

基于线性荧光探针对 T4 DNA 连接酶的活性分析

刘 斌, 羊小海, 王柯敏, 谭蔚泓

(湖南大学化学生物传感与计量学国家重点实验室, 化学化工学院, 生命科学与技术研究院,
生物纳米与分子工程湖南省重点实验室, 长沙 410082)

摘要 利用线性荧光探针作为核酸连接反应的模板和信号分子, 通过实时监测荧光信号的降低来表征连接产物的生成过程, 从而建立了一种连续、简单且特异性高的 T4 DNA 连接酶活性分析的新方法, 检出限可达 1.2 U/mL; 同时, 该方法还可用于快速考察金属离子和化学药物对酶促反应的影响. 实验结果表明, 该法不仅为灵敏、实时监测核酸连接反应提供了一种简便快捷的非同位素分析方法, 也为开展核酸连接酶活性分析、反应动力学机制探讨和药物快速筛选提供了一种新技术.

关键词 线性荧光探针; T4 DNA 连接酶; 实时监测

中图分类号 O657 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2010)03-0463-05

连接酶除了用于基因克隆、载体制备以及核酸分析外^[1~3], 还能参与 DNA 损伤修复以及染色体重组等重要生命过程的调节^[4,5]. 临床研究也表明, 连接酶的活性水平与乳腺癌及恶性胶质瘤等肿瘤的发病机制密切相关, 抑制连接酶的活性不仅能降低肿瘤侵袭转移能力, 还能显著提高肿瘤细胞的药敏性^[6,7], 因此, 定量分析连接酶活性对开展肿瘤的早期诊断和预后评估具有重要意义.

目前, 常用放射性标记法分析酶活性, 但该方法费时费力, 无法连续监测反应过程^[1,8]. 而基于荧光技术发展的分子信标法及 AP 标记法虽然简单快速, 但探针设计复杂, 成本高, 检测过程中容易产生假阳性信号^[3,9], 无法满足人们研究的不同需求. 新的线性荧光探针具有设计简单及长度和碱基组成可变化大的优点, 已被用于多种生物大分子的检测研究^[10,11]. 本文以这种探针作为模板, 通过实时监测连接过程中伴随的信号变化发展了一种简单、快速的连接酶活性分析新方法, 为连接酶研究提供了一种新途径.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

荧光探针由大连 Takara 工程公司合成, 其碱基序列及标记类型见表 1.

Table 1 Sequence of probes and DNA strands

Probe	Sequence	Probe	Sequence
P1	5'-CACGCCATGTCGAAATCTTAAGTGC-3'-DABCYL	P4	TAMRA-5'-GCACTT-3'
P2	5'-AAGAATTTTCGACATGGCGCGTG-3'	P5	TAMRA-5'-GCACTTAAGAATTTTCGACATGGCGCGTG-3'
P3	P-5'-AAGAATTTTCGACATGGCGCGTG-3'		

T4 DNA 连接酶(大连 Takara 工程公司); DTT 和 Tris(BBI 公司); Acr: Bis(29:1, Bio-Rad 公司); 其它试剂均为国产分析纯.

收稿日期: 2009-11-09.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 90606003, 20805012), 国家“八六三”计划项目(批准号: 2007AA022007)和湖南省杰出青年科学基金(批准号: 08JJ1002)资助.

联系人简介: 王柯敏, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事纳米及分子水平上的生物分析化学及纳米生物技术研究.

E-mail: kmwang@hnu.cn

FL-2500 荧光光度计(日本 Hitachi 公司); Thermo Nealab 恒温水浴箱(美国); Image MasterVDS-CL 凝胶成像系统(Amersham Bioscience, 美国); BHC-1300IIA/B3 超净工作台(中国苏净集团安泰公司); DYC-31D 垂直电泳槽(北京市六一仪器厂)。

1.2 双链探针荧光性能的考察

将完全互补的 P1 和 P5 探针分别溶于 50 μL 杂交缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 5 mmol/L MgCl_2) 中, 按等摩尔浓度混匀后, 用杂交缓冲液稀释至终浓度为 125 nmol/L。取 400 μL 混合液, 于 94 $^\circ\text{C}$ 变性 2 min, 37 $^\circ\text{C}$ 恒温 10 min 后进行波长扫描。以终浓度相同(125 nmol/L)的 P1, P3 和 P4 探针混合样品和仅含 P1 探针溶液的样品作为对照进行波长扫描, 考察 P1P5 双链探针发生荧光共振能量转移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)的效率。

1.3 T4 DNA 连接酶催化反应的实时监测和影响因子的考察

实时监测连接反应的实验包括 2 个对照(1#和 2#)和 1 个连接反应样品(3#), 其中 1#样品含有 P1, P2 和 P4 探针, 2#样品含有 P1 和 P5 探针, 3#样品含有 P1, P3 和 P4 探针。所有样品中的探针浓度均为 125 nmol/L, 体积为 400 μL 。将 1#, 2#和 3#样品于 25 $^\circ\text{C}$ 恒温 10 min, 待溶液荧光信号稳定后, 在 1#和 3#样品中分别加入 2U T4 DNA 连接酶后进行时间扫描, 同步监测溶液荧光信号的变化。

金属离子和化学药物的存在可能影响连接反应初速度。在总体积为 400 μL , P1, P3 和 P4 探针终浓度为 125 nmol/L 的溶液中加入不同的金属离子或药物, 然后加入 2U T4 DNA 连接酶, 同步监测溶液荧光信号变化, 根据荧光曲线计算不同样品的反应初始速度。以对照样品反应初速度为 1, 对样品的反应初始速度进行归一化处理, 考察不同因子对连接反应的影响。

1.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳实验

在 125 nmol/L 的 P1, P3 和 P4 探针溶液 [66 mmol/L Tris-HCl (pH = 7.6), 5 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L ATP] 中加入 2U T4 DNA 连接酶, 反应 30 min 后, 加入 EDTA 至终浓度为 20 mmol/L, 终止反应 5 min, 取连接酶加入前后的样品各 5 μL , 在 16% 的聚丙烯酰胺凝胶上恒压电泳 3 h, 取下凝胶, 于 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EB 染色液中染色, 在 Image VDS-CL 系统上观察测定。

1.5 T4 DNA 连接酶分析

所有分析样品体积均为 400 μL , P1, P3 和 P4 探针终浓度均为 125 nmol/L。实时监测样品在 25 $^\circ\text{C}$ 条件下的荧光信号强度, 待信号稳定后用微量进样器分别加入不同浓度的 T4 DNA 连接酶并快速混匀, 同步记录荧光信号变化, 每个样品重复 3 次。T4 DNA 连接酶在 4 $^\circ\text{C}$ 下用连接酶稀释液温和稀释。

1.6 连接反应的动力学分析

所有分析样品的体积均为 150 μL , 改变 P1, P3 和 P4 探针的浓度, 使底物浓度从 16.5 nmol/L 逐渐增至 135 nmol/L, 实时监测样品在 25 $^\circ\text{C}$ 条件下的荧光信号强度, 待信号稳定后用微量进样器在每个样品中分别加入 2U T4 DNA 连接酶, 快速混匀, 每个样品重复 3 次, 同步记录不同底物浓度条件下的荧光信号变化曲线, 根据荧光曲线计算出不同浓度底物对应的反应初始速度。

1.7 荧光信号的测定

荧光探针标记的 TAMRA 的最大激发波长为 521 nm, 最大发射波长为 578 nm, 因此所有荧光强度的测定均采用 521 nm 波长光激发, 检测 578 nm 的发射荧光信号, 仪器的入射狭缝和发射狭缝分别设为 5 和 10 nm。所有样品均在 25 $^\circ\text{C}$ 恒温至荧光信号值稳定后, 加入 T4 DNA 连接酶快速混匀并开始监测荧光信号变化。

2 结果与讨论

2.1 实验设计原理

实验原理如图 1 所示, 检测体系由一条 DNA 长链和两条 DNA 短链组成, 长链的 3' 末端标记 DABCYL, 一条短链 5' 端标记 TAMRA, 另一条短链 5' 端进行磷酸化处理。在连接酶作用下, 两条 DNA 短链与 DNA 长链之间形成稳定的 DNA 双链分子, 使 TAMRA 和 DABCYL 相互靠近导致 FRET 发生, 相应地引起溶液荧光信号下降, 因此根据荧光信号变化可实时监测连接反应过程。

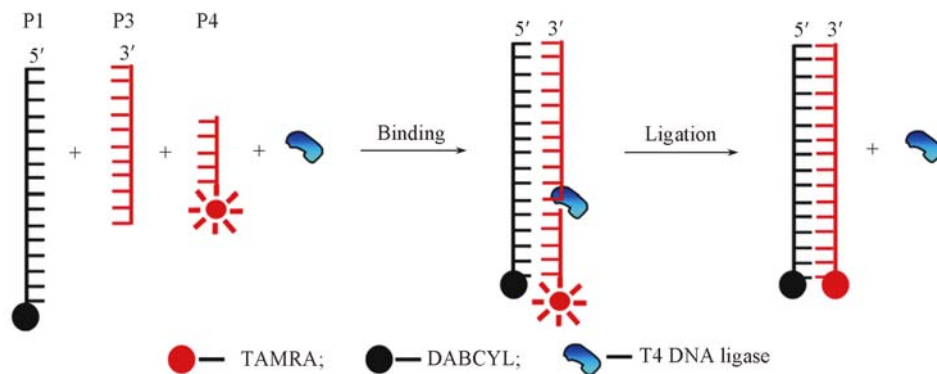


Fig. 1 Schematic diagram of real-time monitoring ligation based on dual-stranded probe

2.2 线形荧光探针发生 FRET 的效率检测

根据发射光谱表征 P1P5 双链荧光探针 (P1P3P4 发生连接反应形成的产物) 之间发生 FRET 效率的高低. 图 2 曲线 *a* ~ *c* 分别代表未加连接酶的 P1P3P4 探针、P1 探针和 P1P5 探针溶液 (代替连接反应后的 P1P3P4 探针) 的发射光谱. 从曲线 *c* 可以看出, P1P5 探针之间形成的稳定双链结构使荧光基团和荧光猝灭基团相互靠近发生 FRET, 导致在 578 nm 处的荧光信号显著降低. 没有连接酶存在时, P1P3P4 探针溶液中的 P1 探针处于游离状态, 溶液发射光谱 (曲线 *a*) 与单独的 P1 探针溶液发射光谱 (曲线 *b*) 类似, 在 578 nm 处的荧光信号强度为曲线 *c* 的 20 倍. 表明线形荧光探针 P1P5 形成双链后探针的荧光基团与荧光猝灭基团之间能产生高效的 FRET, 使其具有高灵敏性.

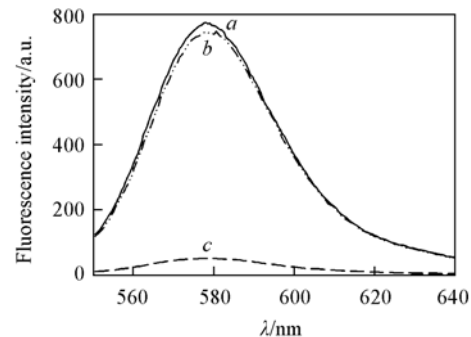


Fig. 2 Emission spectra of different probes

a. P1P3P4 probe; *b.* P1 probe; *c.* P1P5 probe.

2.3 T4 DNA 连接酶催化反应的实时监测

实时监测连接反应的结果如图 3(A) 所示. 1#样品中的 P2 探针与 3#样品中的 P3 探针序列相同, 但 5' 端未进行磷酸化修饰, 因此无法发生连接反应, 加入连接酶不会引起溶液荧光信号的改变 (曲线 *a*); 而 3#样品的荧光信号随连接酶的加入逐渐降低 (曲线 *c*), 接近 2#样品 (P1P5 探针溶液) 的荧光信号 (曲线 *b*), 表明连接酶将 P1, P3 和 P4 探针连接形成的双链能产生 FRET, 引起溶液荧光信号的下降, 为此可实现连接反应的实时监测.

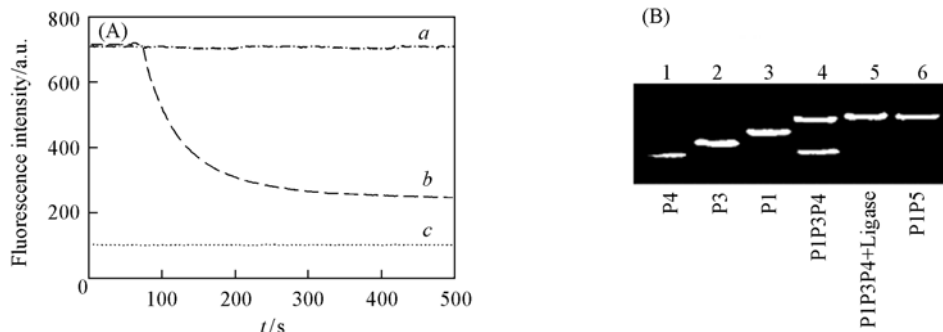


Fig. 3 Real-time monitoring ligation of double-stranded probe (A) and SDS-PAGE electrophoresis (B)

a. P1P2P4 probe with T4 DNA ligase; *b.* P1P3P4 probe with T4 DNA ligase; *c.* P1P5 probe

连接反应产物的电泳结果如图 3(B) 所示, 泳道 1 ~ 3 分别代表 P4, P3 和 P1 探针, 泳道 4 和 5 分别代表 P1P3P4 探针加入 T4 DNA 连接酶前后的产物, 泳道 6 为 P1P5 探针. 从图 3(B) 中可以看出, 连接反应形成的 P1P3P4 探针 (泳道 5) 与 P1P5 探针产物的大小、构象完全相同, 两条泳道处于平行位

置;泳道4中P1P3之间能形成双链结构,电泳位于P1与P1P5之间,游离的P4探针与泳道1的条带平行.电泳结果证明,荧光分析方法可快速、准确、实时地监测酶促反应过程.

2.4 金属离子对连接反应的影响

金属离子(如 Mg^{2+} 等)能促进T4 DNA连接酶-底物中间产物的形成,使连接酶的活性升高^[12,13].而 Fe^{2+} 及 Fe^{3+} 等离子却能抑制T4 DNA连接酶的活性^[13].

考察了 Mn^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对连接反应的影响.将离子浓度设置为0.5和5 mmol/L,以0.5 mmol/L浓度 Mg^{2+} 存在时的反应初始速度作为对照.图4结果表明,在低离子浓度条件下, Co^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 抑制连接反应能力逐渐增强,而 Mn^{2+} 却能促进连接反应发生,使连接反应的初始速度提高了20%;在5 mmol/L浓度条件下, Mg^{2+} 对连接反应初始速度不产生影响,其它金属离子对连接反应均有抑制作用,反应初始速度至少降低30%以上,其中 Fe^{3+} 几乎完全抑制了连接酶的活性.

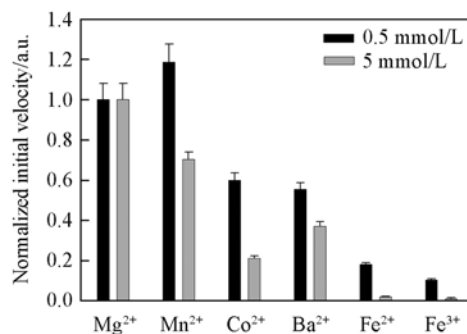


Fig. 4 Effects of metal ions on T4 DNA ligase

2.5 抗肿瘤药物对DNA连接反应的影响

作为酶促反应的抑制剂,长春新碱、环磷酰胺、博莱霉素和丝裂霉素主要是通过改变DNA底物的构象来抑制酶促反应的^[14~17],庆大霉素则能与聚合酶形成复合物直接抑制酶促反应^[18].从不同药物(10 mmol/L)对连接反应影响的结果可见,长春新碱使连接反应初始速度降低20%,博莱霉素、丝裂霉素和环磷酰胺使连接反应初始速度分别降低了40%,51%和70%,庆大霉素使连接酶的活性几乎完全丧失.以上结果表明,该方法可用于以连接酶为靶点的抗肿瘤药物的筛选.

2.6 T4 DNA连接酶的活性分析

图5为不同浓度T4DNA连接酶催化反应的荧光曲线.可见随着时间的延长和底物浓度的降低,连接反应初始速度逐渐变缓.当酶浓度在1.17~23.33 U/mL范围内时,连接反应初始速度与酶浓度成正比,即 $V_0 = 0.42c$,其中反应初始速度 V_0 用荧光单位/s表示, c 为T4 DNA连接酶浓度,单位为U/mL.根据溶液荧光信号的变化确定连接酶检出限为1.17 U/mL(荧光信号大于本底噪声3倍).

进一步考察连接酶反应动力学过程,从实验结果可见,连接反应达到平台期之前,反应初始速度随底物浓度升高而相应加快.以反应初始速度倒数对底物浓度倒数作图,计算出 K_m 和 K_{cat} 值分别为 $(1.18 \pm 0.06) \mu\text{mol/L}$ 和 40 min^{-1} .由于底物序列、测定方法和条件的差异,T4 DNA连接酶参数 K_m 和 K_{cat} 常在 $0.09 \sim 50 \mu\text{mol/L}$ 和 $38 \sim 300 \text{ min}^{-1}$ 范围内变化^[1,12,19,20].以上结果表明,该方法也可用于连接酶反应动力学过程的考察.

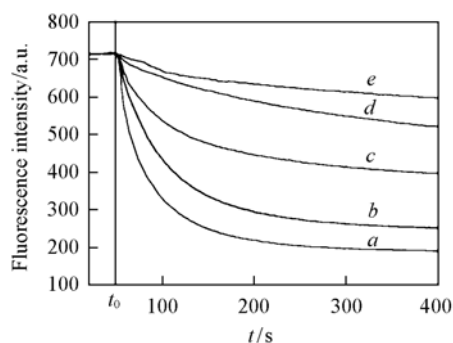


Fig. 5 Quantitative analysis of T4 DNA ligase

Concentration of T4DNA ligase/(U · mL⁻¹):

a. 1.17; b. 2.34; c. 9.99; d. 11.67;

e. 23.33.

3 结 论

基于线性荧光探针发展了一种T4 DNA连接酶活性分析的新方法.作为检测分子的线性探针在连接酶作用下形成双链探针的过程可引起荧光信号降低.通过监测连接反应发生时的信号变化,可获取丰富的反应动力学信息.这种简单、快速、安全的新方法不仅为分析连接酶活性提供了一种新思路,而且为筛选针对连接酶活性异常引起的恶性肿瘤的治疗药物提供了一种新手段.

参 考 文 献

- [1] Nilsson M. , Antson D. O. , Barbany G. , *et al.* . Nucleic Acids Res. [J] , 2001 , **29**(2) : 578—581
- [2] Tang H. X. , Yang X. H. , Wang K. M. , *et al.* . Talanta[J] , 2008 , **75**(5) : 1388—1393
- [3] Tang Z. W. , Wang K. M. , Tan W. H. , *et al.* . Nucleic Acids Res. [J] , 2005 , **35**(16) : 5294—5302
- [4] Song W. , Pascal J. M. , Ellenberger T. , *et al.* . DNA Repair[J] , 2009 , **8**(8) : 912—919
- [5] Jia L. J. , Soengas M. S. , Sun Y. . Cancer Res. [J] , 2009 , **69**(12) : 4974—4982
- [6] Yu J. , Ding S. L. , Chang C. , *et al.* . Carcinogenesis[J] , 2009 , **30**(9) : 1562—1570
- [7] Ortiz T. , Flores M. J. , Pinero J. , *et al.* . Cytogenet Cell Genet[J] , 1997 , **78**(3/4) : 197—201
- [8] Glasner M. E. , Bergman N. H. , Bartel D. P. . Biochemistry[J] , 2002 , **41**(25) : 8103—8112
- [9] LIU Ling-Feng(刘凌凤) , TANG Zhi-Wen(唐志文) , WANG Ke-Min(王柯敏) , *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J] , 2003 , **24**(10) : 1761—1764
- [10] Liu B. , Yang X. H. , Wang K. M. , *et al.* . Anal. Biochem. [J] , 2007 , **366**: 237—243
- [11] Yi J. Z. , Zhang W. D. , Zhang D. Y. . Nucleic Acids Res. [J] , 2006 , **34**(11) : e81
- [12] Tong J. , Cao W. G. , Barany F. . Nucleic Acids Res. [J] , 1999 , **27**(3) : 788—794
- [13] Ferrer M. , V. Golyskina O. , Belouqui A. , *et al.* . Proc. Natl. Acad. Sci. [J] , 2008 , **105**(26) : 8878—8883
- [14] Zhu Y. , Zeng H. , Xie J. M. , *et al.* . Microscopy and Microanalysis[J] , 2004 , **10**(2) : 286—290
- [15] Rink S. M. , Lipman R. , Alley S. C. , *et al.* . Chem. Res. Toxicol. [J] , 1996 , **9**(2) : 382—389
- [16] Xu H. , Johnston S. A. . J. Biol. Chem. [J] , 1994 , **269**(33) : 21177—21183
- [17] Li V. S. , Choi D. , Tang M. S. , *et al.* . J. Am. Chem. Soc. [J] , 1996 , **118** (15) : 3765—3766
- [18] Naryshkina T. , Mustaev A. , Darst S. A. , *et al.* . J. Biol. Chem. [J] , 2001 , **276**: 13308—13313
- [19] Raae A. J. , Kleppe R. K. , Klepp K. . Eur. J. Biochem. [J] , 1975 , **60**(2) : 437—443
- [20] Sugino A. , Goodman H. M. , Heyneker H. L. , *et al.* . J. Biol. Chem. [J] , 1977 , **252**(11) : 3987—3994

Activity Analysis of T4 DNA Ligase Based on Linear Fluorescence Probes

LIU Bin , YANG Xiao-Hai , WANG Ke-Min* , TAN Wei-Hong

(State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics, Biomedical Engineering Center, College of Chemistry and Chemical Engineering, Key Laboratory for Bio-Nanotechnology and Molecular Engineering of Hunan Province, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract A continuous, simple method with high specificity for analyzing T4 DNA ligase activity is introduced by monitoring the fluorescence change in real time. Linear DNA probes that can occur in fluorescent resonance energy transfer were used as templates and detecting probes in a homogeneous solution. The limit of detection of T4 DNA ligase was 1.2 U/mL, the K_M and K_{cat} were $(1.18 \pm 0.06) \mu\text{mol/L}$ and 40 min^{-1} , respectively. In addition, the method was applied to investigate the influence of chemical drugs and metal ions on T4 DNA ligase activity. This method not only overcame the drawbacks of traditional radioactive assays, such as discontinuity and being time-consuming and complicated, but also can be applied to the activity assay, kinetics investigation and drug screening of other ligases.

Keywords Linear fluorescence probe; T4 DNA ligase; Real-time monitoring

(Ed. : A, G)