

封面文章

解旋酶 Sen1 行走机制的研究*

张悦悦¹⁾²⁾ 韩伟静²⁾ 陈同生¹⁾ 王爽^{2)3)†}

1) (华南师范大学, 生物光子学研究院, 广州 510631)

2) (松山湖材料实验室, 东莞 523808)

3) (中国科学院物理研究所, 北京 100190)

(2023年2月13日收到; 2023年3月8日收到修改稿)

转录终止是调节基因转录过程的重要步骤, 关系到基因表达调控过程的正常进行和基因组的稳定性. 酵母体系中, Sen1 是一种解旋酶, 通过水解腺苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 获得能量来行使在核酸底物上的一维运动, 进而实现转录终止功能. 然而, Sen1 的这种运动机制与转录终止功能的关联, 目前尚未清晰的表征. 本文应用凝胶电泳迁移方法表征 Sen1 解旋双链 DNA 和结合单链 DNA 的能力, 并且发现单个 Sen1 分子能够结合 ≤ 24 nt (nucleotide, nt) 的单链 DNA; 进一步, 在提供 ATP 的条件下, 应用单分子荧光共振能量转移技术表征了 Sen1 在单链 DNA 上的行走功能, 其行走速率随 ATP 浓度变化而变化, 符合经典米氏动力学模型; 考虑单链 DNA 底物的长度, 可以估算出 Sen1 的行走速率约为 70 nt/s. 这些研究结果定量表征了 Sen1 的行走速率, 为理解真核转录终止机制提供了分子马达运动方面的实验数据.

关键词: Sen1 解旋酶, 行走, 单分子荧光共振能量转移, 转录终止**PACS:** 87.15.kj, 87.14.G-, 87.14.gk, 87.80.Nj**DOI:** 10.7498/aps.72.20230187

1 引言

转录是生命体遗传信息传递的初始步骤, 由转录分子机器—RNA 聚合酶在基因组 DNA 上做一维运动而实现^[1-3]. 转录终止涉及转录分子机器从运动到暂停的状态转变, 由外源蛋白质机器或特征 DNA 序列 (终止子) 实现, 这是生命体调节转录行为的一种重要机制^[4,5]. 在真核生命体内, 以酵母为例, 转录终止主要由两类蛋白质复合物与 RNA 聚合酶相互作用来实现: polyA 介导的转录终止^[6]和 Sen1 介导的转录终止^[7,8]. polyA 介导的转录终止, 一般发生于编码 RNA 转录, 由 Rat1/Xrn2 执行完成. Sen1 介导的转录终止, 一般发生在非编码 RNA 转录, 由 Nrd1/Nab3/Sen1(NNS) 复合物

实现. 有报道显示, Nrd1 和 Nab3 特异性结合非编码 RNA, 作为媒介招募 Sen1, 而 Sen1 通过自身的机械运动以及和 RNA 聚合酶的相互作用来负责转录终止的发生^[7,9-11].

分子马达是负责生命体运动的纳米操纵器, 一般通过水解腺苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 获得的能量来提供动力^[12-14]. 解旋酶 Sen1 通过水解 ATP 获得能量, 实现打开核酸双链和在核酸上 5'-3' 方向运动的功能. 不存在 ATP 时, Sen1 以类似的亲和力结合单链 RNA 和单链 DNA, 但存在 ATP 时, Sen1 在 RNA 上的易位速率较慢, 与 RNA 结合更稳定^[15,16]. Sen1 能够解旋多种核酸底物, 包括 DNA/DNA 双链、RNA/RNA 双链以及 RNA/DNA 杂合链等, 表现出较低的解旋长度^[16]. Sen1 催化水解 ATP 的功能域位于其解旋

* 国家自然科学基金 (批准号: 32071228, 12004420, 12004271, 12274308, 62135003)、中国科学院战略先导科技专项 (B 类) 资助 (批准号: XDB37000000)、中国科学院青年创新促进会 (批准号: 2021009) 和广东省重点领域研发计划“精密仪器设备”专项项目 (批准号: 21202107221900001, 2022B0303040003) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: shuangwang@iphy.ac.cn

酶核心区域(约 1095—1904 的氨基酸位置, Sen1 helicase domain, 下文简称 Sen1 HD). Sen1 HD 与 Sen1 具有类似的水解 ATP 的功能和解旋 DNA 双链、RNA 双链或 RNA/DNA 杂合链等多种核酸底物的功能^[16]. 基于 Sen1 解旋功能, 当底物为单链核酸(单链 DNA 或 RNA) 时, 人们猜测 Sen1 也能够实现类似的一维机械运动, 该运动功能与 Sen1 的终止转录功能密切相关, 但具体机制目前尚不清楚. 另外, 在人体内存在与 Sen1 同源的转录终止因子——Senataxin (SETX), 其蛋白质的功能缺失与人类中枢神经系统疾病密切相关, 将导致共济失调与动眼神经的失用症 2 (ataxia with oculomotor apraxia2, AOA2) 和肌萎缩性脊髓侧索硬化症 4 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS4), 而这一系列疾病可能与 SETX 的转录终止功能密切相关^[17]. 因此, 研究酵母体系的 Sen1 的一维机械运动, 将有助于理解酵母体系乃至人体内的转录终止功能机制, 对理解 Senataxin 相关疾病的发病机制有借鉴意义.

单分子荧光共振能量转移 (Förster resonance energy transfer, FRET) 是一种纳米级精度检测分子相互作用的实验方法^[18,19], 广泛应用于生物大分子间相互作用的研究. FRET 发生原理是两种荧光分子偶极间的相互作用, 当其中一个荧光分子(称为供体, donor) 的发射光谱与另外一个荧光分子(称为受体, acceptor) 的吸收光谱重叠, 并且两个荧光分子的距离为 2—8 nm 时, 供体将通过共振方式把能量传递给受体, 致受体发光^[18]. FRET 效率与两荧光分子距离的 6 次方成反比, 具备高灵敏度探测微观距离变化的能力, 适用于测量生物大分子内部或分子间关键位置的相对距离变化, 实现对生物大分子微观运动和结构变化的高精度探测.

本文采用单分子 FRET 方法表征了 Sen1 HD 与 DNA 底物的相互作用, 包括解旋双链 DNA、结合并在单链 DNA 上行走等, 通过这些相互作用信息, 分析了 Sen1 HD 在单链 DNA 上的运动行为, 并解释了 Sen1 HD 在单链核酸上的行走机制.

2 实验方法与材料

2.1 Sen1 HD 蛋白样品制备

1) Sen1 HD 重组表达载体构建: 首先从酿酒酵母 BJ2168 基因组 DNA 上 PCR 扩增出 Sen1

HD (1095—1904 氨基酸) 基因片段; 该片段经过限制性内切酶消化后接入 pGEX6 P-1 (Δ GST) 载体进行克隆. 同样, SNAP 基因也经过 PCR 扩增、内切酶消化后, 克隆到 Sen1 HD 的 C 末端.

2) Sen1 HD 蛋白表达纯化: Sen1 HD 的表达纯化步骤参考文献^[20]. 简述如下, 将 Sen1 HD 重组载体转化到大肠杆菌感受态细胞 BL21(DE3) 中, 振荡过夜培养, 离心收集菌体. 对菌体重悬并裂解, 将上清液注入 Ni^{2+} 亲和色谱. 之后使用 PPX 蛋白酶切割目标蛋白上将其释放到溶液环境, 进一步使用阴离子交换柱和分子筛纯化获得高纯度的 Sen1 HD 蛋白. 纯化后的 Sen1 HD 蛋白分装速冻之后在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存. Sen1 HD-SNAP 的表达纯化流程与 Sen1 HD 类似, 其纯化过程中无 PPX 切割步骤, 因此保留了 Sen1 HD 蛋白 C 端的 SNAP 标签.

3) Sen1 HD-SNAP 蛋白荧光标记: 将 Sen1 HD-SNAP 蛋白与 5 倍物质的量的荧光染料 SNAP-Surface649 (购于 NEB 公司) 混合, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜. 随后用分子筛分离除去游离染料. 将荧光标记之后的蛋白分装速冻之后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存. 荧光标记过程需要避光.

2.2 DNA 底物准备

使用 7 种不同序列的单链 DNA (上海生工) 来制备 DNA 底物用于 Sen1 HD 蛋白功能验证. 7 种单链 DNA 的序列信息参见表 1, 其中 20-nt FAM ssDNA 和 70-nt ssDNA 退火后形成具有 50 nt (nucleotide, nt) 单链结合位点的 20 bp 双链 DNA 底物, 命名为 5'-50ss-20duplex(图 1(b)), 用于表征 Sen1 HD 蛋白解旋活性; Cy3-48ssDNA 单链(图 2(a)) 用于验证 Sen1 HD 蛋白与单链 DNA 的结合能力; 5'-bio-60ssDNA 和 5'-Cy3-34ssDNA 退火后形成具有 26 nt 单链结合位点沿 5'-3' 方向远离 DNA 岔口的 34 bp 双链 DNA 底物 (5'-26ss-34duplex, 图 3(a)), 用于表征 Sen1 HD-SNAP649 在单链 DNA 上的行走功能; 3'-bio-60ssDNA 和 3'-Cy3-34ssDNA 退火后形成 26 nt 单链结合位点沿 5'-3' 方向靠近 DNA 岔口的 34 bp 双链 DNA 底物 (3'-26ss-34duplex, 图 5(a)), 用于判断 Sen1 HD-SNAP649 在单链 DNA 上行走的方向性.

采用常规的寡核苷酸退火方案来完成 DNA 底物退火. 具体过程如下: 首先将待退火的两种单链 DNA 干粉溶解为 $50\text{ }\mu\text{M}$ 溶液备用; 随后取等摩

表 1 DNA 底物序列信息及其应用
Table 1. DNA sequences and their applications.

| DNA底物名称 | DNA序列(5'-3') | 应用 |
|------------------|--|---|
| 5'-50ss-20duplex | 20-nt FAM ssDNA: GTT GGG TAA CGC CAG GGA CG-3FAM 70-nt ssDNA: ATT ACG GAT TCA CTG GCC GTC GTT TTA CAA CGT CGT GAC TGG GAA AAA CGC GTC CCT GGC GTT ACC CAA C | DNA退火后形成具有50 nt单链结合位点的20 bp双链DNA底物, 用于表征Sen1 HD解旋活性 |
| Cy3-48ssDNA | AGC TGG ATA CTT ACA GCC ATG GCT GCT CGC AAT ACT CCA TTC CAT CCC | 用于验证Sen1 HD与单链DNA的结合能力 |
| 5'-26ss-34duplex | 5'bio-60ssDNA: 5'Biotin-GCC AGG AGG CTA GCA ACA GTC TTC ATT CAA CCG ACG TCA CAA TAG TGA GTA CCA ATA CCT 5'Cy3-34ssDNA: 5'Cy3-TCG GTT GAA TGA AGA CTG TTG CTA GCC TCC TGG C | DNA退火后形成具有26 nt 单链结合位点沿5'-3'方向远离DNA盆口的34 bp双链DNA底物, 用于表征Sen1 HD-SNAP649在单链DNA上的行走功能 |
| 3'-26ss-34duplex | 3'bio-60ssDNA: TCC ATA ACC ATG AGT GAT AAC ACT GCA GCC AAC TTA CTT CTG ACA ACG ATC GGA GGA CCG-3'Biotin 3'Cy3-34ssDNA: CGG TCC TCC GAT CGT TGT CAG AAG TAA GTT GGC T-3'Cy3 | DNA退火后形成26 nt 单链结合位点沿5'-3'方向靠近DNA盆口的34 bp双链DNA底物, 用于表征Sen1 HD-SNAP649在单链DNA上的行走方向 |

尔浓度的两种单链 DNA 溶液加入退火缓冲液中进行水浴退火. 本文使用的退火缓冲溶液配方为 10 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7.5. 水浴退火操作过程如下: 用水浴锅将烧杯中的水加热至 95 °C, 随后将装有退火体系的离心管放入 95 °C 烧杯中, 维持 5 min; 之后将烧杯从水浴锅中取出避光放置, 待其自然降温至室温后放于 -20 °C 避光保存.

2.3 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

使用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳法来表征 Sen1 HD 蛋白解旋双链 DNA, 以及与单链 DNA 结合的能力, 凝胶电泳实验流程如下.

1) 20% 浓度聚丙烯酰胺凝胶制备: 取 40% 丙烯酰胺 (29:1) 10 mL, 依次加入 10×TBE (890 mM Tris, 20 mM EDTA pH 8.0, 890 mM Boric acid) 2 mL, 10% APS 160 μL, 待其充分混合后加入 8 μL 的四甲基乙二胺 (tetramethylethylenediamine, TEMED). 用纯水定容到 20 mL 后, 灌入垂直电泳胶框中, 室温静置凝胶 30 min.

2) 非变性胶凝胶电泳: 将凝固后的胶框放入垂直电泳槽中, 随后缓慢倒入电泳缓冲液, 待冲洗加样孔、点样, 加入 DNA marker 之后, 进行 100 V 恒压电泳 30 min. 此处电泳缓冲液为 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.1 mg/mL BSA, 7.5 μM ZnCl₂, 10% 甘油, 0.5 mM DTT.

3) 电泳条带成像与分析: 恒压电泳结束后, 拆下胶框玻璃板, 将凝胶放入凝胶成像采集分析系统进行凝胶荧光成像, 观察并记录对照组与实验组的条带变化.

本文共点样 5 种样品来验证 Sen1 HD 解旋双链 DNA 的活性, 分别是 20 nM 20-nt FAM ssDNA (样品 1); 20 nM 20-nt FAM ssDNA 与 70-nt ssDNA 退火产物 (样品 2); 20 nM 20-nt FAM ssDNA 与 70-nt ssDNA 退火产物, 加入 200 nM 20-nt ssDNA (样品 3); 20 nM 20-nt FAM ssDNA 与 70-nt ssDNA 退火产物, 加入 200 nM 20-nt ssDNA, 加入 30 nM Sen1 HD (样品 4); 20 nM 20-nt FAM ssDNA 与 70-nt ssDNA 退火产物, 200 nM 20-nt ssDNA, 30 nM Sen1 HD, 1 mM ATP (样品 5). 其中, 前 4 组样品为对照组, 样品 5 为实验组. 所有样品均在 30 °C 孵育 30 min 之后再点样, 进行凝胶电泳与荧光成像.

本文采用 Sen1 HD 蛋白浓度梯度体系来验证 Sen1 HD 蛋白与单链 DNA 的结合能力, 具体是将 0 nM Sen1 HD, 5 nM Sen1 HD, 25 nM Sen1 HD, 50 nM Sen1 HD 蛋白分别与 10 nM Cy3-48ssDNA 混合定容后, 30 °C 孵育 30 min 之后再点样, 进行凝胶电泳与荧光成像.

2.4 单分子 FRET 实验

采用单分子 FRET 来验证 Sen1 HD-SNAP649 蛋白在单链 DNA 上的行走功能和方向性. 选用 Cy3-SNAP649 供体/受体荧光对来验证 Sen1 HD 蛋白与单链 DNA 的结合距离, 其中 Cy3 荧光标记在 DNA 底物上, SNAP649 荧光标记在 Sen1 HD 蛋白上. 在 532 nm 激光器 (Coherent Inc.) 的激发下, Cy3 供体分子发射荧光光子并激发与之邻近

的 SNAP649 受体分子. 供体和受体荧光分子发射的荧光经过成像系统的分光镜分离, 然后在高灵敏度电子倍增 CCD (EMCCA, Andor) 上成像. 通过分析 Cy3-SNAP649 供体/受体荧光分子的强度变化来判断两者之间距离的变化, 进而判断 Sen1 HD 蛋白在单链 DNA 上的运动行为.

使用底面修饰有 Biotin-PEG 的样品池来实现单分子密度 DNA 底物及 Sen1 HD 蛋白的表面固定^[18]. 样品池制备过程主要分为 3 个部分.

1) 样品池玻璃片清洗: 将预先打孔的载玻片和盖玻片装入染色缸, 依次分别将二次水、丙酮、甲醇加入染色缸中对载玻片和盖玻片进行溶液超声清洗; 随后用二次水对其进行多次清洗, 之后向染色缸中加入 1 M KOH 超声清洗 1.5 h; 再次使用二次水清洗后, 将载玻片浸泡在二次水中保存; 向盖玻片染色缸中加入乙醇钠 (40 mg/mL NaOH、乙醇与二次水比例为 7:3), 超声清洗 15 min, 之后再使用二次水超声清洗 15 min.

2) 盖玻片表面修饰: 将清洗后的盖玻片用氮气吹干放入空置的 APTES 染色缸中, 120 °C 加热 20 min, 随后取出放入真空干燥塔降温; 按照 1 mL APTES 3-氨基丙基三乙氧基硅烷、50 mL 甲醇、2.5 mL 冰醋酸的配比配制 APTES 溶液, 随后倒入已降至室温的 APTES 染色缸, 静置 20 min 进行玻璃表面预修饰, 之后用二次水超声清洗 5 min; 之后将经过预修饰的盖玻片浸没在 m-PEG 和 Biotin-PEG (100:1 配比) 稀释的高盐溶液中, 避光修饰 2.5 h, 得到 m-PEG/Biotin-PEG 修饰的疏水盖玻片表面, 该表面在实现链霉亲和素特异性结合的同时, 有效避免杂质的非特异性吸附. 表面修饰完成之后, 盖玻片再次用二次水冲洗, 之后用氮气吹干, 装到 50 mL 微量离心管中, 抽真空保存于 -20 °C 备用.

3) 样品池组装: 把封口膜切割成通道结构, 随后将其放入上述处理过的载玻片和盖玻片之间热压, 形成闭合通道; 之后在载玻片的打孔位置连接进/出液管, 完成样品池组装. 上述过程详情可以见参考文献^[21].

样品池准备完成之后, 将其放到全内反射荧光 (total internal reflection fluorescence, TIRF) 显微镜的载物台上, 进行 DNA 底物及 Sen1 HD 蛋白上样. 首先在样品池中加入 0.1 mg/mL 链霉亲和素孵育 2 min; 随后用缓冲液冲掉未连接的链

霉亲和素, 再将 40 pM 生物素标记的 DNA 底物加入到样品池中孵育 1 min 并冲掉多余的 DNA; 之后加入 Sen1 HD-SNAP649、不同浓度的 ATP、除氧体系 (2.5 mM protocatechuic acid, PCA; 50 nM protocatechuate-3, 4-dioxygenase, PCD, pH 7.5). 若无特殊说明, 单分子荧光实验使用的缓冲液均为 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 8 mM MgCl₂, 0.5 mg/mL BSA, 7.5 μM ZnCl₂, 体积分数为 0.1% 的 Tween 20, 10 mg/mL Trolox.

2.5 数据处理

使用自有的 Matlab 代码分别提取经过背景矫正的供体/受体荧光信号来进行单分子荧光分析, 之后通过 Matlab 程序对提取的单分子 FRET 信号持续的时间进行动力学分析. 所有的动力学分析拟合均使用 Igor Pro (WaveMetrics) 来实现.

3 结果与讨论

3.1 生化方法表征 Sen1 HD 解旋双链 DNA 的活性

Sen1 是一种 SF1B 家族解旋酶^[16,22,23], 能够利用 ATP 水解提供的化学能, 沿 5'-3' 的核酸方向行走并解开双链 DNA, 双链 RNA 以及 DNA/RNA 杂合链, 该解旋活性被认为与其实现转录终止功能密切相关. Sen1 的核心区域, 即 Sen1 HD, 具备类似的解旋酶活性和转录终止活性, 被广泛用于 Sen1 介导的转录终止相关的研究中. 本文首先运用传统生化方法验证 Sen1 HD 的解旋活性. 首先将 70-nt ssDNA 与 FAM 荧光标记的 20-nt 互补的 ssDNA 退火, 制备具有 50 nt 单链结合位点的 20 bp 双链 DNA 底物, 称为 5'-50ss-20duplex, 该 50 nt 单链 DNA 位于 5' 末端, 可结合 Sen1 HD (图 1(b)). 在 20 μL 反应体系中, 5'-50ss-20duplex 底物的浓度为 20 nM, 加入 1 mM ATP, 30 nM Sen1 HD 和 200 nM 20-nt 竞争 ssDNA (与 20-nt FAM ssDNA 序列相同, 无 FAM 标记). 在 30 °C 反应 20 min. 借助 20% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE), 对 20-nt FAM ssDNA 的迁移率进行表征, 电泳结果如图 1(c) 所示, 迁移速度慢的是底物 5'-50ss-20duplex, 迁移速度快的是 20-nt FAM ssDNA. 图 1(c) 中前 4 道为对照组, 第 5 道为实验组, 实验组结果显示 DNA 底物中的 20-nt FAM

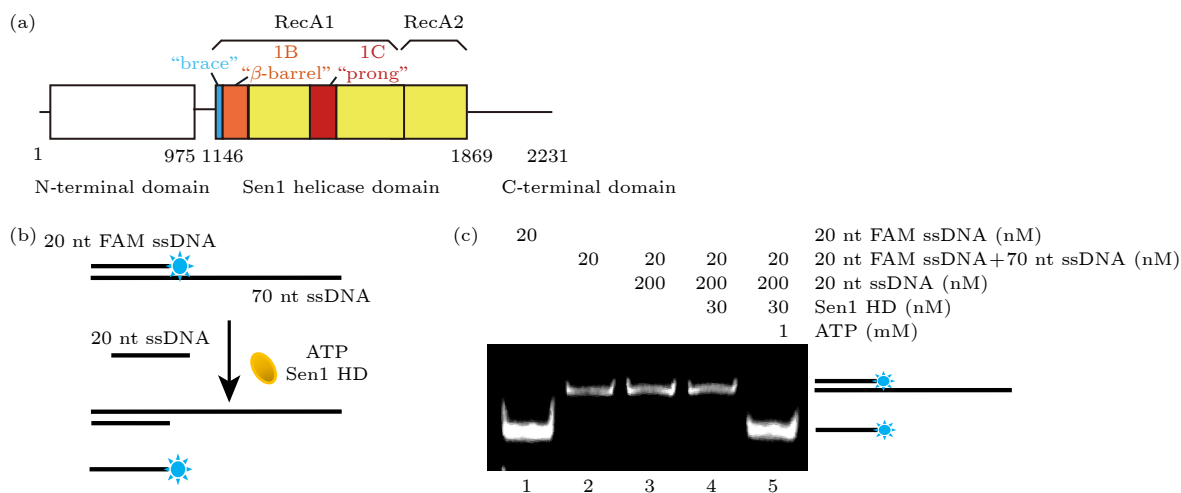


图1 聚丙烯酰胺凝胶电泳表征 Sen1 HD 解旋双链 DNA 活性 (a) Sen1 解旋酶蛋白结构域模式图. (b) 实验方法示意图, Sen1 HD 作用于 5'-50ss-20duplex 底物, 通过水解 ATP 获得能量来解开 20-nt FAM ssDNA. (c) 对 FAM 荧光成像结果 1 道为 20-nt FAM ssDNA 的条带位置; 2 道为 5'-50ss-20duplex 的条带位置; 3 道为 5'-50ss-20duplex 与 20-nt 竞争 ssDNA 30 °C 孵育 20 min 的结果, 无 20-nt FAM ssDNA 产生; 4 道为 5'-50ss-20duplex、20-nt 竞争 ssDNA 和 Sen1 HD 30 °C 孵育 20 min 的结果, 无 20-nt FAM ssDNA 产生; 5 道为 5'-50ss-20duplex、20-nt 竞争 ssDNA、Sen1 HD、ATP 条件下, 30 °C 孵育 20 min 的结果, 产生 20-nt FAM ssDNA

Fig. 1. Characterization of Sen1 HD unwinding activity on double-stranded DNA via PAGE assay. (a) Domain pattern of Sen1. (b) Schematic of PAGE assay, Sen1 HD acts on the 5'-50ss-20duplex substrate to unwind the 20-nt FAM ssDNA by hydrolyzing ATP. (c) Fluorescence imaging of PAGE result: the first lane represents the band position of 20-nt FAM ssDNA; the second lane represents the band position of 5'-50ss-20duplex; the third lane represented 5'-50ss-20duplex with 20-nt competed ssDNA incubated at 30 °C for 20 min, but no 20-nt FAM ssDNA was produced; the fourth lane represented 5'-50ss-20duplex with 20-nt competed ssDNA and Sen1 HD incubated at 30 °C for 20 min, but no 20-nt FAM ssDNA was produced; the fifth lane, 20-nt FAM ssDNA was produced after incubation for 20 min at 30 °C under the condition of 5'-50ss-20duplex, 20-nt competed ssDNA, Sen1 HD and ATP.

ssDNA 与 70-nt ssDNA 分离, 说明在 1 mM ATP 条件下, Sen1 HD 能够解开 5'-50ss-20duplex 底物, Sen1 HD 具有解旋双链 DNA 的活性. 相比于对照组结果, Sen1 HD 的解旋活性依赖于 ATP 水解, 即无 ATP 条件下未观察到 Sen1 HD 的解旋活性.

3.2 Sen1 HD 结合单链 DNA 能力的表征

Sen1 HD 的解旋活性蕴含结合单链 DNA 并在其上迁移的能力, 因此, 进一步表征了 Sen1 HD 和单链 DNA 的结合能力. 首先, 设计并合成了 Cy3 荧光标记的 48 nt 单链 DNA(Cy3-48ssDNA), 运用聚丙烯酰胺凝胶电泳观测不同 Sen1 HD 浓度下, Cy3 荧光的迁移率, 从而表征 Sen1 HD 与单链 DNA 的结合能力. 在 20 μL 反应体系中, Cy3-48ssDNA 浓度为 10 nM, 分别与浓度梯度为 0, 5, 25 和 50 nM 的 Sen1 HD 在 30 °C 孵育 30 min, 随后在聚丙烯酰胺凝胶电泳下进行迁移, 结果如图 2(b) 所示. 随 Sen1 HD 浓度增加, Cy3-48ssDNA 条带逐渐向高分子量区域跳变. Sen1 HD 浓度为 0 或 5 nM 时, Cy3-48ssDNA 条带保持不变; Sen1 HD 浓度为 25 nM 时, Cy3-48ssDNA 条带略有减少, 并且

Cy3-48ssDNA 条带上方出现一条新的条带, 说明 Cy3-48ssDNA 结合了一个 Sen1 HD 分子, 导致 Cy3-48ssDNA 条带位置迁移; Sen1 HD 浓度为 50 nM 时, Cy3-48ssDNA 条带进一步减少, 并且 Cy3-48ssDNA 条带上方出现两个条带, 其中迁移速度较快的条带表明 Cy3-48ssDNA 结合了一个 Sen1 HD 分子, 迁移速度较慢的条带表明 Cy3-48ssDNA 结合了两个 Sen1 HD 分子, 导致条带分层迁移. 综上, Sen1 HD 具备结合单链 DNA 的能力, 并且其结合单链 DNA 的长度 ≤ 24 nt.

3.3 Sen1 HD 在单链 DNA 上行走功能的表征

下一步, 运用单分子 FRET 方法表征了 Sen1 HD 在单链 DNA 上的行走功能. 首先将 5' bio-60ssDNA 与 5' 端 Cy3 荧光标记的 34-nt 互补的 ssDNA 退火, 制备具有 26 nt 单链结合位点的 34 bp 双链 DNA 底物, 称为 5'-26ss-34duplex, 该 26 nt 单链 DNA 位于 3' 末端, 可结合 Sen1 HD, Sen1 HD 在 26 nt 单链 DNA 上沿 5'-3' 方向远离 DNA 岔口处行走. 5'-26ss-34duplex 的 5' 末端标记生物素

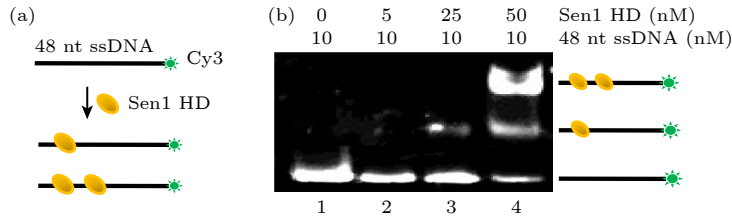


图 2 Sen1 HD 与 Cy3-48ssDNA 结合的 PAGE 实验 (a) Sen1 HD 与 Cy3-48ssDNA 结合示意图. (b) Cy3 荧光成像结果. 第 1 道为 Cy3-48ssDNA 原始长度; 第 2 道为 5 nM Sen1 HD 与 Cy3-48ssDNA 30 °C 孵育 30 min 的结果; 第 3 道为 25 nM Sen1 HD 与 Cy3-48ssDNA 30 °C 孵育 30 min 的结果; 第 4 道为 50 nM Sen1 HD 与 Cy3-48ssDNA 30 °C 孵育 30 min 的结果

Fig. 2. Sen1 HD binding activity to Cy3-48ssDNA characterized via PAGE assay. (a) Schematic of Sen1 HD binding to Cy3-48ssDNA. (b) Fluorescence imaging of Cy3 fluorophore: the first lane represents the original length of Cy3-48ssDNA; the second lane represents the result of 5 nM Sen1 HD incubation with Cy3-48ssDNA at 30 °C for 30 min; the third lane represents the result of 25 nM Sen1 HD incubation with Cy3-48ssDNA at 30 °C for 30 minutes; the fourth lane represents the result of 50 nM Sen1 HD incubation with Cy3-48ssDNA at 30 °C for 30 min.

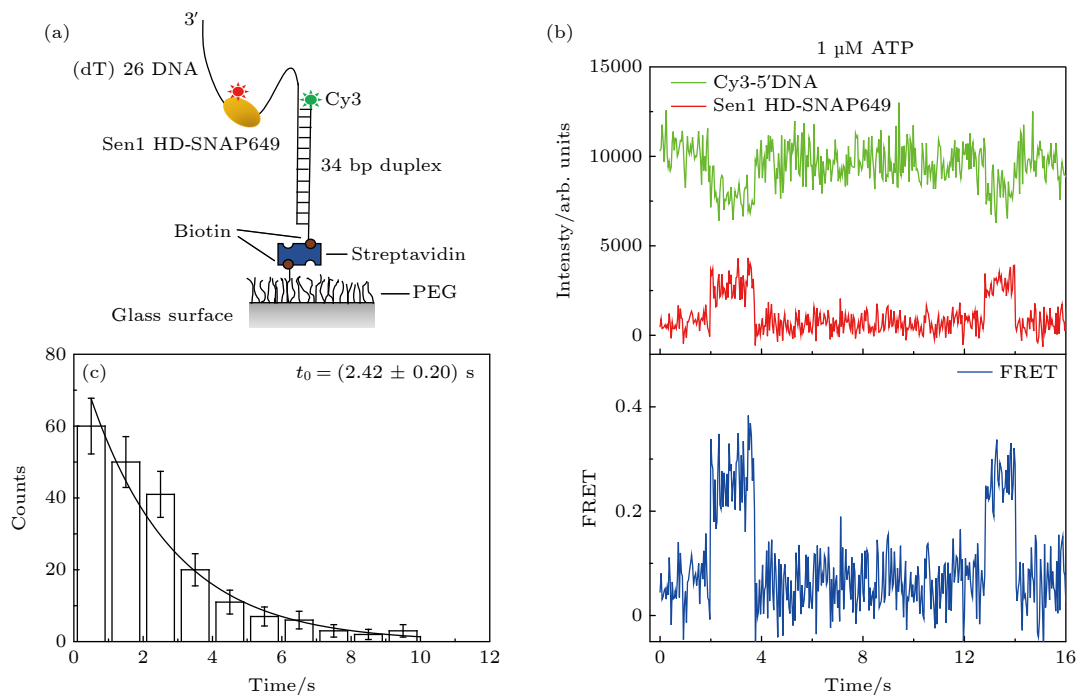


图 3 单分子 FRET 方法表征 Sen1 HD-SNAP649 在 5'-26ss-34duplex 上的行走功能 (1 μM ATP 条件下) (a) 单分子 FRET 方法示意图, 在 5'-26ss-34duplex 结构中, 岔口 5'端标有 Cy3 荧光, Sen1 HD 上标有 SNAP649 荧光; (b) Sen1 HD-SNAP649 行走的典型曲线; (c) FRET 持续时间的分布图

Fig. 3. Sen1 HD-SNAP649 translocation activity on 5'-26ss-34duplex characterized via single-molecule FRET assay under 1 μM ATP condition: (a) Schematic for the assay, in the 5'-26ss-34duplex construct, the 5' end of the fork is labeled with Cy3, and Sen1 HD is labeled with SNAP649; (b) a typical trajectory representing Sen1 HD-SNAP649 translocation on DNA substrate; (c) distribution of the FRET dwell times corresponding to Sen1 HD-SNAP649 translocation.

(Biotin), 用于连接聚乙二醇 (PEG) 和链霉亲和素 (Streptavidin) 修饰的玻璃表面 (图 3). 在 532 nm 激光照射下, 该 DNA 底物展现出稳定的 Cy3 荧光. 当引入 SNAP649 荧光标记的 Sen1 HD (Sen1 HD-SNAP649) 和 1 μM ATP 时, 如图 3(a) 所示, Cy3 荧光光强降低, SNAP649 荧光发生同步且相反的光强变化. 这表明 Sen1 HD 与单链 DNA 结合, Cy3 和 SNAP649 荧光分子之间发生了能量转移现象,

即 FRET (图 3(b)), 当两种荧光光强变化持续一定时间后, 恢复到初始状态, 表明 Sen1 HD 与单链 DNA 解离, 当 Cy3 荧光再次降低, SNAP649 荧光再次发生同步相反的光强变化, 表明 Sen1 与单链 DNA 结合之后再次解离的过程. 该实验现象说明 Sen1 HD-SNAP649 结合到 DNA 底物并与其发生相互作用, 我们对该作用时间 (即 FRET 持续时间) 进行分析, 其结果符合单指数分布. 运用

单指数方程对该时间分布进行拟合, 得到 $1 \mu\text{M}$ ATP 条件下, Sen1 HD-SNAP649 在 DNA 底物上作用的平均时间, $t_0 = (2.42 \pm 0.20) \text{ s}$ (SEM), 如图 3(c) 所示. 当采用齐末端双链 DNA 底物进行对照实验, 未观察到类似的 FRET 现象, 说明 Sen1 HD-SNAP649 作用于 DNA 底物的单链区域.

进一步, 为了验证 Sen1 HD 在单链 DNA 上的行走功能, 进行了 ATP 浓度梯度实验, 即采用 1, 10, 20, 100 和 $500 \mu\text{M}$ ATP 浓度, 利用单分子 FRET 测得在不同 ATP 条件下, Sen1 HD-SNAP649 在 $5'$ -26ss-34duplex 上平均作用时间, 分别为 $t_1 = (2.42 \pm 0.20) \text{ s}$, $t_2 = (0.43 \pm 0.05) \text{ s}$, $t_3 = (0.36 \pm 0.04) \text{ s}$, $t_4 = (0.21 \pm 0.03) \text{ s}$, $t_5 = (0.16 \pm 0.02) \text{ s}$. 结果如图 4 所示, 随着 ATP 浓度增加, Sen1 HD-SNAP649 在 $5'$ -26ss-34duplex 上的平均作用时间减少, 表明 Sen1 HD-SNAP649 在单链 DNA 上平均作用时间受 ATP 浓度调控, 证明 Sen1 HD 具有在单链 DNA 上的行走功能. 对该作用时间与 ATP 浓度的倒数进行拟合 ($t = K_m t_0 \cdot \frac{1}{[\text{ATP}]} + t_0$), 得到 $t_0 = (0.18 \pm 0.01) \text{ s}$ 和 $K_m = (13.1 \pm 0.1) \mu\text{M}$.

考虑 Sen1 HD 结合单链 DNA 的最概然位置是 26 nt 的中间位置, 可以估算出 Sen1 HD 在单链 DNA 上的平均行走速率为 $13 \text{ nt}/0.18 \text{ s} = 72 \text{ nt/s}$.

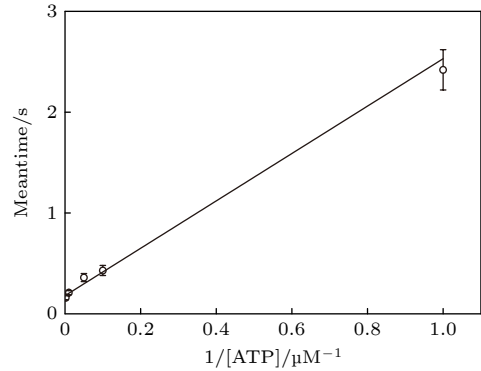


图 4 Sen1 HD-SNAP649 行走功能的米氏动力学分析
Fig. 4. Translocation activity of Sen1 HD-SNAP649 analyzed via the classical Michaelis-Menten model.

3.4 Sen1 HD-SNAP649 在单链 DNA 上的行走方向

改变 3.3 节研究所用 DNA 底物中单链 DNA 的方向, 首先将 $3'$ bio-60ssDNA 与 $3'$ 端 Cy3 荧光

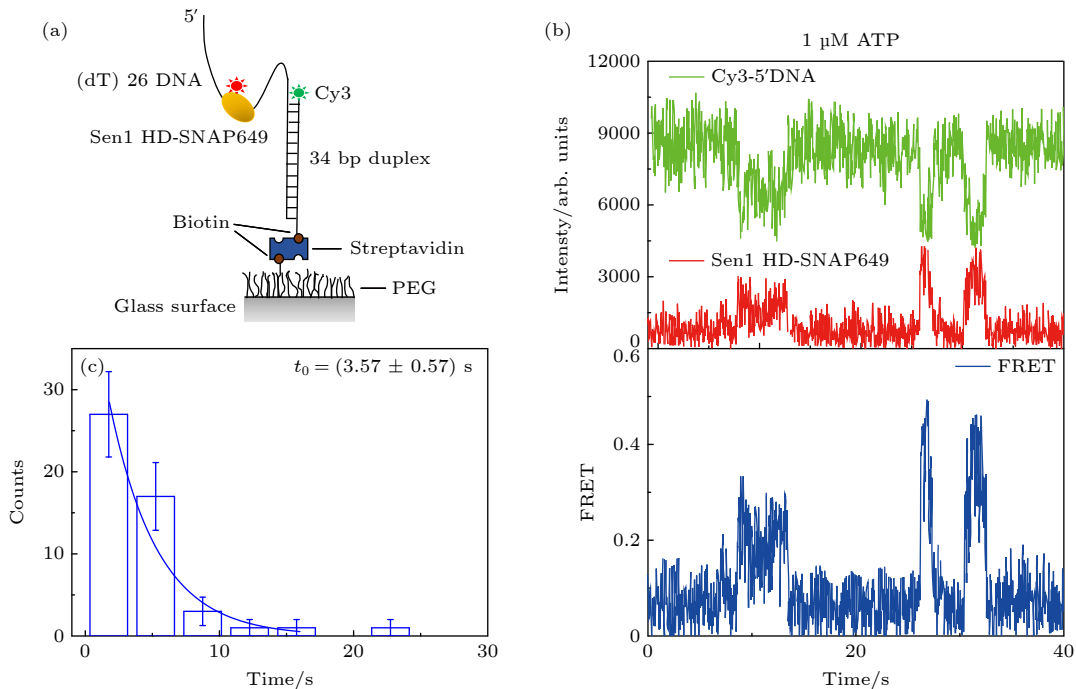


图 5 单分子 FRET 方法表征 Sen1 HD-SNAP649 在 $3'$ -26ss-34duplex 上的行走 ($1 \mu\text{M}$ ATP 条件) (a) 实验示意图, 在 $3'$ -26ss-34duplex 结构中, 岔口 $3'$ 端标有 Cy3 荧光, Sen1 HD 上标有 SNAP649 荧光; (b) Sen1 HD-SNAP649 行走的典型曲线; (c) FRET 持续时间的分布图

Fig. 5. Translocation activity of Sen1 HD-SNAP649 on $3'$ -26ss-34duplex characterized via single-molecule FRET assay under $1 \mu\text{M}$ ATP condition: (a) Schematic of the assay, and in the construct of $3'$ -26ss-34duplex, the $3'$ end of the fork is labeled with Cy3, and Sen1 HD is labeled with SNAP649; (b) a typical trajectory representing Sen1 HD-SNAP649 translocation; (c) histogram of the FRET dwell times for Sen1 HD-SNAP649 translocation.

标记的 34-nt 互补的 ssDNA 退火, 制备具有 26 nt 单链结合位点的 34 bp 双链 DNA 底物, 称为 3'-26ss-34duplex, 该 26 nt 单链 DNA 位于 5' 末端, 可结合 Sen1 HD, Sen1 HD 在 26 nt 单链 DNA 上沿 5'-3' 方向靠近 DNA 岔口处行走 (图 5(a)). 在反应体系中加入 Sen1 HD-SNAP649 和 1 μ M ATP 时, 观察到图 5(b) 的 FRET 现象, 其中, 有 FRET 平稳变化过程, 也有 FRET 渐变过程, 对该 FRET 持续时间进行分析并用单指数方程进行拟合, 得到了平均作用时间为 $t_0 = (3.57 \pm 0.57)$ s (SEM), 大于 3.3 节中相同 ATP 浓度下的平均作用时间, 说明本节中 Sen1 HD-SNAP649 朝向 DNA 岔口运动时, 岔口的存在可能阻碍 Sen1 HD-SNAP649 解离, 也有可能 Sen1 HD-SNAP649 在岔口处对 DNA 解旋, 使得与 DNA 底物的作用时间有所增加.

4 结 论

应用单分子 FRET 和凝胶电泳迁移方法, 研究了解旋酶 Sen1 HD 与多种 DNA 底物之间的相互作用, 验证了 Sen1 HD 具备解旋双链 DNA 和结合单链 DNA 的功能, 并且在 ATP 提供能量的情况下, Sen1 HD 能够在单链 DNA 行走, 行走速率随 ATP 浓度变化而变化, 符合经典米氏动力学模型. 估算得出饱和 ATP 浓度下, Sen1 HD 在单链 DNA 上行走的平均速率为 70 nt/s. 该速率显著大于酵母体系中 RNA 聚合酶的运动速率 (约 16 bp/s), 从简单的运动学角度考虑, Sen1 具备追上 RNA 聚合酶的功能. 在转录终止过程中, 人们发现 Sen1 与 RNA 聚合酶之间的行走速率差别, 显著影响酵母体系的转录终止效率, 即提出了 Sen1 与 RNA 聚合酶相互竞争的工作机制^[24]. 研究结果

为该转录终止机制提供了运动速率方面的实验证据, 有助于深化对酵母体系转录终止机制的理解.

参考文献

- [1] Roeder R G 2019 *Nat. Struct. Mol. Biol.* **26** 783
- [2] Jonkers I, Lis J T 2015 *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **16** 167
- [3] Abbondanzieri E A, Greenleaf W J, Shaevitz J W, Landick R, Block S M 2005 *Nature* **438** 460
- [4] You L, Omollo E O, Yu C, Mooney R A, Shi J, Shen L, Wu X, Wen A, He D, Zeng Y, Feng Y, Landick R, Zhang Y 2023 *Nature* **613** 783
- [5] Molodtsov V, Wang C, Firlar E, Kaelber J T, Ebricht R H 2023 *Nature* **614** 367
- [6] West S, Gromak N, Proudfoot N J 2004 *Nature* **432** 522
- [7] Porrua O, Libri D 2013 *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20** 884
- [8] Wang S, Han Z, Libri D, Porrua O, Strick T R 2019 *Nat. Commun.* **10** 1545
- [9] Vasiljeva L, Kim M, Mutschler H, Buratowski S, Meinhart A 2008 *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15** 795
- [10] Arndt K M, Reines D 2015 *Annu. Rev. Biochem.* **84** 381
- [11] Rondón A G, Mischo H E, Kawauchi J, Proudfoot N J 2009 *Mol. Cell.* **36** 88
- [12] Jia X, Li Y, Wang T, Bi L, Guo L, Chen Z, Zhang X, Ye S, Chen J, Yang B, Sun B 2023 *Embo. J.* **42** e111703
- [13] Saper G, Hess H 2020 *Chem. Rev.* **120** 288
- [14] Nishizaka T 2010 *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **119** 3
- [15] Martin-Tumasch S, Brow D A 2015 *J. Biol. Chem.* **290** 22880
- [16] Han Z, Libri D, Porrua O 2017 *Nucleic. Acids. Res.* **45** 1355
- [17] Skourti-Stathaki K, Proudfoot N J, Gromak N 2011 *Mol. Cell.* **42** 794
- [18] Ha T, Enderle T, Ogletree D F, Chemla D S, Selvin P R, Weiss S 1996 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** 6264
- [19] Maki A H, Co T 1976 *Biochemistry* **15** 1229
- [20] Leonaitė B, Han Z, Basquin J, Bonneau F, Libri D, Porrua O, Conti E 2017 *Embo. J.* **36** 1590
- [21] Shi J, Wang F, Li F, Wang L, Xiong Y, Wen A, Jin Y, Jin S, Gao F, Feng Z, Li J, Zhang Y, Shang Z, Wang S, Feng Y, Lin W 2022 *Nucleic. Acids. Res.* **50** 5974
- [22] Fiorini F, Bagchi D, Le Hir H, Croquette V 2015 *Nat. Commun.* **6** 7581
- [23] Chakrabarti S, Jayachandran U, Bonneau F, Fiorini F, Basquin C, Domcke S, Le Hir H, Conti E 2011 *Mol. Cell.* **41** 693
- [24] Hazelbaker D Z, Marquardt S, Wlotzka W, Buratowski S 2013 *Mol. Cell.* **49** 55

COVER ARTICLE

Mechanism of Sen1 translocation*Zhang Yue-Yue¹⁾²⁾ Han Wei-Jing²⁾ Chen Tong-Sheng¹⁾ Wang Shuang^{2)3)†}1) (*College of Biophotonics, South China Normal University, Guangzhou 510631, China*)2) (*Songshan Lake Materials Laboratory, Dongguan 523808, China*)3) (*Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China*)

(Received 13 February 2023; revised manuscript received 8 March 2023)

Abstract

Transcription termination is a critical step for gene regulation and genome integrity among all kingdoms of life. In *Saccharomyces cerevisiae*, one of the major termination pathways is accomplished by Sen1 helicase, a homolog to human Senataxin (SETX), defection of which raises the diseases for the central nervous system of human. Although it has been proposed that Sen1 translocates along nucleic acids by consuming adenosine triphosphates (ATPs) during termination, the mechanism for this translocation activity of Sen1 has not been well understood. In this work, our aim is to investigate the mechanism of Sen1 translocation by measuring the interactions between Sen1 and different types of nucleic acids by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) assay or single-molecule Förster resonance energy transfer (FRET) assay. We firstly observe the unwinding activity of Sen1 on a tailed duplex DNA in the presence of 1 mM ATP via PAGE assay, where the translocation activity of Sen1 is involved. As the binding activity is crucial for translocation, then we examine the binding affinity of Sen1 to the single-stranded DNA via PAGE assay, revealing a stable binding of Sen1 with an occupied length of nucleic acids of less than 24 nt. In the presence of 1 μ M ATP, we observe that Sen1 dynamically binds to and dissociates from the tailed duplex DNA in the single-molecule FRET assay. By titrating ATP concentrations from 1–500 μ M, we observe a gradual decrease in the mean durations of Sen1 binding, suggesting an ATP-dependent binding affinity of Sen1 to single-stranded DNA. We then fit these mean durations to the classical Michaelis-Menten model and obtain a minimum binding duration of (0.18 ± 0.01) s at saturating ATP concentrations and K_m of (13.1 ± 0.1) μ M for the ATP-dependent binding of Sen1. This result is consistent with that from a translocation activity of Sen1. Taking into account the translocation length of the half of the single-stranded tail, i.e. 13 nt, a mean rate of 70 nt/s is estimated. Reversing the translocation direction, we observe an increase in the duration of Sen1 binding to the single-stranded tail, which suggests an impediment of DNA duplex in front of Sen1 translocation or the possible duplex DNA unwinding activity of Sen1. Our quantitative measurements on Sen1 translocation are helpful in deepening our understanding of the mechanism of eukaryotic transcription termination by Sen1.

Keywords: Sen1 helicase, translocation, single-molecule Förster resonance energy transfer, transcription termination

PACS: 87.15.kj, 87.14.G–, 87.14.gk, 87.80.Nj

DOI: 10.7498/aps.72.20230187

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 32071228, 12004420, 12004271, 12274308, 62135003), the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences, China (Grant No. XDB37000000), the Youth Innovation Promotion Association of the Chinese Academy of Sciences, China (Grant No. 2021009), and the Key-Area Research and Development Program of Guangdong Province, China (Grant Nos. 21202107221900001, 2022B0303040003).

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

解旋酶Sen1行走机制的研究

张悦悦 韩伟静 陈同生 王爽

Mechanism of Sen1 translocation

Zhang Yue-Yue Han Wei-Jing Chen Tong-Sheng Wang Shuang

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 72, 108701 (2023) DOI: 10.7498/aps.72.20230187

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7498/aps.72.20230187>

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-molecule technology

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

聚二甲基硅氧烷微流道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>

等离子共振能量转移与增强光催化研究进展

Plasmon resonance energy transfer and research progress in plasmon-enhanced photocatalysis

物理学报. 2019, 68(14): 147301 <https://doi.org/10.7498/aps.68.20190276>

外电场操控单分子的偶极取向极化特性研究

Dipole orientation polarization property of single-molecule manipulated by external electric field

物理学报. 2019, 68(12): 128201 <https://doi.org/10.7498/aps.68.20190361>

单分子尺度的光量子态调控与单分子电致发光研究

Single-molecule electroluminescence and its relevant latest progress

物理学报. 2018, 67(22): 223301 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20181718>

转录机器: 绳上舞者

Transcription apparatus: A dancer on a rope

物理学报. 2020, 69(24): 248702 <https://doi.org/10.7498/aps.69.20201631>