



研究报告

限制性内切酶 *Mlu* I 蛋白及其硒代衍生物的制备邵钰晨^{1,2} 马燕燕^{1,2} 谷庆花^{1,2} 鲍渴望^{1,2} 孙晓宇^{1,2} 陈晓雨^{1,2} 李婷婷^{1,2} 司鑫鑫^{*1,2}

1 江苏海洋大学药学院 江苏 连云港 222005

2 江苏海洋大学江苏省海洋药物活性分子筛选重点实验室 江苏 连云港 222005

摘要:【背景】限制性内切酶 *Mlu* I 是一种常用的工具酶，在分子生物学领域发挥着重要的作用，其三维结构尚未被解析。【目的】在大肠杆菌中克隆表达、纯化重组 *Mlu* I 蛋白及其硒代蛋白，并进行结晶条件的研究。【方法】构建重组表达载体 pET28b-*Mlu* I，在大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 中诱导表达，利用亲和层析和凝胶过滤层析纯化重组 *Mlu* I 蛋白和硒代 *Mlu* I 蛋白。对蛋白进行质谱检测、圆二色谱检测以及酶活检测，利用坐滴法进行结晶条件的筛选。【结果】构建了重组表达载体 pET28b-*Mlu* I 并纯化获得达到结晶纯度的蛋白，通过质谱检测确定硒代 *Mlu* I 蛋白中的 8 个甲硫氨酸全部被取代，结合酶活测试及圆二色谱检测确定了硒代对 *Mlu* I 蛋白的活性、结构无明显影响。采用坐滴法进行初步的晶体生长研究，重组蛋白目前已在 1 种条件下获得针状晶体并进行初步衍射，获得分辨率在 0.32 nm 左右的衍射数据。【结论】*Mlu* I 蛋白及硒代 *Mlu* I 蛋白纯化体系的构建和结晶条件的研究，可为下一步解析 *Mlu* I 三维结构、作用机制的探讨及定向改造奠定基础。

关键词: 限制性内切酶, *Mlu* I, 硒代蛋白, 结晶

Preparation of restriction endonuclease *Mlu* I and its seleno-derivativeSHAO Yuchen^{1,2} MA Yanyan^{1,2} GU Qinghua^{1,2} BAO Kewang^{1,2} SUN Xiaoyu^{1,2}
CHEN Xiaoyu^{1,2} LI Tingting^{1,2} SI Xinxin^{*1,2}

1 School of Pharmacy, Jiangsu Ocean University, Lianyungang, Jiangsu 222005, China

2 Jiangsu Provincial Key Laboratory of Marine Pharmaceutical Compound Screening, Jiangsu Ocean University, Lianyungang, Jiangsu 222005, China

Abstract: [Background] Restriction endonuclease *Mlu* I is a commonly used tool in molecular biology. However, its three-dimensional structure has not been determined. [Objective] *Mlu* I gene was cloned and expressed in *Escherichia coli*. *Mlu* I and its seleno-derivative proteins were purified, and the crystallization conditions were studied. [Methods] A recombinant expression vector pET28b-*Mlu* I was constructed and expressed inductively in *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Affinity and gel filtration chromatography were used to

Foundation items: Open Foundation of Jiangsu Provincial Key Laboratory of Marine Pharmaceutical Compound Screening (HY201802); Postgraduate Research and Practice Innovation Program of Jiangsu Province (KYCX20-2892)

*Corresponding author: Tel: 86-518-8589579; E-mail: sixx@jou.edu.cn

Received: 14-08-2020; Accepted: 28-09-2020; Published online: 25-11-2020

基金项目: 江苏省海洋药物活性分子筛选重点实验室开放基金(HY201802); 江苏省研究生科研与实践创新计划(KYCX20-2892)

*通信作者: Tel: 0518-8589579; E-mail: sixx@jou.edu.cn

收稿日期: 2020-08-14; 接受日期: 2020-09-28; 网络首发日期: 2020-11-25

purify *Mlu* I and Se-*Mlu* I proteins. Mass spectrometry, circular dichroism and enzyme activity analysis were carried out to characterize these proteins. Sitting drop method was used to screen the crystallization conditions. **[Results]** The recombinant expression vector pET28b-*Mlu* I was successfully constructed and the purified *Mlu* I and Se-*Mlu* I proteins with purity suitable for crystallization were obtained. All 8 methionines were successfully replaced with se-methionines in the Se-*Mlu* I protein determined by mass spectrometry. The circular dichroism and enzyme activity analysis confirmed that se-methionines replacement had no significant effect on the activity and structure of the *Mlu* I protein. Preliminary crystallization study and subsequent X-ray diffraction showed that the needle-like crystal of *Mlu* I formed under one condition diffracted to a resolution of 0.32 nm. **[Conclusion]** The construction of *Mlu* I and Se-*Mlu* I protein purification system and study of crystallization conditions laid the foundation for further analysis of the three-dimensional structure of *Mlu* I, revealing the molecular mechanism of *Mlu* I, and directed evolutionary modification of *Mlu* I.

Keywords: restriction endonuclease, *Mlu* I, selenoprotein, crystallization

限制性内切酶又称限制酶, 是一类具有严格识别位点并在识别位点内或附近切割双链 DNA 的脱氧核糖核酸酶, 是现代分子生物学和基因工程领域研究基因组成、功能和表达不可或缺的重要工具。限制酶形式多样、种类繁多, 根据亚基组成、酶切位置、识别位点和辅助因子等不同, 传统上将限制酶分为 4 类^[1-2]。其中, II 型限制性内切酶由于其稳定的裂解模式及简便的催化方式而被广泛用于现代基因工程领域^[3]。

限制酶 *Mlu* I 是一种来源于藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) 的 II 型限制酶, 可以特异性识别 DNA 序列 5'-ACGCGT-3', 并在 A 与 C 残基之间切割, 从而留下 5 个碱基的 5' 突出端。*Mlu* I 酶切位点广泛存在于常见基因工程载体的多克隆位点 (Multiple Cloning Site, MCS) 区域, 是常用的生物工具酶之一, 在基因工程研究方面有重要的应用价值和潜力。为了进一步阐明 *Mlu* I 作用的分子机制, 本实验尝试通过蛋白质 X 射线衍射晶体学方法初步探讨其三维结构。

X 射线晶体衍射是在原子水平研究生物大分子中原子和基团三维排列的方法, 是测定蛋白质三维结构最主要的手段之一^[4]。该技术中的相位问题是蛋白质晶体学结构解析过程中的核心问题。相位信息可从 2 种途径获得: 一种是要找到目的蛋白的同源结构^[5-6], 另一种是在待解析的目的蛋白中

引入重原子^[7-8]。由于限制酶彼此之间序列相似性低, 无法参考已有的限制酶晶体结构, 而且经分析发现该蛋白质氨基酸序列中含有 8 个甲硫氨酸, 硒代甲硫氨酸可在不影响蛋白质性质的情况下取代甲硫氨酸, 所以通过制备 *Mlu* I 蛋白及其硒代蛋白衍生物的晶体, 在同步辐射光源上用不同波长的射线对晶体进行衍射, 收集相应的晶体数据, 获取反常散射信息以解决相位问题是首选的方法。

本研究以 pET28b 质粒为表达载体, 利用大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 为宿主菌, 对来源于藤黄微球菌 (*M. luteus*) 的 II 型限制性内切酶 *Mlu* I 及其硒代蛋白衍生物进行表达、纯化, 并采用坐滴法^[9]进行初步的晶体生长研究, 以期后续 *Mlu* I 三维结构及作用机制的解析提供基础, 进而为定向进化以提升其功能实用性提供指导性信息。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒

大肠杆菌 pLysS 菌株和质粒 pET28b 购自武汉淼灵生物科技有限公司, 具有广谱甲基化保护的大肠杆菌 pLysS 菌株为本实验室改造所得。

1.1.2 主要试剂和仪器

λ DNA、抗生素等生化试剂, 莫纳(苏州)生物科技有限公司; Ni 亲和层析基质 (Toyopearl AF)

和 ToyoScreen AF-Heparin HC-650M, 东曹(上海) 生物科技有限公司; HiLoad 16/60 Superdex 75 pg 凝胶过滤预装柱, GE 公司; OXOID 胰蛋白 胨、酵母提取物, Thermo Fisher Scientific 公 司; 其余化学试剂均为分析纯, 国药集团化学试 剂有限公司。

超高压连续流细胞破碎仪, 广州聚能纳米生 物科技股份有限公司; 凝胶成像系统, 上海勤翔 科学仪器有限公司; AKTA™ Pure, GE 公司; NT8 蛋白质自动点样机械臂和全自动晶体生长观 察成像分析仪, Formulatrix 公司。

LB 培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0, 琼脂粉(固体培养基添加) 10.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

M9 培养基(g/L): 十二水合磷酸氢二钠 17.09, 磷酸二氢钾 3.0, 氯化钠 0.5, 氯化铵 1.0, 氯化钙 0.011, 葡萄糖 4.0, 硫酸镁 0.24, 维生素 B₁ 0.001, 生物素 0.001, 乙二胺四乙酸 0.05, 六水合 氯化铁 0.008 3, 氯化锌 0.000 84, 二水合氯化铜 0.000 13, 六水合氯化钴 0.000 1, 硼酸 0.000 1, 六水 合氯化锰 0.000 016, 钼酸钠晶体 0.000 3, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 重组蛋白的载体构建

将人工合成的 *Mlu* I 的序列(ATGAGCGCACC GGAAGTGGACAGTGCCCGCGATGCACGCTAT GTGGAAATCCTGCTGGCACCGCTGCGTAAATG CGGCACCTACCTGCCGAAAATGGGTGGTAGC GGTGAAGTGGATCTGGCCGGTTTTACCGCAG CCTATGGTGCCGATCCGCTGTACCACTGGATG GGTCTGGATAGCCCGCTGATGTTTGCCGCCCA TAAAGCCGCCGGTGGCATGACCAGCATTTATC GCCAGCTGGGTATCGGCAGCGAACGCTTATTT CGCCAGGTTCTGCGCGATGAACTGAACCTGA CCGCCGATCAGGTTAAGTGGAGCTACAAAAT GCTGCCGGCACTGGATGCAGAACATGCCAAC GAGAGCGTTAAAGCCCGTGTGCTGAGCCTGG ATGGCGCAGTGGAGCTGGAAGATCTGGAAGA TCAGCAGGCACGTGAGCGTGTGGAGGCCTGG

ATTGAAGTGCAACGTCGCCGCCTGAACATTAC AGCCCCGCTGAAAGGTGCCGTTTTTGAGGTG CGCCAGGGCTATAAAAGCGCCGACAGCAAAC GCCAGAATGCAGATCTGGCCAATGCAGCCCA GGCCTGGGTCATCAGTATCTGCCGGTGCTGG TGATCATGAGCACCCAAATTAATGAGGTGGT GCATGCCCGCTATACCACCGGCAATTGGAGC GTTCTGATGGGCACAGTTGGCGCAAGCGATC CGGTGGGTAGCACCTATGACTTCCTGGATCA GGTGGTGGGTTATGATCTGGCAGCCTTTTTTCG AGCGCAACAAAGCCGCCTTACGCGCCGGTAC CGAAGGTATTCTGACCGATCTGCTGGAAGCA C)克隆到载体 pET28b 上, 将重组质粒通过热激法 转入到具有甲基化保护的 BL21(DE3)pLysS 感受态 细胞内, 由于 pET28b 带有卡那霉素抗性基因 (Kanamycin), BL21(DE3)pLysS 菌株带有氯霉素 抗性(Chloramphenicol), 因此需经带有卡那霉素 (50 mg/L)和氯霉素(50 mg/L)的双抗性的 LB 平板 进行筛选, 最终得到 *Mlu* I 重组菌株 BL21(DE3)pLysS-*Mlu* I。

1.2.2 重组蛋白和硒代蛋白的表达

(1) 重组蛋白的表达

将重组菌株在带有卡那霉素和氯霉素(50 mg/L) 的 LB 平板上划线, 37 °C 培养过夜, 随机挑选数 个单克隆于 LB 中, 在 37 °C、200 r/min 培养至 OD_{600} 值为 0.4–0.6。取出 10 mL 活化液加入至 1 L 带卡那霉素和氯霉素抗性(终浓度为 50 mg/L)的 LB 培 养基, 继续同条件扩大培养至 OD_{600} 值为 0.6–0.8。 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达, 16 °C、200 r/min 继续培养 16–18 h, 5 500 r/min 离心 5 min 收集菌体。

(2) 硒代蛋白的表达

取 10 μ L 重组菌株 BL21(DE3)pLysS-*Mlu* I 接入 10 mL LB 中, 37 °C、200 r/min 活化过夜, 次日 以 1:100 的比例将活化液接种于 1 L 过渡培养基 (LB:M9=1:4, 体积比)中, 37 °C 培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8, 将 1 L 菌液在 2 500 \times g 离心 5 min 后收 集菌体, 将菌体转移至体积为 500 mL 的 37 °C 提前 预热好的 100% M9 培养基中, 37 °C、220 r/min 培

养 1 h, 加入硒代甲硫氨酸(0.05 g/L), 继续培养 15–30 min。加入 IPTG 诱导(终浓度为 0.5 mmol/L), 16 °C 培养 16 h, 5 500 r/min 离心 5 min 收集菌体。

1.2.3 重组蛋白与硒代蛋白的纯化

将冻存于 -20 °C 的菌体用裂解缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 150 mmol/L NaCl) 进行重悬, 将重悬液吹打至无明显菌块后利用细胞破碎仪以 1.0×10^8 Pa 的压强进行高压破碎, 循环破碎 4 次至菌液澄清, 将破碎后的菌液在 4 °C、14 000 r/min 离心 1 h, 收集上清。上清和镍基质结合 1 h 后进行洗脱, 先用含有 15 mmol/L 咪唑的缓冲液(其余成分同裂解液一致)洗 3–5 个柱体积以除去少量杂蛋白, 再用含有 250 mmol/L 咪唑的缓冲液(其余成分同裂解液)进行洗脱, 收集样品进行 SDS-PAGE 鉴定。选择含大量目的蛋白的洗脱样品进行收集, 并利用 ToyoScreen AF-Heparin HC-650M 亲和层析柱进行下一步纯化, 纯化过程中所用缓冲液分为 A 液(25 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)和 B 液(25 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mol/L NaCl), 用 A 液提前进行柱平衡, 0%–100% B 液进行线性洗脱, 流速为 2 mL/min, 选择出峰位置进行收集并用 SDS-PAGE 验证。最后将收集的样品过 HiLoad 16/60 Superdex 75 pg 凝胶过滤预装柱, 通过 25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)和 150 mmol/L NaCl 进行洗脱, 洗脱样进行 SDS-PAGE 检测, 收集蛋白浓度高且纯度好的样品进行浓缩。由 Invitrogen Qubit 4 荧光计精准测定蛋白质的浓度。整个纯化过程在低温环境中进行。

硒代蛋白的纯化过程同重组蛋白一致。此外, 为了尽量避免硒代蛋白中的硒代甲硫氨酸在纯化过程中被氧化, 所有缓冲液均经过超声脱气处理。

1.2.4 重组蛋白与硒代蛋白的质谱检测

将 200 μ L 重组蛋白和硒代蛋白(浓度皆为 1.5 mg/mL)在 37 °C 条件下 1 000 r/min 离心 30 min、

浓缩、干燥成干粉状态。在干粉样品中加入 10 μ L 上样缓冲液, 振荡 10 min 后进行溶解, 1 000 r/min 离心 15 s 后取 5 μ L 蛋白溶液加入进样瓶中进行样品分析。

1.2.5 重组蛋白与硒代蛋白的圆二色谱检测

将重组蛋白和硒代蛋白稀释到 0.5 mg/mL, 利用圆二色谱仪进行圆二色谱扫描, 近紫外区波长范围为 190–240 nm, 样品池光程为 0.5 mm, 分析其二级结构。

1.2.6 重组蛋白与硒代蛋白的功能检测

为了验证重组酶 *Mlu* I 和 Se-*Mlu* I 具有相似的生物学活性, 对两者进行功能检测实验。20 μ L 反应体系中, 以 0.3 μ g λ DNA 为底物, 分别取浓缩后蛋白 1 μ L (1 μ g)、10 \times CutOne Buffer 2 μ L, 37 °C 温育 15 min。使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测底物的酶切情况, 根据 *Mlu* I 蛋白及其硒代蛋白是否都能够切开底物 λ DNA 并产生相应大小的条带来确定其活性。

1.2.7 *Mlu* I 重组蛋白及其硒代蛋白结晶条件初筛

将蛋白浓缩到 10 mg/mL, 通过坐滴法筛选合适的结晶条件: 操作 NT8 将蛋白溶液与池液在晶体板的样品槽内以 1:1 的比例进行混合, 用透明塑封纸密封, 放入恒温 20 °C 的全自动晶体生长观察成像分析仪中, 每隔 12 h 自动拍照观察不同条件下晶体的生长情况。本次实验中所用的试剂盒均为 Hampton Research 的结晶试剂盒, 共计 576 个条件。

2 结果与分析

2.1 重组表达载体的构建

以 pET28b 为载体构建 pET28b-*Mlu* I 重组质粒, *Mlu* I 编码基因 N 端带有 6 \times His 标签序列(图 1)。将重组质粒通过热激法转化到具有甲基化保护的感受态细胞 BL21(DE3)pLysS 中, 通过带有双抗性的平板筛选出阳性克隆, 挑取单克隆进行活化后提取质粒, 经测序确定重组质粒中所插入的片段序列正确。

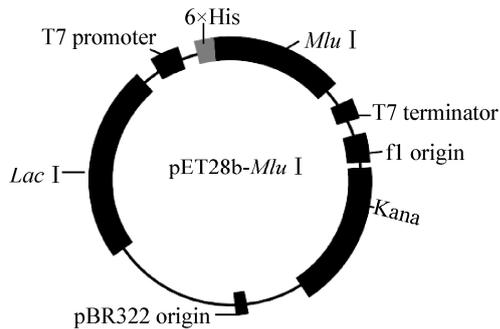


图 1 pET28b-*Mlu I* 质粒图谱

Figure 1 Schematic of pET28b-*Mlu I* plasmid

注: T7 promoter: T7 启动子, 转录起始; *Lac I*: 乳糖调控基因, 编码阻遏蛋白; pBR322 origin: 复制起点; Kana: 卡那抗性基因, 用作抗性筛选的重要标记; T7 terminator: T7 终止子, 终止转录; *Mlu I*: 目的基因; f1 origin: 噬菌体复制起始位点, 启动表达单链 DNA; 6×His: 由 6 个组氨酸组成的标签, 可采用固定化金属螯合层析对重组蛋白进行分离纯化

Note: T7 promoter: Transcription initiation; *Lac I*: Lactose regulatory gene, encoding repressor protein; pBR322 origin: Origin of replication; Kana: Kana resistance gene, an important marker for resistance screening; T7 terminator: Stop transcription; *Mlu I*: Target gene; f1 origin: Phage replication initiation site to initiate expression of single-stranded DNA; 6×His: A tag consisting of 6 histidines through which recombinant proteins can be separated and purified by metal chelate affinity chromatography

2.2 *Mlu I* 蛋白及其硒代蛋白的表达纯化

将构建成功的重组表达质粒转化到 BL21(DE3) pLysS 菌株, 通过双抗性平板得到阳性克隆, 随机挑取数个单克隆在 LB 培养基中进行活化扩大至

OD_{600} 为 0.6–0.8, 最后通过终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 16 °C 诱导表达过夜获得 *Mlu I* 蛋白。

对于硒代蛋白的表达, 传统上是采用 B834 菌株(甲硫氨酸缺陷型菌株)作为表达菌株, 利用 M9 基础培养基进行发酵从而获得硒代蛋白衍生物^[10-11]。由于限制酶在宿主菌内进行表达时会切割宿主 DNA 而造成宿主菌死亡, 因此, 需要利用具有甲基化保护的宿主菌才能获得限制酶的大量表达。本实验采用与表达野生型一致的具有甲基化保护的感受态细胞 BL21(DE3)pLysS 菌株作为表达菌株, 通过在 M9 基础培养基中添加外源硒代甲硫氨酸进行发酵制备硒代 *Mlu I* 蛋白(Se-*Mlu I*)。

将发酵所得的菌体经高压破碎收集裂解产物进行目的蛋白的纯化, 主要包括以下 3 步——Ni 亲和层析、肝素亲和层析和琼脂糖凝胶色谱层析, 以获得高纯度利于进行结晶的蛋白。SDS-PAGE 检测结果显示 *Mlu I* 重组蛋白及其硒代蛋白均可高效表达, 硒代蛋白的大小和重组蛋白一致, 与理论值相符(图 2)。重组蛋白和硒代蛋白在最后凝胶过滤层析后纯度达到 95%以上, 符合晶体生长需要, 其中重组蛋白和硒代蛋白得率分别是 5.6 mg/L 和 4.29 mg/L。

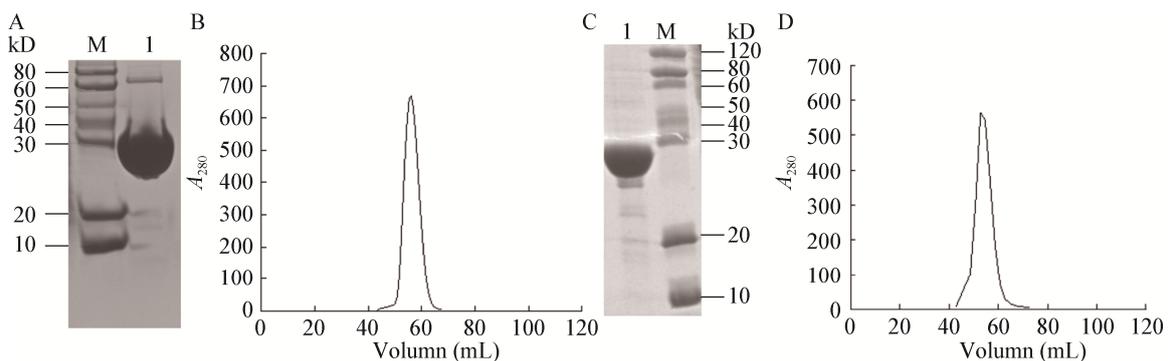


图 2 重组蛋白 *Mlu I* 和硒代蛋白 Se-*Mlu I* 的表达与纯化

Figure 2 Expression and purification of *Mlu I* and Se-*Mlu I*

注: A: 重组 *Mlu I* 的 SDS-PAGE 电泳图; B: 重组 *Mlu I* 的凝胶过滤层析结果; C: Se-*Mlu I* 的 SDS-PAGE 电泳图; D: Se-*Mlu I* 的凝胶过滤层析结果。M: PAGE-MASTER Protein Standard Plus

Note: A: SDS-PAGE electropherogram of recombinant *Mlu I*; B: Gel filtration chromatography results of recombinant *Mlu I*; C: SDS-PAGE electropherogram of Se-*Mlu I*; D: Gel filtration chromatography results of Se-*Mlu I*. M: PAGE-MASTER Protein Standard Plus

2.3 *Mlu* I 蛋白及其硒代蛋白的质谱检测

由于硒原子的取代具有一定概率, 为了检测 *Se-Mlu* I 蛋白中硒代甲硫氨酸的取代率, 将纯化得到的 *Mlu* I 和 *Se-Mlu* I 取样进行质谱检测, 如图 3 所示。将所得数据按照如下公式计算出蛋白分子量:

$$MV = \frac{(X_1 - 1)(X_2 - 1)}{X_2 - X_1}$$

其中 X_1 与 X_2 为相邻的质荷比, 且 $X_2 > X_1$ 。

如图 3 所示, 随机选取箭头所指的 2 个相邻质荷比, *Mlu* I 蛋白的 $X_1 = 839.9274$, $X_2 = 861.4275$, 经计算, 重组 *Mlu* I 蛋白分子量为 33.573 kD, 与理论值 33.5 kD 相符。*Se-Mlu* I 蛋白的 $X_1 = 829.7366$, $X_2 = 850.4697$, 经计算, *Se-Mlu* I 蛋白分子量为 33.954 kD, 与重组蛋白的分子量相差 0.381 kD。每个甲硫氨酸残基包含 1 个硫原子, 硫元素为 32.065, 硒元素原子量为 78.96,

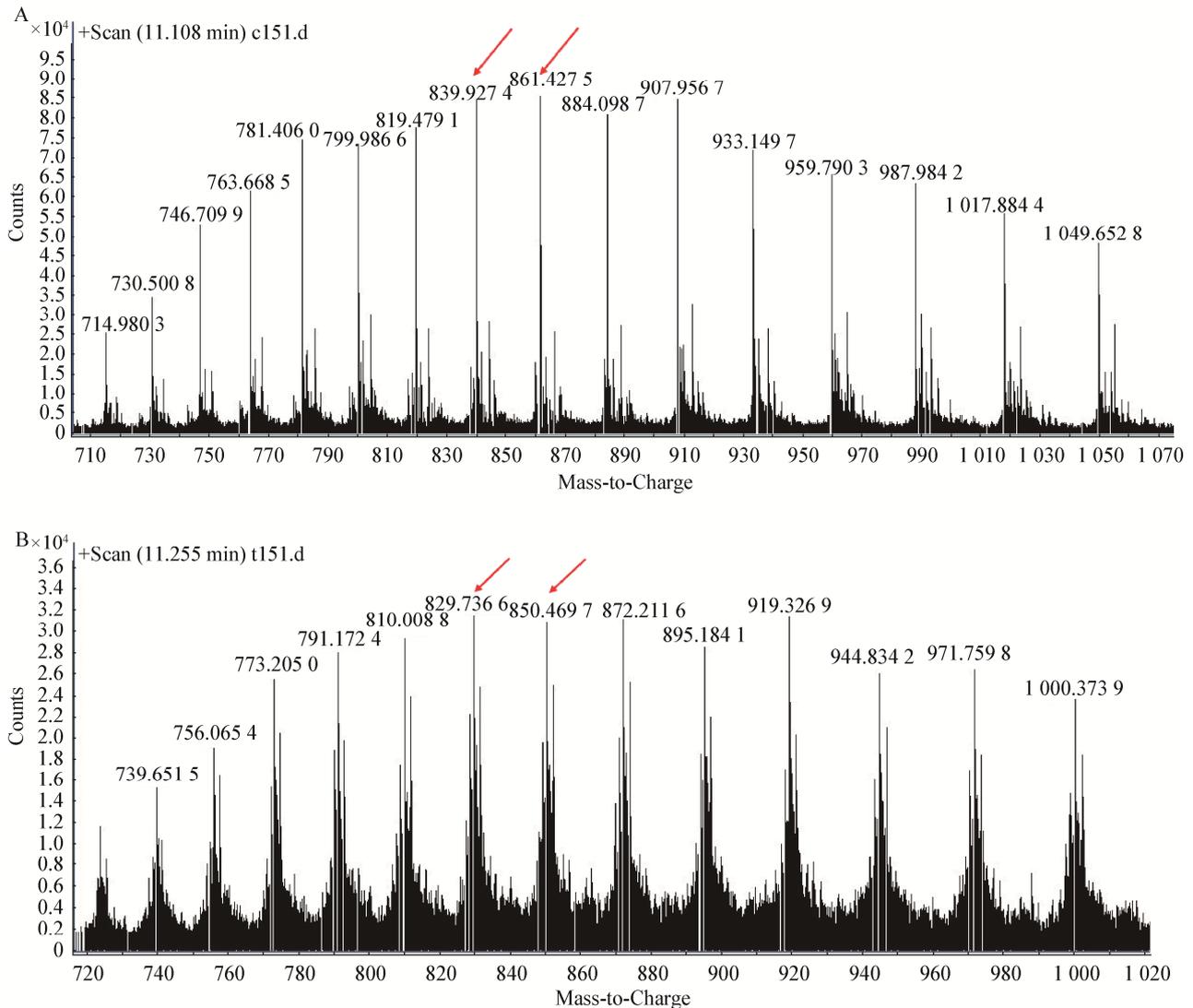


图 3 *Mlu* I 和 *Se-Mlu* I 质谱图

Figure 3 The serum mass spectrometry of *Mlu* I and *Se-Mlu* I

注: A: *Mlu* I 质谱检测结果; B: *Se-Mlu* I 质谱检测。质谱图横坐标 Mass-to-Charge: 质荷比(m/z); 纵坐标 Counts: 离子响应强度
 Note: A: Mass spectrometry analysis of *Mlu* I; B: Mass spectrometry analysis of *Se-Mlu* I. Horizontal coordinate represents Mass-to-Charge; Vertical coordinate represents ion response intensity

二者相差 46.895。因此,平均每分子 Se-*Mlu* I 蛋白中,被硒原子取代的硫原子数量为 $381/46.895=8.12$ 。重组 *Mlu* I 蛋白的氨基酸序列中含有 8 个甲硫氨酸,与质谱结果一致。因此可以推测 Se-*Mlu* I 蛋白中的甲硫氨酸全部被硒代甲硫氨酸取代。

2.4 *Mlu* I 蛋白及其硒代蛋白的功能检测

重组硒代蛋白中的硒代甲硫氨酸可通过发生氧化或者取代正常甲硫氨酸,从而对蛋白功能造成影响^[12]。在获得重组蛋白及硒代蛋白后,比较分析了两者是否具有相同的生物学功能。分别用 1 μ g *Mlu* I 和 Se-*Mlu* I 蛋白对 0.3 μ g λ DNA 在 37 $^{\circ}$ C 酶切 15 min,经琼脂糖凝胶电泳检测,两者均产生了一致且明显的特征条带(图 4),表明 Se-*Mlu* I 蛋白与原始 *Mlu* I 蛋白具有一致的生物学功能,进而推测两者的结构无明显差别。

2.5 *Mlu* I 蛋白及其硒代蛋白的圆二色谱检测

圆二色谱是应用最为广泛的测定蛋白质二级结构的方法,广泛应用于蛋白质的构象研究中^[13-14]。为了进一步明确硒代蛋白和原始蛋白的结构有无差异,将纯化得到的 *Mlu* I 和 Se-*Mlu* I 进行圆二色谱检测,解析其二级结构。如图 5 显示, *Mlu* I 蛋白及其硒代蛋白在 190 nm 处有一正峰,在 208 nm

及 222 nm 处有明显负峰,均符合 α -螺旋构象的圆二色谱图,表明原始蛋白和硒代蛋白均为 α -螺旋结构,两者二级结构无明显差别。

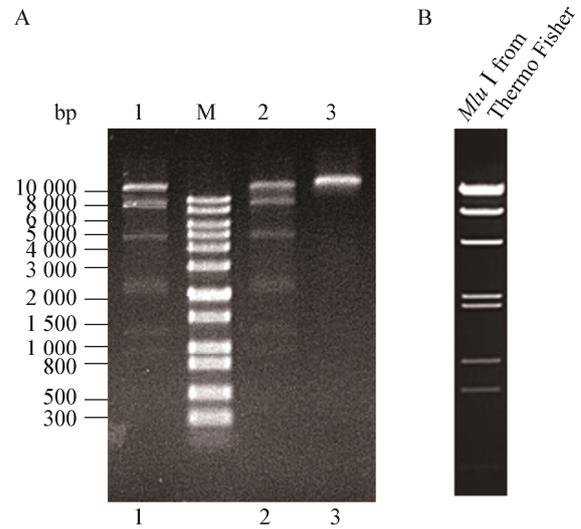


图 4 *Mlu* I 和 Se-*Mlu* I 的酶活验证

Figure 4 Enzymes activity of *Mlu* I and Se-*Mlu* I

注: A: *Mlu* I 和 Se-*Mlu* I 的酶切结果图: 1: *Mlu* I 的酶切产物; 2: Se-*Mlu* I 的酶切产物; 3: λ DNA; M: 1 kb Ladder DNA Marker。

B: Thermo Fisher 公司官网上公布的 *Mlu* I 的酶切效果图

Note: A: The results of digestion of *Mlu* I and Se-*Mlu* I: 1: Digested product of *Mlu* I; 2: Digested product of Se-*Mlu* I; 3: λ DNA; M: 1 kb Ladder DNA Marker. B: The graphical results of *Mlu* I enzymatic digestion published on Thermo Fisher Inc. official website

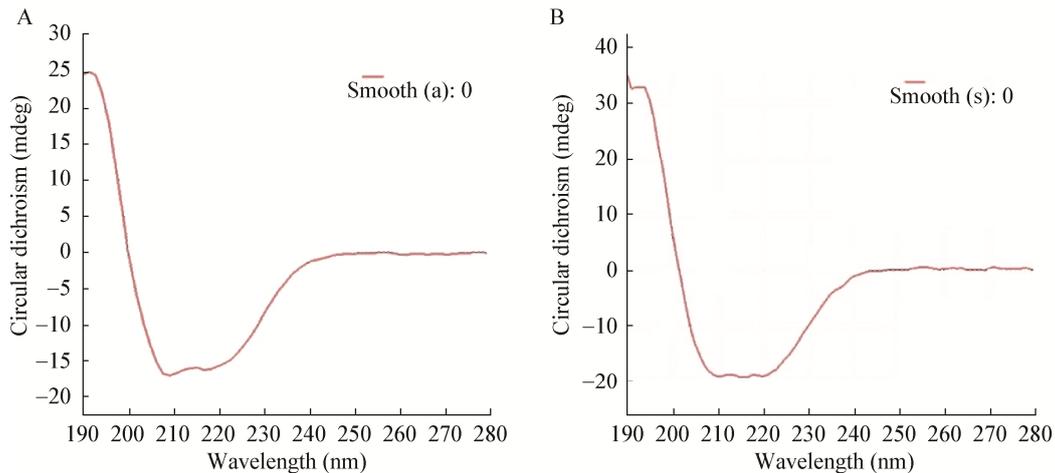


图 5 *Mlu* I 和 Se-*Mlu* I 圆二色谱图

Figure 5 Circular dichromatogram of *Mlu* I and Se-*Mlu* I

注: A: 重组蛋白 *Mlu* I 的圆二色谱图; B: 硒代蛋白 Se-*Mlu* I 的圆二色谱图

Note: A: Circular dichromatogram of recombinant protein *Mlu* I; B: Circular dichromatogram of selenoprotein Se-*Mlu* I

2.6 *Mlu* I 蛋白结晶生长条件筛选

蛋白结晶生长条件无明显规律可循, 通常利用结晶条件筛选试剂盒来进行初步筛选。本研究采用坐滴法, 选用 10 种蛋白质结晶试剂盒, 共筛选了 576 种结晶生长条件, 在 NT8 中利用自动点样臂将 10 mg/mL 的重组蛋白与不同的池液按 1:1 的比例进行混合, 每板点完后放入 20 °C 的全自动晶体生长观察成像分析仪中, 每隔 12 h 自动拍照采集数据。

Mlu I 蛋白在 2 种条件下形成初步晶体, 条件 a 为: 0.01 mol/L 六水合氯化铁(III), 0.1 mol/L pH 5.6 的柠檬酸钠三水合二钠, 10% (体积分数) Jeffamine® M-600®; 条件 b 为: 0.2 mol/L 三水合乙酸钠, 0.1 mol/L pH 8.5 的 Tris-HCl, 15% (质量体积分数) 聚乙二醇 4000。条件 a 所得晶体呈针状, 条件 b 所得晶体呈颗粒状(图 6A、6B)。条件 a 所得 *Mlu* I 蛋白的单晶收集到分辨率在 0.32 nm 左右的数据, 条件 b 所得 *Mlu* I 蛋白单晶脆弱, 无法捞取完整晶体。Se-*Mlu* I 蛋白条件 c 下形成初步晶体, 呈细小颗粒状(图 6C)。条件 c 为: 1.0 mol/L 柠檬酸氢铵, 0.1 mol/L pH 4.6 的三水合乙酸钠, 但得到的单晶脆弱, 无法捞出完整晶体, 暂时没有获得可以衍射的晶体。后续将通过进一步优化结晶生长条件、筛选 *Mlu* I 的 DNA 配体来优化改进。

3 讨论与结论

限制性内切酶是分子生物学领域中最基础的工具酶之一, 目前已有数千种限制酶被发现, 300 多种限制酶被广泛应用^[15]。II 型限制酶由于其可在识别序列的内部或附近确定位点对 DNA 进行特异性切割, 因而被广泛地应用于基因工程中, 包括 NGS 测序、基因编辑等。基于 II 型限制酶独特的性质, 对其研究与改造一直在继续。为了进一步探究 *Mlu* I 的分子机制并对其进行定向改造, 其三维结构的解析就显得尤为重要, 而通过蛋白的表达纯化获得高浓度、高纯度的蛋白则是研究结构和功能的前提。*Mlu* I 是一种来源于藤黄微球菌 *M. luteus* 的 II 型限制酶, 是最常用的限制酶之一, 目前还没有关于其三维结构和分子机制的报道, 因而对其进行改造缺乏理论指导。本文在大肠杆菌中表达纯化重组 *Mlu* I 蛋白并进行结晶条件的研究, 可为下一步解析 *Mlu* I 三维结构、作用机制的探讨及定向改造奠定基础。

Mlu I 蛋白分子量在 33 kD 左右, 适合采用 X 射线晶体衍射法解析三维结构。相位问题是蛋白质结构解析过程中的关键步骤, 一般可采用分子置换法、同晶置换法和反常散射法^[16-17]。但限制酶彼此之间序列相似性低, 在 PDB 数据库中搜索

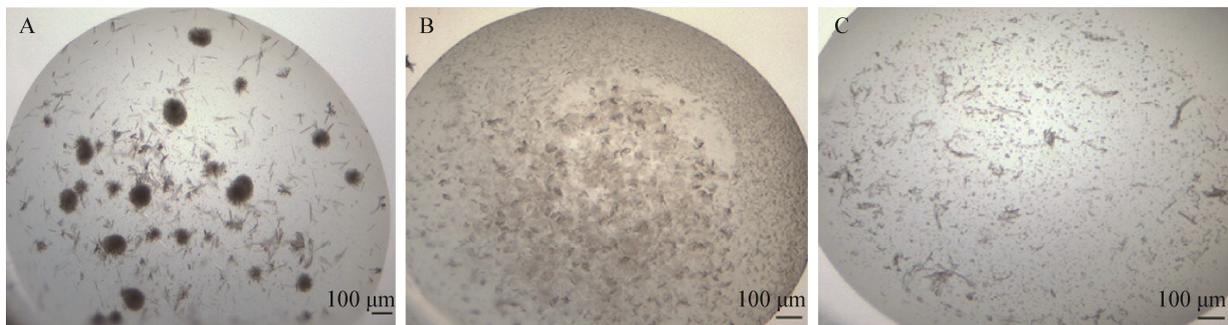


图 6 结晶条件筛选

Figure 6 Initial screening of crystallization conditions

注: A: *Mlu* I 蛋白在条件 a 获得针状晶体; B: *Mlu* I 蛋白在条件 b 获得颗粒状晶体; C: Se-*Mlu* I 蛋白在条件 c 获得细小颗粒状晶体
Note: A: *Mlu* I protein formed needle crystals under condition a; B: *Mlu* I protein formed granular crystals under condition b; C: Se-*Mlu* I protein formed small granular crystals under condition c

未获得与 *Mlu* I 具有同源结构的蛋白, 因此无法通过分子置换的方法推算晶体衍射的相位, 考虑用 *Mlu* I 蛋白的硒代衍生物结合多反常散射法 (Multi-Wavelength Anomalous Dispersion, MAD) 来解决晶体结构解析中的相位问题。组成蛋白质的基本原子的原子序数较小, 其反常散射可忽略不计, 而引入的重金属的反常散射不可忽略, 会对结构因子产生影响。反常散射正是利用这种差异来获得相位^[6]。多波长反常散射则是在多个波长下收集硒原子边缘的反常散射以及其附近的衍射数据, 推算晶体衍射相位, 从而解决初始相位问题^[18-20]。

目前利用大肠杆菌制备硒代衍生物可选择甲硫氨酸缺陷型表达菌株(B834), 或抑制甲硫氨酸合成通路并外源补充硒代甲硫氨酸。杜清等以 B834 为宿主菌表达出了拟南芥 VSP1 硒代蛋白, 并通过反常散射获得了相位信息, 进行了晶体的初步衍射^[21]。由于限制酶在宿主菌内表达时会切割宿主 DNA 造成宿主菌死亡, 因此需要使用具有甲基化保护的宿主菌才可能获得限制酶的大量表达。此外, 考虑到 B834 菌株的基因型可能会影响限制酶硒代蛋白的表达, 因此在本研究中, 我们尝试采用与表达野生型一致且具有甲基化保护的感受态细胞 BL21(DE3)pLysS 菌株作为表达菌株, 结合 M9 培养基发酵制备 Se-*Mlu* I 蛋白。

M9 培养基与 LB 培养基相比营养成分贫瘠, 而且硒代甲硫氨酸具有较大的细胞毒性, 限制了硒代蛋白的表达^[22]。为了尽量提高硒代蛋白产量, 本次实验中, 在活化液转入表达培养基 (100% M9+0.05 g/L 硒代甲硫氨酸) 之前, 先将活化液转入过渡培养基进行适应性生长, 尽可能提高菌体量; 随后采取只转接菌体的方法, 以去除含正常甲硫氨酸的过渡培养基, 该方法使得硒代蛋白的表达量显著上升。此外, 通过在 M9 基础培养基^[23]中添加外源的硒代甲硫氨酸并适当补充异亮氨酸等多种氨基酸, 抑制大肠杆菌本底代谢, 更好地利用外源硒代甲硫氨酸。通过这些改进最终获得了浓度为 10 mg/mL、纯度在 95% 以上的

Se-*Mlu* I 蛋白。对硒代蛋白进行质谱检测, 结果表明甲硫氨酸被硒代甲硫氨酸全部取代。此外, 由于硒原子易被氧化, 可能会对蛋白的稳定性、活性造成影响, 通过酶活检测发现本研究获得的 Se-*Mlu* I 与原始 *Mlu* I 蛋白都能消化底物 λ DNA, 产生相应大小的条带, 说明二者的生物学活性相似。通过圆二色谱发现二者的二级结构相似, 上述实验结果说明本次硒代对蛋白的活性和结构影响不大。同时也证明了利用普通的重组菌株结合 M9 培养基, 通过添加外源的硒代甲硫氨酸来表达硒代蛋白这一方法的成功, 为其他限制酶硒代蛋白的制备提供了参考依据。另外, 本研究通过晶体初筛发现, 重组蛋白 *Mlu* I 在 0.01 mol/L 六水合氯化铁(III)、0.1 mol/L pH 5.6 的柠檬酸钠三水合二钠和 10% (体积分数) Jeffamine[®] M-600[®] 的条件下得到了针状晶体, X 射线衍射得到的晶体分辨率在 0.32 nm 左右, 硒代蛋白在初步晶体条件筛选中未获得可衍射的晶体, 需要通过进一步的条件优化和筛选 DNA 配体来获得高分辨率的晶体。

本研究对 *Mlu* I 及 Se-*Mlu* I 进行了高效重组表达, 获得了纯度和浓度达到晶体生长要求的蛋白, 通过质谱确定 Se-*Mlu* I 蛋白中的 8 个甲硫氨酸全部被成功取代; 此外, 通过酶活测试及圆二色谱检测确定了硒代对该蛋白的活性、结构并未产生影响, 并对 *Mlu* I 蛋白进行了结晶条件初筛, 初步获得分辨率在 0.32 nm 左右的结果, 可为后续 *Mlu* I 三维结构、作用机制的解析及定向改造奠定基础。

REFERENCES

- [1] Bower EKM, Cooper LP, Roberts GA, White JH, Luyten Y, Morgan RD, Dryden DTF. A model for the evolution of prokaryotic DNA restriction-modification systems based upon the structural malleability of type I restriction-modification enzymes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(17): 9067-9080
- [2] Williams RJ. Restriction endonucleases: classification, properties, and applications[J]. *Molecular Biotechnology*, 2003, 23(3): 225-243
- [3] Loenen WAM, Dryden DTF, Raleigh EA, Wilson GG, Murray NE. Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014,

- 42(1): 3-19
- [4] Fan HF, Liang DC. The diffraction-phase problem in structural genomics[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2003, 15(2): 65-69 (in Chinese)
范海福, 梁栋材. 结构基因组学中的衍射相位问题[J]. 生命科学, 2003, 15(2): 65-69
- [5] Rossmann MG, Blow DM. The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit[J]. Acta Crystallographica, 1962, 15(1): 24-31
- [6] Dong YH. Research on protein structure and function in synchrotron radiation[J]. Modern Physics, 2014, 26(5): 22-30 (in Chinese)
董宇辉. 同步辐射中的蛋白质结构和功能研究[J]. 现代物理知识, 2014, 26(5): 22-30
- [7] Zhou L, Liu ZC, Liu P, Dong YH. Direct demodulation method for heavy atom position determination in protein crystallography[J]. Chinese Physics C, 2013, 37(1): 018002
- [8] Botha S, Baitan D, Jungnickel KEJ, Oberthür D, Schmidt C, Stern S, Wiedorn MO, Perbandt M, Chapman HN, Betzel C. *De novo* protein structure determination by heavy-atom soaking in lipidic cubic phase and SIRAS phasing using serial synchrotron crystallography[J]. IUCrJ, 2018, 5(Pt5): 524-530
- [9] Chayen NE, Saridakis E. Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal[J]. Nature Methods, 2008, 5(2): 147-153
- [10] Davies AM, Tata R, Agha R, Sutton BJ, Brown PR. Crystal structure of a putative phosphinothricin acetyltransferase (PA4866) from *Pseudomonas aeruginosa* PAC1[J]. Proteins, 2005, 61(3): 677-679
- [11] Doublé S. Preparation of selenomethionyl proteins for phase determination[J]. Methods in Enzymology, 1997, 276: 523-530
- [12] Malkowski MG, Quartley E, Friedman AE, Babulski J, Kon Y, Wolfley J, Said M, Luft JR, Phizicky EM, DeTitta GT, et al. Blocking S-adenosylmethionine synthesis in yeast allows selenomethionine incorporation and multiwavelength anomalous dispersion phasing[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(16): 6678-6683
- [13] Kelly SM, Price NC. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function[J]. Current Protein & Peptide Science, 2000, 1(4): 349-384
- [14] Whitmore L, Wallace BA. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases[J]. Biopolymers, 2008, 89(5): 392-400
- [15] Pingoud A, Wilson GG, Wende W. Type II restriction endonucleases: a historical perspective and more[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(12): 7489-7527
- [16] Hendrickson WA, Ogata CM, Hendrickson W, Ogata C. Phase determination from multiwavelength anomalous diffraction measurements[J]. Methods in Enzymology, 1997, 276: 494-523
- [17] Hao Q, Zhang WZ. Crystal diffraction analysis method[J]. Modern Physics, 2014, 26(5): 17-21 (in Chinese)
郝权, 张蔚哲. 晶体衍射分析方法[J]. 现代物理知识, 2014, 26(5): 17-21
- [18] Ealick SE. Advances in multiple wavelength anomalous diffraction crystallography[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2000, 4(5): 495-499
- [19] Benvenuti M, Mangani S. Crystallization of soluble proteins in vapor diffusion for X-ray crystallography[J]. Nature Protocols, 2007, 2(7): 1633-1651
- [20] Walsh MA, Evans G, Sanishvili R, Dementieva I, Joachimiak A. MAD data collection: current trends[J]. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 1999, 55(Pt10): 1726-1732
- [21] Du Q, Chen YH, Zhang M. Preparation and crystal growth of *Arabidopsis thaliana* VSP₁ selenium protein derivatives[J]. Journal of Biology, 2011, 28(6): 23-25 (in Chinese)
杜清, 陈玉红, 张敏. 拟南芥 VSP₁ 硒代蛋白衍生物的制备和晶体生长[J]. 生物学杂志, 2011, 28(6): 23-25
- [22] He HZ, Shao Y, Chen YH, Liu BB, Cao ZB, Jiang F, Liu YW, Tang H, Liu JY, Zhao NM, et al. Preparation of the selenomethionine derivative of tabtoxin resistance protein[J]. Chinese Science Bulletin, 2001, 46(8): 662-666 (in Chinese)
何红珍, 邵煜, 陈宇航, 刘斌斌, 曹振波, 江凡, 刘一苇, 唐洪, 刘进元, 赵南明, 等. 硒代甲硫氨酸抗烟毒素蛋白衍生物的制备[J]. 科学通报, 2001, 46(8): 662-666
- [23] Stellmach V, Crawford SE, Zhou W, Bouck N. Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(5): 2593-2597