

# <sup>35</sup>S 标记重组植物钙调素的制备方法\*

崔素娟\*\* 郭晓强\*\* 毛国红 赵军峰 孙颖 白娟 马力耕 孙大业\*\*\*

(河北师范大学分子细胞生物学研究室, 石家庄 050016)

**摘要** 利用<sup>35</sup>S 标记的氨基酸混合物喂养工程菌, 成功地制备了<sup>35</sup>S 标记的拟南芥钙调素亚型 2 (<sup>35</sup>S-ACaM2), 对其纯度、放射活度、电泳行为及其灵敏性等进行了检测. 结果表明从工程菌中制备的<sup>35</sup>S-ACaM2 纯度高、放射活度高、Ca<sup>2+</sup> 与 EGTA 存在时的电泳行为与未标记的 ACaM2 相同, 可作为一种高灵敏性的探针用于检测钙调素结合蛋白.

**关键词** <sup>35</sup>S 标记的拟南芥钙调素亚型 2 (<sup>35</sup>S-ACaM2), 工程菌, 拟南芥

**学科分类号** Q946

钙调素 (calmodulin, CaM) 是一种 Ca<sup>2+</sup> 结合蛋白, 其自身没有任何酶活性, 作为 Ca<sup>2+</sup> 信使途径的重要组分, 它必须通过和其靶酶或靶蛋白 (即钙调素结合蛋白, CaMBPs) 结合才能发挥生物学作用. 另一方面, 越来越多的研究表明, 植物中存在众多 CaM 亚型, 为了探明这些亚型存在的生物学意义及其作用的分子机制, 需要用标记的不同亚型 CaM 寻找其结合蛋白<sup>[1]</sup>. CaM 标记物的灵敏度, 是否具有天然 CaM 活性等是影响 CaMBPs 检测的重要因素. CaMBPs 研究中常用的 CaM 标记物有: 小分子标记物, 如生物素、地高辛; 大分子酶标, 如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶; 及同位素标记<sup>125</sup>I、<sup>35</sup>S 等. 小分子标记物、大分子酶标和<sup>125</sup>I 标记 CaM 时, 首先要提取纯化 CaM 后, 才能进行标记. 标记后的 CaM 无论活性还是构象与天然 CaM 均有一定程度的差别, 这就不利于 CaMBPs 的检测. 随着生物工程技术的日臻完善, 借助<sup>35</sup>S-氨基酸混合物在工程菌体内标记重组蛋白的应用越来越广泛. 在参考国外文献及我室提纯 CaM 的经验基础上, 我们建立了<sup>35</sup>S-氨基酸混合物在工程菌体内标记拟南芥 CaM 亚型 2 (ACaM2) 重组蛋白的方法, 并对纯化的<sup>35</sup>S-ACaM2 性质进行了鉴定.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒与菌种:** 菌种 *E. coli* BL21 (DE3)、拟南芥 CaM 亚型 2 (ACaM2) 表达质粒, 由美国 Zielinski 实验室惠赠.

**1.1.2 试剂:** 细菌蛋白提取液为 Pierce 公司产品;

<sup>35</sup>S 同位素标记氨基酸混合物为 PE 公司产品, 疏水亲和层析介质 (Phenyl Sepharose CL-4B) 为 Pharmacia 公司产品. 其他试剂为国产分析纯.

### 1.2 标记及提纯过程

**1.2.1 菌体培养及诱导合成<sup>35</sup>S 标记蛋白:** 挑单菌落于 10 ml M9 培养液 (含 1% 的蛋白胨, 100 mg/L 氨苄青霉素), 37℃ 振荡培养过夜后, 20℃, 6 000 r/min, 离心 10 min, 弃上清. 用 20 ml 不含蛋白胨的 M9 培养液洗涤菌体一次, 并用此培养液调菌体密度至 A<sub>600</sub> 为 0.6~0.8. 取 10 ml 菌液 37℃ 振荡培养 10 min 后, 加异丙基硫代-β-D 半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 1 mmol/L, 继续振荡培养 15 min, 加入含<sup>35</sup>S 同位素标记氨基酸混合物 7.4 × 10<sup>7</sup>~11.1 × 10<sup>7</sup> Bq, 37℃ 再振荡培养 4 h. 于 4℃, 6 000 r/min, 离心 15 min 收集菌体, 生理盐水洗涤菌体 2 次后, 置-70℃ 冰箱 30 min 后, 加细菌蛋白提取液 1.5 ml, 震荡混匀, 室温 1 h 使菌体充分裂解. 90℃ 水浴 4 min, 迅速冷却至室温. 4℃, 17 000 r/min 离心 1 h, 收集上清, 调 Ca<sup>2+</sup> 至终浓度 5 mmol/L, 准备上疏水亲和柱.

**1.2.2 <sup>35</sup>S 标记重组钙调素的纯化:** 预装好的疏水亲和和层析柱 (柱床体积约 1 ml) 用 3~4 倍柱床体积的 SB (50 mmol/L Tris-HCl, 0.1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5) 平衡, 然后重复上样 2 遍, 静止 5 min 以

\* 国家重点基础研究资助项目 (G1999011702) 和国家杰出青年基金资助项目 (30025024).

\*\* 崔素娟和郭晓强同为第一作者.

\*\*\* 通讯联系人.

Tel: 0311-5820649, E-mail: sundaye@heinfo.net

收稿日期: 2002-01-15, 接受日期: 2002-03-06

利于 CaM 与柱介质充分结合. 然后用约 6 倍柱床体积的 SB 洗涤, 再用约 4 倍柱床体积 WB (50 mmol/L Tris-HCl, 0.1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mol/L NaCl, pH 7.5) 洗涤去杂蛋白, 最后用 EB (50 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L EGTA, pH 8.0) 洗脱, 收集 8 管, 每管体积约 0.5 ml.

### 1.3 液闪法测定蛋白质峰管

每个收集管中取 5  $\mu$ l 样品, 加入 5 ml 的水溶性闪烁液 (4 g/L 2, 5-二苯基恶唑, 0.3 g/L 1, 4-双 (5-苯基-2-恶唑) 苯溶于 7:3 的甲苯/乙醇) 中, 利用 Packard 公司的 2200CA 型液闪仪测定 cpm 值.

### 1.4 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳及放射自显影

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 采用 Laemmli 电泳缓冲系统, 在 mini-protein II 型电泳仪 (Bio-Rad 公司) 上进行, 分离胶浓度为 12%, 银染显示蛋白质条带, 凝胶成像系统记录结果.

银染后凝胶经 10 倍体积的 1 mol/L 水杨酸钠 (pH 6.0) 浸泡 30 min 后, 制干胶, 压 X 光片, -70  $^{\circ}$ C 曝光 3 d 后, 显影、定影, 结果用凝胶成像系统记录.

### 1.5 点杂交及 NC 膜覆盖法

**1.5.1 点杂交检测已知 CaMBPs 的灵敏性:** 倍比稀释的钙调磷酸酶 (calcineurin, CaN) 各 2  $\mu$ l 点于硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上, 各点蛋白质含量分别约为 740、74、7.4、0.74、0.074 ng, 晾干后, 在 10% 乙酸, 25% 异丙醇水溶液中浸 10 min, 重蒸水漂洗 2 次, 然后用含 5 mmol/L Ca<sup>2+</sup> TBS (50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 7.5) 洗涤液漂洗一次, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 10<sup>-9</sup> mol/L <sup>35</sup>S-ACaM2 室温孵育 2 h, 洗涤, 晾干, 压 X 光片, -70  $^{\circ}$ C 曝光 2 d, 显影、定影, 结果用凝胶成像系统记录.

**1.5.2 NC 膜覆盖法检测组织中 CaMBPs:** 拟南芥愈伤组织加液氮充分研磨, 加 2 倍体积提取液 (50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 15 mmol/L 巯基乙醇, 0.5 mmol/L PMSF, pH 7.5), 经 15 000  $\times g$  离心, 取上清液为全蛋白质, 全蛋白质经 10% SDS-PAGE, 电转移 (50 V, 1 h) 至 NC 膜, 取其中两泳道, 分别经含 1 mmol/L Ca<sup>2+</sup> 及 5 mmol/L EGTA 的封闭液 (5% 脱脂奶粉的 TBS) 中封闭 1 h, 10<sup>-9</sup> mol/L <sup>35</sup>S-ACaM2 室温孵育 2 h, TBS 洗涤, 晾干, 压 X 光片, -70  $^{\circ}$ C 曝光 2 d 后, 显影、定影, 结果用凝胶成像系统记录.

按李家旭等<sup>[2]</sup> (1994 年) 方法, 生物素标记

ACaM2、NC 膜覆盖法检测拟南芥愈伤组织全蛋白质中的 CaMBPs.

## 2 结 果

### 2.1 液闪法快速检测<sup>35</sup>S-ACaM2 峰管

蛋白质纯化过程中常通过检测 280 nm 吸光值 ( $A_{280}$ ) 来确定蛋白质峰管. 由于 <sup>35</sup>S-CaM 具有放射性, 而且每管所收集的体积也很小, 借助紫外分光光度计检测  $A_{280}$  存在困难. 为此我们根据所制备物具有放射性这一特点, 摸索建立了借助液闪仪快速检测蛋白质峰管的方法.

即每次标记用  $7.4 \times 10^7 \sim 11.1 \times 10^7$  Bq 的 <sup>35</sup>S 标记氨基酸混合物, 得到 1.5 ml 的标记蛋白混合液, 取 5  $\mu$ l 测得 cpm 值在  $200 \times 10^4 \sim 300 \times 10^4$  间. 用 1 ml 的疏水亲和层析柱提取纯化钙调素, 一般收集 8 管洗脱液, 每管 0.5 ml. 各管取 5  $\mu$ l 测 cpm 值, 绘制洗脱曲线, 如图 1 所示, 为其中三次独立标记纯化实验的洗脱曲线, 高峰管均在第 3 号管, 其 cpm 值为  $50 \times 10^4 \sim 120 \times 10^4$  左右. 根据我们多次标记的经验认为, 不同克隆表达菌株间的差别会影响标记效率, 但菌体裂解是否完全及表达的钙调素能否完全被亲和柱结合是获得高产 <sup>35</sup>S-CaM 的关键因素.

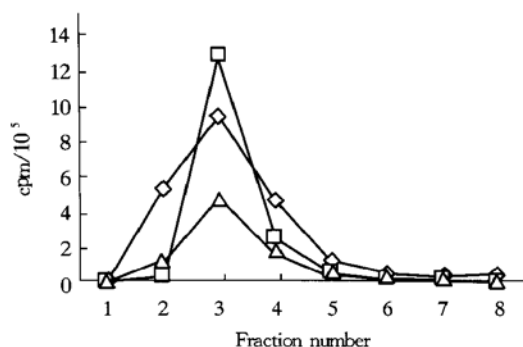
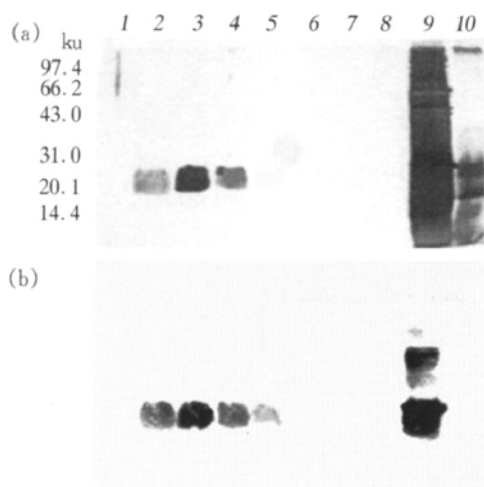


Fig. 1 Elution curves of <sup>35</sup>S-ACaM2 from Phenyl Sepharose chromatography

△—△, ◇—◇, □—□ indicated three separated purifications, which have different product rate. Radioactivity of high peak, No. 3 collecting tube was between  $5 \times 10^5$  to  $12 \times 10^5$  per 5  $\mu$ l.

### 2.2 <sup>35</sup>S-ACaM2 的纯度、浓度及 Ca<sup>2+</sup> 依赖特性的检测

为了进一步确定高峰管内蛋白质的纯度、浓度及放射活性, 我们进行了 SDS-PAGE 电泳及放射自显影 (图 2a 和 2b).



**Fig. 2 SDS PAGE and autoradiograph analysis of fraction from the chromatography**

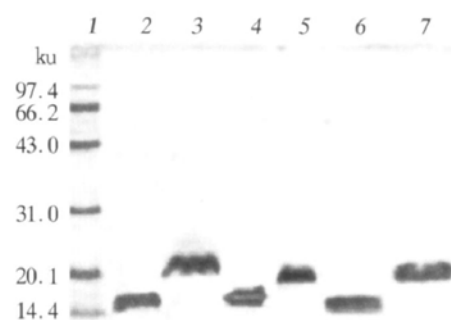
(a) 20  $\mu$ l of each fraction was separated by 12% SDS-PAGE and stained with silver. The fraction number is indicated below the figure (1~8). Lane 9 represents the bacterial lysate after heat treatment and before loading on the column, and lane 10 represent protein after loading on the column; (b) autoradiograph picture of (a).

图2a为图1的“ $\diamond$ — $\diamond$ ”洗脱曲线对应各管电泳结果,每道上样体积一致,均为20  $\mu$ l。结果显示收集的蛋白质主要存在于第2、3、4管,银染结果一条带说明蛋白质纯度很高,此蛋白质的分子质量与钙调素的分子质量相当(图3)。其中第3管为高峰管,这与液闪检测结果一致,表明液闪法检测 $^{35}\text{S}$ 标记蛋白质峰管是可信的。图2b为图2a电泳胶板放射自显影结果,表明 $^{35}\text{S}$ 放射性主要存在于第2、3、4管,而且纯度很高,无放射性的杂带,说明提纯的标记蛋白纯度高、放射活度高。

图2a和2b中第9、10泳道分别为上柱前的蛋白质混合液及2次上柱后的流出液,电泳及放射自显影结果表明,大部分 $^{35}\text{S}$ 标记在钙调素蛋白分子质量条带上,借助钙调素常用提取纯化流程,疏水亲和和层析介质几乎完全结合了诱导表达标记的钙调素,说明标记和提纯的效率与产率较高。

为进一步确定纯化 $^{35}\text{S}$ 标记蛋白的性质,我们将其与已确定浓度的未标记ACaM2同板电泳(图3),结果表明在5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ 存在时,纯化的 $^{35}\text{S}$ 标记蛋白电泳迁移率快,而EGTA存在时,其迁移率较慢,这与未标记ACaM2的电泳行为变化完全一致,说明纯化的标记蛋白确实是 $^{35}\text{S}$ -ACaM2。电泳结果显示15  $\mu$ l  $^{35}\text{S}$ -ACaM2银染条带与2  $\mu$ g的未标记ACaM2相当,故推算其浓度大约在100~200 mg/L间,即 $10^{-6}$  mol/L左右。又据液闪测定

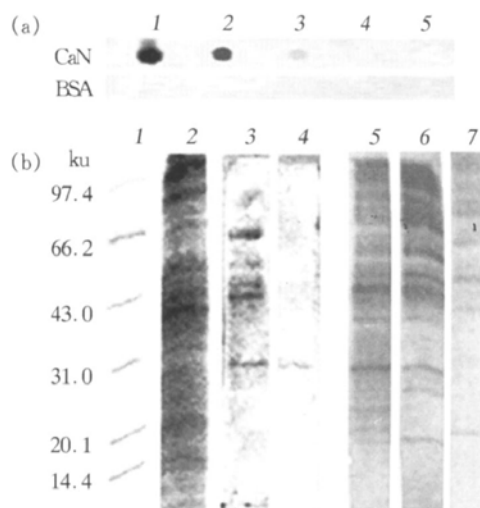
结果,每微克 $^{35}\text{S}$ -ACaM2的放射活度(cpm值)约为 $10^5 \sim 10^6$ 。



**Fig. 3 12% SDS PAGE of  $^{35}\text{S}$  labelled and unlabelled ACaM2**  
1: molecular mass marker; 2, 3: 2  $\mu$ g unlabelled CaM with 5 mmol  $\text{Ca}^{2+}$  or 5 mmol EGTA; 4, 5: 0.75  $\mu$ g unlabelled CaM with 5 mmol  $\text{Ca}^{2+}$  or 5 mmol EGTA; 6, 7: 15  $\mu$ l  $^{35}\text{S}$ -CaM with 5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  or 5 mmol/L EGTA.

## 2.3 $^{35}\text{S}$ ACaM2 与 CaM 结合蛋白结合能力的检测

CaN 是一种钙依赖的 CaMBP, 为了确定提取纯化的 $^{35}\text{S}$  ACaM2 与 CaMBPs 的结合特性及其识别灵敏性, 我们首先通过点杂交(图4)证实 $10^{-9}$  mol/L 的 $^{35}\text{S}$ -ACaM2 可与 CaN 结合, 并可检出 7.4 ng 的 CaN。而牛血清白蛋白(BSA)与 $^{35}\text{S}$ -CaM 没有



**Fig. 4 Binding of  $^{35}\text{S}$  ACaM2 to CaN by dot blot and detection of CaMBPs with  $^{35}\text{S}$  ACaM2 and biotinylated ACaM2**

(a) CaN or BSA was dotted onto NC in 2  $\mu$ l droplet containing 740 ng, 74 ng, 7.4 ng, 0.74 ng, 0.074 ng (1, 2, 3, 4, 5). After incubated with  $10^{-9}$  mol/L  $^{35}\text{S}$ -ACaM2 in 5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  TBS buffer for 2 h, the blot was autoradiography; (b) Total proteins (15  $\mu$ g) of *Arabidopsis callus* were electrophoresed by 10% SDS-PAGE, electroblotted onto NC, incubated with  $^{35}\text{S}$ -ACaM2 in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  (2) or EGTA (3) for 2 h then autoradiography, or incubated with biotinylated CaM in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  (5), EGTA (6) and the blots (5, 6, 7) were developed with avidin-peroxidase. 1: protein molecular mass marker; 2: the electroblotted NC of total protein was stained in Amido Black.

结合 (图 4a). 这表明我们所制备的 $^{35}\text{S}$ -ACaM2 与 CaN 的结合具有高灵敏性及特异性.

为了进一步鉴定所制备的 $^{35}\text{S}$ -ACaM2 在检测植物组织中的 CaMBPs 的能力, 我们制备了拟南芥愈伤组织的全蛋白, 经 SDS-PAGE、电转移至 NC 膜,  $^{35}\text{S}$ -ACaM2 在有钙和无钙条件下分别温育, 结果表明有钙时  $10^{-9}$  mol/L  $^{35}\text{S}$ -ACaM2 可结合的清晰条带有多条, 而无钙时的条带较少 (图 4b), 而我们同时用生物素标记钙调素进行检测, 表明有钙、无钙时的条带数均较多, 而亲和素对照也有多条带 (图 4b). 生物素标记钙调素检测植物组织钙调素结合蛋白时经常出现此类现象, 每次检测需做多次重复. 由此可见,  $^{35}\text{S}$ -CaM 探针灵敏度高, 检测结果准确易于分析, 这对于我们检测那些植物组织中含量较低的钙调素结合蛋白非常有利.

### 3 讨 论

20 世纪 80 年代初国外即建立了从动植物组织中提取纯化钙调素的技术方法. 随着生物工程技术的进步, 重组动植物钙调素蛋白的提取纯化方法也日渐成熟. 同时也建立了利用工程菌生产 $^{35}\text{S}$  同位素标记重组蛋白的技术<sup>[3,4]</sup>.

制备 $^{35}\text{S}$  标记钙调素的技术经历了两个阶段, 第一个阶段为: 无机 $^{35}\text{S}$  起源的方法, 此方法标记时间长, 影响菌体生长, 钙调素产率较低; 第二阶段为: 首先借助工程菌制备 $^{35}\text{S}$  标记氨基酸混合物, 而后直接以这些氨基酸为氮源进行 $^{35}\text{S}$  标记钙调素的制备, 此种方法由于 $^{35}\text{S}$  标记氨基酸的商品化, 标记时间大大缩短, 得率大大提高, 约为无机 $^{35}\text{S}$  标记效率的 200%<sup>[4]</sup>, 目前国际上已有几个实验室建立了此种技术, 并用于蛋白质印迹及表达文库筛选等工作, 从中筛选到不少含量很低的钙调素结合蛋白.

而国内文献尚没有报道钙调素的 $^{35}\text{S}$  标记工作, 我们实验室在多年的钙调素及钙调素结合蛋白的研究工作中, 也曾尝试用生物素、地高辛、 $^{125}\text{I}$  标记及辣根过氧化物酶标记钙调素等多种标记钙调素,

正如本文前言中提到的, 所有这些标记钙调素均存在一个很大的缺点, 即标记后的钙调素往往不能很好地保持天然蛋白构象, 进而影响与钙调素结合蛋白的结合活性. 而 $^{35}\text{S}$ -CaM 由于是在 CaM 生物合成过程中进行标记的, 能很好地保持天然 CaM 的构象. 植物钙调素中含硫氨基酸较多, 1 分子拟南芥钙调素亚型 2 中含有 9 个蛋氨酸和 1 个半胱氨酸, 因此 $^{35}\text{S}$  的掺入率就较高. 此外,  $^{35}\text{S}$  同位素属于中强度软  $\beta$  射线, 穿透力较弱, 容易防护, 且其半衰期为 87 d, 对于蛋白质标记、提取纯化及后续的生物实验来说比较适宜. 基于上述原因我们开展了用 $^{35}\text{S}$  标记氨基酸混合物在工程菌中制备 $^{35}\text{S}$ -ACaM2 的工作.

根据国外文献报道我们经优化摸索建立了制备快速、得率较高、纯度及放射活度也很高的 $^{35}\text{S}$ -ACaM2 标记方法, 其中的液闪测定不仅可以快速确定收集管的 cpm 值, 确定蛋白质高峰管, 而且同时还可检测出 $^{35}\text{S}$ -CaM 的标记效率、估测蛋白质浓度, 我们认为这是一种快速、有效得到标记物几个方面信息的好方法. 所制备的 $^{35}\text{S}$ -ACaM2 具有  $\text{Ca}^{2+}$  依赖的电泳行为变化特性及可高灵敏度识别钙调素结合蛋白, 我们已将其用于我室细胞外钙调素及钙调素结合蛋白的研究中, 有关工作目前正在顺利进行.

### 参 考 文 献

- 1 Fromm H, Chua N H. Cloning of plant cDNAs encoding calmodulin-binding proteins using  $^{35}\text{S}$ -labeled recombinant calmodulin as a probe. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1992, **10** (2): 199~206
- 2 李家旭, 白 娟, 王学臣, 等. 生物素标记钙调素用于植物钙调素结合蛋白的检测. *植物生理学报*, 1994, **20** (2): 157~162
- 3 Li J X, Bai J, Wang X C, *et al.* *Acta Phytophysiologic Sinica*, 1994, **20** (20): 157~162
- 4 Raymond E Z. Preparation of recombinant plant calmodulin isoforms. *Methods in Molecular Biology*, 2001, **172** (7): 1~7
- 4 Michael A L, O'Day D H. Production of  $^{35}\text{S}$ -labeled proteins in *E. coli* and their use as molecular probes. *Methods in Molecular Biology*, 1994, **31**: 389~396

## Preparation of Plant Recombinant $^{35}\text{S}$ Calmodulin in *E. coli* \*

CUI Si-Juan<sup>\*\*</sup>, GUO Xiao-Qiang<sup>\*\*</sup>, MAO Guo-Hong, ZHAO Jun-Feng,  
SUN Ying, BAI Juan, MA Li-Geng, SUN Da-Ye<sup>\*\*\*</sup>

(Laboratory of Molecular and Cell Biology, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China)

**Abstract**  $^{35}\text{S}$ -ACaM2 was produced by using  $^{35}\text{S}$ -labeled amino acid mixture in *E. coli*. SDS-PAGE and autoradiograph indicated that high-purified, high-specific radioactivity  $^{35}\text{S}$ -ACaM2 was obtained. Electrophoresis character of  $^{35}\text{S}$ -ACaM2 is the same as that of unlabeled ACaM2 with  $\text{Ca}^{2+}$  or EGTA. Dot-blot and NC overlay experiment showed that  $^{35}\text{S}$ -ACaM2 could be used to detect calmodulin-binding proteins as a sensitive probe.

**Key words**  $^{35}\text{S}$ -ACaM2, plant, *E. coli*

\* This work was supported by grants from The National Basic Research Programs of China (G1999011700) and The Youth Fund of National Science Foundation of China (30025024).

\*\* These two authors contributed equally to this work.

\*\*\* Corresponding author. Tel: 86-311-6049941, E-mail: sundaye@heinfo.net

Received: January 15, 2002 Accepted: March 6, 2002

## 欢迎订阅《生物技术通讯》

《生物技术通讯》是军事医学科学院生物工程研究所主办的关于生物技术的专业性学术刊物(国内统一刊号: CN11-4226/Q, 国际标准刊号: ISSN 1009-0002), 是国家科技部中国科技论文统计与分析源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊。本刊主要报道生物技术(生物工程)及所有相关学科领域的最新科研成果与进展。主要栏目有: 研究报告、技术方法、研究简报、专论、综述、论坛、讲座、经验交流等。读者对象主要为从事生物技术及其在生物医学、工业、农业、环保等领域应用的科研、教学、管理人员, 大专院校相关专业师生及有关工程技术人员, 以及其他对生物技术感兴趣的人员。欢迎订阅、欢迎供稿、欢迎刊登广告。

《生物技术通讯》为大16开本双月刊, 80页高档轻涂纸印制, 每期定价10元, 全年60元。国内外公开发行, 国内邮发代号: 82-196, 国外发行代号 BM 1433。编辑部办理邮购业务。

邮政编码: 100071, 地址: 北京丰台东大街20号

电话: 010-66948856; 传真: 010-63895646

电子信箱: biolett@bj163.com, swtx@chinajournal.net.cn