

- 9 李东宁, 桂璐璐, 宋时英等. 蝮蛇蛇毒突触前神经毒素的结晶与分子聚集. 科学通报, 1995, 40 (1): 80~82

Observation of Polymerism and Isomerism of β -Agkistrodotoxin. REN Huimin, JI Yonghua (Shanghai Institute of Physiology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

Abstract β -Agkistrodotoxin (β_1 -AgTx), a presynaptic neurotoxin obtained from the venom of snake *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus* (Jiangshu and Zhejiang Province, China) was further purified by the method of preparative electrophoresis. The polymerism was found in the native component of β_1 -AgTx and the puri-

fied β_1 -AgTx-OH⁻ which was solubilized in the slight basic solution (pH 7.5) by SDS-PAGE analysis, however, the amount of polymers seems to be stable observed in the different days. Moreover, by two-dimensional electrophoresis analysis, it was found that both components of β_1 -AgTx and β_1 -AgTx-OH⁻ were composed of three isoforms (pI 7.0, 5.8 and 5.4) with different contents, and the rate of content of isoforms in the component of β_1 -AgTx-OH⁻ was changeable observed in the different days, but not in the β_1 -AgTx.

Key words β -Agkistrodotoxin (β_1 -AgTx), β_1 -AgTx-OH⁻, polymerism, isomerism

腺苷酸激酶基因在大肠杆菌中的可溶性高表达

静恩烜 周波 罗杰 张洪杰

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 报道了鸡肌腺苷酸激酶基因的克隆和在温控启动子 P_{RPL} 调控下在大肠杆菌中的可溶性高效表达. SDS-PAGE 分析表明, 鸡肌腺苷酸激酶的含量可占大肠杆菌细胞总蛋白含量的 38%. 利用 Johnson 等的干冰/乙醇-冰水浴反复冻融法, 可将此重组蛋白进行富集, 纯度可达 85% 以上. 鸡肌腺苷酸激酶可与抗兔肌腺苷酸激酶单克隆抗体产生强的交叉反应.

关键词 大肠杆菌, 腺苷酸激酶, 可溶性高表达

腺苷酸激酶 (adenylate kinase, AK, EC. 2.7.4.3) 广泛存在于生命有机体中, 它催化 $MgATP + AMP \rightleftharpoons MgADP + ADP$ 反应, 通过这个反应来维持腺苷酸组成成分的体内平衡, 是有机体中一种重要酶类. 人类红细胞中 AK 酶的遗传缺陷会导致非球形红细胞溶血性贫血症; 在大肠杆菌细胞中 AK 酶结构基因的损伤可产生条件致死突变. 在脊椎动物中, AK 酶至少有两种类型的同工酶: 肌型 AK 酶 (AK1) 和肝型 AK 酶 (AK2). 这两种类型的酶的组织分布和在细胞内的定位不同, 而彼此

间在催化和免疫特性方面也不尽相同^[1,2]. 人们对肌型 AK 酶的研究比较深入, 对来自人、牛、猪、兔等 AK 酶的氨基酸序列分析表明, 它们具有相似的一级结构. X 射线衍射分析、核磁共振以及动力学的研究提示, 肌型 AK 酶分子中有分别与 $MgATP/MgADP$ 和 AMP/ADP 核苷酸相结合的位点, 然而到底哪些氨基酸残基参与同核苷酸的结合仍不完全清楚. 近来无论从晶体学还是从动力学的研究都

指出, 兔肌 AK 酶具有构象的多型性. 这种多型性是否也存在于其他物种的 AK 酶呢, 其在此酶蛋白的结构与功能关系中的意义是什么以及这种构象多型性的机理是什么? 都是值得深入研究的问题. 为此我们对鸡肌 AK 酶基因进行了克隆和表达.

Kishi 等^[3,4]首先对鸡肌 AK 酶的 cDNA 进行了分离和测序并利用 tac 启动子在大肠杆菌中对其进行了表达, 然而其表达量较低, AK 酶蛋白量只占细菌总蛋白量的 10% 左右. 为提高酶蛋白的表达量, 满足研究工作的需要, 我们将鸡肌 AK 酶基因在温控启动子 P_{RPL} 的调控下进行了高效可溶性表达, 其表达量可占细菌总蛋白量的 38%.

1 材料和方法

1.1 菌株及质粒

E. coli DH5 α (supE44 Δ LacUI69 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1) 作为本实验的受体菌. pBV220 含有 P_{RPL} 温控启动子及为温度敏感的阻遏蛋白 cI 编码的基因 cI 857, 由张智清博士惠赠. pKK-cAK1 含有为鸡肌 AK 酶全部氨基酸序列编码的 cDNA 序列, 由 Inoue 博士惠赠.

1.2 DNA 遗传工程操作

限制性内切酶和 T4DNA 连接酶购自 Promega 公司, 各种酶反应条件按厂家说明书进行. 质粒的分离、重组及转化按 Sambrook 等^[5]的方法进行.

1.3 细菌的培养、诱导及表达产物分析

将含有鸡肌 AK 酶基因的表达质粒 pBV-AK 的 *E. coli* DH5 α 于 LB 培养基 (含 50 mg/L 氨苄青霉素) 在 30℃ 隔夜培养, 然后按 1:50 稀释接入相同培养基中, 在 30℃ 继续培养至 A_{600} 为 0.5~0.6 后, 42℃ 诱导 5 h, 使在 P_{RPL} 温控启动子调控下的 AK 酶基因表达.

根据 Johnson 等^[6]所报道的“反复冻融法”可有效地将分子质量在 8.5~29 ku 的可溶性重组蛋白从大肠杆菌细胞质中释放出来,

而不为大量的受体菌内源蛋白所污染, 为此我们利用 Johnson 的“反复冻融法”来检测 AK 酶在大肠杆菌细胞中的可溶性表达. 4 ml 的上述细菌培养液所得到的菌体按 Johnson 法在干冰/乙醇浴-冰水浴中反复冻融 4 次, 每次 20 min, 然后加入 175 μ l 的 10 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 6.8、10 mmol/L β -巯基乙醇、0.3 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (PMSF), 继续在冰水浴中保温 1 h, 使重组蛋白充分释放出来. 离心后 (12 000 r/min, 4℃, 15 min) 将上清加入等体积的 2 $\times$ Laemmli 缓冲液, 在 100℃ 加热 5 min, 此样品作为可溶性重组蛋白抽提物. 将与上述同样体积的培养液所得到的菌体悬浮于 350 μ l 的 Laemmli 缓冲液中, 100℃ 加热 5 min 后离心取上清, 此样品作为全细胞裂解液. 将从等体积的培养液所制备的蛋白样品在 15% SDS-PAGE 进行电泳分析; 蛋白质经考马斯亮蓝 R250 染色、脱色后用 LKB 激光光密度计扫描定量.

1.4 AK 酶活性测定

为确定工程菌中鸡肌 AK 酶基因的表达, 将相同细胞密度的分别含有鸡肌 AK 酶基因的表达质粒 pBV-AK 和 pBV220 载体的细菌培养物离心, 所得菌体按上述 Johnson “反复冻融法”制备出可溶性重组蛋白抽提物, 然后测定蛋白样品中 AK 酶活力. 1 ml 测活体系中含有 2.5 mmol/L ADP、2.1 mmol/L $MgAc_2$ 、6.7 mmol/L 葡萄糖、0.67 mmol/L $NADP^+$ 、20 单位的己糖激酶、10 单位的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.1. 以己糖激酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶为偶联酶, 在 30℃ 通过监测 340 nm 处光吸收的变化跟踪 $NADP$ 的还原反应来测定 AK 酶活力^[7].

1.5 基因表达的免疫检测

鼠抗兔肌 AK 酶的单克隆抗体由本实验室制备, 作为第一抗体; 与辣根过氧化物酶偶联的羊抗鼠 IgG 作为第二抗体; 四甲基联苯胺 (TMB) 作为生色底物; 兔肌 AK 酶作为阳性对照; 蛋白样品的制备同 1.4. 酶联免疫 (ELISA) 操作按常规进行, 反应终止后于

450 nm 测光密度.

2 结果与讨论

2.1 鸡肌 AK 酶基因表达质粒的构建

质粒 pBV 220 和 pKK-cAK1 被用于构建鸡肌 AK 酶基因表达质粒. pKK-cAK1 用 EcoR I 和 BamH I 酶解后, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离出 750 bp 左右的 EcoR I -BamH I DNA 片段, 此片段含有为鸡肌 AK 酶的编码序列 (582 bp) 及其 3' 非编码区序列. 当将此 EcoR I -BamH I 片段插入到 pBV 220 上的相同限制酶切位点后, 即产生 pBV-AK 质粒 (图 1). 为鸡肌 AK 酶编码的基因被插入到

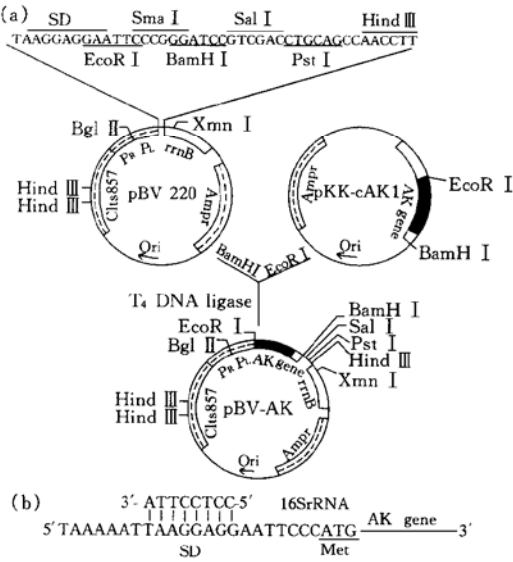


图 1 表达质粒 pBV-AK 构建

(a) pBV-AK 的构建; (b) SD 的核苷酸序列.

P_{RPL} 启动子的下游, 强转录终止序列 $rrnBT_1T_2$ 位于 AK 基因下游. 这样, AK 基因处于为 cI857 温度敏感的阻遏蛋白控制下的 P_{RPL} 启动子的双重调控之下. 整个基因处于正确的阅读框架中, 起始密码 ATG 与一长的 SD 序列之间的距离为 7 bp, 此 SD 序列有 8 个碱基与 16 S rRNA 3' 端序列相互互补. Gold 研究指出, 与短的 SD 序列 (5 bp) 相比, 长的 SD 序列能更有效地起始 mRNA 的转译,

且转译效率同 SD 序列与起始密码 ATG 之间的距离无关^[8]. 由于此 SD 序列埋于富 A + T 区, 可避免在此形成二级结构, 从而有利于核糖体的有效结合. 此外, 由于此表达质粒上含有为温度敏感的阻遏蛋白 cI 编码的基因 cI 857, 所以 pBV-AK 可以被转化入不含有 cI 857 阻遏蛋白基因的大肠杆菌受体细胞, 进行 AK 酶基因的表达.

2.2 AK 酶的可溶性高效表达

鸡肌 AK 酶在 *E. coli* 细胞中的表达首先通过 15% SDS-PAGE 检测. SDS-PAGE 结果指出, 含有 pBV-AK 的 *E. coli* DH5 α 细胞裂解液与含有 pBV 220 的细胞裂解液相比, 在分子质量为 22 ku 处有一额外的蛋白带, 此分子质量与从鸡肌 AK 酶 cDNA 核苷酸序列^[3]所推算出来的氨基酸组成结果相一致 (图 2b).

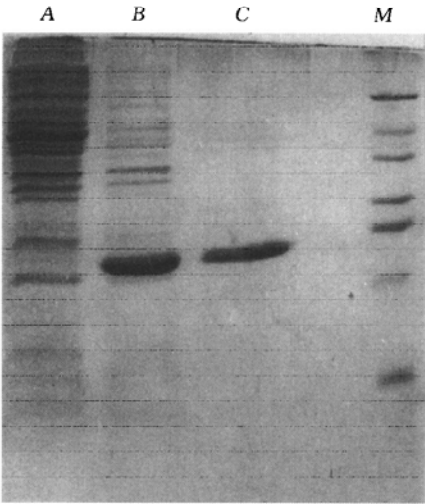


图 2 鸡肌 AK 酶在 *E. coli* 细胞中表达的 SDS PAGE 分析

样品制备如文中所述. A: 含载体 pBV 220 的受体菌全细胞裂解液; B: 含 AK 酶表达质粒 pBV-AK 的工程菌全细胞裂解液; C: 按 Johnson 法从工程菌中制备的可溶性蛋白抽提物. M: 分子质量标准, 从上到下分别为 66、44、36、29、24、20.1 和 14.2 ku.

激光光密度计扫描定量指出, 所表达的重组蛋白的含量可占大肠杆菌细胞总蛋白量的 38%. 对分别来自于含有鸡肌 AK 酶基因表达

质粒 pBV-AK, 和只含有载体 pBV220 的大肠杆菌 DH5 α 可溶性蛋白抽提物中 AK 酶活力测定结果指出, 含 pBV-AK 的抽提物中的酶活力比只含 pBV220 样品中的酶活力要高出 100 倍以上. 免疫检测进一步证明鸡肌 AK 酶的表达, ELISA 测试结果表明, 与兔肌 AK 酶一样, 来源于含 pBV-AK 细胞的蛋白样品同抗兔肌 AK 酶的单克隆抗体呈强阳性反应 (在抗体稀释 100 倍、1 000 倍时, A_{450} 的吸收值分别为 1.036 和 0.860), 而来源于含 pBV220 细胞的蛋白样品与抗兔肌 AK 酶的单克隆抗体不产生免疫反应 (A_{450} 的吸收值分别为 0.023 和 0.008, 相当于本底水平). Tanizawa 等^[2] 也曾报道了兔抗猪肌 AK 酶抗血清同鸡肌 AK 酶有免疫交叉反应, 而同大肠杆菌细胞中的 AK 酶无交叉反应, 这一结果与我们的结果相一致. 这种不同物种间的免疫交叉反应也是它们一级结构具有较高同源性的反映.

当我们将含有 pBV-AK 质粒的大肠杆菌细胞裂解液和其可溶性蛋白抽提物的 SDS-PAGE 图相比较时, 可以看到二者具有几乎相同密度的鸡肌 AK 酶蛋白带 (图 2b, c), 这表明鸡肌 AK 酶在大肠杆菌中是完全可溶性表达. 通过冻融法可以将此 AK 酶富集至纯度达 85% 以上 (图 2c). 虽然 Johnson 等^[6] 指出, 利用反复冻融法可以得到电泳纯的重组蛋白样品, 但当将此法用于大量制备时, 很难避免不同量的受体细胞内源蛋白的污染. 然而, 将此方法用于可溶性重组蛋白的第一步纯化是完全可取的.

值得指出的是, 我们曾得到一株超高表达的工程菌株, 重组 AK 酶的表达量可达细胞总蛋白的 60%, 然而 AK 酶的超高表达严重地抑制工程菌的正常生长. 鸡肌 AK 酶在大肠杆菌中可溶性高表达, 为对其结构功能研究打下基础.

参 考 文 献

1 Frank R, Trosin M, Tomasselli A G *et al.* Mitochondrial

adenylate Kinase (AK₂) from bovine heart. *Eur J Biochem*, 1984, **141** (3): 629~ 636

2 Noda L. *The Enzymes* Orlando F L: Academic press, 1973, **8**: 279~ 305

3 Kishi F, Maryyama M, Tanizawa Y *et al.* Isolation and characterization of cDNA for chicken muscle adenylate Kinase. *J Biol chem*, **261** (6): 2942~ 2945

4 Tanizawa Y, Kinshi F, Kaneko T. High level expression of chicken muscle adenylate kinase in *Escherichia coli*. *J Biochem*, (Tokyo), 1987, **101** (5): 1289~ 1296

5 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 34~ 143

6 Johnson B H, Hecht M H. Recombinant proteins can be isolated from *E. coli* cells by repeated cycles of freezing and thawing. *Bio/Technology*, 1994, **12** (13): 1357~ 1360

7 Zhang Y L, Zhou J M, Tsou C L. Inactivation precedes conformation change during thermal denaturation of adenylate kinase. *Biochim Biophys Acta*, 1993, **1164** (1): 61~ 67

8 Gold L. Posttranscriptional regulatory mechanisms in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem*, 1988, **57**: 199~ 233

Soluble Expression of Chicken Muscle Adenylate Kinase in *Escherichia coli*. JING Enxuan, ZHOU Bo, LUO Jie, ZHANG Hongjie (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract Chicken muscle adenylate kinase was overproduced in soluble form under the transcriptional control of the bacterial phage lambda P_RPL promoters regulated by temperature sensitive repressors. SDS-PAGE analysis demonstrated that the enzyme was produced to the extent of as much as 38% of the total cellular protein. The soluble recombinant enzyme can be released from bacterial cells and enriched to purity of more than 85% by the Johnson's freeze/thaw method. Mouse anti-rabbit muscle adenylate kinase monoclonal antibody can strongly crossreact with the recombinant enzyme.

Key words *Escherichia coli*, adenylate kinase, soluble expression