

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

計畫名稱: 以親和性吸附及交錯連結法研究單胞藻中 DNA 修補蛋白群之組成

計畫類別: 個別型計畫

計畫編號: 90-2311-B-019-001;

執行期間: 90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

計畫主持人: 許濤教授 國立台灣海洋大學生物科技研究所

計畫參與人員: 賴意繡(博士班研究生)與樂媛竹(碩士班研究生)

國立台灣海洋大學生物科技研究所

一·中文摘要

由於 UV 照射 DNA 主要產生 cyclobutane pyrimidine dimer 與 6-4 photoproduct 兩種傷害, 本研究繼續以帶有 CPD 或 6-4PP 之 DNA 藉親和性吸附、蛋白質與 DNA 交錯實驗與雙向蛋白質電泳分離法探討小球單胞藻中是否存在不同核酸切割修補蛋白群, 結果發現吸附在 CPD 與 6-4PP 上之蛋白質分布型式確有差異, 且交錯實驗顯示一分子量約 70-72 kDa 之蛋白似對 6-4PP 有較佳專一性, 而吸附後蛋白質分布差異經雙向蛋白質電泳法在等電點 3-10 間分離後已確認, 目前正以委託方式利用質譜儀撞擊資料分析此 70-72 kDa 蛋白質可能之功能。另外在本計劃經費補助下, 我們也對斑馬魚(*Danio rerio*) 中之 UV 辨識蛋白進行研究, 結果偵測到一種胚胎專一性辨識蛋白群, 對 CPD 與 6-4PP 有類似之結合能力, 但在成熟後斑馬魚中此辨識蛋白群之表現明顯下降, 成熟後斑馬魚反而表現出與真核生物類似之 DNA 修補蛋白 XP-A, 故此胚胎專一性辨識蛋白群可能參予胚胎 DNA 修補作用(研究成果已投稿 Fish Physiol. Biochem. 並接受發表)。

二·Abstract

Cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) and 6-4 photoproduct (6-4PP) are two major forms of DNA damage generated after UV irradiation, this research attempted to examine if different NER systems existed in unicellular alga *C. pyrenoidosa* by affinity adsorption and protein-DNA crosslinking assay using CPD and 6-4PP-specific DNA ligand. Differential polypeptide patterns were observed after affinity adsorption with DNA probes carrying different types of lesion and one 70 to 72 kDa polypeptide seemed to bind more strongly to 6-4PP than to CPD as shown by a UV crosslinking assay. The presence of some lesion-specific proteins with pI between pH 3-10 were confirmed by two-dimensional gel electrophoresis. The possible function of this 70 to 72 kDa protein is being studied by protein mass spectrometry. Under the financial support of this grant, a UV-damaged-DNA binding activity highly expressed in zebrafish(*Danio rerio*) early embryos was detected by gel shift assay and this binding activity showed a similar affinity for both CPD and 6-4PP.

The embryonic UV-binding activity was found to exist as two protein complexes having overlapping components as shown by a UV crosslinking experiment. The expression of NER DNA damage-recognition protein XP-A conserved among eukaryotic organisms was found to arise only in zebrafish beyond the embryonic stage. Hence, the embryonic UV-damaged-DNA binding activity might be responsible for DNA repair in zebrafish embryos.

二·計畫緣由與目的

核酸切割修補作用(NER)之作用機制在細菌、酵母菌與人類細胞中已經相當了解[1,2]，但在植物尤其是低等中 NER 之作用機制仍有待探討。本實驗室以小球單細胞藻 *C. pyrenoidosa* 破碎後之 55%硫酸銨分割物為 DNA 修補蛋白來源已發現 NER 切割產物[3]，且已由 *C. pyrenoidosa* 純化出一辨識紫外線傷害 DNA 之蛋白群[4]，先前研究已完成以化學藥物 cisplatin 處理過之質體 DNA 為修補基質，建立在小球單胞藻蛋白抽取液中檢測核酸切割修補作用之體外 DNA 修補試驗，我們將 UV 照射過之 DNA 固定在 agarose 顆粒上，再以親和性吸附法吸取小球藻抽取液中之 DNA 修補蛋白；未吸附之抽取液與經正常 DNA 吸附後之抽取液都有極明顯之修補作用，抽取液在吸附後幾乎無法修補受 cisplatin 處理之質體，強度約為吸附前之 2%。以蛋白質電泳分析附著在正常與 UV 照射過 DNA 上之蛋白，發現有一 72 kDa 蛋白質對受傷 DNA 有特別強之親和力，因為此蛋白與修補活性下移之關聯，此一 72 kDa 之蛋白應參與小球藻之核酸切割修補作用(研究成果已發表於 *Plant Science* 156:95-102,2000)[5]。本計畫繼續以帶有 CPD 或 6-4PP 之 DNA 藉親和性吸附、蛋白質與 DNA 交錯實驗與雙向蛋白質電泳分離法探討小球單胞藻中是否存在不同核酸切割修補蛋白群。

四·結果與討論

實驗結果發現吸附在 CPD 與 6-4PP 上之小球單胞藻之單向 SDS-PAGE 蛋白質分布型式確有差異，而此蛋白質分布差異經雙向蛋白質電泳法在等電點 3-10 間分離後已確認，交錯實驗顯示一分子量約 70-72 kDa 之蛋白似對 6-4PP 有較佳專一性，而此 70-72 kDa 之蛋白極有可能為先前所發現[5]之同一蛋白，目前已自銀染後之雙向蛋白質電泳片上挖下此蛋白，正以委託方式利用質譜儀撞擊資料分析其可能之功能。另外在本計劃經費補助下，我們也對斑馬魚(*Danio rerio*) 中之 UV 辨識蛋白進行研究，結果偵測到一種胚胎專一性辨識蛋白群主要出現在受精後 12 至 48 小時之斑馬魚胚胎，競爭性結合分析發現此辨識蛋白群對 CPD 與 6-4PP 有類似之結合能力，但在受精 84 小時後至成熟斑馬魚中此辨識蛋白群之表現明顯下降，西方轉印分析顯示成熟斑馬魚反而表現出與真核生物 XPA 辨識蛋白類似之 DNA 修補系統，故此胚胎專一性辨識蛋白群可能參予胚胎 DNA 修補作用或參予處理類似 CPD 與 6-4PP 之 DNA 結構。

五·計畫成果自評

本計畫因小球藻培養時間較長，加上蛋白質萃取液製備過程繁複，故成果尚未達到預期目標，但藉本計畫經費補助本實驗室亦由斑馬魚早期胚胎萃取液偵測到可同時辨識 CPD 與 6-4PP 之蛋白複合物，經部份特性鑑定後確定此蛋白複合物為已往所未發現者，而此研究成果已投稿國際學術期刊 *Fish Physiology and Biochemistry* 並獲接受發表[6]。

六·參考文獻

- [1] R. D. Wood, DNA repair in eukaryotes, *Annu. Rev. Biochem.* 65 (1996) 135-167.
- [2] A. S. Balajee, A. May, V. A. Bohr, Fine structural analysis of DNA repair in mammalian cells, *Mutat. Res.* 404 (1993) 3-11.
- [3] C.-W. Chang, J.-C. Ho, T. Hsu, Thymine-dimer dependent incision on ultraviolet light damaged-DNA in cell-free extracts of *Chlorella pyrenoidosa*, *Biosci. Biotech. Biochem.* 60 (1996) 490-492.
- [4] T. Hsu, J.-C. Ho, C.-C. Chao, Purification of a UV-damaged-DNA binding activity from cell-free extracts of unicellular alga *Chlorella pyrenoidosa*, *Plant Sci.* 138 (1998) 137-147.
- [5] T. Hsu, R.-C. Sheu, Y.-S. Lai, Possible involvement of a 72-kDa polypeptide in nucleotide excision repair of *Chlorella pyrenoidosa* identified by affinity adsorption and repair synthesis assay, *Plant Sci.* 156 (2000) 95-102.
- [6] T. Hsu, C.S. Cheng, F.L. Yeh, C.Y. Shih, Detection and partial characterization of a UV-damaged-DNA binding activity highly expressed in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Fish Physiol. Biochem.* 25 (2002) 41-51.