



生物素化 ATP 硫酸化酶的表达、固定化与应用 *

邹秉杰^{1,2)**} 罗娟^{1)**} 武海萍¹⁾ 周国华^{1,3)***}

(¹⁾华东医学生物技术研究所, 南京 210002; ²⁾中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009; ³⁾南京大学医学院, 南京 210093)

摘要 现代大规模焦测序技术的产生是 DNA 测序技术的一次革命, 其关键技术之一是得到高活性的、固定于磁性微球表面的 ATP 硫酸化酶. 生物素化的 ATP 硫酸化酶可以通过生物素与亲和素之间的特异结合特性固定在包被亲和素的磁性微球表面, 但是利用化学修饰法将 ATP 硫酸化酶进行生物素化修饰很可能会影响酶的活性. 利用融合表达策略, 将大肠杆菌生物素酰基载体蛋白 C 端 87 个氨基酸肽段(BCCP87)与 ATP 硫酸化酶在大肠杆菌内融合表达, 经 SDS-PAGE 和 Western blot 分析, 表达的融合蛋白分子质量约为 64 ku, 并且能够在大肠杆菌内被生物素化. 生物素化的 ATP 硫酸化酶能够与亲和素包被的磁珠结合, 固定后的 ATP 硫酸化酶具有活性, 并且能够用于定量检测焦磷酸盐(PPi)和焦测序, 为今后建立高通量大规模焦测序系统提供了一个有效的工具酶.

关键词 ATP 硫酸化酶, 生物素化, 固定化, 焦测序

学科分类号 Q7, Q81

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00719

ATP 硫酸化酶(ATP sulfurylase, ATPS, EC 2.7.7.4)能够催化腺苷酰硫酸(adenosine-5'-phosphosulfate, APS)与焦磷酸盐(pyrophosphate, PPi)反应生成三磷酸腺苷(ATP)与硫酸盐. ATPS 广泛存在于植物、动物及微生物中. 目前, 已经从产黄青霉菌^[1]、鼠肝^[2]、卷心菜^[3]等生物体中提取得到 ATPS, 编码 ATPS 的基因也已经从原核生物^[4]、真核生物^[5]、动物^[6]和植物^[7]中克隆并在适当的宿主中得到表达. ATPS 偶联荧光素酶可以应用于 PPi 定量^[8]、DNA 聚合酶酶活测定^[9]、焦测序^[10]等很多方面.

焦测序(pyrosequencing)技术是新一代 DNA 序列实时检测技术, 它是由 DNA 聚合酶(polymerase)、ATPS、荧光素酶(luciferase)和三磷酸腺苷双磷酸酶(apyrase) 4 种酶催化的同一反应体系中的酶级联化学发光反应^[11]. 在每一轮测序反应中, 只加入一种 dNTP, 若该 dNTP 与模板配对, 聚合酶(polymerase)就可以将其掺入到引物链中并释放出等摩尔数的 PPi. 在 ATPS 的催化下, PPi 与 APS 反应生成等量的 ATP. 在荧光素酶(luciferase)的催化作用下, ATP 与虫荧光素(luciferin)反应发光, 可用光电倍增管(PMT)或电荷耦合装置(CCD)检测. 产生的荧光信号强度与聚合的 dNTP 个数成正比, 根据加入的 dNTP 类型和荧光信号强度就可实时记

录模板 DNA 的核苷酸序列. 近年来, 出现了一种高通量光导纤维皮升级微反应池阵列焦测序技术, 该技术一次可以测定上百万个样品^[12], 它的出现带来了测序技术的革命, 使原本需要数年才能完成的人类全基因组测序在数月时间内就能完成, 这极大地推动了后基因组计划的发展^[13]. 但是, 这种焦测序技术需要固定在微球表面的高活性的 ATPS, 为此, ATPS 需要经过生物素标记, 使之能与微球表面的链亲和素反应, 从而实现固定化. 常用的将蛋白质生物素化的方法是化学修饰法, 它主要通过化学反应将生物素连接到蛋白质中赖氨酸残基游离氨基上. 但是, 化学修饰生物素特异性差, 如果处于蛋白质活性中心的赖氨酸残基被修饰, 就很可能影响到蛋白质的活性. 此外, 化学法制备生物素化蛋白存在操作繁琐, 产物不均一的缺点. 如果能在生物体内表达生物素化的蛋白质, 就能克服上述缺点. 大肠杆菌生物素酰基载体蛋白(biotin carboxyl

* 国家自然科学基金资助(30470454)和日本日立中央研究所资助.

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 025-84514223, E-mail: ghzhou@nju.edu.cn

收稿日期: 2008-10-21, 接受日期: 2009-03-09

carrier protein, BCCP)是大肠杆菌 CoA 羧化酶的一个亚基,它是大肠杆菌内唯一的生物素载体,能够在生物素合酶的催化下,在其 C 端赖氨酸上连上一个生物素^[14],将它 C 端 87 个氨基酸与外源蛋白融合表达,就能在大肠杆菌内表达生物素化的外源蛋白^[15~17],并且这种修饰是特异的定点修饰,对酶的活性影响小,产物专一。

本文旨在表达生物素化的 ATPS,利用 BCCP 与外源蛋白融合表达能够实现外源蛋白在大肠杆菌内生物素化的特性^[15~17],将 ATPS 基因与编码 BCCP 蛋白 C 端 87 个氨基酸肽段(BCCP87)的基因序列融合表达。经 Western blot 分析,所表达的融合蛋白能够在大肠杆菌内被生物素化,生物素化的 ATPS 能够固定在亲和素包被的磁珠表面,并且具有 ATPS 的活性,为建立高通量光导纤维皮升级微反应池阵列焦测序技术提供一个有效的工具酶。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株. 重组表达质粒 pET28a(+)-ATPS(a)由华东医学生物技术研究所构建,其中含有 ATPS 基因,宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)为华东医学生物技术研究所保存。

1.1.2 试剂. 限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNA 分子质量标准(λ -EcoT14 I digest DNA Marker)、蛋白质分子质量标准、PCR 产物纯化试剂盒等购自 Takara 公司; *d*-虫荧光素,荧光素酶, Klenow (exo-) DNA polymerase 等购自 Promega 公司; Apyrase 购自 Sigma 公司; 酵母提取物、胰蛋白胨等购自 Oxoid 公司; 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)、溶菌酶(Lysozyme)等购自 Amresco 公司; 0.5 ml 超滤离心管(10K)购自 Millipore 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 重组蛋白的克隆表达及 Western blot 分析. 以大肠杆菌基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 BCCP87 基因,上游引物 BCCP87-P1: 5' GTGT-GTCCATGGAAGCGCCAGCAGC 3', 下游引物 BCCP87-P2: 5' GTGTGTGGATCCC TCGATGAC-GACCAG 3', 热循环条件为 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 10 s, 55℃ 20 s, 72℃ 30 s, 30 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min. PCR 产物经纯化试剂盒纯化后用 *Nco* I 和 *Bam*H I 双酶解,克隆到同样酶解的质粒 pET28a(+)-ATPS(a)中 ATPS 基因上游,转化 *E. coli*

BL21(DE3), 挑选转化子抽提质粒后进一步通过 PCR 筛选阳性克隆,阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序,重组表达质粒命名为 pET28a(+)-BCCP87-ATPS。

将过夜活化的阳性重组菌,按 1%接种量接种于 50 ml LB(kan^r, 30 mg/L)液体培养基中,37℃, 200 r/min 振荡培养至 A_{600} 达 0.6~0.7, 收集 1 ml 菌液作 SDS-PAGE 分析,随后加入 IPTG 至终浓度为 0.01 mmol/L,以 30℃, 200 r/min 继续振荡培养 5 h,离心收集菌体,菌体用 PBS 洗涤后,重悬于 1× 结合缓冲液(0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L 咪唑, pH 7.9)中,另加入溶菌酶至 100 mg/L,反复冻融 3 次。加入适当浓度的 DNase 和 RNase, 4℃ 孵育 30 min. 4℃, 12 000 *g* 离心 20 min, 分别收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE (12%)分析。利用辣根过氧化物酶标记的亲和素进行 Western blot 分析。

1.2.2 重组蛋白的固定化及固定后活性测定. 取 10 μ l 链亲和素包被的磁珠混悬液 Dynabeads M-280 Streptavidin (Invitrogen 公司),静置于磁铁上 1 min,弃去上清液,用 50 μ l B & W 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1 mmol/L EDTA, 2 mmol/L NaCl)洗涤磁珠 2 次。将磁珠悬于 1 ml 超滤脱盐后的裂解上清中,室温混摇 0.5 h,使生物素化的 ATPS 与磁珠充分结合。之后将溶液静置于磁铁上,待磁珠完全集中后弃去溶液,用 10 μ l 0.1 mol/L Tris-Ac (pH 9.0, 0.02% BSA)缓冲液洗涤磁珠并最终重悬。

取 1 μ l 固定后的 ATPS(beads-ATPS)按照先前使用的方法^[18]测定活性。将测活使用的 beads-ATPS 用 Tris-Ac(pH 9.0, 0.02% BSA)缓冲液洗涤 3 次,再次测定其活性,如此重复 2 次来考察 beads-ATPS 的重复利用效率。

1.2.3 利用 beads-ATPS 进行 PPi 测定. 在 50 μ l 反应液[0.1 mol/L Tris-Ac pH 7.9, 0.5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L Mg(Ac)₂, 0.4 g/L polyvinyl pyrrolidone (PVP), 0.02% BSA, 1 mmol/L dithiothreitol (DTT), 4 μ mol/L APS, 0.4 mmol/L *d*-虫荧光素, 1.46 mg/L 荧光素酶]中加入 1 μ l beads-ATPS,混匀后依次加入 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 μ l 的 PPi (1 μ mol/L),迅速将混合物置于 BPCL 微量发光检测仪(中国科学院生物物理研究所),测定光信号强度。

1.2.4 利用 beads-ATPS 进行焦测序. 利用 beads-ATPS 对用固相磁珠法制备的序列已知的单链进行焦测序,待测序列为 GGCCTG。测序时,首先将

5 μl beads-ATPS 与 3 μl 固相单链混合, 用磁铁吸引使磁珠集中于管底, 吸弃上清, 加入 10 μl 测序反应液 [0.1 mol/L Tris-Ac pH 7.9, 0.5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L Mg(Ac)₂, 0.4 g/L PVP, 0.02% BSA, 1 mmol/L DTT, 4 $\mu\text{mol/L}$ APS, 0.4 mmol/L *d*- 虫荧光素, 1.46 mg/L 荧光素酶, 90 U/ml Klenow (exo⁻) DNA polymerase]混匀, 置于 BPCL 微量发光检测仪(中国科学院生物物理研究所)测定基线, 然后依待测序列顺序依次加入相应的 dNTP, 测定产生的信号, 在加入 dCTP 后用新鲜的反应液对磁珠进行洗涤, 然后再加入新鲜的反应液继续测定后面的序列.

2 结果与讨论

2.1 重组蛋白的表达及 Western blot 分析

将筛选得到的阳性重组菌进行培养, 经 IPTG 诱导后, 收集菌体, 进行 SDS-PAGE 分析. 结果显示, 与空质粒的阴性对照(图 1-1)相比, 重组菌有明显的外源蛋白表达带, 分子质量约为 64 ku. 比较菌体总蛋白(图 1-2)、上清(图 1-3)和沉淀(图 1-4)的条带可以看出, 重组蛋白主要以可溶的形式存在于上清中.

Western blot 分析结果(图 1-5)表明, 融合表达产物 BCCP87-ATPS 与辣根过氧化物酶标记的亲素和素有特异反应, 进而说明融合表达产物 BCCP87-ATPS 能够在大肠杆菌体内进行生物素化.

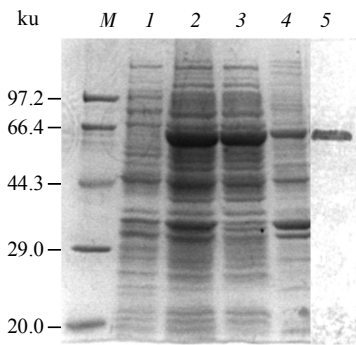


Fig. 1 SDS-PAGE and Western blot analysis of the fusion protein expressed in *E. coli* BL21 (DE3)

M: Protein marker; *1*: Total proteins of *E. coli* BL21 (DE3) transformed with pET28a (+) after being induced with IPTG for 5 h; *2*: Total proteins of *E. coli* BL21 (DE3) transformed with pET28a (+)-BCCP87-ATPS after being induced with IPTG for 5 h; *3*: Supernatant of the lysate of *E. coli* BL21 (DE3) transformed with pET28a (+)-BCCP87-ATPS after being induced with IPTG for 5 h; *4*: Precipitates of the lysate of *E. coli* BL21 (DE3) transformed with pET28a (+)-BCCP87-ATPS after being induced with IPTG for 5 h; *5*: Biotinylated fusion protein hybridized with HRP-conjugated streptavidin.

2.2 重组蛋白的固定化及固定后活性的测定

利用链亲和素 - 生物素之间牢固、特异的结合, 使生物素化的 ATPS 结合到链亲和素包被的磁珠表面, 通过磁铁吸引, 可以将结合生物素化 ATPS 的磁珠同未固定化的 ATPS 分离, 在一定程度上得到了浓缩和纯化. 实验发现, 融合蛋白 BCCP87-ATPS 固定后有明显的 ATPS 催化活性, 活性可达 $1.37 \times 10^{-2} \text{ mU}/\mu\text{l}$, 为了验证固定化 ATPS 能够被重复使用, 将测活使用的 beads-ATPS 洗涤后, 重新测得其活性, 如此重复 2 次, 以第一次测定的 beads-ATPS 的活性作为 100%, 洗涤回收后的 beads-ATPS 的活性与其比值作为相对活性, 得到 beads-ATPS 回收利用率, 结果见表 1. 在操作中尽量降低洗涤磁珠过程中磁珠的损失, beads-ATPS 每次回收后活性降低在 5%左右.

Table 1 The reuse efficiency of beads-ATPS		
Enzyme	Activity/mU• μl^{-1}	Relative activity/%
Fresh beads-ATPS	1.37×10^{-2}	100
Recovered beads-ATPS 1*	1.30×10^{-2}	94.9
Recovered beads-ATPS 2*	1.24×10^{-2}	90.5

*The number (1 and 2) replaced the number of recover times. The beads-ATPS was recovered by washing for 3 times with Tris-Ac(pH 9.0) buffer.

2.3 利用 beads-ATPS 进行 PPi 测定

为了进一步验证 beads-ATPS 的生物活性, 我们将 beads-ATPS 应用到 PPi 的定量试验中. PPi 经 ATPS 的催化与 APS 反应生成 ATP, ATP 在 luciferase 的催化下与 luciferin 反应发光, 发出的光强度与加入的 PPi 量成正比. 实验发现, 检测到的信号有较高的基线, 这是由于底物 APS 也能与荧光素酶反应, 造成一个背景信号. 由于这个背景信号较高, 当加入 0.1 pmol PPi 时, 产生的信号比基线信号低, 但由于反应消耗了底物 APS, 使得基线反而下降, 当继续加入 0.2 pmol PPi 时开始得到能够判读的信号, 继续加入 0.4、0.8 和 1.6 pmol PPi 时也得到了相应的信号(图 2). 将测得的信号与相应的 PPi 的量作线性相关曲线(图 3), 结果看出, PPi 在 0.2 ~ 1.6 pmol 之间, 其荧光信号同 PPi 的量成正比. 实验中测定的 PPi 的量与焦测序常用的模板量延伸一个碱基所产生的 PPi 的量相当, 说明 beads-ATPS 可以应用于高通量光导纤维皮升级微反应池阵列焦测序技术中.

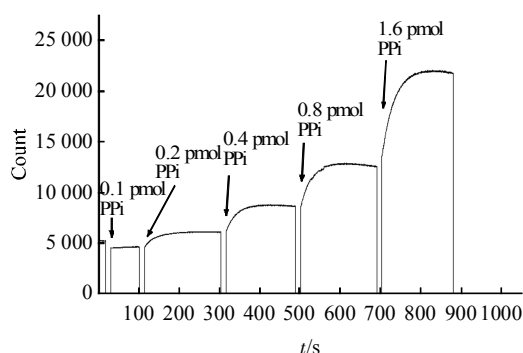


Fig. 2 Real-time bioluminescent traces for detection of PPI

50 μ l of reaction mixture contained 0.1 mol/L Tris-Ac pH 7.9, 0.5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L Mg(Ac)₂, 0.4 g/L PVP, 0.02% BSA, 1 mmol/L DTT, 4 μ mol/L APS, 0.4 mmol/L *d*-luciferin, 1.46 mg/L luciferase and 1 μ l of beads-ATPS. Different amounts of PPI were added into reaction mixture, and the signal was detected by BPCL Luminescence Analyzer (Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences).

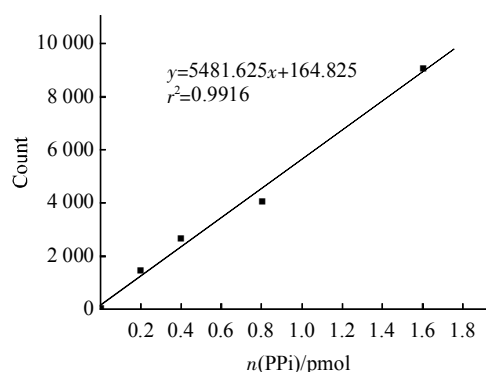


Fig. 3 Linear regression curve of signal and PPI

2.4 利用 beads-ATPS 进行焦测序

为了进一步验证 beads-ATPS 能否用于大规模芯片固相焦测序, 用制备好的 beads-ATPS 测定了一段已知序列(GGCCTG)的固相单链, 结果如图 4a 所示. 当加入 dGTP 和 dCTP 后, 均产生了延伸信号, 这与待测序列相符, 由于后面序列中含有 G, 所以要对 beads 进行洗涤后才能继续加入 dTTP 测定, 从图 4 中可以看到, 洗涤后加入 dTTP 与 dGTP 均产生了相应的信号, 并且产生的信号高度约为前两个信号高度的一半, 这也和待测序列相一致, 说明本文制备的 beads-ATPS 有很好的活性, 完全能够用于焦测序. 将测定的信号用柱状图进行模拟(图 4b), 能够更清楚地看出测序结果与已知待测序列基本一致. 由此, 我们制备的生物素-ATPS (biotin-ATPS)可以用于固相芯片测序.

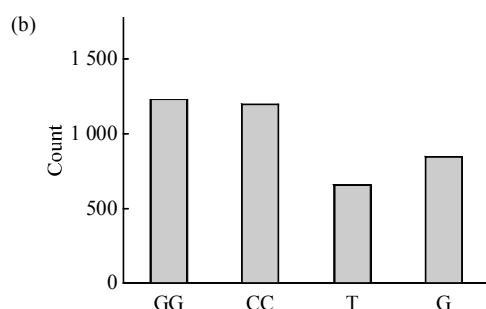
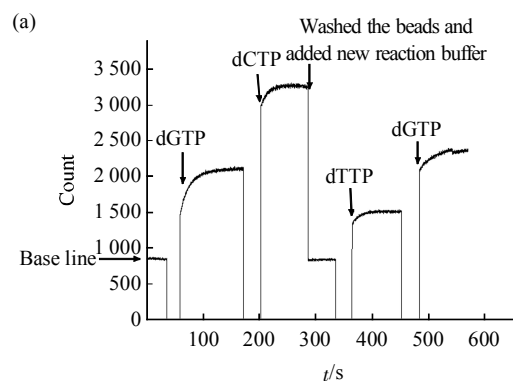


Fig. 4 The results of pyrosequencing with beads-ATPS

(a) Bioluminescent traces for pyrosequencing with beads-ATPS. The reaction mixture contained 0.1 mol/L Tris-Ac pH 7.9, 0.5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L Mg(Ac)₂, 0.4 g/L PVP, 0.02% BSA, 1 mmol/L DTT, 4 μ mol/L APS, 0.4 mmol/L *d*-luciferin, 1.46 mg/L luciferase, 90 U/ml Klenow (exo-) DNA polymerase, 5 μ l of beads-ATPS and 3 μ l of single strand DNA. The order of dNTP dispensing is G-C-T-G. After dCTP added, the beads was washed with new reaction buffer to remove the proposal of dGTP and dCTP. The signal was detected by BPCL Luminescence Analyzer (Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences). (b) Analog signal of pyrosequencing with beads-ATPS.

3 结 论

生物素酶如乙酰辅酶 A 羧化酶、丙酮酸羧化酶, 它们可以在体内由生物素全酶合成酶的催化而使生物素分子与蛋白质分子中独特的赖氨酸相连接^[4]. 用化学修饰的方法制备生物素化蛋白, 操作繁琐, 产物不均一, 而且极有可能影响到蛋白质分子的空间构象和活性. 用基因工程的方法可使与生物素受体肽融合的目的蛋白在体内生物素化^[17, 19, 20], 基因工程的方法制备生物素化蛋白有着明显的优点: 首先, 它可以对目的蛋白进行生物素标记, 避免了化学法制备生物素化蛋白存在操作繁琐, 产物不均一的缺点; 其次, 基因工程制备的生物素化蛋白由于带有了生物素标签, 因而便于纯化和检测.

BCCP87 由乙酰辅酶 A 羧化酶羧基端 87 个氨

基酸残基组成, 其 53 位的赖氨酸残基可被生物素化^[20, 21]. 我们构建了 ATPS 与 BCCP87 的融合蛋白, 并在 *E. coli* BL21(DE3) 中进行了表达, 主要以可溶的形式存在于上清中. Western blot 分析表明, 融合表达产物 BCCP87-ATPS 与辣根过氧化物酶标记的亲生素有特异反应, 说明融合蛋白能够在大肠杆菌中被生物素化. 通过生物素与亲生素之间特异性的结合力, 能够将 BCCP87-ATPS 固定在亲生素包被的磁性微球表面, 固定化 ATPS 活性可达 1.37×10^{-2} mU/ μ l beads. Beads-ATPS 可以用于 PPi 的定量测定, 由于焦测序反应的实质就是测定延伸产生的 PPi, 因此, beads-ATPS 能够用于定量测定 PPi, 经焦测序验证 beads-ATPS 可以应用于焦测序. 这为高通量光纤微反应池阵列焦测序技术提供了一个有利的工具酶.

参 考 文 献

- Renosto F, Martin R L, Wailes L M, *et al.* Regulation of inorganic sulfate activation in filamentous fungi. Allosteric inhibition of ATP sulfurylase by 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate. *J Biol Chem*, 1990, **265** (18): 10300~10308
- Yu M, Martin R L, Jain S, *et al.* Rat liver ATP-sulfurylase: purification, kinetic characterization, and interaction with arsenate, selenate, phosphate, and other inorganic oxyanions. *Arch Biochem Biophys*, 1989, **269** (1): 156~174
- Osslund T, Chandler C, Segel I H. ATP sulfurylase from higher plants: purification and preliminary kinetics studies on the cabbage leaf enzyme. *Plant Physiol*, 1982, **70** (1): 39~45
- Schwedock J, Long S R. Nucleotide sequence and protein products of two new nodulation genes of *Rhizobium meliloti*, nodP and nodQ. *Mol Plant Microbe Interact*, 1989, **2** (4): 181~194
- Foster B A, Thomas S M, Mahr J A, *et al.* Cloning and sequencing of ATP sulfurylase from *Penicillium chrysogenum*. Identification of a likely allosteric domain. *J Biol Chem*, 1994, **269** (31): 19777~19786
- Li H, Deyrup A, Mensch J R Jr, *et al.* The isolation and characterization of cDNA encoding the mouse bifunctional ATP sulfurylase-adenosine 5'-phosphosulfate kinase. *J Biol Chem*, 1995, **270** (49): 29453~29459
- Klonus D, Riesmeier J W, Willmitzer L. A cDNA clone for an ATP-sulfurylase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 1995, **107** (2): 653~654
- Nyren P, Nore B F, Baltscheffsky M. Studies on photosynthetic inorganic pyrophosphate formation in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Biochim Biophys Acta*, 1986, **851**: 276~282
- Nyren P. Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity. *Anal Biochem*, 1987, **167** (2): 235~238
- Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clin Chim Acta*, 2006, **363** (1~2): 83~94
- Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res*, 2001, **11** (1): 3~11
- Margulies M, Egholm M, Altman W E, *et al.* Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 2005, **437** (7057): 376~380
- Chi K R. The year of sequencing. *Nat Methods*, 2008, **5** (1): 11~4
- Samols D, Thornton C G, Murtif V L, *et al.* Evolutionary conservation among biotin enzymes. *J Biol Chem*, 1988, **263** (14): 646~654
- Sibler A P, Kempf E, Glacet A, *et al.* *In vivo* biotinylated recombinant antibodies: high efficiency of labelling and application to the cloning of active anti-human IgG1 Fab fragments. *J Immunol Methods*, 1999, **224** (1~2): 129~140
- Tatsumi H, Fukuda S, Kikuchi M, *et al.* Construction of biotinylated firefly luciferases using biotin acceptor peptides. *Anal Biochem*, 1996, **243** (1): 176~180
- Weiss E, Chatellier J, Orfanoudakis G. *In vivo* biotinylated recombinant antibodies: construction, characterization, and application of a bifunctional Fab-BCCP fusion protein produced in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 1994, **5** (5): 509~517
- 罗娟, 吴文娟, 邹秉杰, 等. 酿酒酵母 ATP-硫酸化酶在大肠杆菌中的克隆表达纯化及其在焦测序中的应用. *生物工程学报*, 2007, **23** (4): 623~627
- Luo J, Wu W J, Zou B J, *et al.* *Chin J Biotechnology*, 2007, **23** (4): 623~627
- Li S J, Cronan J E Jr. The gene encoding the biotin carboxylase subunit of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem*, 1992, **267** (2): 855~863
- Reed K E, Cronan J E Jr. *Escherichia coli* exports previously folded and biotinylated protein domains. *J Biol Chem*, 1991, **266** (18): 11425~11428
- Muramatsu S, Mizuno T. Nucleotide sequence of the fabE gene and flanking regions containing a bent DNA sequence of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 1989, **17** (10): 3982

Expression, Immobilization and Application of Biotinylated ATP Sulfurylase*

ZOU Bing-Jie^{1,2)**}, LUO Juan^{1)**}, WU Hai-Ping¹⁾, ZHOU Guo-Hua^{1,3)***}

(1) Huadong Research Institute for Medicine and Biotechnics, Nanjing 210002, China;

2) School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

3) Medical School, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract The modern large-scale pyrosequencing technology is a revolution of DNA sequencing. One of the key points in this technology is to get an ATP sulfurylase immobilized on the surface of magnetic beads and with a high activity. Biotinylated ATP sulfurylase can be immobilized on magnetic beads coated with streptavidin through the specific conjunction between biotin and streptavidin, but using chemical modification method to biotinylate ATPS will affect the activity of the enzyme. ATP sulfurylase fused with the carboxyl terminal 87 residues of *Escherichia coli* biotin carboxyl carrier protein (BCCP87) was expressed in *E. coli* using fusion expression strategy. Results from Western blot analysis and SDS-PAGE analysis showed that the fusion protein could be biotinylated *in vivo*, and the molecular mass of the fusion protein was about 64 ku. The biotinylated ATP sulfurylase could be immobilized on the surface of magnetic beads coated with strepavidin, and the immobilized ATPS could be used for quantification of PPi and pyrosequencing. An effective enzyme for the large-scale chip-based pyrosequencing system was supplied.

Key words ATP sulfurylase, biotinylation, immobilization, pyrosequencing

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00719

*This work was supported by grants from The National Nature Science Foundation of China (30470454) and Central Research Laboratory of Hitachi, Japan.

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-25-84514223, E-mail: ghzhou@nju.edu.cn

Received: October 21, 2008 Accepted: March 9, 2009