

细菌视紫红质 E204Q 和 I119T/T121S/A126T 突变体的构建及其功能研究 *

宋景娇¹⁾ 钟 声²⁾ 张 悦²⁾ 曹军卫^{1)**} 胡坤生^{2)**}

(¹⁾武汉大学生命科学院, 武汉 430072; ²⁾中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 应用定点突变的方法获得了细菌视紫红质 (bacteriorhodopsin, BR) 的单突变体 BR_{E204Q} 和三突变体 BR_{I119T/T121S/A126T}。通过功能研究发现, BR 蛋白的单突变体 BR_{E204Q} 的 M 态寿命为 7.10 ms, 三突变体 BR_{I119T/T121S/A126T} 的 M 态寿命为 8.23 ms, 均较野生型 BR 蛋白 (6.23ms) 有所延长, 三突变体表现得更为显著, 其 M 态延长时间可超出野生型的 32%。同时单突变体 BR_{E204Q} 和三突变体 BR_{I119T/T121S/A126T} 的质子泵功能也均有改变, 都比野生型 BR 蛋白有所下降, 其中三突变体 BR_{I119T/T121S/A126T} 下降得更为明显。

关键词 细菌视紫红质, 突变体, M 态中间体, 质子泵功能

学科分类号 Q93

细菌视紫红质 (bacteriorhodopsin, BR) 是存在于嗜盐菌盐沼盐杆菌 (*Halobacterium salinarum*) 紫膜上唯一的蛋白质, 分子质量约为 26 ku。每个 BR 分子由含 248 个氨基酸残基的单一肽链和一个视黄醛分子组成, 肽链在质膜上卷曲折叠形成 7 个跨膜螺旋, 视黄醛分子通过质子化的希夫碱基结合到 BR 蛋白 G 螺旋第 216 位赖氨酸的 ϵ 氨基上。在吸收光子后, BR 将质子泵出细胞外, 在细胞膜两侧形成质子梯度, 质膜上的 ATP 合成酶利用质子梯度合成 ATP。BR 分子在完成质子泵功能的同时, 伴随着一个光循环的过程, 视黄醛的异构化在光循环中起着关键的作用, BR 分子被光激发后, 通过热弛豫, 经历视黄醛构型为 13- 顺式的 K、L、M、N 态和全反式的 O 态的转变, 最后返回到具有全反式视黄醛构型的基态, 从而完成一个光循环过程^[1]。O 态也可通过 P 态和 Q 态完成一支光循环。

M 态是天然 BR 分子光循环中一个很重要的中间态, 其吸收峰波长在 412 nm, 与光适应 BR 基态吸收峰波长 568 nm 相距很远, 故可以利用 M 态与基态互变的光致变色特性进行信息处理和存储。但是天然 BR 蛋白的 M 态寿命为 ms 数量级, 远不能满足信息存储应用的需要。因此, 必须设法延长 M 态的寿命。提高 M 态的寿命有很多方法^[2], 其中最直接有效的方法是基因修饰^[3]。

国外研究表明, 通过定点突变得到的 BR 蛋白的单突变体 BR_{E204Q} 与野生型 BR 分子相比, O 态的形成量明显增多, 且寿命也有所延长^[4]。通过半随机

突变得到的 BR 蛋白的三突变体 BR_{I119T/T121S/A126T} 也被证明了具有长寿命的 O 态^[5]。

长寿命的 O 态可能会导致 BR 蛋白回到基态的时间延长, 从而有可能导致 M 态的寿命也随之延长^[6]。所以我们构建单突变体 BR_{E204Q} 和三突变体 BR_{I119T/T121S/A126T}, 以研究这些突变体对 BR 蛋白 M 态寿命和质子泵功能的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和野生型 BR 蛋白 BR 蛋白表达缺陷型菌株——盐沼盐杆菌 (*Halobacterium salinarum*) L33 (*bop* 基因中插入 ISH₂)^[5]由浙江大学吴敏教授赠予。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α (武汉大学生命科学院保存)。野生型 BR 蛋白由中国科学院生物物理研究所胡坤生教授提供。

1.1.2 基因和载体 质粒 pUCMB-*bop* (在 pUC 质粒上连接有 1.2 kb 的 DNA 片段, 包含有 *bop* 基因及启动子^[6], 此片段两端分别含有 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点), 表达载体 pXLNovR (大肠杆菌与嗜盐菌的穿梭质粒, 约 13 kb, 在大肠杆菌中表现为四

*中国科学院知识创新工程重大项目 (KJ CX1-SW07) 和国家自然科学基金资助项目 (30170235)。

** 通讯联系人。

曹军卫, Tel: 027-87872137, E-mail: caojw@whu.edu.cn

胡坤生, Tel: 010-64888580, E-mail: huks@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2004-12-03, 接受日期: 2005-02-28

环素抗性, 在盐沼盐杆菌中表现为新生霉素抗性) 为 Richard Needleman(Wayne State Univ., USA) 和 Esteve Padrós (Unitat de Biofísica., Spain) 教授惠赠, 克隆载体 pUC-18 (武汉大学生命科学学院保存).

1.1.3 主要试剂. 连接酶、聚合酶、限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司, 氨苄青霉素和四环素购自上海生工生物工程技术服务公司, 新生霉素和 PEG-600 购自 Sigma 公司, DNA 回收试剂盒购自 MBI 公司.

1.1.4 培养基. 盐沼盐杆菌液体生长培养基 (HB) 参照文献[7]. 盐沼盐杆菌再生液体培养基为在 HB 培养基中加入 15% 蔗糖和 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.2). 再生半固体培养基则是在再生液体培养基中加入 0.6% 琼脂. 再生固体培养基是在再生液体培养基中加入 1.2% 琼脂. 大肠杆菌液体生长培养基 (LB) 参照文献[8], 大肠杆菌固体培养基为在 LB 中加入 1.2% 琼脂.

1.1.5 溶液. 原生质形成液和原生质稀释液均参考文献[9].

1.2 方法

1.2.1 *bop* 基因的定点突变.

应用 PCR 引入突变的方法, 以 pUCMB-*bop*

为模板, 构建突变基因 *bop*_{T395C/A400T/G415A} 和 *bop*_{G649C}.

构建突变基因过程中所用到的引物序列分别为: *bop* 基因上游引物 FP_W 的序列为 5' CCGG GATCC GACGTGAAGATGGGGCTC 3' (方框内为 *Bam*H I 酶切位点), 下游引物 RP_W 的序列为 5' CGGCGGTCCGCGCC AAGCTT CTGGAATC 3' (方框内为 *Hind*III 酶切位点).

三突变 *bop*_{T395C/A400T/G415A} 突变基因上游引物 FP_{M1} 的序列为 5' ATGA CCGG TCCGGCCTGGTCGGC ACAC 3', 下游引物 RP_{M1} 的序列为 5' GTG TGC CGACCAGGCCGG ACCCG TCAT 3' (方框内为突变位点).

单突变 *bop*_{G649C} 突变基因上游引物 FP_{M2} 的序列为 5' GTGCCGCTGAACATC AGACGCTGCTG 3', *bop*_{G649C} 突变基因下游引物 RP_{M2} 的序列为 5' CAGCAGCGTCT GATGTT CAGCGGCAC 3' (方框内为突变位点).

三突变 *bop*_{T395C/A400T/G415A} 构建过程见图 1 所示, 以质粒 pUCMB-*bop* 为模板, 用 FP_W 和 RP_{M1} 作为一对引物合成片段 A, FP_{M1} 和 RP_W 作为另一对引物合成片段 C. 上述 PCR 的反应条件为: 95℃ 5 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 30

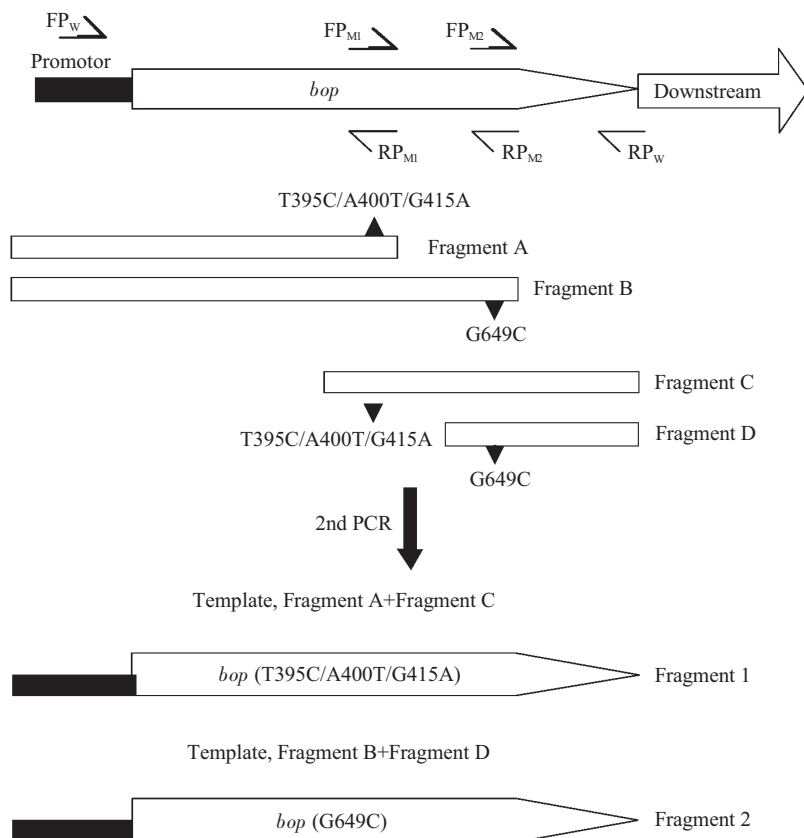


Fig.1 Outline of the preparation of DNA fragments which contain tow types of mutated *bop* genes

个循环; 72℃ 10 min. 然后以片段 A 和 C 作为下一轮重组 PCR 的模板, 以 FP_W 和 RP_W 为引物合成 $bop_{T395C/A400T/G415A}$. 重组 PCR 分两步进行, 第一步先不加引物, 反应条件为: 95℃ 5 min; 94℃ 30 s, 35℃ 30 s, 72℃ 90 s, 共 4 个循环; 72℃ 10 min. 第二步加入引物 FP_W 和 RP_W , 反应条件为: 95℃ 4 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 90 s, 共 30 个循环; 72℃ 10 min. PCR 产物 $bop_{T395C/A400T/G415A}$ 即片段 1.

单突变 bop_{G649C} 构建的过程如图 1 所示, 以质粒 pUCMB- bop 为模板, 用 FP_W 和 RP_M 作为一对引物合成片段 B, FP_M 和 RP_W 作为另一对引物合成片段 D. PCR 的反应条件同上. 然后以片段 B 和 D 作为下一轮重组 PCR 的模板, 以 FP_W 和 RP_W 为引物合成 bop_{G649C} . 重组 PCR 分两步进行, 第一步先不加引物, 反应条件同上. 第二步加入引物 FP_W 和 RP_W , 反应条件同上. PCR 产物 bop_{G649C} 即片段 2.

1.2.2 表达质粒的构建.

将构建好的 $bop_{T395C/A400T/G415A}$ 和 bop_{G649C} 基因片段用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 分别与用同样双酶切的克隆载体 pUC-18 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 涂布在含有氨苄青霉素的固体 LB 固体培养基上培养, 生长出的单菌落通过 PCR 和酶切鉴定的方法鉴定出阳性克隆子, 分别命名为 pUC-18- $bop_{T395C/A400T/G415A}$ 和 pUC-18- bop_{G649C} .

将阳性克隆子接种于含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中培养, 提取质粒 pUC-18- $bop_{T395C/A400T/G415A}$ 和 pUC-18- bop_{G649C} , 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 回收酶切的 $bop_{T395C/A400T/G415A}$ 和 bop_{G649C} 基因片段, 并将其分别连接到用同样双酶切的表达质粒 pXLNovR 上, 转化大肠杆菌 DH5 α , 涂布在含有四环素的 LB 固体培养基上培养, 生长出的单菌落通过 PCR 和酶切鉴定的方法筛选阳性克隆子, 分别命名为 pXLNovR- $bop_{T395C/A400T/G415A}$ 和 pXLNovR- bop_{G649C} . 并经过序列测定, 确定引入的突变位点是否正确.

1.2.3 嗜盐菌的转化. 嗜盐菌的转化方法参考文献 [9], 稍作改进. 按 2% 的接种量将 L33 细胞接种于 HB 培养基中活化培养至 A_{550} 为 1.0~1.5, 取 3 ml 培养物, 离心去上清, 收集菌体, 用 600 μ l 原生质形成液悬浮菌体, 再加入 60 μ l 0.5 mol/L EDTA 混匀, 镜检观察几乎所有的细胞都形成原生质体后, 分别取 200 μ l 原生质体悬液转到含有

约 1~10 μ g PXLNovR- $bop_{T395C/A400T/G415A}$ 质粒和 PXLNovR- bop_{G649C} 质粒的管中 (质粒均用 20 μ l 蒸馏水预先溶解); 同时取 200 μ l 原生质体悬液至 20 μ l 蒸馏水的管中作为阴性对照, 于室温放置 20 min, 再向每管中缓慢加入等体积 (220 μ l) 过滤除菌的 PEG-600^[10] (60%, 质量体积比, 纯化的 PEG-600/未加缓冲液的原生质形成液), 混匀, 于室温放置 20 min, 每管加入 1 ml 原生质体稀释液, 2 000 r/min 离心 30 min, 去上清, 每管加入 1 ml 的再生液体培养基, 37℃ 静置培养过夜. 然后将其分别与 10~15 ml 含新生霉素^[11]的再生半固体培养基混合, 铺在含新生霉素的再生固体培养基的平皿上面, 于 37℃ 避光培养, 7 天后光照培养, 在培养基中筛选紫色菌落.

1.2.4 紫膜的提取. 挑取平皿上紫色单菌落于含新生霉素的 HB 培养基中, 37℃, 240 r/min 培养约 50 h 后, 按 2% 的接种量扩大培养. 培养约 50~70 h 后, 将摇床的转速调至 150 r/min, 继续培养 4~7 天后收集菌体, BR 蛋白的提取方法参照文献 [7, 12].

1.2.5 紫外 - 可见光谱测定. 样品悬浮于双蒸水, 使用紫外 - 可见分光光度计 (HitachiU-2010) 对 BR 蛋白进行紫外 - 可见吸收光谱的测定.

1.2.6 M_{412} 态闪光动力学的测定. M_{412} 态闪光动力学的测定和分析遵从指数拟合方法^[13]. 检测光经狭缝和单色仪 (波长调定为 412 nm), 穿过可调恒温的样品池 (实验温度为 25℃), 经另一单色仪 (波长亦为 412 nm) 以降低杂散光影响, 再经过光电转换放大系统转变成电信号, 并输出到波形贮存器 (wavesaver, EPIC Instruments, USA), 随后由计算机采样处理. 闪光通过一块滤色片后照射样品, 计算机控制波形贮存器触发闪光灯 ($t_{1/2}=200 \mu$ s), 使采样和闪光同步. 信号采集时通过多次叠加平均来提高信噪比, 计算机采集的数据用最小二乘法——Marquardt 方法和 Johnson 方法进行多指数拟合.

1.2.7 质子泵功能的检测. 质子泵功能的检测方法是基于 BR 蛋白被光激发后, 由于释放质子与从介质中摄取质子的时间差, 而使介质瞬间酸化的原理. 测量时将单色仪的波长调定为 457 nm, 因为在 457 nm 时, 染料 Pyranime 对 pH 值微小变化的灵敏度最高. 样品在检测同时用不加染料的样品作为对照. 当溶液碱化时, 染料吸收增加, 酸化时减小, 所以测出来的前后变化值为负值.

2 结果和讨论

2.1 *bop* 基因的定点突变及其在宿主菌中的表达

通过测序结果, 可知用以上 PCR 引入突变的方法构建的 *bop* 基因, 已如我们所设计的突变位点, 产生了突变基因, 即 *bop*_{T395C/A400T/G415A} 和 *bop*_{G649C}, 将它们连接到表达载体 pXLNovR 后, 在宿主菌株 L33 中的表达产物为含有突变氨基酸的 BR 蛋白 BR_{I119T/T121S/A126T} 和 BR_{E204Q}.

2.2 BR 蛋白的紫外-可见吸收光谱

野生型 BR 蛋白, 单突变 BR_{E204Q} 和三突变 BR_{I119T/T121S/A126T} 的紫外-可见吸收光谱图见图 2, 野生型 BR 蛋白的最大吸收峰为 567 nm, 单突变

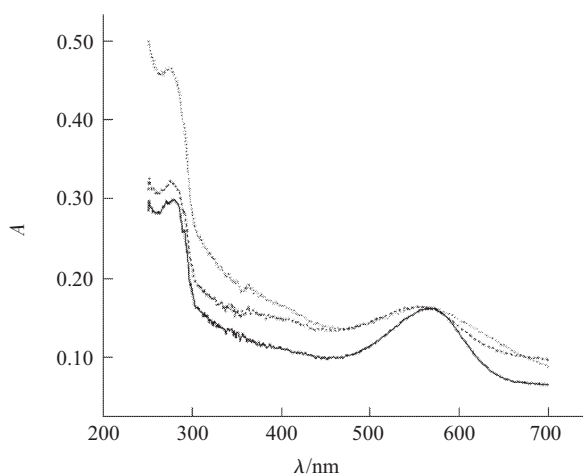


Fig.2 UV-Vis absorption spectrum

—: Wild-type BR; ----: BR_{E204Q}; ·····: BR_{I119T/T121S/A126T}.

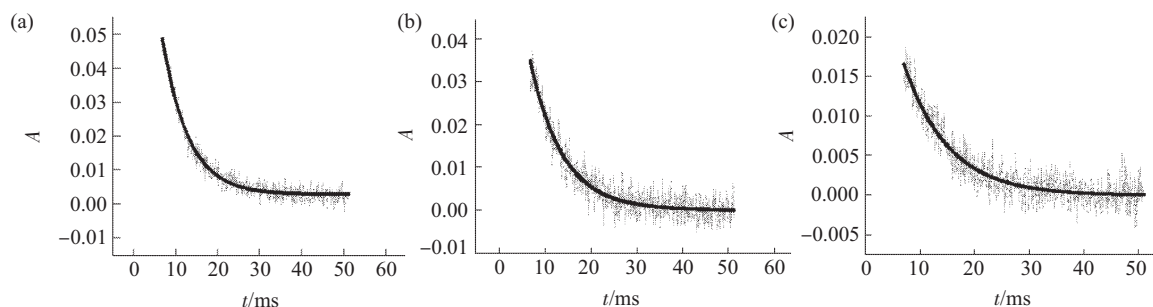


Fig.3 M₄₁₂ Flash-dynamics spectrum

(a) the wild-type BR. ·····: M412 decay of PM, —: Fitting; (b) the mutant BR_{E204Q}. ·····: M412 decay of BR_{E204Q}, —: Fitting; (c) the mutant BR_{I119T/T121S/A126T}. ·····: M412 decay of BR_{I119T/T121S/A126T}, —: Fitting.

已有许多不同紫膜蛋白的突变体用于功能的研究, 其中 D85 和 D96 作为质子传递的受体和供体有特别重要的作用, D85N 和 D96N 会影响到 BR

BR_{E204Q} 在 552 nm 和 570 nm 之间有比较宽的吸收峰, 其原因还有待进一步研究. 三突变 BR_{I119T/T121S/A126T} 在 555 nm 和 572 nm 之间有一个比较宽的吸收峰, 推测此吸收峰可能是由于 BR 蛋白 D 螺旋氨基酸的改变, 导致部分 BR 蛋白三聚体解体为 BR 蛋白单体^[4]的原因.

2.3 M₄₁₂ 中间态的闪光动力学光谱

所有样品用重蒸水悬浮, 在室温下测定. 野生型和突变型 BR 蛋白悬液的光循环中间体 M₄₁₂ 的闪光动力学光谱, 如图 3 灰线所示. 我们对其衰减过程 (毫秒量级) 进行双指数拟合, 但只有一个成分, 图 2 中黑线所示为拟合曲线. 对测量数据进行拟合的结果表明, 野生型 BR 分子 M 态的寿命为 6.23 ms (图 3 a), 单突体 BR_{E204Q} 的 M 态的寿命为 7.10 ms (图 3 b), 比野生型 BR 分子 M 态的寿命延长了 13.9%. 三突变体 BR_{I119T/T121S/A126T} M 态的寿命为 8.23 ms (图 3 c), 比野生型 BR 分子 M 态的寿命延长了 32.0%. 可见单突变和三突变 M 态寿命的延长与 O 态寿命的延长表现一致, 表明 M 态和 O 态之间的密切联系.

2.4 质子泵功能的检测

所有样品用重蒸水悬浮, 在室温下测定. 野生型和突变型 BR 分子的质子泵功能 P₄₅₀ 的检测结果见图 4. 检测结果表明单突变体 BR_{E204Q} 和三突变体 BR_{I119T/T121S/A126T} 的质子泵功能都有改变, 均比野生型 BR 蛋白有所下降, 其中三突变体 BR_{I119T/T121S/A126T} 下降更为明显.

的光循环和质子泵功能. 除了以上两个重要的氨基酸残基外, 其他突变体, 尤其是处于质子传递通道中的 20 多个残基以及处于视黄醛结合口袋中的 21

个残基, 都很有可能会对 BR 的光循环和质子泵产生影响. 国外已对此进行了相当多的研究, 国内还很少有关这方面的报道. 紫膜蛋白 E204 处于质子传递通道的终端, 是质子释放集团的重要部分. 从我们对 E204Q 突变体的光循环和质子泵功能研究结果表明, 其 M 态寿命比野生型的延长了 13.9%, 质子泵功能的效率明显下降. 这主要是因为 E204

作为质子释放基团, 因为 E204Q 的突变, 移除了质子释放集团中的一个羧基, 致使 E204Q 不能在正常时间内释放质子, 因而降低了 E204Q 的质子泵效率. 此外, 由于 M 态的形成和衰减在光循环中与质子的释放和摄取密切相关, 因此必将影响到 E204Q 突变体 BR 的 M 态寿命.

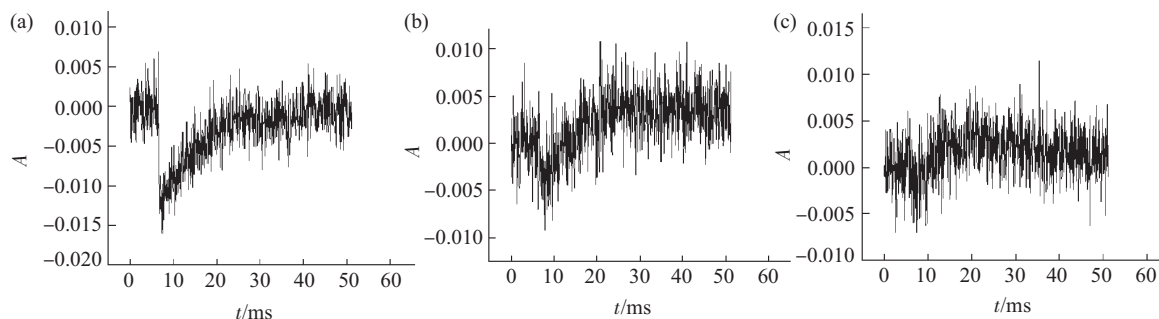


Fig.4 Proton-pump function

(a) the wild-type BR; (b) the mutant E204Q; (c) the mutant I119T/T121S/A126T.

我们选择 BR_{I119T/T121S/A126T} 三突变体的原因是因为其中 I119 和 T121 紧靠近视黄醛口袋残基的 M118、G122, 很可能会影响到视黄醛的异构化过程, 而视黄醛的异构化与光循环中间体的形成有直接关系, 必然也会影响到质子泵功能. 另一方面有文献报道, 三突变体 BR_{I119T/T121S/A126T} 比其他定点突变体和野生型 Q 态的生成量都多^[3]. Q 型中间态是 BR 用于光存储的重要中间态, 这可能为 BR 在光存储的应用方面开辟途径. Q 态由 O 态变化生成, 所以三突变体肯定影响到 O 态. O 态的变化很可能也会对 M 态有影响. 我们的实验证实三突变体的确延长了 M 态寿命, 并严重影响到质子泵功能. 这些研究结果为突变体的设计和功能研究奠定必要的基础.

参 考 文 献

- Wang J P, Link S, Heyes C D, *et al.* Comparison of the dynamics of the primary events of bacteriorhodopsin in its trimeric and monomeric states. *Biophys J*, 2002, **83**:1557~1566
- 王丽萍, 李宝芳, 江 龙. 蛋白质光学信息记录材料细菌视紫红质. 研究与开发, 2001, **2** (4): 1~5
Wang L P, Li B F, Jiang L. Research and Exploitation, 2001, **2** (4): 1~5
- Wise K J, Gillespie N B, Stuart J A, *et al.* Optimization of bacteriorhodopsin for bioelectronic device. *Biotechnology*, 2002, **20** (9): 387~394
- Brown L S, Sasaki J, Kandori H, *et al.* Glutamic acid 204 is the terminal proton release group at the extracellular surface of

- bacteriorhodopsin. *J Biol Chem*, 1995, **270** (45): 27122~27126
- Sarma S D, Rajbhandary U L, Khorana H G. Bacterio-opsin mRNA in wild type and bacterio-opsin deficient mutations in *Halobacterium halobium* strains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81** (1): 125~129
- Dunn R S, McCoy J M, Simsel M, *et al.* The bacteriorhodopsin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78** (11): 6744~6747
- Oesterhelt D, Stoerkenius W. Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fraction into red and purple membrane. *Methods Enzymology*, 1974, **31**: 667~678
- Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Press Laboratory Press, 1989. 908
- Cline S W, Lam W L, Charlebois R L, *et al.* Transformation methods for halophilic archaeobacteria. *Can J Microbiol*, 1989, **35**: 148~152
- Klebe R J, Harriss J V, Sharp Z D, *et al.* A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene*, 1983, **25**: 333~341
- Holmes M L, Dyal-Smith M L. A plasmid vector with a selectable marker for halophilic archaeobacteria. *J Bacteriol*, 1990, **172**: 756~761
- 徐 兵, 陈德亮, 胡坤生. 嗜盐菌的培养及紫膜分离纯化方法的改进. *生物化学和生物物理进展*, 2002, **29** (5): 827
Xu B, Cheng D L, Hu K S. *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (5): 857
- 蒋秋兴, 胡坤生. 菌紫质光循环中间体 M 的双相衰减: 蜂毒素及定点突变体的影响. *科学通报*, 1995, **40** (10): 940~943
Jiang Q S, Hu K S. *Chinese Science Bulletin*, 1995, **40** (10): 940~943
- Kerbs M P, Li W X, Halambeck T P. Intramembrane substitutions in helix D of bacteriorhodopsin disrupt the purple membrane. *J Mol Biol*, 1997, **267**: 172~183

Construction of Bacteriorhodopsin Mutant E204Q and I119T/T121S/A126T of PM Protein and Their Functional Research*

SONG Jing-Jiao¹⁾, ZHONG Sheng²⁾, ZHANG Yue²⁾, CAO Jun-Wei^{1)**}, HU Kun-Sheng^{2)**}

¹⁾Department of Microbiology, Wuhan University, Wuhan 430072, China;

²⁾Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract The single mutant BR_{E204Q} and tri-mutant BR_{I119T/T121S/A126T} of bacteriorhodopsin were constructed by directed-mutation method. The M₄₁₂ Flash-dynamics spectrum indicates that the life of M intermediate of the single mutant BR_{E204Q} is 7.10 ms and the life of M intermediate of the tri-mutant BR_{I119T/T121S/A126T} is 8.23 ms, whose lives of M intermediate are longer than that of the wild-type BR with life of the M intermediate 6.23 ms. The result shows that the tri-mutant has the longest M intermediate life which exceeds wild-type BR by thirty-two percent. The Proton-pump functional research of the two mutants illustrates that their proton-pump functions decrease compare with that of wild-type BR respectively and the proton-pump function of the tri-mutant BR_{I119T/T121S/A126T} is the weakest one.

Key words bacteriorhodopsin, mutant, M intermediate, proton-pump

*This work was supported by grants from The Key Projects of Chinese Academy of Sciences (KJCX1-SW07) and The National Natural Sciences Foundation of China (30170235).

**Corresponding author .

CAO Jun-Wei, Tel: 86-27-87872137, E-mail: Caojw@whu.edu.cn

HU Kun-Sheng, Tel: 86-10-64888580, E-mail: huks@sun5.ibp.ac.cn

Received: December 3, 2004 Accepted: April 28, 2005