

用于核磁共振研究的淀粉样前体蛋白跨膜区域的表达、纯化和胶束重构

孙晓宇¹, 赵雪琛², 陈文^{1*}

1 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东 广州 510641

2 杭州悦泰健康科技有限公司, 浙江 杭州 310059

孙晓宇, 赵雪琛, 陈文. 用于核磁共振研究的淀粉样前体蛋白跨膜区域的表达、纯化和胶束重构[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1633-1643.

SUN Xiaoyu, ZHAO Xuechen, CHEN Wen. Expression, purification and micelle reconstruction of the transmembrane domain of the human amyloid precursor protein for NMR studies[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1633-1643.

摘要: 淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)被多次酶切后生成 β -淀粉样蛋白(amyloid- β peptide, A β), 其聚合物的毒性作用会引发阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)。其中, APP 蛋白的跨膜区域(transmembrane domain of amyloid precursor protein, APPTM)与 γ -分泌酶的非特异性切割作用是生成 A β 的关键步骤, 在生理条件下重构 APPTM 对于探究其与 γ -分泌酶的相互作用以及 AD 药物研发具有重要作用。然而, 现有的重组 APPTM 制备方法存在制备效率和产量低等缺点, 限制了 APPTM 的稳定大规模制备。本研究以大肠杆菌(*Escherichia coli*)为宿主, 使用 pMM-LR6 载体对 APPTM 进行融合表达。包涵体蛋白经盐酸胍提取后, 依次使用 Ni-NTA 亲和层析、溴化氰切割融合标签和反相高效液相色谱(reverse phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC), 得到了高纯度和高产量的同位素标记的 APPTM。进一步将 APPTM 重构到十二烷基磷酸胆碱(dodecylphosphocholine, DPC)胶束环境中, 采集得到了均一、高质量的 ¹⁵N-¹H 异核单量子关系(heteronuclear singular quantum correlation, HSQC)二维谱。本研究成功建立了一种高效且可靠的用于表达、纯化和体外重构 APPTM 的方法, 为后续在更天然的模拟膜环境, 如脂碟(bicelle)和纳米碟(nanodisc)中探究 APPTM 及其复合物的结构和功能奠定了良好的基础。

关键词: 阿尔茨海默病; 淀粉样前体蛋白; 跨膜区域; 膜蛋白; 液相核磁共振技术; 表面活性剂胶束

资助项目: 国家“海外高层次人才”青年项目(A4220040); 杭州悦泰健康科技有限公司横向课题(D8221600)

This work was supported by the Recruitment Program of Global Experts (A4220040) and the Regenerative Bio Inc. Transverse Research Project (D8221600).

*Corresponding author. E-mail: wenchen@scut.edu.cn

Received: 2022-09-29; Accepted: 2022-12-08; Published online: 2023-01-04

Expression, purification and micelle reconstruction of the transmembrane domain of the human amyloid precursor protein for NMR studies

SUN Xiaoyu¹, ZHAO Xuechen², CHEN Wen^{1*}

1 School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, Guangdong, China

2 Regenerative Bio Inc., Hangzhou 310059, Zhejiang, China

Abstract: The multiple-step cleavage of amyloid precursor protein (APP) generates amyloid- β peptides (A β), highly toxic molecules causing Alzheimer's disease (AD). The nonspecific cleavage between the transmembrane region of APP (APPTM) and γ -secretase is the key step of A β generation. Reconstituting APPTM under physiologically-relevant conditions is crucial to investigate how it interacts with γ -secretase and for future AD drug discovery. Although producing recombinant APPTM was reported before, the large scale purification was hindered by the use of biological protease in the presence of membrane protein. Here, we expressed recombinant APPTM in *Escherichia coli* using the pMM-LR6 vector and recovered the fusion protein from inclusion bodies. By combining Ni-NTA chromatography, cyanogen bromide cleavage, and reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), isotopically-labeled APPTM was obtained in high yield and high purity. The reconstitution of APPTM into dodecylphosphocholine (DPC) micelle generated mono dispersed 2D ¹⁵N-¹H HSQC spectra in high quality. We successfully established an efficient and reliable method for the expression, purification and reconstruction of APPTM, which may facilitate future investigation of APPTM and its complex in more native like membrane mimetics such as bicelle and nanodiscs.

Keywords: Alzheimer's disease; amyloid precursor protein (APP); transmembrane domain; membrane proteins; solution nuclear magnetic resonance (NMR); detergent micelle

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以记忆能力和认知能力受损为主要特征的神经退行性疾病^[1]。老年斑是 AD 的标志性病理特征之一,其主要成分是 β -淀粉样蛋白(amyloid- β peptide, A β)^[2]。A β 是淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)经 β -分泌酶和 γ -分泌酶依次水解形成的。APP 是单次跨膜的膜蛋白。首先, β -分泌酶会在胞外近膜区域对 APP 进行切割,释放细胞膜外可溶性的 N 端部分;以及跨过细胞膜,含有 99 个氨基酸残基的 C 末端部分(C99)^[3-4]。

随后, γ -分泌酶在 APP 的跨膜区域(transmembrane domain of amyloid precursor protein, APPTM)对 C99 进行多次切割,生成一系列的 A β 。其中,A β 40 是主要的 A β 产物,毒性相对较低;A β 42 的含量次之,仅占不到 10%,但很不稳定,极易自发寡聚成具有神经毒性的淀粉样纤维和斑块^[5-6]。

APPTM 作为 γ -分泌酶的底物,其与 γ -分泌酶的相互作用对于 γ -分泌酶的酶切特异性至关重要,该相互作用决定了最终的 A β 产物类型和毒性。家族性阿尔茨海默病(familial Alzheimer's

disease, FAD)是由编码 APP 或 γ -分泌酶的基因发生错义突变导致的^[7]。研究发现, APP 中超过一半的 FAD 致病突变集中在 APPTM, 这些致病突变会改变 γ -分泌酶和 APPTM 的相互作用, 进而影响其酶切特异性, 导致 A β 42/A β 40 比率上升, 最终引发 FAD^[8]。因此, APPTM 在 A β 42 的产生和 AD 的发病机制中具有重要作用。然而, 以 APPTM 为靶点的相关分子机制和药物开发研究进展缓慢。尽管单独的 APPTM^[9]和 γ -分泌酶^[10]的高清晰结构都已被解析, 但是 APPTM 和 γ -分泌酶的复合体结构以及二者的相互作用仍然没有被阐明。一个主要的原因在于高产量、具有生物活性的 APPTM 样品制备仍存在一定困难。APPTM 是跨膜蛋白, 疏水性强, 在细胞中表达量低; 同时, APPTM 非常不稳定, 在没有表面活性剂或者脂分子的环境下不溶于水且容易寡聚导致失活^[11]; 在 APPTM 重构前应尽量使其处于酸性(短时间)或者有机溶液环境以保持单体状态。现有的 APPTM 重组制备方法都涉及融合蛋白的表达和生物酶的切割^[8,11-12]。在水溶液环境中, 生物酶的切割效率往往会因为疏水性 APPTM 的产生和聚集而迅速下降, 从而造成 APPTM 的释放中止, 因此制备效率较低且不稳定。这些特性使得 APPTM 的表达和纯化非常具有挑战性。

为了解决 APPTM 样品制备困难的问题, 本研究以大肠杆菌(*Escherichia coli*)为宿主, 使用 pMM-LR6 载体对 APPTM 进行融合表达, 该载体带有 His9-TrpLE 标签, 能提高融合蛋白的稳定性和表达量。随后, 通过盐酸胍对包涵体进行提取, 并依次采用 Ni-NTA 亲和层析、溴化氰切割融合标签和反相高效液相色谱(reverse phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC)来纯化 APPTM。将高纯度的 APPTM 重构到十二烷基磷酸胆碱(dodecylphosphocholine, DPC)胶束中, 并

采集 ^{15}N - ^1H 异核单量子关系(heteronuclear singular quantum correlation, HSQC)二维图谱, 通过与先前报道的制备方法制备的 APPTM 对比来验证蛋白重构的有效性。本研究建立了一种高效且可靠的 APPTM 的表达、纯化和体外重构方法, 为后续利用液相核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)探究 APPTM 在更接近天然环境的膜成分中的结构和功能以及和 γ -分泌酶的相互作用奠定了良好的基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3)感受态细胞购自北京博迈德基因技术有限公司; pMM-LR6 载体为哈佛医学院 Blacklow SC 教授赠送; LB 培养基购于生工生物工程(上海)股份有限公司; 卡那霉素、三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)购于上海麦克林生化科技有限公司; Ni-NTA 填料(L00666)购于金斯瑞生物科技股份有限公司; 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)购于 BioFroxx 公司; 溴化氰购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司; DPC 购于 Glycon-Biochemicals 公司; $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 和 D_2O 购于 Cambridge Isotope Laboratories 公司; 色谱纯乙腈、异丙醇购于北京迈瑞达科技有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 APPTM 重组表达载体的构建

以大肠杆菌为宿主, 对 APPTM 蛋白编码序列(MGSNKGAIIGLVGGVVIATVIVITLVILK KKQYTS, 其中第一个 M 是额外添加的溴化氰切割位点)进行密码子优化, 并在 5'和 3'端分别添加 *Hind* III和 *Bam*H I酶切位点, 所得序列经全基因合成后, 进一步克隆到 pMM-LR6 载体^[13]中, 得到重组表达载体 pMM-LR6-APPTM (图 1)。

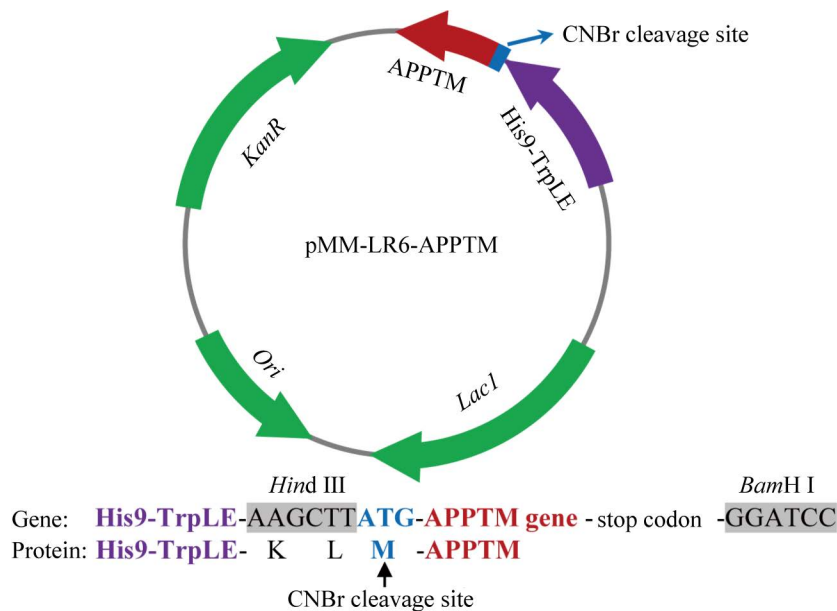


图1 重组表达载体 pMM-LR6-APPTM 的图谱

Figure 1 Construction of the recombinant expression vector pMM-LR6-APPTM.

pMM-LR6-APPTM 将编码融合蛋白 His9-TrpLE-APPTM。其中，His9 是由连续 9 个组氨酸组成的多聚组氨酸标签(polyhistidine-tag, His-tag)，可用于 Ni-NTA 亲和层析纯化；TrpLE 序列^[14]则源于大肠杆菌色氨酸操纵子前导区，能够促进蛋白质表达达到包涵体中。基因合成与载体构建由金斯瑞生物科技有限公司完成，并通过基因测序验证载体构建结果。

1.2.2 诱导表达和 ¹⁵N 同位素标记

将 pMM-LR6-APPTM 转化 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞，挑取一个阳性单克隆接种到 LB 培养基中，37 °C、220 r/min 振荡培养过夜。次日，5 000×g 离心 30 min 收集菌体并转接到 M9 培养基中，使起始 OD_{600} 为 0.1，37 °C、220 r/min 振荡培养至 OD_{600} 为 0.6–0.7 时，加入 IPTG 至终浓度为 0.15 mmol/L，在 20 °C、220 r/min 诱导条件下表达 16 h。诱导结束后，5 000×g 离心 30 min 收集菌体，冻存于 -80 °C 冰箱或立即用于纯化。¹⁵N 同位素标记的 APPTM 则是通过使用以 ¹⁵NH₄Cl (1 g/L) 为唯一氮源的 M9 培养基来

表达制备。

1.2.3 Ni-NTA 亲和层析纯化

将收集的菌体重悬于裂解缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, pH 8.0)中，冰浴条件下间歇超声破碎 9 min (超声功率: 250 W, 每超声 1.5 s 停止 1.5 s)，4 °C、24 000×g 离心 30 min，收集包涵体沉淀。将包涵体沉淀重悬于变性缓冲液(6 mol/L 盐酸胍, 50 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, pH 8.0)中，室温搅拌过夜，24 000×g 离心 30 min，收集上清液。将上清液与预先由变性缓冲液平衡的 Ni-NTA 填料在室温混合孵育 1 h，装填到重力层析空柱(Econo-Pac column, Bio-Rad)中，经重力柱流穿后，依次使用 10 个柱体积的 8 mol/L 尿素溶液和 10 个柱体积的超纯水清洗 Ni-NTA 填料，最后使用 3 个柱体积的 90% (体积分数)甲酸溶液洗脱 Ni-NTA 填料，并收集洗脱液。

1.2.4 溴化氰切割融合标签

向上述甲酸洗脱液中加入溴化氰至终浓度为 0.2 g/mL，在避光、通氮气保护的条件下反

应 1 h。反应结束后,将溶液转移到透析袋(3.5K MWCO, Thermo Scientific)中,用超纯水透析 2 次,每次 1 h。透析后的样品经液氮速冻后,冷冻干燥(Labconco FreeZone)过夜,所得冻干粉未保存于 -80°C 冰箱,用于后续 RP-HPLC 纯化。

1.2.5 RP-HPLC 纯化和质谱鉴定

用 50% (体积分数)甲酸溶液复溶上述溴化氰切割产物,0.45 μm 滤膜过滤,18 000 $\times g$ 离心 3 min 后,取上清上样到 C4 反相色谱柱(Hungpu C4-300, 广州恒谱)中,使用流动相 A (72 \rightarrow 0%) 和流动相 B (28 \rightarrow 100%) 的线性梯度进行纯化。其中流动相 A 成分为:25%乙腈,75%超纯水,0.1%TFA。流动相 B 成分为:25%乙腈,75%异丙醇,0.1%TFA。洗脱程序为:0–10 min, 28% 流动相 B; 10–50 min, 28%–100% 流动相 B; 流速为 3 mL/min。收集主要的洗脱峰,并通过 SDS-PAGE 和基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)进行鉴定。

1.2.6 DPC 胶束环境体外重构

称取 12 mg 的 DPC 干粉,用 1 mL 重构变性缓冲液(25 mmol/L sodium phosphate, 50 mmol/L NaCl, 6 mol/L 盐酸胍, pH 6.5)充分溶解后,再加入 1 mg 的 APPTM 干粉,涡旋溶解至无明显蛋白颗粒,18 000 $\times g$ 离心 2 min 后,吸取上清至透析盒(3.5K MWCO, Thermo Scientific)中,置于 1 L 透析缓冲液(25 mmol/L sodium phosphate, 50 mmol/L NaCl, pH 6.5)中静置过夜。次日,再将透析盒置于新的 1 L 透析缓冲液中,500 r/min 搅拌透析 4 h。随后,使用超滤离心管(10K MWCO)将透析后的样品浓缩至约 300 μL ,再补加 D_2O 至总体积的 10%,混匀后转移到 shigemi 核磁管中。

1.2.7 ^{15}N - ^1H HSQC 二维谱

使用 Bruker Avance 600 MHz 核磁共振谱仪

和低温探头,在 35°C 下采集 ^{15}N - ^1H HSQC 二维谱。 ^{15}N 和 ^1H 的维度分别采集了 2 048 个和 200 个数据点,每次时间递增进行 16 次扫描。HSQC 图谱 ^1H 轴的谱宽是 14 ppm,中心位于 4.7 ppm; ^{15}N 轴的谱宽是 20 ppm,中心位于 115 ppm。数据处理采用 NMRPipe^[15] 和 Sparky 软件(T. D. Goddard and, D. G. Kneller, SPARKY 3, University of California, San Francisco)。

2 结果与分析

2.1 APPTM 的表达和纯化

2.1.1 融合蛋白 His9-TrpLE-APPTM 的诱导表达

APPTM 的表达与纯化流程如图 2 所示。将重组表达载体 pMM-LR6-APPTM 转化 *E. coli* BL21(DE3) 菌株,挑选阳性单菌落扩大培养后,用 IPTG 进行诱导表达。对诱导前后的全菌液进行 SDS-PAGE 分析,结果如图 3 所示,与未诱导的菌液(图 3,泳道 1)相比,0.15 mmol/L IPTG、 20°C 诱导 16 h 的菌液(图 3,泳道 2)在 17 kDa 左右出现了一条特异性蛋白条带,与融合蛋白 His9-TrpLE-APPTM 的分子量(16.8 kDa)相符,表明融合蛋白成功得到了表达。

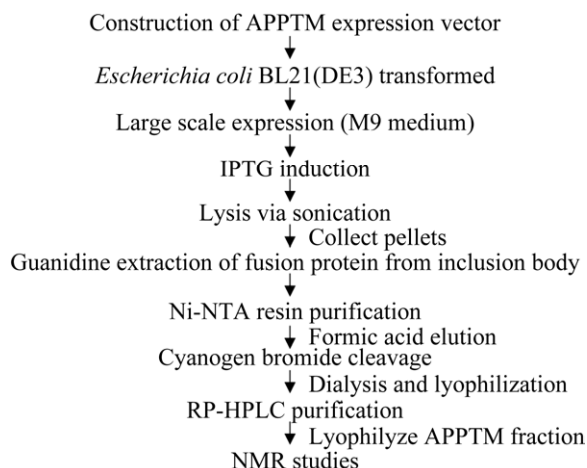


图 2 APPTM 的表达和纯化流程图

Figure 2 Flowchart for the expression and purification of APPTM.

2.1.2 Ni-NTA 亲和层析纯化

His9-TrpLE 标签能够促进融合蛋白 His9-TrpLE-APPTM 以包涵体形式表达。因此, 超声破碎细胞后, 用 6 mol/L 的盐酸胍溶液过夜溶解包涵体, 随后使用 Ni-NTA 亲和层析对含有融合蛋白的包涵体溶液进行纯化, 并通过 SDS-PAGE 来检测纯化效果。如图 3 泳道 3 所示, 纯化产物中含有明显的融合蛋白 His9-TrpLE-APPTM 条带, 但仍存在其他杂蛋白条带。通过使用 ImageJ 软件^[16]对蛋白条带灰度值进行分析, 测得纯化产物的纯度约为 10%。当前阶段纯度为 10% 是因为本文使用了 90% (体积分数) 甲酸溶液进行洗脱, 甲酸能够破坏蛋白与填料的相互作用, 将所有与填料特异性结合以及非特异性结合的蛋白都洗脱下来。

2.1.3 溴化氰切割 His9-TrpLE 标签

使用溴化氰切除融合蛋白中的 His9-TrpLE 标签, 释放目的蛋白 APPTM, 并通过 SDS-PAGE 检测切割效率, 结果如图 3 泳道 4 所示。由图可知, 溴化氰切割 1 h 后, 超过 95% 的融合蛋白 His9-TrpLE-APPTM (16.8 kDa) 被溴化氰切割为 His9-TrpLE (13.1 kDa) 和 APPTM (3.6 kDa) 两条带, 其中 APPTM 因过小的分子量和较弱的染色特性, 条带在图 3 中不明显。

2.1.4 APPTM 的 RP-HPLC 纯化和质谱鉴定

利用 RP-HPLC 对溴化氰切割产物进行纯化, 收集 5 个主要的洗脱峰(图 4A), 冻干后进行 SDS-PAGE 分析(图 4B)。综合分析 5 个洗脱峰的分子量分布情况, 推断洗脱峰 1 为 His9-TrpLE 标签 (13.1 kDa); 洗脱峰 4 为未被切割的融合蛋白 His9-TrpLE-APPTM (16.8 kDa); 洗脱峰 5 为目的蛋白 APPTM (3.6 kDa); 洗脱峰 2 和 3 则是杂质蛋白。进一步使用 MALDI-TOF-MS 对洗脱峰 5 进行鉴定, 质谱结果显示(图 4C), 洗脱峰 5 的实测质量(3 567.73 Da)与 APPTM 的

理论质量(3 567.40 Da)良好吻合; 结合高浓度上样的洗脱峰 5 在 SDS-PAGE 中仅有单一蛋白条带(图 4B), 表明经过 RP-HPLC 纯化后, 能够得到纯度 >95% 的 APPTM 样品。含有高纯度 APPTM 的组分经液氮速冻并冻干称重。1 L M9 培养基能提纯得到约 1 mg APPTM。

2.1.5 APPTM 表达和纯化方法的重复性

图 5 是 3 次独立的 APPTM 表达与纯化试验的 SDS-PAGE 和 RP-HPLC 结果。由图 5A-C 可知, 在 3 次独立试验中, APPTM 均得到了成功表达, 且溴化氰切割效率均在 95% 以上; 同时, 如图 5D 所示, 在上样量一致的情况下(约 0.3 L M9 培养基的表达量), 3 次独立试验中 APPTM 洗脱峰的保留时间和峰面积相近, 这些结果说明本文所用的表达和纯化方法具有良好的重复性。

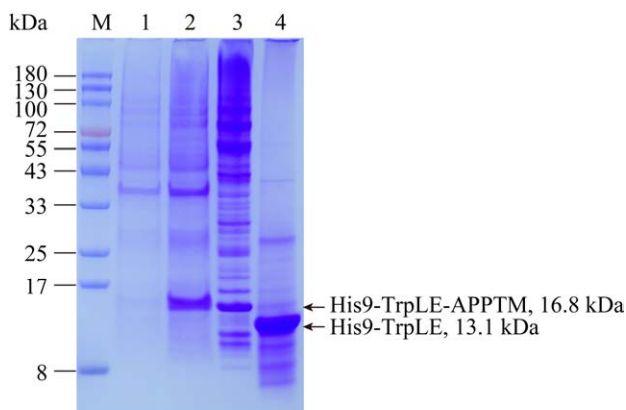


图 3 SDS-PAGE 检测 His9-TrpLE-APPTM 融合蛋白的表达、镍柱亲和纯化和溴化氰切割

Figure 3 SDS-PAGE to detect the expression and purification of recombinant APPTM. Lane M: Molecular weight markers; Lane 1: Whole cell lysate uninduced; Lane 2: Cell lysate induced with 0.15 mmol/L IPTG; Lane 3: His9-TrpLE-APPTM fusion protein after Ni-NTA affinity chromatography; Lane 4: Cyanogen bromide cleavage of His9-TrpLE-APPTM fusion protein.

2.2 APPTM 的 ^{15}N - ^1H HSQC 二维谱

表面活性剂胶束(detergent micelles)是研究膜蛋白最常用的体系之一。为检验本研究所用的制备方法的有效性,选取先前文章报道的制备方法^[11]为对照组,将两种方法制备得到的 ^{15}N 标记的 APPTM 重构到 DPC 胶束环境中,并采集其 ^{15}N - ^1H HSQC 二维谱,结果如图 6 所示。采用本

研究的制备方法得到了高分辨率、信号分散良好的 ^{15}N - ^1H HSQC 谱图(图 6A),且结果与对照组(包含了部分突变序列的 APPTM,图 6B)相似,表明 APPTM 得到了有效的体外重构。同时,本研究只需使用 1 L M9 培养基制样即可得到与对照组使用 4 L M9 培养基制样相近的 NMR 信号强度,降低了样品制备成本。

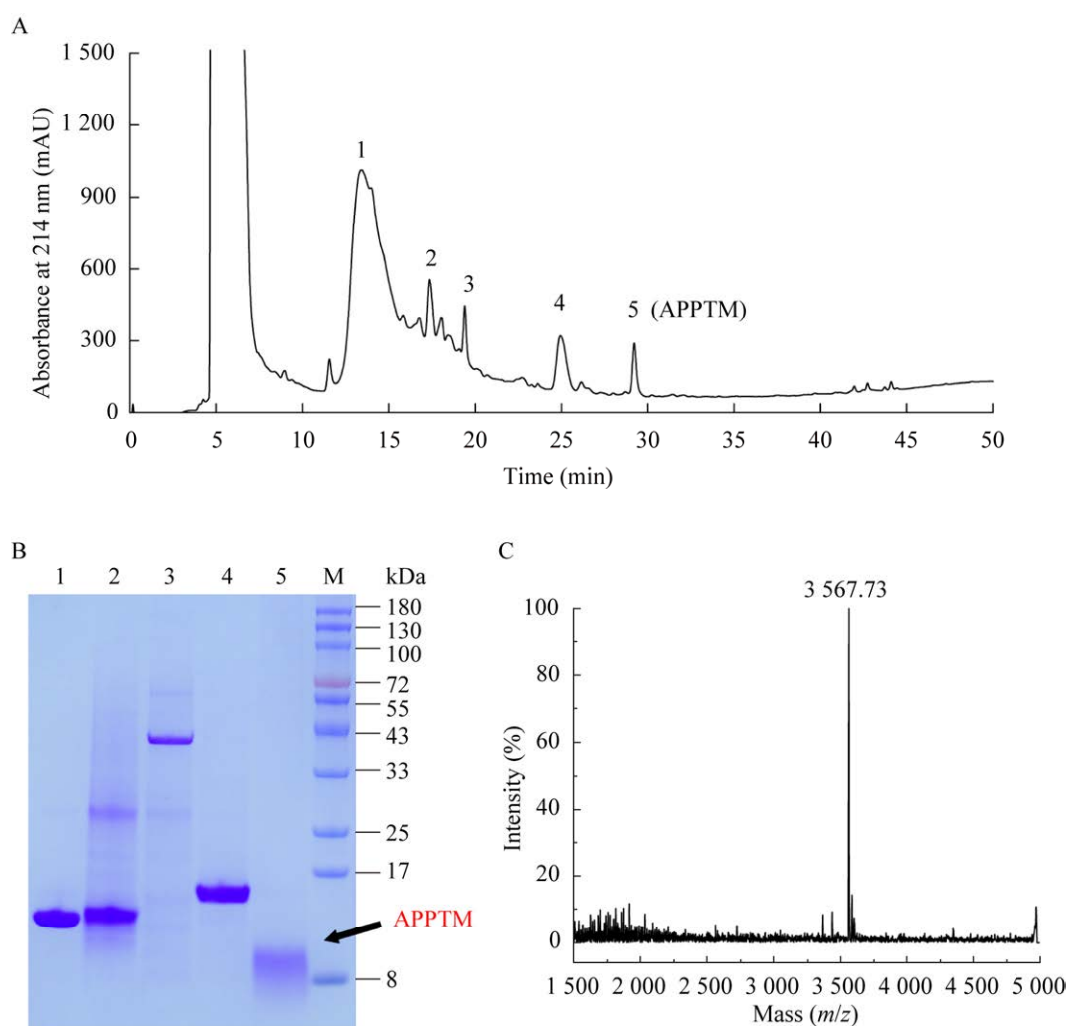


图 4 APPTM 的 RP-HPLC 纯化和质谱鉴定

Figure 4 RP-HPLC purification and mass spectrometry identification of APPTM. A: HPLC chromatogram of cyanogen bromide digest mix, monitored at 214 nm. B: SDS-PAGE of five main fractions from figure 4A. Lane 1–5 represents fraction 1–5, respectively. C: Mass chromatogram of APPTM. Theoretical mass is 3 567.40 Da while the measured mass is 3 567.73 Da.

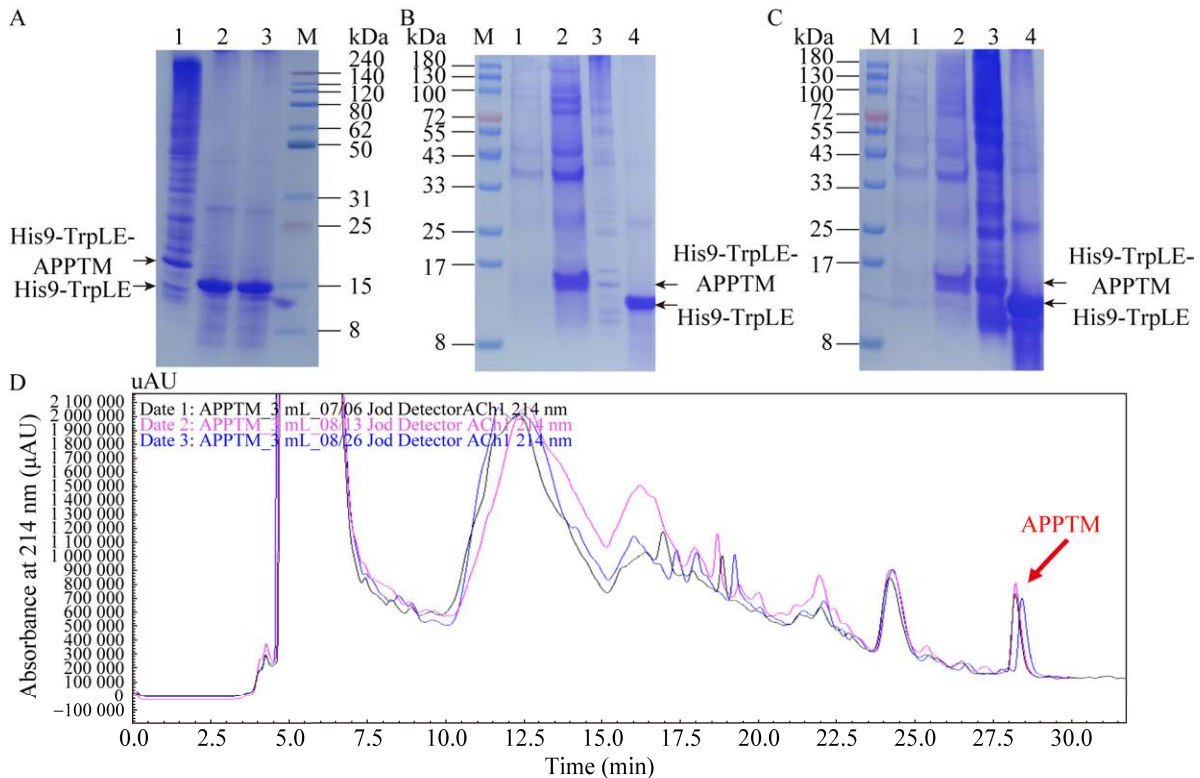


图 5 三次独立的 APPTM 表达与纯化试验的 SDS-PAGE 和 RP-HPLC 结果

Figure 5 SDS-PAGE and RP-HPLC chromatograms of the three independent expression and purification experiments. A: SDS-PAGE chromatograms of independent expression and purification experiments. Lane M: Molecular weight markers; Lane 1: His9-TrpLE-APPTM fusion protein after Ni-NTA purification; Lane 2: Cyanogen bromide (Sigma) cleavage of His9-TrpLE-APPTM fusion protein; Lane 3: Cyanogen bromide (Aladdin) cleavage of fusion protein. B, C: SDS-PAGE chromatograms of independent expression and purification experiments. Lane M: Molecular weight markers; Lane 1: Uninduced cell lysate; Lane 2: Cell lysate after induction; Lane 3: Ni-NTA purification of fusion protein; Lane 4: Cyanogen bromide cleavage of fusion protein. D: Overlay of the RP-HPLC chromatograms of three independent experiments.

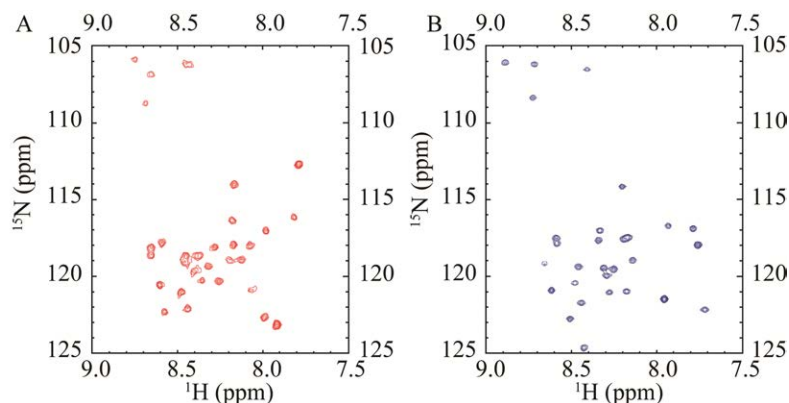


图 6 APPTM 在 DPC 胶束中的 ^{15}N - ^1H HSQC 二维谱

Figure 6 ^{15}N - ^1H HSQC of APPTM in DPC micelles at pH 6.5. A: APPTM prepared from 1 L of M9 culture using the method described in this paper. B: APPTM mutant prepared from 4 L of M9 culture using the method previously described^[11]. The final protein sequence is GAMAKGAIIGLMVGGVVIATVIVITLVMLKKK.

3 讨论与结论

高效、高活性的样品制备是研究 APPTM 结构和功能的前提。APPTM 作为单次跨膜蛋白,具有疏水性强、易寡聚失活且不溶于水溶液的特性,因此,其表达和纯化具有较大难度。为解决上述问题,本研究使用 His9-TrpLE 标签与 APPTM 进行融合表达,该标签可以提高重组蛋白的稳定性,促使蛋白以包涵体形式高效表达,并能简化重组蛋白的纯化流程。此外,麦芽糖结合蛋白(maltose binding protein, MBP)^[11]和硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)标签^[8,12]也可以用于 APPTM 的重组表达。

Ni-NTA 亲和层析纯化法具有操作简单、载量大、化学耐受性好等优点,在变性^[17-18]和非变性^[19-20]条件下均可有效纯化 His-tag 融合蛋白,是最常用的重组蛋白纯化方法之一。Ni-NTA 亲和层析具有多种洗脱方式,除了使用传统的咪唑进行竞争性洗脱外,还可以使用酸性溶液通过破坏融合蛋白与 Ni-NTA 填料之间的亲和力来进行洗脱。本研究采用甲酸溶液对融合蛋白进行洗脱,洗脱液可直接用于后续的溴化氰切割融合标签步骤,有效避免了高浓度咪唑洗脱带来的透析和样品浓缩等繁琐过程。

融合表达会引入额外的融合标签,需要切除以释放目的蛋白 APPTM。常用的标签切除方法包括蛋白酶切割法和化学切割法两种^[21]。蛋白酶切割法特异性强,但切割效率低,且只能在非变性条件下进行^[8,11],这意味着包涵体蛋白必须经过复性后才能进行酶切。额外的复性步骤会导致大量的目的蛋白损失。同时,在蛋白酶切割过程中产生的 APPTM 因不溶于水溶液而产生大量沉淀和聚集,会进一步降低蛋白酶的切割效率。溴化氰切割法是目前最常用的化学切割法,其能够高效地切割甲硫氨酸的 C 端,且可以在

变性条件下进行^[22],效率不受影响,从而有效避免了蛋白复性所造成的蛋白损失;切割产生的 APPTM 也易溶于甲酸溶液。不过,同时需要注意的是,溴化氰切割在甲酸溶液中进行,甲酸能够与蛋白发生副反应(C 端甲酰化和侧链氧化)^[23]。因此,为了避免副反应的发生,溴化氰切割反应时间通常不超过 2 h,且需要在惰性气体(如氮气、氩气)保护下进行。本研究采用高浓度的溴化氰(0.2 g/mL)对融合蛋白进行切割,只需反应 1 h,就能达到 95%以上的切割效率。同时,通过加入氮气保护,有效避免了副反应的发生,未在 APPTM 中发现其他副产物(RP-HPLC 中为单峰、质谱实测质量与理论质量吻合良好,图 4)。

APPTM 作为跨膜蛋白,具有较多疏水氨基酸,易与 SDS 形成胶束复合体系,使条带的迁移速度变慢,并呈现出弥散状态^[24]。因此,APPTM 在 SDS-PAGE 中的实际条带位置会大于理论分子量(图 4B,泳道 5),这与 Bocharova 等^[12]的研究相一致。

表面活性剂胶束是研究膜蛋白最常用的模拟膜环境。截至目前,已经报道了一些能够提供高质量 NMR 谱图的表面活性剂胶束,包括 DPC、1-十八烷酰基-sn-甘油-3-磷酸-(1'rac 甘油)、正辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷、正十二烷基 β-D-麦芽糖苷和 1,2-二丙酰基-1-sn-甘油-3-磷酸-(1'rac 甘油)^[25-27]。两性表面活性剂 DPC 是一种比较温和的表面活性剂,对蛋白结构影响小。研究表明,DPC 可以保持膜蛋白的天然构象和酶活性^[28-29]。因此,本研究首先测试了 APPTM 在 DPC 胶束环境下 NMR 谱图质量,得到了高分辨率和信号分散良好的 ¹⁵N-¹H HSQC 二维谱。此外,研究表明,脂质环境对于 APP 水解生成 Aβ 有重要影响。在体内,γ-分泌酶切割 APP 是发生在脂筏环境中^[30]。Beel 等^[31]研究发现,APP

和胆固醇具有相互作用。因此,除了DPC胶束外,APPTM及其复合物将会被进一步重构在更接近天然膜环境的拟膜成分中,如脂碟(bicelle)和纳米碟(nanodisc)进行结构和功能的研究。

总的来说,本研究成功建立了一种高效且可靠的用于表达、纯化和体外重构APPTM的方法,能够实现自然丰度和同位素标记的APPTM样品的制备,为后续利用液相NMR技术探究APPTM及其复合物的结构和功能奠定了良好的基础,有助于更好地了解A β 的产生机制及AD的发病机制。

REFERENCES

- [1] ADAV SS, SZE SK. Insight of brain degenerative protein modifications in the pathology of neurodegeneration and dementia by proteomic profiling[J]. *Molecular Brain*, 2016, 9(1): 92.
- [2] SHARMA P, SHARMA A, FAYAZ F, WAKODE S, POTTOO FH. Biological signatures of Alzheimer's disease[J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2020, 20(9): 770-781.
- [3] FEDE GD, CATANIA M, MORBIN M, ROSSI G, SUARDI S, MAZZOLENI G, MERLIN M, GIOVAGNOLI AR, PRIONI S, ERBETTA A, FALCONE C, GOBBI M, COLOMBO L, BASTONE A, BEEG M, MANZONI C, FRANCESCOCCI B, SPAGNOLI A, CANTÙ L, del FAVERO E, et al. A recessive mutation in the APP gene with dominant-negative effect on amyloidogenesis[J]. *Science*, 2009, 323(5920): 1473-1477.
- [4] HAMPEL H, VASSAR R, de STROOPER B, HARDY J, WILLEM M, SINGH N, ZHOU J, YAN RQ, VANMECHELEN E, de VOS A, NISTICÒ R, CORBO M, IMBIMBO BP, STREFFER J, VOYTYUK I, TIMMERS M, TAHAMI MONFARED AA, IRIZARRY M, ALBALA B, KOYAMA A, et al. The β -secretase BACE1 in Alzheimer's disease[J]. *Biological Psychiatry*, 2021, 89(8): 745-756.
- [5] STROOPER BD, VASSAR R, GOLDE T. The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease[J]. *Nature Reviews Neurology*, 2010, 6(2): 99-107.
- [6] KAKUDA N, YAMAGUCHI H, AKAZAWA K, HATA SR, SUZUKI T, HATSUTA H, MURAYAMA S, FUNAMOTO S, IHARA Y. γ -secretase activity is associated with braak senile plaque stages[J]. *The American Journal of Pathology*, 2020, 190(6): 1323-1331.
- [7] LISTA S, O'BRYANT SE, BLENNOW K, DUBOIS B, HUGON J, ZETTERBERG H, HAMPEL H. Biomarkers in sporadic and familial Alzheimer's disease[J]. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 2015, 47(2): 291-317.
- [8] BOCHAROVA OV, URBAN AS, NADEZH DIN KD, BOCHAROV EV, ARSENIIEV AS. Bacterial and cell-free production of APP671-726 containing amyloid precursor protein transmembrane and metal-binding domains[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2013, 78(11): 1263-1271.
- [9] CHEN W, GAMACHE E, ROSENMAN DJ, XIE J, LOPEZ MM, LI YM, WANG CY. Familial Alzheimer's mutations within APPTM increase A β 42 production by enhancing accessibility of ϵ -cleavage site[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 3037.
- [10] ZHOU R, YANG GH, GUO XF, ZHOU Q, LEI JL, SHI YG. Recognition of the amyloid precursor protein by human γ -secretase[J]. *Science*, 2019, 363(6428): eaaw0930.
- [11] CHEN W, GAMACHE E, RICHARDSON D, DU ZM, WANG CY. Expression, purification, and reconstitution of the transmembrane domain of the human amyloid precursor protein for NMR studies[J]. *Protein Expression and Purification*, 2012, 81(1): 11-17.
- [12] BOCHAROVA OV, NADEZH DIN KD, BOCHAROV EV, ARSEN'EV AS. Expression and purification of a recombinant transmembrane domain amyloid precursor protein associated with Alzheimer's disease[J]. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2010, 36(1): 97-103.
- [13] BLACKLOW SC, KIM PS. Protein folding and calcium binding defects arising from familial hypercholesterolemia mutations of the LDL receptor[J]. *Nature Structural Biology*, 1996, 3(9): 758-762.
- [14] STALEY JP, KIM PS. Formation of a native-like subdomain in a partially folded intermediate of bovine pancreatic trypsin inhibitor[J]. *Protein Science*, 1994, 3(10): 1822-1832.
- [15] DELAGLIO F, GRZESIEK S, VUISTER GW, ZHU G, PFEIFER J, BAX A. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes[J]. *Journal of Biomolecular NMR*, 1995, 6(3): 277-293.
- [16] SCHNEIDER CA, RASBAND WS, ELICEIRI KW.

- NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(7), 671–675.
- [17] BISHT S, SINGH KS, CHOUDHARY R, KUMAR S, GROVER S, MOHANTY AK, PANDE V, KAUSHIK JK. Expression of fibronectin-binding protein of *L. acidophilus* NCFM and *in vitro* refolding to adhesion capable native-like protein from inclusion bodies[J]. *Protein Expression and Purification*, 2018, 145: 7-13.
- [18] QIN HM, WANG JW, GUO QQ, LI ST, XU PP, ZHU ZL, SUN DY, LU FP. Refolding of a novel cholesterol oxidase from *Pimelobacter simplex* reveals dehydrogenation activity[J]. *Protein Expression and Purification*, 2017, 139: 1-7.
- [19] LIU KX, LI JJ, LIU MH, HOU J. Molecular chaperone GroEL-GroES enhances the soluble expression of biologically active ovine growth hormone in the prokaryotic system[J]. *Protein Expression and Purification*, 2022, 195-196: 106097.
- [20] WILSON RH, THIEULIN-PARDO G, HARTL FU, HAYER-HARTL M. Improved recombinant expression and purification of functional plant Rubisco[J]. *FEBS Letters*, 2019, 593(6): 611-621.
- [21] COSTA S, ALMEIDA A, CASTRO A, DOMINGUES L. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 63.
- [22] ANDREEV YA, KOZLOV SA, VASSILEVSKI AA, GRISHIN EV. Cyanogen bromide cleavage of proteins in salt and buffer solutions[J]. *Analytical Biochemistry*, 2010, 407(1): 144-146.
- [23] DUEWEL HS, HONEK JF. CNBr/formic acid reactions of methionine- and trifluoromethionine-containing lambda lysozyme: probing chemical and positional reactivity and formylation side reactions by mass spectrometry[J]. *Journal of Protein Chemistry*, 1998, 17(4): 337-350.
- [24] FU QS, PIAI A, CHEN W, XIA K, CHOU JJ. Structure determination protocol for transmembrane domain oligomers[J]. *Nature Protocols*, 2019, 14(8): 2483-2520.
- [25] BARRETT PJ, SONG YL, van HORN WD, HUSTEDT EJ, SCHAFER JM, HADZISELIMOVIC A, BEEL AJ, SANDERS CR. The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol[J]. *Science*, 2012, 336(6085): 1168-1171.
- [26] KRUEGER-KOPLIN RD, SORGEN PL, KRUEGER-KOPLIN ST, RIVERA-TORRES IO, CAHILL SM, HICKS DB, GRINIUS L, KRULWICH TA, GIRVIN ME. An evaluation of detergents for NMR structural studies of membrane proteins[J]. *Journal of Biomolecular NMR*, 2004, 28(1): 43-57.
- [27] POGET SF, GIRVIN ME. Solution NMR of membrane proteins in bilayer mimics: small is beautiful, but sometimes bigger is better[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 1768(12): 3098-3106.
- [28] PORCELLI F, BUCK-KOEHN TOP BA, THENNARASU S, RAMAMOORTHY A, VEGLIA G. Structures of the dimeric and monomeric variants of Magainin antimicrobial peptides (MSI-78 and MSI-594) in micelles and bilayers, determined by NMR spectroscopy[J]. *Biochemistry*, 2006, 45(18): 5793-5799.
- [29] PORCELLI F, VERARDI R, SHI L, HENZLER-WILDMAN KA, RAMAMOORTHY A, VEGLIA G. NMR structure of the cathelicidin-derived human antimicrobial peptide LL-37 in dodecylphosphocholine micelles[J]. *Biochemistry*, 2008, 47(20): 5565-5572.
- [30] VETRIVEL KS, CHENG HP, LIN W, SAKURAI T, LI T, NUKINA N, WONG PC, XU HX, THINAKARAN G. Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(43): 44945-44954.
- [31] BEEL AJ, MOBLEY CK, KIM HJ, TIAN F, HADZISELIMOVIC A, JAP B, PRESTEGARD JH, SANDERS CR. Structural studies of the transmembrane C-terminal domain of the amyloid precursor protein (APP): does APP function as a cholesterol sensor?[J]. *Biochemistry*, 2008, 47(36): 9428-9446.

(本文责编 郝丽芳)