

Poly d(GC)在负超螺旋下形成的 Z-DNA

夏玉洁 吴初新 马梅生 胡成钰*

(南昌大学生命科学与食品工程学院, 南昌 330031)

摘要 为建立一个生理状态下的左旋 DNA (Z-DNA)模型, 本文以 pMD18-T 质粒为母本质粒, 将含有 d(GC)₆、d(GC)₈、d(GC)₁₀、d(GC)₁₃ 等 poly d(GC)片段的特殊序列插入到 pMD18-T 质粒中, 构建了 poly d(GC)重组质粒。这些 poly d(GC)重组质粒处于负超螺旋状态。甲基化抑制实验证实, 这些插入到质粒中的 poly d(GC)能够形成潜在的 Z-DNA 构象。同时, 为进一步验证 poly d(GC)重复的长度与形成 Z-DNA 效率的关系, 原核表达并亲和层析纯化了鲫鱼 PKZ Z α 多肽(P_{Z α})。凝胶阻滞实验分析了 d(GC)₆、d(GC)₈、d(GC)₁₀、d(GC)₁₃ 4 种重组质粒与 P_{Z α} 的亲合性。结果显示, P_{Z α} 对这 4 种重组质粒的迁移都能产生阻滞效应, 并且随着 GC 的增多, 阻滞效应越明显。说明 d(GC)越多, poly d(GC)形成 Z-DNA 的能力越强。

关键词 poly d(GC); Z-DNA; Z α ; 负超螺旋; PKZ

负超螺旋是使 DNA 形成左旋 DNA (Z-DNA)的诱因之一。负超螺旋能够诱发 Z-DNA 的形成可能是因为它能够提供右旋 DNA (B-DNA)翻转为 Z-DNA 必需的能量^[1,2]。体内实验也证明了负超螺旋在形成和维持 Z-DNA 构象中的重要性。在转录过程中, 移动的 RNA 聚合酶在犁开 DNA 双螺旋时, 在其 5' 侧产生的负超螺旋扭曲力能够提供 Z-DNA 形成必需的能量^[3]。此外, Z-DNA 具有强烈的核苷酸偏好性, 即交替排列的嘌呤-嘧啶区域在负超螺旋条件下才能形成 Z-DNA^[1]。

甲基化抑制实验是一种在体外鉴定 Z-DNA 的较为简洁的方法^[4,5]。SssI 甲基化酶能够甲基化修饰 d(GC)_n 序列中的胞嘧啶 N-5 位置, 而 d(GC)_n 序列中的胞嘧啶是否被甲基化能够由 HhaI 限制性内切酶来检测。如果 d(GC)_n 序列中的胞嘧啶被甲基化, 此序列则不能够被 HhaI 切开, 反之则能够切开。另外如果该序列处于 Z 型, 则不能被甲基化^[6], 因此就能为 HhaI 所识别而被切开。

Z α 是能够特异性识别并结合 Z-DNA 的蛋白结构域, 存在于 ADAR1、ZBP-1、E3L 和鱼类 PKZ 等, 其发现和报道为 Z-DNA 的研究提供了另一种途径。Z α 能够通过结合 Z-DNA 从而稳定其构象, 为 Z-DNA 功能的研究提供保证。Rothenburg 等^[7]发现斑马鱼 PKZ Z α (drZ α _{PKZ})能够结合 Z-DNA。因此, 本文体外表达、纯化获得了鲫鱼 PKZ Z α 多肽(P_{Z α}), 用于验证 Poly d(GC)在负超螺旋下, 形成 Z-DNA 的情况。

因为 Z-DNA 是一种处于高能状态的 DNA, 极不

稳定。之前 Z-DNA 系统都是在一些盐、金属复合物的条件下形成的, 因此, 很难准确地反映它在生理状态下的情况。利用构建 d(GC)_n 重组质粒的方法可能会解决这些问题。为建立一个生理状态下的 Z-DNA 模型和验证 poly d(GC)重复的长度与形成 Z-DNA 效率的关系。本文一方面利用甲基化抑制实验对 poly d(GC)重组质粒形成 Z-DNA 进行了验证, 另一方面利用凝胶阻滞实验分析了体外表达 P_{Z α} 与重组质粒 d(GC)₆、d(GC)₈、d(GC)₁₀、d(GC)₁₃ 的亲合性。结果显示, Poly d(GC)重组质粒能够形成“潜在”的 Z-DNA, 而且形成 Z-DNA 的能力随 d(GC)的增加而增强。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司; pET-22b(+)购自 Novagen 公司; DH5 α 由中科院水生生物研究所桂建芳实验室惠赠; BL21(DE3)pLysS 购自 Promage 公司。Poly d(GC)的合成、测序由上海生物工程有限公司完成。

1.1.2 主要试剂 SssI、HhaI、S-腺苷甲硫氨酸购自 NEB 公司。

1.2 方法

1.2.1 Poly d(GC)及其重组质粒的构建 Poly d(GC)

收稿日期: 2009-07-23 接受日期: 2009-10-27

国家自然科学基金资助项目(No.30560116, No.30860218)

* 通讯作者。Tel: 0791-8785566, E-mail: hucy2008@21cn.com

的序列如下, $d(GC)_6$: 5'-CTGATAGAATTC(GC)₆-GAATTCTATCAGA-3'; $d(GC)_8$: 5'-CTGAT-ACTACATTGAATTC(GC)₈GAATTCAATGTAGT-ATCAGA-3'; $d(GC)_{10}$: 5'-CTGATACTACATTGAATTC(GC)₁₀GAATTCAATGTAGTATCAGA-3'; $d(GC)_{13}$: 5'-CTGATACTACATTGAATTC(GC)₁₃GAATTCA-ATGTAGTATCAGA-3'.

将合成的 $d(GC)_6$ 、 $d(GC)_8$ 、 $d(GC)_{10}$ 、 $d(GC)_{13}$ 序列在退火缓冲液(10 mmol/L Tris、50 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA, pH 7.6)中 95 °C 加热 2 min 后自然冷却, 形成在 3' 末端突出 1 个 A 的双链 DNA, 连接到 pMD18-T 质粒上。将得到的重组质粒转化到感受态 DH5 α 细胞, 涂布 LB 平板。挑克隆后, PCR 筛选阳性克隆, 测序验证质粒载有上述片段, 构建 poly d(GC) 重组质粒。

1.2.2 甲基化抑制实验 (1) 将 $d(GC)_6$ 、 $d(GC)_8$ 、 $d(GC)_{10}$ 、 $d(GC)_{13}$ 重组质粒(500 ng) 分别经 *HhaI* 限制性内切酶 37 °C 酶切过夜, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。(2) 将 10 μ l $d(GC)_6$ 、 $d(GC)_8$ 、 $d(GC)_{10}$ 、 $d(GC)_{13}$ 重组质粒(500 ng), 分别加 10 μ l 用 10 \times NEBuffer 2 配制的溶液, 其中含有 1 U *SssI* 甲基化酶和 6.4 mmol/L *S*-腺苷甲硫氨酸, 37 °C 水浴 1 h, 反应产物用 PCR 纯化试剂盒纯化, 纯化产物再用 *HhaI* 限制性内切酶 37 °C 酶切过夜, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 $P_{Z\alpha}$ 多肽的获得 参照鲫鱼 PKZ^[8] 的序列特征, 设计引物克隆 $Z\alpha$ cDNA 并与 pET-22b(+) 载体连接。转化表达质粒的 BL21(DE3)pLysS 接入 2 ml 含氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 °C 振荡培养过夜。而后接种于 200 ml 含 20 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 °C 振荡培养, 当检测菌液 A_{600} 为 0.6~0.8 时, 经 1 mmol/L IPTG 诱导, 37 °C 继续培养 4~6 h。

取诱导菌液在 4 °C 下, 6 000 r/min 离心 10 min, 菌体沉淀用 12 ml 1 \times 结合缓冲液(His-Bind Kit 操作手册)重悬, 超声波破碎, 在 4 °C 下, 12 000 r/min 离心 30 min。取上清液通过 His-Bind 树脂亲和层析的方法纯化目的多肽。纯化多肽在缓冲液(20% 甘油、150 mmol/L NaCl、1 mmol/L DTT、0.5 mmol/L EDTA、20 mmol/L HEPES, pH 7.5)中透析过夜, -80 °C 保存备用。

1.2.4 凝胶阻滞实验 表达多肽和重组质粒的浓度分别为 60.0 μ g/ml 和 30.0 μ g/ml。在 20 μ l 体系中, 纯化的多肽 $P_{Z\alpha}$ (16 μ l) 与 4 种 Poly d(GC) (4 μ l) 重组质粒混合。置室温 1 h, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检

测。设置不加 $P_{Z\alpha}$ 的重组质粒作对照。如果 $P_{Z\alpha}$ 与重组质粒发生结合, 则在电泳中重组质粒迁移率下降, 相应的条带发生滞后。

2 结果

2.1 Poly d(GC) 重组质粒的构建

母本质粒 pMD18-T 分别插入 $d(GC)_6$ 、 $d(GC)_8$ 、 $d(GC)_{10}$ 、 $d(GC)_{13}$ 片段, 成功构建了负超螺旋状态的重组质粒, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 1)。

2.2 在负超螺旋的状态下, poly d(GC) 能够形成 Z-DNA

母本 pMD18-T 及 poly d(GC) 重组质粒, 先直接用 *HhaI* 酶切, 由于除了 poly d(GC) 外, 载体上还存在着 15 个 $d(GCGC)$ 酶切位点, 所以整个重组质粒被切得很碎(图 2, 泳道 3、6、9、12、15)。将母本 pMD18-T 及重组质粒先与 *SssI* 甲基化酶温育再用 *HhaI* 酶切, 质粒在很大程度上被切成线性(图 2, 泳道 2、5、8、11、14), 表明重组质粒由于 poly d(GC) 插入序列形成 Z 形构象而没有被甲基化。但是, 由于母本质粒上的 GC 甲基化程度并非完全, 有些位点未能被 *SssI* 甲基化。而且, 插入序列 $d(GC)_n$ 形成 Z 形构象的效

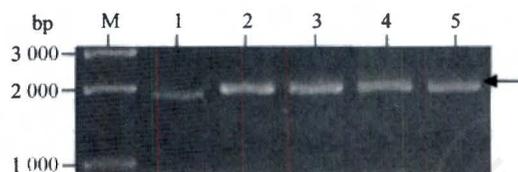


Fig.1 Gel electrophoresis for construction of recombinant plasmids

M: 1 kb DNA ladder marker; 1: control, just cyclized pMD18-T; 2: pMD18-T/ $d(GC)_6$; 3: pMD18-T/ $d(GC)_8$; 4: pMD18-T/ $d(GC)_{10}$; 5: pMD18-T/ $d(GC)_{13}$.

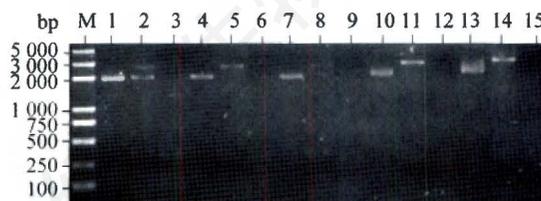


Fig.2 The methylate inhibitory analysis

M: DL2000 DNA marker; 1, 4, 7, 10, 13: pMD18-T, pMD18-T/ $d(GC)_6$, pMD18-T/ $d(GC)_8$, pMD18-T/ $d(GC)_{10}$, pMD18-T/ $d(GC)_{13}$; 2, 5, 8, 11, 14: pMD18-T, pMD18-T/ $d(GC)_6$, pMD18-T/ $d(GC)_8$, pMD18-T/ $d(GC)_{10}$ and pMD18-T/ $d(GC)_{13}$ were methylated by *SssI* methylase and then cleaved by *HhaI*; 3, 6, 9, 12, 15: pMD18-T, pMD18-T/ $d(GC)_6$, pMD18-T/ $d(GC)_8$, pMD18-T/ $d(GC)_{10}$ and pMD18-T/ $d(GC)_{13}$ were cleaved by *HhaI*.

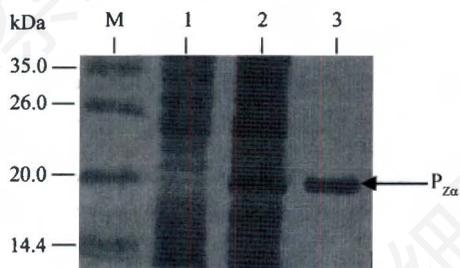


Fig.3 Prokaryotic expression and purification of $P_{Z\alpha}$

M: mid-range protein molecular weight marker; 1: control; 2: induced expression of $P_{Z\alpha}$ by IPTG; 3: purified $P_{Z\alpha}$. The molecular weight of expressed peptides $P_{Z\alpha}$ is 18 kDa.

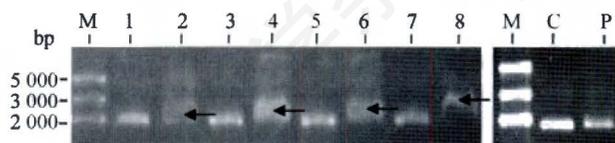


Fig.4 Bandshift assay analysis

M: DL2000 DNA marker; 1, 3, 5, 7: pMD18-T/d(GC)₆, pMD18-T/d(GC)₈, pMD18-T/d(GC)₁₀, pMD18-T/d(GC)₁₃; 2, 4, 6, 8: pMD18-T/d(GC)₆, pMD18-T/d(GC)₈, pMD18-T/d(GC)₁₀, pMD18-T/d(GC)₁₃ binding to $P_{Z\alpha}$; C: pMD18-T alone; P: pMD18-T binding to $P_{Z\alpha}$.

率并非 100%。因此, 图 2 中泳道 2、5、8、11、14 的下方还有许多被 *HhaI* 酶切的条带。

2.3 $P_{Z\alpha}$ 的纯化

取转化成功的 DE3 菌液经 IPTG 诱导表达获得预期大小的融合蛋白(箭头所示)。采用 His-Bind 树脂进行亲和纯化后, 得到了纯化的融合蛋白 $P_{Z\alpha}$ 。 $P_{Z\alpha}$ 的分子量约为 18 kDa, 与预期的一致(图 3)可以用作下步实验。

2.4 $P_{Z\alpha}$ 与 poly d(GC)重组质粒的结合

凝胶阻滞分析了 $P_{Z\alpha}$ 与 4 种 poly d(GC)重组质粒和母本质粒 pMD18-T 的亲合性(图 4)。结果显示, $P_{Z\alpha}$ 与 pMD18-T 不结合, 而对 4 种重组质粒的迁移都产生阻滞效应, 且随着 GC 含量的增加, 阻滞效应越明显(箭头所示)。

3 讨论

与 d(TA)相比, d(GC)更容易形成 Z-DNA。因此, d(GC)一直被作为一种能够形成潜在的 Z-DNA 序列广泛地被研究。实验表明 d(GC)还要通过其他的条件才能形成 Z-DNA。如 Poly(dG-dC)在高浓度的 NaCl 溶液^[9,10]、低浓度的 MgCl₂ 溶液中^[9,11]能形成 Z-DNA。此外, 金属氨基酸复合物 Eu(-L-Asp)在生理状态的 pH 下能够识别非 B 型 DNA^[12], 并能在低盐的条件下把 B 型的 poly d(GC)₂ 转变成 Z 型^[13], 等等。

然而, 利用这些方法形成的 Z-DNA 分子虽然用于热物理学性质的分析没有问题, 但却很难反映细胞内真实状态的 Z-DNA。近年来随着分子生物学、基因组学的飞速发展, 使人们有机会了解 Z-DNA 的生物学功能^[14]。

不仅在体外, Z-DNA 在体内也广泛存在, 并可能具有十分重要的生物学功能^[15]。Z-DNA 与转录激活、诱发遗传的不稳定性等相关, 此外, Z-DNA 还可能参与基因重组、抗病毒等生物学过程^[16,17]。因此, 对 Z-DNA 的研究一直是分子遗传学的一个热点问题。但由于 Z-DNA 具有不稳定的物理性质, 很难获得天然或具有活性的 Z-DNA。所以, 建立一个比较稳定的 Z-DNA 体系非常重要。

研究表明, 由转录所产生的负超螺旋可以稳定细胞中的 Z-DNA, 电泳或 2D 电泳均显示质粒常态下多呈现为负超螺旋, 因此, d(GC)_n 重组质粒能在体外形成 Z-DNA^[18]。在本研究中, 甲基化抑制实验也表明 poly d(GC)在重组质粒中能够形成 Z-DNA (图 2)。而破坏母本质粒的负超螺旋, d(GC)₁₃重组质粒不能形成 Z-DNA^[19]。以上结果证实负超螺旋和 d(GC)可能是形成生理状态 Z-DNA 的必备条件。

GC 重复序列的长度也与 Z-DNA 的形成有关。虽然 Schwartz 等^[20]发现 6 bp 可能是形成 Z-DNA 的最小结构单位。但 Kim 等^[5]研究表明只要 n>2 的(GC)_n 重复序列都具有转变成 Z-DNA 的能力。因此, 能够形成 Z-DNA 所需的 d(GC)数目要求不多。Oh 等^[21]在研究人 ADAR1 的 Z α 分别与包含 0、4、5、9、12 个 d(GC)重复序列的重组质粒结合时, 发现下游报告基因 *LacZ* 的表达量与 GC 重复序列的含量成正比。从分子机制来看, Lushnikov 等^[18]认为 d(GC)越多, 形成 Z-DNA 所需的能量越少。本文的结果也显示, 形成 Z-DNA 的能力随 GC 数量的增多而变强(图 3), 而且随着 GC 数量的增多, $P_{Z\alpha}$ 与 d(GC)重组质粒的阻滞效果越明显(图 4)。因此, d(GC)的数目可能会影响其 Z-DNA 形成的效率, 即 d(GC)越长, 形成 Z-DNA 的效率越高。

参考文献(References)

- [1] Klysik J, Stürdivant SM, Larson JE, *et al.* Left-handed DNA in restriction fragments and a recombinant plasmid, *Nature*, 1981, 290(5808): 672-677
- [2] Zacharias W, O'Connor TR, Larson JE. Methylation of cytosine in the 5-position alters the structural and energetic properties of the supercoil-induced Z-helix and of B-Z junctions, *Biochemistry*, 1988, 27(8): 2970-2978
- [3] Liu LF, Wang JC. Supercoiling of the DNA template during

- transcription, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(20): 7024-7027
- [4] Vardimon L, Rich A. In Z-DNA the sequence G-C-G-C is neither methylated by HhaI methyltransferase nor cleaved by HhaI restriction endonuclease, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81(11): 3268-3272
- [5] Kim YG, Lowenhaupt K, Maas S, *et al.* The zab domain of the human RNA editing enzyme ADAR1 recognizes Z-DNA when surrounded by B-DNA, *J Biol Chem*, 2000, 275(35): 26828-26833
- [6] Vardimon L, Rich A. *In vitro* methylation of B-DNA and Z-DNA, *Prog Clin Biol Res*, 1985, 198: 23-35
- [7] Rothenburg S, Deigendesch N, Dittmar K, *et al.* A PKR-like eukaryotic initiation factor 2 α kinase from zebrafish contains Z-DNA binding domains instead of dsRNA binding domains, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(5): 1602-1607
- [8] Hu CY, Zhang YB, Huang GP, *et al.* Molecular cloning and characterisation of a fish PKR-like gene from cultured CAB cells induced by UV-inactivated virus, *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 17(4): 353-366
- [9] Pohl FM, Jovin TM. Salt-induced co-operative conformational change of a synthetic DNA: equilibrium and kinetic studies with poly (dG-dC), *J Mol Biol*, 1972, 67(3): 375-396
- [10] Thamann TJ, Lord RC, Wang AH, *et al.* The high salt form of poly (dG-dC)-poly(dG-dC) is left-handed Z-DNA: Raman spectra of crystals and solutions, *Nucleic Acids Res*, 1981, 9(20): 5443-5457
- [11] Behe M, Felsenfeld G. Effects of methylation on a synthetic polynucleotide: the B-Z transition in poly(dG-m5dC)-poly(dG-m5dC), *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(3): 1619-1623
- [12] Brahms S, Brahms JG. DNA with adenine tracts contains poly (dA)-poly(dT) conformational features in solution, *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(6): 1559-1564
- [13] Qu X, Trent JO, Fokt I, *et al.* Allosteric, chiral-selective drug binding to DNA, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(22): 12032-12037
- [14] Rich A, Zhang S. Timeline: Z-DNA: the long road to biological function, *Nat Rev Genet*, 2003, 4(7): 566-572
- [15] 汤雅男, 杨攀, 胡成钰. Z-DNA 及其生物学功能, *生命科学*, 2009, 21(1): 72-75
- [16] Wong B, Chen S, Kwon JA, *et al.* Characterization of Z-DNA as a nucleosome-boundary element in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(7): 2229-2234
- [17] Wang G, Christensen LA, Vasquez KM. Z-DNA-forming sequences generate large-scale deletions in mammalian cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(8): 2677-2682
- [18] Lushnikov AY, Brown BA 2nd, Oussatcheva EA, *et al.* Interaction of the Z α domain of human ADAR1 with a negatively supercoiled plasmid visualized by atomic force microscopy, *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(15): 4704-4712
- [19] 陶敏, 吴初新, 杨攀, 等. 鲫鱼 PKR-like Z α 与 d(GC)₁₃ 质粒的结合及其适应性进化, *细胞生物学杂志*, 2008, 30(4): 494-498
- [20] Schwartz T, Rould MA, Lowenhaupt K, *et al.* Crystal structure of the Z α domain of the human editing enzyme ADAR1 bound to left-handed Z-DNA, *Science*, 1999, 284(5421): 1841-1845
- [21] Oh DB, Kim YG, Rich A. Z-DNA-binding proteins can act as potent effectors of gene expression *in vivo*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(26): 16666-16671

Formation of Z-DNA in Poly d(GC) in the Presence of Negatively Supercoil

Yu-Jie Xia, Chu-Xin Wu, Mei-Sheng Ma, Cheng-Yu Hu*

(College of Life Sciences and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract In order to build a Z-DNA model in a physiological status, this study took the plasmid pMD18-T as the parental plasmid. Some special sequences consisting of such poly d(GC) segments as d(GC)₆, d(GC)₈, d(GC)₁₀ and d(GC)₁₃ were inserted into the plasmid pMD18-T, so as to form recombinant plasmid/poly d(GC). These recombinant plasmid/poly d(GC) were in a state of negatively supercoil. The poly d(GC) which was inserted into the plasmid can form the latent Z-DNA proved by methylate inhibitory experiment. Besides, in order to prove the relation between the length of poly d(GC) and the efficiency of forming Z-DNA. P_{Z α} was expressed by a prokaryotic expression system and then purified by affinity chromatography. The affinity of P_{Z α} peptides with the 4 recombinant plasmids d(GC)₆, d(GC)₈, d(GC)₁₀ and d(GC)₁₃ was analyzed by Bandshift assay. The result showed that P_{Z α} can generate the retardation effects on the transfer of the 4 recombinant plasmids. The more GC they have, the more obvious the retardation effects are. This indicates that the ability of poly d(GC) forming Z-DNA depends on the number of d(GC) repeats.

Key words poly d(GC); Z-DNA; Z α ; negatively supercoil; PKZ

Received: July 23, 2009 Accepted: October 27, 2009

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30560116, No.30860218)

*Corresponding author. Tel: 86-791-8785566, E-mail: hucy2008@21cn.com