

酿酒酵母 ATP-硫酸化酶在大肠杆菌中的表达纯化及其在焦测序中的应用 Expression and Purification of ATP Sulfurylase from *Saccharomyces cerevisias* in *Escherichia coli* and Its Application in Pyrosequencing

罗 娟¹ 吴文娟¹ 邹秉杰¹ 周国华^{1,2*}

LUO Juan¹, WU Wen-Juan¹, ZOU Bing-Jie¹ and ZHOU Guo-Hua^{1,2*}

1 中国药科大学生命科学与技术学院 南京 210009

2 华东医学生物技术研究所 南京 210002

1 College of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2 Huadong Research Institute for Medicine and Biotechnics, Nanjing 210002, China

摘 要 ATP-硫酸化酶(ATPS, EC 2.7.7.4)是一种可逆催化 ATP 和 SO_4^{2-} 反应生成腺嘌呤-5'-磷酸硫酸(APS)和焦磷酸盐(P₂i)的酶,已经用于焦测序反应。以酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisias*, CICC 1202)基因组 DNA 为模板,用 PCR 扩增得到 ATPS 基因,并克隆到原核表达质粒 pET28a(+),得到重组表达质粒 pET28a(+)-ATPS,在 IPTG 诱导下,携带 pET28a(+)-ATPS 的大肠杆菌 BL21(DE3)表达分子量约为 60 kD 的带有 His 标签的 ATPS 酶,经镍亲和层析和超滤两步纯化后,可得到电泳纯级 ATPS,比活达 5.1×10^4 u/mg,并成功应用于焦测序反应中。

关键词 ATP-硫酸化酶 酿酒酵母 表达 纯化 焦测序

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0623-05

Abstract ATP sulfurylase(ATPS, EC 2.7.7.4) reversibly catalyzes the reaction between ATP and sulfate to produce APS and pyrophosphate(P₂i), and has been used in pyrosequencing. The gene coding ATP sulfurylase was amplified from the genomic DNA of *Saccharomyces cerevisias* (CICC 1202), and cloned into prokaryotic expression plasmid pET28a(+) to provide a recombinant expression plasmid pET28a(+)-ATPS. Upon IPTG induction, ATP sulfurylase was produced by *E. coli* BL21(DE3) harboring the recombinant expression plasmid pET28a(+)-ATPS. The relative molecular weight of recombinant ATP sulfurylase with His tag was about 60kD. The recombinant ATP sulfurylase with electrophoretic pure grade was obtained only by two purification steps: His·Bind Resin affinity chromatography and ultrafiltration. The specific activity of the purified recombinant ATP sulfurylase was as high as 5.1×10^4 u/mg. The successful application of the enzyme in pyrosequencing was also demonstrated.

Key words ATP sulfurylase, *Saccharomyces cerevisias*, expression, purification, pyrosequencing

ATP-硫酸化酶(ATP sulfurylase, ATPS, EC 2.7.7.4)广泛存在于植物、动物及微生物中,但它在

各种生物体当中的生物学作用略有不同。在植物和部分微生物中,ATPS 是催化硫酸盐同化反应第一步

Received: November 28, 2006; Accepted: December 31, 2006.

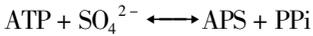
This work was supported by the grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 30470454).

* Corresponding author. Tel: +86-25-84514223, Fax: +86-25-84514223, E-mail: ghzhou@nju.edu.cn

国家自然科学基金(No. 30470454)资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

的关键酶,在 ATPS 催化下,硫酸根离子与 ATP 反应,产生腺嘌呤-5'-磷酸硫酸(APS)和焦磷酸盐(PPI)。而在一些化学自养菌^[1]和化能无机营养菌^[2]中,ATPS 是催化硫化氢氧化生成无机硫酸盐最后一步的酶,其作用是催化 APS 和 PPI 反应生成 ATP 和硫酸根离子,即上述反应的逆反应。



ATPS 已经从产黄青霉菌^[3]、鼠肝^[4]、卷心菜^[5]等生物体中提取并纯化得到,而且编码 ATPS 的基因也已经从原核生物^[6]、真核生物^[7]、动物^[8]和植物^[9]中克隆出来并在适当的宿主中得到表达。不同来源的 ATPS 结构不同,大肠杆菌来源的 ATPS 是异源二聚体且需要 GTP 激活^[6],酵母、真菌以及植物来源的 ATPS 是单体或是同源寡聚体^[5,7]。在分子生物学方面,目前已通过氨基酸修饰等手段研究其结构和功能的关系,加深了对 ATPS 作用机制的了解^[7]。

ATPS 偶连荧光素酶可以应用于很多方面,如: PPI 定量^[10]、RNA 测定^[11]、DNA 测序^[12]、DNA 聚合酶酶活测定^[13]等等。目前,国外有很多关于基因工程表达 ATPS 的报道,所用表达载体分别是 pCRII^[7]、pSVL^[8]等等,分离纯化方法步骤繁琐、损失较大、费时费力。Novagen 公司开发的 pET28a(+)载体带有 His-6 融合标签,利于纯化目的蛋白。因此本研究中,我们采用 pET28a(+)融合表达系统,将 ATPS 蛋白与 His tag 进行融合表达,经镍亲和层析和超滤两步纯化后,得到电泳级 ATPS,并将表达产物应用于焦测序(pyrosequencing)反应中。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌株

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisias*, CICC 1202)购自中国工业微生物菌种保藏中心。宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)及原核表达质粒 pET28a(+)由南京军区疾病预防控制中心刁振宇博士惠赠。

1.2 试剂

限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、λ-EcoT14 I digest DNA Marker、蛋白 Marker、PCR 产物纯化试剂盒等购自 TaKaRa 公司; d-虫荧光素、荧光素酶、Klenow (exo⁻) DNA polymerase 等购自 Promega 公司; Apyrase 购自 Sigma 公司; 酵母提取物、胰蛋白胨等购自 Oxoid 公司; IPTG、Lysozyme 等购自 Amresco 公司; His·Bind Resin 和 His·Bind Columns 等购自 Novagen 公司; 0.5mL 超滤离心管(10K)购自

Millipore 公司,其他试剂均为分析纯、国产。

1.3 方法

1.3.1 重组表达质粒 pET28a(+)-ATPS 的构建 酿酒酵母基因组 DNA 按酚-氯仿法抽提。基于 Cherest 等人公布的酿酒酵母 ATPS 编码基因 *MET3* 序列^[14]和载体 pET28a(+)多克隆位点,设计并合成上游引物 ATPS-P1: 5'-GTGTGTGGATCCATGCTGCTCCTCACCGTGTA-3'(划线字母为 BamH I 酶切位点)及下游引物 ATPS-P2: 5'-GTGTGTAAGCTTCTACTTTT GAGATGGGAGCATT-3'(划线字母为 Hind III 酶切位点),以基因组 DNA 为模板,利用该组引物扩增 *MET3* 基因。采用 25μL 反应体系(10× buffer 2.5μL, 2.5mmol/L dNTP 2.0μL, 25mmol/L Mg²⁺ 1.5μL, 引物(10pmol/μL) 1μL, 5u Taq polymerase (TaKaRa) 0.125μL, 基因组 DNA 约 200ng),热循环条件为 94℃ 3min 94℃ 10s, 58℃ 20s, 72℃ 90s, 30 个循环,最后 72℃延伸 7min。PCR 产物经 PCR 产物纯化试剂盒纯化后用 BamH I 和 Hind III 双酶解,插入到同样酶解的原核表达质粒 pET28a(+)中,转化 *E. coli* BL21(DE3),挑选转化子抽提质粒后通过限制性内切酶酶切分析筛选阳性克隆,阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序,重组表达质粒命名为 pET28a(+)-ATPS。

1.3.2 重组 ATPS 的诱导表达 将重组表达质粒 pET28a(+)-ATPS 转化到感受态 *E. coli* BL21(DE3)菌株中,涂布于含 30μg/mL 卡那霉素的 LB 平板上,37℃ 培养过夜。挑取单菌落接种于 5mL 含 30μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,37℃, 200r/min 振荡过夜。次日取 0.5mL 菌液接种于含同样抗生素的 50mL LB 培养基中,37℃, 200r/min 振荡培养至 OD_{600nm} 达 0.6~0.7,收集 1mL 菌液留作 SDS-PAGE 分析,随后加入 IPTG(终浓度 0.1mmol/L),30℃, 200r/min 诱导表达,分别于 1、3、5h 收集 1mL 菌液,离心收集菌体,SDS-PAGE(12%)分析鉴定是否有诱导产物表达。

1.3.3 重组 ATPS 的表达形式及其纯化 收集 100mL IPTG 诱导培养 5h 的细菌培养液,12000r/min 离心 1min,菌体用 PBS 洗涤后,重悬于 10mL 冰浴的 1× Binding Buffer,另加入溶菌酶至 100μg/mL, Triton X-100 至 0.1%,反复冻融 3 次,然后在冰浴中超声破碎。细菌破碎液以 4℃, 12000r/min 离心 20min,分别收集上清和沉淀,用于 SDS-PAGE 分析重组 ATPS 的表达形式。

采用镍亲和层析系统进行纯化,参照 Novagen 公司操作手册操作。期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1.3.4 蛋白含量测定：紫外分光光度法测定蛋白质浓度，以牛血清白蛋白为标准品绘制标准曲线。

1.3.5 活性测定：参照文献 [15] 的方法，利用 ATPS 和荧光素酶两步偶连反应测定重组 ATPS 的酶活。标准测活反应液的组成为：0.1mol/L Tris-Ac (pH 7.75) 0.5mmol/L EDTA 5mmol/L Mg(Ac)₂ 0.4mg/mL PVP, 0.02% BSA, 1mmol/L DTT, 4μmol/L APS, 4μmol/L PPI, 0.4mmol/L d-虫荧光素, 1.46μg/mL 荧光素酶。以 Sigma 公司的 ATPS 作为对照品计算重组 ATPS 的酶活。

1.3.6 重组 ATPS 应用于焦测序反应：焦测序技术^[12]是在四种酶(DNA Polymerase、ATP Sulfurylase、Luciferase 和 Apyrase)的共同作用下，测定碱基延伸反应的实时测序技术。焦测序标准反应液组成为：90u/mL Klenow(exo⁻) DNA polymerase 2u/mL Apyrase, 0.1mol/L Tris-Ac (pH 7.75), 0.5mmol/L EDTA, 5mmol/L Mg(Ac)₂, 0.4mg/mL PVP, 0.02% BSA, 1mmol/L DTT 4μmol/L APS, 0.4mmol/L d-虫荧光素, 1.46μg/mL 荧光素酶, 0.2u/mL 重组 ATPS。本实验对液体合成单链模板(5'-GGTTCCAAGTCACCCCGCCG-3')进行测序。

2 结果与讨论

2.1 重组表达质粒 pET28a(+)-ATPS 的构建

以酿酒酵母基因组 DNA 为模板，经 PCR 扩增出 ATPS 全长基因(图 1)。PCR 产物插入质粒 pET28a(+)多克隆位点的 BamH I 和 Hind III 酶切位点之间，阳性克隆经 BamH I 和 Hind III 双酶切后得到一个大小位于 1597bp 处的小片段和一个大小位于 5300bp 左右的大片段(图 2)。测序结果表明，载体上 ATPS 基因的蛋白质编码序列与报道的序列基本一致^[14]，重组质粒命名为 pET28a(+)-ATPS。

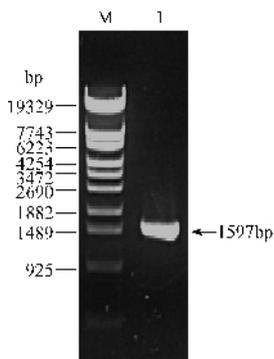


图 1 PCR 产物的电泳分析

Fig.1 Electrophoresis analysis of PCR products

M : λ-Eco T141 digest DNA marker ; 1 : PCR products of ATPS gene.

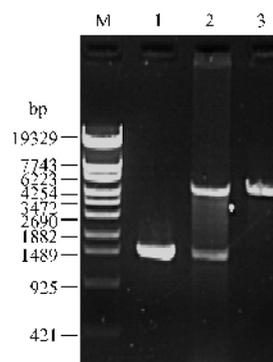


图 2 重组表达质粒 pET28a(+)-ATPS 的酶切鉴定

Fig.2 Restriction enzyme digestion analysis of recombinant plasmid pET28a(+)-ATPS

M : λ-Eco T141 digest DNA marker ; 1 : PCR products of ATPS gene ; 2 : pET28a(+)-ATPS digested with BamH I and Hind III ; 3 : pET28a(+)-ATPS digested with BamH I and Hind III .

2.2 重组 ATPS 的诱导表达

将构建好的重组表达质粒 pET28a(+)-ATPS 转化宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) 经 IPTG 诱导表达，分别对不同培养时间的表达产物进行 SDS-PAGE 检测(图 3)，由图 3 可知，与未经诱导的重组表达质粒 pET28a(+)-ATPS 相比，重组表达质粒 pET28a(+)-ATPS 在分子量大约为 60kD 处有明显的表达条带，由于质粒 pET28a(+)在多克隆位点上游有一段 His-Tag 和 T7-Tag 编码序列(分子量约为 3.5kD)与 ATPS (57kD)蛋白融合表达，所以重组蛋白分子量与理论值相符。

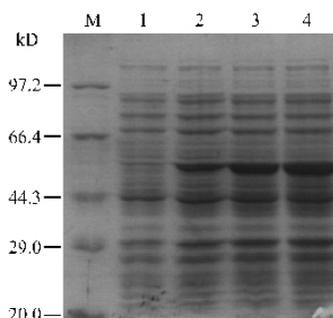


图 3 重组 ATPS 在 *E. coli* BL(DE3) 中表达的 SDS-PAGE 鉴定

Fig.3 SDS-PAGE analysis of recombinant ATPS expressed in *E. coli* BL(DE3)

M : protein marker ; 1 : total protein of *E. coli* BL(DE3) transformed with pET28a(+)-ATPS without IPTG induction ; 2 ~ 4 : total protein of *E. coli* BL(DE3) transformed with pET28a(+)-ATPS after being induced with IPTG of 1h, 3h, and 5h, respectively.

2.3 重组 ATPS 的表达形式及其纯化

表达后的菌体经反复冻融和超声破碎后，分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析，结果表明，重组

ATPS 绝大部分是以可溶蛋白的形式存在于上清中(图4)。目的蛋白采用镍亲和层析纯化,首先用60mmol/L 咪唑的缓冲液洗涤除去杂蛋白,再用200mmol/L 咪唑的缓冲液洗脱目的蛋白。洗脱液经截留分子量为1万的超滤离心管脱盐换用柠檬酸盐缓冲体系(0.1mol/L, pH 6.0)后进行 SDS-PAGE,由图4可知 纯化后的蛋白呈单一条带,与 Sigma 的 ATPS 分子量一致,达到电泳纯级别,但 Sigma 的 ATPS 中存在大量杂蛋白,纯度较低。

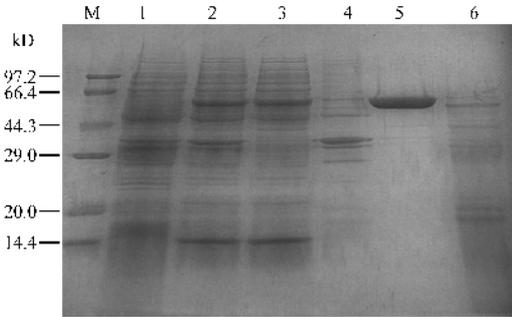


图4 重组 ATPS 的表达形式及其纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of expression pattern and purification of recombinant ATPS

M: protein marker; 1: total protein of *E. coli* BL(DE3) transformed with pET28a(+)-ATPS without IPTG induction; 2: total protein of *E. coli* BL(DE3) transformed with pET28a(+)-ATPS after being induced with IPTG for 5h; 3: supernatant of the lysate of *E. coli* BL21(DE3) transformed with pET28a(+)-ATPS; 4: precipitate of the lysate of *E. coli* BL21(DE3) transformed with pET28a(+)-ATPS; 5: purified recombinant ATPS; 6: commercial ATP sulfurylase from Sigma Chemical Co.

2.4 活性测定

采用间接法测定 ATPS 的活性,即通过测定荧光素酶催化 ATP 的发光强度来测定 PP_i 转化成 ATP 的速度,测定时,加入大量的底物 APS 和 PP_i ,然后加入稀的酶 ATPS,测定信号强度的动态变化。即首

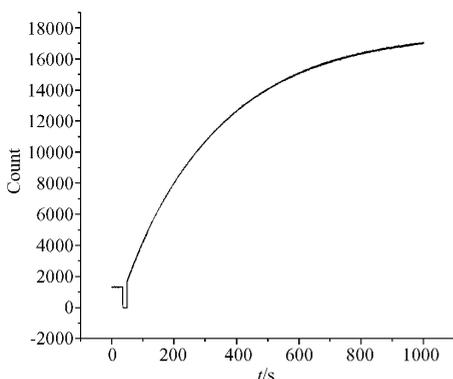


图5 本文制备的重组 ATPS 活性测定的实时生物发光曲线

Fig.5 Real-time bioluminescent traces for determining the activity of recombinant ATPS produced in this paper

先准备好 50 μ L 测活反应液,测定基线,然后快速加入 1 μ L 浓度为 7×10^{-8} mg/mL 的纯化酶(将原液稀释 10^7 倍),混匀后置于 BPCL 微弱发光测量仪进行实时测定,结果如图5所示,荧光信号随着时间逐渐增大,说明我们制备的 ATPS 酶能够有效地催化 APS 和 PP_i 生成 ATP。为了测定相对活性,我们同时以 Sigma 公司的 ATPS 作对照(图6),计算出本品的比活为 5.1×10^4 u/mg。

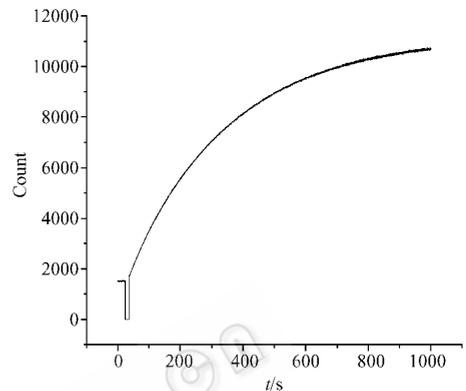
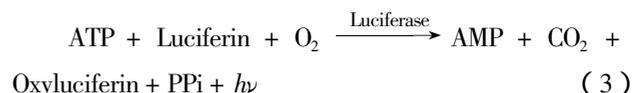
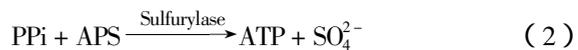
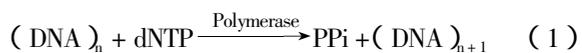


图6 Sigma 公司的 ATPS 活性测定的实时生物发光曲线

Fig.6 Real-time bioluminescent traces for determining the activity of Sigma-ATPS

2.5 重组 ATPS 应用于焦测序反应

为了进一步验证本文制备的 ATPS 的生物活性,我们采用该酶进行了焦测序试验。焦测序反应实际就是测定聚合反应产生的 PP_i ,即在测序过程中,分别循环加入四种 dNTP,一旦加入的 dNTP 与模板互补,就会释放出 PP_i , PP_i 在 ATP sulfurylase 作用下与 APS 反应生成 ATP,ATP 在 Luciferase 的催化下与 Luciferin 反应发出荧光,发出的荧光强度与嵌入的 dNTP 个数成正比,根据测定图谱的信号相对强度,可知模板核酸的序列。其测序原理可以用下列反应方程式表示:



本实验以人工合成一段寡聚核苷酸为 DNA 模板,测序引物 3' 端后的模板序列为:ACTGAACCTTGG(互补序列为:TAGACTTGAACC)。dNTPs 的加入顺序为:CACTG,测定结果如图7所示。因为模板的

第一个碱基为 A,所以在加入前三种 dNTP 时,没有出现信号峰,只出现了 dNTPs 自身的背景信号。当加入 dTTP 时,发生了延伸反应,出现了信号峰,由于第二个碱基是 C,故加入 dGTP 时,又出现了与第一个峰高差不多的信号峰,同样,又测得了信号峰 T 和 G,但当接着加入 dTTP 时,产生了峰高约为前面峰高两倍的信号峰,这与模板中的序列“AA”相一致。图 7 是采用本文制备的 ATPs 测得的 12 个碱基序列的结果。说明我们表达的重组 ATPs 完全可以应用于焦测序反应中。

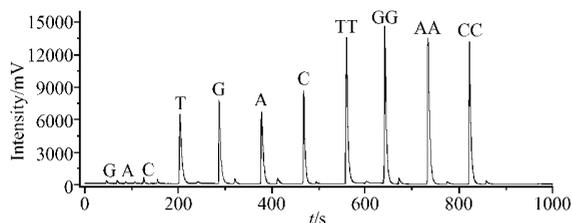


图 7 采用本文制备的 ATPs 酶进行焦测序的图谱

Fig. 7 Pyrogram of DNA sequencing with ATPs prepared in this paper

Template: artificially synthesized oligonucleotide; Order of dNTP dispensing: G-A-C-T-G with the double dispensing of each dNTP species.

3 结论

随着生命科学的飞速发展,对 ATPs 酶的需求也会相应增加,比如焦测序法的应用正日趋广泛^[12]而 ATPs 是焦测序反应中使用的一种酶。利用易于纯化的基因工程法表达高活性、高纯度的 ATPs 酶十分重要。本文以酿酒酵母基因组 DNA 为模板,PCR 扩增得到 ATPs 编码基因,将其克隆到原核表达质粒 pET28a(+)中,成功构建了重组表达质粒 pET28a(+)-ATPs,它具有 His 标签,易于下游纯化。SDS-PAGE 电泳表明,ATPs 主要是以可溶蛋白的形式存在于上清中,经镍亲和层析柱和超滤离心管纯化后,纯度为电泳纯级别,比活可达 5.1×10^4 u/mg,能很好地应用于焦测序反应中。

REFERENCES (参考文献)

[1] Renosto F, Martin RL, Borrell JL, et al. ATP sulfurylase from trophosome tissue of *Riftia pachytila* (hydrothermal vent tube worm). *Arch Biochem Biophys* 1991 **290**(1): 66-78.
[2] Hanna E, MacRae IJ, Medina DC, et al. ATP sulfurylase from the

hyperthermophilic chemolithotroph *Aquifex aeolicus*. *Arch Biochem Biophys* 2002 **400**(2): 275-288.

- [3] Renosto F, Martin RL, Wailes LM, et al. Regulation of inorganic sulfate activation in filamentous fungi. Allosteric inhibition of ATP sulfurylase by 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate. *J Biol Chem* 1990 **265**(18): 10300-10308.
[4] Yu M, Martin RL, Jain S, et al. Rat liver ATP-sulfurylase: purification, kinetic characterization, and interaction with arsenate, selenate, phosphate, and other inorganic oxyanions. *Arch Biochem Biophys* 1989 **269**(1): 165-174.
[5] Osslund T, Chandler C, Segel IH. ATP sulfurylase from higher plants: purification and preliminary kinetics studies on the cabbage leaf enzyme. *Plant Physiol* 1982 **70**(1): 39-45.
[6] Leyh TS, Suo Y. GTPase-mediated activation of ATP sulfurylase. *J Biol Chem* 1992 **267**(1): 542-545.
[7] Foster BA, Thomas SM, Mahr JA, et al. Cloning and sequencing of ATP sulfurylase from *Penicillium chrysogenum*. Identification of a likely allosteric domain. *J Biol Chem* 1994 **269**(31): 19777-19786.
[8] Li H, Deyrup A, Mensch JR, et al. The isolation and characterization of cDNA encoding the mouse bifunctional ATP sulfurylase-adenosine 5'-phosphosulfate kinase. *J Biol Chem* 1995 **270**(49): 29453-29459.
[9] Klonus D, Riesmeier JW, Willmitzer L. A cDNA clone for an ATP-sulfurylase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 1995 **107**(2): 653-654.
[10] Nyren P, Nore BF, Baltscheffsky M. Studies on photosynthetic inorganic pyrophosphate formation in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Biochim Biophys Acta* 1986 **851**: 276-282.
[11] Nyren P, Karamouhamed S, Ronaghi M. Real-time sequence-based DNA analyses using bioluminescence. In: *Bioluminescence and Chemiluminescence Molecular Reporting with Photons*, Hastings et al ed, 1996: 466-469.
[12] Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clin Chim Acta* 2006 **363**(1-2): 83-94.
[13] Nyren P. Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity. *Anal Biochem* 1987 **167**(2): 235-238.
[14] Cherest H, Kerjan P, Surdin-Kerjan Y. The *Saccharomyces cerevisiae* MET3 gene: nucleotide sequence and relationship of the 5' non-coding region to that of MET25. *Mol Gen Genet* 1987 **210**(2): 307-313.
[15] Karamouhamed S, Nyren P. Real-time detection and quantification of adenosine triphosphate sulfurylase activity by a bioluminometric approach. *Anal Biochem* 1999 **271**(1): 81-85.