

大肠杆菌 L-酒石酸脱氢酶 β 亚基体外分子交联

徐燕¹, 高音²

1 山东医学高等专科学校生物化学教研室, 临沂 276002

2 首都师范大学生命科学学院, 北京 100037

摘要: 通过 PCR 技术扩增大肠杆菌 L-酒石酸脱氢酶 β 亚基(L-tartrate dehydratase beta subunit, *TtdB*)野生型与 Cys/Ser 突变型目的基因, 构建带 6×His 标签的诱导型表达载体 pTrcHisC-*TtdB*。重组蛋白以包含体形式存在, 应用 TALON 固定化金属亲和树脂(Immobilized metal affinity chromatography, IMAC)以变性的方法纯化, 通过分步透析逐步去除变性剂的方法复性, 复性率可达 70%。将复性后的两种蛋白通过热诱导去折叠和氧化重折叠方法进行体外蛋白质分子交联实验。SDS-PAGE 分析表明: 野生型 *TtdB* 在其变性的临界温度反应时, 出现交联二聚体和多聚体; 在氧化重折叠后 SDS-PAGE 前加入 100 mmol/L DTT 时, 交联强度明显减弱。这种 DTT 打不开交联即为异肽键交联; 若在其氧化重折叠反应液中加入 DTT 则没有任何交联。突变型 *TtdB* 在与野生型 *TtdB* 相同的热诱导去折叠条件下, 完全没有二聚体和多聚体的形成。

关键词: 酒石酸脱氢酶 β 亚基, 蛋白质交联, 热诱导去折叠和氧化重折叠, 二硫键, 异肽键

In vitro Cross-linking of *Escherichia coli* Tartrate Dehydratase Beta Subunit

Yan Xu¹, and Yin Gao²

1 Biochemistry Research Division, Shandong Medical College, Linyi 276002, China

2 College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100037, China

Abstract: To test the hypothesis that *in vitro* protein cross-linking could be accomplished in three concerted steps: (1) a change in protein conformation; (2) formation of interchain disulfide bonds; and (3) formation of interchain isopeptide cross-links, we studied *Escherichia coli* tartrate dehydratase beta subunit (*TtdB*). With polymerase chain reaction (PCR) technique, wild and Cys/Ser mutant genes were amplified from *E. coli* BL21 cells and subcloned into expression plasmid pTrcHisC. Recombinant proteins, which were associated with formation of inclusion bodies induced by IPTG, were purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) and refolded by dialysis. In thermal unfolding and oxidative refolding experiment, wild *TtdB* was proved to form cross-linked dimers/oligomers as revealed by SDS-PAGE; cross-linking intensity was obviously weakened when the loading buffer contained the reducing agent dithiothreitol (DTT). The residual cross-linking was isopeptide bonds; no dimers/oligomers were detected when the refolding and unfolding solution contained DTT. In addition, Cys/Ser point mutation abrogated its ability to cross-link into homodimers, which showed disulfide bonds could facilitate the following formation of isopeptide bonds.

Keywords: tartrate dehydratase beta subunit, protein cross-linkings, thermal unfolding and oxidative refolding, disulfide bonds, isopeptide bonds

Received: December 12, 2007; **Accepted:** February 27, 2008

Supported by: the National Sciences Foundation of China (No. 39800028).

Corresponding author: Yin Gao. Tel: +86-010-68903623; E-mail: yingao@mail.cnu.edu.cn

国家自然科学基金项目(No. 39800028)资助。

生命从细胞到组织、器官和个体形成的生理过程中,蛋白质交联起着重要作用,比如:血液凝固^[1,2]、细胞程序死亡过程中衰老小体的形成^[3]、表皮细胞的终端分化^[4]、头发和指甲的形成^[5]等等;其次,许多神经性疾病均为蛋白质交联沉积在神经细胞中而严重影响其功能造成的,包括亨廷顿疾病(Huntington's disease)、老年痴呆症(Alzheimer's disease)、帕金森疾病(Parkinson's disease)和朊蛋白性脑病(Prion disease)等。近几年来对蛋白质交联的研究日益受到关注,以至于对蛋白质交联机理的探索,已成为蛋白质科学中最具有挑战性的研究热点之一。

总结起来,现有两种蛋白质交联机理假说。第一种观点:蛋白质构象改变,包括二级结构改变导致蛋白质分子聚集交联^[6,7];第二种观点:酶所介导的分子间异肽键交联使蛋白质分子聚集交联^[8,9]。高音等^[10]在对核糖核酸酶 A(Ribonuclease A, RnaseA)、溶菌酶(Lysozyme)和蛋白质二硫键异构酶(Protein disulfide isomerase, PDI)进行热诱导去折叠和氧化重折叠的实验中发现,它们都能形成交联的二聚体或多聚体,因此认为蛋白质交联途径可能通过以下三步实现:(1)蛋白质构象包括二级结构改变;(2)形成分子间二硫键;(3)形成分子间异肽键且分子间二硫键的形成对随后分子间异肽键的形成具有促进作用。本实验以 *TtdB* 为研究对象,试图为蛋白质交联的三步假说提供进一步的证据。

1 材料和方法

1.1 菌株及质粒

大肠杆菌 BL21、大肠杆菌 DH5 α 、表达载体 pTrcHisC 均为本实验室保存。

1.2 工具酶与试剂

各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、考马斯亮蓝 R250 和溶菌酶购自华美生物工程公司;dNTP、pfu DNA 聚合酶购自上海生工生物公司;DNA 快速纯化回收试剂盒及质粒快速提取试剂盒购自鼎国生物工程公司;平末端 DNA 片段连接试剂盒购自北京天为时代科技有限公司;IMAC 购自 Clontech, Palo Alto, CA;其它试剂均为分析纯产品。

1.3 目的基因的克隆

1.3.1 PCR 方法合成野生型 *TtdB* 基因

2 个寡聚脱氧核糖核苷酸引物 P1(5'-G GGG

ATC CAA AAA ATG AAA AAG ATC CTG AC-3')和 P2(5'-:G GAA GCT TAT TTG ATG TAA TGG ACG-3')为上海生工生物公司合成,划线处分别为 *Bam*HI 和 *Hind* III 酶切位点。取对数生长期的大肠杆菌 BL21 菌液 2 μ L 作为 PCR 反应的模板,循环 30 次,取 10 μ L 反应混合物进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.2 PCR 定点突变技术合成突变型 *TtdB* 基因

根据野生型 *TtdB* 基因序列设计了 8 条突变引物。如下, P1(5'-3'): G GGG ATC CAA AAA ATG AAA AAG ATC CTG AC; P2(5'-3'): TTC GAT CAA ACG GCG GTG A G A AAC GTC GCG G G A GGT CAC CAG CGT ACC GG; P3(5'-3'): T C C CGC GAC GTT T C T CAC CGC CGT TTG ATC GAA; P4(5'-3'): TAG CGC CTT GAA TTT CTG G G A GCC TTC TTC GGT CAG; P5(5'-3'): CAG AAA TTC AAG GCG CTA CAT GTG ATT TTC CCG GCA GGC T C C GCG GTG CTG GCG GCA; P6(5'-3'): GAA CTC TTT GAC CCG G G A GAC CCA CAG TGA CTC; P7(5'-3'): GAG TCA CTG TGG GTC T C C CGG GTC AAA GAG TTC; P8(5'-3'): GGA AGC TTA TTT GAT GTA ATG GAC GTG CTC G G A GAT CTC TTC CAC GAT。其中,方框中的黑体为突变碱基。我们将编码 Cys 的碱基全部突变为编码 Ser 的碱基。具体过程:以野生型重组表达载体 pTrcHisC-*TtdB* 为模板,将 8 条突变引物分 4 组进行 PCR 反应。其中, P1 和 P2、P3 和 P4、P5 和 P6、P7 和 P8 各为一组共进行 4 次 PCR 反应。第一轮反应结束后,2%琼脂糖凝胶电泳检测,并回收 4 组目的片段,各取 1 μ L 与 P1 和 P8 两端引物混合进行第二轮 PCR。取 10 μ L 反应混合物进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 重组野生型和突变型克隆质粒和表达质粒的构建

试剂盒回收 PCR 产物中约 600 bp 的 DNA 片段后,进行加 A 反应,与 PGM-T 载体连接,直接转化大肠杆菌 DH5 α 细胞,在铺有 LB 培养基(含氨苄青霉素 100 μ g/mL)的平板上培养 16 h。挑取白色单菌落提取质粒酶切鉴定后送公司测序。将筛选的正确基因通过内切酶 *Bam*HI 和 *Hind* III 双酶切,然后与同样双酶切的表达载体 pTrcHisC 连接,转化大肠杆菌 DH5 α 细胞,挑取单菌落提取质粒酶切鉴定。

1.5 IPTG 诱导表达融合蛋白

将上述构建好的重组表达质粒 pTrcHisC-*TtdB*

转化大肠杆菌 BL21 细胞, 培养 16 h 后, 接种单菌落于 2 mL LB 培养液(含氨苄青霉素 100 $\mu\text{g/mL}$)中, 30°C 摇床培养过夜。次日用新鲜的 LB 培养液稀释至 100 倍, 30°C 剧烈摇菌培养至 OD_{600} 达 0.4~0.6, 然后升温到 37°C 加入 IPTG(终浓度 0.8 mmol/L)诱导表达 4 h。取 100 μL 菌液 7 000 r/min 离心 4 min, SDS-PAGE 进行表达水平分析。另取 1 mL 菌液 7 000 r/min 离心 4 min, 菌体悬浮于 100 μL 裂解液(溶菌酶 100 $\mu\text{g/mL}$, Tris-HCl pH 8.0 50 mmol/L, EDTA 2 mmol/L)混匀, 30°C 裂解 15 min; 12 000 r/min 离心 20 min, 收集沉淀和上清, 分别进行 SDS-PAGE 分析。

1.6 融合蛋白的纯化与复性

取以上条件大量培养并诱导的菌液 30 mL, 4°C、7 000 r/min 离心 20 min, 菌体用 PBS 和 ddH₂O 各洗一遍, 用 IMAC 以变性方法纯化目的蛋白。然后将其浓度调至 0.3~0.5 mg/mL, 装入透析袋中, 连续用 6 mmol/L、3 mmol/L、2 mmol/L、1 mmol/L、0.1 mmol/L、无尿素复性液(以上尿素复性液除含相应浓度的尿素外, 均含 50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L GSSG, 1 mmol/L GSH, 0.4 mol/L L-Arg, pH 8.2)分步透析, 每步复性 24 h。复性产物 10 000 r/min、4°C 离心 20 min, SDS-PAGE 分析。

1.7 融合 TtdB 的体外热变性交联

以野生型(0.3 mg/mL)和突变型(0.5 mg/mL) TtdB 融合蛋白为实验样品, 分别在同样的氧化还原反应体系(25 mmol/L Tris-HCl pH 7.6, 2.0 mmol/L GSH, 1.0 mmol/L GSSG, 1.0 mmol/L EDTA)及变性的临界温度(T_m)75°C 中反应 30 min, SDS-PAGE 分析。

2 结果

2.1 野生型目的基因的合成

凝胶电泳分析, 可见一个大约 600 bp 的特异性片段, 与已报道的 TtdB 基因大小相同。

2.2 突变型目的基因的合成

第一轮 PCR 结束后, 取全部反应混合物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳分析, 发现有 4 条特异性片段大小与预期一致。如图 2a, 1~4 泳道上最上面的 4 条带为目的片段。第二轮 PCR 结束后凝胶电泳检测, 可见 1 个大约 600 bp 的特异性片段(图 2b)。

2.3 野生型和突变型重组质粒的酶切鉴定

BamH I 和 Hind III 双酶切重组克隆质粒 PGM-T+TtdB, 1% 琼脂糖凝胶电泳均能检测出 1 个大约

600 bp 的目的片段。送公司测序进行序列分析后证明, 野生型目的基因与已报道的基因序列完全一致; 突变型目的基因与预期一致, 编码 6 个 Cys 的碱基全部突变为编码 Ser 的碱基。BamH I 和 Hind III 双酶切重组表达质粒 pTrcHisC-TtdB, 1% 琼脂糖凝胶电泳亦能检测出清晰的目的条带。

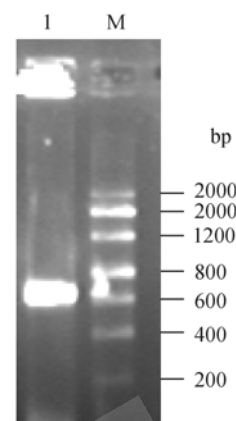


图 1 野生型目的基因的 PCR 分析

Fig. 1 PCR analysis of wild TtdB gene

1: PCR product; M: DNA marker

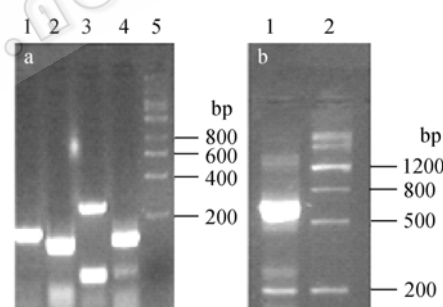


图 2 PCR 定点突变的两轮电泳分析

Fig. 2 two electrophoresis analysis of PCR point mutation

(a) the first round. 1: primers: p7 and p8; 2: primers: p5 and p6; 3: primers: p3 and p4; 4: primers: p1 and p2; M: DNA marker. (b) the second round. 1: amplified mutant gene; M: DNA marker

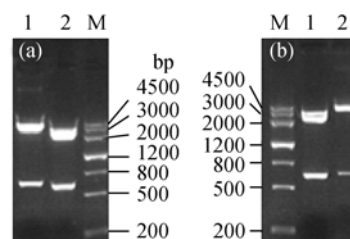


图 3 BamH I 和 Hind III 双酶切野生型(a)和突变型

(b) PGM-T+TtdB 和 pTrcHisC-TtdB

Fig. 3 Restriction of wild (a) and mutant (b) recombinant PGM-T+TtdB and pTrcHisC-TtdB by BamH I and Hind III

M: DNA marker; 1: PGM-T+TtdB/BamH I+Hind III;

2: pTrcHisC-TtdB/BamH I+Hind III

2.4 融合蛋白的表达

TtdB 共有 201 个氨基酸残基, 加上 pTrcHisC 质粒本身含有的 55 个氨基酸残基, 融合蛋白的分子量应约为 29 kD。IPTG 诱导表达结束后, 经 SDS-PAGE 分析可看出 BL21 大量表达一个约 29 kD 的新蛋白, 与预期结果一致, 且野生型与突变型融合蛋白的表达量相差不大, 说明将 Cys 突变为 Ser 对蛋白表达没有产生很大的影响。同时取裂解后的上清进行 SDS-PAGE 分析, 未发现融合蛋白条带(lane4), 说明在上述条件下野生型与突变型融合蛋白均不会以明显的可溶性方式大量表达。

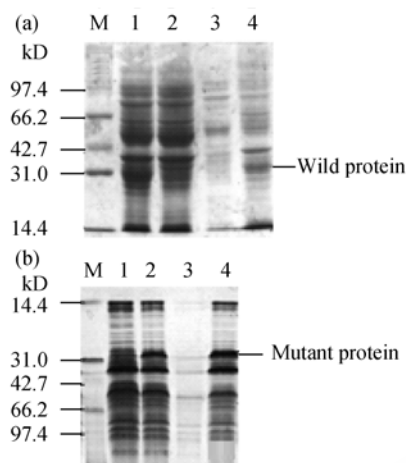


图 4 野生型(a)和突变型(b)融合蛋白的 12% SDS-PAGE 分析

Fig. 4 12% SDA-PAGE analysis of wild(a) and mutant(b) recombinant proteins

1: molecular weight marker; 2: uninduced total protein; 3: induced total protein; 4: soluble fraction after induction; 5: inclusion body after induction

2.5 包涵体的纯化与复性

以稀释成一系列浓度的鸡溶菌酶作标准品, 酶标仪(GENios)测定复性产物的浓度, 结果表明复性率可达 70%。

2.6 交联反应实验的 SDS-PAGE 分析

当野生型与突变型 TtdB 融合蛋白在变性的临界温度反应时, 野生型 TtdB 既有二聚体又有多聚体出现(lane1), 突变型 TtdB 无任何交联出现(lane5); 当两者的凝胶上样缓冲液中有过量 DTT 时, 野生型 TtdB 仍有交联出现(lane2), 突变型 TtdB 仍无任何交联(lane6); 当两者的氧化重折叠反应液中都加入过量 DTT 时, 均无任何交联(lane3 and lane7)。

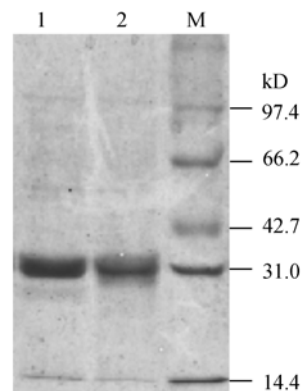


图 5 纯化与复性后的 TtdB 融合蛋白

Fig. 5 Recombinant TtdB after purification and refolding

1: purified TtdB; 2: refolded TtdB; M: molecular weight marker

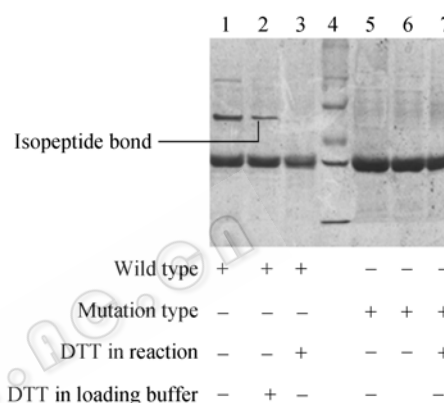


图 6 两种融合蛋白分子间的交联实验

Fig. 6 Crossing-linkings of wild and mutant proteins

1~3: wild TtdB; 5~7: mutant TtdB; 4: molecular weight marker; 2,6: DTT in loading buffer; 3,7: DTT in reaction

3 讨论

当野生型 TtdB 融合蛋白在氧化重折叠后 SDS-PAGE 前加入过量还原性上样缓冲液(含 100 mmol/L DTT)时, 交联现象与不加 DTT 时相比, 强度明显减弱(Fig.6, lane1, lane2)。既然 DTT 能打开已形成的共价二硫键, 那么这种 DTT 打不开交联形式应是除二硫键交联以外的另一种共价交联。高音等^[10]将蛋白质的自由氨基进行化学修饰后发现, 自由氨基的缺失会抑制这种交联, 从而推测这是一种异肽键交联。这表明, 蛋白质间既能形成二硫键交联又能形成异肽键交联。当仅在其氧化重折叠反应液中加入 DTT, SDS-PAGE 没有发现任何交联(Fig.6, lane3)。我们完全可以这样解释: 因为在蛋白质交联过程中, 先形成分子间二硫键, 再形成分子间异肽键, 且二硫键的形成能促进异肽键的形成, 所以当

反应液中存在 DTT 时, 由于 DTT 抑制了二硫键的形成, 继而使异肽键的形成亦受阻, 所以电泳后不会观察到任何交联; 而仅凝胶上样缓冲液中存在 DTT 时, 由于在氧化重折叠过程中已形成了二硫键交联, 已形成的二硫键交联又促进了异肽键交联的形成, 而此处 DTT 的加入只是打开了已形成的二硫键交联, 对已形成的异肽键交联没有影响, 所以电泳后我们仍能观察到异肽键交联。

上述实验是通过还原剂 DTT 来阻止二硫键的形成或打开已形成的二硫键。为了使此假说更有说服力, 我们通过定点突变技术将其中的 Cys 全部突变掉, 彻底阻断二硫键的形成。实验中发现, 在与野生型完全相同的氧化重折叠体系中, 突变型 TtdB 均不能形成任何交联(Fig.6, lane 5~7)。这说明, Cys 残基的突变使 TtdB 失去了形成链间二硫键的能力, 从而抑制了随后链间异肽键的形成。由此我们认为, TtdB 的体外交联现象可以为高音等^[10]提出的蛋白质交联三步假说提供证据。

当然, 一个假说要被广大专家学者接受, 仅靠目前已知的证据是远远不够的。但是它的确立将丰富和加深人们对蛋白质复杂现象的认识, 从而推动与此相关疾病的研究。

REFERENCES

- [1] Takahashi N, Takahashi Y, Putnam FW. Primary structure of blood coagulation factor XIIIa (fibrinolytic, transglutaminase) from human placenta. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**(21): 8023–9019.
- [2] Sekiya F, Yoshida M, Yamashita T, *et al.* Magnesium (II) is a crucial constituent of the blood coagulation cascade. *J Biol Chem*, 1996, **271**(15): 8541–8544.
- [3] Chen JS, Mehta K. Tissue transglutaminase: an enzyme with a split personality. *Cell Biol*, 1999, **31**(8): 817–836.
- [4] Rice RH, Green HJ. Relation of protein synthesis and transglutaminase activity to formation of the cross-linked envelope during terminal differentiation of the cultured human epidermal keratinocyte. *J Cell Bio*, 1978, **76**(3): 705–711.
- [5] Baden HP. Common ansglutaminase substrates shared by hair, epidermis and nail and their function. *J Dermatol Sci*, 1994, **7**: S20–26.
- [6] Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, *et al.* Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Pros Nat Acad Sci USA*, 1993, **90**(23): 10962–10966.
- [7] Perutz MF, Johnson T, Suzuki M, *et al.* Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(12): 5355–5358.
- [8] Martin G, Rita C, Carlo M. Transglutaminases: Nature's biological glues. *Biochem J*, 2002, **368**(Pt 2): 377–396.
- [9] Lorand L. Neurodegenerative diseases and transglutaminase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(25): 14310–14313.
- [10] Gao Y, Mehta K. Interchain disulfide bonds promote protein cross-linking during protein folding. *J Biochem*, 2001, **129**(1): 179–183.