

# 嗜热嗜酸两面菌 S5 分子伴侣 $\beta$ 亚基的表达、 纯化和活性的初步分析\*

马 晴<sup>1</sup> 张渝英<sup>2\*\*</sup>

(北京师范大学生命科学学院 北京 100875)<sup>1</sup> (中国科学院微生物研究所 北京 100080)<sup>2</sup>

**摘要:** 用 *Nde*I 和 *Bam*HI 酶切回收嗜热嗜酸两面菌 S5 的分子伴侣  $\beta$  亚基基因片段插入 pET-23b 的相应位置, 并分别在 BL21 (DE3) 和 Rosetta-gami™ B (DE3) pLysS 中表达。表达的  $\beta$  亚基以可溶的形式存在。 $\beta$  亚基在 Rosetta-gami™ B (DE3) pLysS 中表达较高, 其占菌体总蛋白的 16.2%, 且以单体和聚体形式同时存在。表达的菌体经超声破碎、70℃ 热处理后, 上清中  $\beta$  亚基蛋白含量达到 30%, 再经  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沉淀、Bio-Gel A-1.5m 和 DEAE-Sephacrose CL-6B 柱层析, 得到在 SDS-PAGE 呈电泳均一的  $\beta$  亚基, Native-PAGE 表明其为聚体, 有弱的 ATPase 活性。

**关键词:** 嗜热嗜酸菌, 嗜热嗜酸两面菌, 分子伴侣,  $\beta$  亚基, ATPase

**中图分类号:** Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0028-04

## The Expression, Purification of Chaperonin $\beta$ Subunit from the Thermoacidophilic Archaeon, *Acidianus tengchongensis* and its Activity Analysis\*

MA Qing<sup>1</sup> ZHANG Yu-Ying<sup>2\*\*</sup>

(Life Science Institute, Beijing Normal University, Beijing 100875)<sup>1</sup>

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)<sup>2</sup>

**Abstract:** The fragment of pGEM-T easy $\beta$ , containing the gene of chaperonin subunit  $\beta$  of *Acidianus tengchongensis* strain S5, was inserted into the plasmid pET23b with *Nde*I and *Bam*HI, designated as pET23b $\beta$  and transformed into BL21 (DE3) or Rosetta-gami™ B (DE3) pLysS. The expressed protein was soluble. Expression of the subunit  $\beta$  was 16.2% of total cell proteins in Rosetta-gami™ B (DE3) pLysS and displayed both monomer and oligomer. The recombinant subunit  $\beta$  was purified by means of sonication, heating at 70℃ for 10 min, ammonium sulfate precipitation, chromatography on Bio-Gel A-1.5m and DEAE-Sephacrose CL-6B. The purified recombinant of subunit  $\beta$  displayed oligomer on native-PAGE and exhibited weak ATPase activity.

**Key words:** Thermoacidophilic archaeon, *Acidianus tengchongensis*, Chaperonin,  $\beta$  subunit, ATPase

分子伴侣 (Molecular chaperone), 其中有些也称为热休克蛋白 (heat-shock proteins, hsp) 或应激蛋白 (stress-shock protein), 是一类在体内能够帮助多肽折叠和非共价组装, 但并不参与成熟蛋白质组成的蛋白质<sup>[1]</sup>。近 10 年来, 由于分子伴侣和折叠酶的深入研究, 对蛋白质折叠机理的研究有了很大的进展。由于它们在细胞生命活动的各个层次上所起的重要作用, 又与一些疾病密切相关, 引起分子生物学家、生物化学家和结构生物学家们的关注。对它们的研究不但在生物进化及适

应环境方面都提供了理论依据, 而且在医学、基因工程及蛋白质工程等方面具有重要的理论意义和潜在的应用前景。chaperonin 是分子伴侣中的一类, 又称为 Hsp60。chaperonin 广泛存在于古细菌、细菌和真核生物中, 根据序列和结构上的差异, 可分为两个亚类, 亚类 I 存在于细菌和真核生物的线粒体、叶绿体中, 亚类 II 存在于古细菌和真核生物的胞质中<sup>[1]</sup>。

古细菌中的亚类 II 被命名为 thermosome 以突出它的热诱导性和极端耐热性<sup>[2]</sup>, 由于大量地培

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 3997003)

\*\* 通讯作者 Tel: 010 - 62626769, E-mail: zhangyy@sun.im.ac.cn

收稿日期: 2006-03-02, 修回日期: 2006-05-26

养极端嗜热古菌存在一定的困难,因此往往通过在大肠杆菌中表达以得到大量的研究材料,进行结构和功能的研究。

*Acidianus tengchongensis* 是从云南腾冲热泉分离得到极端嗜酸嗜热古菌<sup>[3]</sup>,现确定它为 *Acidianus* 的一个新种<sup>[4]</sup>。其在好氧 70℃ 和 pH2.5 条件下氧化硫元素为硫酸而获得能量进行自养生长,因此它在冶金、环保、酶工业等方面可能有重要的应用前景,目前 *Acidianus* 属的菌株中 chaperonin 的基因等方面的研究还未见报道。本实验室从 *Acidianus tengchongensis* 中已得到了完整的  $\beta$  亚基的基因<sup>[5]</sup> (GenBank 接受号为: AY223856)。本研究在大肠杆菌中表达 *Acidianus tengchongensis* 的  $\beta$  亚基,纯化了重组的  $\beta$  亚基,对其进行了初步研究,为进一步研究  $\beta$  亚基的性质及生物学功能打下了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种: *E. coli* DH5 $\alpha$  和 BL21 (DE3) 为本实验室保存。*E. coli* Rosetta-gami<sup>TM</sup> B (DE3) pLysS 为中国科学院微生物研究所杨克迁博士惠赠。

1.1.2 质粒: 质粒 pET-23b 及含  $\beta$  亚基的 pGEM-T easy  $\beta$  均为本实验室保存。

1.1.3 酶及化学试剂: 限制性内切酶为宝生物公司产品; T4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品; 蛋白胨、酵母提取物为 Oxoid 公司产品; 琼脂糖、丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺为 GIBCO BRL 公司产品; DEAE-Sephrose CL-6B 为 Pharmacia 公司产品, Bio-Gel A-1.5m 为 Bio-Rad 公司产品; SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质为中国科学院上海生物化学研究所产品; 其它试剂均为进口或国产分析纯试剂。

### 1.2 方法

1.2.1 质粒的提取、感受态细胞的制备与连接产物的转化参照文献[6]进行。

1.2.2  $\beta$  亚基在 BL21 (DE3) 中的表达: 取新鲜平板上的单菌落接种于 40mL 2 × YT 培养基 (含氨苄青霉素 75  $\mu$ g/mL) 中, 37℃ 培养至  $A_{600}$  约 0.6 时按 5% 的接种量转接新鲜培养基, 37℃ 培养至  $A_{600}$  约 0.6 时加 IPTG (终浓度为 0.4 mmol/L) 诱导 3h, 6,000 r/min 离心 10min 收集菌体。

1.2.3  $\beta$  亚基在 Rosetta-gami<sup>TM</sup> B (DE3) pLysS 中的表达: 取新鲜平板上单菌落接种于 2mL 2 × YT 培养基 (含氨苄青霉素 75  $\mu$ g/mL, 氯霉素 34  $\mu$ g/mL, 卡那霉素 15  $\mu$ g/mL, 四环素 12.5  $\mu$ g/mL), 37℃ 培养过夜后转接至 40mL 含 4 种抗生素的 2 × YT 培养基中 37℃ 培养。以后转接和诱导步骤同上。

1.2.4  $\beta$  基因表达产物的纯化及鉴定: 收集的菌体悬于缓冲液 A (20mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 5mmol/L EDTA, 5mmol/L MgCl<sub>2</sub>), 4℃ 超声破碎后, 10,000r/min 离心 40min。将上清液置 70℃ 保温 10min, 10,000r/min 离心 40min 后于上清中加 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 至 40% 饱和度。将硫酸沉淀的蛋白溶于缓冲液 A, 并在预先用缓冲液 A 平衡的 Bio-Gel A 1.5m 柱 (140cm × 0.8cm) 上层析, 经 10% SDS-PAGE 和 5% Native-PAGE 分析后合并所需样品。样品中加 PMSF (终浓度为 34  $\mu$ g/mL) 后, 在预先用含 34  $\mu$ g/mL PMSF 缓冲液 A (缓冲液 B) 平衡的 DEAE-Sephrose CL-6B 柱 (7cm × 1.6 cm) 上层析。分别用含 0.13 和 0.16mol/L NaCl 的缓冲液 B 洗脱, 电泳分析得到纯品。

1.2.5 ATPase 活力测定: 参照 Baykov 等的方法进行<sup>[7]</sup>。用孔雀石绿的方法测定释放的无机磷,  $A_{630}$  比色, 以 ATP 的自水解为对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 表达载体的构建

pET23b $\beta$  表达质粒的构建如图 1 所示。回收

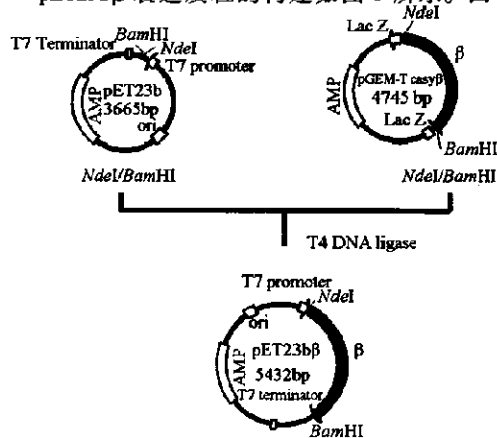


图1 pET23b $\beta$  的构建

pGEM-T easy  $\beta$  中  $\beta$  基因片段 (*NdeI/BamHI*) 插入 pET23b 相应酶切位点。图 2 是 pET23b $\beta$  的酶切鉴定。

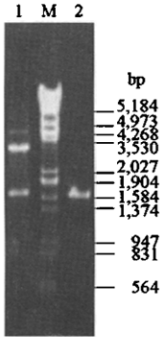


图 2 pET23b $\beta$  的酶切鉴定

1 pET23b $\beta$ /*NdeI + BamHI*, 2 回收的  $\beta$  亚基基因片段, M  $\lambda$ DNA/*EcoRI + HindIII*

2.2  $\beta$  亚基在 *E. coli* 中的表达

$\beta$  亚基在 BL21 (DE3) 中表达时, IPTG 诱导和不诱导对表达差别不大 (图 3, 通道 3 和 4), 且表达量低。而  $\beta$  亚基在 Rosetta-gami<sup>TM</sup> B (DE3) pLysS 中的表达时, 诱导和不诱导的差别显著 (图 3, 通道 10 和 11)。

$\beta$  亚基在 *E. coli* 中表达时以可溶的形式存在 (图 3, 通道 7 和 15), 70℃ 处理后相对含量提高 (表 1)。在 Rosetta-gami<sup>TM</sup> B pLysS 中经 IPTG 诱导表达的  $\beta$  亚基, 经 70℃ 处理后在 5% Native-PAGE

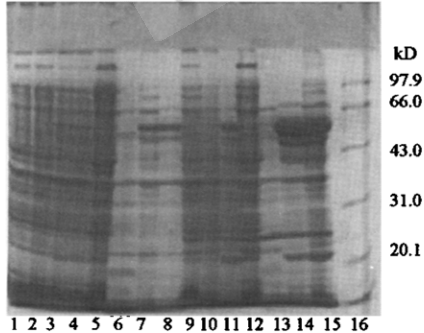


图 3  $\beta$  亚基在大肠杆菌中表达的 10% SDS-PAGE

1 未诱导的 pET23b, 2, 9 诱导的 pET23b, 3, 10 未诱导的 pET23b $\beta$ , 4, 11 诱导的 pET23b $\beta$ , 5, 12 诱导的 pET23b 超声上清, 6, 13 加热处理诱导的 pET23b 超声上清, 7, 15 诱导后的 pET23b $\beta$  超声上清, 8, 14 加热处理诱导的 pET23b $\beta$  超声上清, 16 分子量标准蛋白质, 其中 1~8 为在 BL21 (DE3) 中的表达, 9~15 为在 Rosetta-gami<sup>TM</sup> B (DE3) pLysS 中的表达

可以明显看到  $\beta$  聚体和单体的存在 (图 4A 通道 6), 但在 BL21 (DE3) 中表达的样品作同样处理无明显聚体存在 (图 4A 通道 3)。

表 1  $\beta$  亚基在不同受体菌中的表达情况

| 受体菌                                      | $\beta$ 亚基含量 (%) |       |             |
|--|------------------|-------|-------------|
|  | 占细胞总蛋白           | 占超声上清 | 占 70℃ 加热后上清 |
| BL21 (DE3)                               | 5.6              | 12.5  | 16.8        |
| Rosetta-gami <sup>TM</sup> B (DE3) pLysS | 16.2             | 20.2  | 31.2        |

2.3  $\beta$  亚基的纯化

由表 1 可知,  $\beta$  亚基在 Rosetta-gami<sup>TM</sup> B (DE3) pLysS 的表达量比在 BL21 (DE3) 中高约 10%, 故以在 Rosetta-gami<sup>TM</sup> B pLysS 中表达的  $\beta$  亚基作为纯化的起始材料。经 Bio-Gel A-1.5m 和 DE-AE-Sepharose CL-6B 层析后, 纯化的  $\beta$  亚基在 SDS-PAGE 呈分子量约为 60 kD 的单一条带 (图 4B 通道 1), 而在 5% Native-PAGE 的结果表明  $\beta$  亚基电泳迁移率比分子量为 798kD 的 GroEL (14 聚体) 要慢很多 (图 4A 通道 1 和 4), 用 HPLC 的分析表明, 纯化的重组  $\beta$  亚基在分子筛柱上的保留时间比 GroEL (14 聚体) 的保留时间要长 (结果未显示)。由此表明, 纯化所得的  $\beta$  亚基是聚体。

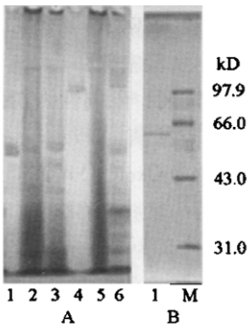


图 4 PAGE 分析纯化的  $\beta$  亚基

A: 5% Native-PAGE: 1 GroEL (14 聚体), 2 在 BL21 (DE3) 宿主表达的超声上清, 3 在 BL21 (DE3) 宿主表达热处理后的上清, 4 纯化的重组的  $\beta$  亚基, 5 在 Rosetta-gami<sup>TM</sup> B (DE3) pLysS 宿主表达的超声上清, 6 在 Rosetta-gami<sup>TM</sup> B (DE3) pLysS 宿主表达热处理后的上清

B: 10% SDS - PAGE: 1 重组的  $\beta$  亚基纯品, M 低分子量标准蛋白质

2.4  $\beta$  亚基聚体的 ATPase 活力

$\beta$  亚基聚体具有 ATPase 的活力, 最适反应温度为 75℃ (图 5)。不同离子对  $\beta$  亚基聚体的 AT-

Pase 活性的影响如图 6 所示, 在 100mmol/L  $MgCl_2$  存在时,  $\beta$  亚基聚体的 ATPase 活性很低, 当 100mmol/L  $K^+$  或  $NH_4^+$  存在时, ATPase 活力显著上升, 而 100mmol/L  $Na^+$  的存在对酶活没有影响。这与来自于 *Methanococcus maripaludis* 的 chaperonin 的 ATPase 性质基本一致<sup>[8]</sup>。

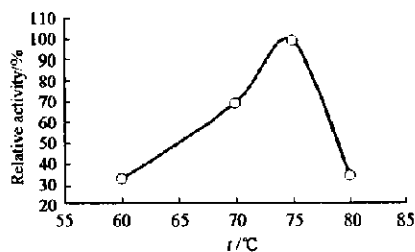


图 5 反应温度对  $\beta$  亚基聚体的 ATPase 活力的影响

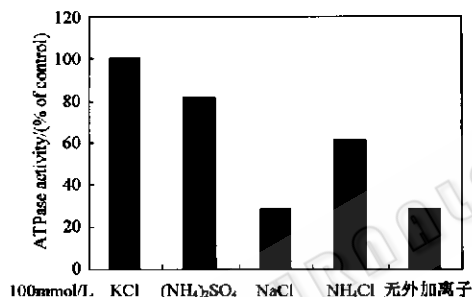


图 6 不同离子对  $\beta$  亚基聚体 ATPase 活力的影响

### 3 讨论

到目前为止, *Acidianus* 属的菌株中 chaperonin 的基因等方面的研究还未见报道。本文将 *Acidianus tengchongensis*  $\beta$  亚基的基因在大肠杆菌进行了表达。Rosetta-gami™ B (DE3) pLysS 受体菌通过一个相容性氯霉素抗性质粒补充密码子 AUA、AGG、AGA、CUA、CCC 和 GGA 的 tRNAs, 能明显增强带有大肠杆菌稀有密码子的真核蛋白在大肠杆菌中的表达。因此  $\beta$  亚基在 Rosetta-gami™ B (DE3) pLysS 中的表达较在 BL21 (DE3) 中表达

增加了约 8%。 $\beta$  亚基在 Rosetta-gami™ B (DE3) pLysS 表达时, 既有单体又有聚体。通过超声破碎、70°C 热处理、硫酸沉淀、Bio-Gel A-1.5m 及 DEAE-Sephars CL-6B 得到了纯化的重组  $\beta$  亚基聚体。

已有的研究表明, Chaperonin 的每个亚基分为 3 个结构域: 赤道结构域是结合和水解 ATP 的部位, 顶端结构域位于桶的顶端形成了空腔的开口部分, 负责与底物蛋白和辅助分子伴侣 GroES 的结合; 两者之间依靠中间结构域它作为可动的铰链 (mobile hinge)。ATPase 活力对分子伴侣活性是必须的, thermosome 结合和水解 ATP 需要  $Mg^{2+}$  的配合, 古细菌 thermosome 的 ATPase 活力有温度依赖性, 一般来说, ATPase 活力的上限是略低于其解离为单亚基的温度, 接近于有机体的最适生长温度。本文所纯化的重组  $\beta$  亚基聚体同样表现有弱的 ATPase 活性, 反应最适温度为 75°C, 略高于其最适生长的 70°C。重组的 *Acidianus tengchongensis*  $\beta$  亚基聚体的获得为深入研究其功能创造了有利条件。

### 参考文献

- [1] Frydman J. Annu Rev Biochem, 2001, 70: 603 ~ 649.
- [2] Phipps B M, Hoffmann A, Settle K O, et al. EMBO J, 1991, 10: 1711 ~ 1722.
- [3] 钟惠芳, 陈秀珠, 李雅芹, 等. 微生物学报, 1982, 22: 1 ~ 7.
- [4] 何正国, 李雅芹, 周培璋. 微生物学报, 2001, 41: 259 ~ 263.
- [5] 马 晴, 张瑜英. 微生物学通报, 2005, 32: 112 ~ 115.
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 著 (金冬雁等译). 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 1982.
- [7] Baykov A A, Evtushenko O A, Awaeva S M. Anal Biochem, 1988, 171: 266 ~ 270.
- [8] Kusmierczyk A, Martin J. FEBS Letters, 2003, 547: 201 ~ 204.