

文章编号: 1000-5641(2012)06-0081-08

# Mg<sup>2+</sup> 对 Bloom 综合症解旋酶与 G4DNA 结合的影响研究

骆 衡<sup>1,3</sup>, 蔡明娟<sup>1,2</sup>, 陈 祥<sup>1,2</sup>, 丁 玫<sup>1,2</sup>, 李 坤<sup>1,2</sup>, 许厚强<sup>1,2</sup>

(1. 贵州大学 动物科学学院 高原山地动物遗传育种与繁殖省部共建教育部重点实验室, 贵阳 550025;

2. 贵州大学 动物科学学院 贵州省动物遗传育种与繁殖重点实验室, 贵阳 550025;

3. 贵州大学 农学院 贵州山地农业病虫害重点实验室, 贵阳 550025)

**摘要:** 利用荧光偏振技术检测了 Mg<sup>2+</sup> 对 G4DNA、BLM-G4DNA 复合物和 BLM<sup>642-1290</sup> 解旋酶与 G4DNA 结合的影响. 结果表明, G4DNA 荧光偏振值随着 Mg<sup>2+</sup> 浓度的增加而增加 ( $P < 0.01$ ); BLM-G4DNA 复合物的荧光偏振值随着 Mg<sup>2+</sup> 浓度的增加出现下降—升高—下降的变化趋势 ( $P < 0.01$ ); G4DNA 与 BLM<sup>642-1290</sup> 解旋酶结合的荧光偏振值随着 Mg<sup>2+</sup> 浓度的增加而逐渐下降 ( $P < 0.01$ ); 分析不同 Mg<sup>2+</sup> 浓度下两种分子结合的  $K_d$  值, 发现 Mg<sup>2+</sup> 浓度为 3.0 mmol/L 时, BLM<sup>642-1290</sup> 解旋酶与 G4DNA 最容易结合, 表明适量 Mg<sup>2+</sup> 浓度会促进 BLM<sup>642-1290</sup> 与 G4DNA 的结合, 但会引起两种分子结合的形状、流动性和电荷等性质的改变. 这些结果可为进一步研究 BLM 解旋酶对 G4DNA 的作用机理提供相关资料.

**关键词:** BLM 解旋酶; G4DNA; Mg<sup>2+</sup>; 荧光偏振技术

**中图分类号:** R733.7 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1000-5641.2012.06.009

## Study on the effects of Mg<sup>2+</sup> on the binding between Bloom syndrome helicase and G4DNA

LUO Heng<sup>1,3</sup>, CAI Ming-juan<sup>1,2</sup>, CHEN Xiang<sup>1,2</sup>, DING Mei<sup>1,2</sup>,

LI Kun<sup>1,2</sup>, XU Hou-qiang<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in the Plateau Mountainous Region, Ministry of Education, College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. Guizhou Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding Reproduction, College of Animal Science,

Guizhou University, Guiyang 550025, China; 3. The Provincial Key Laboratory for Agricultural Pest Management of Mountainous Region, Agricultural College, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

**Abstract:** This paper studied the effects of Mg<sup>2+</sup> on G4DNA, BLM-G4DNA complex, and the binding of BLM<sup>642-1290</sup> helicase and G4DNA using fluorescence anisotropy technology. The results

收稿日期: 2011-09

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(2010CB534912); 教育部博士点基金(200806570003); 贵州省优秀人才省长资金(200822); 贵州省国际科技合作计划项目(黔科合外 G 字[2011]7008 号); 大学生创新性实验计划项目(贵大国创字(2010)008 号)

第一作者: 骆衡, 男, 博士研究生, 研究方向为动物生理生化及分子生物学. E-mail: luohengzz@sina.com.

通信作者: 许厚强, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为细胞分子生物学. E-mail: houqiang0524@yahoo.com.

indicated that the fluorescence anisotropy of G4DNA increased with  $Mg^{2+}$  concentration ( $P < 0.01$ ); The anisotropy of BLM-G4DNA complex showed varied tendency of decrease-increase-decrease with  $Mg^{2+}$  concentration ( $P < 0.01$ ); The anisotropy of the binding between the helicase and G4DNA gradually declined following  $Mg^{2+}$  concentration ( $P < 0.01$ ); The binding was most likely to occur between the helicase and G4DNA when  $Mg^{2+}$  concentrations was 3.0 mmol/L, which suggested that the suitable amount of  $Mg^{2+}$  could promote the binding of the helicase and G4DNA but that could lead to the change of the binding properties of two molecules including the shape, flow ability, and charge. These results provided useful data for studying the interaction mechanism between BLM helicase and G4DNA.

**Key words:** BLM helicase; G4DNA;  $Mg^{2+}$ ; fluorescence polarization technology

## 0 引 言

DNA 解旋酶在 DNA 的复制、修复、重组、转录及维持染色体稳定性等细胞代谢过程中都具有非常重要的作用<sup>[1-3]</sup>. DNA 解旋酶利用催化核苷三磷酸水解所释放的化学能解开双链 DNA(dsDNA)两条链之间的氢键从而使其解链成单链<sup>[4]</sup>. RecQ 解旋酶家族是 DNA 解旋酶中的一个重要保守家族,从细菌到人类都具有很高的保守性,在维持生物体的遗传稳定性中具有重要作用<sup>[5]</sup>. 在人类中已经确定了 RECQ1、BLM、WRN、RECQ4 和 RECQ5 这 5 种 RecQ 解旋酶<sup>[6]</sup>. 其中 BLM 解旋酶缺陷会导致 Bloom 综合症(BS)<sup>[7]</sup>. BS 病人临床特征表现为身躯小、出生前或出生后引起的生长阻滞、面部有对光敏感的红斑、女性的生育能力较低、男性不育、免疫缺陷并易患多种癌症<sup>[8,9]</sup>. BLM 解旋酶对 DNA 的解链具有 3'~5'极性,且可以解开多种 DNA,包括 3'末端有缺口的 dsDNA、泡状 DNA、带有复制叉的 dsDNA、G-四链体 DNA(G4DNA)、D 型环状 DNA 及霍利迪结构 DNA<sup>[10-12]</sup>. 研究证明 BLM 解旋酶的催化核心区域(642~1290 氨基酸序列, BLM<sup>642-1290</sup>)具有与全酶的相似活性<sup>[13]</sup>.

富含鸟嘌呤碱基重复序列的 DNA 易形成四链结构,称为 G 四链体 DNA<sup>[14]</sup>,其结构见图 1. 体外研究表明,  $Na^+$  或  $K^+$  可以促进富含 G 重复序列的 DNA 形成 G 四链体结构,而在体内 G 四链体的形成可能要复杂得多<sup>[15,16]</sup>. G4DNA 由 4 个 G-四分体叠加而成,4 条平行的 DNA 链中相邻鸟嘌呤之间通过 Hoogsteen 键结合<sup>[17]</sup>. 人们发现 G4DNA 广泛存在于染色体端粒末端及一些重要肿瘤基因转录调节区,对染色体端粒稳定性的维持具有重要作用<sup>[18,19]</sup>. 研究发现端粒末端的 G4DNA 能抑制端粒酶活性,表明 G4DNA 对控制细胞具有重要作用<sup>[20]</sup>. 近年来发现大多数 RecQ 家族解旋酶能优先解链 G4DNA,暗示在细胞中 G4DNA 是这些酶的天然底物<sup>[21]</sup>. 人 RecQ 解旋酶可能直接与端粒后随链的合成有关,这对富含鸟嘌呤 G 的端粒 DNA 的有效复制和防止因端粒功能紊乱而产生的染色体不稳定具有重要意义<sup>[22,23]</sup>. 因此,研究 DNA 解旋酶对 G4DNA 的作用机理,对于了解二者在细胞内的生理功能非常重要.

BLM 解旋酶是  $Mg^{2+}$  依赖的 DNA 解旋酶,  $Mg^{2+}$  对解旋酶的生物学特性具有重要的作用<sup>[13]</sup>. 本研究选取人类端粒单链部分的 24 个碱基序列(5'-AGGGTTAGGGTTAGGGT-TAGGGTT-3')探讨  $Mg^{2+}$  对 BLM<sup>642-1290</sup> 解旋酶与 G 四链体结合的影响,并分析其影响机理,为研究 DNA 解旋酶对 G4DNA 的作用机理奠定基础.

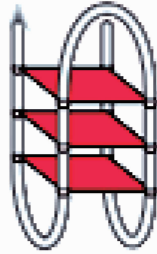


图1 G4DNA 的结构示意图

Fig. 1 Structure representation of the G4DNA

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试剂

荧光标记的 DNA 底物合成于北京鼎国生物技术有限公司,二硫苏糖醇(DTT)、异丙基硫代- $\alpha$ -D-半乳糖苷(IPTG)、Triton X-100、咪唑等均购自中国北京的 Solarbio 公司, Tris、 $MgCl_2$  等均购置于美国 Sigma 公司. 整个实验采用 Milli-Q 超纯水系统制成的超纯水作为实验用水. 反应缓冲液为 25 mmol/L Tris-HCl、3 mmol/L NaCl、不同浓度的  $MgCl_2$  (0、1、2、3、4、5 和 6 mmol/L) 及 0.1 mmol/L DTT, pH 7.9. DNA 底物缓冲液为 20 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L NaCl, pH 7.9.

### 1.2 BLM<sup>642-1290</sup> 解旋酶制备

BLM<sup>642-1290</sup> 重组大肠杆菌 BL21 菌株由法国巴黎第十一大学居里研究所的奚绪光研究员馈赠. 含有 6 个组氨酸串联标签(6 $\times$  his)的 BLM 重组大肠杆菌在 17  $^{\circ}C$  的 LB 培养基中用 0.45 mmol/L IPTG 诱导表达 20 h, 收集菌体超声破碎(美国 Sonics 公司), 13 000 rpm 离心收集上清液在 AKTA purifier100 蛋白纯化仪上先后用镍亲和层析柱(美国 GE Healthcare 公司)和 Superdex 200 分子筛(美国 GE Healthcare 公司)进行分离纯化, 获得可用于开展生物学特性研究的 BLM<sup>642-1290</sup> 解旋酶.

### 1.3 G4DNA 底物的制备

PAGE 纯化的带有荧光标记的 DNA 底物合成于北京鼎国生物技术有限公司. 线性 G4DNA 在底物缓冲液中 90  $^{\circ}C$  水浴 10 min, 缓慢冷却至室温, 静置超过 4 h<sup>[16]</sup>. 复性后的 DNA 为 G 四链体 DNA.

### 1.4 $Mg^{2+}$ 对 G4DNA 荧光偏振值的影响检测

利用荧光偏振技术分析  $Mg^{2+}$  对 G4DNA 荧光偏振值的影响<sup>[24]</sup>. 在含有不同  $Mg^{2+}$  浓度的反应缓冲液中加入 2 nmol G4DNA(总反应体系为 150  $\mu$ L)<sup>[24]</sup>, 在 25  $^{\circ}C$  条件下平衡 5 min, 利用荧光偏振仪(PanVera)迅速检测其荧光偏振值的变化, 每 8 s 检测 1 次, 直到其稳定.

### 1.5 $Mg^{2+}$ 对 BLM-G4DNA 复合物荧光偏振值的影响检测

在不含  $Mg^{2+}$  浓度的反应缓冲液中加入 2 nmol G4DNA, 在 25  $^{\circ}C$  平衡 5 min, 检测其荧光偏振值的变化, 直到其稳定. 用 100 mmol/L 的 BLM<sup>642-1290</sup> 解旋酶进行滴定, 检测其荧光偏振值的变化, 直到不再变化, 表示 2 nmol G4DNA 完全被酶结合形成了 BLM-G4DNA 复合物. 用浓度为 0.15 mol/L 的  $MgCl_2$  滴定 BLM-G4DNA 复合物(总反应体系为 150  $\mu$ L), 迅速检测其荧光偏振值的变化.

## 1.6 $Mg^{2+}$ 对 $BLM^{642-1290}$ 与 G4DNA 结合活性的影响检测

通过两种实验方案来分析  $Mg^{2+}$  对  $BLM^{642-1290}$  解旋酶与 G4DNA 结合的影响.

方案一 在含有不同  $Mg^{2+}$  浓度的反应缓冲液中加入 2 nmol G4DNA, 在 25 °C 条件下平衡 5 min, 检测其荧光偏振值的变化, 直到其稳定. 用 100 mmol/L  $BLM^{642-1290}$  解旋酶进行滴定, 检测其荧光偏振值的变化, 直到其稳定.

方案二 在不含  $Mg^{2+}$  浓度的反应缓冲液中加入 2 nmol G4DNA, 在 25 °C 平衡 5 min, 检测其荧光偏振值的变化, 直到其稳定. 将  $BLM^{642-1290}$  解旋酶与不同终浓度(0、1、2、3、4、5 和 6 mmol/L)的  $MgCl_2$  反应 5 min, 用混合液进行滴定, 检测其荧光偏振值的变化, 直到其稳定. 解旋酶与 G4DNA 结合的解离常数( $K_d$  值)可根据方程(1)和(2)计算获得:

$$\alpha D_T = NP_T \frac{\alpha}{1-\alpha} + K_d, \quad (1)$$

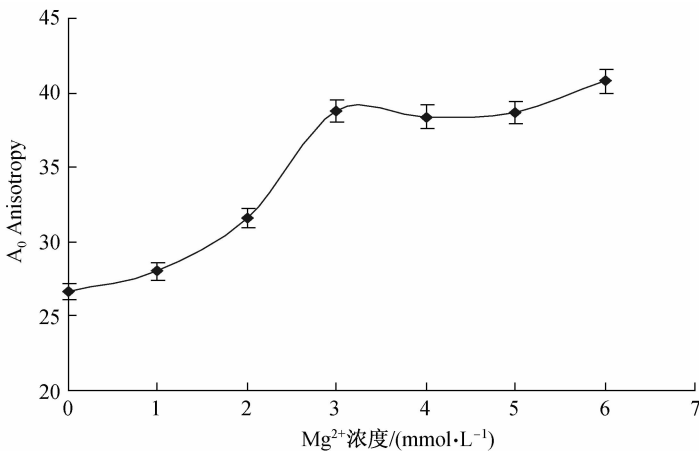
$$\alpha = \frac{A_{\max} - A}{A_{\max} - A_{\min}}. \quad (2)$$

式中,  $D_T$  和  $P_T$  分别为 G4DNA 和解旋酶的总浓度,  $A$  是任一浓度解旋酶与 DNA 结合的荧光偏振值,  $A_{\max}$  是 DNA 完全被酶结合时的荧光偏振值,  $A_{\min}$  为 DNA 的荧光偏振值,  $N$  是化学计量比<sup>[24]</sup>.

## 2 结果与讨论

### 2.1 $Mg^{2+}$ 对 G4DNA 荧光偏振值的影响

$Mg^{2+}$  对 G4DNA 荧光偏振值的影响结果见图 2. 由结果可知, G4DNA 的荧光偏振值随着  $Mg^{2+}$  浓度的增加而增加( $P < 0.01$ ).  $Mg^{2+}$  浓度从 0 增加到 3.0 mmol/L, DNA 的荧光偏振值约从 26.5 增加到 40.0; 当  $Mg^{2+}$  浓度达到 3.0 mmol/L 后, 其荧光偏振值变化不显著.



注:  $A_0$  指 G4DNA 荧光偏振值

图 2  $Mg^{2+}$  对 G4DNA 荧光偏振值的影响

Fig. 2 Effect of  $Mg^{2+}$  on fluorescence anisotropy value of G4DNA

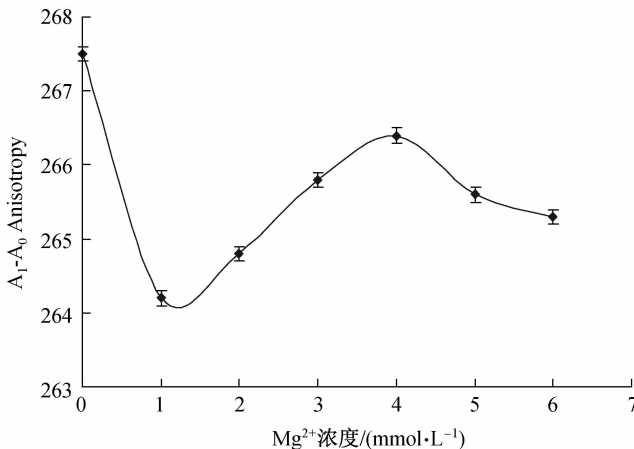
荧光偏振技术已广泛应用于检测具有高亲和力的蛋白质—核酸、蛋白质—蛋白质及生物大分子与小分子药物等的相互作用<sup>[25,26]</sup>. 用平面偏振光去激发一个荧光系统, 可以产生

偏振荧光. 通过分析偏振荧光从而确定分子的大小、形状和流动性等性质<sup>[27,28]</sup>. 荧光偏振技术是一种对分子大小、分子移动快慢很灵敏的探测手段. 本研究中带有荧光基团标记的 DNA 分子在溶液中随机分布, 而分子量稳定, 其荧光偏振值维持在一个较稳定的水平. 有研究表明, 与碱基对有较高亲和力的金属离子容易引起 DNA 聚集<sup>[29]</sup>. 而  $Mg^{2+}$  主要与 DNA 的磷酸骨架结合, 能够中和一部分戊糖磷酸骨架上的负电荷<sup>[26]</sup>. 从 DNA 荧光偏振值变化的程度可知,  $Mg^{2+}$  对 G4DNA 不会引起聚合, 而主要是  $Mg^{2+}$  与 DNA 的磷酸骨架结合从而影响 G4DNA 的形状或在溶液中的流动性. 而荧光偏振值显著增加, 表明  $Mg^{2+}$  与 DNA 的磷酸骨架结合会改变 G4DNA 的形状并降低其在溶液中的流动性.

## 2.2 $Mg^{2+}$ 对 BLM-G4DNA 复合物荧光偏振值的影响

$Mg^{2+}$  对 BLM-G4DNA 复合物荧光偏振值的影响见图 3. 由结果可知,  $Mg^{2+}$  浓度在 1.0 mmol/L 以内, 复合物的荧光偏振值随着  $Mg^{2+}$  浓度的增加而急剧下降 ( $P < 0.01$ );  $Mg^{2+}$  浓度在 1.0~4.0 mmol/L 范围内, 其荧光偏振值却随着  $Mg^{2+}$  浓度的增加而增加 ( $P < 0.01$ );  $Mg^{2+}$  浓度大于 4.0 mmol/L 时, 其荧光偏振值再随着  $Mg^{2+}$  浓度的增加而逐渐下降 ( $P < 0.01$ ). 以上结果表明  $Mg^{2+}$  使 BLM-G4DNA 复合物荧光偏振值出现下降—升高—下降的变化趋势 ( $P < 0.01$ ).

根据荧光偏振技术的原理, 可推测低浓度的  $Mg^{2+}$  会引起 G4DNA 荧光偏振值的急剧下降可能主要是  $Mg^{2+}$  与 G4DNA 的结合会引起 G4DNA 的电荷升高, 影响酶与 G4DNA 结合. 研究表明, 大肠杆菌 RecQ 解旋酶的 ATP 酶活性依赖  $Mg^{2+}$  和 ssDNA<sup>[24]</sup>, 且  $Mg^{2+}$  可与多种与能量代谢有关的蛋白质发生作用而影响其生物学活性<sup>[30]</sup>. 另外, BLM 解旋酶的中心结构越具有  $Mg^{2+}$  结合位点, 在正常催化 ATP 水解的过程中需要结合  $Mg^{2+}$  形成催化活性中心<sup>[13]</sup>. 随着  $Mg^{2+}$  浓度的增加,  $Mg^{2+}$  可能与酶结合后, 酶— $Mg^{2+}$  复合物所带的电荷与 G4DNA- $Mg^{2+}$  复合物的电荷平衡, 从而导致两种分子的结合变得紧密; 随着  $Mg^{2+}$  浓度的继续增加, 酶— $Mg^{2+}$  复合物所带的电荷超过 G4DNA- $Mg^{2+}$  复合物的电荷, 酶与 G4DNA 的结合又会变得松弛. 为了进一步验证, 运用荧光偏振技术分析不同  $Mg^{2+}$  浓度下的 G4DNA 与解旋酶结合及 G4DNA 与含不同  $Mg^{2+}$  浓度下的解旋酶结合的荧光偏振值变化.



注:  $A_1$  指 G4DNA 与解旋酶结合后的荧光偏振值

图 3  $Mg^{2+}$  对 BLM-G4DNA 复合物荧光偏振值的影响

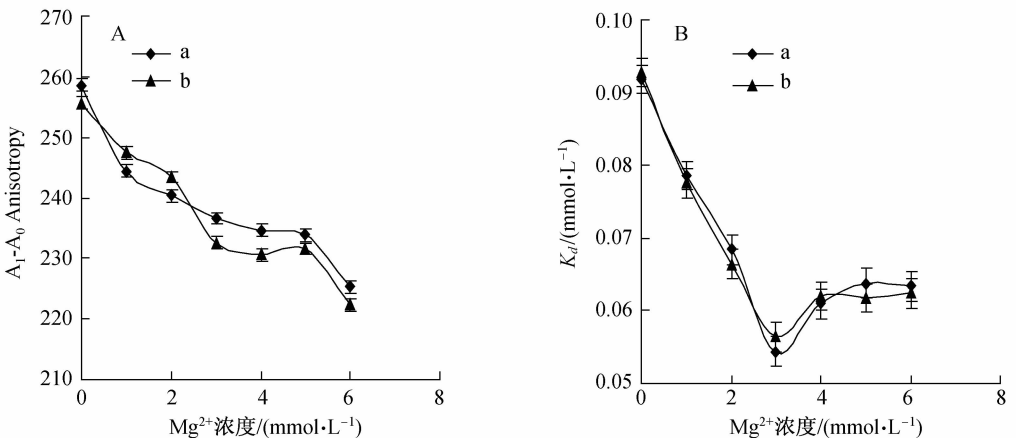
Fig. 3 Effect of  $Mg^{2+}$  on fluorescence anisotropy value of BLM-G4DNA complex

### 2.3 $Mg^{2+}$ 对 $BLM^{642-1290}$ 解旋酶与 G4DNA 结合的影响

$Mg^{2+}$  对  $BLM^{642-1290}$  解旋酶与 G4DNA 结合的影响见图 4. 由结果可知,解旋酶与不同浓度  $Mg^{2+}$  作用下的 G4DNA 结合的荧光偏振值随着  $Mg^{2+}$  浓度的增加而逐渐下降(见图 4A) ( $P < 0.01$ ),而 G4DNA 与不同浓度  $Mg^{2+}$  作用下的解旋酶结合的荧光偏振值变化也有相似的结果,表明  $Mg^{2+}$  能影响解旋酶与 G4DNA 的结合. 荧光偏振值反应的是荧光标记分子的分子量大小、移动快慢程度,而两种条件下酶与 G4DNA 结合的荧光偏振值均出现了下降,但这不能说明  $Mg^{2+}$  对解旋酶的 DNA 结合活性具有抑制作用,因为这里的荧光偏振值与分子的形状和流动性等性质有关. 为了确定  $Mg^{2+}$  对解旋酶与 DNA 结合的影响,进一步分析了两种实验方案下解旋酶与 G4DNA 结合的  $K_d$  值变化(见图 4B).

根据  $K_d$  值的定义,可知两种分子结合的  $K_d$  值越大,其分子亲和力越小,表示两种分子的结合越弱<sup>[31]</sup>. 结果发现解旋酶与 G4DNA 结合的  $K_d$  值在  $Mg^{2+}$  浓度为 3.0 mmol/L 时最小,表明在  $Mg^{2+}$  浓度为 3.0 mmol/L 时解旋酶与 G4DNA 的分子亲和力最大,最易结合;在没有  $Mg^{2+}$  存在时,酶与 G4DNA 结合的解离常数最小,表明两种分子之间的亲和力最小,最不易结合. 以上结果说明适量  $Mg^{2+}$  会促进解旋酶与 G4DNA 的结合,但会引起两种分子的结合的形状和流动性等性质的改变. 因此,解旋酶与 G4DNA 结合的荧光偏振值随着  $Mg^{2+}$  浓度的增加而逐渐下降原因可能主要是其酶与 G4DNA 结合后形成的复合物的流动性减弱.

比较  $Mg^{2+}$  对 G4DNA、BLM-G4DNA 复合物和  $BLM^{642-1290}$  解旋酶与 G4DNA 结合的影响,推测  $Mg^{2+}$  影响解旋酶与 G4DNA 结合的机理可能为: $Mg^{2+}$  可能与 G4DNA 的磷酸骨架结合或与解旋酶结合而影响酶与 G4DNA 结合. 另外,酶与 G4DNA 结合与各自所带的电荷可能有关,可能存在一个平衡点,而一旦打破这种平衡,二者结合会受到影响.



注: (A)  $BLM^{642-1290}$  解旋酶在不同  $Mg^{2+}$  浓度的缓冲液中与 G4DNA 结合的荧光偏振值变化, (B) 不同  $Mg^{2+}$  浓度下解旋酶与 G4DNA 结合的解离常数的变化; (a) 不同  $Mg^{2+}$  浓度下的 G4DNA 与解旋酶结合, (b) G4DNA 与含不同浓度  $Mg^{2+}$  的解旋酶结合

图 4  $Mg^{2+}$  对  $BLM^{642-1290}$  解旋酶与 G4 DNA 结合的影响

Fig. 4 Effect of  $Mg^{2+}$  on the combination of  $BLM^{642-1290}$  and G4DNA

### 3 总结与展望

$BLM^{642-1290}$  解旋酶包括解旋酶结构域 (Helicase)、RecQ 保守的 C 末端结构域 (RecQ-Ct)

和解螺旋酶 RNA 酶 D 碳末端(HRDC)结构域<sup>[32]</sup>. 解旋酶和 RecQ-Ct 结构域结合在一起形成了具有催化作用的“解旋酶核心结构域”,其包含有 ATP 酶活性和 DNA 结合活性的必须的基序和结合位点<sup>[33]</sup>. 研究表明  $Mg^{2+}$  在结合于解旋酶核心结构域的活性中心,对调节解旋酶的 ATP 酶活性具有重要的作用<sup>[13]</sup>. 而  $Mg^{2+}$  的存在是否对解旋酶的 DNA 结合活性是否有影响还没有直接的研究报道. 本研究利用荧光偏振技术研究  $Mg^{2+}$  对 BLM<sup>642-1290</sup> 解旋酶与 G4DNA 结合的影响,结果表明  $Mg^{2+}$  可使 G4DNA 的荧光偏振值增加,并使 BLM-G4DNA 复合物荧光偏振值出现下降-升高-下降的变化趋势;不同浓度  $Mg^{2+}$  作用下的 G4DNA 与 BLM<sup>642-1290</sup> 结合及 G4DNA 与不同浓度  $Mg^{2+}$  作用下 BLM<sup>642-1290</sup> 结合的荧光偏振值均随着  $Mg^{2+}$  浓度的增加而逐渐下降; $Mg^{2+}$  浓度为 3.0 mmol/L 时,BLM<sup>642-1290</sup> 与 G4DNA 最容易结合,表明适量  $Mg^{2+}$  会促进 BLM<sup>642-1290</sup> 与 G4DNA 的结合,但会引起两种分子结合的形状、流动性和电荷等性质的改变. 推测  $Mg^{2+}$  影响 BLM<sup>642-1290</sup> 解旋酶与 G4DNA 结合的机理可能为: $Mg^{2+}$  可能与 G4DNA 的磷酸骨架结合或与解旋酶结合而影响酶与 G4DNA 结合.

关于 BLM 解旋酶,有很多方面都需要继续研究,如其解链过程如何进行,解链过程是如何终止的,受到其它蛋白的调控的机理等<sup>[31]</sup>. 对 BLM 催化核心区域的相关生物学特性研究,不仅对了解 BLM 解旋酶与不同结构的 DNA 分子、细胞中其他蛋白之间相互作用的研究具有重要的意义,更重要的是它将为我们的下一步研究 BLM 解旋酶的结构和功能提供重要的特征参数及其相关信息,以更加深入地认识解旋酶在细胞代谢过程中的重要作用及其机制,同时也为进一步研究以人 DNA 解旋酶为抗癌药物靶标的机理研究奠定基础.

### [参 考 文 献]

- [1] BACHRATI C Z, HICKSON I D. RecQ helicases: suppressors of tumorigenesis and premature aging[J]. *Biochem J*, 2003, 374(Pt 3): 577-606.
- [2] MOUNIA A G. Bloom syndrome, genomic instability and cancer: the SOS-like hypothesis[J]. *Cancer Letters*, 2006, 236(1): 1-12.
- [3] WONG I, MOORE K J M, BJOMSON K P, et al. ATPase Activity of *Escherichia coli* Rep Helicase Is Dramatically Dependent on DNA Ligation and Protein Oligomeric States[J]. *Biochemistry*, 1996, 35(18): 5726-5734.
- [4] PHAM X H, TUTEJIA N. Potent inhibition of DNA unwinding and ATPase activities of pea DNA helicase 45 by DNA-binding agents[J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 2002, 294(2): 334-339.
- [5] LINDOR N M, FURUICHI Y, KITAO S, et al. Rothmund-Thomson syndrome due to RECQ4 helicase mutations: report and clinical and molecular comparisons with Bloom syndrome and Werner syndrome[J]. *Am J Med Genet*, 2000, 90(3): 223-228.
- [6] KITAO S, OHSUGI I, ICHIKAWA K, et al. Cloning of two new human helicase genes of the RecQ family: biological significance of multiple species in higher eukaryotes[J]. *Genomics*, 1998, 54(3): 443-452.
- [7] GERMAN J, ROE A M, LEPPERT M F, et al. Bloom syndrome: an analysis of consanguineous families assigns the locus mutated to chromosome band 15q26.1[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(14): 6669-6673.
- [8] HICKSON I D. RecQ helicases: caretakers of the genome[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2003(3): 169-178.
- [9] CHEOK C F, BACHRATI C Z, CHAN K L C, et al. Roles of the Bloom's syndrome helicase in the maintenance of genome stability[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2005, 33: 1456-1459.
- [10] BACHRATI C Z, HICKSON I D. RecQ helicases: guardian angels of the DNA replication fork[J]. *Chromosoma*, 2008, 117(3): 219-233.
- [11] THOMPSON L H, SCHILD D. Recombinational DNA repair and human disease[J]. *Mutat Res*, 2002, 509(1-2): 49-78.

- [12] XI X G. Helicases as antiviral and anticancer drug targets[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2007, 14(8): 503-517.
- [13] JANSACK P, GARCIA P L, HAMBURGER F, et al. Characterization and mutational analysis of the RecQ core of the bloom syndrome protein[J]. *J Mol Biol*, 2005, 330: 29-42.
- [14] 殷菲, 刘建辉, 彭孝军. 以 G-四链体为靶点的小分子端粒酶抑制剂研究进展[J]. *化学通报*, 2004(4): 271-277.
- [15] YANG D Z, OKAMOTO K. Structural insights into G-quadruplexes: towards new anticancer drugs[J]. *Future Med Chem*, 2010, 2(4): 619-646.
- [16] 周江, 袁谷. 溶液 pH 和阳离子对端粒 G-四链体 DNA 形成和结构的影响[J]. *化学通报*, 2007, 65(16): 1728-1732.
- [17] DEMPSEY L A, SUN H, HANAKAHI L A, et al. G4 DNA binding by LR1 and its subunits, nucleolin and hnRNP D, a role for G-G pairing in immunoglobulin switch recombination[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(2): 1066-1071.
- [18] 胡晓文, 黄洪章. 端粒 G-四联体—肿瘤治疗的新靶点[J]. *国外医学口腔医学分册*, 2004, 31: 98-100.
- [19] HUPPERT J L, BALASUBRAMANIAN S. Prevalence of quadruplexes in the human genome[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: 2908-2916.
- [20] HUPPERT J L, BALASUBRAMANIAN S. G-quadruplexes in promoters throughout the human genome[J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35: 406-413.
- [21] SUN H, KAROW J K, HICKSON I D. The Bloom's syndrome helicase unwinds G4 DNA[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273, 42: 27587-27592.
- [22] GUO R B, RIGOLET P, ZARGARIAN L, et al. Structural and functional characterizations reveal the importance of a zinc binding domain in Bloom's syndrome helicase[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(10): 3109-3124.
- [23] CHEOK C F, BACHRATI C Z, CHAN K L, et al. Roles of the Bloom's syndrome helicase in the maintenance of genome stability[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2005, 33(6): 1456-1459.
- [24] DOU S X, WANG P Y, XU H Q, et al. The DNA binding properties of the *Escherichia coli* RecQ helicase[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(8): 6354-6363.
- [25] VERONIQUE L T, CATHERINE A R. Fluorescence anisotropy assays implicate protein-protein interactions in regulating trp repressor DNA binding[J]. *Biochemistry*, 1993, 32(30): 7753-7758.
- [26] LIU Y Y, WANG P Y, DOU S X, et al. Study the effects of divalent metallic ions on the combination of DNA and histones with fluorescence anisotropy assays[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2007, 52(9): 1166-1171.
- [27] BJOMSON K P, AMARATUNGA M, MOORE K J, et al. Single-turnover kinetics of helicase-catalyzed DNA unwinding monitored continuously by fluorescence energy transfer[J]. *Biochemistry*, 1994, 33(47): 14306-14316.
- [28] RANEY K D, SOWERS L C, MILLAR D P, et al. A fluorescence-based assay for monitoring helicase activity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(14): 6644-6648.
- [29] DUGUID J, BLOOMFIELD V A, BENEVIDES J, et al. Raman spectroscopy of DNA-metal complexes. I. Interactions and conformational effects of the divalent cations; Mg, Ca, Sr, Ba, Mn, Co, Ni, Cu, Pd, and Cd[J]. *Biophys J*, 1993, 65: 1916-1928.
- [30] SUN H, JIANG Y J, YU Q S, et al. Molecular dynamics simulations on the role of structural  $Mg^{2+}$  ions in phosphoryl transfer catalyzed by GSK-3 $\beta$ [J]. *Acta Phys-Chim Sin*, 2011, 27(1): 207-212.
- [31] 骆衡, 陈祥, 段丽霞, 等. 大肠杆菌 RecQ 解旋酶的生物学活性分析[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2010, 26(12): 1143-1150.
- [32] CHEN X, LUO H, DUAN L X, et al. Effects of mercury on the structure and activity of BLM<sup>642-1290</sup> helicase[J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2011, 24(1): 47-55.
- [33] BERNSTEIN D A, ZITTEL M C, KECK J L. High-resolution structure of the *E. coli* RecQ helicase catalytic core[J]. *EMBO J*, 2003, 22(19): 4910-4921.