



核酸去甲基酶 AlkB 在毕赤酵母中的表达纯化及在 tRNA 相关研究中的应用

崔璐瑶, 李安娜, 林茹, 张嘉祺, 施嘉诚, 周勉*

华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

崔璐瑶, 李安娜, 林茹, 张嘉祺, 施嘉诚, 周勉. 核酸去甲基酶 AlkB 在毕赤酵母中的表达纯化及在 tRNA 相关研究中的应用[J]. 微生物学报, 2023, 63(3): 1088-1098.

CUI Luyao, LI Anna, LIN Ru, ZHANG Jiazhen, SHI Jiacheng, ZHOU Mian. Nucleic acid demethylase AlkB in *Pichia pastoris*: expression, purification, and application in tRNA-related research[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(3): 1088-1098.

摘要:【目的】核酸的甲基化修饰是一种常见的化学修饰形式, 具有重要的生物学功能, 却也在一定程度上给一些核酸研究过程带来了技术难度。tRNA 上具有的大量甲基化修饰会阻碍逆转录进程, 从而降低荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 和高通量测序对其的检测效率。来自大肠杆菌(*Escherichia coli*)的 AlkB 蛋白是一种多功能的脱烷基化酶, 可以去除 DNA 和 RNA 上多种甲基化为代表的修饰, 有望解决以上问题。

【方法】针对大肠杆菌来源的 AlkB, 分别尝试在大肠杆菌和毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统中进行诱导表达和纯化, 对纯化获得的 AlkB 进行酶学性质测定。最后以 tRNA^{U_{UA}}等两种 tRNA 为代表, 研究 AlkB 的处理对于荧光定量 PCR 法检测 tRNA 表达水平的影响。【结果】AlkB 在大肠杆菌中表达时多以包涵体形式存在, 但是在毕赤酵母中可以成功分泌表达。使用镍柱分离纯化后获得了纯度高于 95% 的 AlkB 蛋白, 其酶学性质参数如下: 最适反应温度为 25 °C, 最适 pH 值为 6.5, V_{max} 为 0.39 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, K_m 为 3.23 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 比酶活为 1.08 U/mg。AlkB 对 RNA 的处理可以增加荧光定量 PCR 对 tRNA 表达水平检测的准确度。【结论】AlkB 可以在毕赤酵母中高效表达并纯化, 其处理有助于荧光定量 PCR 对于 tRNA 的检测结果变得更准确。AlkB 的各项酶学性质特征在相关理论研究和应用中具有一定的科学价值。

关键词: 毕赤酵母; 去甲基酶; AlkB; tRNA; 酶学性质

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFA0900300); 上海市青年科技启明星计划(19QA1402600)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0900300) and the Shanghai Science and Technology Committee Rising-Star Program (19QA1402600).

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-21-64252257, E-mail: mianzhou@ecust.edu.cn

Received: 2022-07-14; Accepted: 2022-10-28; Published online: 2022-11-04

Nucleic acid demethylase AlkB in *Pichia pastoris*: expression, purification, and application in tRNA-related research

CUI Luyao, LI Anna, LIN Ru, ZHANG Jiazhen, SHI Jiacheng, ZHOU Mian*

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: [Objective] As a common type of chemical modification, nucleic acid methylation has significant biological functions. However, it also brings technical difficulties to some nucleic acid-related studies. Massive methylations on tRNAs will block reverse transcription and decrease the efficiency of real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and high-throughput sequencing for the determination of tRNA levels. The AlkB from *Escherichia coli* is a multi-functional dealkylase. It can remove methylation as well as other modifications on DNA and RNA and thus has the potential to solve the problem mentioned above. **[Methods]** Here we expressed the *E. coli* sourced AlkB in *E. coli* and *Pichia pastoris*. After purification of the protein, we measured its enzyme properties. Finally, two tRNAs represented by tRNA^{UUA} were used to examine the effect of AlkB treatment on the detection performance of real-time PCR for tRNA levels. **[Results]** AlkB mostly presented as inclusion bodies localized in *E. coli*, however, it was successfully expressed in and secreted by *P. pastoris*. After being purified by Nickel column, the AlkB protein showed the purity above 95%. The optimum conditions of this enzyme were 25 °C and pH 6.5, at which it showed the V_{max} of 0.39 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, K_m of 3.23 $\mu\text{mol}/\text{L}$, and specific activity of 1.08 U/mg. When RNA sample was treated by AlkB, real-time PCR could detect the tRNA level more accurately. **[Conclusion]** AlkB could be efficiently expressed and purified in *P. pastoris*. By treating RNA sample with purified AlkB, the real-time PCR method is able to detect tRNA levels more accurately. Additionally, the enzyme properties of AlkB have a significant value for relevant theoretical research and application.

Keywords: *Pichia pastoris*; demethylase; AlkB; tRNA; enzyme property

核酸甲基化是核酸发生化学修饰的一种形式, 两类核酸分子 DNA 和 RNA 都可以发生甲基化修饰, 并具有重要的生物学功能。DNA 甲基化属于表观遗传标记的一种, 能够在不改变 DNA 序列的前提下引起染色质构象、稳定性以及与蛋白质相互作用方式的改变, 从而调控基因表达^[1]。真核生物中的 DNA 甲基化类型主要是 5-甲基胞嘧啶, 发生在 CpG 二核苷酸的胞嘧啶位点。而原核生物中除了 5-甲基胞嘧啶外, 还存在着 6-甲基腺嘌呤修饰。除了对基因表达的

潜在影响^[2], “G^mATC”也是原核生物区分新旧 DNA 链以协助损伤修复的重要机制^[3]。甲基化修饰也是发生在 RNA 上的众多化学修饰中比较主要的修饰类型。许多种类的 RNA 包括 mRNA、rRNA、tRNA、snRNA 和 snoRNA 都存在甲基化修饰, 其中 6-甲基腺嘌呤在 mRNA 中丰度最高^[4]; 而 tRNA 上的修饰则包括 1-甲基腺嘌呤、3-甲基胞嘧啶和 1-甲基鸟嘌呤等, 这些修饰可能对 tRNA 的生物合成、稳定性和功能活性起重要作用^[5]。

在重要的生物学功能以外, 核酸的甲基化修

饰也可能在相关领域的研究中带来一定的问题。荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)和转录组测序(RNA-seq)是对样品中的转录产物进行定量,比较在发育的不同阶段以及不同条件下基因表达水平的技术^[6-8],目前已广泛应用于生物学、医学和药物研发等多个研究领域。然而与 mRNA 相比,对 tRNA 表达水平的检测具有一定的技术难度。因为这两种技术都依赖逆转录这一关键步骤,而 tRNA 上具有的大量化学修饰会导致逆转录过程的暂停或终止。此外,tRNA 稳定的二级结构也进一步限制了接头连接和 cDNA 的合成效率,因此 tRNA 是目前唯一仍然不能被传统的 RNA-seq 有效且定量测序的 RNA 类型^[6]。tRNA 除了参与翻译过程,也被报道参与调控细胞增殖、代谢信号传递以及疾病发生机制^[9-10]。Northern blotting 是目前常用的检测 tRNA 表达水平的常用方法,但是其通量低、操作繁琐的特点在一定程度上限制了实验进度。因此,突破技术瓶颈问题,实现 tRNA 表达水平的快速精确检测具有重大的意义。

AlkB 蛋白家族是一类核酸去甲基酶,在表观基因调控、RNA 代谢和 DNA 修复等研究领域都获得了广泛的关注^[11]。哺乳动物和大肠杆菌中都存在 AlkB 的同源蛋白。哺乳动物中 AlkB 的错误调控与肥胖、糖尿病、肿瘤等疾病发生存在相关性,因此其抑制剂的筛选也是疾病治疗的研究热点^[12]。来自大肠杆菌的 AlkB 蛋白是一种多功能的脱烷基化酶,属于非血红素二价铁和 α -酮戊二酸依赖的双加氧酶超家族中的一员^[13],以 1-甲基腺嘌呤和 3-甲基胞嘧啶为主要底物,也可以去除 3-甲基胸嘧啶、1-甲基鸟嘌呤、6-乙基腺嘌呤和 4-乙基胞嘧啶中的烷基^[14-16]。

基于大肠杆菌 AlkB 在去除核酸甲基化等修饰中的重要作用,我们分别尝试在大肠杆菌

(*Escherichia coli*)和毕赤酵母(*Pichia pastoris*)两种重组蛋白表达系统中表达 AlkB 并进行分离纯化。对于纯化获得的 AlkB 蛋白,进一步测定其酶活和其他酶学性质参数,并研究了 AlkB 的处理对于荧光定量 PCR 法检测 tRNA 表达水平的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)菌株,毕赤酵母 GS115、GS115-tRNA^{U_{UAU}}、GS115-tRNA^{U_{CGU}}菌株均由本实验室保存,其余菌株在此基础上构建。pET28a 载体和 pPICZ α 载体由本实验室保存,其余载体在此基础上构建。

1.2 试剂和培养基

质粒抽提试剂盒、RNA 纯化试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司,识别 6 \times His 标签的一抗和二抗、cDNA 第一链合成试剂盒、化学发光法生物素标记核酸检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,SYBR Green 购自北京聚合美生物科技有限公司,蛋白纯化所用镍柱填料购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司,无缝克隆试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。引物序列、DNA 探针合成及 Sanger 测序由苏州金唯智生物科技有限公司完成,其余化学品试剂购自华东理工大学材料采购平台。LB 培养基配方:0.5%酵母提取物,1%蛋白胨,1%氯化钠。酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(yeast extract peptone dextrose medium, YPD)配方:1%酵母提取物,2%蛋白胨,2%葡萄糖。含甲醇的缓冲性复杂培养基(buffered methanol-complex medium, BMMY)配方:1%酵母提取物,2%蛋白胨,1.34%酵母氮源基础(yeast nitrogen base, YNB),1%甲醇,0.1mol/L 磷酸钾缓冲液。固体培养基中加入 2%琼脂。于 121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 20 min。如需抗性,加入终浓度 0.1–1 mg/mL zeocin 或 50 μ g/mL 卡那霉素。

1.3 仪器和器材

蛋白质垂直电泳仪(上海天能生命科学有限公司), 转印电泳仪(上海天能生命科学有限公司), 离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司), PCR 仪(苏州东胜兴业科学仪器有限公司), 化学发光仪(上海天能生命科学有限公司), 荧光酶标仪(伯腾仪器有限公司), 核酸杂交仪(宁波新芝生物科技股份有限公司), 微量分光光度计(杭州奥盛仪器有限公司)。

1.4 表达载体的构建

从 National Center for Biotechnology Information (NCBI)数据库查找获得大肠杆菌 AlkB 基因的核酸序列(Gene ID: 946708), 设计引物进行 PCR 扩增。所得基因片段通过无缝克隆插入 pET28a 载体的 T7 启动子之后, N 端添加 OmpA 分泌序列, 并保留 C 端 6×His 标签, 获得 pET28a-AlkB 表达载体; 所得基因片段通过无缝克隆插入 pPICZα 载体 alpha 因子分泌序列之后, 保留 C 端 6×His 标签, 获得 pPICZα-AlkB。

构建好的表达载体使用大肠杆菌扩增, 验证测序无误后保存。所用引物序列如表 1 所示。

1.5 大肠杆菌的化学转化

将 0.5 μL 质粒或 10 μL 无缝克隆连接液加入到 100 μL 大肠杆菌感受态细胞中, 轻弹管壁混匀, 于冰上静置 10 min。将离心管轻柔放入 42 °C 水浴锅中, 热激 45 s 后立即拿出置于冰上冷却 2–3 min。加入 900 μL LB 培养基(不添加抗生素), 37 °C 复苏 1 h。5 000 r/min 离心 5 min, 弃掉 800 μL 上清。菌体轻柔吹打混匀后, 涂布于含卡那霉素的 LB 平板, 37 °C 培养箱中倒置培养 12–16 h 后挑选单菌落, 抽提质粒并进行测序验证。

1.6 毕赤酵母的电转化

构建好的质粒(1 μg 以上)经 *Sac* I 酶切线性化后与 80 μL 新鲜制备的毕赤酵母感受态细胞混合, 转移到预冷的电转杯中冰浴 5 min。将电转杯放入设定在“Pic”模式的电转仪滑槽中, 电击 1 次, 立即加入 1 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇溶液, 并将电转杯中的菌液转移到装有 1 mL

表 1 本研究使用的引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

Primers	Sequence (5'→3')
pet28a-F	GGCCTGCGCTACGGTAGCGAA
pet28a-R	CTCGAGCACCAACCACCA
pet28a-AlkB-F	TGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTTCTTTTTACCTGCCTGACG
pet28a-AlkB-R	TTCGCTACCGTAGCGCAGGCCATGTTGGATCTGTTTGCCGA
T7-R	TAATACGACTCACTATAGGG
T7t-F	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
AlkB-F	GGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGTTGGATCTGTTTGCCGATGC
AlkB-R	TTCTGAGATGAGTTTTTGTCTTCTTTTTACCTGCCTGACG
pPICZa-F	GAACAAAACTCATCTCAGAA
pPICZa-R	CTCTCTTTTCTCGAGAGATACC
5AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
3AOX1	GCAAATGGCATTCTGACATCC
RT-5sRNA-F	CCATATCTAGCAGAAAGCA
RT-5sRNA-R	TCTCCACTACTACTCT
RT-Ile tRNA-F	CTTCTGTGGCGCAGTGGT
RT-Ile tRNA-R	TGCTTCTGGAGGGGTTTCG
RT-Thr tRNA-F	GCCCTTTTGGCCAAGTGG
RT-Thr tRNA-R	TGCCCTTTGACGGGATCG

YPD 液体培养基的血清瓶中, 30 °C、200 r/min 摇床培养 2–3 h。用移液枪吸取适量电转复苏后的菌液, 涂布于相应带有高浓度 zeocin 抗生素 (0.7 mg/mL) 的筛选平板, 倒置于 30 °C 培养箱中培养 2 d 左右, 至有肉眼可见的转化子长出。挑选单菌落, 提取基因组进行 PCR 验证。

1.7 SDS-PAGE 电泳和 Western blotting

通过离心分离菌体和上清, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 和 Western blotting 的方法如参考文献^[17]所述。Western blotting 一抗使用抗 6×His 小鼠抗体, 二抗使用 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 抗体。

1.8 毕赤酵母中 AlkB 的表达与纯化

AlkB 表达菌株在 YPD 培养基中培养至 OD_{600} 值达到 2–6, 离心分离菌体, 无菌水洗涤 3 次后转移到 BMMY (含 1% 甲醇) 培养基中进行目标蛋白的诱导表达。每 24 h 补充一次甲醇, 诱导 72 h 后离心收集上清。培养温度为 30 °C。离心收集发酵液上清, 通过 10 kDa 孔径超滤膜包 (赛多利斯 Vivaflow 50) 浓缩 10 倍。在浓缩后的上清中加入等量的镍柱平衡缓冲液并调 pH 至 7.4, 加入镍柱中与介质充分结合。分别使用含 25 mmol/L 和 300 mmol/L 咪唑的平衡缓冲液进行洗涤和洗脱, 通过 SDS-PAGE 电泳、考马斯亮蓝染色和 Western blotting 检测每一组分中的目标蛋白含量。将含目标蛋白 AlkB 的数管洗脱液合并, 使用 10 kDa 孔径超滤管超滤浓缩, 并通过 Bradford 法测定蛋白浓度。

1.9 AlkB 酶活测定

AlkB 酶活测定的原理如下: AlkB 对 DNA 进行脱甲基作用时, 每个被氧化的甲基会产生一个甲醛分子, 甲醛可被甲醛脱氢酶 (formaldehyde dehydrogenase, FDH) 氧化成甲酸, 在此过程中, 辅酶 NAD^+ 被还原为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸

(nicotinamide adenine dinucleotide, NADH), $NADH$ 受 340 nm 波长激发光照射下可发射出 465 nm 波长荧光。使用酶标仪监测反应开始后的荧光强度, 以此性质来定量计算酶活。AlkB 反应缓冲液配方: 20 mmol/L HEPES pH 8.0, 200 μ mol/L α -酮戊二酸, 2 mmol/L L-抗坏血酸, 20 μ mol/L $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$, 100 μ g/mL 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)。检测 AlkB 活性时选用底物为单链 DNA (5'-CGTCGXATTCTAGAGCCCC-3')^[13], 其中 X 代表 1-methyl-dA。

1.10 最适反应温度的测定

在 AlkB 反应缓冲液中添加 15 μ mol/L DNA 底物、120 ng AlkB、2.5 U/mL FDH 和 1 mmol/L NAD^+ , 反应体系 120 μ L, 控制反应温度分别为 15、20、25、30、35 °C。用酶标仪连续监测 465 nm 波长处发射荧光值的增加, 从而计算不同温度下的催化反应速率。

1.11 最适 pH 的测定

在 AlkB 反应缓冲液中添加 15 μ mol/L DNA 底物、120 ng AlkB、2.5 U/mL FDH 和 1 mmol/L NAD^+ , 调节 AlkB 反应缓冲液的 pH 使得最终反应体系的 pH 值分别为 4.0、4.7、5.0、6.5、7.8、8.5、9.2、10.0, 反应体系 120 μ L。25 °C 下进行反应, 用酶标仪连续监测 465 nm 波长发射荧光值的增加, 从而计算不同 pH 值下的催化反应速率。

1.12 AlkB 的动力学常数测定

如方法 1.9 所述, 在 AlkB 反应缓冲液中添加 DNA 底物、50 ng AlkB、2.5 U/mL FDH 和 1 mmol/L NAD^+ , 底物浓度 [S] 分别选择 0、5、10、15、25、30 μ mol/L, 反应体系 120 μ L。在 25 °C, pH 6.5 条件下测定荧光强度变化, 从而计算不同底物浓度下的催化反应速率。

1.13 荧光定量 PCR

通过离心分离毕赤酵母菌体和上清, 菌体液氮研磨破碎后使用 Trizol 试剂法抽提总 RNA。通过微量分光光度计测定 RNA 浓度后, 使用 cDNA

第一链合成试剂盒对RNA进行逆转录,使用SYBR Green 预混液进行荧光定量 PCR。内参选择 5S rRNA, tRNA 与内参的扩增引物序列见表 1。

1.14 Northern blotting

通过离心分离毕赤酵母菌体和上清,菌体液氮研磨破碎后使用 Trizol 试剂法抽提总 RNA。通过微量分光光度计测定 RNA 浓度后,使用尿素变性的 PAGE 胶分离 RNA。将 RNA 由胶上转至尼龙膜,与生物素标记的 tRNA 探针进行杂交,使用化学发光法生物素标记核酸检测试剂盒进行显影。检测 tRNA^{U^{ic}} 所用的探针序列为 biotin-5'-GCTTCTGTGGCGCAGTGGTTTAGCGCATCGTGCTTATAAACGTTTAAACACGTCTATGTTCAAAGCACAGTCGTTTAGAAACGCGATGGTCGTGGGTTTCGAACCCCTCCAGAAGCA-3'-biotin, 检测 tRNA^{U^{CGU}} 所用的探针序列为 biotin-5'-TTGACGGGATCGAACCATCGGTCTTCTCATTACGAGTGAGACGCCTTACCACTTGCCAAAAGGGC-3'-biotin。

1.15 AlkB 处理 RNA

在 AlkB 反应缓冲液中加入 60 pmol 总 RNA 和 120 pmol AlkB, 25 °C 反应 2 h。反应结束后使用 RNA 快速浓缩纯化试剂盒回收 RNA, 通过微量分光光度计测定浓度后用于后续实验。RNA 与 AlkB 的用量计算依据如下:

根据测得的比酶活 1.08 U/mg, x mol 的底物需要约 0.05x mol 的酶处理 1 min 以完全去甲基化。而这里用的是总 RNA, 平均长度 2 kb, 是酶活反应中所用底物的 100 倍, 因此 x mol 的 RNA 则需要 5x mol 的酶。考虑到这是理论值, 实际的反应效率必定低于理论值并且会随着时间而降低, 此外所用底物的碱基修饰比例为 1/20, 而 tRNA 中可能更高, 因此将 RNA 与酶的比例调整为 1:2, 并且增加处理时间至 2h 以充分反应。

2 结果与分析

2.1 AlkB 在大肠杆菌中的表达

由于这里选择的 AlkB 蛋白来自大肠杆菌,

首先尝试在大肠杆菌中对其进行分泌表达。将 AlkB 基因片段克隆入 pET28a 载体获得表达载体 pET28a-AlkB, 化学转化进大肠杆菌 BL21(DE3)感受态, 筛选阳性转化子。验证无误后, 挑取单菌落于 5 mL LB 液体培养基中培养过夜作为一级培养液。将一级培养液以 1% 的接种量转接到 50 mL LB 培养基中, 待 OD₆₀₀ 值达到 0.6–0.8 时, 加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 进行诱导。37 °C 诱导 16 h 后收集发酵液上清和菌体, 对菌体进行超声破碎, 通过 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测 AlkB 的表达情况。

如图 1 所示, 其中 A 为 SDS-PAGE 的考马斯亮蓝染色结果, B 为 Western blotting 检测结果。泳道 1 为发酵液上清, 泳道 2 为菌体破碎上清, 泳道 3 为菌体破碎沉淀, 泳道 M 为分子量标准。可以看到, 大肠杆菌中表达的 AlkB 大多位于菌体破碎沉淀组分, 显示其在大肠杆菌中以包涵体形式存在(泳道 3)。AlkB 的实际大小与理论大小(23.9 kDa)相符。后期我们逐步降低诱导温度至 16 °C, 仍然无法解决此问题。AlkB 是大肠杆菌的内源蛋白, 包涵体的形成可能是使用 IPTG 诱导型启动子后蛋白质表达水平过高, 远远超出原本水平导致。

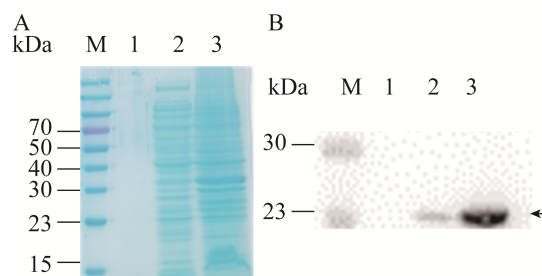


图 1 AlkB 蛋白在大肠杆菌中的表达情况

Figure 1 Examine AlkB expression in *Escherichia coli* BL21 strain. A: Coomassie blue staining of SDS-PAGE. B: Western blotting detecting AlkB. Lane M: Marker; Lane 1: Cell culture medium; Lane 2: Supernatant of cell lysate; Lane 3: Pellet of cell lysate.

2.2 AlkB 在毕赤酵母中的表达

由于 AlkB 无法在大肠杆菌中可溶性高效表达, 接下来尝试使用毕赤酵母表达系统, 该系统中不存在 AlkB 同源蛋白。将 AlkB 基因片段克隆入 pPICZ α 载体获得表达载体 pPICZ α -AlkB, 将该质粒线性化后电转入毕赤酵母 GS115 感受态细胞, 使用高浓度 zeocin 抗性平板筛选多拷贝阳性转化子。基因组 PCR 验证无误后, 使用甲醇培养诱导并通过 Western blotting 初步比较所有阳性转化子中目标蛋白 AlkB 的表达水平, 挑选表达水平最高的菌株进行后续的表达纯化实验。该菌株命名为 GS115-pPICZ α -AlkB。

2.3 AlkB 的亲纯化

对以上构建获得的 GS115-pPICZ α -AlkB 菌株进行摇瓶培养和甲醇诱导, 方法如 1.8 所示。分离发酵液上清进行超滤浓缩、镍柱纯化, 结果如图 2 所示。图 2A 为 SDS-PAGE 的考马斯亮蓝

染色结果, 图 2B 为 Western blotting 检测结果。其中泳道 1 为发酵液上清, 泳道 2 为上样流穿液, 泳道 3 为 25 mmol/L 咪唑洗涤流穿液, 泳道 4-5 为 300 mmol/L 咪唑洗脱流穿液。可以看到, 镍柱亲和层析能高效分离纯化目的蛋白和去除杂蛋白, 获得较高纯度的可溶性 AlkB。通过使用 Image J 对洗脱泳道的条带灰度进行定量分析, 目标蛋白纯度大于 95%。

2.4 AlkB 的酶学性质研究

2.4.1 甲醛浓度-荧光强度增值标准曲线的测定

AlkB 酶活检测的原理实际上是对反应产生的甲醛进行定量, 因此首先需要绘制不同甲醛浓度下荧光值变化的标准曲线。室温 25 °C 下在 AlkB 反应缓冲液中加入不同浓度的甲醛(1-20 $\mu\text{mol/L}$), FDH(终浓度 2.5 U/mL), NAD⁺(终浓度 1 mmol/L), 反应体系 120 μL 。用酶标仪连续监测 NADH 的产生直到荧光值趋于稳定, 记录荧光强度增值。将荧光强度增值(单位: RFU)相对于甲醛浓度(单位: $\mu\text{mol/L}$)作图, 拟合成标准曲线。所得标准曲线方程为 $y=125.16x-47.316$, $R^2=0.9949$ 。

2.4.2 温度对于 AlkB 催化速率的影响

我们首先研究了不同温度对于 AlkB 催化速率的影响, 以探究该酶的最适反应温度。实验方法如 1.10 所述, 测试温度选择 15、20、25、30、35 °C。将 AlkB 催化反应速率定义为反应体系中每分钟催化底物产生甲醛的量(单位: $\mu\text{mol/L}$), 计算方法为 $V[\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})]=\text{单位时间}(\text{min})\text{荧光值的增加}/\text{标准曲线斜率}$ 。不同温度的反应体系中反应速率的计算结果如图 3A 所示。可以看到, 反应速率在 25 °C 左右达到最高, 随着温度的升高和降低反应速率均迅速降低。因此我们纯化获得的 AlkB 最适反应温度为 25 °C。

2.4.3 pH 对于 AlkB 催化速率的影响

接下来我们研究了不同 pH 对于 AlkB 催化速率的影响, 以探究该酶的最适 pH。实验方法

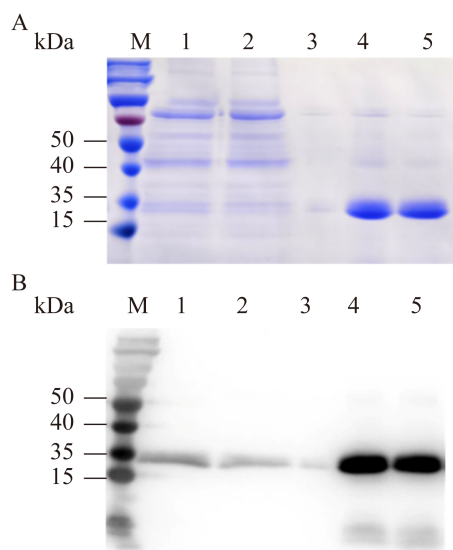


图 2 AlkB 蛋白的镍柱纯化结果

Figure 2 AlkB purification results by Nickel column. A: SDS-PAGE and Coomassie blue staining of different fractions. B: Western blotting detecting target protein AlkB. Lane M: Marker; Lane 1: Cell culture medium; Lane 2: Flow through; Lane 3: Wash buffer containing 25 mmol/L imidazole; Lane 4-5: Wash buffer containing 300 mmol/L imidazole.

如 1.11 所述, 测试 pH 选择 4.0、4.7、5.0、6.5、7.8、8.5、9.2、10.0。反应速率 V 的计算方法与 2.4.2 相同。不同 pH 的反应体系中反应速率的计算结果如图 3B 所示。可以看到, 反应速率在极端 pH (<5 或 >9) 下都非常低, 在接近中性 pH 时达到最高。我们纯化获得的 AlkB 最适 pH 为 6.5。

2.4.4 AlkB 的动力学常数测定

接下来我们进一步测定了 AlkB 的酶动力学参数。实验方法如 1.12 所述, 测试底物浓度 $[S]$ 选择 0, 5, 10, 15, 25, 30 $\mu\text{mol/L}$ 。反应速率 V 的计算方法与 2.4.2 相同。如图 4A 所示, 在底物浓度 $[S]$ 高于 15 $\mu\text{mol/L}$ 后反应速率达到最大。

由于底物浓度 $[S]$ -反应速率 V 的关系曲线较

难精确计算 K_m 和 V_{\max} , 我们通过 Hanes-Woolf 法作图, 绘制 $[S]/V$ 与 $[S]$ 关系曲线, 并进行线性拟合(图 4B)。拟合趋势线的斜率为 2.573 9, 与 x 轴的截距为 $-8.320 9/2.573 9=-3.23$ 。根据斜率 $=1/V_{\max}$, 与 x 轴的截距 $=-K_m$, 计算可得 $V_{\max}=1/2.573 9=0.39 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, $K_m=3.23 \mu\text{mol/L}$ 。通过 Hanes-Woolf 法计算获得的 K_m 和 V_{\max} 数值也与图 4A 相匹配。

将酶活力单位(U)定义为: 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下, 1 min 内转化 1 μmol 底物所需的酶量。根据 AlkB 的催化原理, 每转化 1 μmol 底物产生 1 μmol 的甲醛, 那么 1 U 等于 25 $^{\circ}\text{C}$ 下, 1 min 内产生 1 μmol 甲醛所需要的 AlkB 的量。经计算得出 AlkB 的比酶活为 1.08 U/mg。

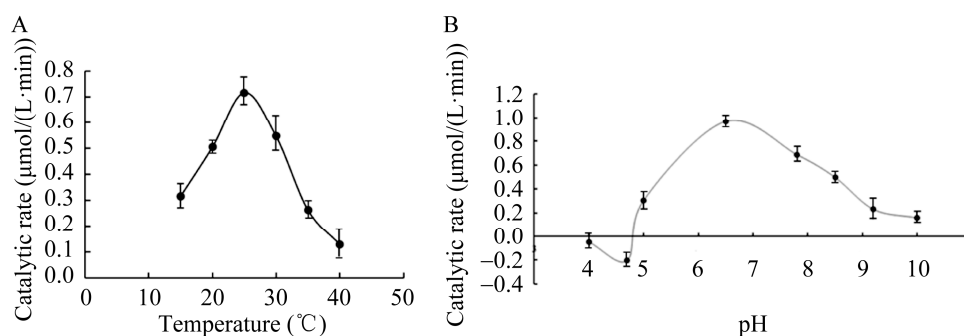


图 3 AlkB 催化速率随温度和 pH 的变化

Figure 3 The catalytic activity change of AlkB with temperature and pH. A: Temperature. B: pH. Data are shown as the mean of three replicates, with the error bars representing \pm standard error.

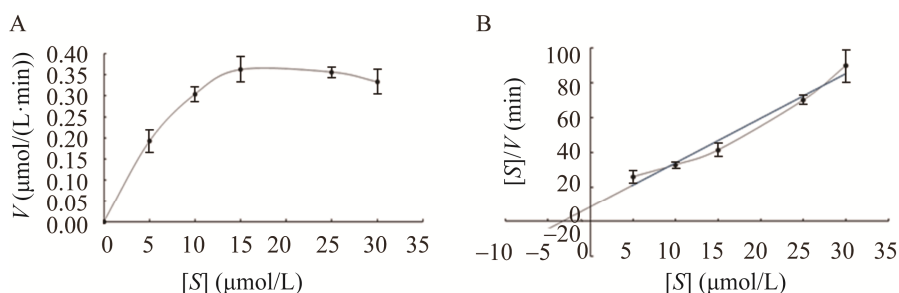


图 4 AlkB 的动力学常数测定

Figure 4 Measurement of kinetic parameters of AlkB. A: The reaction rates of AlkB at different substrate concentrations. B: Hanes-Woolf plot of the data in A. Data are shown as the mean of three replicates, with the error bars representing \pm standard error.

2.5 AlkB 的处理对于荧光定量 PCR 法检测 tRNA 表达水平的影响

接下来,我们尝试使用纯化获得的 AlkB 去甲基酶处理 RNA,研究 AlkB 的处理是否有助于提高荧光定量 PCR 法对 tRNA 表达水平的检测精准度。我们选取了 2 种 tRNA 作为检测对象,分别是 $\text{tRNA}_{\text{UAU}}^{\text{Ile}}$ 和 $\text{tRNA}_{\text{CGU}}^{\text{Thr}}$,两者在毕赤酵母野生型菌株 GS115 中均只有一个拷贝。课题组前

期构建了 $\text{GS115-tRNA}_{\text{UAU}}^{\text{Ile}}$ 和 $\text{GS115-tRNA}_{\text{CGU}}^{\text{Thr}}$ 菌株,分别额外导入了 2 个拷贝的 $\text{tRNA}_{\text{UAU}}^{\text{Ile}}$ 和 $\text{tRNA}_{\text{CGU}}^{\text{Thr}}$ 基因。Northern blotting 检测(实验方法如 1.14 所述)显示,转基因菌株中 $\text{tRNA}_{\text{UAU}}^{\text{Ile}}$ 和 $\text{tRNA}_{\text{CGU}}^{\text{Thr}}$ 的表达水平分别达到了野生型菌株的 3–4 倍(图 5A、5B),与预期相符。直接通过荧光定量 PCR (实验方法如 1.13 所述)检测 tRNA 表达水平结果如图 5C 所示,仍然可以看到转基因

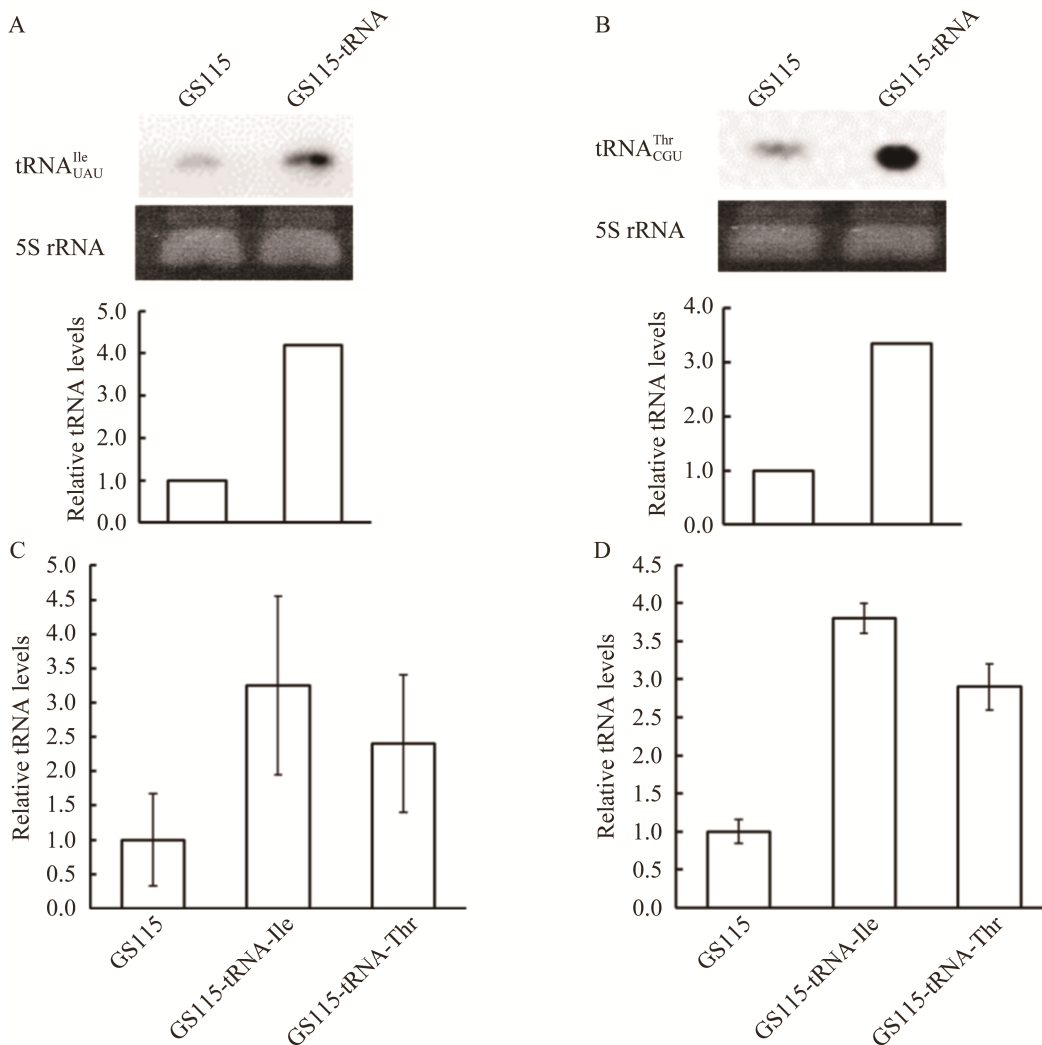


图 5 AlkB 处理对于荧光定量 PCR 法检测 tRNA 表达水平的准确度的影响

Figure 5 The effect of AlkB treatment on the accuracy of real-time PCR in detecting tRNA expression levels. A: Northern blotting measuring $\text{tRNA}_{\text{UAU}}^{\text{Ile}}$ levels in two strains, as well as its quantification by Image J. B: Northern blotting measuring $\text{tRNA}_{\text{CGU}}^{\text{Thr}}$ levels in two strains, as well as its quantification by Image J. C: Regulator real-time PCR to detect tRNA levels. D: Real-time PCR after AlkB treatment to detect tRNA expression levels. For C and D, data are shown as the mean of three replicates, with the error bars representing \pm standard error.

菌株中 tRNA 表达水平提高的趋势,但是过大的误差线导致与野生型菌株相比失去了差异显著性。误差线较大的原因是 tRNA 上的众多修饰影响了逆转录效率,导致各平行实验的逆转录质量均不同。在逆转录步骤之前使用 AlkB 处理 RNA 样品(实验方法如 1.15 所述),纯化 RNA 后再次通过荧光定量 PCR 检测 tRNA 表达水平,结果如图 5D 所示。可以看到转基因菌株与野生型菌株之间的差异更加明显,误差线显著减小,说明 AlkB 的处理可以减少 tRNA 的修饰以提高逆转录质量,从而帮助荧光定量 PCR 检测结果变得更精确。

3 讨论与结论

3.1 AlkB 的酶学性质比较

本研究尝试在大肠杆菌和毕赤酵母两种表达系统中分泌表达 AlkB。AlkB 的理论大小为 23.9 kDa,在大肠杆菌和毕赤酵母中表达的实际大小与理论大小相符。在大肠杆菌中多以包涵体形式存在,但是成功在毕赤酵母中表达并使用镍柱亲和层析纯化了 AlkB,纯度达到 95%以上。通过对于纯化所得 AlkB 进行酶学性质参数的测定显示,最适反应温度为 25 °C,最适 pH 值为 6.5, $V_{\max}=0.39 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, $K_m=3.23 \mu\text{mol}/\text{L}$,比酶活为 1.08 U/mg。

Roy 等^[13]曾通过监测 NADH 类似物的荧光强度变化,测定了大肠杆菌表达 AlkB 的 K_m 值为 $(5.4\pm 0.9) \mu\text{mol}/\text{L}$,高于本文中测得的 K_m 值,说明本实验用毕赤酵母表达的 AlkB 蛋白与 DNA 底物的亲和力高于大肠杆菌表达的 AlkB;其测得 V_{\max} 为 $0.04 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$,小于本文测定的 $0.39 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$,说明我们表达纯化获得的 AlkB 具有显著更高的催化速率。二者酶学性质

的差异,可能与所用 AlkB 的一级序列存在略微差异有关。本实验所用的 AlkB 序列克隆自 MG1655 菌株,而 Roy 等克隆自 BL21 菌株,二者在 3 个氨基酸位点存在差异(G8A、S71T 和 T201I)。并且 Roy 等使用 NADH 类似物 APADH 进行荧光检测,与本实验选用 NADH 也有所不同,可能也是测得酶学性质有所差异的原因之一。另外,酶学性质的差异也可能由表达宿主的不同而造成。作为常用的真核表达系统,毕赤酵母中表达的蛋白存在一定程度的糖基化修饰。目前关于 AlkB 的糖基化修饰以及与功能的关系没有太多的报道,可能是出现酶学性质差异的因素。此外,也有报道使用非 NADH 或类似物荧光变化测定 AlkB 的 DNA 脱烷基酶活性的方法,例如放射性标记的 DNA 凝胶电泳^[18],以及使用 HPLC 或质谱分析法对非放射性标记 DNA 进行分析等方法。

3.2 AlkB 的应用

DNA 和 RNA 的甲基化修饰都具备重要的生物学功能,而这些甲基化修饰却有可能为一些核酸的研究技术增加困难。本研究显示,AlkB 对 RNA 的处理可以增加荧光定量 PCR 对 tRNA 表达水平检测的准确度。后续可以尝试 AlkB 处理是否可以改善 tRNA 建库和高通量测序的效率。

除了 tRNA 相关的研究,AlkB 在 DNA 相关的研究中也存在应用潜力。例如许多限制性内切酶对靶序列位点的识别受甲基化影响,甲基化修饰的存在可能降低工具酶对靶标位点的切割,而 AlkB 处理可以解决这一问题。本研究中对于 AlkB 酶学性质的研究,也为核酸去甲基反应的条件、酶量需求估算以及反应时间的设定提供了依据。

参考文献

- [1] MOORE LD, le T, FAN GP. DNA methylation and its basic function[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2013, 38(1): 23-38.
- [2] XING YZ, GONG RQ, XU YC, LIU KS, ZHOU M. Codon usage bias affects α -amylase mRNA level by altering RNA stability and cytosine methylation patterns in *Escherichia coli*[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2020, 66(9): 521-528.
- [3] WION D, CASADESÚS J. N6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(3): 183-192.
- [4] WANG X, ZHAO BS, ROUNDTREE IA, LU ZK, HAN DL, MA HH, WENG XC, CHEN K, SHI HL, HE C. N6-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency[J]. *Cell*, 2015, 161(6): 1388-1399.
- [5] LIU FG, CLARK W, LUO GZ, WANG XY, FU Y, WEI JB, WANG X, HAO ZY, DAI Q, ZHENG GQ, MA HH, HAN DL, EVANS M, KLUNGLAND A, PAN T, HE C. ALKBH₁-mediated tRNA demethylation regulates translation[J]. *Cell*, 2016, 167(3): 816-828.e16.
- [6] HEID CA, STEVENS J, LIVAK KJ, WILLIAMS PM. Real time quantitative PCR[J]. *Genome Research*, 1996, 6(10): 986-994.
- [7] COSTA V, ANGELINI C, de FEIS I, CICCOCICOLA A. Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-seq[J]. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 2010: 853916.
- [8] WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2009, 10(1): 57-63.
- [9] HANADA T, WEITZER S, MAIR B, BERNREUTHER C, WAINGER BJ, ICHIDA J, HANADA R, ORTHOFER M, CRONIN SJ, KOMNENOVIC V, MINIS A, SATO F, MIMATA H, YOSHIMURA A, TAMIR I, RAINER J, KOFLER R, YARON A, EGGAN KC, WOOLF CJ, GLATZEL M, HERBST R, MARTINEZ J, PENNINGER JM. CLP1 links tRNA metabolism to progressive motor-neuron loss[J]. *Nature*, 2013, 495(7442): 474-480.
- [10] MAUTE RL, SCHNEIDER C, SUMAZIN P, HOLMES A, CALIFANO A, BASSO K, DALLA-FAVERA R. tRNA-derived microRNA modulates proliferation and the DNA damage response and is down-regulated in B cell lymphoma[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(4): 1404-1409.
- [11] XIAO MZ, LIU JM, XIAN CL, CHEN KY, LIU ZQ, CHENG YY. Therapeutic potential of ALKB homologs for cardiovascular disease[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 131: 110645.
- [12] PERRY GS, das M, WOON ECY. Inhibition of AlkB nucleic acid demethylases: promising new epigenetic targets[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, 64(23): 16974-17003t.
- [13] ROY TW, BHAGWAT AS. Kinetic studies of *Escherichia coli* AlkB using a new fluorescence-based assay for DNA demethylation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(21): e147.
- [14] FALNES PØ. Repair of 3-methylthymine and L-methylguanine lesions by bacterial and human AlkB proteins[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(21): 6260-6267.
- [15] DELANEY JC, SMEESTER L, WONG C, FRICK LE, TAGHIZADEH K, WISHNOK JS, DRENNAN CL, SAMSON LD, ESSIGMANN JM. AlkB reverses etheno DNA lesions caused by lipid oxidation *in vitro* and *in vivo*[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2005, 12(10): 855-860.
- [16] DELANEY JC, ESSIGMANN JM. Mutagenesis, genotoxicity, and repair of L-methyladenine, 3-alkylcytosines, L-methylguanine, and 3-methylthymine in alkB *Escherichia coli*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(39): 14051-14056.
- [17] XU YC, LIU KS, HAN Y, XING YZ, ZHANG YX, YANG QY, ZHOU M. Codon usage bias regulates gene expression and protein conformation in yeast expression system *P. pastoris*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 91.
- [18] FALNES PØ, BJØRÅS M, AAS PA, SUNDHEIM O, SEEBERG E. Substrate specificities of bacterial and human AlkB proteins[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(11): 3456-3461.