

鼠脑驱动蛋白的表达、纯化和结晶

万群, 祝娉婷, 吕后宁, 陈欣虹

扬州大学医学院生化系, 江苏 扬州 225001

万群, 祝娉婷, 吕后宁, 等. 鼠脑驱动蛋白的表达、纯化和结晶. 生物工程学报, 2014, 30(3): 485-491.

Wan Q, Zhu PT, Lü HN, et al. Expression, purification and crystallization of rat brain kinesin. Chin J Biotech, 2014, 30(3): 485-491.

摘要: 驱动蛋白是一类利用水解 ATP 为 ADP 和磷酸的过程中释放的能量沿微管系统运动的蛋白。为了研究 ATP 中储存的化学能是如何转化为驱动蛋白的机械动能, 鼠脑驱动蛋白的相关 N-端区域在 BL21-Codon Plus(DE3)-RP 感受态大肠杆菌细胞中大量地表达。通过 SP-强阳离子交换色谱和分子筛色谱的两步骤纯化, 蛋白最终产量高达 10 mg/L 细胞培养液, 蛋白纯度可以达到 95%以上。纯化的蛋白具有水解 ATP 酶的活力, 并与驱动蛋白抗体有特异性的反应。驱动蛋白可以在如下条件结晶: 1.7 mol/L (NH₄)₂SO₄, 500 mmol/L NaCl, 20% glycerol。晶体衍射的分辨率可以达到 2.0 Å。

关键词: 驱动蛋白, ATP, 表达, 纯化, 晶体

Expression, purification and crystallization of rat brain kinesin

Qun Wan, Pingting Zhu, Houning Lü, and Xinhong Chen

Department of Biochemistry, College of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu, China

Abstract: Kinesin is a motor protein that uses the energy from ATP hydrolysis to move along the microtubule system. To investigate how the chemical energy stored in ATP is converted to mechanical movement, the corresponding N-terminal region of rat brain kinesin was expressed in BL21-Codon Plus (DE3)-RP competent cells. After SP-cation exchange chromatography and size exclusion chromatography, the protein yield reached 10 mg/L culture with the purity above 95%. The purified protein had ATPase activity and specifically reacted with the kinesin antibody in the Western blotting analysis.

Received: June 30, 2013; **Accepted:** September 4, 2013

Supported by: Innovation Fund of Yangzhou University (No. 2013CXJ083).

Corresponding author: Qun Wan. Tel: +86-514-87978804; E-mail: wqun@yzu.edu.cn

扬州大学科技创新培育基金 (No. 2013CXJ083) 资助。

网络出版时间: 2013-10-17

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20131017.1242.005.html>

The purified kinesin was crystallized under the following condition: 1.7 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 500 mmol/L NaCl, 20% glycerol. The kinesin crystal can diffract up to 2.0 Å resolution.

Keywords: kinesin, ATP, expression, purification, crystal

驱动蛋白 (Kinesin) 是一种在所有真核生物中都广泛存在的运动蛋白 (Motor protein)^[1-2]。驱动蛋白的主要功能包括: 细胞器 (Organelle) 和囊泡 (Vesicle) 的运输^[3-4]; 染色体/纺锤体的转移^[5-6]。因此, 它在细胞动力学和细胞有丝分裂与减数分裂等方面起着重要作用。驱动蛋白由几个单体在“颈”和“躯干”部位缠绕形成多聚体, 从而形成“头、颈、躯干和尾部”等区域^[7]。驱动蛋白的头结合在微管 (Microtubule) 系统上, 尾部结合在将要转移的细胞器或纺锤体上, 颈和躯干则将头尾分开。驱动蛋白利用 ATP 水解成 ADP 和磷酸过程中释放的能量沿着微管系统运动来完成上述功能。大部分种类的驱动蛋白具有运动的连续性: 蛋白可以在微管上以“双手交互”的方式连续运动几百步都不从微管上掉下来^[8-9]。这些驱动蛋白被称为常规驱动蛋白 (Conventional kinesin)。理解驱动蛋白如何将 ATP 中储藏的化学能转化成机械的动能是了解这种蛋白运动特性的重要课题。获得驱动蛋白在 ATP 水解的不同阶段的晶体结构可以在原子水平了解 ATP 水解机理和相应的蛋白结构变化。Kif1A 和 Eg5 是不像常规驱动蛋白那样具有高运动连续性的驱动蛋白^[10-11]。它们具有 ATP 酶活力的 N-端区域同 ATP 的结构类似物 AMPPNP 和 AMPPCP^[12] 的共结晶结构揭示了 ATP 的 γ -磷酸基团是如何同连接微管结合区域的开关区域 (Switch region) 互动的^[13-15]。但是, kif1A 和 Eg5 都不具有常规驱动蛋白那样的“双手交互”的运动方式, 而且运动的连

续性也不高。因此, 采用常规驱动蛋白来研究储藏在 ATP 中的能量是如何转化为动能这一重要课题仍然是很有必要的。本研究采用鼠脑驱动蛋白 (Rat brain kinesin) 这一具有代表性的常规驱动蛋白^[7-16], 将其中具有水解 ATP 功能和微管结合区域的 N-端区域在大肠杆菌中高效表达, 经离子交换树脂和分子筛两步纯化, 得到高纯度的单体。从而为下一步的结晶和化学能转化为动能的机理研究打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株

编码鼠脑驱动蛋白的 N-端 354 个氨基酸的基因被克隆到表达载体 pET-21(b) 上。这个质粒构建 (rK354) 来自美国佛蒙特大学的 Dr. Kathleen Trybus 实验室。它具有抗青霉素和氯霉素的抗药性标记。由于这个区域只包含很短的“颈部”序列, 它在溶液中以单体状态存在^[16]。大肠杆菌 BL21-Codon Plus (DE3) -RP 感受态细胞由本实验室保存。

1.1.2 试剂

DNase I 内切酶、Bradford 试剂、BSA 标准蛋白、4-(2-氨基乙基) 苯磺酰氟盐酸盐 (AEBSF)、甲苯磺酰赖氨酸氯甲酮 (TLCK)、苯甲基磺酰氟 (PMSF)、二硫苏糖醇 (DTT)、ATP、异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG)、羟乙基哌嗪乙硫磺酸缓冲液 (HEPES buffer)、对二氮己环-1,4-二(2-乙磺酸) 缓冲液 (PIPES buffer)、乙二醇-双-

(2-氨基乙醚)四乙酸 (EGTA) 购自美国 Sigma 公司。兔源驱动蛋白抗体 AKIN01 购自美国 Cytoskeleton 公司。蛋白胨 (Trypton) 和酵母提取物 (Yeast Extract) 购自美国 Invitrogen 公司。蛋白浓缩管 Centricon Plus-20 和 Centrion Ultra-15 购自美国 Amicon 公司。强阳离子交换柱由 80 mL SP-Sepharose (美国 Amersham Biosciences 公司产品) 树脂填充在 30 cm×3 cm 玻璃柱中。分子筛柱由 70 mL Sephacryl S-200HR (美国 Amersham Biosciences 公司产品) 树脂填充在 90 cm×1 cm 玻璃柱中。结晶试剂盒 Crystal ScreenTM、IndexTM、PEG-IonTM、PEGRx 购自美国 Hampton Research 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞的化学转化

将约 0.2 μg rK354 质粒加入到 100 μL 刚解融的 BL21-Codon Plus (DE3)-RP 感受态细胞中, 在冰上静置 20 min 后, 在 42 °C 水浴中热休克 40 s, 然后在冰上静置 5 min, 最后再加入 900 μL 无菌 LB 培养液 (1% (W/V) 蛋白胨、0.5% (W/V) 酵母提取物、1% (W/V) 氯化钠)。上述细胞混合物在 37 °C 摇床中培养 1 h 后, 5 000×g 离心, 去除 950 μL 上清液。剩下的 50 μL 培养液混匀后, 涂在含氯霉素的 LB 琼脂糖平板 (LB 培养液加上 1.5% (W/V) 琼脂糖) 上, 37 °C 过夜得到菌落。

1.2.2 蛋白表达

将琼脂糖平板上长出的单菌落接种到 5 mL 含 50 μg/mL 青霉素和 100 μg/mL 氯霉素的无菌 LB 培养液中, 并在 37 °C 培养过夜。每 10 mL 上述细菌过饱和培养液再被接种到 1 L 含抗生素的无菌 TB 培养液 (Terrific Broth :1.2% (W/V)

蛋白胨、2.4% (W/V) 酵母提取物、0.4% (V/V) 甘油、0.017 mol/L KH₂PO₄、0.072 mol/L K₂HPO₄) 中 37 °C 培养 3–4 h 直到 OD₆₀₀ 值为 0.6。上述 4 L 培养液降温到 22 °C 后, 加入 0.5 mmol/L IPTG, 过夜 (约 16 h) 诱导蛋白表达。大肠杆菌细胞在 6 000×g 离心后, 称重, 在 -80 °C 冰箱保存。

1.2.3 蛋白纯化

冰冻的细胞在室温下解冻后, 以 5 g/mL 的浓度溶解于裂解缓冲液中 (10 mmol/L HEPES, 10 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT, 10 mmol/L EGTA, 1 mmol/L PMSF, 0.5 mmol/L AEBSF, 0.5 mmol/L TLCK, 5 mmol/L MgCl₂, 40 μg/mL DNase I, pH 7.2)。细胞混合液在冰浴中被超声细胞破碎仪处理 40 min, 直到大部分细胞都被裂解。细胞裂解液 39 000×g 离心 1 h 后, 上清液加到被缓冲液 1 (10 mmol/L HEPES, 10 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT, 10 mmol/L EGTA, 1 mmol/L MgCl₂, 0.5 mmol/L ATP) 预平衡的 SP-强阳离子交换树脂中。用至少 5 倍柱体积 (400 mL) 的平衡液清洗树脂, 直到没有多余的蛋白从树脂中洗脱出来 (用 Bradford 试剂检测)。用 NaCl 缓冲溶液将结合在树脂上的目的蛋白梯度洗脱出来 (10–300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L HEPES, 10 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT, 10 mmol/L EGTA, 1 mmol/L MgCl₂, 0.5 mmol/L ATP), 并被分布收集器收集。得到的蛋白洗脱液进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检测, 收集纯化后的目的蛋白, 用 Centricon Plus-20 浓缩至 3 mL。分子筛柱用缓冲液 2 (20 mmol/L PIPES, 1 mmol/L EGTA, 50 mmol/L KCl, 1 mmol/L DTT, pH 7.5) 预平衡后, 将上述蛋白浓缩液加到分子筛柱上。蛋白在分子筛柱中以 0.08 mL/min 的速度缓慢洗脱分离, 并被分布收

集器收集。分离的蛋白用 SDS-PAGE 凝胶电泳检测后,最纯的部分被集中到一起,用 Centricon Ultra-15 浓缩到 30 mg/mL 以上的浓度(蛋白浓度用 BSA 标准曲线标定)。浓缩的蛋白用超速离心(372 000×g)去除可能的悬浮物后,在-80 °C 保存。

1.2.4 Western blotting 检验

具体过程参见文献[17]。

1.2.5 基础 ATPase 酶活 (Basal ATPase) 的测定

无微管激活时的驱动蛋白基础 ATPase 酶活 (Basal ATPase activity) 用钼酸铵/硫酸亚铁混合液来测定在反应中释放的磷酸离子来测定^[18]。具体过程如下:在 25 °C 将 2 mmol/L ATP 和 5 mmol/L MgCl₂ 加入到 400 μL 含 0.3 μg/μL 驱动蛋白的反应液中。每 10 min,从中取出 50 μL 反应液,混入 50 μL 灭活液(140 mmol/L EDTA, 20% SDS, pH 6.5)。200 μL 显色液(2% 钼酸铵, 0.5%硫酸亚铁)继而加入到上述混合液中,在 25 °C 放置 20 min 显色。最后,已显色的溶液测定 OD₇₀₀。用无机磷酸在钼酸铵/硫酸亚铁混合液中的 OD₇₀₀ 值作出光吸收标准曲线后,ATP 的水解速率 (*r*) 可以通过以下公式计算:

$$r = \frac{(OD / \text{min}) \times (\text{nmols} / OD)}{(\mu\text{gs} / 50\mu\text{L}) \times \beta}$$

$$\beta = \frac{60 \times 1000}{MW}$$

(其中, OD/min 是显色反应速率; nmols/OD 是无机磷酸在钼酸铵/硫酸亚铁试剂中的标准曲线斜率; MW 是蛋白的分子量; 对于 rK354, β 值为 1.68)。

1.2.6 结晶条件的筛选

用 Crystal ScreenTM、IndexTM、PEG-IonTM 等结晶试剂盒以悬滴法筛选 rk354 的结晶条件:

1 μL 浓度为 18 μg/μL 的蛋白溶液在载玻片上与 1 μL 池液混合,与 1 mL 池液平衡。

1.2.7 晶体的衍射数据搜集和处理

晶体衍射数据由 Rigaku RUH3R 发生器和 Mar345 成像板构成的 X-光衍射仪收集,并用 HKL2000^[19]软件处理。

2 结果

2.1 蛋白纯度与产率

SDS-PAGE 凝胶电泳分析结果显示,驱动蛋白的纯度达到 95%以上(图 1)。每升 TB 培养液可以得到 10 mg 以上的蛋白。在 22 °C 条件下,驱动蛋白可溶性地表达。在 37 °C,驱动蛋白大部分存在于包涵体(数据未显示)。因此,笔者采用 22 °C 常温表达。在用阳离子交换色谱纯化驱动蛋白时,笔者尝试过 pH 6.7、pH 6.9 和 pH 7.2 三种不同的 pH 条件,结果显示, pH 7.2 的条件可以更好地去除杂蛋白(数据未显示)。

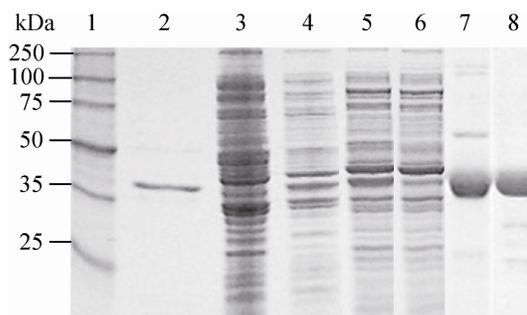


图 1 鼠脑驱动蛋白纯化的 SDS-PAGE 凝胶电泳结果
Fig. 1 SDS-PAGE gel of rK354 purification. 1: standard protein ladder; 2: standard rK354 from Dr. Trybus' lab; 3: cell lysate without IPTG induction; 4: cell lysate with 0.5 mmol/L IPTG induction; 5: the supernatant loaded to the SP-cation exchange resin; 6: the flow through from the SP-cation exchange resin; 7: the elution from the SP-cation exchange resin; 8: the elution from the size-exclusion chromatography.

2.2 Western blotting 检测

纯化的鼠脑驱动蛋白与兔源驱动蛋白抗体有一定的交叉抗性反应 (图 2), 证实了驱动蛋白的特异性。但是由于兔源驱动蛋白抗体的交叉抗性不强, 显色结果不太理想。

2.3 基础 ATPase 酶的活性

纯化的驱动蛋白具有 ATPase 的酶活 (图 3)。在无微管激活的情况下, 它的水解 ATP 速率是 0.015 s^{-1} 。

2.4 结晶条件的筛选

在用多个结晶试剂盒筛选结晶条件并加以改进后, rK354 可以在以下条件结晶 (图 4A): 1.7 mol/L 硫酸铵, 500 mmol/L 氯化钠, 20% 甘油 (V/V)。

2.5 晶体衍射数据的处理和分析

晶体的衍射分辨率为 2.0 \AA (图 4B)。在分析了晶体衍射数据的对称性 (Symmetry) 和系统缺

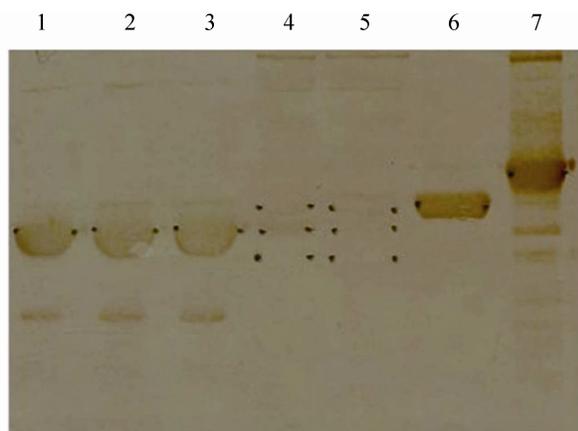


图 2 鼠脑驱动蛋白的 Western blotting 检测结果
Fig. 2 Western blotting analysis of the purified rK354. 1-3: purified rK354; 4: the cell lysate after IPTG induction; 5: the cell lysate without IPTG induction; 6: the rK379 standard protein (from Dr. Trybus' lab); 7: the rK406 standard protein (from Dr. Trybus' lab).

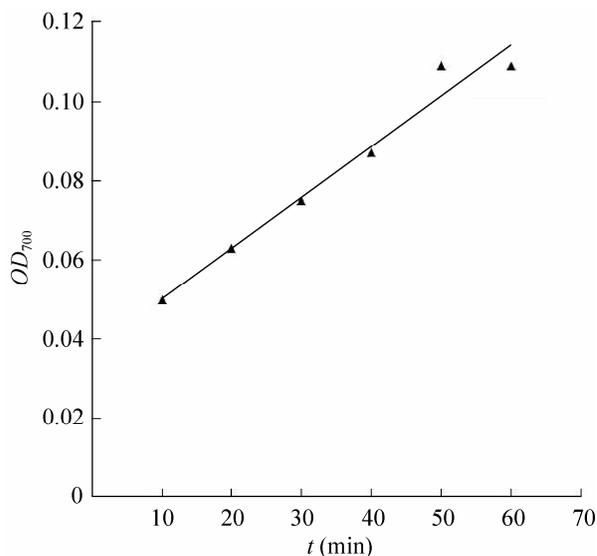


图 3 鼠脑驱动蛋白 rK354 的 ATPase 酶活
Fig. 3 ATPase activity of the purified rK354.

失 (Systematic absences) 后, 得到的 rK354 晶体的空间群是 $P2_12_12_1$, 晶胞参数是: $a=72.7 \text{ \AA}$, $b=74.2 \text{ \AA}$, $c=88.4 \text{ \AA}$, 分辨率为 2.0 \AA (表 1)。

3 讨论

常规驱动蛋白具有很高的运动连续性。研究常规驱动蛋白将 ATP 中储藏的化学能转化为动能是研究这一运动蛋白的重要课题。鼠脑驱动蛋白作为一种具有代表性的常规驱动蛋白, 在神经介质的传递方面起着重要的作用。笔者拟用蛋白晶体学的方法来研究鼠脑驱动蛋白在 ATP 水解过程中结构和功能的关系, 为此需要大量地纯化蛋白。大肠杆菌作为蛋白表达的首选表达系统, 具有操作简便、表达量高和价格低廉等多种优点。但是, 用大肠杆菌 BL21(DE3) 这一最常用的工程菌株来表达鼠脑驱动蛋白, 笔者没有得到相关表达。尝试使用 BL21 StarTM (DE3) 作为 RNaseE (一种重要的 mRNA 降解酶)

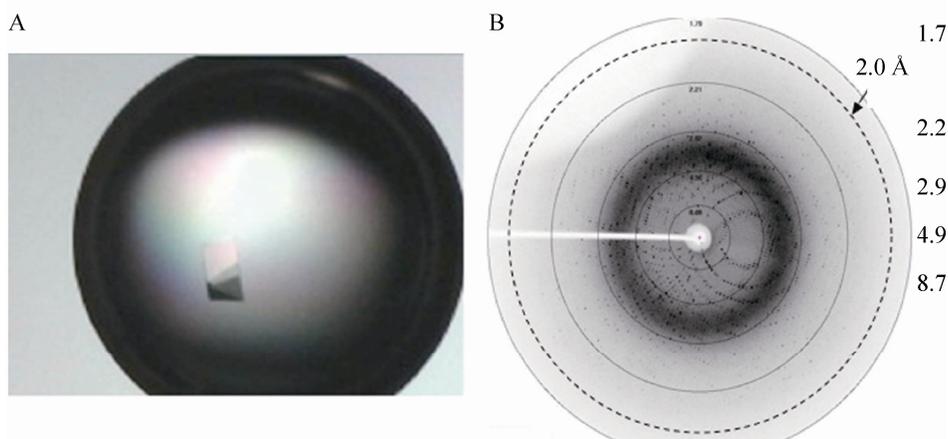


图 4 鼠脑驱动蛋白 rK354 晶体 (A) 和 X-光衍射图谱 (B)
Fig. 4 rK354 crystal (A) and its X-ray diffraction pattern (B).

表 1 晶体衍射数据

Table 1 Data collection statistics

Parameters	Results
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit cell dimensions	
a	72.7 Å
b	74.2 Å
c	88.4 Å
Resolution	20-2.0 Å
R _{sym} ^{a'}	5.9% (27.6%) ^{b'}
#Unique Reflections	31966
Data completeness	97.1% (93.5%)
Mean Redundancy	4.4
$\langle I \rangle / \langle \sigma \rangle$ ^{b'}	24.7 (4.0)

^{a'} $R_{sym} = \sum(|I_i - \langle I \rangle|) / \sum(I)$, where Σ is overall reflections measured more than once, and $\langle I \rangle$ is the mean intensity of all measured observations equivalent to reflection I_i .

^{b'} Numbers in parentheses represent values in the highest resolution shell.

缺陷型菌株可以得到 0.5 mg/L 培养液的产率,但是这个产率并不理想。BL21-Codon Plus (DE3)-RP 感受态细胞可以大量转录在大肠杆菌中稀有的

argU 和 proL 两个 tRNA, 而 Arg 和 Pro 在真核细胞表达的蛋白中普遍地存在^[20]。本文结果显示, 采用 Codon Plus 感受态菌株可以将驱动蛋白的产率提高 20 倍以上 (大于 10 mg/L 培养液), 从而为结晶学研究中蛋白质的来源提供了可靠的保障。

以往的文献采用 pH 6.9 条件下的阳离子交换色谱 (磷酸纤维素树脂)、阴离子交换色谱 (Mono Q 树脂) 和分子筛色谱 3 个连续步骤来纯化鼠脑驱动蛋白^[16]。因为大部分大肠杆菌自身表达的蛋白的等电点 (pI) 偏酸性^[21], 所以在不影响目的蛋白同离子交换树脂结合的情况下, 适当地提高色谱纯化时的 pH 可以有效地去除杂蛋白, 提高纯化效率。笔者将离子交换纯化时的 pH 提高到 7.2, 蛋白纯度可以达到 90%。这样, 加上后续的分筛分离, 两步纯化步骤就可以得到纯度达 95% 的驱动蛋白, 从而提高了纯化效率和产率。

文献中的鼠脑驱动蛋白晶体只有 ADP 牢牢地结合在活性中心^[16-22], 其他 ATP 的结构类似

物由于亲和力小,无法取代 ADP 而不能结合在活性中心。要研究 ATP 的水解机制,必须得到驱动蛋白同 ATP 结构类似物的复合物的晶体结构。因此,找到一个与 ADP 结合力不那么高的新的结晶条件就显得非常重要。通过筛选,我们发现硫酸铵可以取代以往文献里报道的硫酸锂作为结晶沉淀剂。在加入浓度为 500 mmol/L 的 NaCl 作为添加剂后,晶体的 X-光衍射分辨率可以从 2.2 Å 提高到 2.0 Å。用液氮来快速冷冻蛋白晶体的过程中,为了防止冰晶的形成,我们添加了 20% 的甘油为抗冻剂(Cryoprotectant)。晶体衍射结果显示,20% 甘油作为添加剂不会影响到晶体的分辨率。在新的结晶条件得到的晶体的活性中心没有 ADP,而只有一个硫酸根离子(详见后续研究结果)。这个新的结晶条件为 ATP 衍生物结合在活性中心提供了希望。

REFERENCES

- [1] Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, et al. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(10): 682–696.
- [2] Brady ST. A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor. *Nature*, 1985, 317(6032): 73–75.
- [3] Pernigo S. Structural basis for kinesin-1: cargo recognition. *Science*, 2013, 340(6130): 356–359.
- [4] Verhey KJ, Kaul N, Soppina V. Kinesin assembly and movement in cells. *Annu Rev Biophys*, 2011, 40: 267–288.
- [5] Rath O, Kozielski F. Kinesins and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(8): 527–539.
- [6] Kaan HY, Ulaganathan V, Rath O, et al. Structural basis for inhibition of Eg5 by dihydropyrimidines: stereoselectivity of antimitotic inhibitors enastron, dimethylenastron and fluorastrol. *J Med Chem*, 2010, 53(15): 5676–5683.
- [7] Greene L, Henikoff S. Kinesin Homepage[EB/OL]. [2013-04-20]. <http://www.proweb.org/kinesin/>.
- [8] Howard J. *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Sunderland, MA: Sinauer Assoc Inc, 2001: 367.
- [9] Vale RD, Milligan RA. The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science*, 2000, 288(5463): 88–95.
- [10] Okada Y, Hirokawa N. A processive single-headed motor: kinesin superfamily protein KIF1A. *Science*, 1999, 283(5405): 1152–1157.
- [11] Heald R. Motor function in the mitotic spindle. *Cell*, 2000, 102(4): 399–402.
- [12] Yount RG, Ojala R, Babcock D. Interaction of P--N--P and P--C--P analogs of adenosine triphosphate with heavy meromyosin, myosin, and actomyosin. *Biochemistry*, 1971, 10(13): 2490–2496.
- [13] Kikkawa M, Hirokawa N. High-resolution cryo-EM maps show the nucleotide binding pocket of KIF1A in open and closed conformations. *Embo J*, 2006, 25(18): 4187–4194.
- [14] Kikkawa M, Sablin EP, Okada Y, et al. Switch-based mechanism of kinesin motors. *Nature*, 2001, 411(6836): 439–445.
- [15] Parke CL, Wojcik EJ, Kim S, et al. ATP hydrolysis in Eg5 kinesin involves a catalytic two-water mechanism. *J Biol Chem*, 2010, 285(8): 5859–5867.
- [16] Sack S, Muller J, Marx A, et al. X-ray structure of motor and neck domains from rat brain kinesin. *Biochemistry*, 1997, 36(51): 16155–16165.
- [17] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning*. 3rd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [18] White HD. *Methods in Enzymology*. Colowick SP, Kaplan NO ed. New York: Academic Press, 1982: 698–708.
- [19] Otwinowski Z, Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol*, 1997, 276(part A): 307–326.
- [20] Cunningham BA. Most competent for the job. *The Scientist*, 2001, 15(4): 22–23.
- [21] Han MJ, Lee SY. The *Escherichia coli* proteome: past, present, and future prospects. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006, 70(2): 362–439.
- [22] Kozielski F, Sack S, Marx A, et al. The crystal structure of dimeric kinesin and implications for microtubule-dependent motility. *Cell*, 1997, 91(7): 985–994.

(本文责编 陈宏宇)