



嗜热古菌 *Archaeoglobus fulgidus* RecJ 核酸酶的表达纯化及酶学特征

王天乐, 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】克隆表达嗜热古菌 *Archaeoglobus fulgidus* (*A. fulgidus*)来源的 RecJ 核酸酶基因(ORF 编号 AF_0699, NCBI 数据库基因登陆号为 AF_RS03550), 对该重组蛋白的核酸酶活性及酶学特征进行鉴定和分析。【方法】将 *A. fulgidus* RecJ (AfuRecJ)核酸酶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; 利用人工合成的带有末端荧光标记的寡核苷酸作为底物, 体外反应后, 利用 8 mol/L 尿素变性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定 AfuRecJ 核酸酶的水解产物。【结果】AfuRecJ 核酸酶具有单链 DNA 特异性的 3'-5'外切核酸酶活性, 酶活性依赖于二价金属离子 Mn^{2+} 或 Mg^{2+} , 且 Mn^{2+} 存在条件下的催化效率明显优于 Mg^{2+} ; 其最适反应温度范围为 55–65 °C; 高于 200 mmol/L 的 NaCl 会显著抑制 AfuRecJ 的核酸酶活性。AfuRecJ 还具有单链 RNA 3'-5'外切酶活性, 且活性高于单链 DNA 底物。单链核酸 3'末端的磷酸基团对水解活性有一定抑制作用。AfuRecJ 对单链核酸的长度有一定的选择性, 可以有效水解长度 ≥ 4 个核苷酸长度的单链 RNA、 ≥ 12 个核苷酸长度的单链 DNA, 而且对双链 DNA 中的 3'单链 DNA 结构(3'突出单链尾巴与末端分叉结构)具有类似单链 DNA 的水解活性。【结论】本研究证实 AfuRecJ 是一种单链核酸特异性的 3'-5'外切核酸酶, 且相比单链 DNA, 单链 RNA 为优势底物, 推测其在胞内可能参与 RNA 降解与 DNA 修复。

关键词: 嗜热古菌, DNA 修复, RecJ 核酸酶, 核酸酶

核酸酶包括核酸内切酶和核酸外切酶, 水解磷酸二酯键, 参与细胞内 DNA 复制、重组、修复以及 RNA 成熟、加工等重要的代谢过程^[1–2]。DHH 磷酸酯水解酶(DHH 超家族蛋白)是一大类能够水解磷酸酯键的酶的总称, 参与多种核酸代谢过程。

DHH 磷酸酯水解酶不同亚家族间的氨基酸序列保守性很低, 但均具有一个由 3 个连续氨基酸残基 DHH (即天冬氨酸-组氨酸-组氨酸)构成的保守基序(motif), 故统称为 DHH 超家族蛋白。DHH 超家族包含许多水解磷酸二酯键的蛋白, 根据结构

基金项目: 国家自然科学基金(U1832161)

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

收稿日期: 2020-03-20; 修回日期: 2020-05-22; 网络出版日期: 2020-07-08

域的差别可以划分为 3 个亚家族: I 型、II 型、III 型^[2-3]。

RecJ 蛋白最早发现于细菌同源重组过程^[4], 属于 DHH 超家族的 I 型亚家族。细菌 RecJ 蛋白具有单链 DNA 特异性的 5'-3'外切酶活性^[5-7], 因此被命名为 RecJ 核酸酶。RecJ 核酸酶广泛存在于细菌。最近发现部分古菌编码一个或多个细菌 RecJ 核酸酶同源蛋白, 例如詹氏甲烷球菌 *Methanocaldococcus jannaschii* (*M. jannaschii*) 编码 3 个 RecJ 同源蛋白^[8]。但古菌 RecJ 同源蛋白在结构域组成上与细菌的 RecJ 核酸酶明显不同^[5,9], 而与真核来源的 Cdc45 蛋白更为相似^[10]。目前对细菌 *Deinococcus radiodurans* (*D. radiodurans*)^[11]、*Thermus thermophilus* (*T. thermophilus*)^[5,9] 和古菌 *Pyrococcus furiosus* (*P. furiosus*)^[12], *Thermococcus kodakarensis* (*T. kodakarensis*)^[13] 等原核生物的 RecJ 核酸酶的生化功能和三级结构的认识较为清楚。

A. fulgidus 是一种极端嗜热古菌, 生长温度范围为 60–95 °C, 最适生长温度为 85 °C, 全基因组序列由美国马里兰基因研究所于 1997 年完成测定^[14]。生物信息学分析表明 *A. fulgidus* 编码 RecJ 核酸酶的 3 个同源蛋白。经初步的活性测定, 仅编号为 AF_0699 的 RecJ 蛋白显示出体外的核酸酶活性。而 AF_0735 本身在大肠杆菌中主要以包涵体形式表达, 仅纯化到极少量可溶性蛋白, 未检测到明显的核酸酶活性; 同时 AF_0075 也未显示出明显的核酸酶活性, 且 AF_0075 和其他两个 RecJ 蛋白的序列相似性较低。因此, 为进一步研究古菌中的 RecJ 核酸酶的生物功能, 本文首先选取 *A. fulgidus* 菌株编码的一个 RecJ 核酸酶 (AF_0699), 对其体外核酸酶活性进行了核酸酶活性测定和酶学特性表征。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验所用的 *A. fulgidus* 基因组 DNA 源自美国 ATCC。大肠杆菌菌株 DH5 α 、Rosetta (DE3) 感受态细胞购自北京全式金公司。用于构建表达载体的引物和测定核酸酶活性的损伤寡核苷酸底物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 底物序列见表 1。本实验中所用到的 PrimeSTAR DNA 聚合酶、Nde I 和 Hind III 限制性内切酶、DNA Ladder、蛋白 Marker 购自 TaKaRa 公司, ClonExpress II 一步克隆试剂盒购自诺唯赞公司。PCR 产物纯化和胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。Ni-NTA 蛋白纯化树脂为 Bio-Rad 公司产品。

1.2 表达载体构建

以 *A. fulgidus* 基因组 DNA 作为模板, 利用 PrimeSTAR DNA 聚合酶 PCR 扩增 *recJ* 基因。正向引物序列为 5'-TGCCGCGCGGCAGCCCATATG AGTTCGGGCTCGGCAAT-3', 反向引物序列为 5'-TCGAGTGC GGCCGC AAGCTTCTAAGCGAGCATGGCACAGC-3' (带下划线斜体碱基表示酶切位点)。PCR 扩增条件为 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min。PCR 产物经纯化试剂盒纯化。用 Nde I 和 Hind III 消化 pET28a 质粒, 将其线性化, 作为重组法基因克隆的质粒底物。用一步重组克隆试剂盒连接 *recJ* 基因片段和线性化的 pET28a 质粒, 取 10 μ L 反应产物转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取单克隆培养, 菌落 PCR 鉴定阳性克隆, 并进行 DNA 序列测定, 确定 AfuRecJ 核酸酶的基因序列准确无误, 最终获得表达载体 pET28a-AF0699。

表 1. 分析 AfuRecJ 核酸酶活性的寡核苷酸序列

Table 1. Oligonucleotides and oligodeoxynucleotides used for analyzing AfuRecJ nuclease activity

Number	Sequences (5'→3')	Figures
DD286	*TCCGATAGCCAGATATCTTGACA	1, 2
DD286	*TCCGATAGCCAGATATCTTGACA	
JL510	*uccgauagccagauaucuugacu	3
DD305	*TCCGATAGCCAGATATCTTGACA	4
DD306	TCCGATAGCCAGATATCTTGACA*	
DD264	*csasgscscsasgsusgsuscsuscsascsu	5
DD265	asgscscsgsascsuscsascsascsasgsu*	
DD286	*TCCGATAGCCAGATATCTTGACA	6
DD297	*TCCGATAGCCAGATATCTTGACAp	
DD247	*cggagaugacgg	7
DD256	*cggagaugacggp	
DD282	*CGAT	6
DD283	*TCCGAT	
DD284	*TCCGATAGCCAG	7
DD285	*TCCGATAGCCAGATATC	
DD286	*TCCGATAGCCAGATATCTTGACA	7
DD287	*TCCGATAGCCAGATATCTTGTGAGCGTGGG	
DD288	*AGGCTGCGGTTCGAGTTGACAGCACTGCACGCATTACTGAGCT	7
DD289	*CTCCAGTGGTGTTCGGCTCCGATAGCCAGATATCTTGTGACGTGACGTG CGTAATGAC	
DD245	*acgu	7
DD246	*ugacgu	
DD247	*cggagaugacgg	7
DD248	*cgagcggagaugacgg	
DD288	*AGGCTGCGGTTCGAGTTGACAGCACTGCACGCATTACTGAGCT	7
JL1196	AGCTCAGTAATGCGTGCAGTGCTGTCAACTCGACCGCAGCCT	
JL390	TCGAGTCATTACGCTGCAGTGCTGTCAACTCGACCGCAGCCT	7
JL391	TGCAGTGCTGTCAACTCGACCGCAGCCT	
JL392	TTTTAGCTCAGTAATGCGTGCAGTGCTGTCAACTCGACCGCAGCCT	7

*: fluorescent group FAM; s: phosphorothioate modification; p: phosphorylation modification; Uppercase: DNA base; Lowercase: RNA base.

1.3 重组蛋白的诱导表达和纯化

将 AfuRecJ 重组表达载体 pET28a-AF0699 转入大肠杆菌 Rosetta (DE3)感受态细胞中, 挑取单克隆于 LB 液体培养基(含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素)中, 并将菌体逐步扩大培养至 250 mL。待 OD_{600} 达到 0.6–0.8 时, 加入终浓度 0.5 mmol/L 的 IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside, 异丙基硫代半乳糖苷), 20 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h, 诱导重组蛋白表达。8000 r/min 离心 4 min 收集菌体。将菌体沉淀悬浮 30 mL 裂解缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 300 mmol/L NaCl, 10%甘油, 5.0 mmol/L β -巯基乙醇, 1.0 mmol/L PMSF), 置于冰上超声破碎法

裂解菌体: 600 W 功率下超声 3 s, 间歇 3 s, 超声 15 min。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下、10000 r/min 离心 30 min, 收集细胞裂解上清液。预先用 5 倍树脂体积的裂解缓冲液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下平衡 Ni-NTA 树脂 1 h。将上清倒入已平衡好的树脂中, 分别用含有 5、10、20、50 mmol/L 咪唑的裂解缓冲液梯度洗涤树脂, 除去非特异性结合的杂蛋白, 再用 5 mL 洗脱缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 300 mmol/L NaCl, 300 mmol/L 咪唑, 10%甘油, 5.0 mmol/L β -巯基乙醇, 1.0 mmol/L PMSF)洗涤树脂, 分步收集目标蛋白(1 mL/管)。通过 SDS-PAGE 检测纯度后, 利用超滤管离心交换缓冲液, 最终置于储存缓冲

液(20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 100 mmol/L NaCl, 50%甘油)中,于-20 °C 保存。蛋白浓度经 Bradford 法测定。

1.4 AfuRecJ 核酸酶活性鉴定

用于检测 AfuRecJ 核酸酶活性的寡核苷酸片段见表 1,于-20 °C 避光储存。AfuRecJ 核酸酶活性测定反应体系(10 μ L)包括: 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 50 mmol/L NaCl, 2.0 mmol/L $MnCl_2$, 1.0 mmol/L DTT, 100 ng/ μ L BSA, 100 nmol/L 底物和 1.67 μ mol/L 的 AfuRecJ 核酸酶。55 °C 反应 20 min。加入 10 μ L 反应终止液(95%甲酰胺, 100 mmol/L EDTA, 0.2% SDS, 0.02%溴酚蓝)。反应产物于含有 8 mol/L 尿素的 15%变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳,经 Amersham Typhoon RGB 激光成像仪(GE 公司)扫描成像并分析。

2 结果和分析

2.1 AfuRecJ 核酸酶表达纯化、活性鉴定

将表达质粒 pET28a-AF0699 在 *E. coli* Rosetta (DE3)中重组表达 AfuRecJ 蛋白,纯化结果见图 1-A。20 °C 诱导过夜,经镍柱亲和层析纯化,从 250 mL 培养液中得到约 4 mg 的 AfuRecJ 蛋白。经 15% SDS-PAGE 初步检测表明目的蛋白纯度达 90%以上。通过与蛋白分子量标准对比, AfuRecJ 蛋白的单体分子量约为 50.0 kDa,与理论计算值(49.589 kDa)相符(图 1-A)。对其进行体外酶学活性的检测实验,在反应体系中加入梯度稀释的 AfuRecJ, 55 °C 反应 20 min,结果表明 AfuRecJ 具有单链 DNA 核酸酶活性(图 1-B)。

2.2 AfuRecJ 核酸酶活性测定条件的优化

初步鉴定 AfuRecJ 具有核酸酶活性,进一步对其反应条件进行优化,结果如图 2 所示。

AfuRecJ 在 pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲体系中活性最高(图 2-A)。AfuRecJ 酶促反应需要二价金属离子的参与, Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 均可促进 AfuRecJ 的核酸酶活性,其中 Mn^{2+} 促进效果更为明显,其最优浓度是 0.5 mmol/L(图 2-B)。图 2-C 表明, AfuRecJ 在低盐浓度下具有更高的活性,最适反应浓度为 10 mmol/L,当 NaCl 浓度高于 200 mmol/L 时, AfuRecJ 的核酸酶活性显著降低。AfuRecJ 在 65 °C 活性最高,在温度高于 85 °C 后基本失活(图 2-D)。

2.3 AfuRecJ 核酸酶的底物特异性

细菌的 RecJ 核酸酶仅从 5'端水解单链 DNA,而部分古菌 RecJ 同源蛋白能同时水解 DNA 和 RNA^[15-17],故分别利用单链 DNA 和 RNA 作为底物,检测 AfuRecJ 的核糖选择性。结果显示, AfuRecJ 可以水解单链的 DNA 和 RNA,相同条件下对 RNA 的水解活性更强(图 3)。

2.4 AfuRecJ 核酸酶的水解极性

使用全硫代修饰的单链 DNA 和 RNA 作为底物,检测 AfuRecJ 核酸酶的水解极性。图 4-A 两种 DNA 底物长度相同,荧光标记在不同末端(DD305 荧光标记在 5'末端, DD306 荧光标记位于 3'末端)。AfuRecJ 降解 5'末端带有标记的单链 DNA 时产生梯度长度的寡核苷酸,在降解 3'末端标记的 DNA 时只产生 1 nt 的产物。该结果表明, AfuRecJ 对于单链 DNA 的降解是从 3'末端起始的。图 4-B 中 RNA 底物的荧光基团同样是标记在单链 RNA 的不同末端, AfuRecJ 对于两种标记的单链 RNA 都能降解产生梯度长度的产物片段,表明 AfuRecJ 可从两端降解单链 RNA,且 3'-5'外切酶活性明显高于 5'-3'外切酶活性。因此,对于单链 DNA 底物, AfuRecJ 是 3'外切酶;对于单链 RNA 底物, AfuRecJ 主要表现为 3'外切酶,同时具有微弱的 5'外切酶活性。

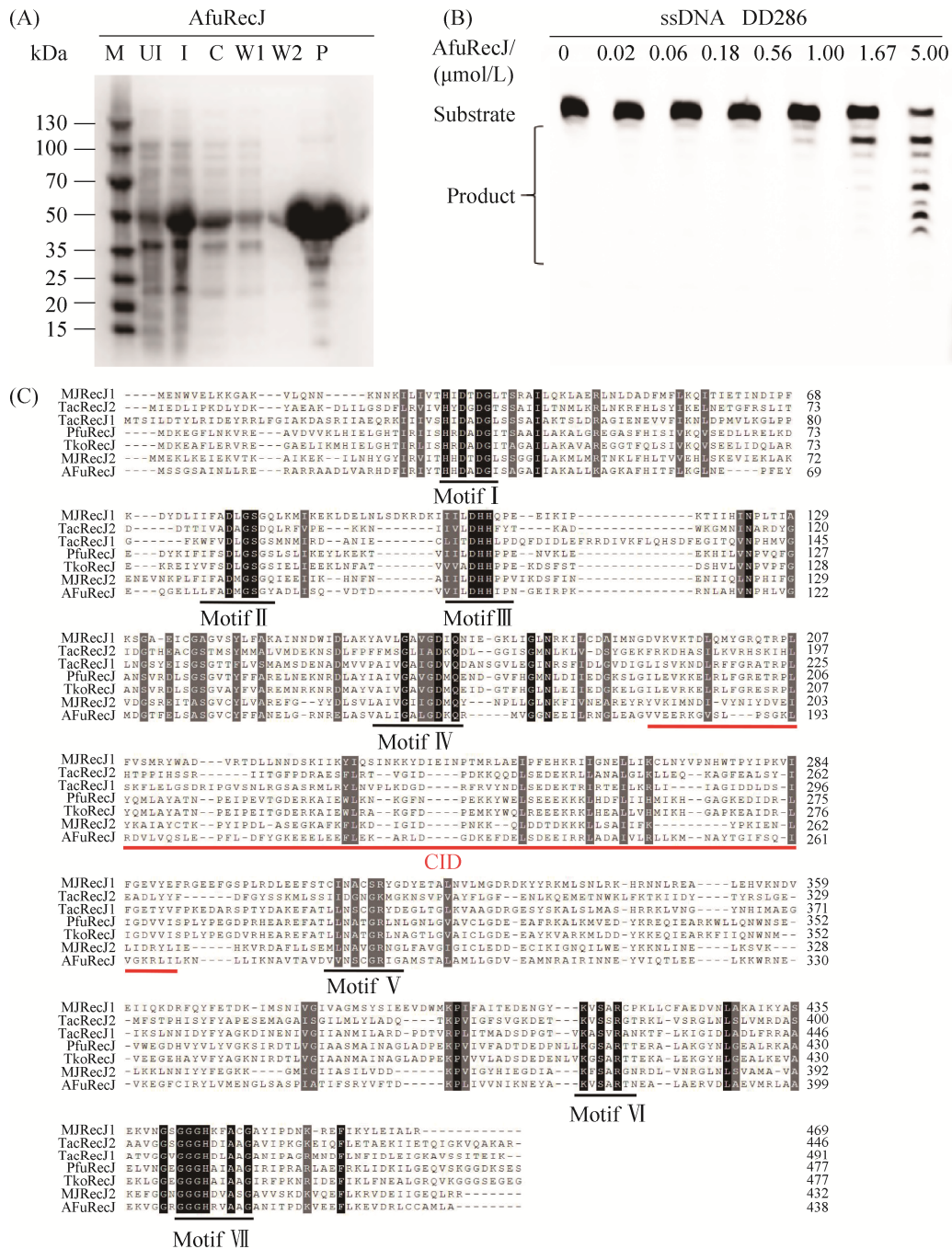


图 1. AfuRecJ 表达纯化及活性测定

Figure 1. Expression and purification of AfuRecJ and activity titration. A: 15% SDS-PAGE analysis of recombinant AfuRecJ recovered from induced *E. coli* cells. The gel was stained with Coomassie blue R-250. Lane M: molecular weight marker; lane I and UI: induced and uninduced *E. coli* total proteins; lane C: supernatant after centrifugation; lane W1 and W2: wash through buffer B with 5.0 mmol/L and 50 mmol/L of imidazole; lane P: purified recombinant AfuRecJ. B: activity titration of AfuRecJ. The reaction mixtures contained 100 nmol/L ssDNA substrate, and increasing AfuRecJ in reaction buffer consisted of 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 50 mmol/L NaCl, 2.0 mmol/L $MnCl_2$, 1.0 mmol/L DTT and 100 ng/ μ L BSA. The reactions were performed at 55 °C for 20 min. C: multi-alignment of different archaeal RecJs. The conserved motifs are marked by black lines, and the domain of CID (CMG Interaction Domain) is highlighted with the red line.

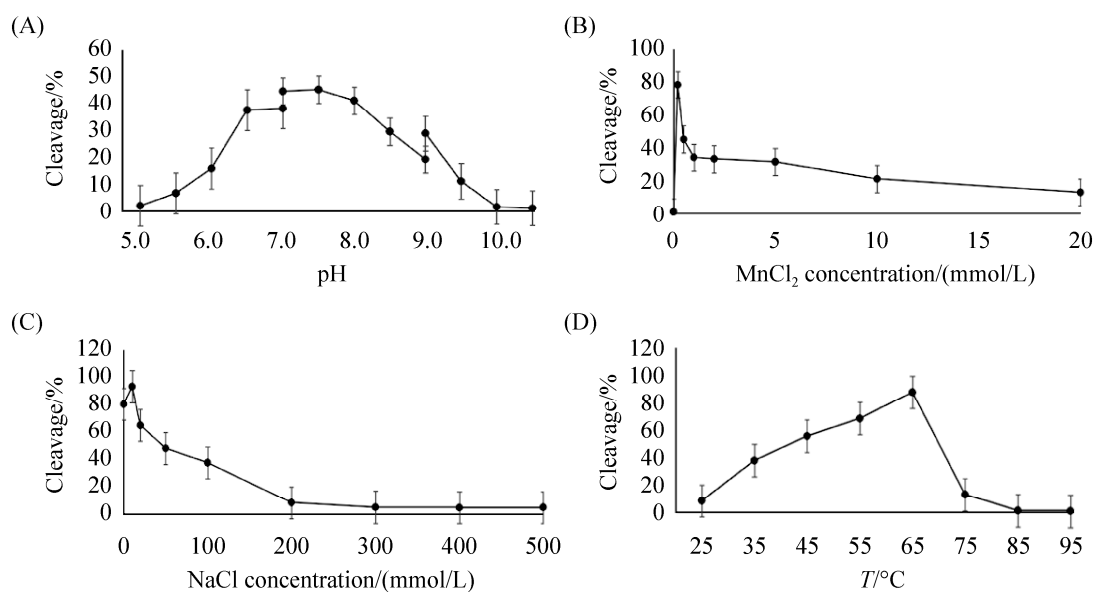


图 2. AfuRecJ 水解单链 DNA 反应条件优化

Figure 2. Optimization of ssDNA hydrolysis by AfuRecJ. pH value (A), concentration of divalent manganese ion (B), ion strength (C), and reaction temperature (D) were optimized for the nuclease activity of AfuRecJ using a 23 nt single-stranded DNA (ssDNA) as substrate (100 nmol/L). The degraded amount of substrate DNA was quantified and plotted vs. each effect factor.

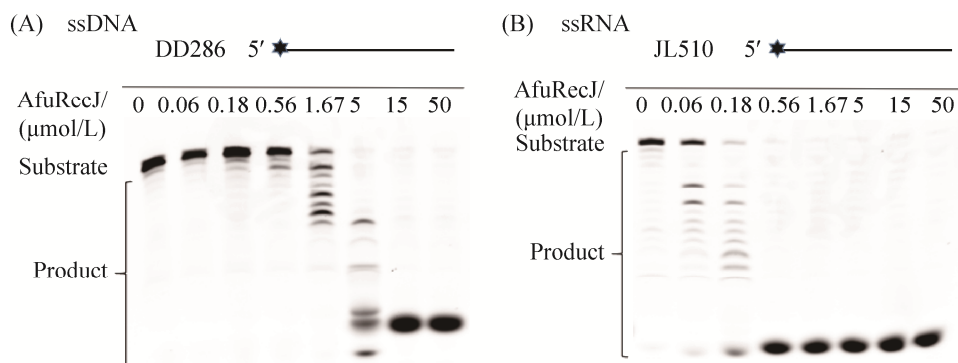


图 3. AfuRecJ 核酸酶的核糖选择性

Figure 3. Preferences for oligoribonucleotides of AfuRecJ nuclease. Reactions were performed at 55 °C by incubating increasing concentration of AfuRecJ with 100 nmol/L 5'-FAM-labeled 23 nt ssDNA (A) or ssRNA (B), respectively.

2.5 底物末端基团磷酸化对 AfuRecJ 核酸酶活性的影响

使用 3'末端磷酸化修饰的单链 DNA 和 RNA 作为底物, 检测其对 AfuRecJ 核酸酶水解活性的

影响。对于单链 DNA 底物, 底物 3'末端磷酸化对其活性有微弱的抑制作用(图 5-A)。对于单链 RNA 底物, 底物 3'末端的磷酸化对其核酸酶活性的抑制作用较为明显(图 5-B)。

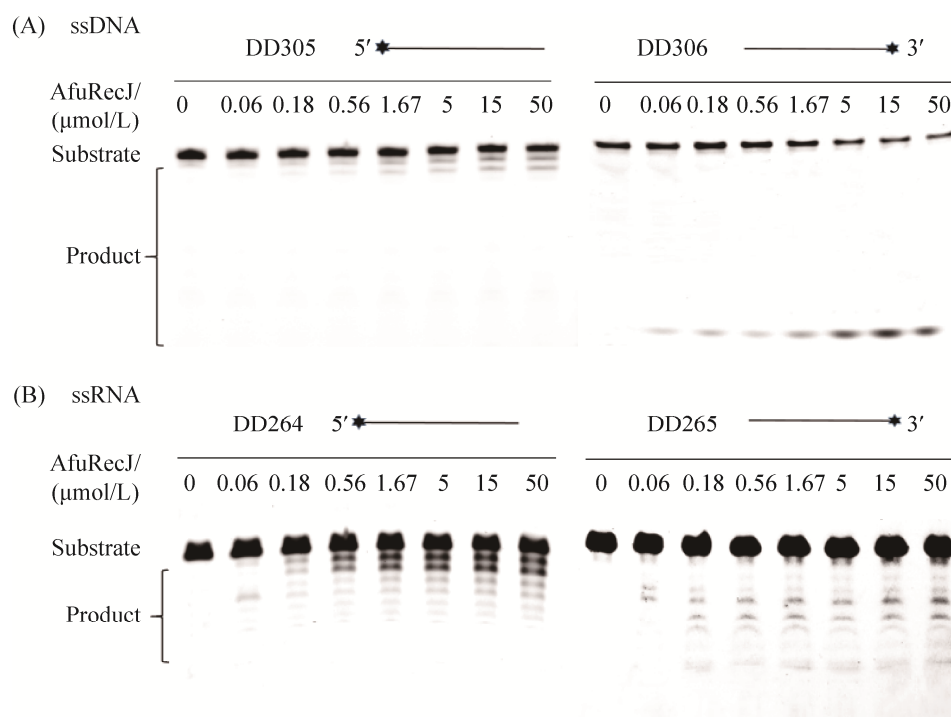


图 4. AfuRecJ 核酸酶的水解极性

Figure 4. Hydrolysis polarity of oligonucleotides and oligodeoxynucleotide by AfuRecJ nuclease. AfuRecJ was incubated with 100 nmol/L fully phosphothioate-modified 23 nt ssDNA (A) or 17 nt ssRNA (B) labeled with a fluorescence group FAM at 5'- or 3'-end, respectively.

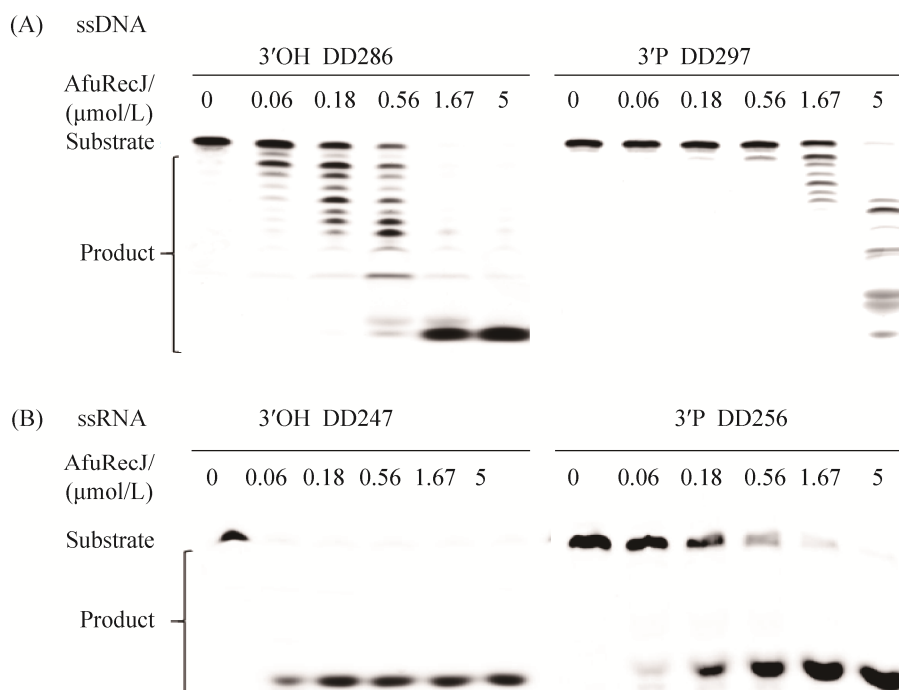


图 5. 3'末端磷酸化对 AfuRecJ 核酸酶活性的影响

Figure 5. The effect of the 3'-terminal phosphate group on the AfuRecJ nuclease activity. AfuRecJ was incubated with 100 nmol/L 5'-FAM-labeled 23 nt ssDNA (A) or 12 nt ssRNA (B) which has a phosphate or hydroxyl group at 3'-end, respectively.

2.6 AfuRecJ 核酸酶水解底物长度的偏好性

AfuRecJ 对不同长度的底物水解活性也不同。对于单链 DNA 底物而言, AfuRecJ 不能有效水解长度小于等于 6 nt 的底物, 对于长度为 12–42 nt 的底物水解活性较强, 对于长度大于 42 nt 的底物水解活性略有降低(图 6-A)。对于单链 RNA 底物, AfuRecJ 水解活性总体上强于 DNA 底物, 对长度为 4–16 nt 的 RNA 底物水解活性都较强(图 6-B)。

2.7 AfuRecJ 核酸酶对不同结构的 DNA 链的选择性

最后检测了 AfuRecJ 对不同二级结构的 DNA 底物的水解活性 (图 7)。总体上, AfuRecJ 水解单链 DNA 的活性最强。对于 3'端特殊结构的双链 DNA 底物, 水解活性从强到弱的顺序为 3'突出(3'overhang)>3'叉状(3'fork)>>3'平端(3'blunt)=3'凹陷(3'recess), 且对于 3'平端(3'blunt)和凹陷(3'recess)结构基本无活性。

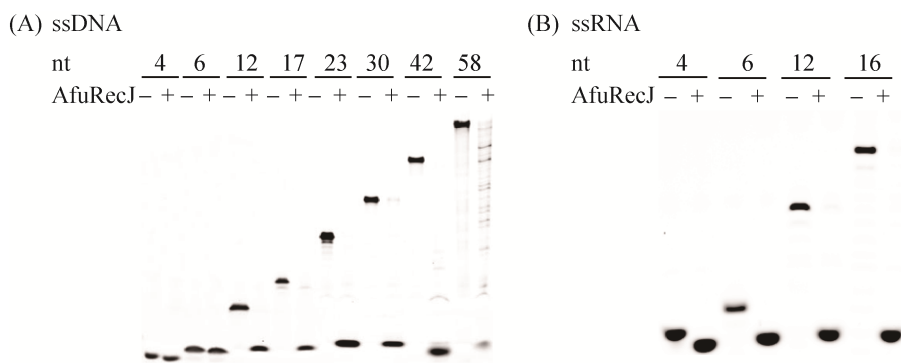


图 6. AfuRecJ 核酸酶对底物长度的偏好性

Figure 6. Substrate length preferences of AfuRecJ. The AfuRecJ (1.67 $\mu\text{mol/L}$) was incubated with 5'-FAM-labeled ssDNA (A) or ssRNA (B) with different lengths at 55 $^{\circ}\text{C}$ for 20 min.

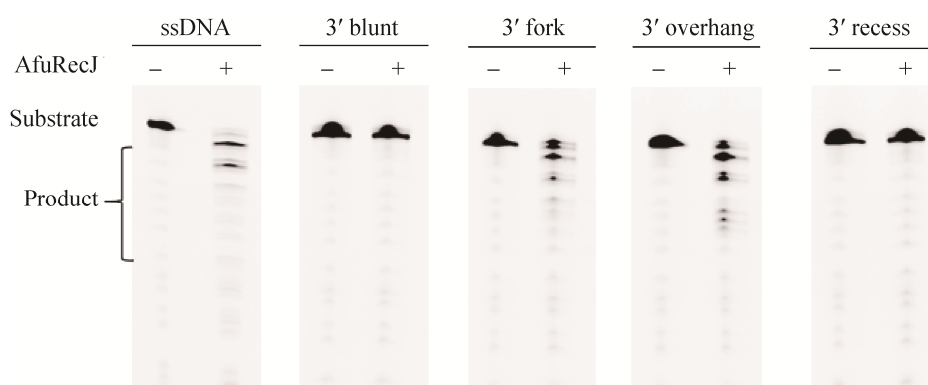


图 7. AfuRecJ 核酸酶对不同二级结构的 DNA 链的选择性

Figure 7. Selectivity of the AfuRecJ on DNA secondary structure. DNA with different secondary structures (single-stranded, forked, overhanged, recessed and blunt) were incubated with 5 $\mu\text{mol/L}$ AfuRecJ at 55 $^{\circ}\text{C}$ for 20 min.

3 讨论

现有研究表明细菌 RecJ 核酸酶仅具有 5'-3' 的单链 DNA 特异性外切酶, 主要参与 DNA 同源重组和错配修复^[4,18]。生物信息学分析结果表明广古菌、奇古菌、初古菌都编码 RecJ 核酸酶同源蛋白, 但泉古菌中没有发现 RecJ 同源蛋白。同时古菌编码 RecJ 核酸酶的数量和酶活性存在显著多样化。部分古菌仅存在一个 RecJ 蛋白, 如嗜热球菌 *P. furiosus* RecJ 和 *T. kodarensis* GAN。PfuRecJ 具有单链 DNA 底物 5'-3' 外切酶、单链 RNA 底物 3'-5' 外切酶两种活性^[15]; 而 TkoGAN 仅检测到单链 DNA 底物 5'-3' 外切酶活性, 未检测到对 RNA 底物的切割活性^[16]。另外部分古菌则含有多个 RecJ 核酸酶。甲烷球菌 *M. jannaschii* 较长的 MjRecJ1 具有 5'-3' 的外切核酸酶活性, 较短的 MjRecJ2 主要表现为 3'-5' 的外切酶活性^[17]。*Thermoplasma acidophilum* (*T. acidophilum*) 较长的 TacRecJ1 具有 ssDNA 特异性的 5'-3' 外切酶活性; 较短的 TacRecJ2 对 ssDNA 与 ssRNA 均为 3'-5' 的外切酶活性, 且偏好 ssRNA 底物^[19]。

与这些已鉴定的古菌 RecJ 核酸酶的酶学特征相比, AfuRecJ 与 TacRecJ2 更为相似。二者都具有依赖于 Mn^{2+} 的 ssDNA 和 ssRNA 依赖性 3'-5' 外切核酸酶活性, 可水解单链 DNA 和 RNA, 对 RNA 的水解活性强于 DNA。虽然 AfuRecJ 也能够从单链 RNA 的 5' 端微弱地水解核苷酸, 但该活性结果可能是由于本文所用单链 RNA 底物的 3' 端的荧光标记阻碍了其从 3' 端降解, 从而使其从 5' 端降解单链 RNA。同时后续研究会继续尝试 AF_0735 在大肠杆菌重组表达, 获得高浓度可溶性蛋白后, 增高反应体系中蛋白浓度, 鉴定其是否具有对 ssDNA 与 ssRNA 的水解活性。

细菌 RecJ 的催化活性主要由 N 端的催化核心(DHH 和 DHHA1 两个结构域)^[9]、C 端的寡核苷酸/寡糖折叠结构域(OB)组成。部分细菌 RecJ 在 C 端还具有一个功能未知的多样化结构域^[5,11]。与细菌的 RecJ 核酸酶相比, 古菌 RecJ 核酸酶在 DHH 结构域的基序 IV 和 V 之间(图 1-C)存在一个类似真核 Cdc45 蛋白所具有的 CID 结构域(CMG interaction domain, CMG 相互作用结构域)^[20]。真核 Cdc45 蛋白的 CID 结构域在真核细胞中参与 MCM 的结合, 与 GINS 蛋白一同形成 Cdc45-MCM-GINS (CMG) 复合物, 该复合物作为复制型解螺旋酶, 对于 DNA 复制的起始起重要作用^[20]。在古菌 PfuRecJ 和 TkoGAN 三级结构的 DHH 和 DHHA1 结构域之间也存在一个独立 CID 结构域^[21]。与真核 Cdc45 蛋白不同的是, PfuRecJ 和 TkoGAN 是通过 DHH 结构域与 GINS 蛋白相互作用, 进而形成 CMG 复合物, 其 CID 结构域的敲除并不影响二者的 RecJ/GAN 与 GINS 形成复合物。古菌 *M. jannaschii* 的两个 RecJ 核酸酶也具有 CID 结构域, 然而二者均不能和 GINS 蛋白形成复合物。而同样具有 CID 结构域的 *T. acidophilum* 的 2 个 RecJ 核酸酶中, 只有 TacRecJ2 可以与 GINS 形成复合物。另外泉古菌门的硫化叶菌含有和真核生物 Cdc45 类似的蛋白(古菌 Cdc45)。硫化叶菌 Cdc45、MCM、GINS 形成类似真核生物的 CMG 复合物, 在 DNA 复制中行使 DNA 解螺旋酶功能^[22]。古菌的 RecJ 蛋白普遍具有核酸酶活性, 而真核和古菌的 Cdc45 蛋白则不具有核酸酶活性^[20,22]。虽然 AfuRecJ 核酸酶中也存在类似的 CID 结构域(图 1-C), 但生信序列分析并未发现 *A. fulgidus* 中有 GINS 蛋白, 导致无法鉴定 AfuRecJ 与 GINS 是否形成复合物。我们将在后续研究中寻找 *A. fulgidus* GINS 蛋白的替

代蛋白, 研究其与 AfuRecJ 的相互作用。

本研究阐明了 AfuRecJ 在体外的生化功能和酶学特征, 对于其体内功能的鉴定还需要进一步的实验证明。后期将从其晶体结构角度解析优先水解单链 RNA 的催化机制, 以及鉴定 GINS 蛋白的功能同源蛋白, 并验证其是否参与形成 MCM-GINS-RecJ 复合物及其功能。鉴于古菌 RecJ 通常能够同时水解 DNA 和 RNA, 可能参与 RNA 代谢, 因此对于 *A. fulgidus* RecJ 核酸酶的研究有利于深入理解古菌的 DNA 复制与损伤修复以及 RNA 加工成熟与降解循环机制。

参 考 文 献

- [1] Yang W. Nucleases: diversity of structure, function and mechanism. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2011, 44(1): 1–93.
- [2] Dianov G, Lindahl T. Reconstitution of the DNA base excision-repair pathway. *Current Biology*, 1994, 4(12): 1069–1076.
- [3] Makarova KS, Koonin EV, Kelman Z. The CMG (CDC45/RecJ, MCM, GINS) complex is a conserved component of the DNA replication system in all archaea and eukaryotes. *Biology Direct*, 2012, 7(1): 7.
- [4] Thoms B, Borchers I, Wackernagel W. Effects of single-strand DNases ExoI, RecJ, ExoVII, and SbcCD on homologous recombination of *recBCD*⁺ strains of *Escherichia coli* and roles of SbcB15 and XonA2 ExoI mutant enzymes. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(1): 179–192.
- [5] Wakamatsu T, Kitamura Y, Kotera Y, Nakagawa N, Kuramitsu S, Masui R. Structure of RecJ exonuclease defines its specificity for single-stranded DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(13): 9762–9769.
- [6] Suter VA Jr, Han ES, Rajman LA, Lovett ST. Mutational analysis of the RecJ exonuclease of *Escherichia coli*: identification of phosphoesterase motifs. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(19): 6098–6102.
- [7] Yamagata A, Masui R, Kakuta Y, Kuramitsu S, Fukuyama K. Overexpression, purification and characterization of RecJ protein from *Thermus thermophilus* HB8 and its core domain. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(22): 4617–4624.
- [8] Rajman LA, Lovett ST. A thermostable single-strand DNase from *Methanococcus jannaschii* related to the RecJ recombination and repair exonuclease from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(3): 607–612.
- [9] Yamagata A, Kakuta Y, Masui R, Fukuyama K. The crystal structure of exonuclease RecJ bound to Mn²⁺ ion suggests how its characteristic motifs are involved in exonuclease activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(9): 5908–5912.
- [10] Pellegrini L. Structural insights into Cdc45 function: was there a nuclease at the heart of the ancestral replisome? *Biophysical Chemistry*, 2017, 225: 10–14.
- [11] Cheng KY, Xu H, Chen XY, Wang LY, Tian B, Zhao Y, Hua YJ. Structural basis for DNA 5'-end resection by RecJ. *eLife*, 2016, 5: e14294.
- [12] Li MJ, Yi GS, Yu F, Zhou H, Chen JN, Xu CY, Wang FP, Xiao X, He JH, Liu XP. The crystal structure of *Pyrococcus furiosus* RecJ implicates it as an ancestor of eukaryotic Cdc45. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(21): 12551–12564.
- [13] Oyama T, Ishino S, Shirai T, Yamagami T, Nagata M, Ogino H, Kusunoki M, Ishino Y. Atomic structure of an archaeal GAN suggests its dual roles as an exonuclease in DNA repair and a CMG component in DNA replication. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(19): 9505–9517.
- [14] Klenk HP, Clayton RA, Tomb JF, White O, Nelson KE, Ketchum KA, Dodson RJ, Gwinn M, Hickey EK, Peterson JD, Richardson DL, Kerlavage AR, Graham DE, Kyrpides NC, Fleischmann RD, Quackenbush J, Lee NH, Sutton GG, Gill S, Kirkness EF, Dougherty BA, McKenney K, Adams MD, Loftus B, Peterson S, Reich CI, McNeil LK, Badger JH,

- Glodek A, Zhou LX, Overbeek R, Gocayne JD, Weidman JF, McDonald L, Utterback T, Cotton MD, Spriggs T, Artiach P, Kaine BP, Sykes SM, Sadow PW, D'Andrea KP, Bowman C, Fujii C, Garland SA, Mason TM, Olsen GJ, Fraser CM, Smith HO, Woese CR, Venter JC. The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature*, 1997, 390(6658): 364–370.
- [15] Yuan H, Liu XP, Han Z, Allers T, Hou JL, Liu JH. RecJ-like protein from *Pyrococcus furiosus* has 3'-5' exonuclease activity on RNA: implications for proofreading of 3'-mismatched RNA primers in DNA replication. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(11): 5817–5826.
- [16] Li Z, Pan M, Santangelo TJ, Chemnitz W, Yuan W, Edwards JL, Hurwitz J, Reeve JN, Kelman Z. A novel DNA nuclease is stimulated by association with the GINS complex. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(14): 6114–6123.
- [17] Yi GS, Song Y, Wang WW, Chen JN, Deng W, Cao WG, Wang FP, Xiao X, Liu XP. Two archaeal RecJ nucleases from *Methanocaldococcus jannaschii* show reverse hydrolysis polarity: implication to their unique function in Archaea. *Genes*, 2017, 8(9): 211.
- [18] Burdett V, Baitinger C, Viswanathan M, Lovett ST, Modrich P. *In vivo* requirement for RecJ, ExoVII, ExoI, and ExoX in methyl-directed mismatch repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(12): 6765–6770.
- [19] Ogino H, Ishino S, Kohda D, Ishino Y. The RecJ2 protein in the thermophilic archaeon *Thermoplasma acidophilum* is a 3'-5' exonuclease that associates with a DNA replication complex. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(19): 7921–7931.
- [20] Simon AC, Sannino V, Costanzo V, Pellegrini L. Structure of human Cdc45 and implications for CMG helicase function. *Nature Communications*, 2016, 7(1): 11638.
- [21] Nagata M, Ishino S, Yamagami T, Ogino H, Simons JR, Kanai T, Atomi H, Ishino Y. The Cdc45/RecJ-like protein forms a complex with GINS and MCM, and is important for DNA replication in *Thermococcus kodakarensis*. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(18): 10693–10705.
- [22] Xu YL, Gristwood T, Hodgson B, Trinidad JC, Albers SV, Bell SD. Archaeal orthologs of Cdc45 and GINS form a stable complex that stimulates the helicase activity of MCM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(47): 13390–13395.

Expression, purification and characterization of RecJ nuclease from *Archaeoglobus fulgidus*

Tianle 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 and purify the RecJ nuclease gene (AF_0699) from *Archaeoglobus fulgidus*, identify and analyze its nuclease activity. [Methods] Recombinant RecJ nuclease (AfuRecJ) was expressed in *E. coli* and purified by affinity chromatography. The enzymatic properties of AfuRecJ nuclease were characterized *in vitro* using synthesized oligo (deoxy) nucleotides as substrate. [Results] AfuRecJ nuclease has a single-stranded DNA specific 3'–5' exonuclease activity, which depends on the divalent metal ions Mn^{2+} or Mg^{2+} , and the catalytic efficiency of Mn^{2+} is significantly higher than that of Mg^{2+} . The optimal reaction temperature is between 55 and 65 °C. The presence of high concentration of NaCl decreases the exonuclease activity of AfuRecJ, and cleavage percentage greatly reduces at 200 mmol/L of NaCl. AfuRecJ shows 3'–5' exonuclease activity on single-stranded RNA, higher than that of single-stranded DNA. The 3' terminal phosphate group inhibits the AfuRecJ nuclease. AfuRecJ has different preferences for substrate length. It can effectively hydrolyze ssRNA ≥ 4 nt, and ssDNA ≥ 12 nt. Moreover, the hydrolysis activity of AfuRecJ on dsDNA with special structure (3' overhang and 3' fork) is similar to that of ssDNA. [Conclusion] The nuclease activity of AfuRecJ depends on the Mn^{2+} and can cleave ssDNA and ssRNA with a preference for RNA substrate.

Keywords: thermophilic archaea, DNA repair, RecJ nuclease, nuclease

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (U1832161)

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

Received: 20 March 2020; Revised: 22 May 2020; Published online: 8 July 2020