

文章编号 1006-8147(2022)01-0035-05

论著

人源解旋酶样转录因子的表达、纯化和功能研究

龚晓昕,沈苗苗,李徐梓超,向嵩

(天津医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系,天津 300070)

摘要 目的:解旋酶样转录因子(HLTF)在人体细胞的DNA复制压力应对中发挥重要作用,对其结构和功能的研究需要大量、高纯度且折叠正确的蛋白质。方法:通过优化HLTF基因的密码子偏好,构建HLTF蛋白的大肠杆菌表达系统;通过亲和层析、离子交换层析、凝胶过滤层析等方法纯化HLTF;采用体外实验研究HLTF的生化活性。结果:成功构建HLTF蛋白的大肠杆菌表达系统,通过一个4步的纯化,获得高纯度的HLTF蛋白质,体外功能实验表明大肠杆菌表达的HLTF具有完整的生化活性,提示蛋白折叠正确。本研究发现HLTF的泛素连接酶活性对底物与泛素的连接方式有较大的容忍度。结论:建立了一种高效制备大量、高纯度且折叠正确的HLTF的方法,为深入理解其泛素连接酶活性提供线索,为其结构和功能研究奠定基础。

关键词 解旋酶样转录因子;蛋白质表达;蛋白质纯化;泛素连接酶活性;DNA复制压力应对

中图分类号 Q51

文献标志码 A

Expression, purification of human helicase-like transcription factor

GONG Xiao-xin, SHEN Miao-miao, LI Xu-zi-chao, XIANG Song

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: The helicase-like transcription factor (HLTF) plays critical roles in human cells' response to DNA replication stresses; structural and functional studies of this important protein require significant amounts of pure and correctly folded HLTF. **Methods:** This study optimized the codon preference in the HLTF gene to construct an *Escherichia coli*-based HLTF expression system. Recombinant HLTF was purified by affinity chromatography, ion-exchange chromatography and gel filtration chromatography. *In vitro* experiments were carried out to probe the biochemical activities of the recombinant HLTF. **Results:** This *Escherichia coli*-based HLTF expression system was successfully constructed, and the high-purity HLTF protein was obtained by a 4-step purification procedure. *In vitro* functional experiments showed that the HLTF expressed by *Escherichia coli* had complete biochemical activity, indicating that it is correctly folded. It was found that ubiquitin ligase activity of HLTF was insensitive towards the ubiquitin-substrate linkage. **Conclusion:** Here presents an efficient protocol that produces large quantities of pure and correctly folded HLTF, as well as insights into HLTF's ubiquitin ligase activity. This study provides a starting point for future structural and functional studies of this important protein.

Key words helicase-like transcription factor; protein expression; protein purification; ubiquitin ligase; DNA replication stress tolerance

准确而顺利的DNA复制对于细胞生存至关重要。大量的外源性和内源性因素,例如核苷酸耗竭、DNA二级结构、蛋白质-DNA复合物、DNA碱基损伤等都会对DNA复制造成压力,从而导致复制停滞^[1-2]。停滞的复制叉是一种非常不稳定的DNA结构,容易导致DNA双链断裂和核溶解,从而导致基因组不稳定,最终造成细胞死亡^[3-4]。细胞进化出复杂的机制来应对这些复制压力。其中,高度保守的真核生物DNA损伤耐受通路(DNA damage tolerance, DDT)通过易出错的跨损伤合成(translesion synthesis, TLS)和无错误的模板转换DNA合成(template switch, TS)两条分支来恢复被中断的DNA复制^[5-6]。解旋酶样

转录因子(helicase-like transcription factor, HLTF)在人类细胞的DDT通路中起到关键作用。DDT中TLS分支与TS分支都是通过将增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)高度保守的Lys164泛素化修饰而启动的。泛素连接酶Rad18和泛素结合酶Rad6将该残基单泛素化修饰,启动TLS分支^[7]。HLTF具有泛素连接酶活性,它可进一步使用Lys63相连接的泛素链标记PCNA,启动无错误的TS分支。这一反应以单泛素化的PCNA为底物,还需要泛素结合酶复合物Ubc13-Mms2的共同参与^[8-10]。除此之外,HLTF还能通过催化ATP水解驱动复制叉退行^[11]。在停滞的复制叉处,TS分支可通过复制叉退行实现;复制叉退行也能保护停滞的复制叉^[2,12-13]。与HLTF在DNA复制压力应对中的关键功能一致,研究发现HLTF与早衰、神经系统疾病及多种癌症密

基金项目 国家自然科学基金(31870769,32071205)

作者简介 龚晓昕(1995-),女,硕士在读,研究方向:结构生物学;通信作者:向嵩, E-mail: xiangsong@tmu.edu.cn。

切相关^[1,14]。

HLTF 的分子量为 114 kD,是一个较为复杂的多结构域蛋白。它由 HIRAN 结构域、Snf2 家族的 DNA 解旋酶结构域(Snf2 结构域)和嵌在其中的RING 结构域构成。Snf2 结构域驱动复制叉退行;RING 结构域编码泛素连接酶活性;HIRAN 结构域在复制叉退行中发挥关键作用^[8,13,15-17]。本课题组近期对 HLTF 的酵母同源蛋白 Rad5 的结构和功能研究为理解 HLTF 的功能机制提供了线索^[18]。本研究表明,HLTF 与 Rad5 催化差异巨大的 PCNA 的泛素化修饰及复制叉退行。因此,迫切需要对 HLTF 本身的结构和功能研究以理解它在人体细胞的 DNA 复制压力应对中发挥作用的机制。制备大量、高纯度且正确折叠的 HLTF 对该研究至关重要。虽然已有研究人员利用酵母表达系统表达并纯化 HLTF^[8],但该表达系统操作较为繁琐,蛋白产量也较为有限。与酵母表达系统相比,细菌表达系统通常耗时更短、蛋白产量更高。然而高等真核生物与细菌之间存在密码子偏好性差异,可能会阻碍高等真核生物蛋白在细菌中的表达。这些物种细胞中蛋白折叠环境的差异,也可能导致在细菌中表达的高等真核生物蛋白不能正确折叠^[19-21]。本课题组在前期研究中发现,通过优化 HLTF 基因的密码子偏好性能够在大肠杆菌表达系统中表达 HLTF^[18]。本研究优化了 HLTF 的表达和纯化方式,获得了大量高纯度的 HLTF。体外实验结果发现,重组 HLTF 具有完整的生化活性,提示它是正确折叠的。另外,结果发现 HLTF 在发挥泛素连接酶活性时对底物 PCNA 与泛素的连接方式不敏感。本研究提供了一种高效制备大量、高纯度且折叠正确 HLTF 的方法,并为深入理解其泛素连接酶活性提供了线索,为 HLTF 的进一步研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 蛋白表达和纯化 本研究对本课题组之前报道的 HLTF 的表达和纯化方法进行了优化^[18]。HLTF 基因的密码子偏好性优化有利于其在大肠杆菌中表达,由化学方法合成(生工生物技术)。HLTF 的氨基酸残基 46-1013 对应的基因片段插入 pET28a 载体(Novagen),构建 HLTF 的表达质粒。将质粒转化大肠杆菌 BL21 Rosetta(DE3)感受态细胞,在添加 34 mg/L 卡那霉素和 25 mg/L 氯霉素的 LB 培养基中培养,用终浓度为 0.25 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(Bio Basic)在 16°C 诱导 14 h。收集的细胞重悬在含有 20 mmol/L Tris(pH 7.5)、300 mmol/L NaCl、10 mmol/L 苯甲基磺酰氟和 2 mmol/L β -巯基乙醇的缓冲液中,每克细胞使用 50 mL 缓冲液重悬,冷

却到 4°C,以 50 mL/min 的流速通过 AH-2010 高压破碎仪(ATS Engineering),破碎压力设为 900 磅每平方英尺。经过 3 次破碎循环后,细胞裂解液经过 15 000 \times g 离心 50 min,上清部分经过镍-次氨基三乙酸纯化琼脂糖树脂(nickel-nitrilotriacetic acid, Ni-NTA, Smart-Lifesciences)、DEAE 柱(Hitrap DEAE HP, GE Healthcare)、SP 柱(Hitrap SP HP, GE Healthcare)和分子筛柱(Superose 6 10/300, GE Healthcare)依次纯化,得到纯度大于 95% 的 HLTF 蛋白。

从人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的 cDNA 文库(天津医科大学于林教授赠送)中扩增出泛素、PCNA 的基因;从人乳腺癌 T-47D 细胞的 cDNA 文库(天津医科大学于林教授赠送)中扩增出 Mms2 基因。Ubc13 基因密码子优化为利于在大肠杆菌中表达(生工生物技术)。将泛素基因插入 pET28a 载体;将 Mms2 基因插入 pTYb2 载体(New England Biolabs);将 Ubc13 基因插入 pTXb1 载体(New England Biolabs),构建表达质粒。将 FLAG 肽段寡核苷酸序列、泛素基因、连接肽段(VQIPGK)核苷酸序列和 PCNA 基因插入 pET28a 载体,构建 His-FLAG-泛素-PCNA 融合蛋白表达质粒。上述重组蛋白均在大肠杆菌 BL21 Rosetta(DE3)细胞中表达。泛素和 His-FLAG-泛素-PCNA 融合蛋白均用 Ni-NTA 和分子筛柱纯化(泛素蛋白用 Superdex 75 Increase 10/300, His-FLAG-泛素-PCNA 融合蛋白用 Superdex 200 Increase 10/300,均来自 GE Healthcare)。Mms2 和 Ubc13 用几丁质树脂(New England Biolabs)和分子筛柱(Superdex 75 Increase 10/300)进行纯化。

所有蛋白质在含有 20 mmol/L Tris(pH 7.5)、200 mmol/L NaCl 和 2 mmol/L 二硫苏糖醇的缓冲液中,用液氮速冻后保存在 -80°C。

1.2 ATP 酶活性实验 ATP 酶活性实验中使用的双链 DNA 是通过将互补寡核苷酸(ACCACTGCCACTGAT 和 ATCACTGGCACTGGT,生工生物技术合成)加热至 95°C,随后缓慢冷却至 4°C 生成。实验采用丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶耦联反应,通过监测 NADH 减少来测定 ATP 酶活性^[22]。利用 ultraspec 2100 pro 分光光度计(GE Healthcare)来监测 NADH 在 340 nm 处吸收值的变化。反应体系包括 2.5 μ mol/L HLTF、40 mmol/L Tris(pH 7.5)、50 mmol/L NaCl、0.5 mmol/L ATP(Sigma)、1 mmol/L 磷酸烯醇式丙酮酸(Sigma)、0.2 g/L NADH(Sigma)、80 单位/mL 丙酮酸激酶(源叶生物)、100 单位/mL 乳酸脱氢酶(源叶生物)、10 mmol/L MgCl₂ 和不同浓度的双链 DNA。每次实验重复 3 次,数据用 QTIPLLOT 分析(www.

qtiplot.com)。

1.3 HLTf 促进自由泛素链的形成 实验反应体系包括 20 mmol/L Tris(pH7.5)、50 mmol/L NaCl、10 mmol/L MgCl₂、1 mmol/L ATP (Sigma)、0.02 mg/mL BSA、1 mmol/L DTT、33 nmol/L 人源泛素激活酶(UBE1, R&D Systems)、667 nmol/L Ubc13、667 nmol/L Mms2、33 μmol/L 泛素和 233 nmol/L HLTf。需要时,将单链 DNA(序列为 TTTTTTTCGTCTTCGGCAATTTTTTT, 生工生物技术合成)或双链 DNA(与 ATP 酶活性实验相同)加入反应体系中,终浓度为 6.7 μmol/L。

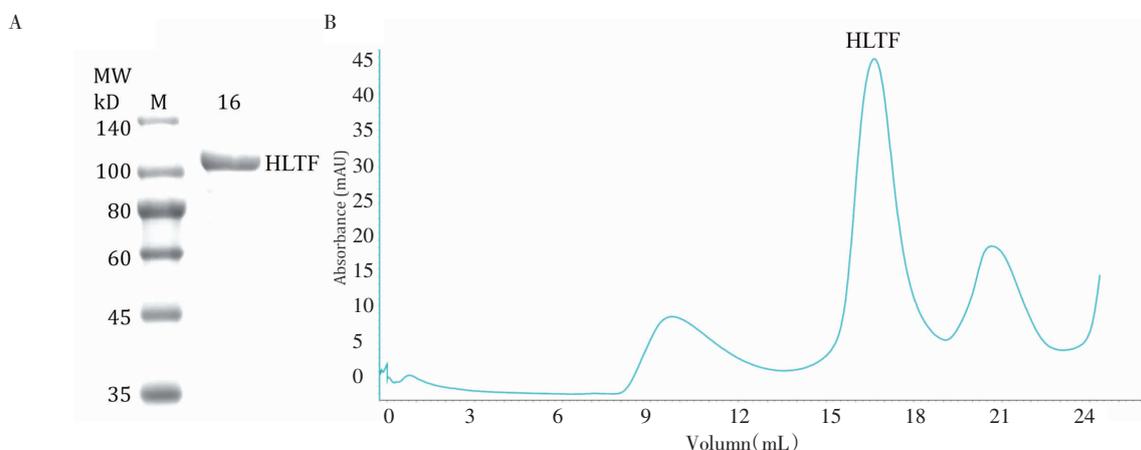
30℃孵育 12 min 后,加入 SDS-PAGE 上样缓冲液[20 mmol/L Tris-HCl(pH 6.8),40 mmol/L DTT,0.8% SDS,0.02%溴酚蓝,4%甘油]煮沸终止反应。通过 SDS-PAGE 分析反应结果。

1.4 HLTf 催化 PCNA 的泛素链标记 实验反应体系包括 40 mmol/L Tris(pH7.5)、50 mmol/L NaCl、10 mmol/L MgCl₂、1 mmol/L ATP(Sigma)、0.15 μmol/L

人源泛素激活酶(UBE1, R&D Systems)、2 μmol/L Ubc13、2 μmol/L Mms2、10 μmol/L 泛素、0.5 μmol/L HLTf 和 0.05 μmol/L His-FLAG-泛素-PCNA 融合蛋白。30℃孵育 30 min 后,加入 SDS-PAGE 上样缓冲液煮沸终止反应。用抗 FLAG 抗体(a8592, Sigma-Aldrich)进行 Western 印迹分析反应结果。

2 结果

2.1 重组 HLTf 蛋白在细菌中的表达和纯化 DEAE 柱可去除 Ni-NTA 纯化 HLTf_{ec} 蛋白时残留的大量杂蛋白和错误折叠的蛋白。通过在纯化流程的 Ni-NTA 柱步骤后添加 DEAE 柱步骤可以有效地提高蛋白质的产量和纯化产物的纯度。优化的纯化流程可从 7 L 的大肠杆菌培养液中制备 6 mg 纯度大于95%的 HLTf_{ec} 蛋白(图 1A)。蛋白从 Superose 6 10/300 分子筛柱的 16 mL 处洗脱出来(图 1B),与溶液中 HLTf 蛋白的单体形式一致(预期分子量为 109 kD)。



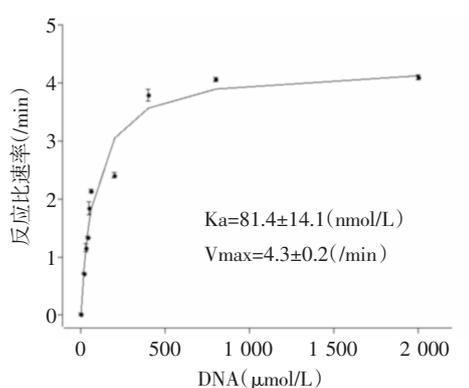
注:A:用 Superose 6 10/300 柱纯化 HLTf_{ec} 蛋白的 SDS-PAGE 分析;B:HLTf_{ec} 蛋白在 Superose 6 10/300 柱上的洗脱图,HLTf_{ec} 蛋白在 16 mL 处出峰

图 1 HLTf_{ec} 蛋白的纯化

Fig 1 Purification of HLTf_{ec} protein

2.2 重组 HLTf 的 ATP 水解酶活性 在没有双链 DNA 时 HLTf_{ec} 只有非常小的 ATP 水解酶活性,而当双链 DNA 存在时该活性被强烈地促进超过 300 倍(图 2)。数据分析显示当双链 DNA 存在时,该活性的激活常数(K_a)为(81.4±14.1)nmol/L,该反应的最大反应比速率(定义为最大反应速率除以 HLTf 的浓度, V_{max})为(4.3±0.2)/min。这些数据表明,HLTf_{ec} 具有强大的受双链 DNA 激活的 ATP 酶活性,与其催化复制叉退行的功能一致。

2.3 重组 HLTf 的泛素连接酶活性 HLTf_{ec} 可强烈地促进泛素激活酶与 Ubc13-Mms2 复合物催化的自由泛素链的形成(图 3),说明其具有很强的泛素连接酶活性。笔者发现加入双链 DNA 或单链 DNA

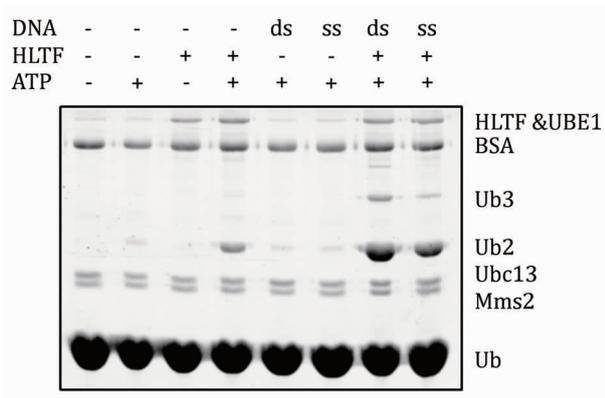


注:误差条代表 3 次独立实验的标准差;反应比速率定义为反应速率除以 HLTf 浓度

图 2 DNA 激活的 HLTf_{ec} 的 ATP 酶活性

Fig 2 DNA-stimulated ATPase activity of HLTf_{ec}

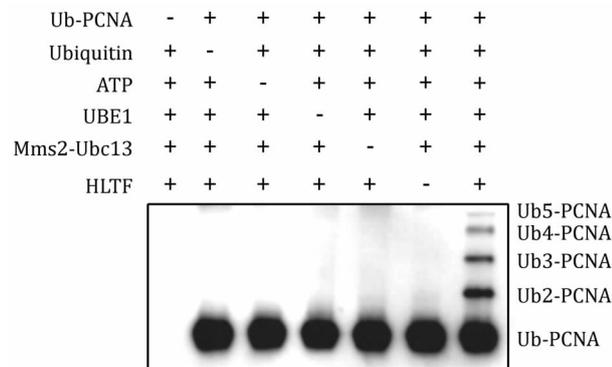
会进一步促进泛素链的形成。这些数据表明,HLTFec 具有较强的泛素连接酶活性,且可被 DNA 激活。



注:图中显示对反应的 SDS-PAGE 分析,用考马斯亮蓝染色检测蛋白。ss:单链 DNA;ds:双链 DNA;Ub:泛素;Ub2-3:含有 2 或 3 个泛素基团的泛素链;UBE1:人源泛素激活酶

图 3 HLTfFec 促进 Ubc13-Mms2 复合物催化自由泛素链形成

Fig 3 Stimulation of free ubiquitin chain formation catalyzed by Ubc13-Mms2 complex through HLTfFec



注:图中显示为反应后对泛素-PCNA 融合蛋白(Ub-PCNA)的 Western 印迹分析;Ub (2-5)-PCNA 代表带有 2-5 个泛素分子泛素链的 PCNA

图 4 HLTfFec 催化 PCNA 的泛素链标记

Fig 4 PCNA-anchored poly-ubiquitination by HLTfFec

2.4 重组 HLTfFec 催化 PCNA 泛素链标记的活性 该反应需要单泛素化的 PCNA 作为底物,在该底物中泛素以共价键连接在 PCNA 的 164 号位赖氨酸的侧链上。本研究使用类似的泛素-PCNA 融合蛋白作为底物检测 HLTfFec 是否能催化 PCNA 的泛素链标记。结果表明,HLTFec 可与 Mms2、Ubc13、泛素激活酶等蛋白协作,在泛素-PCNA 融合蛋白底物上催化 PCNA 的泛素链标记(图 4)。这些数据表明,HLTFec 可催化 PCNA 的泛素链标记,且对底物中泛素与 PCNA 的连接方式不敏感。

3 讨论

在常用的蛋白表达系统中,细菌表达系统所需要的工作量和材料最少^[23-24]。然而,由于真核生物和细菌在密码子偏好性上存在差异,真核生物的蛋白一般无法很好地在细菌中表达^[20-21]。此外,由于细菌与真核细胞中的蛋白折叠环境有很大的不同,一些真核生物的蛋白即使能在细菌中表达,也可能无法正确折叠从而缺乏生物活性^[19]。在细菌中表达来自高等真核生物的大分子量多结构域蛋白尤其困难。大分子量多结构域的人源 HLTfFec 蛋白在细胞的 DNA 复制压力应对中发挥关键作用,对它的结构和功能研究急需建立大规模制备高纯度、折叠正确的 HLTfFec 的方法。本课题组前期的工作表明,通过优化密码子偏好性可以在大肠杆菌中表达 HLTfFec。本研究优化了从大肠杆菌中制备 HLTfFec 的方案,建立了一个有效的制备大量、高纯度的 HLTfFec 的方法。更为重要的是,体外实验表明制备的 HLTfFec 具有完整的生物活性,提示它是正确折叠的。已有报道表明 HLTfFec 可以使用酵母表达系统表达^[8]。该系统较为耗时,转化、细胞培养及诱导蛋白表达需 2 周左右的时间。另外,研究人员仅利用该系统纯化了少量的 HLTfFec 进行功能实验,能否将该系统用于制备结构研究所需的大量、高纯度、正确折叠的 HLTfFec 还不清楚。与该方法相比,本研究建立的方法耗时更短,细胞培养和诱导蛋白表达仅需 2 d。而且,此方法可以方便的制备 5~6 mg 的高纯度、正确折叠的 HLTfFec。因此,本研究提供了一个有效的方案来制备正确折叠的 HLTfFec 蛋白,为该蛋白的结构和功能研究奠定了基础。

HLTF 催化 PCNA 的泛素链标记反应以单泛素化的 PCNA 作为底物,其生成需要 Rad18、Rad6、PCNA 和复制因子 C(replication factor C, RFC)将 PCNA 加载到双链 DNA 上^[18,25]。HLTF 的酵母同源蛋白 Rad5 催化类似的反应,也需要一组相似的蛋白因子^[26]。然而,研究表明 Rad5 对泛素与 PCNA 之间的连接方式并不敏感,可以将泛素-PCNA 融合蛋白作为底物来催化 PCNA 的泛素链标记。本研究发现 HLTfFec 同样对泛素与 PCNA 之间的连接方式不敏感,泛素-PCNA 融合蛋白也可作为 HLTfFec 催化 PCNA 泛素链标记反应的底物。本课题组最近发现, Rad5 和 HLTfFec 以截然不同的机制催化 PCNA 的泛素链标记。Rad5 通过其 HIRAN 结构域招募 PCNA 并对其泛素化,而 HLTfFec 的 HIRAN 结构域与 PCNA 没有相互作用^[18]。有意思的是,本研究表明,HLTF 和 Rad5 催化的差异巨大的 PCNA 的泛素链标记反应对泛素-PCNA 连

接方式均不敏感。这一发现为深入理解 Rad5 和 HLTf 催化的 PCNA 泛素链标记反应的机制提供线索, 也提供一种操作简便的实验体系来研究 HLTf 催化的 PCNA 泛素链标记反应。

参考文献:

- [1] ZEMAN M K, CIMPRICH K A. Causes and consequences of replication stress [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(1): 2–9.
- [2] MARIANS K J. Lesion bypass and the reactivation of stalled replication forks [J]. *Annu Rev Biochem*, 2018, 87: 217–238.
- [3] CORTEZ D. Replication-coupled DNA repair [J]. *Mol Cell*, 2019, 74(5): 866–876.
- [4] PASERO P, VINDIGNI A. Nucleases acting at stalled forks: how to reboot the replication program with a few shortcuts [J]. *Annu Rev Genet*, 2017, 51: 477–499.
- [5] BRANZEI D, PSAKHYE I. DNA damage tolerance [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2016, 40: 137–144.
- [6] CHATTERJEE N, WALKER G C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2017, 58(5): 235–263.
- [7] SALE J E. Translesion DNA synthesis and mutagenesis in eukaryotes [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5(3): a012708.
- [8] UNK I, HAJDÚ I, FÁTYOL K, et al. Human HLTf functions as a ubiquitin ligase for proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(10): 3768–3773.
- [9] LEE K Y, MYUNG K. PCNA modifications for regulation of post-replication repair pathways [J]. *Mol Cells*, 2008, 26(1): 5–11.
- [10] MOTEGI A, LLAW H J, LEE K Y, et al. Polyubiquitination of proliferating cell nuclear antigen by HLTf and SHPRH prevents genomic instability from stalled replication forks [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(34): 12411–12416.
- [11] BLASTYÁK A, HAJDÚ I, UNK I, et al. Role of double-stranded DNA translocase activity of human HLTf in replication of damaged DNA [J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(3): 684–693.
- [12] NEELSEN K J, LOPES M. Replication fork reversal in eukaryotes: from dead end to dynamic response [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16(4): 207–220.
- [13] UNK I, HAJDÚ I, BLASTYÁK A, et al. Role of yeast Rad5 and its human orthologs, HLTf and SHPRH in DNA damage tolerance [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2010, 9(3): 257–267.
- [14] ELSERAFY M, ABUGABLE A A, ATTEYA R, et al. Rad5, HLTf, and SHPRH: a fresh view of an old story [J]. *Trends Genet*, 2018, 34(8): 574–577.
- [15] ACHAR Y J, BALOGH D, NECULAI D, et al. Human HLTf mediates postreplication repair by its HIRAN domain-dependent replication fork remodelling [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(21): 10277–10291.
- [16] HISHIKI A, HARA K, IKEGAYA Y, et al. Structure of a novel DNA-binding domain of helicase-like transcription factor (HLTf) and its functional implication in DNA damage tolerance [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(21): 13215–13223.
- [17] KILE A C, CHAVEZ D A, BACAL J, et al. HLTf's ancient HIRAN domain binds 3' DNA ends to drive replication fork reversal [J]. *Mol Cell*, 2015, 58(6): 1090–1100.
- [18] SHEN M, DHINGRA N, WANG Q, et al. Structural basis for the multi-activity factor Rad5 in replication stress tolerance [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 321.
- [19] KIM H J, KIM H J. Yeast as an expression system for producing virus-like particles: what factors do we need to consider? [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2017, 64(2): 111–123.
- [20] VILLALOBOS A, NESS J E, GUSTAFSSON C, et al. Gene designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments [J]. *BMC Bioinformatics*, 2006, 7: 285.
- [21] STENSTRÖM C M, HOLMGREN E, ISAKSSON L A. Cooperative effects by the initiation codon and its flanking regions on translation initiation [J]. *Gene*, 2001, 273(2): 259–265.
- [22] BARKER S C, KASSEL D B, WEIGL D, et al. Characterization of pp60c-src tyrosine kinase activities using a continuous assay: autoactivation of the enzyme is an intermolecular autophosphorylation process [J]. *Biochemistry*, 1995, 34(45): 14843–14851.
- [23] LAURSEN B S, SØRENSEN H P, MORTENSEN K K, et al. Initiation of protein synthesis in bacteria [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005, 69(1): 101–123.
- [24] TENAILLON O, SKURNIK D, PICARD B, et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli* [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(3): 207–217.
- [25] HARACSKA L, UNK I, PRAKASH L, et al. Ubiquitylation of yeast proliferating cell nuclear antigen and its implications for translesion DNA synthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(17): 6477–6482.
- [26] HOEGE C, PFANDER B, MOLDOVAN G L, et al. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO [J]. *Nature*, 2002, 419(6903): 135–141.

(2021-03-10 收稿)