



优化的绿色荧光蛋白在超嗜热嗜酸古菌冰岛硫化叶菌中的表达与应用

黄奇洪, 马家兴, 倪金凤, 申玉龙*

山东大学微生物技术国家重点实验室, 山东 济南 250100

摘要:【目的】开发可用于在极端嗜热嗜酸模式菌古菌冰岛硫化叶菌(*Sulfolobus islandicus*)中进行高效表达的 eCGP123 (enhanced consensus green protein variant 123) 荧光蛋白, 并用作 *S. islandicus* 的细胞内蛋白定位工具。【方法】绿色荧光蛋白突变体 eCGP123 具有极高的热稳定性、耐酸性和可逆的荧光特性等。本研究主要对 eCGP123 的基因根据 *S. islandicus* 密码子偏好性进行优化与合成, 在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中表达并研究其蛋白性质; 通过在 eCGP123 的 C 末端分别融合具有不同细胞内定位的蛋白(包括 *E. coli* 来源的 FtsZ 和 *S. islandicus* 来源的 UpsE、PCNA1 和 SiRe_1200 等), 构建 eCGP123 及其融合蛋白的表达菌株, 用激光共聚焦显微镜分析 eCGP123 及其融合蛋白在 *E. coli* 和 *S. islandicus* 活细胞中的亚细胞定位。【结果】我们确认了在 *E. coli* 中表达并纯化密码子优化后的 eCGP123 具有与野生型绿色荧光蛋白相同的吸光值和较高的热稳定性。细胞学分析显示细胞分裂相关蛋白 FtsZ 和 SiRe_1200 分别主要定位于 *E. coli* 和 *S. islandicus* 分裂细胞的中间; 鞭毛组分蛋白 UpsE 呈点状均匀分布, 可能定位于细胞膜上; DNA 复制滑动夹亚基 PCNA1 呈区域性点状分布, 暗示了 DNA 复制区域的位置。蛋白的亚细胞定位与预期结果基本吻合。【结论】绿色荧光蛋白 eCGP123 可以作为报告蛋白, 应用于 *S. islandicus* 细胞的蛋白定位分析中, 可作为该模式菌株中功能基因研究的重要工具, 但需要进一步优化条件。

关键词: 绿色荧光蛋白, eCGP123, 密码子优化, 冰岛硫化叶菌, 亚细胞定位

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)最早由 Shimomura 等于 1962 年在研究维多利亚多管水母(*Aequorea victoria*)中冷光蛋白 aequorin 时所发现^[1], 它是一种酸性、呈球状的可溶性生物发光蛋白, 在紫外光或蓝光激发下, 无论是单独存

在还是与其他蛋白质融合都具有自发荧光的特性, 而且基本上不影响融合蛋白的结构和功能以及细胞的正常生长。GFP 的分子量小, *gfp* 基因序列短, 目前已经广泛应用于真核生物和原核生物的基因表达标记、蛋白质的运输和定位、蛋白质

基金项目: 国家自然科学基金(31470200, 31670061); 中国博士后科学基金(11200077311030)

*通信作者。Tel/Fax: +86-531-88362903; E-mail: yulgshen@sdu.edu.cn

收稿日期: 2017-05-08; 修回日期: 2017-06-13; 网络出版日期: 2017-07-05

的相互作用、蛋白质构象变化以及生物传感器等研究领域。

由于野生型 GFP 及其大多数突变体的蛋白合成和折叠速度较慢, 荧光强度受表达温度和酸碱度的影响较大, 表达量较低, 在高温强酸下结构不稳定, 因此无法应用于高温及强酸、强碱条件下的微生物细胞中。Kiss 等以之前报道的绿色荧光蛋白突变体 CGP (consensus green protein) 为模板^[2], 通过反复的随机突变和筛选, 获得一个增强的绿色荧光蛋白突变体 eCGP123 (enhanced CGP variant 123)。eCGP123 全长 245 个氨基酸, 分子量约为 28 kDa, Gln62、Tyr63 和 Gly64 经环化和氧化形成发光基团。通过体外的生化性质鉴定发现, eCGP123 的激发光谱($\lambda_{\max}=495$ nm)和发射光谱($\lambda_{\max}=505$ nm)与野生型 GFP 的基本一致, 而其蛋白的热稳定性、耐酸性以及蛋白折叠效率均显著提高^[3]。因此, eCGP123 理论上可作为高温强酸条件下的荧光标记物。硫化叶菌(*Sulfolobus*)是泉古菌中可以进行遗传操作的模式菌株, 其生长条件为 pH 1.0–5.5、65–85 °C, 是好氧及兼性自养的古菌^[4]。虽然 Henche 等在研究嗜酸热硫化叶菌(*S. acidocaldarius*)细胞表面 IV 型菌毛不同结构缺失突变体对细胞被膜形成的影响时, 首次融合表达了 eCGP123^[5]。然而, eCGP123 能否用于硫化叶菌进行蛋白的亚细胞定位及体内蛋白互作研究还不清楚, 如果可行, 将极大促进该模式菌株中的各功能基因的研究。

本研究主要对 eCGP123 的基因进行密码子优化与合成, 鉴定表达蛋白的性质, 并将 eCGP123 与具有不同细胞定位的目的蛋白融合, 分别在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和冰岛硫化叶菌 (*S. islandicus*) 两种细胞中进行表达, 同时检测荧光分布, 分析目的蛋白的亚细胞定位, 探索 eCGP123 在 *S. islandicus* 活细胞中用于蛋白定位的可行性。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒与生化试剂

E. coli DH5 α 与 *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL 为本实验室保存, 菌株 *S. islandicus* E233S 是 *lacS* 和 *pyrEF* 基因双缺失菌株^[6]。所用载体为 pET-22b、*Sulfolobus-E. coli* 穿梭载体 pSeSD (带 *pyrEF* 标记基因)^[7]。限制性内切酶、DNA Ligation Kit 购自宝生物工程(太)有限公司(TaKaRa), EasyPfu DNA 聚合酶购自北京全式金公司, Gel Extraction Kit、Plasmid Mini Kit、Cycle-Pure Kit 购自 OMEGA 公司, HRP 标记的羊抗兔/羊抗鼠二抗、硫化叶菌固体培养基的凝固剂 Gelrite/Phytagel 购自美国 Sigma 公司, 抗 His-tag 的多克隆抗体购自杭州华安公司, Ni²⁺-NTA 琼脂糖树脂购自 Invitrogen 公司, 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 培养基

1.2.1 硫化叶菌 MCSV 液体培养基: 无机盐培养基(M)、0.2%酸水解酪蛋白(Casamino acid, C)、0.2%蔗糖(S)与 1 mL/L 1000 \times 维生素混合液(V), pH 3.3^[6]。

1.2.2 MTSV 液体培养基: 无机盐培养基(M)、0.2%蛋白胨(T)、0.2%蔗糖(S)与 1 mL/L 1000 \times 维生素混合液(V), pH 3.3。

1.2.3 MTAV 液体培养基: 无机盐培养基(M)、0.2%蛋白胨(T)、0.2%阿拉伯糖(A)与 1 mL/L 1000 \times 维生素混合液(V), pH 3.3。

1.2.4 硫化叶菌固体培养基: 在相应的液体培养基中增加 MgCl₂/Ca(NO₃)₂ 的含量至 10 倍, 并加入 0.8%的凝固剂 Gelrite/phytagel, pH 3.6–3.8。

1.3 eCGP123 基因的优化与合成

根据 eCGP123 的氨基酸序列^[8]和 *S. islandicus* 中密码子的偏好性, 由上海捷瑞生物工程有限公司优化 eCGP123 基因的密码子(不含终止密码

子)。优化后的 *eCGP123* 基因序列和所用引物的合成、基因的测序均由华大基因完成。

1.4 *eCGP123* 及其融合蛋白表达质粒的构建

从NCBI网站上分别查找 *E. coli* 中 *ftsZ* (EG10347) 以及 *S. islandicus* 中 *upsE* (SiRe_1879)、*pcna1* (SiRe_1602)和 *SiRe_1200* 等目的基因, 设计引物(表 1)并扩增出基因片段。将 *eCGP123* 基因分别连接到 pET-22b 和 pSeSD 质粒的 *Nde* I/*Sal* I 和 *Nde* I/*Mlu* I 酶切位点间, 测序成功后, 在 *eCGP123* 基因的 3'-末端连接上目的基因。其中, *ftsZ* 连接到 pET22b-*eCGP123* 的 *Sal* I/*Not* I 之间, 而 *upsE*、*pcna1* 和 *SiRe_1200* 分别连接到 pSeSD-*eCGP123* 的 *Mlu* I/*Sal* I 之间。通过测序, 最后得到 pET22b-*eCGP123*-C-His、pET22b-*eCGP123*-FtsZ-C-His、pSeSD-*eCGP123*-C-His、pSeSD-*eCGP123*-UpsE-C-His、pSeSD-*eCGP123*-PCNA1-C-His 和 pSeSD-*eCGP123*-SiRe_1200-C-His 等表达质粒。

1.5 *E. coli* 中蛋白表达与纯化

将表达质粒 pET22b-*eCGP123*-C-His 和 pET22b-*eCGP123*-FtsZ-C-His 通过热激法转入到 *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL 细胞中, 在 60 mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素、34 μ g/mL 氯霉素的 LB 液

体培养基中培养。当菌液 OD_{600} 值达到 0.4–0.6 时, 加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L, 在 37 °C 下继续振荡培养 4–6 h。4 °C、7000 \times g 离心 10 min, 收集菌体。加入 10 mL 破壁缓冲液 A (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 100 mmol/L NaCl), 充分重悬菌体沉淀并置于冰上进行超声破壁(功率 200 W, 超声时间 5 s, 间隔时间 5 s, 超声次数 100 次)。将裂解液于 4 °C、10000 \times g 离心 30 min。将蛋白上清于 80 °C 热处理 30 min, 10000 \times g 离心 15 min。将热处理后的蛋白上清于 4 °C 下进行硫酸铵(0.6 g/mL)沉淀过夜。10000 \times g 离心 15 min, 将蛋白沉淀用 10 mL 破壁缓冲液 A 溶解并置于破壁缓冲液 A 中于 4 °C 过夜透析。将蛋白溶液用 0.22 μ m 滤膜过滤, 然后用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化, 杂蛋白用含有 40 mmol/L 咪唑的缓冲液 A 清洗, 目的蛋白用含 250 mmol/L 咪唑的缓冲液 A 洗脱, 得到目的蛋白于 -20 °C 保存。

将诱导后的 3 个菌株 *E. coli*/pET22b、*E. coli*/pET22b-*eCGP123*-C-His 和 *E. coli*/pET22b-*eCGP123*-FtsZ-C-His, 置于 75 °C 热处理 30 min, 然后于 4 °C、10000 \times g 离心 15 min。将热处理后的蛋白上清进行 SDS-PAGE 分析, 并以 His-tag 特异性抗体、用 Western blot 检测蛋白的表达。

表 1. 本研究中所用的引物
Table 1. Oligonucleotide primers used in this study

Gene	Primers	Sequence (5'→3')*
<i>eCGP123</i>	eCGP123- <i>Nde</i> I-For	CAGAGAGTCATATGGGAGCACATGCA
	eCGP123- <i>Mlu</i> I-Rev	GGACGCGTTGTAGAGTCTAATCCTA
	eCGP123- <i>Sal</i> I-Rev	CCTGGTCGACTGTAGAGTCTAATCC
<i>ftsZ</i>	ftsZ- <i>Sal</i> I-For	CATCGTCGACATGTTTGAACCAATGGAACCTAC
	ftsZ- <i>Not</i> I-Rev	TATCAACGCGGCCGCATCAGCTTGCTTAC
<i>upsE</i>	upsE- <i>Mlu</i> I-For	GGACGCGTATGAATATTCTTCAAGAGTATTCTG
	upsE- <i>Sal</i> I-Rev	CTAGGTCGACAATAGCCTTTGTCTCAACT
<i>pcna1</i>	pcna1- <i>Mlu</i> I-For	GGACGCGTATGTTTAAGATTATTTACCCTAATGCG
	pcna1- <i>Sal</i> I-Rev	GCCGCTCGACTAACCTTGGTGCTAT
<i>SiRe_1200</i>	SiRe_1200- <i>Mlu</i> I-For	GAACGCGTATGGCCTCAAGTAAAGTGG
	SiRe_1200- <i>Sal</i> I-Rev	CGCCGTCGACTTTCTGCTCTTGATTAG

*: The restriction sites were underlined.

1.6 *S. islandicus* 中蛋白表达与分析

将 eCGP123 及其融合蛋白表达质粒电转入 *S. islandicus* E233S 感受态细胞中, 电转步骤及转化子筛选方法见文献[9]。将构建好的表达菌株在添加有蔗糖(低诱导水平)或者阿拉伯糖(高诱导水平)的培养基中培养, 诱导蛋白的表达。取不同 OD_{600} 值下相同数量的细胞进行 SDS-PAGE 和 Western blot, 分析蛋白的表达。

1.7 eCGP123 热稳定性和吸光值分析

将 eCGP123 蛋白溶液(1.5 mg/mL)于 50–80 °C 下处理 30 min, 然后于 4 °C、10000×g 离心 15 min。取 24 μ L 热处理后的蛋白上清进行 SDS-PAGE 分析, 检测蛋白的热稳定性。

使用 UV-2802H 紫外可见分光光度计(上海尤尼克仪器有限公司)测定 eCGP123 蛋白溶液吸光光度值。测定前, 先设置扫描方式为吸光度, 扫描起始波长为 400 nm, 终止波长为 650 nm, 扫描次数为 1, 扫描精度为 1 nm。然后以双重蒸馏水为参比, 放入样品槽内, 通过扫描建立基线。然后将装有 1.5 mL eCGP123 蛋白溶液(1.5 mg/mL)的比色杯放入样品槽内扫描, 得到吸光度图谱。实验至少重复 3 次。

1.8 eCGP123 及其融合蛋白表达细胞的荧光检测

取 5 μ L 处于对数生长期的 eCGP123 及其融合蛋白表达菌株的细胞滴于载玻片上, 盖上盖玻片, 置于 LSM 780 高灵敏度激光共聚焦显微镜(Carl Zeiss)下, 通过紫外光的激发, 观察细胞中荧光分布情况, 分析目的蛋白的亚细胞定位。

1.9 硫化叶菌细胞生长曲线测定

将对照菌株 Sis/pSeSD 和 eCGP123 过表达菌株 Sis/pSeSD-eCGP123-C-His 在 MTSV 液体培养基中多次活化, 转接至 MTV 液体培养基, 当 OD_{600} 值为 0.5–0.6 时转接到 MTAV 培养基中, 控制初始

OD_{600} 值约为 0.05, 每组做 3 个平行, 每 6 或 12 h 测 1 次 OD_{600} 值, 直至生长趋于平稳或开始下降, 然后绘制生长曲线。

2 结果和分析

2.1 eCGP123 基因的优化

根据 Don Paul 等报道的 eCGP123 氨基酸序列^[8]和 *S. islandicus* 中密码子的偏好性, 我们优化并合成了全长 735 bp、编码 245 个氨基酸的 eCGP123 基因。在优化的 eCGP123 基因序列中, 多数密码子为 *S. islandicus* 的最优密码子, 少数为次优密码子, 没有 *Nde* I、*Sal* I、*Not* I 或 *Mlu* I 等常用酶切位点, 方便载体的构建。

2.2 eCGP123 热稳定性和吸光值分析

为了检测 eCGP123 是否能够在高温下稳定存在, 我们将 Ni-NTA 柱纯化后的蛋白在 50–80 °C 热处理 30 min 并离心, 蛋白上清进行 SDS-PAGE 检测(图 1)。从 SDS-PAGE 结果可以看出, eCGP123

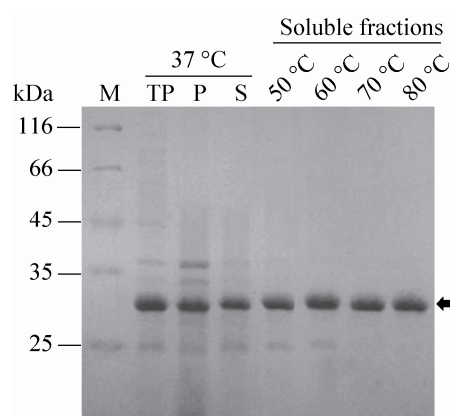


图 1. eCGP123 蛋白的热稳定性分析

Figure 1. Thermostability analysis of eCGP123. eCGP123 was treated at different temperatures for 30 min after purification by Ni-NTA column. M: molecular size markers; TP: total protein; P: precipitate; S: supernatant. The arrow indicates eCGP123 (28.6 kDa).

(28.6 kDa)蛋白依然稳定存在于热处理后的上清中,同时我们发现,热处理后的蛋白溶液明显呈绿色。因此,研究结果表明,eCGP123 具有较高的热稳定性。此外,我们测定了 eCGP123 蛋白溶液在 400–650 nm 波长范围内的吸光光度值(图 2)。结果显示,eCGP123 的最大激发光波长为 493 nm,与 Kiss 等的研究结果一致^[3]。

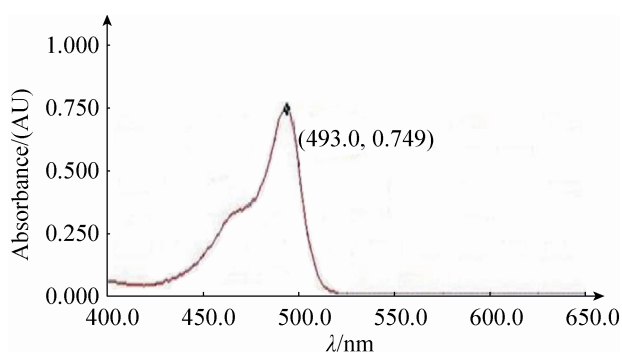


图 2. eCGP123 吸收光谱的测定

Figure 2. Absorption spectrum of eCGP123.

2.3 *E. coli* 中 eCGP123 和 eCGP123-FtsZ 的表达与荧光定位

为了检测 eCGP123 是否仍然能在常温细胞内作为蛋白定位的工具,我们首先在 eCGP123 的 C-末端融合 *E. coli* 来源的 FtsZ 蛋白,并对融合蛋白诱导表达和分析,通过激光共聚焦显微镜检测荧光的分布情况。FtsZ (filamenting temperature-sensitive mutant Z)蛋白是原核生物中高度保守的微管蛋白同源物,它定位在分裂细胞的中间,形成环状结构,参与细胞的分裂^[10–11]。Western blot 分析结果表明,通过 IPTG 的诱导,融合蛋白 eCGP123-FtsZ 在 *E. coli* 细胞中表达(图 3)。同时,荧光定位结果表明,在 465–495 nm 激发光波长范围内,eCGP123 表达细胞中荧光呈均匀分布(图 4-A),而在 eCGP123-FtsZ 融合表达细胞中,荧光主要分布

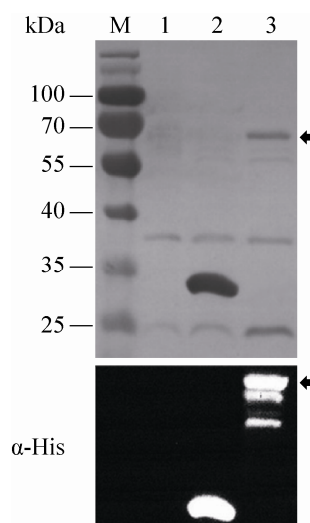


图 3. *E. coli* 中 eCGP123 和 eCGP123-FtsZ 的表达与分析
Figure 3. Expression and identification of eCGP123 and eCGP123-FtsZ in *E. coli* by Western blot analysis using an anti-His-tag antibody (α -His). The samples from each *E. coli* strain are loaded onto SDS-PAGE (upper panel) after heat-treatment at 75 °C for 30 min. M: molecular size markers; Lane 1: proteins purified from *E. coli*/pET22b, as a negative control; lane 2 and lane 3: eCGP123 and eCGP123-FtsZ. Predicted protein sizes of eCGP123 and eCGP123-FtsZ are 28.6 kDa and 69.6 kDa, respectively.

在细胞的中间和两端(图 4-B)。以上结果与之前报道的 FtsZ 功能相吻合,达到了预期的结果,说明 eCGP123 可以用于 *E. coli* 细胞中蛋白质定位的研究。

2.4 *S. islandicus* 中 eCGP123 及其融合蛋白的表达与荧光定位

为了进一步检测 eCGP123 能否在嗜热嗜酸的 *S. islandicus* 中作为蛋白定位工具,我们选择若干已知细胞定位的目的蛋白与之融合。其中,UpsE (UV-inducible pili operon of *Sulfolobus* E)是古菌经过紫外线照射后在细胞表面形成 IV 型菌毛结构 (type IV pili-like structure)的一个重要组成成分,

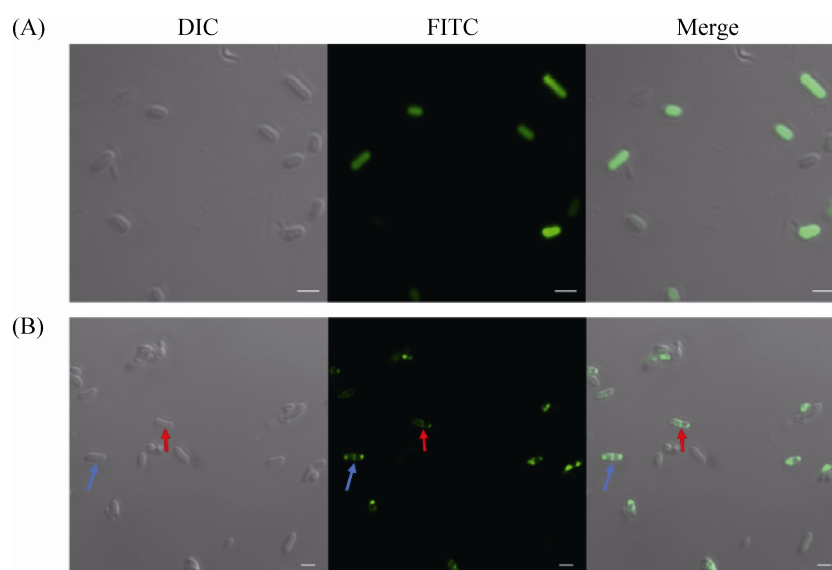


图 4. *E. coli* 细胞中 eCGP123-C-His 和 eCGP123-FtsZ-C-His 的荧光定位

Figure 4. Localization of eCGP123 (A) and eCGP123-FtsZ (B) expressed in *E. coli* cells. eCGP123 distributes evenly in the cells, while eCGP123-FtsZ mainly localizes at the mid-cell division site and both ends of the rod-shaped cells. Scale bar=2 μm .

是一种分泌型 ATPase, 定位于细胞膜上^[12-13]。PCNA1 是组成泉古菌中参与 DNA 复制的异源三聚体 PCNA (proliferating-cell nuclear antigen, 增殖细胞核抗原)的重要亚基之一^[14], 主要定位于细胞质中 DNA 复制的区域^[15]。我们实验室研究结果发现, ESCRT-III (endosomal sorting complex required for transport III)同源蛋白 SiRe_1200 参与细胞分裂, 用蛋白特异性抗体进行免疫荧光定位分析发现, 该蛋白位于正在分裂的 2 个细胞中间, 过表达其羧基端 loop 区缺失突变体会导致细胞生长缓慢, 引起细胞的分裂缺陷^[16]。

我们将 eCGP123 融合蛋白表达质粒电转入 *S. islandicus* 细胞中, 筛选出表达菌株, 并在培养基中加入阿拉伯糖进行诱导表达, 然后在不同 OD_{600} 值取相同数量的细胞, 进行 Western blot 分析。结果表明, eCGP123 及其融合蛋白 eCGP123-UpsE、eCGP123-SiRe_1200 都可以表达, 但检测不到

eCGP123-PCNA1 的信号, 多次重复实验的结果类似(图 5)。*S. islandicus* 细胞中, pSeSD-eCGP123-PCNA1-C-His 质粒重提取验证结果显示, 表达质粒存在于细胞中, 在高灵敏度激光共聚焦显微镜下能检测到表达细胞产生的荧光。此外, 我们在 *E. coli* 中可以检测到 eCGP123-PCNA1 的表达。因此, 我们推断, 可能是由于 *S. islandicus* 中该蛋白的表达量较低, 无法检测到信号。此外, 为了分析 eCGP123 在 *S. islandicus* 中过表达会不会影响细胞生长, 进而影响其应用, 我们检测了 eCGP123 过表达菌株的生长曲线, 结果表明 eCGP123 过表达菌株与含有空质粒的对照菌株生长没有区别, 因此 eCGP123 过表达并不影响 *S. islandicus* 细胞的生长(图 6)。而另外 3 个融合蛋白的过表达菌株中, 只有 eCGP123-SiRe_1200 过表达导致细胞生长缓慢, 可能与 SiRe_1200 参与细胞分裂有关(结果未展示)。

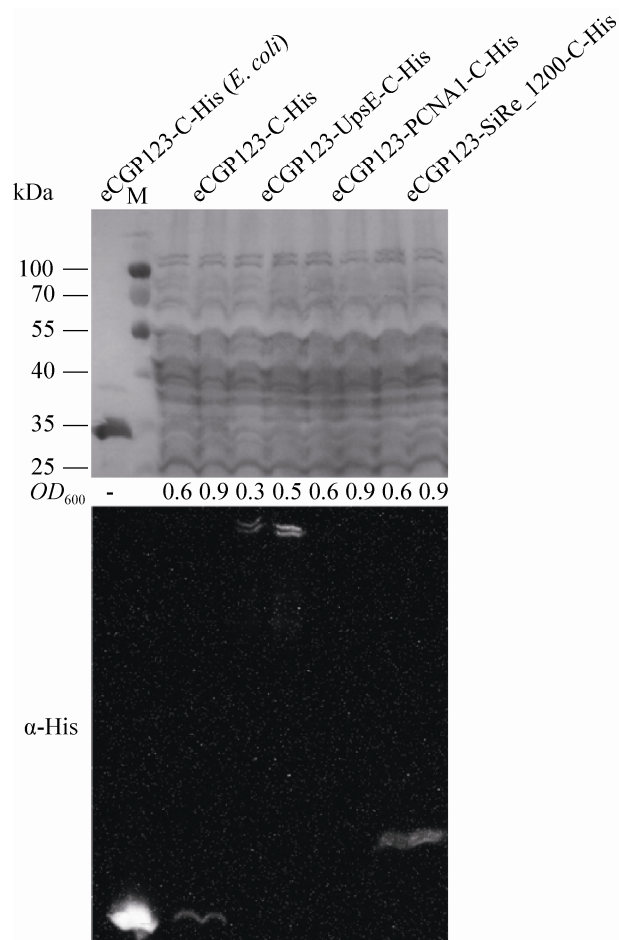


图 5. *S. islandicus* 中 eCGP123 及其融合蛋白的表达与分析

Figure 5. Analysis of eCGP123 and its fusion proteins with C-terminal 6×His-tag in *S. islandicus* by Western blot. The cell extracts of the expression strains at different OD_{600} values were taken for loading onto SDS-PAGE (upper panel). M: molecular size markers. Predicted protein sizes are 28.57 kDa (eCGP123), 82.60 kDa (eCGP123-UpsE), 56.04 kDa (eCGP123-PCNA1) and 53.59 kDa (eCGP123-SiRe_1200), respectively.

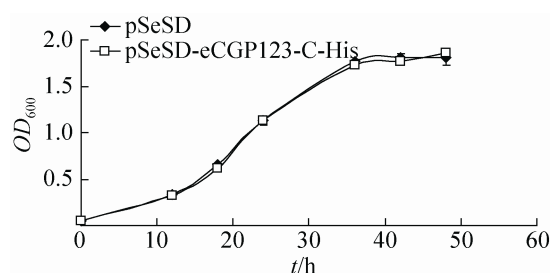


图 6. eCGP123 过表达不影响 *S. islandicus* 生长

Figure 6. eCGP123 overexpression has no effect on the cell growth of *S. islandicus*. The OD values were measured every 6 or 12 h. The growth curves were obtained from three independent cultures. Error bars indicate standard deviation.

我们对 *S. islandicus* 细胞中的 eCGP123 及其融合蛋白进行了荧光定位。在含有阿拉伯糖的培养基中培养表达菌株，取处于对数生长期的细胞，置于高灵敏度激光共聚焦显微镜下，检测荧光的分布。如图 7 所示，在阿拉伯糖诱导后的 eCGP123 表达细胞中，其荧光充满整个细胞，均匀分布在细胞质中，表达量较高，与 Western blot 结果一致。在 eCGP123-UpsE 表达细胞中，荧光也均匀分布，但呈稀疏的点状分布，很可能是位于细胞膜上，因此各个蛋白荧光点之间相互隔离。由于表达量较低，难以通过膜质分离实验进一步确认荧光是否定位在细胞膜上(图 8)。

DNA 复制滑动夹 PCNA 已广泛应用于真核细胞复制体(replisome)的细胞内定位，生化和遗传实

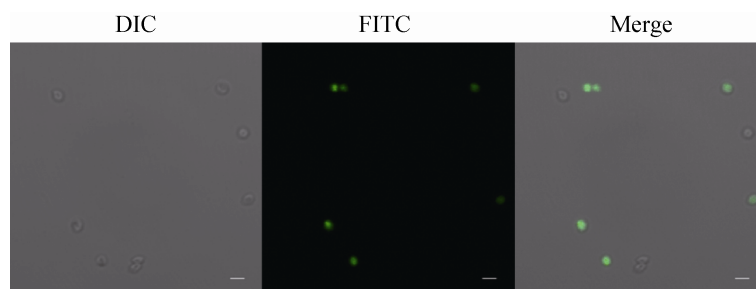


图 7. *S. islandicus* 细胞中 eCGP123 的荧光定位

Figure 7. Localization of eCGP123 in *S. islandicus* cultured in the medium containing arabinose (0.2%). Scale bar=2 μ m.

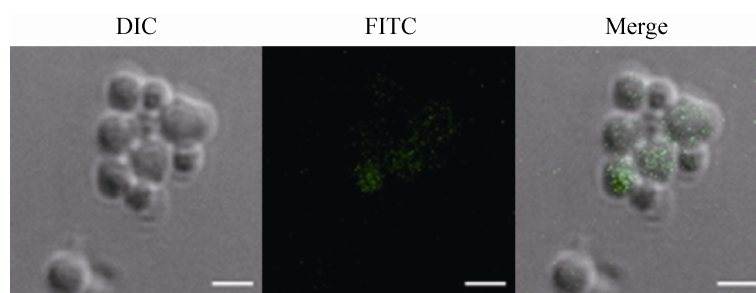


图 8. *S. islandicus* 细胞中 eCGP123-UpsE 的荧光定位

Figure 8. Localization of eCGP123-UpsE in *S. islandicus* in arabinose medium. Scale bar=2 μ m.

验已经证明 PCNA 在硫化叶菌 DNA 复制中也发挥重要功能。PCNA1 (SiRe_1602) 是组成泉古菌中参与 DNA 复制的异源三聚体 PCNA 的重要亚基之一。此前, Bell 课题组使用 PCNA1 特异性抗体对同步至 G1 期的 *S. acidocaldarius* 细胞进行免疫荧光标记, 分析复制体的荧光定位。研究结果发现, 大多数被标记的细胞中含有 1 个、2 个或 3 个 PCNA1 foci, 部分细胞中含有 4 个、5 个和 6 个 PCNA1 foci, 同时少数细胞也出现 PCNA1 foci 遍及整个细胞的现象, 但是 foci 基本都是位于 DNA 区域^[14-15,17]。

我们在观察阿拉伯糖诱导后的 eCGP123-PCNA1 表达细胞时发现, 只有少数细胞中含有 1 个 PCNA1 focus, 大多数细胞中的 PCNA1 foci 数目

多达 4-6 个及以上, 但是这些 foci 有一定的区域分布, 并没有完全遍及整个细胞, 与之前的研究类似, 可能是位于 DNA 的区域(图 9)。通过免疫荧光和绿色荧光蛋白两种方法对 PCNA1 进行定位, 得到了比较类似而又有细微差异的结果。我们推测可能是因为两种蛋白定位方法之间的差异所致, 即前者以荧光染料标记抗体对固定的细胞进行标记, 往往具有较高的特异性和荧光量子产率, 但活细胞受到损坏; 而后者是利用绿色荧光蛋白对处于生理条件下活细胞内的蛋白质进行实时定位, 但在荧光显微镜下荧光易淬灭, 荧光信号较弱。总体而言, eCGP123 在一定程度上发挥了对 *S. islandicus* 细胞中 PCNA1 的亚细胞定位的作用。

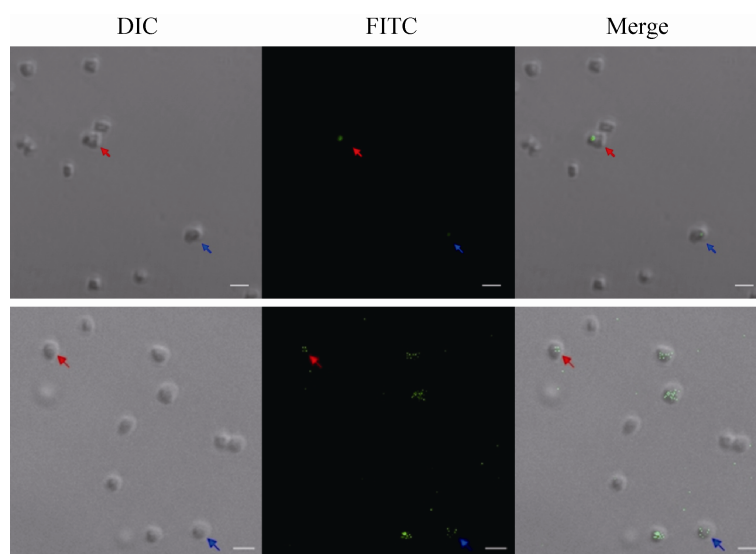


图 9. *S. islandicus* 细胞中 eCGP123-PCNA1 的荧光定位

Figure 9. Localization of eCGP123-PCNA1 in *S. islandicus* in arabinose medium. Scale bar=2 μ m.

我们实验室前期使用特异性抗体标记 *S. islandicus* 中 ESCRT-III 同源蛋白 SiRe_1200, 通过添加阿拉伯糖大量诱导蛋白表达发现, 整个细胞都是荧光, 可能是蛋白量太高, 难以定位。之后换成蔗糖诱导蛋白低表达并进行原位免疫荧光定位分析发现, SiRe_1200 定位于即将分裂细胞的中间, 参与细胞的分裂。此外, 绿色荧光也

分布于细胞周围, 可能与样品所处的时期有关。我们观察蔗糖诱导后的 eCGP123-SiRe_1200 表达细胞中的荧光发现, 在单个细胞中, 一般存在 3–5 个 SiRe_1200 形成的 foci。同时, 我们也在细胞的中间位置观察呈带状的荧光分布, 与实验室前期免疫荧光定位结果相似, 但荧光比较弱 (图 10)。

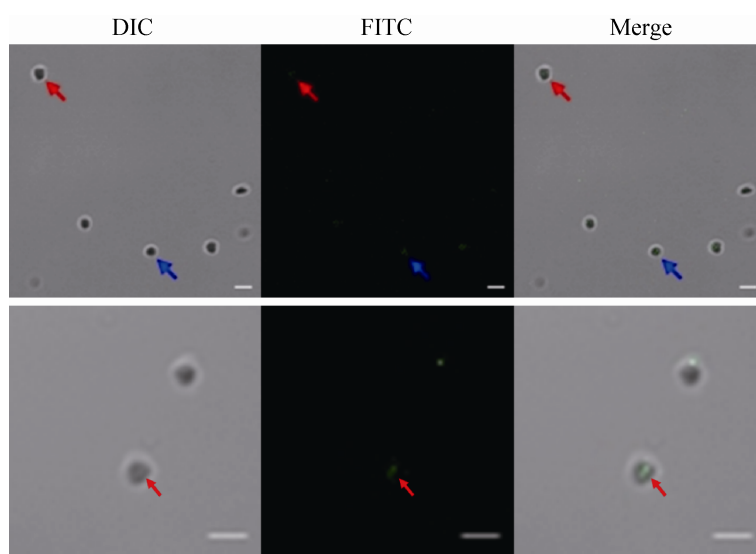


图 10. *S. islandicus* 细胞中 eCGP123-SiRe_1200 的荧光定位

Figure 10. Localization of eCGP123-SiRe_1200 in *S. islandicus* in arabinose medium. Scale bar=2 μ m.

3 讨论

由于 *S. islandicus* 生活在 75–80 °C、pH 2–3 的高温强酸环境中, 因此, 广泛应用于真核生物和原核生物中的绿色荧光蛋白 GFP 及其突变体几乎无法适用于嗜嗜热嗜酸的冰岛硫化叶菌中。绿色荧光蛋白突变体 eCGP123 具有较高的蛋白折叠效率、蛋白热稳定性和耐酸性等性质, 适用于高温强酸条件下, 因此有可能应用于 *S. islandicus* 蛋白的亚细胞定位研究中。

通过 eCGP123 密码子优化并合成基因, 我们分别构建了在 *E. coli* 和 *S. islandicus* 中的 eCGP123 融合蛋白表达质粒和表达菌株。蛋白表达检测和荧光

观察表明, 在 *E. coli* 中, eCGP123-FtsZ 的荧光主要分布在细胞的中间, 呈带状, 与以前的研究结果一致, eCGP123 对 FtsZ 的定位基本上达到了预期结果。

在 *S. islandicus* 中, eCGP123 单独表达时的荧光均匀分布于细胞中。eCGP123-UpsE 的荧光也呈均匀点状分布, 可能分布在细胞膜上, 需要进一步确认。我们只在很少的细胞中观察到 1–4 个 PCNA1 foci, 而在大多数细胞中, PCNA1 foci 的数目多达 6 个及以上, 并定位与细胞某个区域, 与之前报道结果类似, 推测位于细胞复制区域。本底表达的 SiRe_1200 通过 eCGP123 能够定位于细胞中间, 荧光呈带状分布。此外, 我们也发现, SiRe_1200 在阿拉伯糖诱导的过表达时, 荧光遍布

在整个细胞中, 影响蛋白的定位。

通过绿色荧光蛋白 eCGP123 对 *S. islandicus* 中已知定位的蛋白进行定位分析发现, eCGP123 具有一定的定位功能。但是, 相对于免疫荧光定位, 通过 eCGP123 对蛋白定位的方法存在一定的缺陷, 如荧光较弱, 荧光易淬灭。此外, 该方法可能还受到目的蛋白表达量的影响, 表达量过高或过低都会干扰目的蛋白的定位, 再加上 *S. islandicus* 细胞直径小(直径 1–2 μm), 对目的蛋白的定位造成了一定的困难。因此, eCGP123 应用于 *S. islandicus* 中进行蛋白的亚细胞定位, 还需进行条件优化, 如通过改进取样时间, 对细胞进行特殊处理(如 DNA 损伤剂处理分析 DNA 修复蛋白的定位), 提高显微观察技术, 观察和统计大量的细胞等。

根据 Paul 等的研究报道, 将 eCGP123 进行定点突变(Q66M, T73V, H197Q)得到的橙色荧光蛋白 Phanta, 其荧光较微弱, 激发光谱与许多 GFP 的发射光谱有很大的重叠, 能够与 eGFP 组成光致变色荧光共振能量转移对[photochromic fluorescence resonance energy transfer (FRET) pair], 检测 HeLa 活细胞中 Caspase 3 蛋白的活性^[18]。在前期实验中, 我们已经获得 Phanta 蛋白, 发现其同样具有较高的热稳定性, 有可能与 eCGP123 组成新的 FRET 供体/受体对。在 eCGP123 荧光显微观察条件优化后, 以上蛋白可以通过 FRET 技术研究古菌体内以及体外蛋白的相互作用。

参 考 文 献

- [1] Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 1962, 59(3): 223–239.
- [2] Dai MH, Fisher HE, Temirov J, Kiss C, Phipps ME, Pavlik P, Werner JH, Bradbury ARM. The creation of a novel fluorescent protein by guided consensus engineering. *Protein Engineering Design & Selection*, 2007, 20(2): 69–79.
- [3] Kiss C, Temirov J, Chasteen L, Waldo GS, Bradbury AR. Directed evolution of an extremely stable fluorescent protein. *Protein Engineering Design & Selection*, 2009, 22(5): 313–323.
- [4] Brock TD, Brock KM, Belly RT, Weiss RL. *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Archiv für Mikrobiologie*, 1972, 84(1): 54–68.
- [5] Henche AL, Koerdt A, Ghosh A, Albers SV. Influence of cell surface structures on crenarchaeal biofilm formation using a thermostable green fluorescent protein. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(3): 779–793.
- [6] Deng L, Zhu HJ, Chen ZJ, Liang YX, She QX. Unmarked gene deletion and host-vector system for the hyperthermophilic crenarchaeon *Sulfolobus islandicus*. *Extremophiles*, 2009, 13(4): 735–746.
- [7] Peng N, Xia Q, Chen ZJ, Liang YX, She QX. An upstream activation element exerting differential transcriptional activation on an archaeal promoter. *Molecular Microbiology*, 2009, 74(4): 928–939.
- [8] Don Paul C, Traore DAK, Byres E, Rossjohn J, Devenish RJ, Kiss C, Bradbury A, Wilce MCJ, Prescott M. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of eCGP123, an extremely stable monomeric green fluorescent protein with reversible photoswitching properties. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, 2011, 67(10): 1266–1268.
- [9] Huang QH, Li YS, Zeng CN, Song TT, Yan Z, Ni JF, She QX, Shen YL. Genetic analysis of the Holliday junction resolvases Hje and Hjc in *Sulfolobus islandicus*. *Extremophiles*, 2015, 19(2): 505–514.
- [10] Ma XL, Ehrhardt DW, Margolin W. Colocalization of cell division proteins FtsZ and FtsA to cytoskeletal structures in living *Escherichia coli* cells by using green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(23): 12998–3003.
- [11] Buss J, Coltharp C, Shtengel G, Yang XX, Hess H, Xiao J. A multi-layered protein network stabilizes the *Escherichia coli* FtsZ-ring and modulates constriction dynamics. *PLoS Genetics*, 2015, 11(4): e1005128.
- [12] Fröls S, Ajon M, Wagner M, Teichmann D, Zolghadr B, Folea M, Boekema EJ, Driessen AJM, Schleper C, Albers SV. UV-inducible cellular aggregation of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* is mediated by pili formation. *Molecular Microbiology*, 2008, 70(4): 938–952.
- [13] van Wolferen M, Ajon M, Driessen AJM, Albers SV. Molecular analysis of the UV-inducible pili operon from *Sulfolobus acidocaldarius*. *Microbiology Open*, 2013, 2(6): 928–937.
- [14] Dionne I, Nookala RK, Jackson SP, Doherty AJ, Bell SD. A heterotrimeric PCNA in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Molecular Cell*, 2003, 11(1): 275–282.
- [15] Gristwood T, Duggin IG, Wagner M, Albers SV, Bell SD. The sub-cellular localization of *Sulfolobus* DNA replication. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(12): 5487–5496.
- [16] Liu JF, Gao RX, Li CT, Ni JF, Yang ZJ, Zhang Q, Chen HN, Shen YL. Functional assignment of multiple ESCRT-III

homologs in cell division and budding in *Sulfolobus islandicus*. *Molecular Microbiology*, 2017, doi: 10.1111/mmi.13716. (in Press)

[17] Zhang CY, Guo L, Deng L, Wu Y, Liang YX, Huang L, She QX. Revealing the essentiality of multiple archaeal pcna genes using a mutant propagation assay based on an improved

knockout method. *Microbiology*, 2010, 156(11): 3386–3397.

[18] Don Paul C, Kiss C, Traore DAK, Gong L, Wilce MCJ, Devenish RJ, Bradbury A, Prescott M. Phanta: a non-fluorescent photochromic acceptor for pcFRET. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75835.

Expression and application of an improved green fluorescence protein in the hyperthermophilic acidophile *Sulfolobus islandicus*

Qihong Huang, Jiaxing Ma, Jinfeng Ni, Yulong Shen*

State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, Shandong Province, China

Abstract: [Objective] To explore an efficiently expressed fluorescence protein, enhanced consensus green protein variant 123 (eCGP123), and its application on sub-cellular localization of proteins in the thermophilic acidophile *Sulfolobus islandicus*. [Methods] eCGP123 exhibits extreme thermostability, acid stability and reversible photo-switching. We optimized the sequence of eCGP123 gene according to *S. islandicus* codon usage. The protein purified from *E. coli* was characterized. We fused various proteins with different cellular localizations at C-terminal of eCGP123, including FtsZ from *E. coli*, and UpsE, PCNA1 and SiRe_1200 from *S. islandicus*. We constructed eCGP123 and its fusion proteins expression strains and analyzed their sub-cellular localizations in the host cells by laser confocal microscopy. [Results] Consistent with previous results, the optimized eCGP123 expressed from *E. coli* had the same absorption spectrum as the wild type green fluorescence protein and was thermostable *in vitro*. We found that the cell division proteins FtsZ and SiRe_1200 mainly localized at the mid-cell of *E. coli* and *S. islandicus*, respectively. The pili component protein UpsE evenly distributes in the cells as dots, while DNA replication clamp subunit PCNA1 formed several foci in certain area of a cell indicating the locations of DNA replication. [Conclusion] The optimized eCGP123 can utilized as a protein reporter for analysis of protein sub-cellular localizations in *S. islandicus*. This will be an important tool for functional studies of genes in the model species. However, more improvements are still needed for the application.

Keywords: green fluorescence protein (GFP), eCGP123, codon optimization, *Sulfolobus islandicus*, subcellular localization

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31470200, 31670061) and by the China Postdoctoral Science Foundation (11200077311030)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-531-88362903; E-mail: yulgshen@sdu.edu.cn

Received: 8 May 2017; Revised: 13 June 2017; Published online: 5 July 2017



申玉龙, 1989 于兰州大学获得硕士学位, 1993–1996 在英国伯明翰大学学习, 并获博士学位。曾在中国农业科学院(1989–1993)、日本农林水产省果树研究所(1997–1999)和日本通产省生命工学研究所(产业技术综合研究所)工作(1999–2003), 2003 年 11 月回国。近十多年来一直从事极端嗜热古菌方面的研究, 主要研究方向为硫化叶菌 DNA 修复及基因组稳定性维持的机制、古菌细胞分裂与病毒出芽机制, 以及蛋白翻译后修饰对上述过程的调控, 同时对极端微生物的多样性、嗜热酶的分离、鉴定与应用, 以及古菌遗传操作体系的利用与改良等也开展研究。已在 *Molecular Microbiology*、*Journal of Molecular Biology*、*Nucleic Acids Research*、*Journal of Chemical Biology*、*DNA Repair*、*Journal of Bacteriology*、*Extremophiles* 等期刊上发表论文多篇。