

重组人源 SNX7 蛋白在大肠杆菌中的表达、纯化及磷脂结合特异性分析

冯站^{1,2}, 许婷婷², 徐进新²

1 安徽大学生命科学学院, 安徽 合肥 230601

2 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广东 广州 510530

冯站, 许婷婷, 徐进新. 重组人源 SNX7 蛋白在大肠杆菌中的表达、纯化及磷脂结合特异性分析. 生物工程学报, 2014, 30(9): 1436-1445.

Feng Z, Xu TT, Xu JX. Expression, purification and phosphoinositide binding specificity of recombinant human SNX7 expressed in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2014, 30(9): 1436-1445.

摘要: Sorting nexins (SNXs) 是一类含有 SNX-PX 结构域, 并在细胞内吞和内体分选运输过程中发挥重要调节作用的蛋白。SNX7 是 SNXs 家族中的一员, 含有 PX 结构域和 BAR 结构域, 属于 SNX-PX-BAR 亚家族。斑马鱼实验表明, SNX7 是在肝脏中大量表达的抗凋亡蛋白, 并在胚胎肝脏的发育中发挥关键作用。为了从蛋白水平对 SNX7 进行研究, 首先将编码人源 ^{PX-BAR}SNX7 (SNX7 的一个片段, 包含 PX 和 BAR 结构域) 的 cDNA 片段插入到原核表达载体 p28a 中, 再将重组质粒转化到大肠杆菌 Rosseta 2 (DE3) 中诱导表达, 并用亲和层析、离子交换和分子筛层析对 ^{PX-BAR}SNX7 进行了纯化。Western blotting 结果表明, 亲和层析、离子交换和分子筛层析纯化后获得了高纯度的 ^{PX-BAR}SNX7 蛋白。动态光散射实验显示 ^{PX-BAR}SNX7 蛋白均一性良好。磷脂结合实验表明, ^{PX-BAR}SNX7 具有较为广泛的磷脂酰肌醇结合能力, 能够与 PtdIns(5)P、PtdIns(4,5)P₂ 和 PtdIns(3,4,5)P₃ 结合。

关键词: Sorting nexin 7(SNX7), 磷脂结合, 均一性, 表达纯化

Received: November 25, 2013; **Accepted:** February 11, 2014

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2012CB917200).

Corresponding author: Jinxin Xu. Tel: +86-20-32015240; E-mail: xu_jinxin@gibh.ac.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2012CB917200) 资助。

网络出版时间: 2014-03-10

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.130600.html>

Expression, purification and phosphoinositide binding specificity of recombinant human SNX7 expressed in *Escherichia coli*

Zhan Feng^{1,2}, Tingting Xu², and Jinxin Xu²

¹ School of Life Science, Anhui University, Hefei 230601, Anhui, China

² Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences (GIBH), Guangzhou 510530, Guangdong, China

Abstract: Sorting nexins (SNXs) are a large group of proteins that contain Phox (PX) domain and involve in regulating endocytosis and endosome sorting. SNX7, a member of SNXs family, contains a PX domain and a BAR domain. In zebrafish, SNX7 is a liver-enriched anti-apoptotic protein and indispensable for the liver development. A fragment of SNX7 cDNA (*px-bar snx7*), encoding the PX domain and the BAR domain, was inserted into the expressing vector p28a, transformed into *E. coli* Rosseta 2 (DE3), and then induced by isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside (IPTG). After affinity, ion exchange and gel filtration purification, the purity of *PX-BAR*SNX7 reached over 95%. Dynamic light scattering (DLS) experiment indicated that *PX-BAR*SNX7 was homogeneous in solution. Lipid overlay assay showed that *PX-BAR*SNX7 can bind to PtdIns(5)P, PtdIns(4,5)P₂ and PtdIns(3,4,5)P₃.

Keywords: Sorting nexin 7 (SNX7), lipid overlay assay, homogeneity, expression and purification

Sorting nexins (SNXs) 是一类含有 PX 结构域,并在细胞内吞和蛋白分选运输等细胞过程中发挥重要作用的蛋白^[1-5]。PX 结构域特异性地与磷脂酰肌醇结合,并介导 SNXs 靶向富含特异磷脂酰肌醇的细胞器。根据结构域组成,目前在哺乳动物中发现的 33 种 SNXs 可以分为 3 大类: SNX-PX, 这类 SNXs 只含有 PX 结构域和侧翼序列,包括 SNX3、SNX10、SNX11、SNX12、SNX22 和 SNX24; SNX-PX-BAR, 这类 SNXs 含有 PX 结构域和 BAR 结构域,包括 SNX1、SNX2、SNX4、SNX5、SNX6、SNX7、SNX8、SNX9、SNX18、SNX30、SNX32 和 SNX33; SNX-PX-other, 这类 SNXs 除了含有 PX 结构域外,还含有除了 BAR 结构域外的其他结构域^[3]。

在 SNXs 蛋白中, SNX-PX-BAR 的功能研究较多,它们被认为在内体的分选运输中发挥

着关键的调节作用。SNX1、SNX2、SNX5 和 SNX6 组成 retromer 的膜结合亚复合物,调节阳离子非依赖性的甘露糖-6-磷酸受体 (CI-MPR) 由内体向高尔基体的逆向运输^[6-11]。SNX4 参与调节转铁蛋白受体 (TfnR) 由内体向质膜的循环转运^[12]。SNX9、SNX18 和 SNX33 除了含有 PX 结构域和 BAR 结构域,还有 SH3 结构域,它们在网格蛋白介导的细胞内吞作用中发挥重要作用。SNX9 和 SNX18 的表达沉默会抑制转铁蛋白受体的吸收^[13-14],而 SNX33 的表达将抑制转铁蛋白受体的吸收^[15]。此外,SNX9 通过结合 WASP 还能调节 T 细胞信号传导和调节肌动蛋白依赖性的液相内吞^[16]。最近,舒晓东等以斑马鱼为模式动物,对 SNX7 的生物功能进行了初步的研究。他们发现 SNX7 是在肝脏中大量表达的抗凋亡蛋白,是斑马鱼胚胎发育早期

酵母细胞的生存所必需的^[17]。

SNX7 属于 SNX-PX-BAR 亚家族, 包含 N 端的 PX 结构域和 C 端的 BAR 结构域。为了从蛋白水平对 SNX7 进行研究, 并为 SNX7 的结构生物学研究建立基础, 我们对 SNX7 的一个片段 $PX-BAR^{SNX7}$ (包含 PX 结构域和 BAR 结构域) 进行了表达、纯化和磷脂酰肌醇结合特异性分析。我们成功地在大肠杆菌中表达了可溶的 $PX-BAR^{SNX7}$ 蛋白。我们用亲和层析、离子交换和分子筛层析对 $PX-BAR^{SNX7}$ 进行了纯化, 并获得了高纯度的蛋白。磷脂结合实验表明, $PX-BAR^{SNX7}$ 能结合多种磷脂酰肌醇: PtdIns(4)P、PtdIns(5)P、PtdIns(4,5)P₂ 以及 PtdIns(3,4,5)P₃。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌菌株 Rosseta 2 (DE3), 质粒 p28a 均由中国科学技术大学周丛照实验室赠送; 插入人源 *snx7* (isoform b, 序列号: EAW72996.1) cDNA 的 PCR3.1-*snx7* 质粒由中国科学院广州生物医药与健康研究院 (GIBH) 裴端卿实验室赠送。

镍亲和层析柱购于 Qiagen 公司。离子交换柱 (QFF)、分子筛层析柱 HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade、AKTA purifier 纯化系统均购于 GE healthcare 公司。蛋白电泳仪、Model 550 酶标仪购于 Bio-Rad 公司。动态光散射仪 The DynaPro TITAN 购自 Wyatt Technology 公司。普通 DNA 产物纯化试剂盒、质粒小提试剂盒、Bradford 蛋白质定量试剂盒购于 TIANGEN 公司。一抗 (His 鼠单抗) 购于 Qiagen 公司, 二抗 (羊抗鼠) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 均购于 TaKaRa 公司。异丙基硫代- β -D-半乳糖

苷 (IPTG) 购于 Amresco 公司。其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 人源重组 $PX-BAR^{SNX7}$ 片段表达载体的构建

用分子克隆的方法将编码人源 $PX-BAR^{SNX7}$ (氨基酸残基从 25–384) 的 cDNA 片段插入到 p28a 载体中。首先用 PCR 扩增出目的 DNA 片段, 目的 DNA 片段的理论大小为 1 101 bp, PCR 引物如下: 5'-CCGCATATGGATGAACCAGATTTAAAGGA-3', 5'-TGGCTCGAGTCATTCAGAGGCTTCTTCCAAGTGAA-3'。PCR 扩增反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 5 个循环; 98 °C 变性 10 s, 62 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 25 个循环; 72 °C 延伸 5 min。再将 p28a 载体和 PCR 产物用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 进行酶切。最后, 将双酶切后的 PCR 产物连接到 p28a 载体上, 把构建好的载体转化到大肠杆菌 Top10, 涂板后, 置于 37 °C 过夜培养。挑取单克隆进行菌落 PCR 鉴定, 菌落 PCR 使用载体上的通用引物 (5'-TAATACGACTCACTATAGG-3'; 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3')。菌落 PCR 产物的理论大小约为 1 301 bp。提取阳性质粒, 并进行 DNA 测序验证, 测序验证无误后, 用于下一步实验。

1.2.2 人源重组融合蛋白 $PX-BAR^{SNX7}$ 的表达

将构建成功的质粒 p28a-*px-bar snx7* 转化到大肠杆菌 Rosseta 2 (DE3), 涂板后于 37 °C 恒温箱内培养 14–16 h。挑取单克隆接种于含有氯霉素和氨苄的 LB 培养基中培养 12–14 h, 按照 1% 的体积转移到含有 500 mL LB 培养基的培养瓶中, 于 37 °C 培养。当 OD_{600} 值达到 0.6–0.8 时, 加入终浓度为 0.6 mmol/L 的异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG), 16 °C 诱导表达 20 h。离心收集

菌体，于-30℃保存。

1.2.3 人源重组融合蛋白^{PX-BAR}SNX7的纯化

将收集保存的菌体放于冰上解冻，用裂解缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 300 mmol/L NaCl, 5%甘油, 7 mmol/L β-巯基乙醇, 10 mmol/L 咪唑, 1 mmol/L PMSF)重悬菌体。用低温高压破碎的方法充分破碎菌体, 12 000 r/min 离心 30 min, 分别取沉淀和上清液进行 SDS-PAGE 电泳检测。上清液经过超滤后用镍亲和层析柱进行亲和纯化。镍亲和层析柱用 10 个柱体积的结合缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 300 mmol/L NaCl, 5%甘油, 7 mmol/L β-巯基乙醇, 10 mmol/L 咪唑, 1 mmol/L PMSF)平衡后上样。然后用洗涤蛋白缓冲液(咪唑浓度分别为 20 mmol/L 和 40 mmol/L)充分洗涤除去镍柱中非特异性结合在柱子上的杂蛋白, 分别收集洗涤蛋白液。最后用 5 个柱体积的蛋白洗脱缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 300 mmol/L NaCl, 5%甘油, 7 mmol/L β-巯基乙醇, 250 mmol/L 咪唑, 1 mmol/L PMSF)特异性洗脱目的蛋白, 收集洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳检测。镍亲和层析纯化收集的洗脱蛋白液超滤后再用离子交换柱(QFF)继续纯化, 首先用离子交换缓冲液 A(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0, 7 mmol/L β-巯基乙醇)平衡柱子, 上样后用含有高浓度 NaCl 的缓冲液 B(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0, 1 mol/L NaCl, 7 mmol/L β-巯基乙醇)进行梯度洗脱, 收集蛋白, 并进行 SDS-PAGE 电泳检测。最后将蛋白收集液超滤浓缩后, 用分子筛(Superdex 200 16/60)纯化, 分子筛缓冲液成分是 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5 (4℃), 300 mmol/L NaCl, 5%甘油, 5 mmol/L DTT, 收集出峰位置的样品进

行 SDS-PAGE 电泳检测。把样品混合浓缩后用 Bradford 法测定其蛋白浓度。

1.2.4 人源重组融合蛋白^{PX-BAR}SNX7的 Western blotting 分析

分子筛纯化的蛋白进行 SDS-PAGE 后, 用电转仪将所测蛋白从凝胶转移至 PVDF 膜上, 转膜结束后用脱脂奶粉封闭过夜, 与鼠抗组氨酸标签的单抗室温孵育 1 h, 再与羊抗鼠二抗室温孵育 1 h, ECL 显色, 最后压片曝光。

1.2.5 人源重组融合蛋白^{PX-BAR}SNX7的动态光散射实验

动态光散射仪能通过测量样品散射光强度起伏的变化得出样品中颗粒大小的信息。根据散射光强度的变化, 测得溶液中分子的扩散系数 D , 经公式: $D=KT/6\pi\eta R$ 可求出分子的流体力学半径 R (式中 K 为玻尔兹曼常数, T 为绝对温度, η 为溶液的粘滞系数)。结合光强(Mass)、多分散性(Polydispersity, Pd)和 R 指标可以分析蛋白溶液中颗粒大小的均一性。

1.2.6 人源重组融合蛋白^{PX-BAR}SNX7的磷脂结合检测

磷脂结合实验采用 Protein-Lipid Overlay Assay 方法, 实验参照文献中的步骤进行^[18]。从 Echelon Biosciences 公司购得醋酸纤维膜(PIP Strips, 货号: P-6001)上有多种磷脂斑点。该膜用含有 3%牛血清蛋白的 PBS-T 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.1% (V/V) Tween-20)在室温下孵育 1 h, 然后放入含有 1 μg/mL 的人源重组融合蛋白^{PX-BAR}SNX7 在缓冲液中孵育 1 h。用 PBS-T 缓冲液洗涤 6 次, 每次 5 min。为了检测被结合在膜上的蛋白, 将膜在含有抗组氨酸标签抗体的溶液中孵育 1 h, 洗涤 6 次, 每次 5 min。再置于羊抗鼠二抗的缓冲

液中, 室温孵育 1 h, 充分结合后, 再次洗涤, 最后在胶片上曝光, 观察结果。

2 结果

2.1 p28a-*px-bar**snx7* 片段表达载体的构建

本实验采用的 p28a 载体是在 pET28a 的基础上进行了改造的载体, 去除了 His 标签和 *Nde* I 酶切位点之间的序列。PCR 反应获得的 *px-bar**snx7* 片段经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切, 然后插入到经同样酶切处理的 p28a 载体中。利用载体上的通用引物进行菌落 PCR 筛选重组载体, 菌落 PCR 产物的理论大小约为 1 301 bp (图 1)。将阳性质粒进行测序验证。

2.2 人源重组融合蛋白 *PX-BAR*SNX7 的表达

将质粒 p28a-*px-bar**snx7* 成功转化到大肠杆菌 Rosseta 2 (DE3), 经 37 °C 培养的菌液的 OD_{600} 达到 0.6–0.8 时, 加入终浓度为 0.6 mmol/L 的异

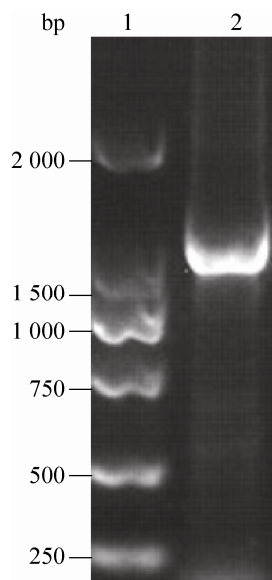


图 1 重组质粒 p28a-*px-bar**snx7* 的菌落 PCR 鉴定图谱
Fig. 1 Identification of recombinant plasmid p28a-*px-bar**snx7*. 1: DNA molecular weight standard (DL 2000); 2: PCR product.

丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG), 在 16 °C 诱导目的蛋白表达, 收集菌体, 并进行 SDS-PAGE 电泳检测。SDS-PAGE 结果显示, 与诱导前相比, IPTG 诱导之后在 44 kDa 附近有一条明显的蛋白条带, 与重组融合蛋白 His-*PX-BAR*SNX7 的分子量 (43.9 kDa) 基本相当(图 2)。菌体经高压破碎后离心, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析。结果表明, 部分 *PX-BAR*SNX7 以可溶的形式表达于上清中(图 2)。

2.3 人源重组融合蛋白 *PX-BAR*SNX7 的纯化及 Western blotting 检测结果

人源重组融合蛋白 *PX-BAR*SNX7 是氨基端带有组氨酸标签的融合蛋白, 我们首先用镍亲和柱纯化 *PX-BAR*SNX7。上样后 *PX-BAR*SNX7 与镍充分结合, 再依次用含有 40 mmol/L 咪唑和 250 mmol/L

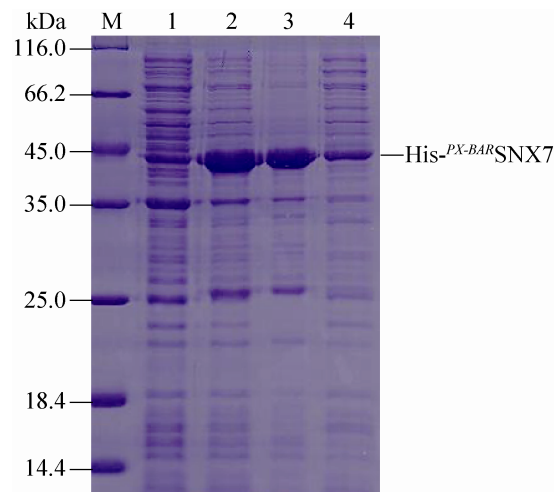


图 2 融合 *PX-BAR*SNX7 蛋白在大肠杆菌 Rosseta 2 (DE3) 中诱导表达的 SDS-PAGE 检测结果

Fig. 2 SDS-PAGE result of the expression of the recombinant human *PX-BAR*SNX7 in *E. coli* Rosseta2 (DE 3) at 16 °C. M: protein molecular weight standard; 1: total protein before IPTG induction; 2: total protein after IPTG induction; 3: pellet fraction; 4: soluble fraction.

咪唑的缓冲液洗脱杂蛋白和目的蛋白。收集洗脱的蛋白, 并进行 SDS-PAGE 检测。SDS-PAGE 电泳检测显示, 大部分的目的蛋白都被含有 250 mmol/L 咪唑的缓冲液洗脱 (图 3)。

再将经镍亲和柱纯化后的蛋白用离子交换柱 (QFF) 进行进一步纯化, 如图 4A 所示, 在离子交换纯化过程中出现了 3 个蛋白洗脱峰 (P1、P2 和 P3)。SDS-PAGE 电泳结果显示大部分目的蛋白出现在峰 P2 中 (图 4B)。

将离子交换纯化后的蛋白再用分子筛层析纯化, 结果如图 5A 所示, 在 77.26 mL 位置处出现蛋白洗脱峰, 峰形较好, 收集峰处蛋白样品, 并进行 SDS-PAGE 电泳检测。SDS-PAGE 电泳结果显示, $PX\text{-}BAR$ SNX7 蛋白的纯度达到 95% 以上 (图 5B)。最后, 将纯化后的蛋白进行 Western blotting 检测 (图 6)。

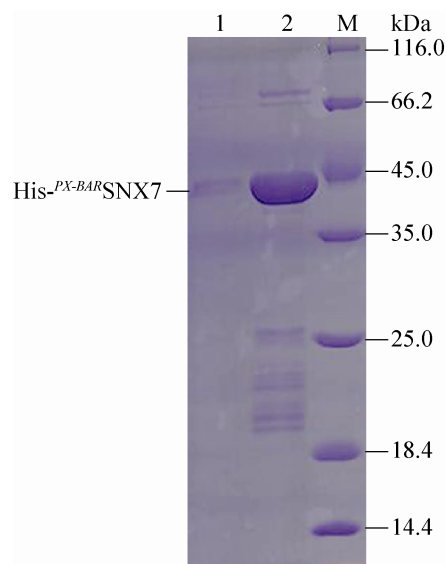


图 3 融合蛋白 $PX\text{-}BAR$ SNX7 镍柱纯化 SDS-PAGE 检测
Fig. 3 SDS-PAGE result of the purified recombinant human $PX\text{-}BAR$ SNX7 by Ni column. M: protein molecular weight standard; 1: elution fraction by 40 mmol/L imidazole; 2: elution fraction by 250 mmol/L imidazole.

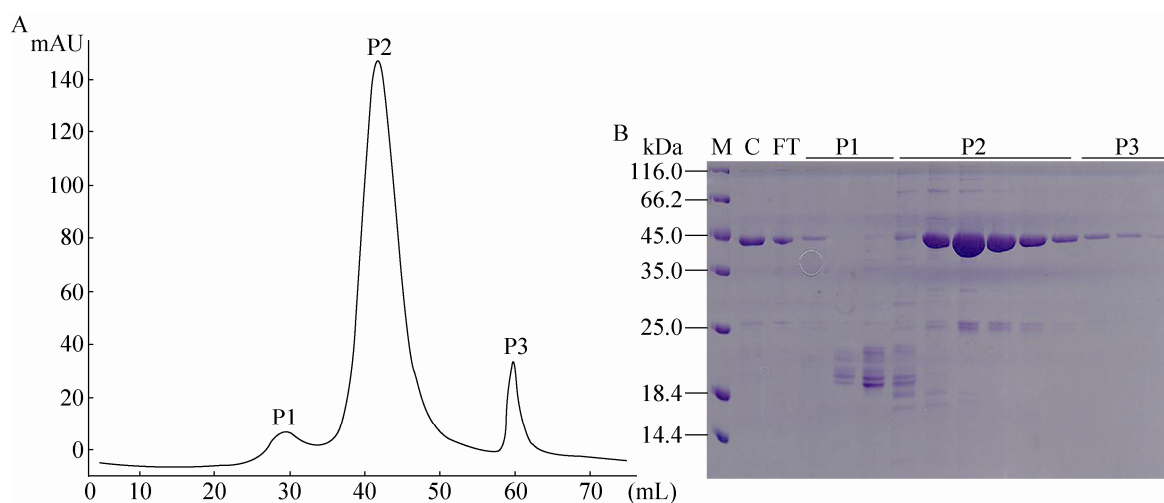


图 4 融合蛋白 $PX\text{-}BAR$ SNX7 离子交换纯化的 (QFF) AKTA 色谱图 (A) 及 SDS-PAGE 检测图 (B)
Fig. 4 (A) The ion exchange chromatography of the purified recombinant human $PX\text{-}BAR$ SNX7. (B) SDS-PAGE result of the purified recombinant human $PX\text{-}BAR$ SNX7 by ion exchange. M: protein molecular weight standard; C: $PX\text{-}BAR$ SNX7 before loading on the ion exchange column; FT: flow through; P1: the first peak; P2: the second peak; P3: the third peak.

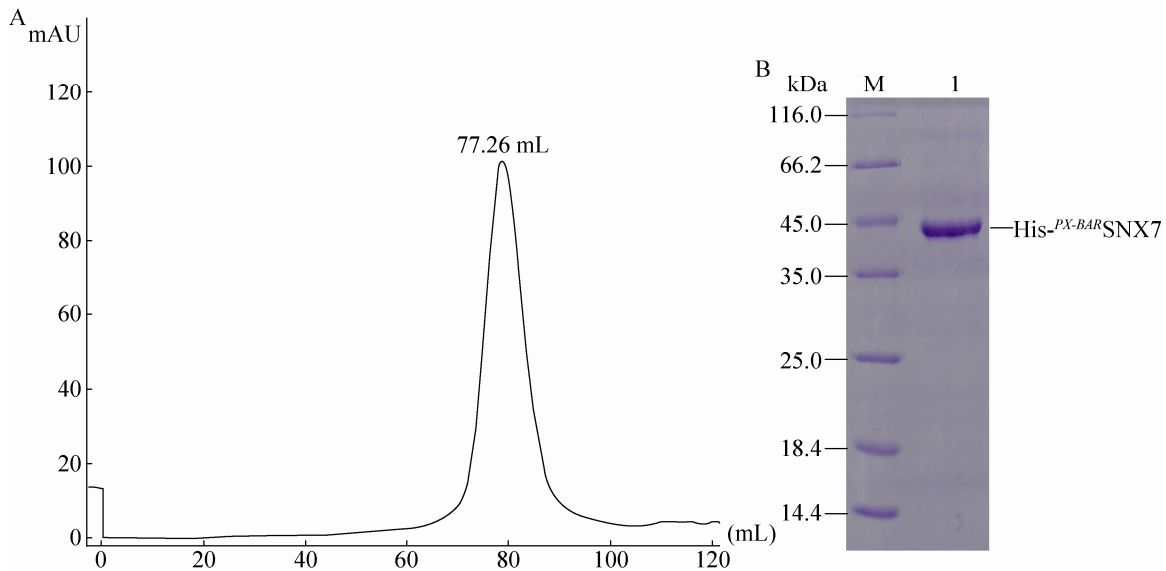


图 5 融合蛋白 $PX-BAR$ SNX7 分子筛纯化的 AKTA 色谱图 (A) 及 SDS-PAGE 检测图 (B)

Fig. 5 (A) The gel filtration chromatogram of the purified recombinant human $PX-BAR$ SNX7. (B) SDS-PAGE result of the purified recombinant human $PX-BAR$ SNX7 by gel filtration. M: protein molecular weight standard; 1: purified recombinant human $PX-BAR$ SNX7.

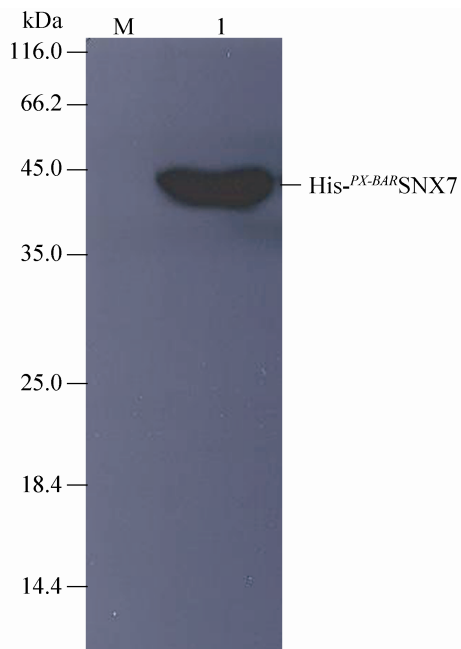


图 6 融合蛋白 $PX-BAR$ SNX7 的 Western blotting 检测

Fig. 6 Western blotting of recombinant human $PX-BAR$ SNX7. M: protein molecular weight standard; 1: purified recombinant human $PX-BAR$ SNX7.

2.4 人源重组融合蛋白 $PX-BAR$ SNX7 的均一性检测

为了检测 $PX-BAR$ SNX7 在溶液中的状态, 将分子筛纯化的蛋白用动态光散射分析。动态光散射结果显示: 蛋白溶液中 100% Mass 的散射光均来自 R 为 5.7 nm 的颗粒物质。Pd<15%, 说明颗粒物质存在形式单一, 具有良好的均一性 (图 7)。这些指标都说明, 经过纯化, 人源重组融合蛋白 $PX-BAR$ SNX7 可以达到良好的均一性。

2.5 人源重组融合蛋白 $PX-BAR$ SNX7 与磷脂结合特异性分析

PX 结构域具有特异性地与磷脂酰肌醇结合的能力。为了检测 $PX-BAR$ SNX7 是否也具有磷脂酰肌醇结合的能力以及磷脂结合的特异性, 我们将 $PX-BAR$ SNX7 进行了磷脂结合实验。如图 8 所示, 融合蛋白 $PX-BAR$ SNX7 能结合 PtdIns(4)P、PtdIns(5)P、PtdIns(4,5)P₂、PI(3,4,5)P₃。其中,

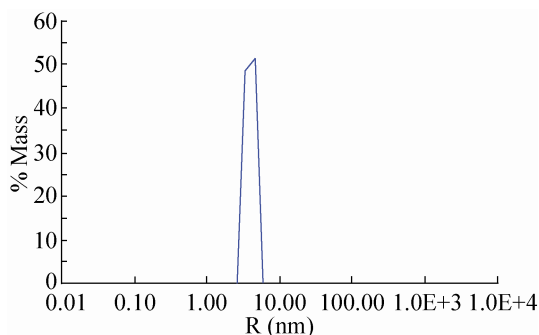


图 7 融合蛋白 $PX\text{-}BAR$ SNX7 动态光散射结果 (R: 流体动力学半径; %Mass: 质量分数)

Fig. 7 Dynamic light scattering (DLS) sized distribution result of the purified recombinant human $PX\text{-}BAR$ SNX7. R: hydrodynamic radius; % Mass: mass fraction.

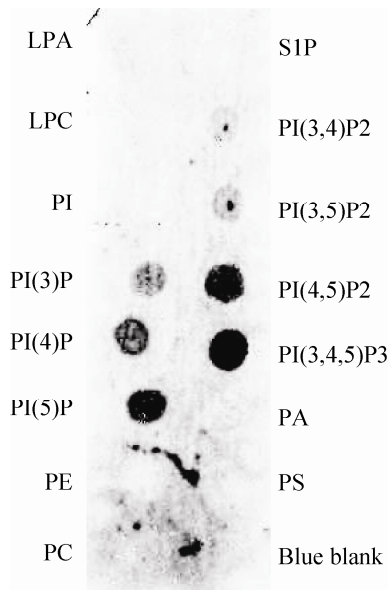


图 8 融合蛋白 $PX\text{-}BAR$ SNX7 的膜脂结合检测

Fig. 8 Protein-Lipid Overlay Assay of recombinant human $PX\text{-}BAR$ SNX7.

与 PtdIns(5)P、PtdIns(4,5)P₂、PtdIns(3,4,5)P₃ 相互作用较强, 而和 PtdIns(4)P 的作用相对较弱。这表明 $PX\text{-}BAR$ SNX7 具有较为广泛的磷脂结合能力, 能结合多种磷脂酰肌醇。

3 讨论

SNX-PX-BAR 是在细胞内吞和蛋白分选运输中发挥重要作用的蛋白, 具有两个可以与膜结合的结构域: PX 结构域和 BAR 结构域。PX 结构域特异性地与磷脂酰肌醇结合^[19]。BAR 结构域可以感应膜的曲率或诱导膜的弯曲, 在膜的重塑中发挥重要作用^[2,20-21]。

不同 SNX-PX-BAR 蛋白与磷脂酰肌醇的结合能力不同。SNX1 可以结合 PtdIns(3)P 和 PtdIns(3,5)P₂^[22]; SNX2 结合 PtdIns(3)P^[23]; SNX9 可以结合 PtdIns(3)P、PtdIns(3,4)P₂、PtdIns(4,5)P₂ 和 PtdIns(3,4,5)P₃^[24]; SNX18 可以结合 PtdIns(3,4)P₂ 和 PtdIns(4,5)P₂^[25]。我们首次对 SNX7 的磷脂酰肌醇结合能力进行了研究。Protein-Lipid Overlay Assay 实验表明, 与 SNX9 类似, SNX7 也具有较为广泛的磷脂酰肌醇结合能力, 能结合多种磷脂酰肌醇。其中, SNX7 与 PtdIns(5)P、PtdIns(4,5)P₂ 和 PtdIns(3,4,5)P₃ 的结合能力相对较强, 与 PtdIns(4)P 的结合能力较弱。

目前, SNX7 的研究才刚刚起步。揭示 SNX7 的功能及其机制, 还需要更多的细胞生物学和结构生物学的研究。SNX7 的 PX 结构域的晶体结构虽然已被解析, 但尚缺乏 $PX\text{-}BAR$ SNX7 (包括 PX 结构域和 BAR 结构域的 SNX7 片段) 或 SNX7 全长的结构。

本研究在大肠杆菌中成功表达了 $PX\text{-}BAR$ SNX7 蛋白。通过镍柱亲和层析、离子交换和分子筛纯化, 获得纯度大于 95% 的 $PX\text{-}BAR$ SNX7 蛋白。动态光散射实验表明, 纯化后的 $PX\text{-}BAR$ SNX7 蛋白在溶液中的状态是较为均一的。这些研究为 $PX\text{-}BAR$ SNX7 蛋白的结构研究奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Carlton J, Bujny M, Rutherford A, et al. Sorting nexins--unifying trends and new perspectives. *Traffic*, 2005, 6(2): 75–82.
- [2] Cullen PJ. Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(7): 574–582.
- [3] Seet LF, W Hong. The Phox (PX) domain proteins and membrane traffic. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1761(8): 878–896.
- [4] Teasdale RD, BM Collins. Insights into the PX (phox-homology) domain and SNX (sorting nexin) protein families: structures, functions and roles in disease. *Biochem J*, 2012, 441(1): 39–59.
- [5] Worby CA, Dixon JE. Sorting out the cellular functions of sorting nexins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(12): 919–931.
- [6] Cullen PJ, HC Korswagen. Sorting nexins provide diversity for retromer-dependent trafficking events. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(1): 29–37.
- [7] Hong Z, Yang Y, Zhang C, et al. The retromer component SNX6 interacts with dynactin p150(Glued) and mediates endosome-to-TGN transport. *Cell Res*, 2009, 19(12): 1334–1349.
- [8] Wassmer T, Attar N, Bujny MV, et al. A loss-of-function screen reveals SNX5 and SNX6 as potential components of the mammalian retromer. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 1): 45–54.
- [9] Rojas R, Kametaka S, Haft CR, et al. Interchangeable but essential functions of SNX1 and SNX2 in the association of retromer with endosomes and the trafficking of mannose 6-phosphate receptors. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(3): 1112–1124.
- [10] Carlton J, Bujny M, Peter BJ, et al. Sorting nexin-1 mediates tubular endosome-to-TGN transport through coincidence sensing of high-curvature membranes and 3-phosphoinositides. *Curr Biol*, 2004, 14(20): 1791–1800.
- [11] McGough IJ, Cullen PJ. Recent advances in retromer biology. *Traffic*, 2011, 12(8): 963–971.
- [12] Traer CJ, Rutherford AC, Palmer KJ, et al. SNX4 coordinates endosomal sorting of TfnR with dynein-mediated transport into the endocytic recycling compartment. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(12): 1370–1380.
- [13] Park J, Kim Y, Lee S, et al. SNX18 shares a redundant role with SNX9 and modulates endocytic trafficking at the plasma membrane. *J Cell Sci*, 2010, 123(Pt 10): 1742–1750.
- [14] Soulet F, Yazar D, Leonard M, et al. SNX9 regulates dynamin assembly and is required for efficient clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(4): 2058–2067.
- [15] Heiseke A, Schöbel S, Lichtenthaler SF, et al. The novel sorting nexin SNX33 interferes with cellular PrP formation by modulation of PrP shedding. *Traffic*, 2008, 9(7): 1116–1129.
- [16] Badour K, McGavin MKH, Zhang J, et al. Interaction of the Wiskott-Aldrich syndrome protein with sorting nexin 9 is required for CD28 endocytosis and cosignaling in T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(5): 1593–1598.
- [17] Xu L, Yin W, Xia J, et al. An anti-apoptotic role of SNX7 is required for liver development in zebrafish. *Hepatology*, 2012, 55(6): 1985–1993.
- [18] Dowler S, Deak M, Kular G, et al. Identification of pleckstrin-homology-domain-containing proteins with novel phosphoinositide-binding specificities. *Biochem J*, 2000, 351(Pt 1): 19–31.
- [19] Ago T, Takeya R, Hiroaki H, et al. The PX domain as a novel phosphoinositide-binding module. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 287(3): 733–738.
- [20] Peter BJ, Kent HM, Mills IG, et al. BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science*, 2004, 303(5657): 495–499.
- [21] van Weering JRT, Sessions RB, Traer CJ, et al.

Molecular basis for SNX-BAR-mediated assembly of distinct endosomal sorting tubules. The EMBO J, 2012, 31(23): 4466–4480.

[22] Cozier GE, Carlton J, McGregor AH, et al. The phox homology (PX) domain-dependent, 3-phosphoinositide-mediated association of sorting nexin-1 with an early sorting endosomal compartment is required for its ability to regulate epidermal growth factor receptor degradation. J Biol Chem, 2002, 277(50): 48730–48736.

[23] Zhong Q, Lazar CS, Tronchère H, et al.

Endosomal localization and function of sorting nexin 1. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(10): 6767–6772.

[24] Yasar D, Surka MC, Leonard MC, et al. SNX9 activities are regulated by multiple phosphoinositides through both PX and BAR domains. Traffic, 2008, 9(1): 133–146.

[25] Häberg K, Lundmark R, Carlsson SR. Carlsson, SNX18 is an SNX9 paralog that acts as a membrane tubulator in AP-1-positive endosomal trafficking. J Cell Sci, 2008, 121(Pt 9): 1495–1505.

(本文责编 郝丽芳)



《生物工程学报》2014 年出版专刊获《科技导报》期刊亮点推荐

《生物工程学报》2014 年分别于第 5 期和第 7 期出版了“生物质炼制”专刊和“蛋白质组学”专刊，集中介绍了国内外在相应领域内获得的最新研究进展和科研成果。专刊发表后受到了研究者的关注，被《科技导报》列为“科技期刊亮点”，刊载在 2014 年 19 期和 21 期上，相关信息请见《科技导报》网站（<http://www.kjdb.org/cn/dqml.asp>）。

科技导报 2014, 32(19) www.kjdb.org

·国内期刊亮点·

生物质炼制专刊出版



生物质是自然界最丰富的含碳有机大分子功能体，它有望通过“生物炼制”实现“无废炼制”的理想。理想的生物质炼制应以最大限度分离木质纤维原料中各个组分，以尽可能保持分子的完整性，最大限度地利用和最终实现资源最大化。这要求生物炼制应当是源于原料结构、过程转化和产品特点三者的关键，面向原料、面向过程、面向产品的炼制过程。

《生物工程学报》于 2014 年 5 月出版了“生物质炼制专刊”，邀请中国科学院过程工程研究所陈曦研究员特约编辑，集中报道了在生物质炼制技术领域国际学者在原料精制、精制技术、组分转化等领域取得的最新研究进展。

《生物工程学报》[2014-05-28]

合成二硫杂(3,3)对环季金属钎基配合物

华中师范大学化学学院魏静等设计合成了 3 个含不取代基的二硫杂(3,3)对环季金属钎基配合物 6b-6d 及一个对照化合物 6a。4 个化合物通过 $^1\text{H NMR}$ 、 $^{13}\text{C NMR}$ 、 $^{31}\text{P NMR}$ 和元素分析进行了表征。配合物 6b 的晶体结构通过单晶衍射证实，晶体结构显示环季上下季环间存在明显的 $\pi-\pi$ 作用。同时还用电化学、红外光谱以及密度泛函理论计算，探究了二硫杂(3,3)对环季配体及其上取代基对金属钎中心电子性质的影响。

电化学实验结果显示，二硫杂(3,3)对环季上取代基(F, CN)可以通过分子中的 $\pi-\pi$ 作用影响钎中心的氧化还原活性，其中氟基的影响最大。密度泛函理论计算结果显示取代基(F, CN)对配合物的最低未占分子轨道(LUMO)电子态密度分布影响较大，氟基取代的 6b 和 6d 取代的 6d，其 LUMO 轨道上的电子几乎完全在钎配体的环季上，而 6a 和 6c，其 LUMO 轨道上的电子几乎完全在金属钎及其配体上。



《科技导报》[2014-05-28]

科技导报 2014, 32(21) www.kjdb.org

·国内期刊亮点·

预烧影响低压烧结 WC-Co 硬质合金组织和性能

WC-Co 硬质合金具有良好力学性能，其中 WC 的晶粒尺寸决定了其性能的发展。北京工业大学材料科学与工程学院新型功能材料教育部重点实验室魏晓华研究员通过预烧处理制备 WC-10%Co 对 WC-10%Co 复合粉末在低于共晶点的温度下进行预烧处理，采用 XRD、SEM 和力学性能测试手段考察预烧对随后的低压二次烧结合金组织和性能的影响。

结果表明，不同温度预烧处理二次烧结后，可以有效抑制晶粒异常长大现象，二次烧结后合金具有高的屈服强度，最高值达到 $16.1 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$ ；在 1350°C 和 1380°C 温度下预烧烧结体经低压二次烧结后均具有均匀的合金组织，其中经过 1380°C 预烧烧结体测得屈服强度为 3260 MPa 。这一结果对发展硬质合金组织和性能控制技术具有一定的参考价值。

《北京工业大学学报》[2014-06-10]

蛋白质组学专刊出版

蛋白质组学研究是后基因组时代最重要的功能基因组学研究之一，与医学、生物学、化学、物理学、信息学以及现代技术等关系十分密切。自从人类基因组计划完成以来，功能基因组学研究上了历史舞台。作为功能基因组学研究最重要的“组学”研究——蛋白质组学不断的深度和广度推进，涵盖面广，发展迅速，取得了一系列重要进展。

为了展示和交流国内外在蛋白质组学研究的进展与应用情况，探讨其存在的问题和解决之道，以促进本研究领域的发展，《生物工程学报》于 2014 年 7 月出版了“蛋白质组学专刊”。邀请中国科学院北京协和医学院基础医学研究所方耀楠和高文翰为特邀编辑。内容涉及不同物种蛋白质组学研究、蛋白质组学重要方法学与技术研究和蛋白质组学功能与疾病研究的最新研究进展。



《生物工程学报》[2014-07-25]