

分析超速离心研究多聚酸性氨基酸 对 SnRK2.6 的影响*

褚文丹 周翠燕 芦亚菲 徐扬 李文奇^{1)**}

(清华大学生命科学与医学研究院, 蛋白质研究技术中心, 北京 100084)

摘要 分析超速离心技术是一种通过检测分子在离心场作用下的沉降行为, 分析获得其沉降系数、扩散系数、流体力学半径、摩尔质量、结合常数等水力学和热力学性质的方法, 被广泛应用于蛋白质分子溶液性质的研究中. 本文利用分析超速离心技术研究了拟南芥 SnRK2.6(sucrose non-fermenting1-related protein kinase 2.6)末端一段多聚酸性氨基酸序列对其溶液性质的影响, 并将多聚酸性氨基酸序列 SnRK2.6(333~362)及人源 PDI(protein disulfide isomerase)(441~491)连接至拟南芥 PYL10 (PYR like protein 10)分子末端进行分析, 同时结合分子排阻层析和静态光散射技术, 研究了上述蛋白质分子的分子质量和聚合状态. 结果表明, 多聚酸性氨基酸序列可以引起蛋白质分子轴长比增加, 在溶液中运动时摩擦系数增加, 水合半径明显增大, 分子排阻层析洗脱体积明显变小.

关键词 分析超速离心, 分子排阻层析, 静态光散射, 蛋白质分子质量, 聚合状态

学科分类号 Q5

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0323

分析超速离心技术通过检测分子在离心场作用下的沉降行为, 可以分析获得分子的水力学和热力学性质^[1]. 20 世纪 20 年代初, Svedberg 设计发明了第一台分析超速离心机, 用来分析溶液中胶体的尺寸及其分布情况, 并因此获得了 1926 年的诺贝尔奖^[2]. 后来, 分析超速离心技术被广泛用于生物大分子, 尤其是蛋白质的分子质量、沉降系数、扩散系数、流体力学半径等性质的测定^[3]. 20 世纪 60~70 年代, 由于分析超速离心机体积庞大、操作及维护非常复杂、测量精度偏低, 以及其他技术如分子排阻层析、聚丙烯酰胺凝胶电泳等的出现, 分析超速离心机的使用受到了限制. 近年来, 随着新型分析超速离心机的出现、计算能力提高、理论模型的完善, 分析超速离心技术越来越成熟, 其在蛋白质研究中的应用如蛋白质分子质量精确测定、蛋白质分子构象变化、蛋白质分子相互作用、膜蛋白、不同制剂对蛋白质药物影响等方面的研究, 得到了极大的促进和发展^[4]. 溶液中蛋白质分子质量和聚合状态的测定方法主要有分析超速离心技术、多角度静态光散射技术和分子排阻层析技术, 其中

分析超速离心是通过蛋白质的沉降行为, 结合蛋白质和溶液的性质, 利用公式和计算推导出蛋白质的分子质量、沉降系数等, 得到的是蛋白质的绝对分子质量. 多角度静态光散射技术是通过样品分离过程中对紫外信号、光散射信号、示差信号的综合分析, 无需标准品作参照, 即可得到准确的样品分子质量及其分布. 分子排阻层析是根据样品的大小和形状对样品进行分离, 测定过程中需要用已知分子质量的标准品做标准曲线, 对于样品的形状、带电性等要求较高, 更适于近球形的蛋白质样品测定.

拟南芥 SnRK2.6 属于 SnRK 家族中 SnRK2 亚家族成员之一, 是 PYL 介导的脱落酸(abscisic acid, ABA)信号通路的关键组成, 由 362 个氨基酸组成^[5]. SnRK2.6 具有蛋白激酶典型的结构, 由蛋白激酶结构域(21~277)、渗透性刺激反应结构域

* 中国博士后科学基金面上资助项目(2014M550050).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62782031, E-mail: liwenqi@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2015-10-14, 接受日期: 2016-02-02

(283~317)和磷酸酶结合结构域(318~357)三个结构域组成. 结构生物学研究揭示了 SnRK2.6 蛋白激酶结构域和渗透性刺激反应结构域的三维结构^[6-7], 但还没有磷酸酶结合结构域的三维结构信息. 体外氢-氘交换实验表明, 磷酸酶结合结构域参与 SnRK 与 ABA 下游分子磷酸酶 PP2C 的相互作用^[8]. 功能研究发现, 删除这段序列对 SnRK2.6 的激酶活性影响不大, 但失去了 ABA 正向调节信号通路的功能. 序列分析发现, SnRK2.6 磷酸酶结合结构域, 特别是 SnRK2.6(333~362)这段序列, 富含酸性氨基酸 D/E. 由于磷酸酶结合结构域柔性比较大, 即使在 SnRK2.6-PP2C 复合物结构中, 仍然看不到其结构细节. 磷酸酶结合结构域如何与 PP2C 相互作用, 它对 SnRK2.6 整体构象有何影响, 仍然未知. PYL 家族蛋白是植物激素脱落酸(ABA)的受体, 是 ABA 信号通路的最为关键的信号识别组件, 在植物对抗外界各种不利环境过程中发挥着非常关键的作用, 其中 PYL10 是家族中以单体形式存在的蛋白, 可以在不结合 ABA 的情况下抑制 PP2C 的活性. 蛋白质二硫键异构酶(PDI)由 491 个氨基酸组成, 在蛋白质的折叠和二硫键的形成中起重要的作用, 在很长一段时间内被认为以二聚体形式存在, 直到 2005 年李升建等用分析超速离心技术和小角 X 射线散射技术证明在溶液状态下 PDI 蛋白呈单体状态, 推测与其 C 端(440~491)富含酸性氨基酸 D/E 有关.

本文利用分析超速离心技术测定了拟南芥蛋白 SnRK2.6 的分子质量、沉降系数、摩擦系数、简化椭球模型轴长比等参数, 研究了末端多聚酸性氨基酸序列对 SnRK2.6 溶液性质的影响. 在分子质量测定方面, 将分析超速离心技术与静态光散射、分子排阻层析两种方法进行了比较.

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

SnRK2.6、PYL10 质粒由清华大学颜宁实验室惠赠, PDI 质粒由中国科学院生物物理研究所王志珍实验室惠赠, 大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 和 BL21(DE3)均由本实验室制备.

1.2 酶与生化试剂

Trans 2K DNA 分子质量标准品购自 TransGen 公司; dNTP、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; 各种限制性内切酶购自 NEB 公司; 质粒小提试剂盒、普通 DNA 产物纯化试剂盒和 DNA 胶回收试

剂盒购自天根生化科技有限公司; DNA 聚合酶和蛋白质 Marker 为本实验室提取制备; GoldView 核酸染料购自赛百盛有限公司; BSA 标准品购自 Sigma 公司; 储液配制所需化学试剂购自国药集团化学试剂有限公司; Ni-NTA 柱材购自 Qiagen 公司; Source Q 和 Superdex 200 及分子筛标准品购自 GE 公司.

1.3 蛋白质表达与纯化

将含有目的基因的菌种接种至 100 ml 氨苄抗性 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 220 r/min 过夜培养; 以 1:100 左右的比例转接至 1 L 体系扩大培养 3~4 h, 加入 0.2 mmol/L IPTG, 22 $^{\circ}$ C 过夜诱导. 4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体后超声破碎, 14 000 r/min 离心 1 h, 除去细胞碎片取上清即为粗蛋白. 将粗蛋白与 Ni-NTA 充分结合, 用 20 mmol/L 咪唑、25 mmol/L Tris(pH 8.0)、150 mmol/L NaCl 淋洗液去除非特异性结合的杂蛋白, 再用 250 mmol/L 咪唑、25 mmol/L Tris(pH 8.0)、150 mmol/L NaCl 洗脱液对目的蛋白进行洗脱. 将洗脱液上样至 Source Q 离子交换色谱柱, 使用低盐与高盐溶液梯度洗脱的方式, 去除杂蛋白, 提纯目的蛋白; 结合紫外吸收峰位置及 SDS-PAGE 结果将目的蛋白用 Centricon 浓缩至 1.5 ml 左右, 加入 100 μ l Driace 酶, 18 $^{\circ}$ C 酶切 2 h 去除 His 标签, 最后用 Superdex 200 色谱柱将切掉标签的目的蛋白进一步纯化, 结合紫外吸收峰位置及 SDS-PAGE 结果得到最终纯化的目的蛋白备用.

1.4 Bradford 法蛋白质定量

将考马斯亮蓝 G-250 储液稀释 5 倍, 摇匀备用. 移取 1 ml 稀释液于 1.5 ml 离心管中, 根据蛋白质溶液的浓度加入 1~20 μ l 蛋白溶液并混合均匀. 室温静置 1 min 后, 以考马斯亮蓝 G-250 稀释液为参比, 在 595 nm 记录吸光度数值. 最后通过公式计算蛋白质溶液的浓度, 重复测定 5 次, 取平均值即为蛋白质实际浓度, 计算公式如下:

$$\rho(\text{蛋白质})/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})=25\cdot A_{595}/(V/\mu\text{l})$$

1.5 分子排阻层析分析

将 Superdex 200 色谱柱用 25 mmol/L Tris (pH 8.0)、150 mmol/L NaCl 缓冲液平衡, 分别将蛋白质标准品 (6、43、75 和 158 ku) 以 500 μ l 的体积上样, 流速 0.5 ml/min, 限压 1.2 MPa, 记录洗脱体积, 以蛋白质分子质量对数为横坐标, K_{av} 为纵坐标, 建立标准曲线. 将分离纯化得到的目的蛋白用 Bradford 法定量至 1.0 g/L, 上样 500 μ l, 以相

同的实验程序进行分子排阻层析, 记录目的蛋白洗脱体积, 收集紫外吸收峰位置样品, 0.5 ml/管, 根据标准曲线计算蛋白质分子质量, 并对收集的样品进行 SDS-PAGE 分析.

比较 pH 值对 SnRK2.6 及 SnRK2.6 (1~332) 洗脱体积的影响, 分别用 pH 6.5 的 MES 缓冲液、pH 7.5 的 HEPES 缓冲液、pH 8.5 和 pH 9.4 的 Tris-HCl 缓冲液对 Superdex 200 色谱柱进行平衡, 取浓度为 1.0 g/L 的 SnRK2.6 及 SnRK2.6(1~332) 蛋白进行分子排阻层析分析, 记录每个蛋白在不同 pH 条件下的洗脱体积.

1.6 静态光散射分析

采用美国 Wyatt 公司的 DAWN HELEOS 18 角度静态光散射仪与 AKTA purifier 10 系统联用, 使用怀雅特公司的 WTC-030S5 色谱柱, 将 pH 8.0 25 mmol/L 的 Tris 缓冲液经 0.1 μm 滤膜进行抽滤, 以 0.5 ml/min 的流速进行柱平衡至光散射信号 < 0.0005, 然后将 2 g/L 的 BSA 标品用 100 μl 的上样环上样, 0.5 ml/min 的流速, 数据采集 30 min, 通过结果分析检测仪器状态^[9]. 将目的蛋白浓度调整至 1.0 g/L, 以相同程序进行实验, 利用 ASTRA6.1 软件对光散射信号、紫外信号和 dn/dc 值分析得到蛋白质分子质量.

1.7 分析超速离心分析

采用美国 Beckman 公司的分析超速离心机 ProteomeLab XL-I, 调整样品浓度至 $A_{280} = 0.8$, 缓冲液成分为 pH 8.0, 25 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 用 2 孔铝合金中心件和蓝宝石窗口组成的样品池将样品、对照液分别上样 396 μl 和 400 μl , 选择 An-50 Ti 的 8 孔转头在 20°C 50 000 r/min 的条件下进行沉降速率实验, 选择紫外吸收波长为 280 nm, 编辑实验方法: 先进行基础校准(radical calibration), 再进行实验扫描, 每 6 min 采集一次数据. 观察扫描数据, 待样品全部离心至样品池底部时停止扫描, 收集数据^[10]. 运用 SEDFIT(14.4f 版)软件对得到的数据进行分析, 依次进行数据导入、边界选定、Modle 选择、参数设定, 经运算和拟合, 最终得到蛋白质分子质量、沉降系数、摩擦系数比、水合半径、轴长比等信息^[11].

2 结 果

2.1 蛋白质表达与纯化

将 SnRK2.6、SnRK2.6(1~332), PYL10 的基因, 连接至表达载体 pET15D. 通过搭桥 PCR 的

方法将 SnRK 末端 30 个氨基酸对应的核酸序列 (LDIDDDMEEDLESDDLDDLDIDSSG EIVYAM, D/E 含量达 46.7%) 以及 PDI 末端 50 个氨基酸对应的核酸序列 (GERTLDGFKKFLSEGGQDGAGDDDDL - EDLEEAEPPDMEEDDDQKAVKDEL, D/E 含量达 46.7%), 分别连接至 PYL10 的 C 端, 并将嵌合基因连接至表达载体 pET15D. 将上述表达载体转化大肠杆菌 BL21, 通过诱导表达, 离心破碎以及亲和层析、离子交换、分子筛三步纯化, 得到纯度较高的全长蛋白 SnRK2.6、PYL10, 截短体蛋白 SnRK2.6(1~332), 嵌合体蛋白 PYL10-SnRK(333~362)、PYL10-PDI(441~491). 所有蛋白均在离子交换层析后, 通过 Dince 蛋白酶切去除 His 标签. 聚丙烯酰胺凝胶电泳显示蛋白质纯度均大于 95% (图 1), 适合进行下一步实验.

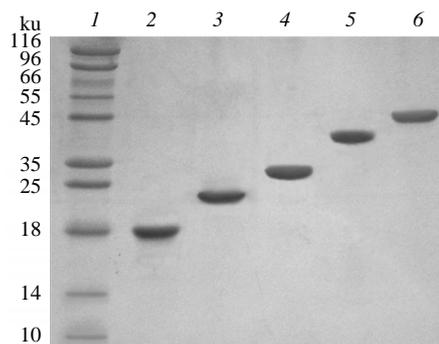


Fig. 1 Analysis of the purified proteins by SDS-PAGE

The purified proteins were subjected to 15% SDS-PAGE. Lane 1: Protein marker; Lane 2: The purified protein of PYL10; Lane 3: The purified protein of PYL10-SnRK2.6 (333~362); Lane 4: The purified protein of PYL10-PDI (440~491); Lane 5, 6: The purified protein of SnRK 2.6 (1~332) and SnRK 2.6, SDS-PAGE result shows that all these proteins purity are over 95%.

2.2 分子排阻层析分析 SnRK2.6 及 SnRK2.6 (1~332)

将经过亲和层析、离子交换层析、分子筛三步纯化法得到的全长蛋白 SnRK2.6, 以及截短体蛋白 SnRK2.6(1~332), 通过 Bradford 法定量至 1 g/L, 上样 0.5 ml 至 Superdex 200 色谱柱进行分子排阻层析分析, 确定全长蛋白及截短体蛋白的洗脱体积分别为 14.3 ml 和 15.5 ml. 通过蛋白质分子质量标准品实验得到的标准曲线对 SnRK2.6 和 SnRK2.6 (1~332) 蛋白进行计算, 得到蛋白质分子质量分别

为 78.7 ku 和 44.0 ku, 表明全长蛋白 SnRK2.6 以二聚体形式存在, 而截短体蛋白 SnRK2.6(1~332) 近似以单体形式存在.

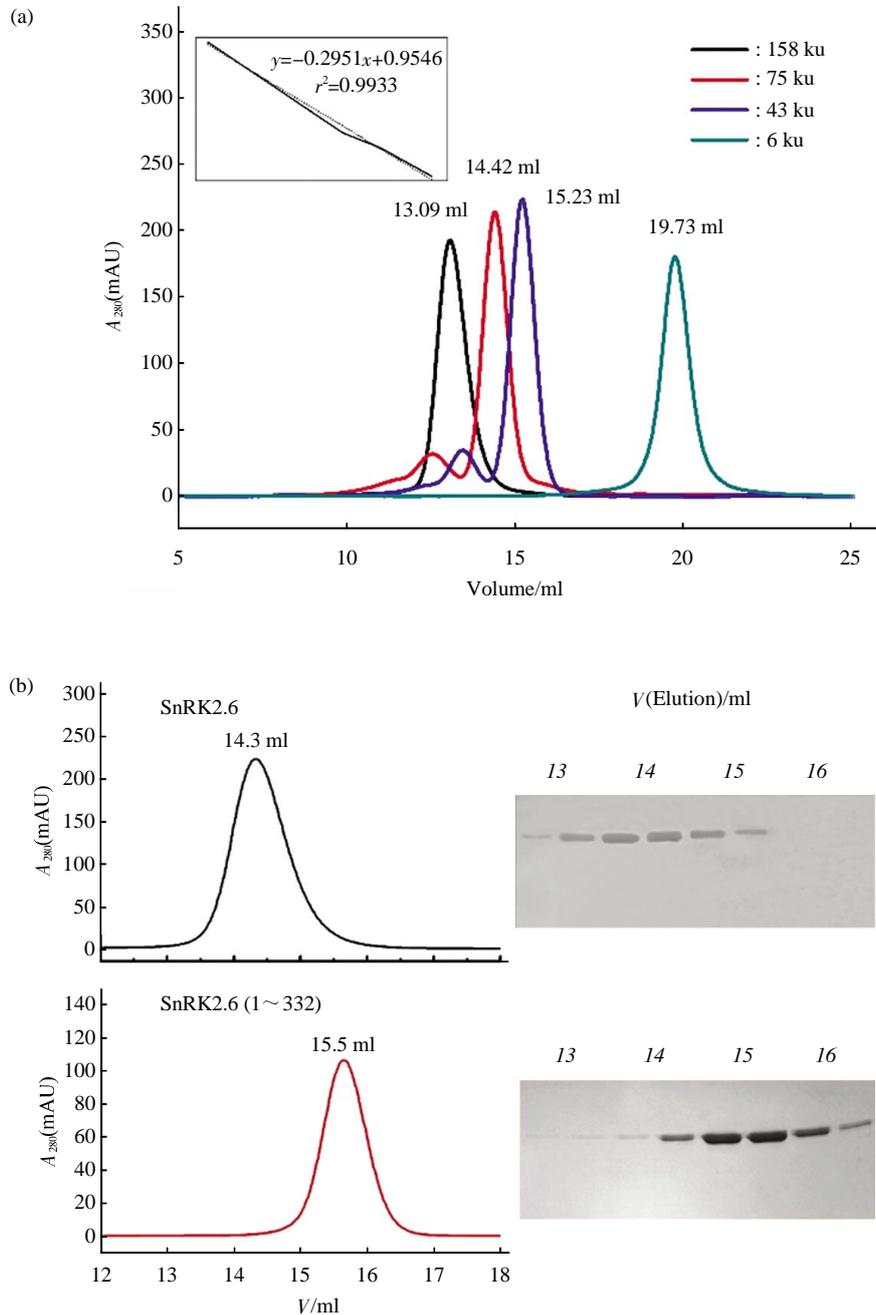


Fig. 2 SEC analysis of SnRK2.6 and SnRK2.6 (1~332)

(a) Standard proteins on Superdex 200. Each protein was loaded on Superdex 200 at the flow rate of 0.5 ml/min with 500 μ l. The standard curve regression linear equation of the method was: $y = -0.2951x + 0.9546$, the linear coefficient was 0.9933. (b) The analysis of SnRK2.6 and SnRK2.6(1~332) by SEC and SDS-PAGE shows that the elution volume of SnRK2.6(1~332) is larger than SnRK2.6. After calculated, the MW of SnRK2.6 is 78.7 ku, close to dimer, while the MW of SnRK2.6(1~332) is 44.1 ku, close to monomer.

2.3 静态光散射分析 SnRK2.6 及 SnRK2.6 (1~332)

使用 Wyatt 公司的 18 角度静态光散射仪与 AKTA purifier 10 系统联用, 采用怀雅特公司的

WTC-030S5 色谱柱, 首先对标准样品 BSA 进行实验, 经 0.5 ml/min 的流速, 30 min 采集数据后用软件分析得到 BSA 的拟合分子质量为 65.8 ku(理论分子质量为 66.7 ku), 证明仪器和色谱柱状态良好.

然后将分离纯化得到的全长蛋白 SnRK2.6 和截短体蛋白 SnRK2.6(1~332)定量至 1 g/L, 依次使用相同的程序进行实验及分析, 得到全长蛋白 SnRK2.6 和截短体蛋白 SnRK2.6(1~332)的拟合分子质量分别为: $(40.6 \pm 5.0\%)$ ku 和 $(37.5 \pm 4.4\%)$ ku, 与单体蛋白的理论分子质量非常接近, 说明蛋白在该状态下均以单体形式存在, 这与 2.2 中得到的结论并不相符, 因此我们进一步进行了蛋白质溶液状态下的分析超速离心实验.

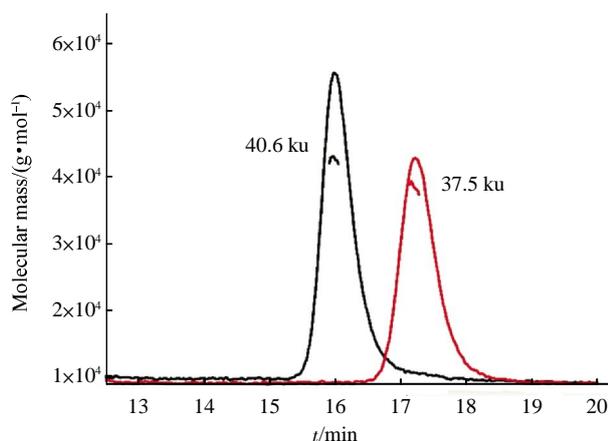


Fig. 3 MALLS-SEC analysis of SnRK2.6 and SnRK2.6 (1~332)

The concentration of the sample was 1 g/L, 500 μ l of the sample were injected onto WTC-030S5 column (Wyatt) at pH 8.0, 25 mmol/L Tris-HCl and 150 mmol/L NaCl at a flow rate of 0.5 ml/min. Analyzed by MALLS-SEC the MW of SnRK2.6 and SnRK2.6 (1~332) are 40.6 ku and 37.5 ku. —: SnRK2.6 (1~362); —: SnRK2.6 (1~332).

2.4 分析超速离心分析 SnRK2.6 及 SnRK2.6 (1~332)

采用美国 Beckman 公司的分析超速离心机 ProteomeLab XL-I, 选择 280 nm 波长对样品进行检测, 全长蛋白 SnRK2.6 和截短体蛋白 SnRK2.6 (1~332)的吸光度均在 0.8 左右, 50 000 r/min 离心 8 h 样品全部沉降于样品池底部, 收集数据, 用

SEDFIT(14.4f 版)软件进行分析. 首先导入数据, 将每个样品的全部 80 个扫描结果每隔 1 个选作处理对象, 合计导入 40 个扫描结果, 然后选定边界, 以空气与样品的界面为 meniscu 并进行拟合, 以 7.15 mm 处为 bottom, 选择 C(S)模型, 设定实验参数 resolution 为 150, 沉降系数范围 1~10, 同时拟合 RI 和 TI 噪音, 设定可信度 $F=0.68$, 最后进行计算和拟合, 拟合结果 RMSD 在 0.006 左右 (小于 0.01), Runs test Z 在 2~3 之间 (远小于 30), 说明拟合结果真实可靠. 最终得到全长蛋白 SnRK2.6 和截短体蛋白 SnRK2.6 (1~332)的沉降系数分别为: 2.83S 和 2.9S, 拟合分子质量分别为: 43.9 ku 和 37.0 ku, 与理论分子质量比较得到 2 个蛋白质在溶液状态下均以单体状态存在, 与 SLS 得到的结论一致. AUC 实验同时得到了蛋白质的摩擦系数、水合半径以及轴长比等信息, 从蛋白质水力学性质方面解释了分子排阻层析方法计算分子质量误差的来源.

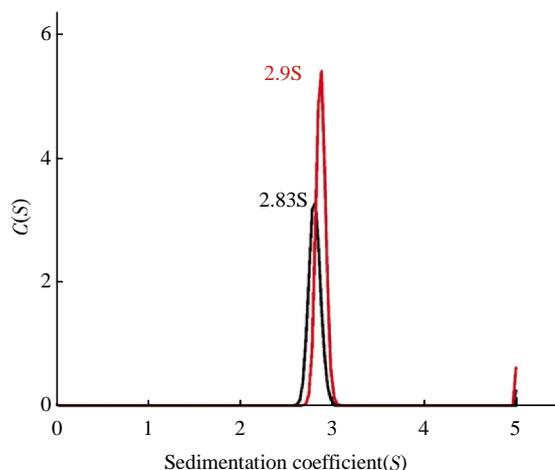


Fig. 4 AUC analysis of SnRK2.6 and SnRK2.6 (1~332)
Sedimentation-velocity analysis of SnRK2.6 and SnRK2.6 (1~332) by AUC. Absorbance of samples at 280 were about 0.8. Sedimentation coefficients of SnRK2.6 and SnRK2.6 (1~332) are 2.9S and 2.83S respectively. —: SnRK2.6; —: SnRK2.6 (1~332).

Table 1 Hydrodynamic parameters of SnRK2.6 and SnRK2.6 (1~332)

Protein	MW Theoretical/ku	MW AUC/ku	Sedimentation coefficient (S)	Frictional ratio (f/f_0)	Stokes Radius/nm	a/b (oblate)	a/b (prolate)
SnRK2.6	41.22	43.9	2.83	1.58	3.69	8.42	7.60
SnRK2.6 (1~332)	37.88	37.0	2.90	1.38	3.04	5.02	4.68

2.5 pH 值对 SnRK2.6 及 SnRK2.6 (1~332) 洗脱体积的影响

将分离纯化得到的全长蛋白 SnRK2.6 和截短体蛋白 SnRK2.6(1~332)定量至 1 g/L, 上样 500 μ l 至 Superdex 200 色谱柱进行分子排阻层析分析, 选择 4 种不同 pH 的缓冲液进行实验, 得到全长蛋白和截短体蛋白在 pH 6.5、7.5、8.5、9.4 的条件下洗脱体积如图 6 所示. 全长蛋白 SnRK2.6 在不同 pH 条件下依次为: 14.77、14.43、14.27 和 14.24 ml, 呈逐渐减小的趋势, 而截短体蛋白 SnRK2.6(1~332)在不同 pH 条件下洗脱体积依次为: 15.67、15.67、15.56 和 15.48 ml, 变化趋势并不明显.

2.6 综合分析 PYL10、PYL10-SnRK2.6(333~362)、PYL10-PDI(441~491)

将分离纯化得到的全长蛋白 PYL10、嵌合体蛋白 PYL10-SnRK2.6(333~362)和 PYL10-PDI(441~491)用 Bradford 法定量至 1 g/L, 依次通过 Superdex 200 色谱柱进行分子排阻层析分析, 根据洗脱体积和分子筛标准曲线计算分子质量. 使用 18 角度静态光散射仪与 AKTA purifier 10 系统联用进行静态光散射分析, 综合紫外信号、光散射信号和 dn/dc 值计算样品绝对分子质量. 采用分析超速离心机 ProteomeLab XL- I 进行沉降速率实验, 用与处理 SnRK2.6 蛋白相同的方法进行处理, 得到蛋白质分子质量、沉降系数、摩擦系数比、水合半径、轴长比等信息, 详见表 2.

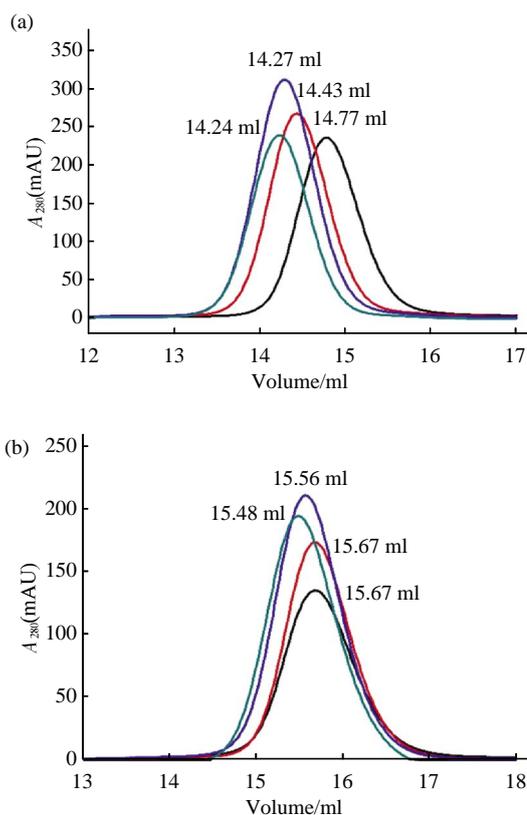


Fig. 5 SEC chromatograms of SnRK2.6 and SnRK2.6 (1~332) at different pH

(a) Elution volume of SnRK2.6 decreases with increasing solution pH on Superdex 200 in Size exclusion chromatography experiment. Buffers with different pH are MES pH 6.5, HEPES pH 7.5, Tris pH 8.5 and Tris pH 9.4. (b) Different solution pH do not influence elution volume of SnRK2.6 (1~332) distinctly on Superdex 200 in size exclusion chromatography experiment. —: MES pH 6.5; —: HEPES pH 7.5; —: Tris pH 8.5; —: Tris pH 9.4.

Table 2 Hydrodynamic parameters of PYL10 and chimeric proteins

Protein	MW Theoretical/ku	MW SLS/ku	MW AUC/ku	MW SD200/ku	Sedimentation coefficient (S)	Frictional ratio (f/f_0)	Stokes radius/nm	a/b	
								(Oblate)	(Prolate)
PYL10	20.6	22.0	19.7	29.1	2.10	1.25	2.24	3.18	3.05
PYL10-SnRK2.6 (333~362)	24.2	24.2	25.2	52.9	2.11	1.47	2.85	6.44	5.9
PYL10-PDI (441~491)	26.4	27.2	27.1	66.7	2.12	1.53	3.05	7.57	6.87

3 讨 论

分子排阻层析是一种利用被分离蛋白质分子质量的差异进行分离的层析技术, 经常被用来测定蛋白质分子的聚合状态. 通过与蛋白质标准的洗脱体积比较, 分析获得目的蛋白溶液状态下的分子质量, 与单体分子质量比较得到蛋白质分子在溶液中

的聚合状态. 本文研究发现, SnRK2.6 分子排阻层析的洗脱体积位于二聚体洗脱体积的位置. 而分析超速离心技术 - 沉降速率法以及多角度静态光散射法均表明, SnRK2.6 在溶液中以单体形式存在. 进一步研究表明, SnRK2.6 末端序列(333~362, 氨基酸序列为 LDIDDDMEEDLES DLDDLDIDSSGE-IVYAM, D/E 比例为: 46.7% 造成了 SnRK2.6 分

子排阻层析行为的异常,以单体形式存在 SnRK2.6 的洗脱体积明显小于理论出峰位置. 2006 年,李升建等^[12]发现, PDI 末端序列(441~491, 氨基酸序列为 GERTLDGFKKFLESGGQDGAGDDDDLEDL-EEAEPEPMEEDDDQKAVKDEL, D/E 比例为: 52.5%)使得 PDI 在分子筛上在二聚体位置洗脱, α -Synuclein 末端序列使得 α -Synuclein 在三聚体位置洗脱; 李等分别将 PDI 和 α -Synuclein 末端两段序列, 连接至球形蛋白 Thioredoxin 后面, 使得嵌合体蛋白的洗脱位置前移. PYL10 是 ABA 信号通路中 SnRK 的上游分子, 结构已被报道, PYL10 在溶液中以单体形式存在, 为准球形蛋白分子^[13]. 我们将 SnRK2.6、PDI 末端富含酸性氨基酸序列连接至球形蛋白 PYL10 末端, 通过分析超速离心和静态光散射的结果可以看到, 嵌合体蛋白 PYL10-SnRK2.6 (333~362) 和 PYL10-PDI (441~491) 在溶液中是以稳定的单体形式存在, 而通过分子排阻层析分析得到的蛋白质分子质量明显偏大, 近似二聚体, 与上文中分析的 SnRK2.6 蛋白表现的规律一致, 多聚酸性氨基酸序列使得嵌合体蛋白洗脱位置明显前移. 分子排阻层析测定蛋白质分子质量的理论基础, 是基于蛋白质分子形状为球形且水合度一样, 由于蛋白质分子的氨基酸组成、三维结构等差异, 蛋白质分子形状及水合度可能存在较大差异. 对于非球形蛋白质分子或者水合度变化较大的分子, 若利用标准球形分子标定的曲线来计算其分子质量, 可能存在较大误差. 通过本文对 SnRK2.6 的研究, 以及文献中关于 PDI^[14], α -Synuclein^[15] 和 Securin^[16] 等的研究表明, 利用分子排阻层析法判断蛋白质分子在溶液中的聚合状态, 需要非常谨慎.

序列比对分析发现, SnRK2.6、PDI、 α -Synuclein 的末端有个共同特点, 都富含酸性氨基酸 D 或 E. 是不是带负电荷的 D 和 E 引起其分子排阻层析行为的异常, 又是如何引起的, 带着这个疑问我们进行深入地分析研究. 氨基酸所带电荷随着 pH 改变而改变, SnRK2.6 等电点为 4.8, 当 pH 大于 4.8 时 SnRK2.6 净带负电荷, pH 越高, SnRK2.6 所带负电荷越多. 为了研究是否所带电荷的多少引起了 SnRK2.6 的分子排阻层析行为异常, 我们测定了不同 pH 值缓冲液条件下, SnRK2.6 及 SnRK2.6(1~332) 的洗脱体积. 结果发现, pH 变化对 SnRK2.6 的洗脱体积影响很大, 而对去掉末端酸性氨基酸序列的截短体蛋白 SnRK(1~332) 的洗

脱体积影响很小. pH 从 6.5 变化为 8.5 时, SnRK2.6 的洗脱体积减少 0.5 ml, 而截短体蛋白 SnRK2.6(1~332) 的洗脱体积仅减少 0.1 ml. 分析认为, 带负电荷的氨基酸残基之间由于电荷排斥作用, 不容易堆积在一起, 柔性增加; 同时, 随着蛋白分子所带电荷越多, 其水合化程度越高, 在溶液中的水合半径也越大, 即蛋白质分子体积增大, 因此洗脱体积靠前.

分析超速离心-沉降速率法通过检测分子在离心场作用下的沉降行为, 可以分析获得其沉降系数 S 、摩擦系数 f/f_0 , 水合半径 R_h 、简化椭球模型中的轴长比 a/b 等水力学性质, 我们利用沉降速率法测定了 SnRK2.6, SnRK2.6(1~332) 上述参数. 结果显示, 与全长蛋白相比, 截掉 C 端富含 D/E 区域后, 截短体 SnRK2.6(1~332) 的摩擦系数、水合半径 R_h 、简化椭球模型中的轴长比 a/b 均明显减小, 沉降系数几乎没有变化, 说明 C 端这段序列比 SnRK2.6 其他序列的柔性更大、水合化程度更高. 我们将 SnRK2.6 末端富含酸性氨基酸的序列连接至 PYL10 末端, 得到嵌合体蛋白 PYL10-SnRK2.6(333~362) 并进行沉降速率分析, 结果发现, SnRK2.6(333~362) 这段序列使得 PYL10 的摩擦系数 f/f_0 增加 0.22、水合半径 R_h 增加 0.61 nm、简化扁平椭球模型轴长比 a/b 增加 3.26、简化扁长椭球模型轴长比 a/b 增加 2.95、洗脱体积减小 1.0 ml, 而沉降系数几乎没有变化. 将 PDI 末端富含酸性氨基酸的序列连接至 PYL10 末端, 得到类似的结果. 因此, 末端多聚酸性氨基酸序列(333~362) 不仅改变了 SnRK2.6 水力学性质, 也能改变其他蛋白质分子的水力学性质.

拟南芥 SnRK 家族分为 SnRK1、SnRK2 和 SnRK3 三个亚家族. 序列分析发现, SnRK2 亚家族 10 个成员 C 端均富含酸性氨基酸序列(图 6), 而 SnRK1 和 SnRK3 亚家族成员 C 端序列则没有这个特点, 本文第一次发现了 SnRK2 亚家族末端富含酸性氨基酸的共性. 文献报道称, SnRK2 家族在植物抗逆中发挥重要作用^[6], SnRK2 末端序列参与了和 PP2C 的相互作用^[8], 逆境条件会造成植物胞内 pH 变化^[17]. 本文研究表明, pH 变化会引起末端序列富含多聚酸性氨基酸的 SnRK2 水力学性质的明显变化, 上述变化能否引起 SnRK2 与 PP2C 的相互作用的改变, 这种特性是否在植物抗逆中发挥作用, 有待更深入的研究.

SnRK2.6(333~362) LDIDDDMEEDLESDDLDDIDSSGEIVYAM
 SnRK2.1(316~353) DEEEEDVEAEVEEEEDDEDEYKHKVKEAQSCQESDKA
 SnRK2.2(333~362) DNLDLDDDDMDDFDSESEIDVDSSGEIVYAL
 SnRK2.3(334~360) SDDEYMDDLDSSELEVDSSGEIVYAM
 SnRK2.4(332~371) EEDAEDVEEEEEVEEEEDDEDEYDKTVKEVHASGEVRIS
 SnRK2.5(313~360) DDDEEDVEDEVEEEEEEEEEEEEEEEDEYKHKVKEAHSCQEPKKA
 SnRK2.7(319~350) DGSIDLDDIDDADIYDDVDDDEERNRNGDFVCAL
 SnRK2.8(316~353) DEEEEDVEAEVEEEEDDEDEYKHKVKEAQSCQESDKA
 SnRK2.9(317~339) DKKDDDEEYLDANDEEWYDDYA
 SnRK2.10(318~361) EDAEGKEEDAEEVEVEEEEDDEDEYDKTVKQVHASMGEVRVS

Fig. 6 Sequences of SnRK2 subfamily proteins

Sequences analysis revealed that c-terminus of SnRK2 subfamily proteins is rich in acidic amino acids Aspartic (D) and Glutamic acid (E).

本文研究表明, 分子排阻层析法测定溶液中蛋白质的分子质量及聚合状态具有一定的局限性, 应该更多地使用分析超速离心法或多角度静态光散射法。多聚酸性氨基酸序列可以引起蛋白质分子运动时的摩擦系数、水合半径、简化椭球模型轴长比明显增大, 分子排阻层析洗脱体积明显变小。然而, 多聚酸性氨基酸序在蛋白质分子进化过程中是否保守, 水力学性质的变化对蛋白质分子的功能是否产生影响, 多聚碱性氨基酸 K/R 对蛋白质分子是否有类似的影响, SnRK2 亚家族末端富含酸性氨基酸序列是否具有其他生物学意义, 都有待进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Zhao H, Brautigam C A, Ghirlando R, *et al.* Overview of current methods in sedimentation velocity and sedimentation equilibrium analytical ultracentrifugation//Coligan J E, *et al.* Current Protocols in Protein Science. USA: John Wiley & Sons, 2013: Chapter 20
- [2] Cole J L, Hansen J C. Analytical ultracentrifugation as a contemporary biomolecular research tool. *Journal of Biomolecular Techniques: JBT*, 1999, **10**(4): 163-176
- [3] Brown P H, Balbo A, Schuck P. On the analysis of sedimentation velocity in the study of protein complexes. *European Biophysics Journal: EBJ*, 2009, **38**(8): 1079-1099
- [4] Schuck P. Analytical Ultracentrifugation as a tool for studying protein Interactions. *Biophysical Reviews*, 2013, **5**(2): 159-171
- [5] Halford N G, Hey S J. Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *The Biochemical Journal*, 2009, **419**(2): 247-259
- [6] Soon F F, Ng L M, Zhou X E, *et al.* Molecular mimicry regulates ABA signaling by SnRK2 kinases and PP2C phosphatases. *Science*, 2012, **335**(6064): 85-88
- [7] Umezawa T, Sugiyama N, Mizoguchi M, *et al.* Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(41): 17588-17593
- [8] Nakashima K, Fujita Y, Kanamori N, *et al.* Three *Arabidopsis* SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant & Cell Physiology*, 2009, **50**(7): 1345-1363
- [9] Ahrer K, Buchacher A, Iberer G, *et al.* Detection of aggregate formation during production of human immunoglobulin G by means of light scattering. *Journal of Chromatography A*, 2004, **1043**(1): 41-46
- [10] Brown P H, Schuck P. Macromolecular size-and-shape distributions by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. *Biophysical Journal*, 2006, **90**(12): 4651-4661
- [11] Gabrielson J P, Arthur K K. Measuring low levels of protein aggregation by sedimentation velocity. *Methods*, 2011, **54**(1): 83-91
- [12] Li S J, Hong X G, Shi Y Y, *et al.* Annular arrangement and collaborative actions of four domains of protein-disulfide isomerase: a small angle X-ray scattering study in solution. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, **281**(10): 6581-6588
- [13] Hao Q, Yin P, Li W, *et al.* The molecular basis of ABA-independent inhibition of PP2Cs by a subclass of PYL proteins. *Molecular Cell*, 2011, **42**(5): 662-672
- [14] Solovyov A, Gilbert H F. Zinc-dependent dimerization of the folding catalyst, protein disulfide isomerase. *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, 2004, **13**(7): 1902-1907
- [15] Huang C, Ren G, Zhou H, *et al.* A new method for purification of recombinant human alpha-synuclein in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 2005, **42**(1): 173-177
- [16] Sanchez-Puig N, Veprintsev D B, Fersht A R. Human full-length Securin is a natively unfolded protein. *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, 2005, **14**(6): 1410-1418
- [17] Wilkinson S, Corlett J E, Oger L, *et al.* Effects of xylem pH on transpiration from wild-type and flacca tomato leaves. A vital role for abscisic acid in preventing excessive water loss even from well-watered plants. *Plant Physiology*, 1998, **117**(2): 703-709

Analytical Ultracentrifugation Reveals Poly Acidic Amino Acids Sequence Alters Hydrodynamic Properties of SnRK2.6*

CHU Wen-Dan, ZHOU Cui-Yan, LU Ya-Fei, XU Yang, LI Wen-Qi**

(School of Biomedicine in Tsinghua University, National Protein Science Facility, Beijing 100084, China)

Abstract Analytical ultracentrifugation has been utilized to capture the motion of macromolecules in centrifugation field, and is widely applied in assessing protein properties in solution, especially sedimentation coefficient, diffusion coefficient, Stokes radius, molecular mass, and hydrodynamic and thermodynamic parameters, including binding affinity. Utilizing analytical ultracentrifugation, we analyzed the impact of poly acidic amino acids sequence on SnRK2.6's hydrodynamic properties. Chimeric proteins are engineered which combine full length PYL10 and c-terminal poly acidic amino acids sequence of SnRK2.6(333~362) or PDI(441~491). Simultaneously, molecular mass and aggregative state of these proteins were analyzed and calculated by size exclusion chromatography and static light scattering. We demonstrate addition of this sequence leads to increase of Stokes radius, axial ratio, friction ration, and decrease of elution volume on size exclusion chromatography.

Key words analytical ultracentrifugation, size exclusion chromatography, static light scattering, protein molecular mass, oligomerization state

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0323

*This work was supported by a grant from China Postdoctoral Science Foundation (2014M550050).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62782031, E-mail: liwenqi@mail.tsinghua.edu.cn

Received: October 14, 2015 Accepted: February 2, 2016