

蛋白质 N 端豆蔻酰化修饰的 基因工程表达偶联加工系统

段治军 陈长征 杨新颖 李伯良* 王德宝

(中国科学院上海生物化学研究所 上海, 200031)

摘要 对酵母 NMT 基因在大肠杆菌中表达进行较详细的研究, 进而构建了复制子为 p15A 并含卡那霉素抗性基因的相容性表达质粒 pKZMT, 将其与表达质粒 pCZmCa1 共转化进大肠杆菌 BL21(DE3)F', 进行双质粒表达偶联加工修饰研究, 其中 pCZmCa1 表达底物蛋白 - 小鼠 cAMP 依赖的蛋白激酶催化亚基 α (PKA-mC_α)。SDS-PAGE 及 Western blot 分析表明, 双质粒表达系统中, PKA-mC_α 都得到了稳定的高表达, 尤其在 23℃ 低温诱导表达时, 表达产物的可溶性部分明显增多; 而酵母 NMT 被控制在有利于活性功能的可溶性低水平表达。 [³H]myristic acid 标记测定及放射自显影的结果显示, 在大肠杆菌中表达的重组 PKA-mC_α 被豆蔻酰化修饰。

关键词 蛋白质 N 端豆蔻酰化, PKA-mC_α, 偶联表达, 双质粒系统

1982 年, 大肠杆菌表达的重组人胰岛素被成功地用于临床治疗, 从此, 随着 DNA 重组技术的不断发展, 越来越多的外源蛋白质在大肠杆菌中得到了高效表达。但是, 大肠杆菌缺乏蛋白质翻译后加工修饰系统, 许多在大肠杆菌中重组表达的外源蛋白, 因得不到应有的翻译后加工修饰而不能充分表现其生物学结构和功能^[1]。这种大肠杆菌表达系统的缺陷, 也是基因工程表达研究的重要课题之一。本文报道在大肠杆菌中构建真核生物的蛋白质 N 端豆蔻酰化修饰系统, 作为这方面的研究尝试。

我们已报道利用 PCR 技术克隆了啤酒酵母 NMT(YSCNMT)的编码基因, 并在大肠杆菌中实现了高效活性表达^[2]。本工作是在上述基础上, 进一步研究了 YSCNMT 基因在大肠杆菌中的表达情况, 并进而探索构建了双质粒表达偶联加工修饰系统。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒: 大肠杆菌 RR1、MC1061、AR68、BL21、TG1、NM522 和 BL21(DE3), 质粒 pKK233-2 和 pACYC177 为本实验室保存。大肠杆菌 BL21(DE3)F', 质粒 pDHPS3 和 pMFT7-5 为本实验室构建。

1.1.2 酶、化学试剂及其他: Pseudomonas acyl CoA synthetase 购自 Sigma。限制酶、T4

* 本文联系人。

本文于 1995 年 9 月 11 日收到。

DNA 连接酶、Klenow 酶、Mung Bean Nuclease 为 GIBCO/BRL 或 Boehringer Mannheim 的产品。Agarose 和 LMP Agarose 为 GIBCO/BRL 公司产品。LiCoA、Acrylamide、Bisacrylamide、X-gal、IPTG 为 Sigma 公司产品。Amplify™、Hyperfilm MP、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP (3000Ci/mmol) 和 $[9, 10(n)\text{-}^3\text{H}]$ myristic acid (54Ci/mmol) 购自 Amersham 公司, 兔抗 PKA-mC_α 抗血清为本组制备。

1.2 方法

1.2.1 DNA 重组克隆:质粒抽提、酶切反应、电泳鉴定、DNA 回收、连接反应、细菌转化等均照文献[3]略作修改进行。

1.2.2 蛋白质分析:蛋白质浓度测定采用 Bradford 的方法^[4]。SDS-PAGE 分析按照 Laemmli 方法^[7]进行, 胶浓度为 15%, 考马斯亮蓝染色, 对染色后电泳胶进行黑度密度自动扫描, 测定表达产物的表达量; 或电泳胶经半干转移仪转移至 PVDF 膜上, 进行 Western blot 分析。

1.2.3 YSCNMT 基因的表达:见表 1 及文献[2]。

1.2.4 重组 YSCNMT 和重组 PKA-mC_α 粗抽提物的制备:参见文献[2]。

1.2.5 YSCNMT 基因和 PKA-mC_α 基因在大肠杆菌中的共表达:采用电穿孔的方法, 将含完整 YSCNMT 编码基因的表达质粒和含完整 PKA-mC_α 编码基因的表达质粒共转化进大肠杆菌 BL21(DE3)F', 接种单菌落于 LB-ApKnTc (含 Ap, 50μg/ml; Kn, 25μg/ml; Tc, 10μg/ml) 培养液, 37℃ 培养过夜。2.5% 接种上述过夜菌于新鲜的 LB-ApKnTc 培养液, 37℃ 培养 2~3h 至 A₆₀₀ 为 0.3~0.5, 然后加 IPTG 至终浓度 1mmol/L, 37℃ 诱导表达 3h 或 23℃ 诱导表达 11h, 冰浴冷却菌液, 取样测 A₆₀₀, 离心收集菌体, 制备 SDS-PAGE 分析样品; 或将收集好的表达菌体悬浮于适当体积的抽提缓冲液 (mmol/L, Tris·HCl 30、EDTA 1、KCl 50、β-巯基乙醇 5, pH7.2), 超声波破菌, 13 800r/min 离心 40min(4℃), 收集上清液和沉淀, 制备 SDS-PAGE 分析样品。

1.2.6 YSCNMT 体外活力分析:参见文献[2], 反应体系为 20μl。反应完成后, 加等体积的 2× 上样缓冲液, 进行 SDS-PAGE, 然后进行放射自显影分析。

1.2.7 YSCNMT 体内活力分析:2.5% 接种上述双质粒转化子过夜菌于 5ml 新鲜的 LB-ApKnTc 培养液, 37℃ 培养约 3.5h 至 A₆₀₀ 为 0.6~0.8, 然后加 IPTG 至终浓度 1mmol/L 和 250μCi^{[3}H]myristic acid, 混匀后取 2.5ml 培养液于 37℃ 诱导表达 0.5h; 其余培养液于 23℃ 诱导表达 11h。冰浴冷却菌液, 取样测 A₆₀₀, 离心收集菌体, 制备 SDS-PAGE 分析样品; 或将收集好的表达菌体悬浮于适当体积的抽提缓冲液 (mmol/L, Tris·HCl 30、EDTA 1、KCl 50、β-巯基乙醇 5, pH7.2), 冻融法 (液氮中放 3min, 再 37℃ 1min, 重复 10 次) 破菌, 13 800r/min 离心 40min(4℃), 收集上清液和沉淀, 分别制备电泳样品并进行 SDS-PAGE 分析, 然后进行放射自显影分析。

1.2.8 放射自显影分析:样品 SDS-PAGE 分离后, 将电泳胶在固定液 (25% 异丙醇, 10% 冰醋酸) 中固定 30min, 1mol/L 羟胺 (pH9.5) 中洗 10min, 再浸泡在 Amplify™ 中 30min, 然后将胶加热抽干, 最后于 -70℃ 与 Hyperfilm MP 感光片曝光 2~4d。

2 结果

2.1 YSCNMT 基因在大肠杆菌中的表达

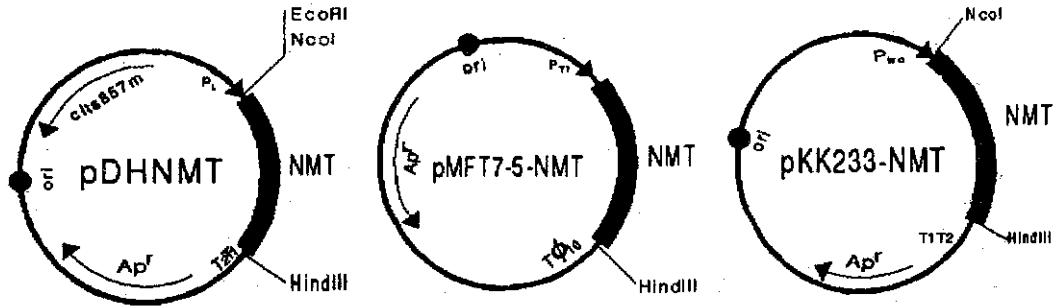


图 1 不同启动子控制下的 YSCNMT 基因的表达质粒

Fig. 1 Expression plasmids for YSCNMT gene under the control of different promoters

表 1 在不同启动子控制下 YSCNMT 基因在大肠杆菌中的表达
Table 1 The expression of YSCNMT gene under the control
of different promoters in *E. coli* strains

启动子	质粒菌	抗性筛选	诱导条件	表达情况	
				表达量 %	表达产物的主要形式
P _L	RR1(pDHNMT)	Amp ^r	2% 接种; 30℃, 2h; 42℃, 3h	2	包涵体
	BL21(pDHNMT)	Amp ^r	2% 接种; 30℃, 2h; 42℃, 3h	4	包涵体
	MC106(pDHNMT)	Amp ^r	2% 接种; 30℃, 2h; 42℃, 3h	3	包涵体
	AR68(pDHNMT)	Amp ^r	5% 接种; 30℃, 2h; 38℃, 3h	8	包涵体
T _{rc}	TG1 (pKK233-NMT)	Amp ^r	2% 接种; 37℃, 2h; 0.5mmol/L IPTG, 37℃, 2h	1	包涵体和可溶性蛋白
	NM522 (pKK233-NMT)	Amp ^r	2% 接种; 37℃, 2h; 0.5mmol/L IPTG, 37℃, 3h	1	包涵体和可溶性蛋白
	BL21(DE3) (pKK233-NMT)	Amp ^r	2% 接种; 37℃, 3h	2	包涵体和可溶性蛋白
T7	BL21(DE3) (pMFT7-5-NMT)	Amp ^r	2% 接种; 37℃, 2h; 0.5mmol/L IPTG, 37℃, 3h	39	包涵体和可溶性蛋白

利用所克隆的重组 YSCNMT 基因^[2], 分别构建了 P_L、T7、T_{rc} promoter 控制下的含完整 YSCNMT 编码基因的表达质粒 pDHNMT、pMFT7-5-NMT、pKK233-NMT(图 1), 并分别转化大肠杆菌, 进行诱导表达研究。表 1 结果表明, YSCNMT 基因在上述 3 种 promoter 控制下, 在不同的大肠杆菌菌株中均能得到表达。其中, P_L promoter 控制下的温敏诱导表达, 产物主要以包涵体形式存在, 表达量为 2%~8%; 而 T7 promoter 和 T_{rc} promoter 控制下的经 IPTG 诱导表达, 前者表达产物表达量达 39%, 远高于文献报道^[6]的 1%, 且相当部分是可溶性蛋白; 后者表达产物表达量虽较低(1%~2%), 但可溶性部分也占较高的比例; 而可溶性部分均具有 NMT 酶活性。

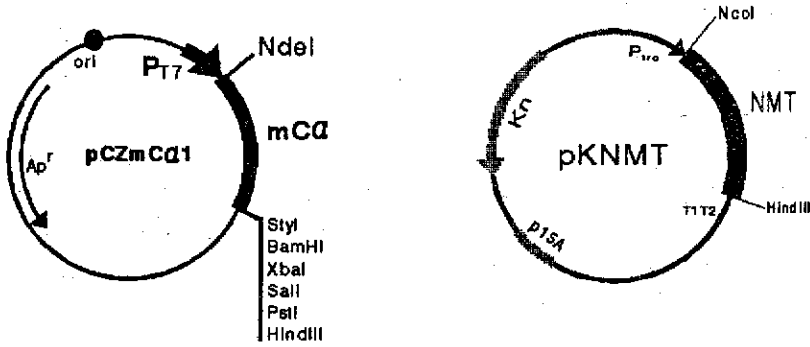


图 2 相容性表达质粒 pKNMT 和 pCZmCa1

Fig2 Compatible expression plasmids
pKNMT and pCZmCa1

2.2 双质粒表达系统的构建

根据上述结果,并考虑有关质粒相容性及其外源基因表达高低等问题,将 YSCNMT 编码基因用 Trc promoter 控制,构建了复制子为 p15A、含卡那霉素(Kn)抗性基因的相容性表达质粒 pKNMT(图 2);而 PKA-mC_α 编码基因则被置于 T7promoter 控制下,构建表达质粒 pCZmCa1,含氨苄青霉素(Ap)抗性基因(图 2)。利用电穿孔方法,将这两种质粒共转化进大肠杆菌 BL21(DE3)F',在 Ap/Kn 双抗筛选条件下,得到稳定的转化子 BL21(DE3)F'(pKNMT/pCZmCa1)。

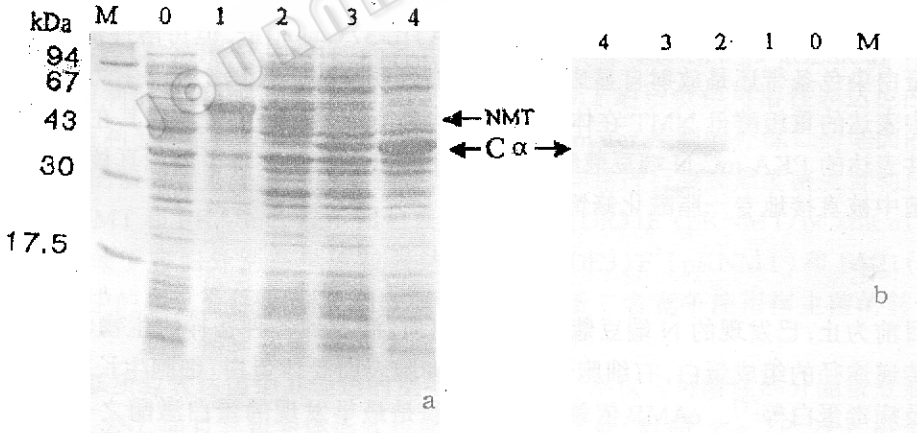


图 3 重组表达的 YSCNMT 和 PKA-mC_α 的蛋白分析图谱

Fig.3 Analysis of the coexpressed YSCNMT and PKA-mC_α in *E. coli* BL21(DE3)F' harboring the plasmids pKNMT and pCZmCa1

Assay by 15% SDS-PAGE with each aliquote equivalent to 0.1 A₆₀₀ of cell culture (a) and Western blot with a rabbit anti-PKA-mC_α antiserum (b): M, Protein molecular weight standards; 0, *E. coli* strain BL21(DE3)F'; 1, *E. coli* strain BL21(DE3)(pMFT7-5-NMT); 2, *E. coli* strain BL21(DE3)F'(pKNMT); 3, *E. coli* strain BL21(DE3)F'(pKNMT/pCZmCa1); 4, *E. coli* strain BL21(DE3)F'(pCZmCa1).

2.3 PKA-mC_α N 端豆蔻酰化修饰表达

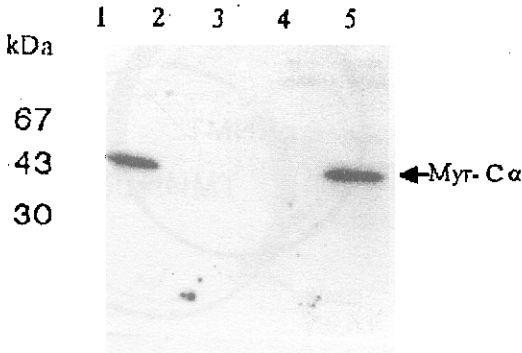


图 4 NMT 活力测定放射自显影图谱

Fig.4 NMT assay *in vitro* and *in vivo* by autoradiography

1. *in vitro* assay sample (see "methods")
2. *in vitro* assay control(see "methods")
3. *in vivo* assay control (*E. coli* strain BL21(DE3)F')
4. *in vivo* assay control (*E. coli* strain BL21(DE3)F'(pKNMT))
5. *in vivo* assay control (*E. coli* strain BL21(DE3)F'(pKNMT/pCZmCa1))

(图 4)显示,体外和体内条件下均观察到相同分子量的单一放射自显影条带,其分子量与诱导表达的 PKA-mC_α 一致。同时,对不同温度下诱导表达的目标产物进行比较分析,结果见图 5。22℃ 下共表达的 PKA-mC_α 量(图 5, A)比 37℃ 时稍低,但可溶性部分(图 5, S)不管从蛋白染色条带还是放射自显影条带都观察到明显提高。以上结果有力地表明在大肠杆菌中表达的重组酵母 NMT 在体外和体内均具有 NMT 酶活性。尤其在体内条件下直接使共表达的 PKA-mC_αN 端豆蔻酰化修饰,证明已成功地实现了外源真核基因产物在大肠杆菌中被直接地专一脂酰化修饰。

3 讨 论

到目前为止,已发现的 N 端豆蔻酰化的蛋白质,涉及到各种各样的生物学功能,有细胞信号传递途径的组成蛋白,有细胞骨架蛋白、细胞表面受体蛋白、细胞生长因子、原癌基因产物及病毒蛋白等^[7]。cAMP 依赖的蛋白激酶是最早发现的蛋白激酶之一,它是细胞信号传递途径的重要组分,对调节细胞生长和代谢起着重要作用。其催化亚基是第一个被发现 N 端豆蔻酰化修饰的蛋白蛋^[8],X-射线晶体衍射分析表明,N 端豆蔻酰基可以增加 PKA-mC_α 的热稳定性^[9]。我们以 YSCNMT 和 PKA-mC_α 为模型,在大肠杆菌中构建了外源蛋白质 N 端豆蔻酰化修饰系统,这不仅为研究蛋白质 N 端豆蔻酰化的生物学功能及蛋白激酶的结构和功能提供了条件,而且为进一步探索其他大肠杆菌表达偶联加工系统奠定了基础。

上述转化的双质粒菌 BL21 (DE3) F' (pKNMT/pCZmCa1), 经 IPTG 诱导表达后,其 SDS-PAGE(图 3a)和 Western blot(图 3b)的分析结果均显示 PKA-mC_α (约 40kDa)在双质粒系统中得到了稳定的高表达;而 YSCNMT (约 53kDa)的表达量较低,不但远低于含单一质粒 pMFT7-5-NMT 的表达菌的诱导表达量,也低于含单一质粒 pKNMT 时的诱导表达量(图 3a)。进一步利用 [³H] 标记的豆蔻酸 [³H]-Myristic acid) 进行体外和体内 NMT 酶活力分析(见“方法”部分),其凝胶放射自显影的结果

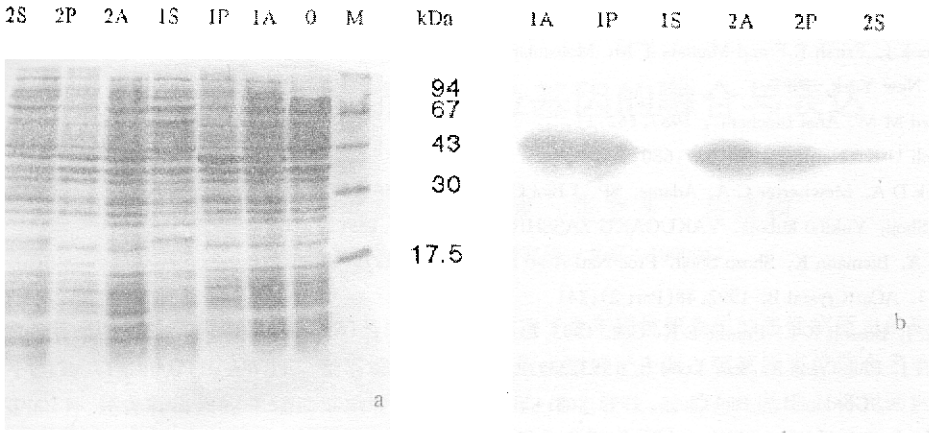


图 5 温度对大肠杆菌双质粒系统中表达产物可溶性的影响

Fig.5 N-myristoylation of PKA-mC₈ in *E. coli* strain BL21(DE3)F'(pKNMT/pCZmCa1) at different temperature

Analysis with 15% SDS-PAGE (a) and autoradiography (b); M, protein molecular weight standards; 0, total extract of bacteria before induced with IPTG; 1A, total extract of bacteria after induced with IPTG at 37°C; 1P, pelletes of expressed bacteria at 37°C; 1S, lysate of expressed bacteria at 37°C; 2A, total extract of bacteria after induced with IPTG at 22°C; 2P, pelletes of expressed bacteria at 22°C; 2S, lysate of expressed bacteria at 22°C.

近年来,利用双质粒、三质粒系统来研究蛋白质的相互作用^[10]、促进某些蛋白质的活性表达^[11]及研究生物体内功能途径各组分之间的相互作用^[12],是非常行之有效的方法。在上述构建的双质粒系统中,所用的两种相容性表达质粒 pKNMT 和 pCZmCa1 含不同的抗性基因,有利于筛选;而 Trc promoter 控制 YSCNMT 的较低但可溶性表达也占较高比例,既可能有利于其活性功能发挥,也有利于 T7 promoter 控制的外源目的基因的高效表达及其产物的修饰。另外,对图 3a 中的 2、3、4 蛋白样品进行凝胶黑度密度自动扫描分析表明, YSCNMT 和 PKA-mC₈ 在双质粒表达菌 BL21(DE3)F'(pKNMT/pCZmCa1) 中的表达量都明显低于它们分别在单质粒表达菌 BL21(DE3)F'(pKNMT) 和 BL21(DE3)F'(pCZmCa1) 中的表达量(数据未给出),原因可能在于二者竞争使用宿主菌的转录、翻译资源^[13]。

在上述双质粒表达菌中共表达的重组 PKA-mC₈, 不仅其可溶性部分能被豆蔻酰化修饰(图 5a, 1S, 2S), 而且其包涵体形式也能被豆蔻酰化修饰(图 5. a, 1P, 2P), 提示这种修饰可能发生在新生肽链折叠之前^[2], 也可能是不受蛋白质构象的影响, 有待进一步的实验研究。另外, N 端豆蔻酰化修饰的和未修饰的重组 PKA-mC₈, 在 15% 的 SDS-PAGE 胶中电泳迁移率无明显差别(图 3a 中的 3 和 4), 而在 10% 的凝胶电泳中, 观察到前者的电泳迁移率要略小些(数据未给出), 说明 N 端的豆蔻酸长链对其电泳行为有轻微影响。

参 考 文 献

[1] Gary Walsh and Denis R H. Protein Biotechnology, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 1994.

- [2]段治军,陈长征,李伯良,生物化学与物物理学报,1996,28(2):115.
- [3]Sambrook J, Fritsh E F and Maniats T M. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- [4]Bradford M M. Anal Biochem., 1987,162:11.
- [5]Laemmli U K. Nature, 1970,227:680.
- [6]Rudnick D A, Mcwherter C A, Adams, SP. J Biol Chem, 1990,265:13370.
- [7]Shozo Shoji, Yukiho kubota. YAKUGAKU ZASSHI(Japan), 1989,109(2):71.
- [8]Carr S A, Biemann K, Shozo Shoji. Proc Natl Acad Sci USA, 1982,79:6128.
- [9]Zheng J. ACat Crystal B, 1992,48(Part 2):241.
- [10]Luban J, Bossolt K L, Franke E K. Cell, 1993,73:1067.
- [11]Ellis R J. Phil Trans R. Soc. Lond B, 1993,339:257
- [12]Laura J K, Gordon JI. J Biol Chem, 1993,268:4281
- [13]Wes Yonemoto, Mcglone M L and Taylor S S. J Biol Chem, 1993,268:2348

Coexpression System for Protein N-myristoylation in *Escherichia coli*

Duan Zhijun Chen Changzheng Yang Xinying

Li boliang Wang Debao

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031)

Abstract High-level expression of YSCNMT was achieved in *E. coli*. Then, two compatible expression plasmids pKNMT and pCZmC α 1 were constructed. The former includes the coding region of YSCNMT gene, the p15A origin of replication and a kanamycin-resistance gene, while the latter contains the coding region of PKA-mC α gene. Both of the plasmids were used to cotransform *E. coli* strain BL21(DE3)F' and a double transformant was then obtained. Analyzed by SDS-PAGE and Western Blot, it was observed that PKA-mC α was highly coexpressed with the dual plasmid system and its soluble form was sapparently increased when the coexpression was induced at 23°C; while the inducible expression of YSCNMT was controlled to a low level in oreder to form soluble functional product. The results of autoradiography after labeling with [³H]myristic acid *in vivo* suggested that the recombinant PKA-mC α was myristoylated within the dual plasmid system.

Key words Protein N-myristoylation, PKA-mC α , coexpression, dual plasmid system