

小泛蛋白样修饰物双荧光融合蛋白及其特异性蛋白酶的原核表达及鉴定

王晓辉^{1*}, 郭杰^{2*}, 王菊芳¹, 李杉¹, 孙丽华¹, 王小宁¹, 吕建新²

1 华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006

2 温州医学院检验与生命科学学院, 温州 325035

摘要: 本实验克隆了人的 4 种 SENP(Sentrin-specific protease)C 端催化结构域、3 种 SUMO(Small ubiquitin-like modifier)、ECFP(Enhanced cyan fluorescent protein)以及 EYFP(Enhanced yellow fluorescent protein)的基因, 通过 RecJoin 克隆技术分别成功构建 SENP 和 ECFP-SUMO-EYFP 表达载体 B28 和 B13。将表达载体转化大肠杆菌 BL21, 经 IPTG 诱导表达, 通过 Ni-NTA 离子交换柱层析纯化, 进一步采用 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析鉴定, 并以酶切实验初步分析了 SENP 相对于底物 ECFP-SUMO-EYFP 的酶切特异性。最终, SENP3C(SENP3 catalytic domain)截短表达, SENP5C 以包涵体形式表达, 其他蛋白均为可溶性表达, SDS-PAGE 分析表明表达产物分子质量(Mr)与预期相符, Western blotting 方法进一步证实其为目的蛋白。酶切实验初步鉴定了 SENP1C 和 SENP2C 的酶切特异性。以上蛋白的原核表达为荧光共振能量转移实验奠定了实验基础。

关键词: 小泛蛋白样修饰物, 小泛蛋白样修饰物特异性蛋白酶, 小泛蛋白样修饰物双荧光融合蛋白, 原核表达, 纯化

Prokaryotic expression and identification of dual-fluorescence fusion proteins of small ubiquitin-like modifier and sentrin-specific protease

Xiaohui Wang^{1*}, Jie Guo^{2*}, Jufang Wang¹, Shan Li¹, Lihua Sun¹, Xiaoning Wang¹, and Jianxin Lü²

1 School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China

2 Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China

Abstract: We cloned genes of four sentrin-specific protease (SENP), three small ubiquitin-like modifiers (SUMO), enhanced cyan fluorescent protein (ECFP) and yellow fluorescent protein (EYFP) by two-step PCR. Then we constructed expression vector B28 for SENP and B13 for ECFP-SUMO-EYFP. The recombinant plasmids were transformed into *Escherichia coli* BL21 and expression was induced by isopropyl β -D-thiogalactoside, then recombinant proteins were purified by Ni-NTA agarose column ion-exchange chromatography. The proteins were analyzed with SDS-PAGE and identified with Western blotting. Except that SENP3 catalytic domain (SENP3C) truncated in the C termini and SENP5C expressed in inclusion body, others were expressed as soluble proteins.

Received: August 22, 2008; **Accepted:** January 21, 2009

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA021702).

Corresponding author: Xiaoning Wang. Tel: +86-20-39380668; Fax: +86-20-39380668; E-mail: xnwang@21cn.net

Jianxin Lü. Tel/ Fax: +86-577-86689805; E-mail: jxlu313@163.com

*These authors contribute equally to this study.

国家高技术研究计划(863 计划) (No. 2007AA021702)资助。

SDS-PAGE analysis showed that the relative molecular mass of these fusion proteins were consistent with theoretical ones, and the specificity of the fusion proteins were confirmed with Western blotting. The fusion proteins of SENP and ECFP-SUMO-EYFP can be successfully expressed in prokaryotic expression system. It lays the foundation for the fluorescence resonance energy transfer analysis.

Keywords: SUMO, SENP, ECFP-SUMO-EYFP dual-fluorescence fusion protein, prokaryotic expression, purification

小泛蛋白样修饰物(Small ubiquitin-like modifier, SUMO)是存在于真核生物中高度保守的蛋白家族,虽然 SUMO 化修饰过程与泛素化修饰过程的酶体系具有高度同源性,循环过程相似, SUMO C 端序列与泛素有 80%同源性,二级结构上极其相似,并且两者的四级结构都具有典型的“泛蛋白折叠”^[1,2],但两者存在截然相反的生物学功能。泛素化修饰的靶分子主要被蛋白酶体降解,而 SUMO 化修饰则增加蛋白质的稳定性。SUMO 通过异肽键与靶蛋白连接,参与多种蛋白质的翻译后修饰,介导不同的细胞内反应,如靶分子定位、功能调节及相互作用,参与调控线粒体分裂、DNA 损伤修复,近年来发现 SUMO 化修饰还能够调节基因组稳定性、调控离子通道及生物节律^[3-5]。所有的 SUMO 蛋白都具有保守的泛素结构域和 C 端双 Gly 的断裂/连接位点,为特异的蛋白-蛋白相互作用提供结构基础^[6]。脊椎动物中已发现 4 个 SUMO 成员,分别为 SUMO-1,2,3,4。

SUMO 化循环是由 SUMO 特异性蛋白酶(Sentrin-specific protease, SENP)家族调节的可逆循环。SENP 属于半胱氨酸蛋白酶超家族,功能是切除 SUMO 前体的 C 端,及介导去 SUMO 化使 SUMO 分子重新进入循环^[7]。哺乳动物中至少有 8 种 SENP,称为 SENP1-8。它们在细胞中的定位不同,不同的酶对不同的 SUMO 具有一定的底物特异性^[8,9]。由于 SUMO 化修饰参与哺乳动物重要的生理生化调节, SUMO 调节紊乱会导致很多疾病的发生^[5],而 SENP 的表达及活性与 SUMO 化密切相关。因此, SENP 的表达情况可以作为一种检测指标,可以通过体外定性及定量检测 SENP 的表达情况,来评价 SUMO 化修饰。

本实验表达并纯化了人 SENP1 和 SENP2 的 C 端催化结构域。为了在凝胶上区别 SUMO 前体及其成熟状态, SUMO 两端分别加 ECFP(Enhanced cyan fluorescent protein) 和 EYFP(Enhanced yellow fluorescent protein) 构建并表达了 ECFP-SUMO-

EYFP 融合蛋白, SUMO 与 EYFP 之间的“GG”位点会在 SENP 酶作用下使 70 kD 的融合蛋白断裂为成熟形式的 43 kD 的 ECFP-SUMO 和 27 kD 的 EYFP 分子。以这种方法初步鉴定了 SENP1C (SENP1 catalytic domain)和 SENP2C 的底物特异性,并检测了类泛素蛋白加工酶 (Ubiquitin-like proteases, ULP) 和 SENP2C 的酶活。此外,融合蛋白 ECFP-SUMO-EYFP 可用于荧光共振能量转移实验检测 SENP 的活性及含量,评价 SUMO 化修饰,具有一定的应用与临床诊断的潜力。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

宿主菌 *Escherichia coli* BL21 和 *E. coli* DH5 α 由复能基因公司保存,质粒 pDeliver01、pDeliver02 及表达质粒 pReceiver-B13、pReceiver-B28 由复能基因公司提供,含 ECFP 基因的质粒由中山大学惠赠,含 EYFP 基因的质粒 pReceiver-M15a、ULP 及带有 ULP 酶切位点作为阳性对照的 EGFP 蛋白由复能基因公司提供,克隆 SUMO1/2/3 及 SENPs 基因的 cDNA 文库由复能基因公司保存。

1.2 酶和试剂

BP clonase、LR clonase、T4 DNA 连接酶及核酸电泳 marker、蛋白质电泳 marker、预染蛋白质 marker 由复能基因公司提供, Acc65 I、Xmn I、Xho I、Sal I、T4 PNK 购自 NBE 公司,质粒提取试剂盒购自 Omega 公司, IPTG(异丙基- β -D-硫代半乳糖苷)、PEG 购自广东光华化学厂有限公司, Ni-NTA 蛋白纯化填料购自 MBI 公司, 6 \times His 单克隆抗体购自 Sigma 公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔 IgG(H+L)及 DAB 显色剂购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 引物设计与合成

SUMO1、SUMO2、SUMO3、SENP1C、SENP2C、SENP3C、SENP5C 在 GenBank 中的序列信息 (GenBank Accession Nos. 分别为 X99586、

NM_006937、NM_006936、NM_014554、NM_021627、NM_015670 和 BC030705)设计引物, *ECFP* 引物两端加上 *Xmn* I、*Xho* I 的酶切位点; *ECFP* 与 *EYFP* 两端序列相同, 因此可用同一对引物; *SUMO*s 的序列从起始到 *SEN*P 剪切部位, 即 3'端 2 个甘氨酸处为终点, 以便插入到 *His-GFP* 中, 构成 *His-SUMO1(2,3,4)-GFP*。2 个甘氨酸后面不能接脯氨酸, *SUMO2*、*SUMO3* 可共享 3'引物。 *ECFP*、*EYFP*、*SUMO*s、*SEN*P 的上下游引物见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

Primers	Sequence (5'-3')
<i>ECFP</i> / <i>EYFP</i>	F: gaaggaattcggtaccATGAGTAAAGGAGAAGAACTTT TC R: tgcggccgcactcgagCTATTTGTATAGTTTCATCCAT
<i>SUMO1</i>	F: AATTCGTCGACATGTCTGACCAGGAGGCAAAA CC R: CTATAGGTACCCCCG TTTGTTCTTG
<i>SUMO2</i>	F: AATTCGTCGACATGGCCGACGAAAAGCCC R: CTATAGGTACCTCCCGTCTGCTGTTGG
<i>SUMO3</i>	F: AATTCGTCGACATGTCCGAGGAGAAGCCC R: CTATAGGTACCTCCCGTCTGCTGTTGG
<i>SEN1C</i>	F: AATTCGTCGACATGTCTGACCAGGAGGCAAAA CC R: CTATAGGTACCCCCGTTTGTTCCTG
<i>SEN2C</i>	F: AATTCGTCGACATGGCCG ACGAAAAGCCC R: CTATAGGTACCTCCCGTCTGCTGTTGG
<i>SEN3C</i>	F: AATTCGTCGACATGTCCGAGGAGAAGCCC R: CTATAGGTACCTCCCGTCTGCTGTTGG
<i>SEN5C</i>	F: AATTCGTCGACATGTCTGACCAGGAGGCAAAA CC R: CTATAGGTACCCCCGTTTGTTCCTG
Adaptor- rCF	F: ggggACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTgaagg aatcggtaccatg R: ggggACCACTTTGTACAAAAGCTGGGTgctggcc gcactcgagga

1.4 PCR 扩增 *EYFP*、*SEN*P、*SUMO*s 基因

以含 *EYFP* 基因序列的质粒 pReceiver-M15a、含 *SUMO1/2/3* 及 *SEN*P 基因的 cDNA 文库为模板, 分别用上述设计的引物通过 PCR 扩增出 *EYFP*、*SEN*P、*SUMO*s 的基因。PCR 反应体系: 质粒模板 0.2 μ L, 引物 0.2 μ L, PCR 反应液 12 μ L (pfu 4 μ L, 5 U Amplifier 0.2 μ L, DMSO 2 μ L, ddH₂O 1.8 μ L), ddH₂O 12.4 μ L, 共 25 μ L; PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 预变性 1 min 30 s; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 循环 25 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。1%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 并用 PEG 纯化 PCR 产物。

1.5 *SEN*P 重组质粒的构建与鉴定

将纯化的 PCR 产物插入载体 pDeliver02 中, 构建 *SEN1*、*SEN2*、*SEN3*、*SEN5* C 端催化域的重组质粒, 转化 *E. coli* DH5 α , 提取重组质粒, 经

PCR 鉴定和测序鉴定。将测序鉴定正确的克隆与 pReceiver-B28 空载体(图 1)进行 RJ 反应, 构建 *SEN*P 的表达克隆, 转化 *E. coli* DH5 α , 提取重组质粒, 通过 *Acc*65 酶切鉴定。

1.6 *ECFP-SUMO*s-*EYFP* 重组质粒的构建与鉴定

构建 *EYFP* 的表达克隆 pReceiver-B01.1 \times (图 2), 将纯化的 *SUMO1/2/3* 的 PCR 产物酶切后与酶切并去磷酸化的 *EYFP* pReceiver-B01.1 \times 连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 提取重组质粒 *SUMO*s-*EYFP* B01.1 \times , 经 PCR 鉴定。以含 *ECFP* 基因序列的质粒为模板, 两步 PCR 扩增 *ECFP* 基因, 第一步扩增 *ECFP* 基因, 第二步 PCR 加 Adaptor-r CF 接头, PEG 纯化 PCR 产物, 将纯化产物酶切后与酶切并去磷酸化的 *SUMO*s-*EYFP* B01.1 \times 连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 提取重组质粒 *ECFP-SUMO*s-*EYFP* B01.1 \times , PCR 鉴定。

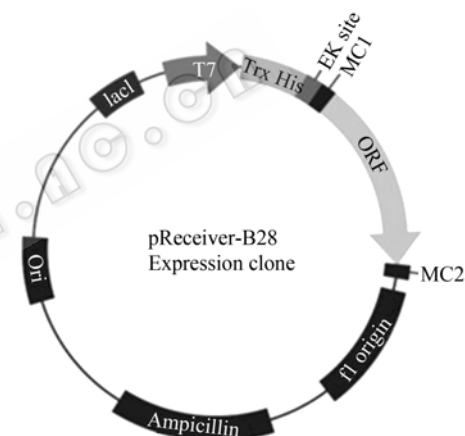


图 1 pReceiver-28 原核表达重组质粒构建示意图

Fig. 1 Prokaryotic expression recombinant plasmid pReceiver-28.

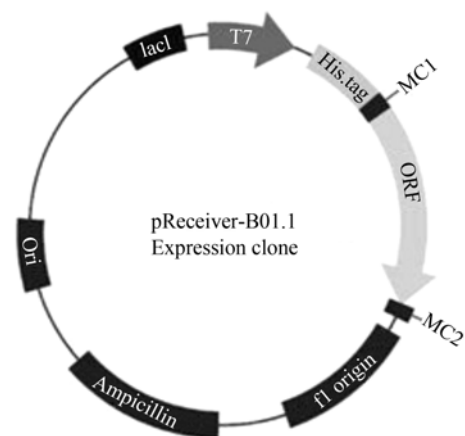


图 2 pReceiver-B01.1X 原核表达重组质粒构建示意图

Fig. 2 Prokaryotic expression recombinant plasmid pReceiver-B01.1X.

1.7 *SENPs B28* 和 *ECFP-SUMOs-EYFP B01.1* × 重组质粒的原核表达

将重组质粒 *SENPs B28* 和 *ECFP-SUMOs-EYFP B01.1* × 分别转化 *E. coli* BL21, 经 37°C 过夜培养后, 挑取单菌落进行 PCR 检菌。挑取检菌阳性菌落接种至 Amp 抗性培养基培养, 以终浓度 0.4 mmol/L 的 IPTG 在 18°C 诱导目的蛋白过夜(约 16 h)表达。

1.8 *SENPs* 和 *ECFP-SUMOs-EYFP* 融合蛋白的分析鉴定

将经诱导后的细菌上清与沉淀分离后进行 12% SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色, 分析目的蛋白的表达和分布情况。将已进行电泳 SDS-PAGE 膜上的蛋白转醋酸纤维膜做 Western blotting 分析鉴定, 用 5% 牛奶封闭 30 min, 加入 6 × His 兔单克隆抗体 4°C 孵育过夜, 加入辣根过氧化物酶(HRP) 标记山羊抗兔 IgG(H+L) 37°C 孵育 1 h, 用二氨基联苯胺(DAB)显色, 至出现条带后立即终止反应。

1.9 *SENPs* 和 *ECFP-SUMOs-EYFP* 融合蛋白的纯化

重组菌株在 18°C、0.4 mmol/L IPTG 诱导过夜, 离心收集菌体, 超声波破碎菌体, 分离上清、沉淀, Ni-NTA 离子交换柱层析纯化蛋白, 进一步用 SDS-PAGE 分析鉴定。

1.10 ULP、*SENPs* 对底物 *ECFP-SUMOs-EYFP* 的酶切特异性及 ULP、*SEN2C* 酶活检测

ULP、*SEN1C*、*SEN2C* 对底物 *ECFP-SUMOs-EYFP* 的酶切特异性实验在 Tris buffer 中进行: 50 mmol/L Tris, pH 8.0, 20 mmol/L NaCl, 5 mmol/L DTT。*SEN1C*、*2C* 和 ULP 分别在 37°C 和 25°C 下与一定量底物孵育 1 h。酶活检测实验以 ULP 和 *SEN2C* 分别在 37°C 和 25°C 下, 1 h 内完全切割 1 μg 底物所需要的酶量为一个酶单位。每毫克纯化酶蛋白中所含的催化活力为酶的比活力。一定量的底物与梯度稀释的酶在规定的温度下孵育 1 h, 计算酶的活力单位及比酶活, 以 ULP 酶切 EGFP 蛋白(该蛋白带有 ULP 酶切位点)为阳性对照。2 × SDS 小分子上样缓冲液终止酶切反应, 并进行 12% SDS-PAGE 检测, 考马斯亮蓝染色, 分析酶切效果。

2 结果

2.1 *ECFP*、*EYFP*、*SENPs*、*SUMOs* 基因的 PCR 扩增结果

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 分别可

见 751 bp、751 bp、657 bp 和 300 bp 左右条带, 分子量大小与预期一致(图 3~图 5)。

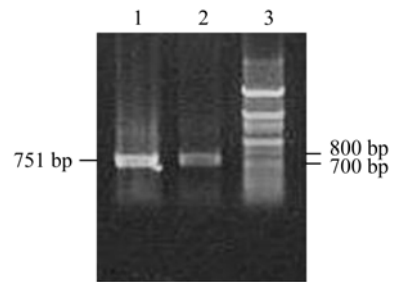


图 3 两步 PCR 扩增 *ECFP*、*EYFP* 纯化后产物

Fig. 3 Amplification of *ECFP* and *EYFP* DNA by two-step PCR. 1: *ECFP*; 2: *EYFP*; 3: DNA marker.

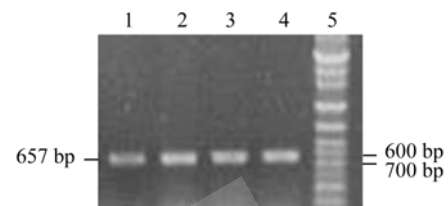


图 4 两步 PCR 扩增 *SENPs* 纯化后产物

Fig. 4 Amplification of *SENPs* DNA by two-step PCR. 1: *SEN1C*; 2: *SEN2C*; 3: *SEN3C*; 4: *SEN5C*; 5: DNA marker.

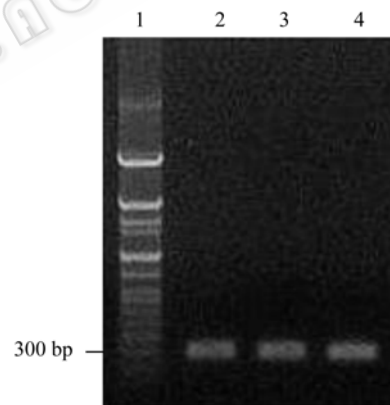


图 5 两步 PCR 扩增 *SUMOs* 纯化后产物

Fig. 5 Amplification of *SUMOs* DNA by two-step PCR. 1: DNA marker; 2: *SUMO1*; 3: *SUMO2*; 4: *SUMO3*.

2.2 *SENPs B28* 和 *ECFP-SUMOs-EYFP B01.1* × 重组质粒的鉴定

SENPs B28 质粒经 *Acc65* 酶切, 见约 6.6 kb 条带(图 6); *ECFP-SUMOs-EYFP B01.1* × 重组质粒用 *SUMOs* 的上下游引物进行 PCR 鉴定, 见 300 bp 左右条带(图 7), 以上测序完全正确, 重组质粒构建成功。

2.3 *SENPs* 和 *ECFP-SUMOs-EYFP* 融合蛋白的原核表达

重组蛋白经 12% SDS-PAGE 分析可见 40 kD 处 *SEN1C*、*SEN2C* 蛋白条带及 73 kD 处 *ECFP-*

SUMOs-EYFP 蛋白条带, 约占菌体总蛋白的 10 % 左右。SENPs 表达产物经 Western blotting 分析鉴定为目的重组蛋白(图 8)。SEN3C 以 23 kD 的分子量截短表达在上清中, SEN5C 表达在沉淀中, 因此无法继续分析 SEN3C 和 SEN5C。

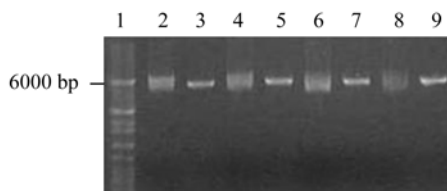


图 6 质粒 *SENPs* B28 *Acc65* I 酶切鉴定

Fig. 6 Construction and identification of *SENPs* B28. 1: DNA marker; 2, 4, 6, 8: *SENP1C* B28, *SENP2C* B28, *SENP3C* B28, *SENP5C* B28; 3, 5, 7, 9: cleaved by *Acc65* I.

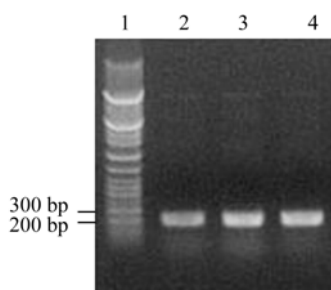


图 7 质粒 *ECFP-SUMOs-EYFP* B01.1x 的鉴定

Fig. 7 Identification of plasmid *ECFP-SUMOs-EYFP* B01.1x. 1: DNA marker; 2: *ECFP-SUMO1-EYFP* B01.1x; 3: *ECFP-SUMO2-EYFP* B01.1x; 4: *ECFP-SUMO3-EYFP* B01.1x.

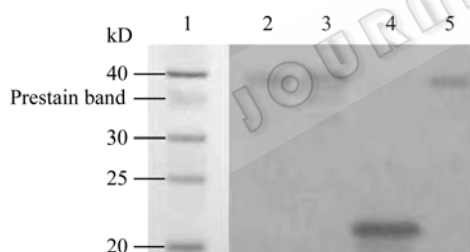


图 8 *SENPs* 表达上清 Western blotting 鉴定结果

Fig. 8 Expression of *SENPs* with Western blotting. 1: protein marker; 2: *SENP1C*; 3: *SENP2C*; 4: *SENP3C*; 5: *SENP5C*.

2.4 *SENPs* 和 *ECFP-SUMOs-EYFP* 融合蛋白的纯化鉴定

重组菌株经 IPTG 诱导后, 超声波破碎菌体, 上清经 Ni-NTA 离子交换柱层析纯化可得到纯度较高(95%以上)的融合蛋白, 经 SDS-PAGE 分析鉴定为目的蛋白(图 9)。

2.5 ULP、SENPs 对底物 ECFP-SUMOs-EYFP 的酶切特异性检测

将各酶切反应样品及其对照进行 12% SDS-PAGE,

并进行考马斯亮蓝染色(图 10~图 12)。由图 10、12 可以看出, ULP、SEN2C 分别在 25°C 和 37°C 下, 1 h 可将 1.15 μ g 底物 ECFP-SUMO1/2/3- EYFP 全部切开。由图 11 可以看出, SEN1C 37°C 下, 1 h 只能切开小量 ECFP-SUMO2/3-EYFP。酶的活力单位及比活力见表 2。

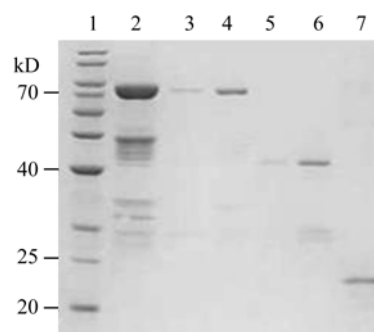


图 9 *SENPs* 和 *ECFP-SUMOs-EYFP* 蛋白纯化产物 SDS-PAGE 电泳鉴定

Fig. 9 SDS-PAGE analysis of purified *SENPs* and *ECFP-SUMOs-EYFP* proteins. 1: protein marker; 2: *ECFP-SUMO1-EYFP*; 3: *ECFP-SUMO2-EYFP*; 4: *ECFP-SUMO3-EYFP*; 5: *SENP1C*; 6: *SENP2C*; 7: *SENP3C*.

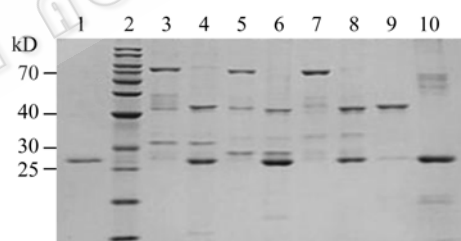


图 10 ULP 对底物 *ECFP-SUMOs-EYFP* 的酶切特异性检测

Fig. 10 Enzymatic specificity of ULP to substrates *ECFP-SUMOs-EYFP*. 1: ULP; 2: marker; 3: *ECFP-SUMO1-EYFP*; 4: ULP+*ECFP-SUMO1-EYFP*; 5: *ECFP-SUMO2-EYFP*; 6: ULP+ *ECFP-SUMO2-EYFP*; 7: *ECFP-SUMO3-EYFP*; 8: ULP+*ECFP-SUMO3-EYFP*; 9: EGFP; 10: ULP+EGFP.

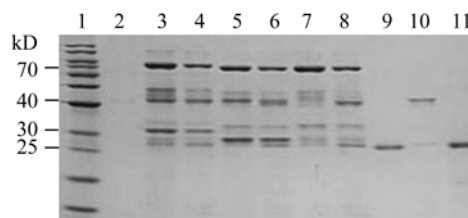


图 11 *SENP1C* 对底物 *ECFP-SUMOs-EYFP* 的酶切特异性检测

Fig. 11 Enzymatic specificity of *SENP1C* to substrates *ECFP-SUMOs-EYFP*. 1: marker; 2: *SENP1C*; 3: *ECFP-SUMO1-EYFP*; 4: *SENP1C*+*ECFP-SUMO1-EYFP*; 5: *ECFP-SUMO2-EYFP*; 6: *SENP1C*+*ECFP-SUMO2-EYFP*; 7: *ECFP-SUMO3-EYFP*; 8: *SENP1C*+*ECFP-SUMO3-EYFP*; 9: ULP; 10: EGFP; 11: ULP+EGFP.

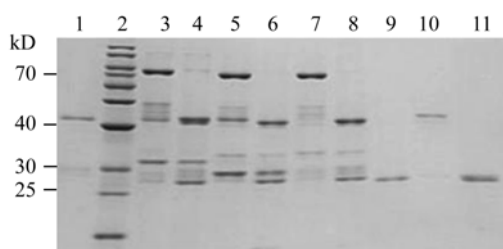


图 12 SENP2C 对底物 ECFP-SUMOs-EYFP 的酶切特异性检测

Fig. 12 Enzymatic specificity of SENP2C to substrates ECFP-SUMOs-EYFP. 1: SENP2C; 2: marker; 3: ECFP-SUMO1-EYFP; 4: SENP2C+ECFP-SUMO1-EYFP; 5: ECFP-SUMO2-EYFP; 6: SENP2C+ECFP-SUMO2-EYFP; 7: ECFP-SUMO3-EYFP; 8: SENP2C+ECFP-SUMO3-EYFP; 9: ULP; 10: EGFP; 11: ULP+EGFP.

表 2 ULP、SENP2C 的活力单位及比活力

Table 2 Enzymatic activities of ULP and SENP2C to different substrates

Enzyme	Substrate	Activity unit (U/ μ L)	Specific activity (U/mg)
ULP1C	ECFP-SUMO1-EYFP	2.560 \pm 1.109	(5.243 \pm 2.275) $\times 10^3$
ULP1C	ECFP-SUMO2-EYFP	0.293 \pm 0.127	(0.600 \pm 0.260) $\times 10^3$
ULP1C	ECFP-SUMO3-EYFP	1.227 \pm 0.531	(2.510 \pm 1.091) $\times 10^3$
SENP2C	ECFP-SUMO1-EYFP	0.320 \pm 0.139	(1.280 \pm 0.554) $\times 10^3$
SENP2C	ECFP-SUMO2-EYFP	1.173 \pm 0.508	(4.693 \pm 2.032) $\times 10^3$
SENP2C	ECFP-SUMO3-EYFP	0.623 \pm 0.257	(2.453 \pm 1.062) $\times 10^3$

The active unit values represent enzyme concentration needed to process 1 μ g of substrate in 1 hour at 37°C (SENP) or 25°C (ULP), while specific activity values represent active unit concentration every milligram enzyme protein.

3 讨论

四种 SUMO 以前体形式存在于哺乳动物中, 利用 SENPs 对其进行差异剪切成熟和介导去 SUMO 化, 调控不同的 SUMO 蛋白对底物的修饰, 对 SUMO 化修饰的调控体系具有非常重要的生理意义。了解 SENPs 对 SUMOs 的特异性及活性差异有重要的生物学意义及临床应用价值。

本实验通过对 SENP1,2,3,5 的 C 末端活性片段的克隆及表达, 构建了可用于荧光共振能量转移实验的融合蛋白 ECFP-SUMOs-EYFP。初步研究了 SENP 家族成员 SENP1C、SENP2C 对于 SUMO1, 2, 3 的底物特异性。文献报道 SENP 家族蛋白对于底物 SUMO 的酶切具有特异性, 但结果有很大差异^[1,8,11,12]。本研究结果表明人 SUMO 蛋白酶在 SUMO 的成熟上存在底物特异性。SENP2C 的酶谱较宽, 对 3 种底物均有切割活性, SENP2C 的切割效

率为 SUMO2>SUMO3>SUMO1, 与文献报道的 SUMO2>SUMO1>SUMO3 不同^[8,12,15]。SENP1C 只能切开 ECFP-SUMO2,3-EYFP 两种融合蛋白, 对 SUMO1 不具有切割活性^[8,12]。本研究存在 2 个问题。首先, 因为 SENP3C 截短表达、SENP5C 表达在包涵体中, 本研究缺乏 SENP3C 和 SENP5C 的数据。其次, 本研究表达的是 SENPs 的 C 端催化结构域而非全长蛋白, 而 SENPs 的 N 端区域很可能会影响酶在体内环境的生理特性, 甚至会影响其作为酶本身的生化特性。但目前无法预测 N 端区域会如何影响酶的功能, 因为 N 端区域没有可识别的蛋白结构域特征^[8,10]。虽然如此, 本研究可以在没有其他结构域干扰的情况下, 鉴定保守的催化域的固有特性。基于以上结果, 可以推断, 即使在同样的 SENP 作用下, 不同 SUMO 的成熟反应是不同的, 不同目标蛋白的 SUMO 化位点在 SUMO 化循环中也是不同的, SENP 对 SUMO 化循环调节的特异性有待进一步研究。

ULP 是哺乳动物 SENP 在酵母中的同源酶, 分为 Ulp1 和 Ulp2 两种, 目前研究较详细的是 Ulp1^[13,14]。本研究通过检测 ULP1 的 C 端活性片段对于哺乳动物 3 种 SUMO 的底物特异性(酵母的 ULP1C 对 SUMO1,2,3 均有切割活性), 表明酵母的 ULP1 对于哺乳动物 SUMO 具有较广的酶谱。

SUMO 化与疾病的相关性可将其作为疾病临床检测靶标, 目前常规的免疫学方法无法予以鉴别。因此探索新的检测方法是非常必要的。荧光共振能量转移(FRET)技术构建的蛋白酶检测器具有高灵敏度和高特异性, 可用于通过检测 SENP 的表达及活性进而评价 SUMO 化, 本实验的工作对进一步开展基于 FRET 的临床相关研究做了充分的准备。

致谢 本实验全部工作在广州复能基因有限公司完成, 在此致谢。

REFERENCES

- [1] Kong Y, Yang KG, Chen SS. SUMO: A newly discovered post-translational modification protein. *Chemistry of Life*, 2004, 24(4): 317-319.
孔燕, 杨克恭, 陈松森. SUMO: 一种新发现的翻译后修饰蛋白. 生命的化学, 2004, 24(4): 317-319.
- [2] Reverter D, Lima CD. A basis for SUMO protease specificity provided by analysis of human Senp2 and a Senp2-SUMO complex. *Structure*, 2004, 12: 1519-1531.

- [3] Schwartz DC, Hochstrasser M. A superfamily of protein tags: Ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends Biochem Sci*, 2003, **28**: 321–328.
- [4] Melchior F, Hengst L. Mdm2-SUMO1: Is bigger better? *Nat Cell Biol*, 2000, **2**: E161–E163.
- [5] Wilkinson CRM. New tricks for ubiquitin and friends. *Trends Cell Biol*, 2002, **12**: 545–546.
- [6] Hay RT. Protein modification by SUMO. *Trends Biochem Sci*, 2001, **26**: 332–333.
- [7] Gong LM, Yeh ETH. Characterization of a family of nucleolar SUMO-specific proteases with preference for SUMO-2 or SUMO-3. *J Biol Chem*, 2006, **281**(23): 15869–15877.
- [8] Mikolajczyk J, Drag M, Be'ke's M, *et al.* Small ubiquitin-related modifier (SUMO)-specific proteases. *J Biol Chem*, 2007, **282**(36): 26217–26224.
- [9] Sternsdorf T, Jensen K, Freemont PS. SUMO. *Curr Biol*, 2003, **13**: R258–R259.
- [10] Brian A, Pollok, Roger Heim. Using GFP in FRET-based applications. *Trends Cell Biol*, 1999, **9**: 57–60.
- [11] Chen XH, Li XK, Su ZJ, *et al.* Expression, purification and activity determination of SUMO protease's active fragment. *China Biotechnol*, 2007, **27**(3): 34–41.
- 陈兴华, 李校堃, 苏志坚, 等. SUMO 蛋白酶活性片段的表达、纯化及活性测定. *中国生物工程杂志*, 2007, **27**(3): 34–41.
- [12] Zheng XU, Shannon WNAU. Mapping residues of SUMO precursors essential in differential maturation by SUMO-specific protease, SENP1. *Biochem J*, 2005, **386**: 325–330.
- [13] Taylor DL, Ho JCY, Oliver A, *et al.* Cell-cycle-dependent localisation of Ulp1, a *Schizosaccharomyces pombe* Pmt3 (SUMO)-specific protease. *J Cell Sci*, 2002, **115**: 1113–1122.
- [14] Mossessova E, Lima CD. Ulp1-SUMO Crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. *Mol Cell*, 2000, **5**: 865–876.
- [15] Reverter D, Lima CD. A basis of SUMO protease specificity provided by analysis of human Senp2 and a Senp2-SUMO complex. *Structure*, 2004, **12**: 1519–1531.

中国科学院微生物研究所期刊广告部成立

中科院微生物研究所期刊广告部于 2007 年 3 月正式成立, 具有北京市工商行政管理局正式批准的广告经营许可证(京海工商广字第 8107 号)。广告部代理《生物工程学报》、《微生物学报》、《微生物学通报》、《菌物学报》四个期刊的广告经营业务, 此四种期刊均为中国自然科学核心期刊, 国内外公开发行, 主要报道微生物学、菌物学和生物技术领域的最新研究成果和研究动态, 已被美国化学文摘(CA)、生物学文摘(BA)、医学索引(MEDLINE)、俄罗斯文摘杂志(AJ)、Abstracts of Mycology (美国“菌物学文摘”)、Index of Fungi (英国“菌物索引”)、Review of Plant Pathology (英国“植物病理学文摘”)、Bibliography of Systematic Mycology (英国“系统菌物学文献目录”)、Bibliographie der Pflanzenschutz literature(德国“植物保护文献目录”)、《中国学术期刊文摘》、《生物学文摘》等等国内外著名数据库和检索期刊收录, 是促进国内外学术交流的重要科技期刊。

广告刊登内容主要包括大型生化仪器(如显微镜、离心机、色谱仪、无菌操作台、大、中、小型发酵罐)、设备耗材(如 PCR 仪、细胞生物反应器、微量移液器、离心管、杂交膜)及生化试剂(如各种酶、载体、试剂盒)等的产品宣传信息, 也可以发布生物技术人才招聘信息、会议消息、以及与生命科学有关的各类服务信息。广告部以严谨、诚信为原则, 愿与从事生物技术产品生产与销售的各类厂商和公司精诚合作, 共同发展。如果您有刊登广告的需要, 欢迎与我们电话或 email 联系获取各刊版位及报价信息! 也可以登陆各刊网站, 了解更多详情。

提示: 从 2007 年起, 各公司与此四刊签订的广告费用请通过新地址汇款(收款单位: 中国科学院微生物研究所, 开户银行: 中国工商银行北京分行海淀镇支行, 帐号: 0200004509089117425)。

中国科学院微生物研究所·期刊广告部

联系电话: 010-64807336; 010-64807521 电子邮箱: gg@im.ac.cn 联系人: 武文 王闯

网址: <http://journals.im.ac.cn>

Journals.im.ac.cn