



DNA双链退火压力对DNA聚合酶gp5链置换的调控

贾棋 樊秦凯 侯文清 杨晨光 王利邦 王浩 徐春华 李明 陆颖

Control of DNA polymerase gp5 chain substitution by DNA double strand annealing pressure

Jia Qi Fan Qin-Kai Hou Wen-Qing Yang Chen-Guang Wang Li-Bang Wang Hao Xu Chun-Hua
Li Ming Lu Ying

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 70, 158701 (2021) DOI: 10.7498/aps.70.20210707

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7498/aps.70.20210707>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

单分子技术研究T7解旋酶的解旋与换链

T7 helicase unwinding and strand switching investigated via single-molecular technology

物理学报. 2018, 67(11): 118201 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20180501>

用单分子技术研究Sso7d与DNA的相互作用

Interaction between Sso7d and DNA studied by single-molecule technique

物理学报. 2018, 67(14): 148201 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20180630>

聚二甲基硅氧烷微流体中光流控荧光共振能量转移激光

Optofluidic fluorescence resonance energy transfer lasing in a polydimethylsiloxane microfluidic channel

物理学报. 2019, 68(5): 054203 <https://doi.org/10.7498/aps.68.20181696>

脂质体包裹荧光受体方法研究 α -突触核蛋白在磷脂膜上的结构和动态特征

Investigation of structure and dynamics of α -synuclein on membrane by quenchers-in-a-liposome fluorescence resonance energy transfer method

物理学报. 2020, 69(3): 038701 <https://doi.org/10.7498/aps.69.20191607>

基于单分子成像技术研究 λ -DNA分子穿越微米通道端口的电动力学特性

Electrodynamic characteristics of λ -DNA molecule translocating through the microfluidic channel port studied with single molecular fluorescence imaging technology

物理学报. 2020, 69(16): 168202 <https://doi.org/10.7498/aps.69.20200074>

基于DNA自组装的金属纳米结构制备及相关纳米光子学研究

DNA self-assembly-based fabrication of metallic nanostructures and related nanophotonics

物理学报. 2017, 66(14): 147101 <https://doi.org/10.7498/aps.66.147101>

DNA 双链退火压力对 DNA 聚合酶 gp5 链置换的调控*

贾棋¹⁾²⁾ 樊秦凯¹⁾²⁾ 侯文清¹⁾²⁾ 杨晨光¹⁾²⁾ 王利邦¹⁾²⁾
王浩¹⁾²⁾ 徐春华¹⁾ 李明¹⁾²⁾ 陆颖^{1)2)†}

1) (中国科学院物理研究所, 北京 100190)

2) (中国科学院大学, 北京 100049)

(2021 年 4 月 14 日收到; 2021 年 5 月 7 日收到修改稿)

DNA 聚合酶是执行 DNA 复制和修复的重要蛋白, 由于其只能从 5' 向 3' 方向聚合, 所以在聚合双链 DNA 时会有两种模式: 其一是先打开 DNA 双链, 让其暴露出 3'-5' 方向的模板链 (先导链), 然后沿着这条链复制出新链以此置换旧链, 这就是链置换的合成. 另一种是沿着已经置换出的 5'-3' 方向的模板链 (滞后链) 进行延伸合成. T7 噬菌体作为常被研究的模式生物, 其 DNA 聚合酶 gp5 在复制过程中既会参与链置换也会参与延伸合成, 已有的研究报道 gp5 自身独立链置换的能力很弱, 其与 T7 解旋酶 gp4 耦合形成复制体后可以发生快速且持续的链置换, 这一现象的分子机制尚待厘清. 本文通过单分子荧光共振能量转移 (smFRET) 的方法对 gp5 聚合过程的动力学进行了研究, 发现 gp5 在没有外力帮助下时会进入链置换-外切的循环, 导致聚合难以延伸, 调控这一循环的关键则是 DNA 双链退火压力. 进一步的实验表明 gp5 和 gp4 形成复制体后, gp4 辅助 gp5 克服了退火压力从而聚合可以延伸.

关键词: T7 DNA 聚合酶, T7 DNA 解旋酶, 荧光共振能量转移, DNA 双链退火压力

PACS: 87.15.kj, 87.14.G-, 87.14.gf, 87.14.gk

DOI: 10.7498/aps.70.20210707

1 引言

DNA 复制过程中解旋酶和聚合酶会形成一个复制体先解开 DNA 双链让其形成 3'-5' 方向先导链和 5'-3' 方向滞后链. 在先导链上聚合酶聚合的方向和打开 DNA 的方向是一致的, 所以会连续复制并且会置换出滞后链, 这种复制又被称为链置换. 而滞后链上聚合酶聚合的方向与打开 DNA 的方向相反, 只能打开一段再合成一段导致其合成是不连续的进而形成冈崎片段^[1,2]. 由于 DNA 复制机制在各个物种间是高度保守的^[1], 而 T7 噬菌体复

制时所需蛋白非常简单, 仅由 DNA 聚合酶 (gp5)、DNA 解旋酶 (gp4) 及单链结合蛋白 (gp2.5) 组成, 是一个良好的研究模型^[3-5]. 形成复制体后 gp5 聚合酶有着高速合成 DNA 的能力, 其链置换速度在饱和的脱氧核糖三磷酸 (100 $\mu\text{mol/L}$ dNTP) 下可以达到 200 个核苷酸 (nt) 每秒^[6,7]. gp4 作为解旋酶, 其单独解旋速度在饱和脱氧脱氧胸苷三磷酸 (1 mmol/L dTTP) 下只能达到 20 nt 每秒, 远远低于 gp5 的速度^[6-8]. 最近, 冷冻电镜的研究发现, gp5 的前端有一个起到打开 DNA 双链效果的氨基酸二级结构^[9], 也就是说 gp5 自身具有打开双链的能力. 又有报道显示 gp5 如果没有 gp4 的帮助就

* 国家自然科学基金 (批准号: 12090051, 11834018, 12022409)、中国科学院前沿重点研究计划 (批准号: QYZDJ-SSW-SYS014) 和中国科学院青年创新促进会 (批准号: 2017015) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: yinglu@iphy.ac.cn

难以进行链置换^[7,10]. 因此, 聚合酶在先导链上链置换过程的分子机制值得研究.

有研究者通过单分子磁镊的方式对 DNA 双链施加大于 8 pN 的拉力时, gp5 可以持续链置换但是也有持续外切的现象, 而将外力变小, 持续外切的情况就会更加频繁导致 gp5 难以链置换^[11]. 这一结果说明了 gp5 可以独自链置换, 但是新合成的碱基又会被外切掉. 由于技术局限, 磁镊无法在完全没有力作用下 (生理条件下) 对 gp5 的链置换和外切进行测量, 这也留下了疑问: gp5 在无力作用下, 有无一定程度的链置换及外切的现象.

这里我们使用单分子荧光共振能量转移 (smFRET) 的方法在一个没有力的生理条件下, 并在一个接近单核苷酸尺度的分辨率下对 gp5 的链置换动力学进行测量. 本工作发现即使没有外力的帮助, gp5 也可以链置换, 但是链置换到 4 nt 左右后就会回退. 通过突变掉外切活性的蛋白, 证明了这种回退是外切导致的. 为了证明退火压力对 gp5 的影响, 本文使用了纳米张力器的 FRET 方法, 对 DNA 双链施加了一个微小的力^[12,13], 以此来减弱 DNA 双链的退火压力. 施加力后外切的长度减小、链置换的长度提高了. 进一步的实验发现 gp4 和 gp5 形成了复制体后合成速度会有一定升高, 而其最主要的特征是不再有外切的出现. 这说明了 gp4 帮助 gp5 克服了 DNA 的退火压力, 从而减少了 gp5 外切的发生.

2 实验材料与方法

2.1 聚丙烯酰胺电泳凝胶实验步骤

首先配置 12% 聚丙烯酰胺电泳凝胶: 48 g 尿素, 30 mL 40% 丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺 (19:1) 溶液, 10 mL 10 × TBE, H₂O (补足 100 mL), 10% APS 700 μL, TEMED 66 μL. 配置好后在电泳仪上以 400 V 的电压预跑 30 min. 在这一过程中准备电泳的样品, 分别是样品 1: 10 nmol/L DNA; 样品 2: 加入 40 nmol/L DNA, 40 nmol/L gp5, 100 μmol/L dNTP, 1 mmol/L 二硫硫糖醇在 37 °C 水浴反应 1 min 后用 100 mmol/L EDTA 终止反应; 样品 3: 使用 *exo*⁻ gp5, 其余和样品 2 一样; 样品 4: 和样品 2 一样, 但是反应时间为 5 min; 样品 5: 和样品 3 一样, 但是反应时间为 5 min. 然后将 5 个样品加入不同的条带处进行 3 h 的电泳, 最后用凝胶成像仪分析条带位置.

2.2 单分子实验玻片的清洗与修饰

首先使用丙酮、甲醇、食人鱼洗液 (浓硫酸+双氧水) 对玻片进行深度清洁, 接着使用硅烷化试剂进行修饰, 最后使用 100:1 的 mPEG 和 biotin-PEG 进行修饰. 详情可以见参考文献 [14].

2.3 单分子荧光共振能量实验步骤

首先将上述的玻片用双面胶粘成具有不同通道的样品池, 接着加入链酶亲和素连接波片的 biotin-PEG, 然后加入 100 pmol/L DNA, 最后加入 1 nmol/L gp5 和 4 μmol/L dNTP, 收集 Cy3 和 Cy5 的光强信息, 并以此计算荧光转移效率. 对于 gp5 和 gp4 一起加入的实验过程为, 先体外孵育 1 nmol/L gp5, 20 nmol/L gp4 和 100 μmol/L dTTP 形成复合体再加入到样品池中.

2.4 蛋白和缓冲液

gp5 购买于 NEB 公司, *exo*⁻ gp5 购买于 GE health 公司. gp4 按照文献 [15] 的方法纯化得到. dNTP 购买于 Takara 公司. DNA 购买于上海生工公司, 退火的方法详见文献 [16]. 实验时的缓冲体系为: 50 mmol/L NaCl, 20 mmol/L pH 为 7.9 的 Tris 缓冲液, 10 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT.

3 结果与讨论

3.1 外切活性对 gp5 链置换的影响

之前的文献认为持续外切是导致 gp5 无法链置换的原因^[11], 为了直接证明这一点, 本文使用突变了外切活性的 *exo*⁻ gp5 作为对照组实验 (为了区分, 在后续的结果与讨论部分, 把没有突变的野生型 gp5 写作 *exo*⁺ gp5), 并建立了如图 1(a) 所示的 DNA, 其引物链末端标记了 Alexa488, 而变性聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 被用来分离这些引物链, 最后使用 488 nm 激光照明就可以特异性地得到引物链的长度, 进而得知 DNA 聚合酶的链置换情况. 通过对比 *exo*⁺ gp5 和 *exo*⁻ gp5 反应产物, 从图 1(b) 电泳结果的第 3 道中可以发现在 1 min 的时间内 *exo*⁻ gp5 大部分产物都被全部链置换了, 只有极少数留在原来的位置, 相反的是, 在图 1(b) 电泳结果的第 2 道中 *exo*⁺ gp5 只有极少数全部被链置换. 不仅如此, *exo*⁺ gp5 还外切了一些原有

DNA. 通过在图 1(b) 电泳结果第 4 道和第 5 道中展示的延长反应时间后的结果可以发现: 所有 $\text{exo}^- \text{gp5}$ 都全部合成了, 但是 $\text{exo}^+ \text{gp5}$ 仍然只有很少的全长延伸产物. 从聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 的结果可以得知, $\text{exo}^+ \text{gp5}$ 是一个双向的马达, 它既可以链置换也可以外切, 但是由于外切活性的存在导致了其链置换能力很弱, 甚至会把原有的 DNA 外切的更短. 而如果突变了外切活性, $\text{exo}^- \text{gp5}$ 可以独立的打开 DNA 双链并进行合成. 由于 PAGE 实验只展示了最后的结果, 无法看到 $\text{exo}^+ \text{gp5}$ 在链置换与外切中切换的动态过程, 也就无法测量 $\text{exo}^+ \text{gp5}$ 单次链置换和外切的长度和速度, 所以我们使用了单分子荧光共振能量转移的方法 [17,18] 来实时观测其转化的方式和原因.

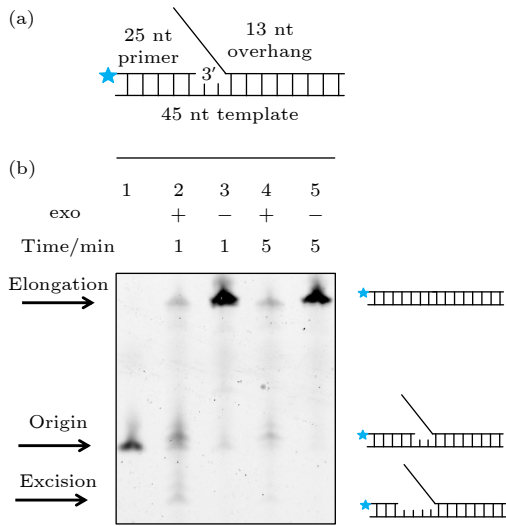


图 1 $\text{exo}^+ \text{gp5}$ 和 $\text{exo}^- \text{gp5}$ 的 PAGE 实验 (a) 电泳实验的 DNA, 在引物链 5' 端标记有 Alexa488; (b) 对 Alexa488 照明得到的结果: 第 1 个条带为 DNA 的原始长度, 第 2 个条带是 $\text{exo}^+ \text{gp5}$ 合成 1 min 后的结果, 第 3 个条带是 $\text{exo}^- \text{gp5}$ 合成 1 min 后的结果, 第 4 个条带是 $\text{exo}^+ \text{gp5}$ 合成 5 min 后的结果, 第 5 个条带是 $\text{exo}^- \text{gp5}$ 合成 5 min 后的结果

Fig. 1. PAGE assays of $\text{exo}^+ \text{gp5}$ and $\text{exo}^- \text{gp5}$. (a) Illustration of DNA that used in PAGE assays. Alexa488 is labeled on the 5' overhand of primer DNA. (b) Results of various condition. The first lane: Original length of the DNA. The second lane: The synthesis-product of $\text{exo}^+ \text{gp5}$ with 1 minute. The third lane: The synthesis-product of $\text{exo}^- \text{gp5}$ with 1 minute. The fourth lane: The synthesis-product of $\text{exo}^+ \text{gp5}$ with 5 minute. The fifth lane: The synthesis-product of $\text{exo}^- \text{gp5}$ with 5 minute.

3.2 gp5 外切与链置换的动态过程

构建了如图 2(a) 所示的 Y 型 DNA, 通过标记在 DNA 不同单链上的 Cy3 和 Cy5 来进行测量

DNA 聚合酶链置换的长度和速度. 当 DNA 聚合酶打开 DNA 双链时, Cy3 和 Cy5 的距离会变远, 进而导致能量转移效率 FRET 降低, 相反当 DNA 聚合酶回退时, FRET 就会增加. 因为 FRET 和距离的关系为 6 次方, 所以这种方法可以达到 2—3 Å 的精度.

之前报道中发现辅助因子 Trx 会帮助 $\text{exo}^+ \text{gp5}$ 结合 DNA, 进而延长 $\text{exo}^+ \text{gp5}$ 在延伸时的合成长度, 使其从数十 nt 的量级变到数百 nt 的量级 [19]. 图 2(a) 和图 2(b) 展示了不加入 Trx 的对照组实验结果, $\text{exo}^+ \text{gp5}$ 几乎无法链置换, 而从图 2(c) 和图 2(d) 可以看出加入 Trx 后 $\text{exo}^+ \text{gp5}$ 可以打开 DNA 双链进行链置换, 进而使得 FRET 下降, 但是 FRET 下降到一定长度后就会发生回退. 这里我们对曲线中每次下降的长度 (synthesis processivity) 进行统计, 通过拟合可以发现下降长度的分布是单 e 指数分布, 其分布的平均长度 $\langle \text{processivity} \rangle = 0.26 \pm 0.03$ (图 2(g)). 根据文献 [17] 结果在不加力时 $\Delta \text{FRET} = 0.07$ 约为 1 nt, 也就可以将下降的平均长度换算为约 3.7 个核苷酸. 在之前的工作 [11] 中认为只有大于 8 pN 才有合成的出现, 而在 4 pN 时只有外切被发现, 这可能是其精度所限导致的, 无法看到这种短片段的链置换. 本工作进一步对其链置换速度进行分析 (链置换长度/时间), 发现其速度即使在低浓度 dNTP (4 $\mu\text{mol/L}$) 也可以达到 8 nt/s (图 4(d)), 这些现象说明 $\text{exo}^+ \text{gp5}$ 独自链置换的速度是很快, 但是容易回退. 为了直接研究这种回退到底是什么导致的, 采用突变了外切结构域的 $\text{exo}^- \text{gp5}$ 作为对照组进行了 smFRET 实验, 从图 2(e) 和图 2(f) 可以发现在 $\text{exo}^- \text{gp5}$ 的实验中几乎就没有回退的现象, 这说明了回退的确是外切导致的. 之前的单分子文献发现了 DNA 聚合酶在链置换时有持续外切的现象, 但是由于都是在施加外力的情况下发现的, 所以可能无法证实没有力的情况下是否还有持续外切 [11,20,21]. 我们对曲线中每次回退的长度 (excision processivity) 进行了统计, 从图 2(h) 的拟合可以发现其长度的分布也是单 e 指数衰减的, 平均长度为 0.24 ± 0.03 , 换算后就是在 3.4 nt 左右, 这一现象验证了即使没有外力的介入, $\text{exo}^+ \text{gp5}$ 在链置换时也有持续外切的现象. 通过这些实验可以发现, gp5 链置换到 4 nt 左右时, $\text{exo}^+ \text{gp5}$ 就开始外切, 而由于链置换和外切的长度差不多,

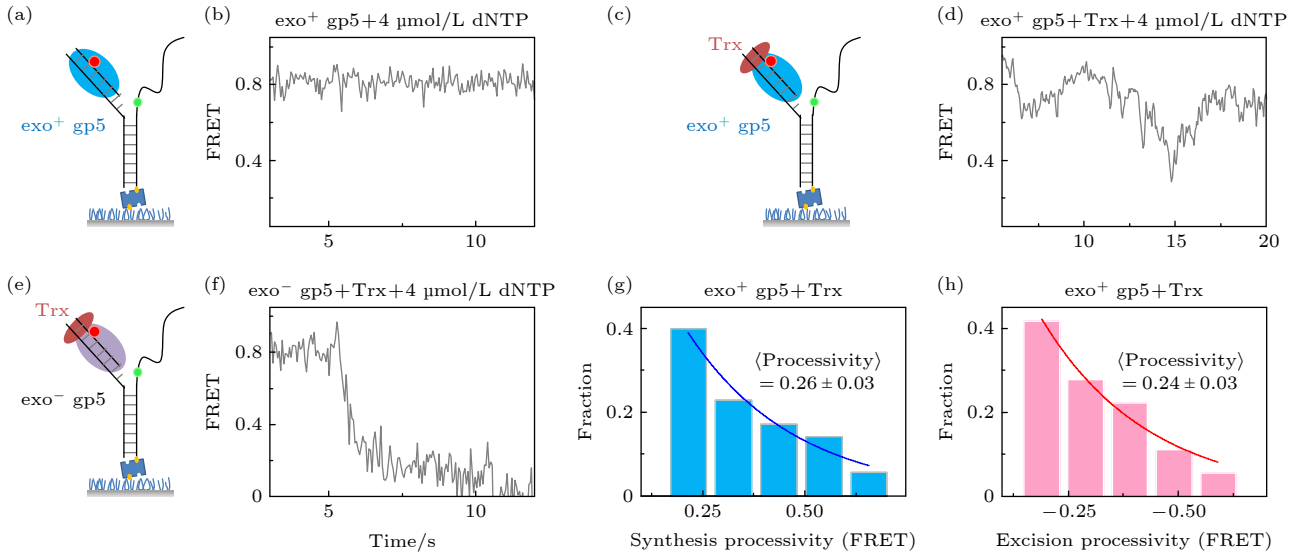


图2 T7 DNA 聚合酶 gp5 不断重复链置换和外切 (a), (b) 没有结合辅助因子 Trx 时聚合酶无法链置换 DNA 双链; (c), (d) 有辅助因子 Trx 时聚合酶能够部分链置换 DNA, 但是会回退; (e), (f) 外切活性突变后的 gp5 不会再外切; (g) exo^+ gp5 + Trx 实验中合成长度的统计图, 其分布满足单 e 指数; (h) exo^+ gp5 + Trx 实验中外切长度的统计图, 其分布满足单 e 指数

Fig. 2. T7 DNA polymerase gp5 repeats in synthesis-excision cycle: (a), (b) exo^+ gp5 cannot have displacement synthesis without co-factor Trx; (c), (d) gp5 with Trx repeats in synthesis-excision cycle; (e), (f) exo^- gp5 attain full-length displacement synthesis without excision; (g) histogram of synthesis processivity from assay of exo^+ gp5 + Trx, the distribution is well fit by an exponential; (h) histogram of excision processivity from assay of exo^+ gp5 + Trx, the distribution is well fit by an exponential.

聚合酶此时进入了链置换-外切的循环中无法真正的进行链置换. 本文也发现如果外切活性突变后, 聚合酶就可以一直链置换, 但是没有了外切活性, 聚合酶的复制保真度会大大降低, 导致生命复制的错误率增加.

3.3 力对野生型 gp5 链置换长度的影响

通常认为聚合酶的外切功能只会切除错误的核苷酸, 而 exo^+ gp5 只有万分之一的概率插入错误的核苷酸^[22], 所以链置换过程中的外切不全是错误导致的. 上面的实验发现外切是要 exo^+ gp5 链置换到一定程度后才会明显出现的, 链置换的过程伴随的是旧双链退火压力. 为了证明是力改变了 exo^+ gp5 的模式, 我们通过图 3(a) 所示的纳米张力器来研究力对外切的影响. 纳米张力器的原理是通过一段弯曲的双链 DNA 来对需要链置换的 DNA 施加张力, 这个张力大概在 5—6 pN 左右, 而此时根据计算^[12] $\Delta\text{FRET} = 0.11$ 为 1 nt, 也就对实验精度有进一步的提高. 通过实验发现当张力加到 DNA 上后, 聚合酶链置换长度和外切长度仍然是单 e 指数衰减的分布 (图 3(c) 和图 3(d)), 经过换算后, 聚合酶的速度稍微有提高到 9 nt/s (图 3(b) 和图 4(d)), 而外切的平均长度变为 2.9 nt,

比不加力的情况稍微变小, 这意味着外切程度变低了. 另一方面聚合酶的链置换平均长度变为了 4.9 nt, 比不加力变长了, 但是这种变长仍然无法完全链置换, 这说明了在 6 pN 的外力帮助下, gp5 仍然无法克服退火压力的影响.

3.4 解旋酶帮助聚合酶克服了退火压力解旋酶对聚合酶链置换的影响

我们之前的工作发现单独加入 gp4 解旋速度是很慢的^[16], 而单独加入 exo^+ gp5 就无法完全链置换. 为了研究复制体链置换的情况, exo^+ gp5, Trx 和 gp4 以及 dTTP 被体外孵育好后加入到反应池中 (图 4(a)), 通过图 4(b) 所示曲线可发现链置换速度变快了而且也没有外切的出现. 由图 4(d) 可知, 复制体的速度 (14 nt/s) 快于聚合酶单独的速度 (8 nt/s), 而加入 gp4 后最大的特点就是聚合酶不再回退 (图 4(c)). 这说明了聚合酶打开双链后, 由于解旋酶阻挡了退火压力, 聚合酶可以持续链置换而不会外切, 这就使得两者配合在一起, 解旋酶阻挡聚合酶不再外切, 而聚合酶帮助解旋酶打开双链. 这里值得注意的是, 外切对于聚合酶的保真度是有帮助的^[23,24], 在加入 gp4 后不再出现外切, 这虽然提高了合成效率但是可能降低了保真度.

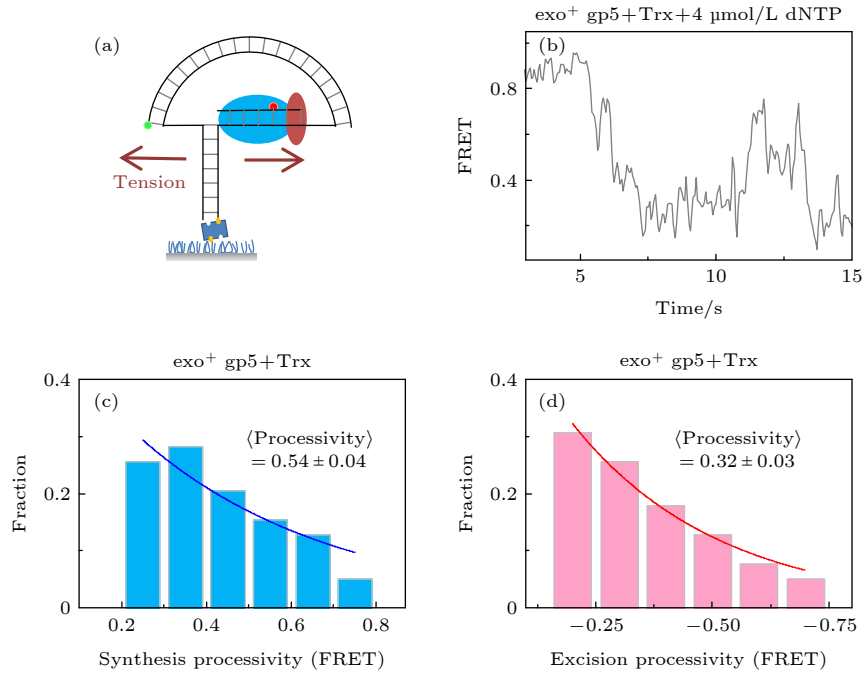


图3 T7 DNA 聚合酶 gp5 外切的原因是退火压力 (a) 纳米张力器示意图; (b) 纳米张力器实验的典型曲线; (c) exo^+ gp5 + Trx 在受力后合成长度的统计图, 其分布满足单 e 指数; (d) exo^+ gp5 + Trx 受力后外切长度的统计图, 其分布满足单 e 指数

Fig. 3. DNA regression pressure induced exonuclease activity: (a) Illustration of nanotensionior; (b) typical trace from assay of nanotensionior; (c) histogram of synthesis processivity from assay of exo^+ gp5 + Trx with tension, the distribution is well fit by an exponential; (d) histogram of excision processivity from assay of exo^+ gp5 + Trx with tension, the distribution is well fit by an exponential.

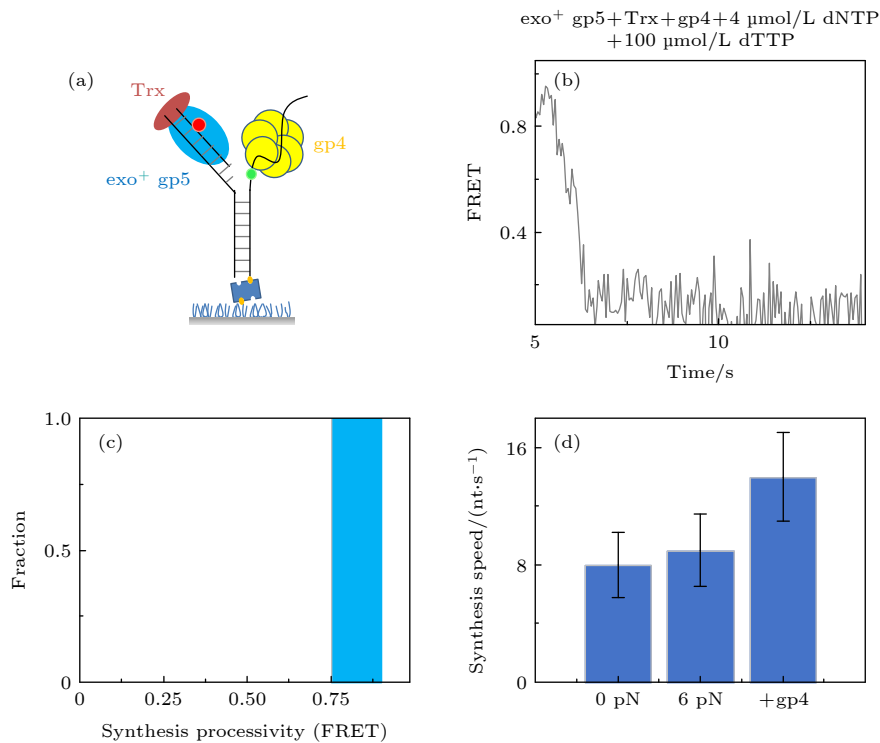


图4 T7 DNA 解旋酶帮助聚合酶克服退火压力 (a) gp4, exo^+ gp5 和 Trx 共同链置换的示意图; (b) gp4, exo^+ gp5 和 Trx 共同链置换时的典型曲线; (c) exo^+ gp5 + Trx + gp4 可以完全链置换; (d) 不同情况的链置换速度

Fig. 4. gp4 decrease DNA regression pressure which facilitate gp5 to attain processive strand-displacement synthesis: (a) Illustration of displacement by gp4, exo^+ gp5 and Trx; (b) typical trace from assay of gp4, exo^+ gp5 and Trx; (c) exo^+ gp5 + Trx + gp4 attain processive synthesis; (d) synthesis speed in various condition.

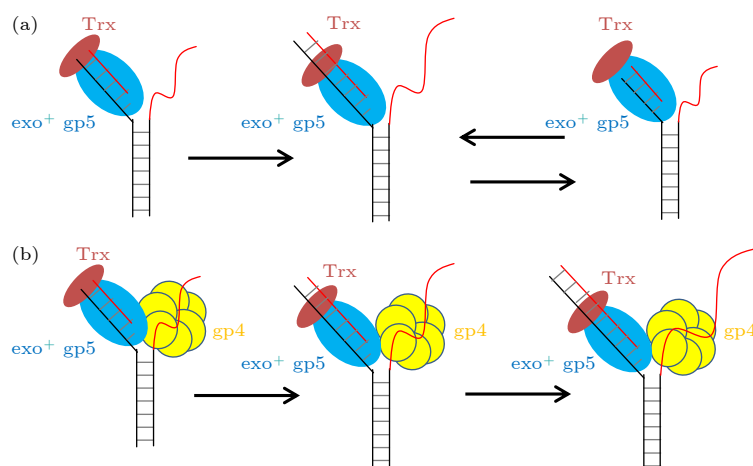


图 5 T7 DNA 聚合酶不同情况链置换时的模型 (a) 野生型 gp5 单独链置换时进入链置换和外切的循环; (b) 野生型 gp5 在 gp4 的帮助下, 没有外切的出现可以持续链置换

Fig. 5. Model for gp5 strand displacement activity in various condition: (a) exo^+ gp5 repeats in synthesis-excision cycle; (b) gp4 facilitate exo^+ gp5 to attain processive strand-displacement synthesis.

3.5 聚合酶链置换的机制

如图 5(a) 所示单独的聚合酶面对 DNA 双链时, 能够打开双链, 但是其合成长度非常的低, 其原因在于退火压力的出现, 这种压力使得聚合酶无法在打开双链后顺利插入核苷酸只能进行外切的反应, 而外切一旦开始就会持续 3—4 nt 左右导致过度外切的出现, 当外切完后聚合酶又进入了链置换模式. 单独的聚合酶就会一直陷入这种聚合-外切循环. 但是有了解旋酶加入后, 如图 5(b) 所示解旋酶帮助聚合酶承受了退火压力, 使得聚合酶可以链置换. 另一方面由于聚合酶打开双链的能力很强, 这也就帮助了解旋酶进行解旋. 这种互相配合使得复制体可以快速的进行链置换.

之前的文献证明聚合酶和解旋酶不是一直同步进行的, 而是会有脱耦的出现^[25]. 这些情况都需要野生型 gp5 本身有一定的链置换能力, 在本实验中发现野生型 gp5 能够独立链置换 4 nt 左右才容易外切, 也就是说野生型 gp5 和 gp4 之间可以存在 4 nt 的脱耦而不影响复制体的合成. 之前我们的工作也发现了 gp4 的解旋甚至有换链的情况^[26], 这种情况也说明了需要野生型 gp5 具有一定的独立链置换能力, 否则 DNA 的复制就会完全停止.

4 结 论

本工作使用 smFRET 的方法发现 gp5 能够独自链置换, 但是其链置换 4 个核苷酸后就会由于退火压力的影响, 进而外切核苷酸. 有趣的是这种

外切是有持续性的, 过度的外切会降低合成的效率. 当对 DNA 施加力来抵抗退火压力后, gp5 合成的会变长, 外切会变短, 这说明了 gp5 的外切活性是受力调控的, 力越大越不容易出现外切. 而加入解旋酶后, 帮助聚合酶克服了退火压力, 使得聚合酶可以一直合成核苷酸. 这种独特的模式使得 gp5, gp4 的协同下可以快速的进行链置换.

参考文献

- [1] Benkovic S J, Valentine A M, Salinas F 2001 *Annu. Rev. Biochem.* **70** 181
- [2] O'Donnell M 2006 *J. Biol. Chem.* **281** 10653
- [3] Pandey M, Syed S, Donmez I, Patel G, Ha T, Patel S S 2009 *Nature* **462** 940
- [4] Sun B, Pandey M, Inman J T, Yang Y, Kashlev M, Patel S S, Wang M D 2015 *Nat. Commun.* **6** 10260
- [5] Kath J E, Jergic S, Heltzel J M, Jacob D T, Dixon N E, Sutton M D, Walker G C, Loparo J J 2014 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111** 7647
- [6] Nandakumar D, Pandey M, Patel S S 2015 *Elife* **4** e06562
- [7] Pandey M, Patel S S 2014 *Cell Rep.* **6** 1129
- [8] Syed S, Pandey M, Patel S S, Ha T 2014 *Cell Rep.* **6** 1037
- [9] Gao Y, Cui Y, Fox T, Lin S, Wang H, de Val N, Zhou Z H, Yang W 2019 *Science* **363** eaav7003
- [10] Stano N M, Jeong Y J, Donmez I, Tummalapalli P, Levin M K, Patel S S 2005 *Nature* **435** 370
- [11] Manosas M, Spiering M M, Ding F, Bensimon D, Allemand J F, Benkovic S J, Croquette V 2012 *Nucleic Acids Res.* **40** 6174
- [12] Lin W, Ma J, Nong D, Xu C, Zhang B, Li J, Jia Q, Dou S, Ye F, Xi X, Lu Y, Li M 2017 *Phys. Rev. Lett.* **119** 138102
- [13] Ma J B, Jia Q, Xu C H, Li J H, Huang X Y, Ma D F, Li M, Xi X G, Lu Y 2018 *J. Phys. Chem. B* **122** 5790
- [14] Huang X Y, Sui M Y, Hou W Q, Li M, Lu Y, Xu C H 2020 *Acta Phys. Sin.* **69** 208706 (in Chinese) [黄星樾, 隋明宇, 侯文]

- 清, 李明, 陆颖, 徐春华 2020 *物理学报* **69** 208706]
- [15] Kim D E, Narayan M, Patel S S 2002 *J. Mol. Biol.* **321** 807
- [16] Ma J B, Chen Z, Xu C H, Huang X Y, Jia Q, Zou Z Y, Mi C Y, Ma D F, Lu Y, Zhang H D, Li M 2020 *Nucleic Acids Res.* **48** 3156
- [17] Schwartz J J, Quake S R 2009 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106** 20294
- [18] Ha T 2001 *Methods* **25** 78
- [19] Etson C M, Hamdan S M, Richardson C C, van Oijen A M 2010 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107** 1900
- [20] Ibarra B, Chemla Y R, Plyasunov S, Smith S B, Lazaro J M, Salas M, Bustamante C 2009 *EMBO J.* **28** 2794
- [21] Hoekstra T P, Depken M, Lin S N, Cabanas-Danes J, Gross P, Dame R T, Peterman E J G, Wuite G J L 2017 *Biophys. J.* **112** 575
- [22] Johansson E, Dixon N 2013 *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5** a012799
- [23] Derbyshire V, Freemont P S, Sanderson M R, Beese L, Friedman J M, Joyce C M, Steitz T A 1988 *Science* **240** 199
- [24] Lam W C, Van der Schans E J, Joyce C M, Millar D P 1998 *Biochemistry* **37** 1513
- [25] Graham J E, Mariani K J, Kowalczykowski S C 2017 *Cell* **169** 1201
- [26] Chen Z, Ma J-B, Huang X Y, Jia Q, Xu C H, Zhang H D, Lu Y 2018 *Acta Phys. Sin.* **67** 118201 (in Chinese) [陈泽, 马建兵, 黄星樨, 贾棋, 徐春华, 张慧东, 陆颖 2018 *物理学报* **67** 118201]

Control of DNA polymerase gp5 chain substitution by DNA double strand annealing pressure*

Jia Qi¹⁾²⁾ Fan Qin-Kai¹⁾²⁾ Hou Wen-Qing¹⁾²⁾ Yang Chen-Guang¹⁾²⁾
 Wang Li-Bang¹⁾²⁾ Wang Hao¹⁾²⁾ Xu Chun-Hua¹⁾
 Li Ming¹⁾²⁾ Lu Ying^{1)2)†}

¹⁾ (*Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China*)

²⁾ (*University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

(Received 14 April 2021; revised manuscript received 7 May 2021)

Abstract

DNA polymerase is essential for DNA replication and repair. As it only performs the 5'-3' polymerization, there are two kinds of DNA replication. One of them is called strand-displacement synthesis: DNA polymerase opens the double-strand (ds) DNA to attain the 3'-5' strand (leading strand) and copy this template in a continuous way, and the other is extension synthesis: DNA polymerase copies the newly separated 5'-3' strand (lagging strand) in a discontinuous manner. The replication complex of T7 phage is an optimal model to investigate the mechanism of replication because it is only constituted by 4 terms of protein which are DNA helicase gp4, DNA polymerase gp5 with co-factor thioredoxin (Trx), and single-strand (ss) DNA-binding protein gp2.5. The replication complex of T7 encounters both strand-displacement synthesis and extension synthesis. Previous researches reported that gp5 can have rapid extension synthesis but lacks the ability to attain strand-displacement synthesis. It also reported that gp4 translocates on ssDNA at a rapid speed but unwinds dsDNA at a very low speed. However, gp5 and gp4 together can attain rapid and processive strand-displacement synthesis. Although extensively studied, this mechanism remains unclear. Here in this work, the dynamic of strand-displacement synthesis by gp5 is investigated with single-molecule Förster (fluorescence) resonance energy transfer (smFRET). It is found that gp5, without the help of external tension, can open dsDNA but only attain strand-displacement synthesis about 4 base pairs (bp), because its exonuclease activity excises the nascent nucleotides. Therefore gp5 repeats in the synthesis-excision cycle which results in the less production of strand-displacement synthesis. We conduct another control experiment by nano-tensioner, a high precision smFRET setup which can exert a tension on dsDNA, to change the dsDNA regression pressure on gp5. It is observed that reduced dsDNA regression pressure can increase the length of strand-displacement synthesis and reduce the length of excision which indicates that the dsDNA regression pressure can regulate the strand-displacement synthesis of gp5. The further experiment shows that after gp5 and gp4 are assembled into a replisome, it can have a processive strand-displacement synthesis and barely any excision presented. The speed of replisome is a little higher than gp5 alone but much higher than gp4 alone. Additionally, the length of strand-displacement synthesis by replisome is much longer than gp5 alone. Therefore it is indicated that the gp4 can reduce dsDNA regression pressure to enables gp5 to attain processive strand-displacement synthesis. On the other hand, the gp5 facilitates gp4 to unwind the dsDNA.

Keywords: T7 DNA polymerase, T7 DNA helicase, fluorescence resonance energy transfer, DNA regression pressure

PACS: 87.15.kj, 87.14.G-, 87.14.gf, 87.14.gk

DOI: 10.7498/aps.70.20210707

* Project supported by the National Science Foundation of China (Grant Nos. 12090051, 11834018, 12022409), the CAS Key Research Program of Frontier Sciences, China (Grant No. QYZDJ-SSW-SYS014), and the Youth Innovation Promotion Association of CAS (Grant No. 2017015).

† Corresponding author. E-mail: yinglu@iphy.ac.cn