

# hPARP1 酶在杆状病毒/昆虫细胞中的高表达及快速纯化

周海燕, 马军, 杨雪丽, 龚笑海, 李秋萍, 金坚

江南大学医药学院, 江苏 无锡 214122

周海燕, 马军, 杨雪丽, 等. hPARP1 酶在杆状病毒/昆虫细胞中的高表达及快速纯化. 生物工程学报, 2013, 29(7): 998–1005.  
Zhou HY, Ma J, Yang XL, et al. Expression and purification of hPARP1 by baculovirus system. Chin J Biotech, 2013, 29(7): 998–1005.

**摘要:** PARP1 是动物细胞内的一种重要的 DNA 修复酶。近几年 PARP1 作为新型的抗癌靶点, 受到广泛的关注。为了获得高活性的 PARP1, 首先将 *hPARP1* 基因克隆到载体 pFastBac<sup>TM</sup>1 中, 构建转移载体 pFast-hPARP1; 然后转化大肠杆菌 *Escherichia coli* DH10Bac 感受态细胞中。其次, 通过位点特异性转座, 将 *hPARP1* 基因整合到 Bacmid 穿梭载体中, 构建表达质粒 Bacmid-hPARP1。最后, 通过脂质体将表达质粒转染 Sf9 昆虫细胞。Western blotting 和酶活测定法对 hPARP1 的表达和活性进行分析。采用 3-氨基苯甲酰胺亲和层析柱对收获的昆虫细胞中表达的 hPARP1 酶进行纯化。Western blotting 结果表明在昆虫细胞中 hPARP1 酶表达成功。经 3-氨基苯甲酰胺亲和层析柱纯化后, Sf9 昆虫细胞表达出的 hPARP1 酶的比活由 0.051 nmol/(min·μg) 提高到了 1.988 nmol/(min·μg), 而且每 100 mL 的细胞中能够收获约 3.2 mg 酶。实验结果为 PARP1 大规模生产和应用提供了可参考利用的技术。

**关键词:** hPARP1, 杆状病毒, 表达, 纯化

## Expression and purification of hPARP1 by baculovirus system

Haiyan Zhou, Jun Ma, Xueli Yang, Xiaohai Gong, Qiuping Li, and Jian Jin

School of Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** PARP1 is an important part of DNA repair machinery. In recent years, PARP1 as novel anti-cancer therapeutic

**Received:** December 28, 2012; **Accepted:** February 22, 2013

**Corresponding author:** Jian Jin. Tel: +86-510-85918219; E-mail: jinjian31@126.com

Qiuping Li. E-mail: liqp@163.com

网络出版时间: 2013-04-15

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130415.1715.001.html>

target has been broadly explored. In this study, we expressed hPARP1 enzyme in the baculovirus system and tested its activity. We inserted *hPARP1* gene into the pFastBac<sup>TM</sup>1, a baculovirus transfer vector and then transformed it into DH10Bac containing a shuttle vector of Bacmid. After co-transfecting the recombinant plasmid into Sf9 insect cells, the expressed hPARP1 was purified by 3-aminobezamide affinity chromatography. The expression of hPARP1 was visualized by SDS-PAGE and Western blotting; the activity of expressed and purified hPARP1 was confirmed by the reaction of consumption of NAD<sup>+</sup> by hPARP1 *in vitro*. After the purification by 3-aminobezamide affinity column, 3.2 mg protein was obtained and its specific activity was 1.988 nmol/(min·μg).

**Keywords:** hPARP1, baculovirus system, expression, affinity purification

聚 ADP 核糖聚合酶 (Poly ADP-ribose polymerase, PARP)<sup>[1]</sup>是一种参与 DNA 修复的核酶,能够以烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD<sup>+</sup>) 为底物,将聚腺苷二磷酸核糖基转移到受体蛋白的谷氨酸残基上,催化合成 PAR 聚合物。但在该反应过程中会消耗大量 ATP 和 NAD<sup>+</sup>,导致细胞死亡。由于 PARP 的激活在缺血再灌注、糖尿病、炎症和肿瘤<sup>[2]</sup>的病理过程中起着重要作用,这预示 PARP 抑制剂在治疗这些疾病中方面有着良好的前景。特别是在肿瘤治疗中,PARP 已成为一个重要的新的治疗靶点<sup>[3]</sup>。

PARP 是一个蛋白超家族,包括 PARP1、PARP2、PARP3、Vault-PARP、TANK1、TANK2 和 TANK3 等亚型<sup>[4]</sup>,其中对 PARP1 的研究最为深入和广泛。PARP1 分子量为 116 kDa,含有 3 个主要区域: N 端为 46 kDa 的 DNA 结合区域,中间是一个 22 kDa 的自我修饰区域和 C 端是一个 54 kDa 的催化区域。当 PARP1 的锌指结构检测到 DNA 单链或双链断裂时,PARP1 形成二聚体并催化 NAD<sup>+</sup>合成烟酰胺和聚 ADP 核糖<sup>[5]</sup>。

聚 ADP 核糖聚合酶广泛应用于 PARP1 抑制剂的筛选、PARP1 与其他 DNA 修复蛋白关系研究等。1986 年, Burtscher 等<sup>[6]</sup>首次在大肠杆菌中表达出有活性的 PARP1,此后,一些研究学者纷

纷发现酵母细胞<sup>[7]</sup>、CHO 细胞<sup>[8]</sup>及其昆虫细胞<sup>[9]</sup>都可以作为 PARP1 的表达宿主,其中昆虫细胞表达量较高<sup>[6-9]</sup>,1 L 大肠杆菌仅纯化出 0.3 mg hPARP1<sup>[6]</sup>,而仅仅 100 mL 的昆虫细胞便可纯化出其 10 倍以上 hPARP<sup>[9]</sup>。目前,国内尚未见成功表达纯化 hPARP1 研究的报道。

本实验室从分子构建开始,利用 Bac-to-bac 昆虫杆状病毒表达系统成功地表达出高活性的 hPARP1,并利用 hPARP1 酶可以被 3-氨基苯甲酰胺特异性亲和的特点纯化出了高活性的 hPARP1,为 PARP1 抑制剂的筛选奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌株、细胞和试剂

*hPARP1* 基因购自 OriGene 科技有限公司。质粒 pFastBac<sup>TM</sup>1、大肠杆菌 *Escherichia coli* DH10Bac、*Escherichia coli* DH5α 和草地贪夜蛾卵巢细胞系 (*Spodoptera frugiperda* 9, Sf9) 均由本实验室保存。脂质体转染试剂 (Lipofection 2000 Reagent) 和 SF900 II SFM 昆虫细胞培养基购自 GIBCO 公司;琼脂糖回收试剂盒、限制性内切酶 *Sgf*I 和 *Miu*I 购自宝生物工程 (大连) 有限公司;质粒纯化试剂盒和 T4 DNA 连接酶购自生物工程 (上海) 股份有限公司;ECH

Sepharose 6B 和 EDC 购自北京韦氏博慧色谱科技有限公司; 3-氨基苯甲酰胺 (3AB) 购自阿拉丁公司; Anti-PARP1 (sc-74470) 多克隆抗体购自 Santa Cruz Biotechnology, Anti-mouse IgG-HRP 二抗购自 Vector 公司。其他试剂均为国产分析纯级。

## 1.2 重组杆状病毒表达质粒 Bacmid-hPARP1 的构建和鉴定

用 *Sgf I* / *Miu I* 双酶切 PCMVhPARP1, 回收 hPARP1 片段, 并克隆至 pFastBac<sup>TM</sup>1 的相应位点中, 然后转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中。鉴定为阳性的重组子点接在 LB 培养基中过夜培养, 采用质粒纯化试剂盒提取重组质粒 pFast-hPARP1, 用 *Sgf I* / *Miu I* 双酶切鉴定, 并送上海生工生物技术有限公司进行测序。取 *E. coli* DH10Bac 感受态细胞, 加入 1 ng 的重组质粒 pFast-hPARP1, 42 °C 热击 45 s 后, 于 LB 培养基 37 °C 孵育 4 h, 涂布在含有抗性的平板上, 并加入 X-gal, 将平板于 37 °C 培养 48 h, 筛选白色菌落作为阳性质粒 Bacmid-hPARP1。提取的阳性质粒可用于下一步转染实验。

## 1.3 Sf9 细胞的转染及其高滴度重组杆状病毒的获得

采用 Invitrogen 公司的脂质体转染试剂将重组质粒 Bacmid-hPARP1 转染 Sf9 细胞, 操作步骤按照产品说明书进行。每孔 8  $\mu$ g 质粒转染 Sf9 细胞 4~6 h 后更换 SF900 II SFM, 同时转染空质粒, 作为阴性对照。6 d 后观察细胞出现病变, 收集细胞上清 12 000 r/min 离心 5 min, 收集上清并 4 °C 避光保存, 所获得的细胞即为 P1 代。取 P1 代重组病毒, 按照 1 : 10 稀释后, 感染处于

对数生长期的 Sf9 细胞, 27 °C 培养 3 d, 细胞出现明显病变时收集上清, 得到 P2 代病毒。同样方法再传一代, 筛选到高滴度的含有 hPARP1 基因的重组杆状病毒。用 P3 代高滴度的病毒感染细胞 48 h、56 h、64 h 和 72 h 后, 分别收集病变的细胞。

## 1.4 hPARP1 的 Western blotting 检测

收集病变的细胞, 用 PBS 重悬后, 超声裂解细胞, 12 000 r/min 离心 10 min, 上清进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜并用 5% 的脱脂奶粉封闭后, 用鼠抗 hPARP1 的一抗 4 °C 孵育过夜, 经 TBST 洗涤后, 二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 室温孵育 2 h, 洗涤后显色并观察特异性条带。

## 1.5 hPARP1 活性测定

### 1.5.1 NAD<sup>+</sup>标准曲线的测定

黑色 96 孔板中加入 20  $\mu$ L NAD, 使其终浓度分别为 0.48、0.97、1.95、3.9、7.81、15.625、31.25、62.5、125 和 250 nmol/L, 每个浓度设 4 个孔。然后加入 10  $\mu$ L 的 PARP 稀释缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, pH 8.0), 加入 10  $\mu$ L 的 2 mol/L KOH 和 10  $\mu$ L 的 20% 苯乙酮, 4 °C 反应 10 min; 最后加入 45  $\mu$ L 的 88% 甲酸, 110 °C 反应 5 min, 待板温度降到常温时, 在激发波长 (360 $\pm$ 15) nm, 发射波长 (445 $\pm$ 15) nm 条件下<sup>[10]</sup>测荧光强度。

### 1.5.2 hPARP1 活性的测定

在黑色 96 孔板中加入 20  $\mu$ L 的 125 nmol/L NAD<sup>+</sup>, 10  $\mu$ L 不同含量的溶于 PARP 缓冲液中 hPARP1 和 DNA (终浓度为 15 mg/L) 混合物。反应 15 min 后, 加入 10  $\mu$ L 2 mol/L KOH 和 10  $\mu$ L 20% 苯乙酮, 4 °C 反应 10 min; 最后加入 45  $\mu$ L

88%甲酸, 110 °C 反应 5 min, 待板温度降到常温时, 在激发波长 (360±15) nm, 发射波长 (445±15) nm 条件下测荧光强度, 同时设置空白对照孔为 20 μL 125 nmol/L NAD<sup>+</sup>, 10 μL PARP 缓冲液和 DNA (终浓度为 15 mg/L) 混合物, 其 hPARP1 活性为 0%<sup>[10-11]</sup>。

## 1.6 hPARP1 的纯化

### 1.6.1 3-氨基苯甲酰胺 (3AB) 亲和层析柱的合成

用 0.5 mol/L NaCl 洗涤 25 mL ECH Sepharose 6B, 去除乙醇后, 用 0.1 mol/L NaOH 将其 pH 调至 4.5~6.0 之间。在 4 °C 条件下, 在 ECH Sepharose 6B 中缓慢加入 1 g 的 EDC (N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride) 和 0.5 g 溶于 1 mL 甲醇中的 3-氨基苯甲酰胺, 摇动过夜, 并保持其 pH 为 4.5~6.0。用 100 mmol/L 乙酸钠 (pH 4.0) 和 0.5 mol/L NaCl 终止交联, 并用 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 和 0.5 mol/L NaCl 洗涤填料<sup>[12]</sup>。

### 1.6.2 利用 3-氨基苯甲酰胺(3AB)亲和层析柱纯化 hPARP1

12 000 r/min 离心 5 min, 收集 Sf9 细胞, 将其重悬于缓冲液 A (50 mmol/L 葡萄糖, 0.2% Tween 20, 0.5 mmol/L EDTA 和 0.5 mmol/L PMSF), 超声破碎后 12 000 r/min 离心 30 min, 硫酸鱼精蛋白 (终浓度 1 mg/mL) 去除其 DNA, 上清液中缓慢加入硫酸铵, 使硫酸铵的饱和度达到 70%后, 4 °C 静置 1 h。12 000 r/min 离心 20 min, 用缓冲液 B (100 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 14 mmol/L β-巯基乙醇, 0.5 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L PMSF) 溶解沉淀。

在层析柱中装 20 mL ECHsepharose 6B-3AB

亲和填料, 并用缓冲液 B 平衡后, 以重力速度流速上样。用含有 100 mmol/L、400 mmol/L 和 800 mmol/L NaCl 不同浓度的缓冲液 B 除去样品中未结合的蛋白, 然后用洗脱液 (100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 400 mmol/L NaCl, 1 mmol/L 3-甲氧基苯甲酰胺, 14 mmol/L β-巯基乙醇, 0.5 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L PMSF) 进行洗脱, 并收集样品。

## 2 结果与分析

### 2.1 pFast-hPARP1 昆虫表达载体的构建

重组质粒 pFast-hPARP1 是通过将 *hPARP1* 基因插入到质粒 pFastBac<sup>TM</sup>1 的 *Sgf* I 和 *Miu* I 两个酶切位点间来构建的。获得的重组质粒经 *Sgf* I 和 *Miu* I 双酶切进行鉴定, 酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳分析 (图 1)。通过双酶切鉴定, 理论预测目的片段约为 3 045 bp。图 1 中泳道 2 可以看出, 质粒酶切后出现 2 条带, 有一条带约在

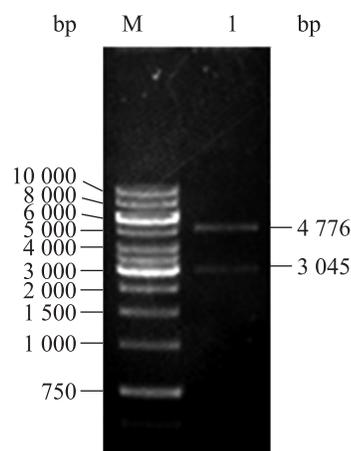


图 1 重组质粒 pFast-hPARP1 双酶切产物的琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 1 Identification of recombinant transfer plasmid by enzyme digestion. M: DNA marker; 1: recombinant transfer plasmid digested with *Sgf* I and *Miu* I.

3 000 bp 处出现,可能对应的是 *hPARP1* 基因片段,将鉴定为阳性的重组质粒送往上海生工生物技术有限公司进行测序,测序结果发现重组质粒上的 *hPARP1* 基因与报道的基因序列完全一致,表明 *hPARP1* 基因被正确克隆到质粒 pFastBac<sup>TM</sup>1 上,可用于下一步的实验中,将 pFast-hPARP1 导入 *E. coli* DH10Bac 感受态细胞,发生转座后,挑取白色的阳性质粒,为 Bacmid-hPARP1。

## 2.2 免疫杂交试验验证 hPARP1 的表达

提取重组质粒 (Bacmid-hPARP1) 并转染 Sf9 细胞,6 d 后可见转染 Bacmid-hPARP1 的细胞直径增大,细胞核充满整个细胞,细胞发生病变。将 P3 代病毒接种到对数生长期的 Sf9 细胞中,分别在 48、56、64 和 72 h 后收集病变细胞。超声破碎并离心后,取上清将感染细胞和野生病毒感染 Sf9 细胞组分别进行 SDS-PAGE 电泳(图 2),图 2 中可在泳道 2、3、4、5 清晰地看见 116 kDa 处 hPARP 的条带。并利用免疫印迹试验(Western blotting)对细胞内的 hPARP1 酶进行结合特异性检测(图 3)。从图 3 中可以看出,转染 pFast-hPARP1 的昆虫细胞可以与 hPARP1 抗体发生特异性反应,而野生病毒感染的 Sf9 细胞组与 hPARP1 抗体并无结合反应。免疫印迹结果表明,Sf9 昆虫细胞成功表达 hPARP1 酶。

## 2.3 hPARP1 活性的测定

### 2.3.1 NAD<sup>+</sup>标准曲线的确定

选择一系列浓度的底物 NAD<sup>+</sup>,按照上述方法测定荧光值,结果显示(图 4)在 1 nmol/L 时候就可以检测生成化合物的荧光,当浓度达到 250 nmol/L 时仍然具有良好的线性关系( $R^2=0.9984$ )。根据标准曲线的测定,选择荧光值

大约一半时的底物浓度,125 nmol/L NAD<sup>+</sup>作为酶活测定的标准。

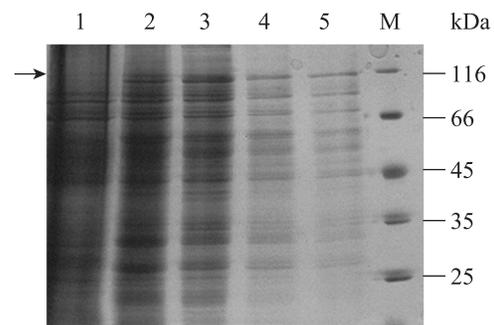


图 2 SDS-PAGE 检测昆虫细胞表达 hPARP1

Fig. 2 Identification of hPARP1 expressed by Sf9 insect cell by Commaissie blue staining. 1: Sf9 insect cell transfected with plasmid pFastBac<sup>TM</sup>1; 2: hPARP1 enzyme expressed in Sf9 insect cell after 48 h; 3: hPARP1 enzyme expressed in Sf9 insect cell after 56 h; 4: hPARP1 enzyme expressed in Sf9 insect cell after 64 h; 5: hPARP1 enzyme expressed in Sf9 insect cell after 72 h; 6: protein marker.



图 3 Western blotting 分析 hPARP1 抗体与 hPARP1 酶的特异性结合

Fig. 3 Identification of hPARP1 expressed by Sf9 insect cell by Western blotting. 1: hPARP1 enzyme expressed in Sf9 insect cell identified by Western blotting; 2: Sf9 insect cell transfected with plasmid pFastBac<sup>TM</sup>1.

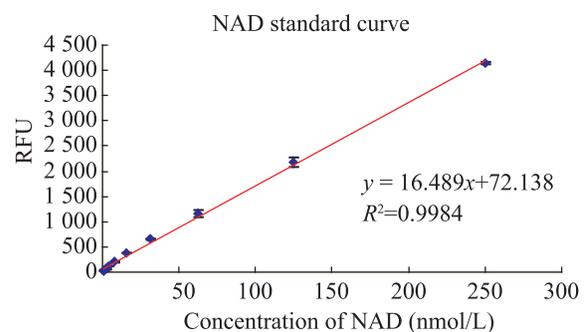


图 4 NAD<sup>+</sup>标准曲线

Fig. 4 NAD<sup>+</sup> calibration curve.

### 2.3.2 hPARP1 活性的测定

hPARP1 活性的测定是通过检测其底物  $\text{NAD}^+$  的量来间接测定 hPARP1 的活性,  $\text{NAD}^+$  属于 N-烷基吡啶类化合物, 其可以与酮类反应, 在过量酸中加热转化为荧光分子, 通过测定荧光值变化间接反应 hPARP1 活性。根据标准曲线, 使用

125 nmol/L  $\text{NAD}^+$  作为酶活测定的底物, 分别加入纯化后的不同量的 hPARP1 酶和相同 DNA, 反应 15 min。结果可见图 5, 随着 hPARP1 量增加, 荧光值逐渐降低, 说明在相同时间内, 随着 hPARP1 酶浓度的增加, 底物  $\text{NAD}^+$  被消耗的越多, 即剩余的  $\text{NAD}^+$  越少, 荧光值越小。

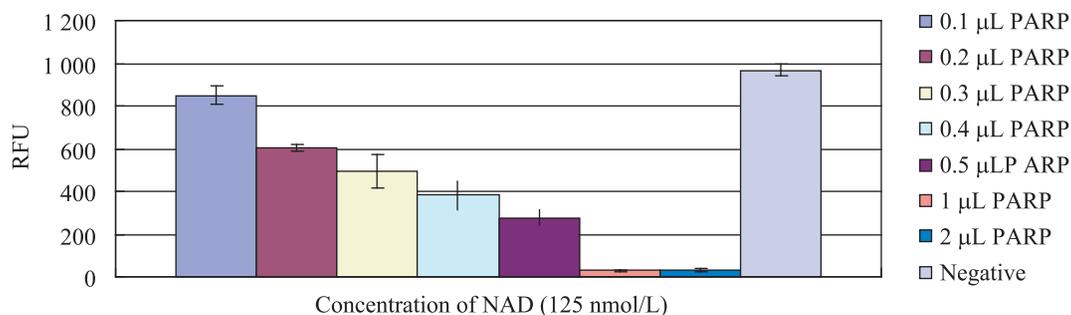


图 5 hPARP1 的活性

Fig. 5 Activity of purified hPARP1.

### 2.4 hPARP1 酶的纯化

收集病变的细胞, 超声破碎并离心后, 利用硫酸鱼精蛋白去除 DNA。通过 70% 硫酸铵沉淀, 一方面富集 hPARP1 酶和去除部分杂蛋白 (图 6); 另外一方面, 通过硫酸铵沉淀使 hPARP1 酶的比活从 0.051 nmol/(min·μg) 提高到 0.072 nmol/(min·μg) (表 1), 纯化倍数提高了 1.4 倍, 产率为 91.5%。

由于 3-氨基苯甲酰胺是 PARP1 的抑制剂, 它可以与 PARP1 的催化结构域特异性结合, 所以我们利用 PARP1 的这一特点交联合成了 3-氨基苯甲酰胺柱, 并用它对 hPARP1 进行纯化。首先, 用不同浓度的盐溶液梯度洗除杂质, 然后用含有 3-甲氧基苯甲酰胺的洗脱液进行洗脱, 收集液用紫外监测仪检测。纯化后的蛋白进行还原性

SDS-PAGE 分析 (图 6)。如图 6 所示, 泳道 2 中可以清晰观察到 116 kDa 附近有一条很深的条带, 经扫描分析, 其纯度大于 90%。结果表明通

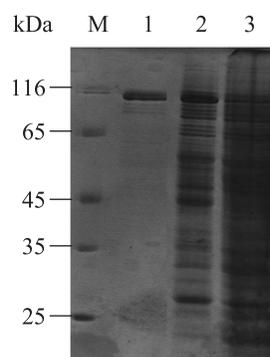


图 6 SDS-PAGE 检测 hPARP1 酶的纯化

Fig. 6 Commassie blue staining of the purified poly (ADP-ribose) polymerase1 from Sf9 lysate. M: protein marker; 1: 3-aminobenzamide affinity chromatography; 2: ammonium sulfate precipitation; 3: cleared lysate.

表 1 hPARP1 纯化活性

Table 1 hPARP1 activity during the purification

Step	Total protein (μg)	Protein concentration (μg/mL)	Total activity (nmol/min)	Specific activity (nmol/(min·μg))	Volume (mL)	Yield	Fold
Cell Lysis	172 000	8 600	8 834	0.051	20	1.000	0.00
Ammonium sulfate	111 686	5 584	8 087	0.072	20	0.915	1.40
3-Aminobenzamide	3 285	547	6 535	1.988	6	0.808	38.72

过利用 hPARP1 酶的亲和层析柱可以实现 hPARP1 酶的分离纯化, 并得到较高纯度的 hPARP1 酶蛋白, 同时还可以大大提高 hPARP1 酶的比活, 达到 1.988 nmol/(min·μg)。经过亲和纯化后, hPARP1 酶的纯化倍数提高了 38 倍, 并且产率仍维持在 80% 以上。

### 3 讨论

近年来, 由于 PARP1 与炎症、肿瘤、缺血再灌注等病理过程有着密切的联系, PARP1 已经成为一个新的治疗靶点。目前, PARP1 抑制剂的筛选已经成为抗肿瘤药物的研究热点<sup>[13-15]</sup>, PARP1 抑制剂 AZD2281<sup>[16]</sup>, ABT-888<sup>[17]</sup>等已经进入临床试验阶段, 但是由于其临床用药量比预期稍大, 临床试验陷入了一定的困境<sup>[18]</sup>, 因此, 纯化出大量高活性的 hPARP1 酶有利于我们对 PARP1 晶体结构的探索, 进而增加对 PARP 这个靶点的认识。同时, 高活性及纯度的聚 ADP 核糖聚合酶在 PARP1 抑制剂筛选中的应用具有广阔的前景。

由于 *E. coli* 中有 PARP1 的水解酶及其蛋白在原核表达系统中的折叠不同<sup>[9]</sup>, *E. coli* 中表达的有活性的 hPARP1 的表达量较低, 因此我们采用杆状病毒表达系统。昆虫表达系统有诸多优

点, 如能进行翻译后修饰, 酶的活性比较稳定, 产量高, 适用性强等<sup>[19]</sup>。本研究将编码 hPARP1 基因重组于杆状病毒表达载体中, 成功构建了能够表达 hPARP1 酶的重组杆状病毒。Western blotting 表明该病毒表达的 hPARP1 酶可被 hPARP1 单克隆抗体识别, 表明该系统表达的 hPARP1 具有免疫原性; 酶活测定实验表明 hPARP1 有良好的生物活性。

hPARP1 酶在体外极不稳定, 容易降解, 其半衰期极短<sup>[20]</sup>。本研究仅仅利用一个亲和层析柱将 hPARP1 纯化, 这为工业大规模生产提供了可能。纯化后的 hPARP1 酶仍具有良好的生物活性, 本研究一方面为 PARP1 抑制剂的筛选创造了条件; 另一方面, 从 100 mL 的昆虫细胞中即可纯化得到 3.2 mg 的 PARP1 酶, 表明通过杆状病毒表达系统生产 PARP1 酶可以获得很高的产量, 这为大规模生产 hPARP1 酶奠定了基础。同时, 大量生产 hPARP1 酶对我们进一步研究 hPARP1 的晶体结构, 增加对 PARP1 的认识提供了必要的条件。

### REFERENCES

- [1] Jagtap P, Szabó C. Poly (ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. Nat Rev

- Drug Discov, 2005, 4(5): 421–440.
- [2] Aguilar-Quesada R, Munoz-Gamez J, Martin-Oliva D, et al. Modulation of transcription by PARP-1: consequences in carcinogenesis and inflammation. *Curr Med Chem*, 2007(11), 14: 1179–1187.
- [3] Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. *Nature*, 2005, 434(7035): 913–917.
- [4] Beneke S, Bürkle A. Poly (ADP-Ribosyl) ation and aging. *Exp Gerontol*, 2004, 39(11): 234–241.
- [5] Langelier MF, Planck JL, Roy S, et al. Structural basis for DNA damage-dependent poly (ADP-ribose) ation by human PARP1. *Science*, 2012, 336(6082):728–732.
- [6] Burtscher HJ, Auer B, Klocker H, et al. Isolation of ADP-ribosyltransferase by affinity chromatography. *Anal Biochem*, 1986, 152(2): 285–290.
- [7] Kaiser P, Auer B, Schweiger M. Inhibition of cell proliferation in *Saccharomyces cerevisiae* by expression of human NAD<sup>+</sup> ADP-ribosyltransferase requires the DNA binding domain (“zinc fingers”). *Mol Gen Genet*, 1992, 232(2): 231–239.
- [8] Fritz G, Auer B, Kaina B. Effect of transfection of human poly (ADP-ribose) polymerase in Chinese hamster cells on mutagen resistance. *Mutat Res*, 1994, 308(2): 127–133.
- [9] Giner H, Simonin F, de Murcia G, et al. Overproduction and large-scale purification of the human poly (ADP-ribose) polymerase using a baculovirus expression system. *Gene*, 1992, 114(2): 279–283.
- [10] Putt KS, Hergenrother PJ. An enzymatic assay for poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) via the chemical quantitation of NAD<sup>+</sup>: application to the high-throughput screening of small molecules as potential inhibitors. *Anal Biochem*, 2004, 326(1): 78–86.
- [11] Liu J, Zhang LY. HTS model for poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors. *Chin Pharmacol Bull*, 2007, 23(1): 124–127 (in Chinese).  
柳军, 张陆勇. 聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1 抑制剂高通量筛选模型. *中国药理学通报*, 2007, 23(1): 124–127.
- [12] Dantzer F, Amé JC, Schreiber V, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 activation during DNA damage and repair. *Meth Enzymol*, 2006, 409: 493.
- [13] Kummar S, Chen A, Ji J, et al. Phase I study of PARP inhibitor ABT-888 in combination with topotecan in adults with refractory solid tumors and lymphomas. *Cancer Res*, 2011, 71(17): 5626–5634.
- [14] Samol J, Ranson M, Scott E, et al. Safety and tolerability of the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor, olaparib (AZD2281) in combination with topotecan for the treatment of patients with advanced solid tumors: a phase I study. *Invest New Drugs*, 2011, 30(4): 1–8.
- [15] Domagala P, Lubinski J, Domagala W, et al. Iniparib in metastatic triple-negative breast cancer. *New Engl J Med*, 2011, 364(18): 1780–1781.
- [16] Shivaani K, Alice C, Ralph EP, et al. Advances in using PARP inhibitors to treat cancer. *BMC Medicine*, 2012, 10(1): 25–30.
- [17] Pothuri B, Sparano J, Blank S, et al. Phase I study of the PARP inhibitor ABT-888 (veliparib) and pegylated liposomal doxorubicin (PLD) in recurrent ovarian (ov) and breast (br) cancers. *Gynecol Oncol*, 2012, 125: 22.
- [18] Patel AG, De Lorenzo SB, Flatten KS, et al. Failure of iniparib to inhibit poly (ADP-Ribose) polymerase *in vitro*. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(6): 1655–1662.
- [19] Wang F, Diao Y, Xiao WD, et al. Large-scale production of recombinant adeno-associated virus (rAAV). *Chin J Biotech*, 2009, 25(11): 1608–1613 (in Chinese).  
王峰, 刁勇, 肖卫东, 等. 重组腺相关病毒规模化生物包装技术. *生物工程学报*, 2009, 25(11): 1608–1613.
- [20] Caiafa P, Guastafierro T, Zampieri M, et al. Epigenetics: poly (ADP-ribose) ation of PARP-1 regulates genomic methylation patterns. *FASEB J*, 2009, 23(3): 672–678.

(本文责编 陈宏宇)