目: 国家自然科学基金(31371260, J1210047)

*通信作者。Tel: +86-21-34204378; E-mail: xpliu@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2017-03-15; 修回日期: 2017-04-19; 网络出版日期: 2017-05-12

factor A related protein)^[16]、Bloom 综合症相关蛋白 (BLM)^[17]、AP 核酸内切酶 1(APE1)^[18]等。而 FEN1 是一个只有 40 kDa 左右大小的蛋白, 每次只能和 1-2 个其他蛋白相互作用, 由此可见 FEN1 参与了众多的生命过程。虽然关于 FEN1 的生化活性以及生物学功能的研究已有先例, 也有许多同源蛋白的晶体结构被解析出来, 但对于其底物识别和切割机制还存在较大争议, 对其与众多蛋白质之间的相互作用机制及其生物学意义还需进一步深入的研究^[19-21]。

Pyrococcus furious 是一种极端嗜热古菌 (hyperthermophiles), 生长温度范围 70–103 °C, 最适生长温度 100 °C^[22], 其全基因组序列于 2001 年由马里兰大学生物技术研究所的科学家们测定完成^[23]。嗜热菌体内产生的嗜热蛋白因其耐热性而在工业上具有重要的应用价值, 例如 *Pyrococcus furious* 来源的 DNA 聚合酶因具热稳定性、高效性和高保真度已广泛应用于 PCR 技术^[24]。

在本研究中, 我们克隆、表达和纯化 *Pyrococcus furious* 来源的瓣状核酸内切酶 1 (pFEN1, NCBI

Reference Sequence: WP_011012561.1), 鉴定该蛋白的活性及酶学特征, 以及研究 PCNA (PF0983)、RPA (PF2020)、3 种解螺旋酶 Dna2 (PF0572)、Rad25 (PF0126)、XPB (PF1902)对 pFEN1 活性的影响, 并对其在基因克隆技术上潜在的应用价值进行了讨论。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验所用到的质粒、菌株见表 1。用于构建表达载体的引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 用于测定蛋白活性的寡核苷酸由 Invitrogen 公司合成。本实验中所用到的 DNA Ladder、蛋白 Marker、限制性内切酶、KOD plus DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。质粒提取试剂盒、PCR 纯化和胶回收试剂盒、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒及其他生化试剂均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。Ni-NTA 蛋白纯化树脂为 Bio-Rad 公司产品。

表 1. 实验所用到的质粒和菌株

Table 1. Plasmids and strains used in this work

Plasmids and Strains	Characteristics	Source
Plasmids		
pET28a	Cloning vectors	Merck
pET28a-pFEN1	Plasmid for pFEN1 purification	This work
pDEST17-PF0983	Plasmid for PCNA purification	Store in this lab
pDEST17-PF2020	Plasmid for RPA purification	Store in this lab
pDEST17-PF1902	Plasmid for XPB purification	Store in this lab
pDEST17-PF0126	Plasmid for Rad25 purification	Store in this lab
pDEST17-PF0572	Plasmid for Dna2 purification	Store in this lab
Strains		
<i>E. coli</i> DH5a	Host for cloning vectors	Store in this lab
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Host for expressing Rad25	Store in this lab
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	Host for expressing pFEN1、PCNA、Dna2	Store in this lab
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysE	Host for expressing XPB	Store in this lab

1.2 pFEN1 表达载体的构建

首先, 利用 *KOD plus* DNA 聚合酶从 *Pyrococcus furiosus* 基因组中扩增 pFEN1 的编码序列, 引物序列见表 2, 上游引物带有 *Nde* I 酶切位点, 下游引物带有 *Xho* I 酶切位点。PCR 扩增条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增好后, 用 PCR 产物纯化试剂盒纯化。然后用 *Nde* I 和 *Xho* I 分别消化 PCR 产物和 pET28a 质粒, 以获得粘性末端, 再用 T4 DNA 连接酶连接基因片段和线性化的质粒, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 涂布于含有卡那霉素的 LB 固体培养基上, 37 °C 过夜培养后挑取若干数量的单克隆做菌落 PCR 鉴定, 再将鉴定出的阳性克隆培养后抽提质粒, 送测序公司进行 DNA 序列测定, 验证基因序列和表达框是否正确。

1.3 重组蛋白诱导表达与亲和纯化

首先将表达载体 pET28a-pFEN1 转化大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS 感受态细胞, 37 °C 过夜培养后挑取单菌落接种于 4 mL 含卡那霉素和氯霉素的 LB 液体培养基, 37 °C 培养过夜。取 1 mL 过夜培养物接种于 400 mL 培养基中培养至 $OD_{600}=0.6$, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside, 异丙基硫代半乳糖苷), 20 °C 继续培养 16 h, 诱导重组蛋白表达。8000 r/min 离心 5 min 收集菌体沉淀。将菌体悬浮于 40 mL 裂解缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 300 mmol/L NaCl, 10%甘油), 在冰上超声波裂解菌体。细胞裂解液离心前, 在

70 °C 保温 20 min, 失活绝大部分大肠杆菌自身蛋白。在 4 °C 下, 10000 r/min 离心 30 min, 收集上清液。上清液流经裂解缓冲液预平衡的 Ni-NTA 树脂(1 mL), 然后分别用含 5、20、50、100 mmol/L 咪唑的裂解缓冲液进行梯度洗涤树脂, 除去非特异性结合的杂蛋白, 再用 10 mL 洗脱缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 300 mmol/L NaCl, 200 mmol/L 咪唑, 10%甘油)洗涤树脂, 收集目标蛋白。经 SDS-PAGE 检测纯度后, 将蛋白在储存缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 300 mmol/L NaCl, 50%甘油)中透析除去咪唑, 储存于 -20 °C。蛋白浓度用 Bradford 法测定。

Pyrococcus furiosus 来源的 PCNA、RPA、Dna2 的表达纯化方法同 pFEN1。XPB 在 *E. coli* BL21(DE3)pLysE 菌株中表达, Rad25 在 *E. coli* BL21(DE3)菌株中表达, 两者诱导温度均为 37 °C, 诱导时间为 3 h, 其他操作同 pFEN1。此 5 种蛋白的表达载体均为 pDEST17 (氨苄抗性)。

1.4 pFEN1 底物的制备

用于制备 pFEN1 底物的寡核苷酸片段见表 3, FAM 代表荧光标记。将荧光标记链跟不同序列的寡核苷酸链混合, 加热退火, 互补区域配对, 形成不同结构的底物。底物制备方法如下: 将 3'FAM 标记的寡核苷酸片段(终浓度为 1.0 μ mol/L)与互补链、竞争链以 1.0:1.2:1.5 摩尔比溶于含有 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0、20 mmol/L NaCl 的缓冲液中, 100 °C 水浴煮 5 min 后, 于热水中自然冷却至室温。配好的底物于 -20 °C 避光储存。

1.5 pFEN1 核酸内切酶活性鉴定

除非特别说明, pFEN1 核酸内切酶活性测定标准反应体系(15 μ L)组成如下: 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.5, 20 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L

表 2. pFEN1 扩增引物

Table 2. Primers for pFEN1 amplification

Primers	Primer sequences (5'→3')
PF1414-F	CCCCCCCATATGGGTGTCCCAATTGGTGA
PF1414-R	CCCCCCTCGAGTTATCTCTTGAACCAA CTTTC

表 3. pFEN1 活性测定底物所用到的寡核苷酸序列
Table 3. Oligonucleotides used for pFEN1 substrates preparation

No.	Sequences (5'→3')	Characteristics
JL1	AGGCTGCGGTCGAGTTGACAGCACTGCACGCATTACTGAGCT	42 nt, 3'FAM fluorescence labeled
JL2	AGCTCAGTAATGCGTGCAAGATATCTGGCTATCGGA	45 nt, complement with JL1
JL3	TCCGATAGCCAGATATCS	17 nt, to make 14 nt flap with JL1 and JL2
JL4	TCCGATAGCCAGATATCTT	19 nt, to make 16 nt flap with JL1 and JL2
JL5	TCCGATAGCCAGATATCTTG	20 nt, to make 17 nt flap with JL1 and JL2
JL6	TCCGATAGCCAGATATCTTGA	21 nt, to make 18 nt flap with JL1 and JL2
JL7	TCCGATAGCCAGATATCTTGAC	22 nt, to make 19 nt flap with JL1 and JL2
JL8	TCCGATAGCCAGATATCTTGACAG	24 nt, to make 21 nt flap with JL1 and JL2
JL9	TCCGATAGCCAGATATCTTGACAGC	25 nt, to make 22 nt flap with JL1 and JL2
JL10	TCCGATAGCCAGATATCTTGACAGCA	26 nt, to make 23 nt flap with JL1 and JL2
JL11	TCCGATAGCCAGATATCTTGACAGCACT	28 nt, to make 25 nt flap with JL1 and JL2
JL12	TCCGATAGCCAGATATCTTGACAGCACTGC	30 nt, to make 27 nt flap with JL1 and JL2

MgCl₂, 1 mmol/L DTT, 0.1 μmol/L 底物和 0.1 μmol/L pFEN1。65 °C 反应 30 min, 然后加入等体积的反应终止液(90%甲酰胺, 100 mmol/L EDTA, 0.2% SDS, 10%甘油)。反应产物经含 8 mol/L 尿素的 15%变性聚丙烯酰胺凝胶分析, 凝胶在多功能激光成像仪 Typhoon FLA 9500 (通用电器公司)中扫描成像和分析。

2 结果和分析

2.1 pFEN1 及其他与 DNA 复制和修复相关蛋白的表达与纯化

采用 pET 原核表达系统, 重组的 pFEN1 蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 菌株中能够成功表达。经过 IPTG 在 20 °C 低温诱导过夜后, 再经镍柱亲和层析纯化, 可得到大量的可溶性重组蛋白, 产量约为 20 mg/L。15% SDS-PAGE 检测结果显示蛋白的纯度达到 90%以上, 通过与蛋白 Marker 比较, 该蛋白分子量约为 38 kD, 与目的蛋白理论计算值(38.6 kD)相符(图 1-A)。采用同样的方法,

Pyrococcus furiosus 来源的 RPA、PCNA、Dna2、Rad25 和 XPB 重组蛋白均能在大肠杆菌中表达, 蛋白纯化结果见图 1-B, 产量分别约为 10、20、8、1、10 mg/L。

2.2 pFEN1 活性测定条件的优化

拿到高纯度的 pFEN1 蛋白后, 我们对其酶促反应条件进行了优化。首先将带有 19 nt 长度 flap 的底物(图 2-A)在不同的 NaCl 浓度(0–500 mmol/L)下进行反应。由实验结果可知, 随着盐浓度的增加, pFEN1 的 5'flap 内切酶活性随之降低, 在含 100 mmol/L NaCl 浓度的反应液里其活性就几乎完全受到抑制, 说明高浓度的一价盐离子会抑制 pFEN1 的核酸酶活性(图 2-B)。

之后将酶与同一底物在不同的温度下进行反应。结果如图 2-C 所示, 在 35–75 °C 温度范围内, 该酶都表现出很高的活性, 说明温度对酶活性的影响较小, 而在 60–65 °C 下, 该酶的活性最高。我们无法知道在高于 75 °C 时 pFEN1 是否还能有效地切割底物, 因为当温度超过了底物的退火温度时, 底物双链解开, flap 结构也随之破坏。

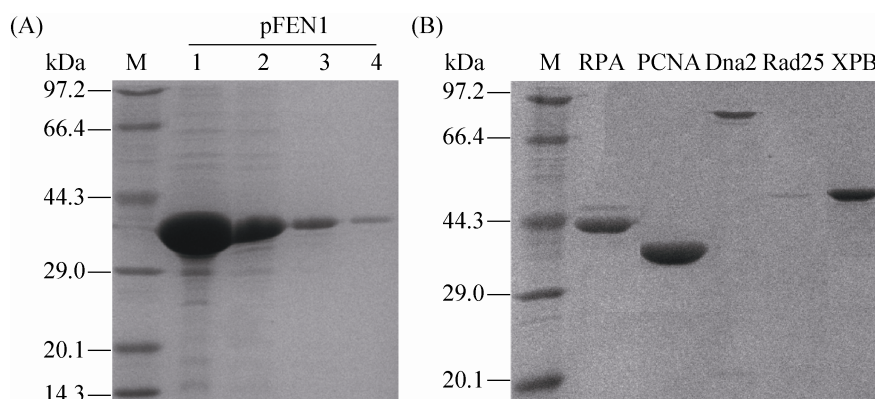


图 1. 蛋白表达纯化结果

Figure 1. The results of proteins expression and purification. A: SDS-PAGE analysis of purified pFEN1; B: SDS-PAGE analysis of purified RPA (PF2020), PCNA (PF0983), Dna2 (PF0572), Rad25 (PF0126) and XPB (PF1902) respectively; M: Protein marker.

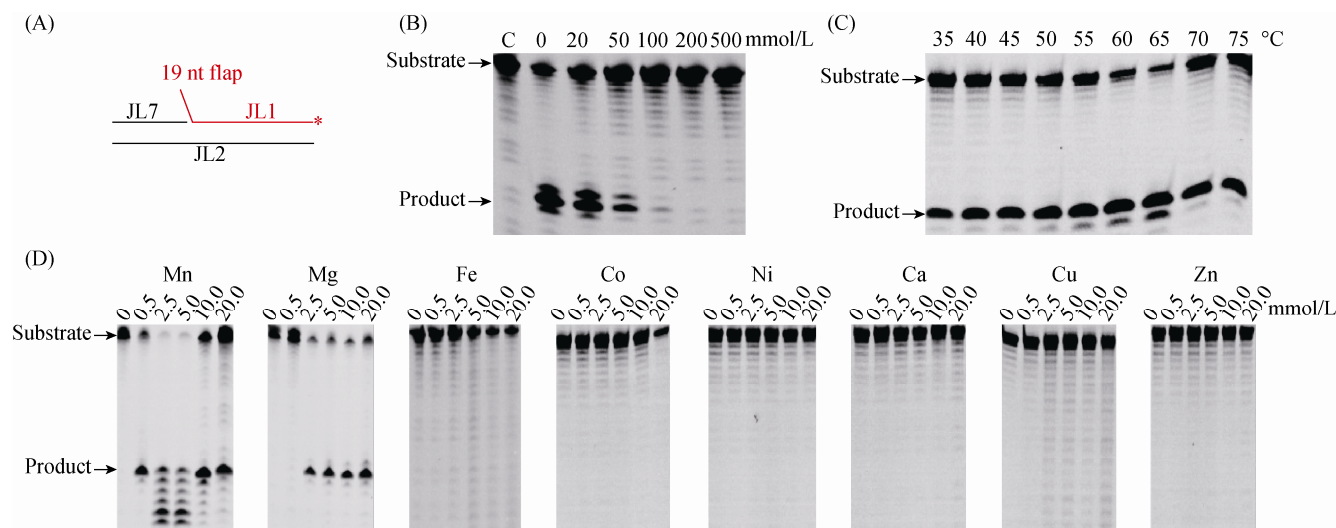


图 2. pFEN1 酶促反应条件的优化

Figure 2. Optimization of pFEN1 assay conditions. A: structure of substrate; B: effect of salinity on pFEN1 assay; C: effect of temperature on pFEN1 assay; D: effect of metal ions on pFEN1 assay.

由图 2-D 可以看出, pFEN1 的酶促反应需要二价金属离子的参与, 而且只有 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 才是适合的金属离子, 不能被其他离子如 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 等取代。当 Mn^{2+} 浓度为 2.5–5.0 mmol/L 时, pFEN1 活性最高, 随着 Mn^{2+} 浓度的增高, 酶活性下降。pFEN1 在 0.5 mmol/L Mg^{2+} 催化下没有活性, 在 2.5–20.0 mmol/L 浓度范围里, 酶活性大致保持

一致。另外, 在 Mn^{2+} 催化下, pFEN1 不仅能切割 5' flap 结构, 而且还能发挥缺口内切酶的活性, 继续切割带缺口的双链 DNA。而在 Mg^{2+} 催化下, pFEN1 缺口内切酶活性不是很明显。

2.3 Flap 长度对 pFEN1 活性的影响

为研究 flap 长度对酶活性的影响, 我们制备了带有不同长度(14–27 nt) flap 结构的底物, 分别

在 Mn^{2+} 或 Mg^{2+} 催化下进行反应, 检测 pFEN1 对各种底物的切割效率, 结果如图 3 所示。pFEN1 核酸酶活性受到 flap 长度的影响, 而且这种影响还因金属离子的种类而有所不同。pFEN1 在 Mg^{2+} 催化下能切割 16–27 nt 长度的 flap, 但无法切割 14 nt 长度的 flap (图 3-A)。在 Mn^{2+} 催化下, pFEN1 可以催化 14 nt flap 底物的反应, 但最优底物为 17–22 nt flap, 之后随着 flap 长度的增加其切割效率有所下降(图 3-B)。

2.4 pFEN1 的热稳定性研究

Pyrococcus furiosus 是一种嗜超高温菌, 为验证 pFEN1 在体外的热稳定性, 我们先将该蛋白在不同的温度下温育一段时间后, 再加入底物(同图

2-A)于 65 °C 反应 30 min。反应产物经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析(图 4)。从实验结果可知, 该酶是一个耐高温蛋白, 即使在 100 °C 温育 5 h 后, 该酶的活性基本保持不变。而且在 4 °C 冰箱存放 6 个月后, 该酶依然具有很强的催化能力(结果未展示)。

2.5 DNA 复制和修复相关的蛋白对 pFEN1 活性的影响

接下来我们选用含 22 nt flap 的底物(底物条带为 42 nt, 产物条带应为 20 nt), 同时在 pFEN1 的反应体系中分别加入 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的 PCNA、RPA、Dna2、XPB 以及 Rad25, 看 pFEN1 的催化效率是否受到影响。不同的酶组合和反应结果如图 5 所示。

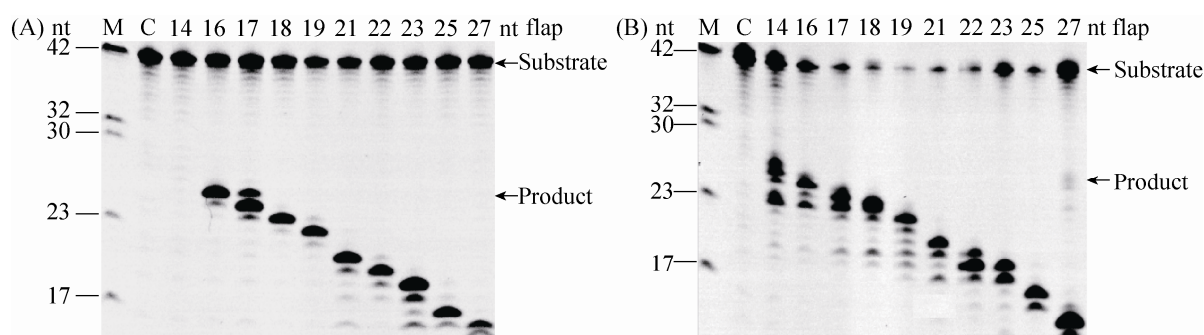


图 3. Flap 长度对 pFEN1 活性的影响

Figure 3. Effect of flap length on pFEN1 activity. M: marker; A: catalyzed by Mg^{2+} ; B: catalyzed by Mn^{2+} ; C: blank control. The reaction buffer (15 μL) contained: 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.5, 20 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L MgCl_2 or MnCl_2 , 1 mmol/L DTT, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ substrate and 0.1 $\mu\text{mol/L}$ pFEN1, reacting at 65 °C for 30 min.

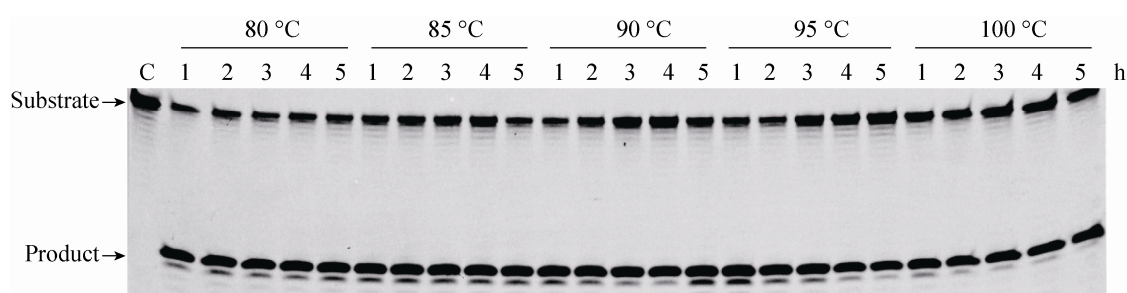


图 4. pFEN1 的热稳定性研究

Figure 4. Thermal stability of pFEN1. The reaction buffer (15 μL) contained: 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.5, 20 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L DTT, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ substrate and 0.1 $\mu\text{mol/L}$ pFEN1, reacting at 65 °C for 30 min.

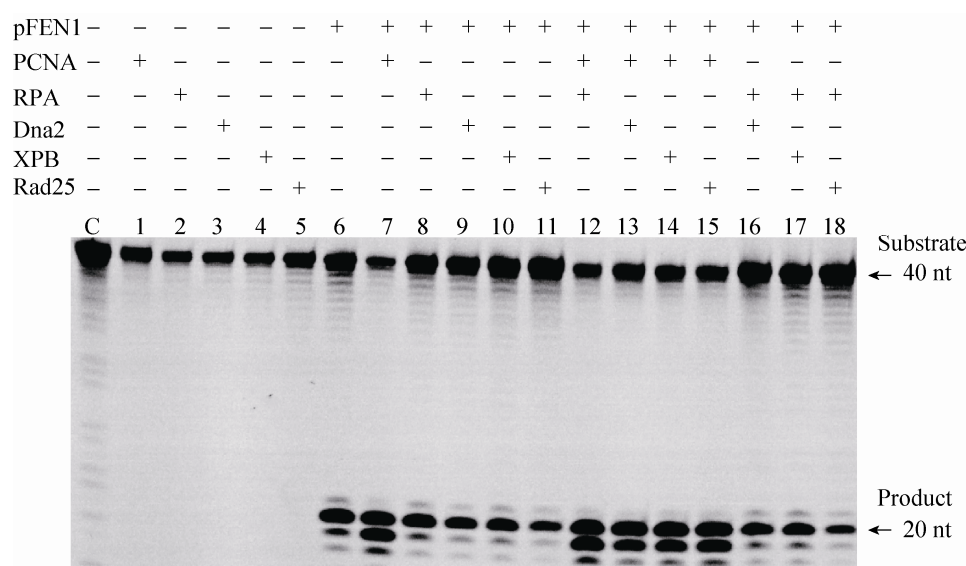


图 5. DNA 复制和修复相关的蛋白对 pFEN1 活性的影响

Figure 5. Effect of some DNA replication and DNA repair related proteins on pFEN1 activity. The reaction buffer (15 μ L) contained: 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.5, 20 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L DTT, 0.1 μ mol/L substrate and 0.1 μ mol/L enzymes respectively, reacting at 65 $^{\circ}C$ for 30 min. +/-: with/without.

由结果可知, 单独由 pFEN1 催化的反应体系中产物条带的位置大小主要在 20 nt 处(图 5, 泳道 6), 同时在 21、19、18 nt 的地方也有较弱的产物带, 说明 pFEN1 主要在单双链分支处产生切割, 同时也有部分切割在分支位点上下游 1–2 个核苷酸的位点, 且趋向于分支位点下游双链底物位点上, 继续发挥其缺口内切酶的活性。在加入 PCNA 的反应体系里(泳道 7, 12–15), 20 nt 和 19 nt 大小的产物量大致相同, 说明 PCNA 在 pFEN1 行使 flap 核酸内切酶功能后, 能促进 pFEN1 继续发挥其缺口内切酶的活性。而 RPA、Dna2、XPB 以及 Rad25 对 pFEN1 的功能并没有显著的影响。

3 讨论

极端微生物是指适合生活在极端环境中的微生物, 包括嗜热、嗜冷、嗜压、嗜酸、嗜碱等多种类型。研究极端微生物, 对于揭示生命的起源

和生物多样性的形成机制具有重要意义, 开展对极端酶的研究, 不仅有助于阐明微生物对极端环境的适应机理, 还能促进微生物在生物技术产业上的应用。

pFEN1 是来源于嗜热火球菌 *Pyrococcus furiosus* 跟 DNA 复制和损伤修复相关的瓣状核酸内切酶 1, 与已报道的来源于 *Archaeoglobus fulgidus* 和 *Pyrococcus horikoshii* 的同源蛋白 AF_0264 (NCBI Reference Sequence: WP_010877775.1) 和 PH1415 (NCBI Reference Sequence: WP_010885498.1) 的相似度分别为 62% 和 88%。

本研究克隆、表达、纯化了 pFEN1, 并在体外对其活性进行鉴定和分析。结果表明该酶是一个二价金属离子(Mg^{2+} 或 Mn^{2+}) 依赖的蛋白。研究还发现 pFEN1 除了切割 flap 结构外, 还能继续往前切割发挥缺口内切酶的活性, 而这种活性在 Mn^{2+} 的作用下更为明显。而且 pFEN1 的活性还受

到 flap 长度的影响, 在 Mg^{2+} 催化下, pFEN1 只能切割 14 nt 长度以上的 flap, 而在 Mn^{2+} 催化下, 其最优底物为 17–22 nt 长度的 flap。虽然 pFEN1 的晶体结构显示该蛋白能结合 2 个 Mg^{2+} [25], 并且已知的大部分核酸酶都需要金属离子的催化, 但具体的催化机制及其金属离子选择性还不是很清楚, 需要将来通过对不同金属离子与 pFEN1-DNA 复合物晶体结构的研究来进一步阐明。

本研究还发现 pFEN1 在低盐浓度下具有更高的活性, 这或许是因为虽然 DNA 双链在低盐浓度下不稳定, 但却有利于 flap 结构的形成, 从而更容易被 pFEN1 识别、结合和切割。同时本文还证实了 PCNA 能显著促进 pFEN1 的核酸酶活性, 并且 pFEN1 的晶体结构也表明了其 C 端结构域能与 PCNA 结合 [25]。虽然在本文中 RPA 和几种解螺旋酶对 pFEN1 的活性并没有显著影响, 但在体内它们是否具有相互作用还需进一步的分析。

常规的克隆方法是通过限制性内切酶切割载体和目的片段, 然后将载体和目的片段用连接酶连接起来。本研究已证实了 pFEN1 是一种 flap 结构特异性的核酸酶, 能够耐高温, 并且优化了其酶促反应条件和可识别的 flap 长度, 因而设想可将 pFEN1 应用于基因克隆, 具体思路如图 6 所示: 首先用特定的引物扩增载体和目的片段, 使载体和基因片段的两端产生 20–25 bp 同源区域, 然后将线性载体和目的片段混合, 通过热循环的方法, 使两者两端发生配对而连接起来, 同时产生 flap 结构, 之后 flap 结构可在 pFEN1 作用下被切除, 形成带缺口的重组 DNA, 然后转化大肠杆菌, 在大肠杆菌体内完成 DNA 缺口的修复, 形成完整的重组质粒。通过该方法可以将目标基因插入载体的任何位点, 操作简便, 是一种新的不依赖于 DNA 连接酶的通用型克隆技术。

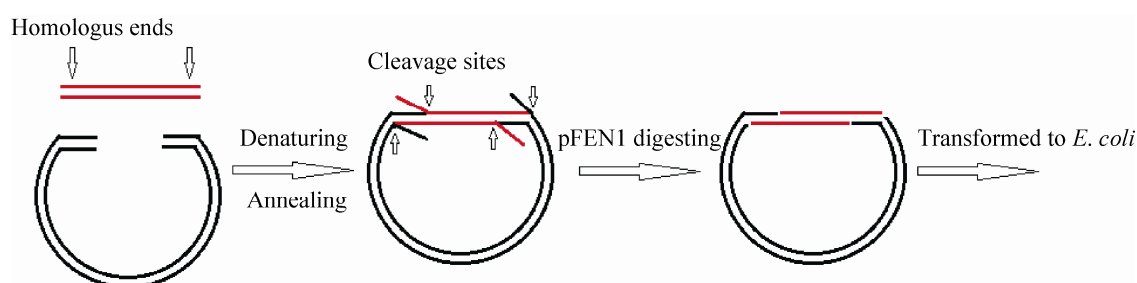


图 6. pFEN1 克隆方法示意图

Figure 6. pFEN1-dependent cloning method. Both linear vector and insert fragment, which have 20–25 bp homologous DNA at their respective terminal regions, are mixed together. After heating and cooling down, they will anneal to each other at the homologous region, and generate flaps which can be removed by pFEN1. Then the nicked/gapped recombinant circle plasmid will be repaired fully after transformation to an *E. coli* host.

参考文献

- [1] Liu R, Qiu JZ, Finger LD, Zheng L, Shen BH. The DNA-protein interaction modes of FEN-1 with gap substrates and their implication in preventing duplication mutations. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(6): 1772–1784.
- [2] Balakrishnan L, Bambara RA. Flap endonuclease 1. *Annual Review of Biochemistry*, 2013, 82(1): 119–138.
- [3] Lieber MR. The FEN-1 family of structure-specific nucleases in eukaryotic DNA replication, recombination and repair. *Bioessays*, 1997, 19(3): 233–240.
- [4] Hegde ML, Hazra TK, Mitra S. Early steps in the DNA base

- excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Research*, 2008, 18(1): 27–47.
- [5] Bambara RA, Murante RS, Henricksen LA. Enzymes and reactions at the eukaryotic DNA replication fork. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(8): 4647–4650.
- [6] Turchi JJ, Huang L, Murante RS, Kim Y, Bambara RA. Enzymatic completion of mammalian lagging-strand DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(21): 9803–9807.
- [7] Klungland A, Lindahl T. Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *The EMBO Journal*, 1997, 16(11): 3341–3348.
- [8] Grasso S, Tell G. Base excision repair in Archaea: back to the future in DNA repair. *DNA Repair*, 2014, 21: 148–157.
- [9] Johnson RE, Kovvali GK, Prakash L, Prakash S. Requirement of the yeast RTH1 5' to 3' exonuclease for the stability of simple repetitive DNA. *Science*, 1995, 269(5221): 238–240.
- [10] Wu X, Wilson TE, Lieber MR. A role for FEN-1 in nonhomologous DNA end joining: the order of strand annealing and nucleolytic processing events. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(4): 1303–1308.
- [11] Dehé PM, Gaillard PHL. Control of structure-specific endonucleases to maintain genome stability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017, 18(5): 315–330.
- [12] Kathera C, Zhang J, Janardhan A, Sun HF, Ali W, Zhou XL, He LF, Guo ZG. Interacting partners of FEN1 and its role in the development of anticancer therapeutics. *Oncotarget*, 2017, 8(16): 27593–27602.
- [13] Nazarkina ZK, Lavrik OI, Khodyreva SN. Flap endonuclease-1 and its role in the processes of DNA metabolism in eucaryotic cells. *Molecular Biology*, 2008, 42(3): 405–421.
- [14] Wu XT, Li J, Li XY, Hsieh CL, Burgers PMJ, Lieber MR. Processing of branched DNA intermediates by a complex of human FEN-1 and PCNA. *Nucleic Acids Research*, 1996, 24(11): 2036–2043.
- [15] Budd ME, Campbell JL. A yeast replicative helicase, Dna2 helicase, interacts with yeast FEN-1 nuclease in carrying out its essential function. *Molecular and Cellular Biology*, 1997, 17(4): 2136–2142.
- [16] Bae SH, Bae KH, Kim JA, Seo YS. RPA governs endonuclease switching during processing of Okazaki fragments in eukaryotes. *Nature*, 2001, 412(6845): 456–461.
- [17] Wang WS, Bambara RA. Human Bloom protein stimulates flap endonuclease 1 activity by resolving DNA secondary structure. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(7): 5391–5399.
- [18] Dianova II, Bohr VA, Dianov GL. Interaction of human AP endonuclease 1 with flap endonuclease 1 and proliferating cell nuclear antigen involved in long-patch base excision repair. *Biochemistry*, 2001, 40(42): 12639–12644.
- [19] Finger LD, Atack JM, Tsutakawa S, Classen S, Tainer J, Grasby J, Shen BH. The wonders of flap endonucleases: structure, function, mechanism and regulation/MacNeill S. *The Eukaryotic Replisome: A Guide to Protein Structure and Function*. Netherlands: Springer, 2012: 301–326.
- [20] Mase T, Kubota K, Miyazono KI, Kawarabayashi Y, Tanokura M. Structure of flap endonuclease 1 from the hyperthermophilic archaeon *Desulfurococcus amylolyticus*. *Acta Crystallographica Section F*, 2011, 67(2): 209–213.
- [21] Tomlinson CG, Atack JM, Chapados B, Tainer JA, Grasby JA. Substrate recognition and catalysis by flap endonucleases and related enzymes. *Biochemical Society Transactions*, 2010, 38(2): 433–437.
- [22] Fiala G, Stetter KO. *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100 °C. *Archives of Microbiology*, 1986, 145(1): 56–61.
- [23] Robb FT, Maeder DL, Brown JR, Diruggiero J, Stump MD, Yeh RK, Weiss RB, Dunn DM. Genomic sequence of hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*: Implications for physiology and enzymology. *Methods in Enzymology*, 2001, 330: 134–157.
- [24] Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MWW, Short JM, Sorge JA, Mathur EJ. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene*, 1991, 108(1): 1–6.
- [25] Hosfield DJ, Mol CD, Shen BH, Tainer JA. Structure of the DNA repair and replication endonuclease and exonuclease FEN-1: coupling DNA and PCNA binding to FEN-1 activity. *Cell*, 1998, 95(1): 135–146.

Expression, purification and characterization of flap endonuclease 1 from *Pyrococcus furiosus*

Juanjuan Xie, Fengping Wang, Xipeng Liu*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Objective] To clone, express, purify and characterize flap endonuclease 1 from thermophilic archaea *Pyrococcus furiosus*. [Methods] We cloned *fen1* gene from *Pyrococcus furiosus* (pFEN1), expressed it in *Escherichia coli* and purified the protein by affinity chromatography. We applied denaturing polyacrylamide gel electrophoresis to detect the enzymatic activities and studied its interaction with other proteins by using fluorescence labeled oligonucleotides as substrates. [Results] pFEN1 was overexpressed in *E. coli*. The presence of salts diminished the endonuclease activity of pFEN1, with cleavage greatly reduced at 100 mmol/L of NaCl. The activity of pFEN1 was detected only in the presence of magnesium (Mg^{2+}) or manganese (Mn^{2+}), and pFEN1 showed a higher endonuclease activity under the catalysis of Mn^{2+} . pFEN1 was thermally stable and had highest activity at temperature range of 60–65 °C. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) can significantly promote the activity of pFEN1. [Conclusion] This study confirmed that pFEN1 is a Mg^{2+} or Mn^{2+} dependent endonuclease and PCNA can stimulate its activity.

Keywords: thermophilic archaea, *Pyrococcus furiosus*, flap endonuclease 1, proliferating cell nuclear antigen (PCNA)

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31371260, J1210047)

*Corresponding author. Tel: +86-21-34204378; E-mail: xpliu@sjtu.edu.cn

Received: 15 March 2017; Revised: 19 April 2017; Published online: 12 May 2017

刘喜朋, 上海交大学生命科学技术学院副教授, 主要从事微生物的核酸代谢机制研究。综合运用生物化学、分子遗传学与结构生物学等研究手段, 解析极端微生物的核酸代谢机理; 同时开发新型高效基因组编辑技术。构建了极端微生物的数千个蛋白的重组表达载体, 阐明了嗜热古菌 *Pyrococcus furiosus* 的 RecJ 核酸酶在 DNA 修复与 RNA 引物校正中的酶学机制与结构基础。目前的研究重点包括: (1) 极端微生物 DNA 复制的分子机制, 包括 DNA replisome 的组装、动态变化与调控。(2) 同源重组修复、非同源末端结合修复等的分子机制及其在基因组编辑技术中的应用。(3) 具有重要经济价值的极端酶的挖掘利用。

