

海带核基因组编码 CbbX 蛋白的原核表达与纯化

谢玮怡, 毕燕会, 周志刚

(上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要:为研究海带核基因组编码的 nucCbbX 蛋白的结构和功能,根据海带配子体核基因 *cbbX* (GenBank 登录号: NP_053838) 设计含有酶切位点的引物,通过 RT-PCR 方法获得末端连接 *Nde* I、*Xho* I 酶切位点的完整 ORF。序列保守性分析表明,预测的海带成熟 nucCbbX 蛋白序列含具有 AAA+ 结构域、Walker-A 和 Walker-B ATP 结合位点及 ATP 水解酶和 RuBisCo 活化酶活性相关位点。序列相似度分析表明,海带 nucCbbX 与其质体基因组编码的 ptCbbX 和类球红细菌的 *RsCbbX* 蛋白氨基酸序列相似度均较低,分别为 37.4% 和 36.8%,相比 ptCbbX 与 *RsCbbX* 相似度较高为 57.6%。以 *RsCbbX* 蛋白单体晶体结构模型为模板,预测获得的海带 nucCbbX 蛋白三级结构中 N 端为一个 α/β 子域含有 5 个 α 螺旋和 5 个 β 折叠,C 端为 α 螺旋子域含有 5 个 α 螺旋。为进一步研究海带 nucCbbX 蛋白晶体结构,通过双酶切和连接反应成功构建 pET28a-*cbbX* 原核表达载体,并转化至 BL21 感受态细胞,获得 pET28a-*cbbX*/BL21 重组菌株。利用终浓度为 1% 的 IPTG 进行诱导后,重组蛋白主要以包涵体形式存在,分子量为 50.2 kDa,较 nucCbbX 成熟蛋白(44.7 kDa)大。重组蛋白经变性、纯化和复性后用于蛋白结晶,初步获得海带 nucCbbX 蛋白晶体。

关键词:海带;核基因组;CbbX;蛋白;表达与纯化

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2015)02-0064-08

doi:10.7668/hbxb.2015.02.013

Prokaryotic Expression and Purification of Nuclear-genomic *cbbX* Gene of *Saccharina japonica*

XIE Wei-yi, BI Yan-hui, ZHOU Zhi-gang

(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Calvin-benson-bassham cycle-related enzyme (CbbX) is regarded as red-like RuBisCo activase that activates RuBisCo in Chromophyta. In *Saccharina japonica*, *cbbX* gene is encoded in nuclear genome (nuc*cbbX*) and plastid genome (pt*cbbX*). With RT-PCR, the fragment containing intact ORF of nuc*cbbX* gene and restriction enzyme cutting site was amplified in this study. Multiple sequence alignment carried out for the protein sequences of nucCbbX, ptCbbX of *S. japonica* and CbbX of *Rhodobacter sphaeroides* (*RsCbbX*) revealed the predicted mature nucCbbX contained AAA+ domain, Walker-A and -B motifs and residues related to CbbX functions (ATPase, binding RuBP and keeping hexamer structure stability). The pairwise sequence similarities between nucCbbX and ptCbbX, nucCbbX and *RsCbbX* were 37.4% and 36.8%. While the similarity between ptCbbX and *RsCbbX* was relatively high 57.6%. The predicted 3D structure of nucCbbX contained three subdomains which were N-terminal extension consisting of one α -helix, α/β subdomain containing 5 α -helixes and 5 β -folds, and C-terminal 5-helix bundle subdomain. For further study the crystal structure of nucCbbX, the target fragment was then successfully subcloned into the express vector pET28a and was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) induced with 1% IPTG. The result of SDS-PAGE showed that the fusion protein expressed mainly in the form of inclusion bodies with molecular weight of 50.2 kDa which is greater than that of nucCbbX mature protein 44.7 kDa. The fusion proteins were purified after being denatured by urea. And the purified proteins were proven that they could be used in protein crystallization after renaturation.

收稿日期:2015-01-28

基金项目:上海海洋大学一流学科海洋科学项目;国家高技术研究发展计划课题项目(2012AA10A406)

作者简介:谢玮怡(1988-),女,上海人,在读硕士,主要从事藻类生物技术研究。

通讯作者:周志刚(1964-),男,安徽肥东人,教授,博士,博士生导师,主要从事藻类生物学研究。

Key words: *Saccharina japonica*; Nuclear genome; CbbX; Protein; Expression and purification

海带 (*Saccharina japonica*) 是我国主要的经济海藻, 其养殖产量占世界总产量的 70% 以上^[1]。海带之所以能在中国得到大规模养殖, 主要在于其极高的光合作用效率所带来的巨大经济价值。据 Ross 等^[2]报道, 海带等大型海藻的光合作用效率为 6% ~ 8%, 远高于陆地植物 (1.8% ~ 2.2%)。另外, 与陆生 C4 植物相比, 海带在 7 个月的养殖时间内, 干物质产量可达 15 000 g/m² (相当于 150 t/hm²), 是甘蔗最大年产量的 2.8 倍 (鲜质量约 95 t/hm²)^[3]。海带的高光合作用效率可能是由于海带等杂色藻类具有红藻型核酮糖-1, 5-二磷酸羧化/加氧酶 (RuBisCo), 它与绿藻和高等植物的绿藻型 RuBisCo 相比, 具有更高的 CO₂/O₂ 特异性因子^[4-5]。

RuBisCo 是光合作用的关键酶, 在其催化作用下, CO₂ 与核酮糖-1, 5-二磷酸 (RuBP) 发生反应产生两分子的 3-磷酸甘油酸, 实现无机碳的固定。但是, RuBisCo 只有经过活化才具有催化能力。目前已证实, 绿藻、高等植物及杂色藻类中均存在 RuBisCo 活化酶, 它们属于 AAA + (ATPase associated with various cellular activities) 蛋白^[6-7]。通过晶体结构分析证实, CbbX 是杂色藻类的红藻型 RuBisCo 的活化酶^[7], 但其具体作用机制还不清楚。海带是杂色藻类的一种, 其 CbbX 也属于红藻型 RuBisCo 的活化酶, 但关于其 CbbX 蛋白的研究很少, 目前仅知海带具有两类 *cbbX* 基因, 分别位于核基因组 (*nuc-cbbX*) 和质体基因组 (*ptcbbX*), 以及 *nuc-cbbX* 基因具有雌、雄配子体差异表达的特征^[8]。本研究以类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 的 CbbX 蛋白晶体结构为模板, 通过生物信息学方法, 分析海带 *nuc-CbbX* 蛋白的三级结构特点, 并通过原核表达与纯化获得可用于蛋白结晶的重组可溶性 *nucCbbX* 蛋白, 初步探索 *nucCbbX* 蛋白结晶过程, 试验结果将有助于进一步探究海带 CbbX 蛋白的亚细胞定位、晶体结构、RuBisCo 激酶的作用机制, 并为最终揭示海带高光合作用效率机理和实现调控海带光合作用效率积累数据。

1 材料和方法

1.1 海带配子体培养

按已报道的方法^[9], 在 PES 培养基中分别培养海带雌、雄配子体。营养生长培养条件: 温度为 (17 ± 1) °C、光强为 40 μmol/(m²·s)、光时为 16 h/d。利用 Philips 直型荧光灯管提供白色冷光

源。定期更换培养基。

1.2 RNA 提取和反转录

利用 RNAiso 试剂 (TaKaRa) 提取总 RNA。然后利用 DNase I 在 37 °C 对总 RNA 处理 30 min, 以除去基因组 DNA, 再加入 1 μL 25 mmol/L EDTA, 65 °C 处理 10 min 以灭活 DNase I。最后置 -80 °C 保存备用。

以海带配子体总 RNA 为模板, 利用 PrimeScript™ RT 试剂盒 (TaKaRa) 进行 cDNA 第一链合成。10 μL 反应体系由 2 μL 5 × PrimeScript™ 缓冲液、0.5 μL PrimeScript™ RT 酶混合液 I、0.5 μL Oligo dT 引物 (50 μmol/L)、0.5 μL 随机引物 (100 μmol/L)、总 RNA 150 ng 及无 RNase 的 dH₂O 组成。反转录反应在 37 °C 温育 15 min, 然后 85 °C 热激 5 s 以终止反应。反转录产物于 -20 °C 保存。

1.3 目的基因克隆

根据海带配子体 *nuc-cbbX* 基因 (GenBank 登录号: NP_053838) 的序列设计引物, 用于扩增完整的 ORF, 并引入酶切位点, 序列如下, Nuc1: 5'-tc CATATGAAGGCAGCAGCGATG-3' 和 Nuc2: 5'-cg CTGCAGAGCAACGATAGCGTCAAGC-3' (小写字母为保护碱基, 划线部分为 *Nde* I 和 *Xho* I 的酶切位点)。引物由上海生工生物工程有限公司合成, 以海带 cDNA 第一链为模板进行 PCR 反应。

25 μL 反应体系包括 10 × PCR 缓冲液 2.5 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL, Mg²⁺ (25 mmol/L) 1.5 μL, *Taq* 酶 (5 U/μL) 0.25 μL, 正向引物 (25 μmol/L) 1 μL, 反向引物 (25 μmol/L) 1 μL, 模板 1 μL, 灭菌双蒸水 15.75 μL。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 35 个循环包括 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经胶纯化后连接到 pMD19-T 载体中, 然后转染宿主菌 *E. coli* DH5α, 蓝白斑筛选阳性克隆, 进行菌落 PCR 检测, 然后进行测序鉴定。

1.4 生物信息学分析

1.4.1 海带 *nuc-cbbX* 基因的序列分析 从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 的数据库中下载海带 *nucCbbX*、*ptCbbX* 和类球红细菌 *RsCbbX* 蛋白的氨基酸序列 (GenBank 登录号: ADG62366.1, AFC40130.1 和 AAC44827.1), 然后利用 CLUSTAL X1.8 软件^[10-11] 对这 3 个蛋白的氨基酸序列进行比对, 基于比对结果利用 BioEdit 软件^[12] 获得蛋白序列相似度, 利用 GeneDoc 软件^[13] 进行序列保守区分

析, SingalP3.0 软件^[14] 预测信号肽, 利用网络服务器 PROSITE 分析海带 *nucCbbX* 蛋白的功能结构域。

1.4.2 海带 *nucCbbX* 蛋白的空间结构模拟 将海带 *nucCbbX* 蛋白序列提交英国伦敦大学理工学院生物信息学小组维护的 3D-PSSM 服务器^[15], 运用 1D-3D 序列剖面图并结合二级结构进行蛋白折叠识别和预测, 得到海带 *nucCbbX* 的 3D 结构。*RsCbbX* 单体结构来自 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/pdb>)。使用 Pymol 软件^[16] 将上面预测的海带 *nucCbbX* 结构和数据库中 *RsCbbX* 单体的结构进行叠合, 根据 *RsCbbX* 中的 ATP 结合位点及 ATPase 和 Rubisco 活化酶活性相关位点的空间位置, 模拟海带 *nucCbbX* 中相应氨基酸的空间位置。

1.5 原核表达载体构建和鉴定

利用质粒提取试剂盒 (艾德莱公司) 提取 pMD19T-*cbbX* 重组质粒。将原核表达质粒 pET28a (鼎国生物) 和重组质粒 pMD19T-*cbbX* 分别用 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切, 胶回收目的片段, 通过 T4 连接酶 (TaKaRa) 16 °C 连接过夜, 转化宿主菌 *E. coli* DH5 α , 蓝白斑筛选阳性克隆, 利用质粒提取试剂盒 (艾德莱公司) 提取质粒, 然后进行双酶切和测序鉴定。

1.6 原核表达蛋白的诱导和分析

1.6.1 原核表达蛋白的诱导 经鉴定阅读框正确的阳性重组质粒 pET28a-*cbbX* 转化 BL21 (DE3) 感受态细胞 (上海申能博彩公司), 涂板挑菌, 筛选出阳性重组菌。挑阳性单克隆接种于 3 mL 终浓度为 100 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中, 37 °C 振荡培养过夜, 次日以 1:100 体积比转接到含卡那霉素的 LB 培养液中, 37 °C 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 时, 加 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L, 37 °C 继续培养 0.5, 1, 1.5, 2 h 后收集菌体。

1.6.2 原核表达蛋白可溶性鉴定 将 pET28a-*cbbX*/BL21 菌株分别在 37, 14 °C 诱导培养, 各取 1 mL 菌液分装于 1.5 mL 离心管中, 离心 5 min, 沉淀用 PBS (pH 值 7.4) 悬浮。采用冻融法破碎菌体后, 4 °C 条件下 20 000 r/min 离心 10 min, 分别收集上清和沉淀, 沉淀用 PBS 重悬。取未诱导菌体裂解液、诱导菌体裂解液、上清液、沉淀重悬液各 20 μ L, 按 1:1 比例加入 2 \times 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDA-PAGE) 上样缓冲液, 水浴煮沸 10 min, 进行 12% SDS-PAGE 电泳。聚丙烯酰胺胶采用考马斯亮蓝法进行染色。

1.7 包涵体蛋白的大量纯化及复性

1.7.1 包涵体的制备和纯化 37 °C 条件下利用终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 4 L 重组菌液, 10 000

r/min 离心收集菌体。每 500 mL 菌液收集的菌体用 50 mL 的缓冲液重悬, 进行冰浴超声, 至菌液清亮不黏稠, 加入 500 μ L PMSF, 10 000 r/min 离心 20 min, 沉淀即为粗制的包涵体。沉淀分别用 2 mol/L 尿素、50 mmol/L Tris-HCl 和 2 mol/L 盐酸胍洗涤, 用 8 mol/L 尿素室温溶解 2 h 后, 10 000 r/min 离心 20 min, 上清即为比较纯的已变性目的蛋白溶液。将上清液加入平衡好的镍柱 (GE Ni Sepharose 6 Fast Flow), 接着加入含 10 mmol/L 咪唑的溶解液, 继续平衡至读数不变, 用咪唑梯度法洗脱目的蛋白, 分别收集洗脱液及洗脱峰, SDS-PAGE 检测含有目的蛋白的洗脱液, 收集纯度 95% 以上的洗脱液, 合并后加入 PMSF 进行复性。

1.7.2 目的蛋白的复性及保存 将纯化后的变性目的蛋白溶液置于透析复性液中复性 8 h, 透析液与蛋白溶液的比例为 1:10, 之后用 20 mmol/L Tris-HCl (pH 值 8.0) 透析 2 次, 10 000 r/min 离心 20 min, 取上清即为复性后的目的蛋白。测定浓度后, 将上清液加入 10 kDa 超滤离心管, 12 000 r/min, 4 °C 条件下离心浓缩, 每 20 min 停下观察浓缩状况, 紫外分光光度计 280 nm 测得蛋白浓度为 20 mg/mL 时, 分装 10 μ L 至 PCR 管, -80 °C 保存。

1.8 蛋白结晶

在 24 孔晶体生长板的孔的边缘涂上高真空硅胶, 取 1.5 μ L 测定液于预先用二甲基二氯硅烷硅化好的盖玻片中间, 加等体积蛋白溶液 (此体积比将决定平衡后的蛋白质浓度), 混合均匀, 在孔内加入相应沉淀剂 500 μ L, 将盖玻片倒扣在晶体生长板上, 检查密封性, 将点好蛋白的晶体生长板置于 16 °C 培养箱中培养, 定期进行显微镜观察。

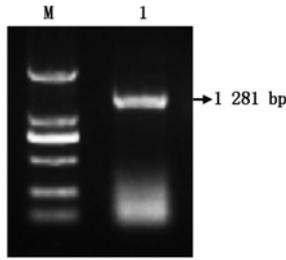
2 结果与分析

2.1 PCR 结果与 *nucCbbX* 基因 ORF 全长序列

以海带配子体 cDNA 为模板, 利用 Nuc1、Nuc2 引物进行 PCR 扩增, 反应产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后所获条带单一且符合目的大小 (图 1), 说明具有较好的特异性。PCR 产物经克隆、测序和拼接, 获得海带配子体 *nucCbbX* 基因 ORF 全长序列, 且其 5' 和 3' 端分别有 *Nde* I 和 *Xho* I 的酶切位点。

2.2 海带 *nucCbbX* 蛋白序列分析

图 2 为海带 *nucCbbX*、ptCbbX 和类球红细菌 *RsCbbX* 蛋白氨基酸序列比对结果。序列相似度分析表明, *nucCbbX* 与 ptCbbX 和 *RsCbbX* 的相似度均较低, 分别为 37.4% 和 36.8%, 而 ptCbbX 与 *RsCbbX* 相似度较高为 57.6%。信号肽预测软件 SingalP3.0



1. Nuc1、Nuc2 引物获得的 PCR 产物电泳;
M. DL2000 的 DNA 分子量标准。

1. The RT-PCR products with Nuc1、Nuc2 as primers;
M. DL2000 molecular weight Marker.

图 1 RT-PCR 扩增产物的电泳图谱

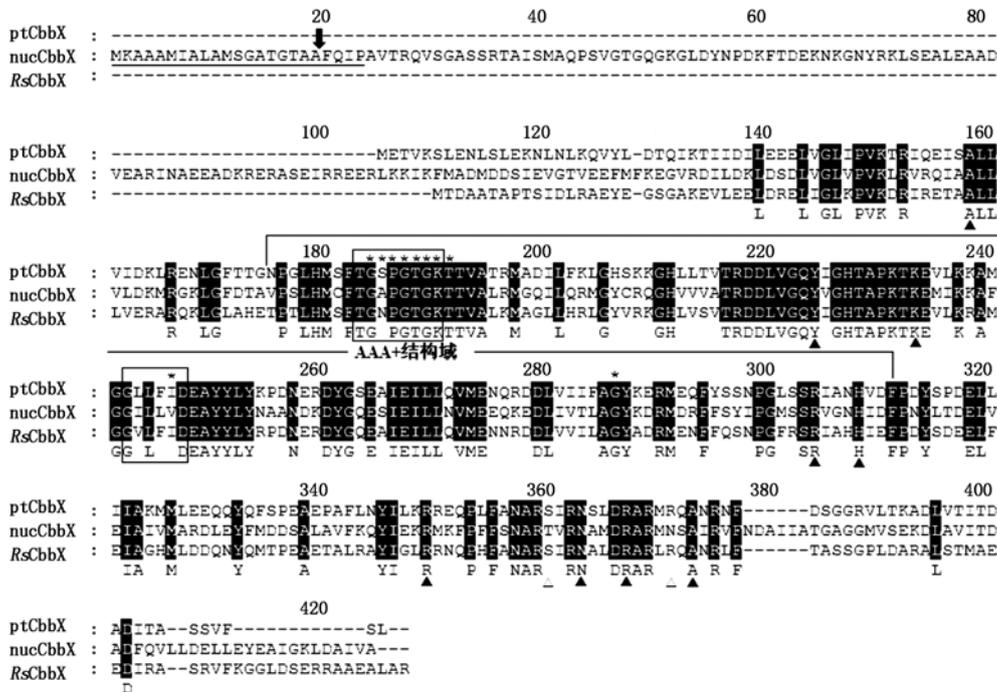
Fig.1 RT-PCR products stained with ethidium bromide and run on 1% agarose gels

分析结果显示, *nucCbbX* 含有 19 个氨基酸长度的质体信号肽和 4 个氨基酸长度的叶绿体转运肽。结构域预测结果和保守性氨基酸分析结果显示其成熟蛋白具有 AAA+ 结构域(176 Asn ~ 312 Phe), 属于 AAA+ 蛋白家族, 具备 Walker-A (183 Thr ~ 190 Lys)、Walker-B (242 Gly ~ 247 Asp) 结构域, ATP 结合位点(184 Gly ~ 191 Thr、246 Val、286 Gly) 和酶活性相关位点(158 Ala、224 Tyr、233 Lys、304 Arg、308 His、349 Arg、363 Asn、367 Arg 和 373 Ala)。

图 3-A 是海带 *nucCbbX* 蛋白预测的三级结构图, 从中可以看出其三级结构 N 端始于 131 Gly, 止

于 404 Gln, 而 24 Phe ~ 130 Glu 和 405 Val ~ 424 Ala 由于与 *RsCbbX* 相应氨基酸无相似性(图 2), 故没有预测出相应结构(图 3-C)。与 *RsCbbX* 结构类似, 海带 *nucCbbX* 的三级结构也是由三部分构成, 分别是 N 端伸展区(131 Gly ~ 144 Val)、 α/β 子域(145 Gly ~ 316 Thr) 和 C 端的 α 螺旋子域(317 Asp ~ 404 Gln)。其中 N 端伸展区含有 1 个 α 螺旋; α/β 子域含有 5 个 α 螺旋和 5 个 β 折叠, Walker-A 位于 α 3 上, Walker-B 位于 β 2 上; α 螺旋子域含有 5 个 α 螺旋。

图 3-B 和图 3-D 分别为海带 *nucCbbX* 和 *RsCbbX* 上的功能相关(ATPase、结合 RuBP、保持 CbbX 六聚体的结构稳定)氨基酸分子的空间分布, 基于图 2 保守氨基酸分析结果, *RsCbbX* 上的与 CbbX 六聚体的结构稳定相关的 48 Ala 和 263 Ala, 与 ATPase 活性相关的 114 Tyr 和 123 Lys, 与 RuBP 结合有关的 194 Arg 和 198 His 高度保守, 分别对应于海带 *nucCbbX* 的 158 Ala 和 373 Ala, 224 Tyr 和 233 Lys, 304 Arg 和 308 His; 而 *RsCbbX* 另外一组结合硫酸根离子的氨基酸 239 Arg、250 Ser、253 Asn、257 Arg、261 Arg 中有 3 个位点 239 Arg、253 Asn 和 257 Arg 保守, 分别对应于海带 *nucCbbX* 的 349 Arg、363 Asn 和 367 Arg, 而另外 2 个位点 250 Ser 和 261 Arg 在海带 *nucCbbX* 中发生变异。



下划线. 质体信号肽和叶绿体转运肽; 箭头. 质体信号肽酶切位点;

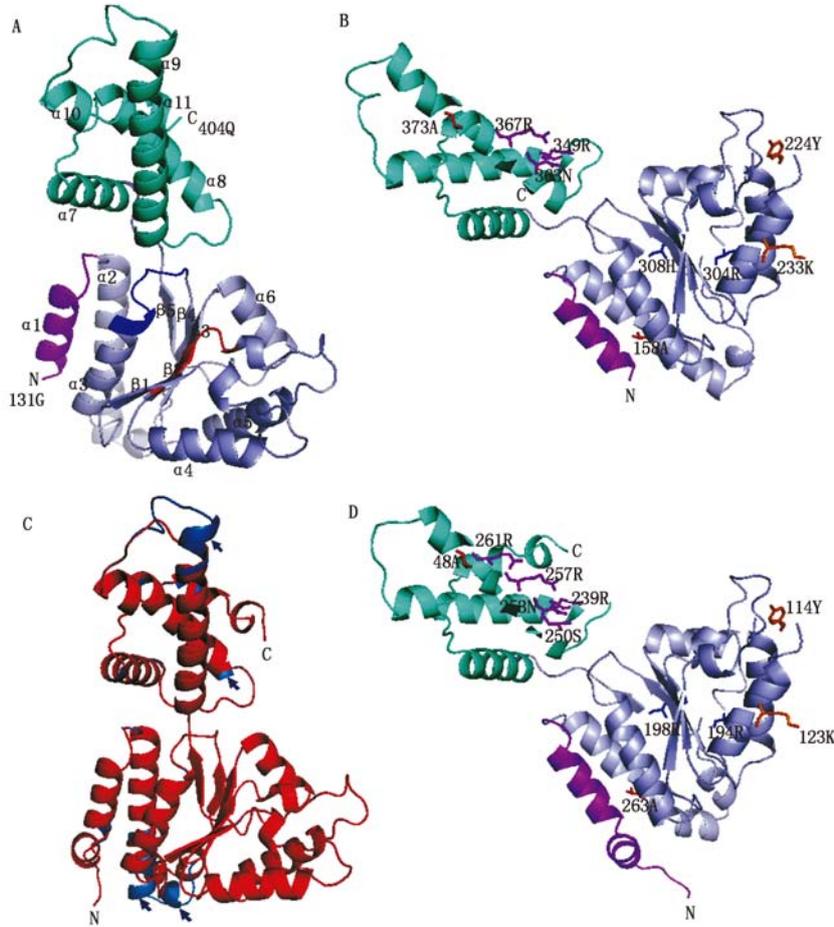
方框. Walker-A 和 Walker-B; *. ATP 结合位点; ▲. 保守的功能相关位点; △. 不保守功能位点。

Line. The putative signal peptide targeting the plastid and chloroplast transit peptides; Arrow. Enzyme digestion site;

Boxes. The Walker-A and-B ATP-binding motifs; *. ATP-binding site; ▲. The conserved residue required for normal activase function; △. Sulphate binding residue mutant.

图 2 海带核 *nucCbbX* 蛋白序列分析

Fig.2 Sequence analysis of CbbX protein encoded by nuclear genome of *S. japonica*



A. 海带 *nucCbbX* 蛋白三级结构组成;N 端伸展区. $\alpha 1$; α/β 子域. $\alpha 2 \sim \alpha 6$ 和 $\beta 1 \sim \beta 5$; α 螺旋子域. $\alpha 7 \sim \alpha 11$; α/β 子域深色区域依次为 Walker-A 和 Walker-B; B. 海带 *nucCbbX* 功能相关位点及硫酸根离子结合位点的空间分布, 各氨基酸分子用棍棒结构显示; C. 海带 *nucCbbX* 预测的三级结构与 *RsCbbX* 蛋白单体结构的空重叠, 箭头为未重叠的主要区域; D. *RsCbbX* 功能相关位点及硫酸根离子结合位点的空间分布, 各氨基酸分子用棍棒结构显示。

A. The predicted 3D structure of *S. japonica nucCbbX*; N-terminal extension. $\alpha 1$; The α/β subdomain; $\alpha 2 \sim \alpha 6$ and $\beta 1 \sim \beta 5$; The α -helical subdomain. $\alpha 7 \sim \alpha 11$; The Walker-A and -B motifs are shown in dark; B. The spatial distribution of the conserved residues required for normal activase function as well as residues binding sulphate in *nucCbbX* of *S. japonica*, they are shown in ball-and-stick form; C. Comparison of 3D structures of *S. japonica nucCbbX* and *RsCbbX* monomer, arrows indicate structures not overlapped; D. The spatial distribution of the residues required for normal activase function as well as residues binding sulphate in *RsCbbX*.

图 3 海带核 *nucCbbX* 蛋白与 *RsCbbX* 蛋白单体空间结构比较

Fig. 3 Comparison of the predicted 3D structure of *S. japonica nucCbbX* and *RsCbbX* monomer structure

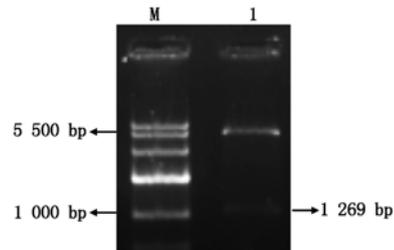
2.3 原核表达质粒的构建及重组质粒的鉴定

将原核表达质粒 pET28a 和重组质粒 pMD-*cbbX* 分别用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切, 胶回收连接, 构建成重组质粒 pET28a-*cbbX*。pET28a-*cbbX* 转染 DH5 α , 蓝白斑筛选阳性克隆, 利用质粒提取试剂盒 (艾德莱公司) 提取质粒。双酶切分析表明, 重组原核表达质粒中可切出大小约为 1 269 bp 的插入片段 (图 4); 进一步测序表明, 重组原核表达质粒中 *cbbX* 基因的序列未突变且读码框正确没有移码, 表明成功构建成海带配子体 *nucCbbX* 的原核表达质粒。

2.4 重组蛋白的原核表达和纯化

将 pET28a-*cbbX* 转化 *E. coli* BL21 感受态细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 经 IPTG 诱导 0.5, 1, 1.5, 2 h, 离心收集菌体做 SDS-PAGE 分析, 电泳结果 (图 5-A) 显示, 随着诱导

时间延长, 重组蛋白的表达量逐渐增加。由于上游部分载体参与表达和下游引入了聚组氨酸标签, 重组蛋白由 452 个氨基酸组成, 分子量约 50.2 kDa, 大于 *nucCbbX* 成熟蛋白分子量 (44.7 kDa), 它与设计



M. Marker IV 分子量标准; 1. 双酶切的 pET28a-*cbbX* 重组表达载体。
M. Marker IV; 1. Digested recombinant protein expression vector.

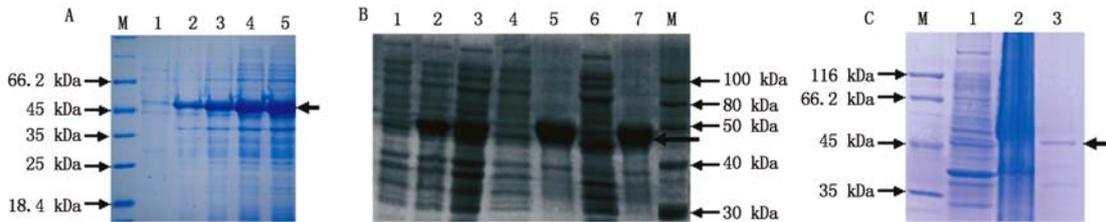
图 4 重组表达载体 pET28a-*cbbX* 双酶切电泳鉴定结果
Fig. 4 Electrophoresis pattern of restriction enzyme-digested recombinant protein pET28a-*cbbX* expression vector

的重组蛋白分子量大小一致,而未诱导的菌株则没有重组蛋白表达。

收集 37, 14 °C IPTG 诱导表达后的重组菌,经反复冻融破碎,4 °C、20 000 r/min 离心,分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳,发现 37, 14 °C 条件下诱导的重组蛋白均主要以包涵体的形式存

在;上清中有少量可溶性目的蛋白,但不足以分离纯化。另外,37 °C 条件下重组蛋白表达量稍高于 14 °C (图 5-B)。

Ni Sepharose 6 Fast Flow 纯化回收液的 SDS-PAGE 电泳结果发现,在 50.2 kDa 处有一条明显条带(图 5-C),估测目的蛋白的纯度为 95% 左右。



M. 蛋白质分子量标准; A. 重组蛋白不同诱导时间的表达图谱; 1. 阴性对照; 2~5. 诱导表达 0.5, 1, 1.5, 2 h; B. SDS-PAGE 分析重组蛋白的溶解性; 1. 阴性对照; 2, 4, 5. 37 °C 诱导表达的重组菌总蛋白、超声破碎离心后的上清和沉淀; 3, 6, 7. 14 °C 诱导表达的重组菌总蛋白、超声破碎离心后的上清和沉淀; C. SDS-PAGE 分析分离蛋白的纯度; 1. 阴性对照; 2. 表达菌超声裂解液; 3. 纯化的目的蛋白。

M. Protein molecular weight Marker; A. Expression profile of recombinant nucCbbX in *E. coli* with different time; 1. Control; 2~5. Expression of recombinant bacteria at 0.5, 1, 1.5, 2 h post induction respectively; B. SDS-PAGE analysis of the solubility of the recombinant nucCbbX in *E. coli*; 1. Control; 2, 4, 5. Total protein, supernatant and precipitation of supersonic lysates of recombinant bacteria induced at 37 °C; 3, 6, 7. Total protein, supernatant and precipitation of supersonic lysates of recombinant bacteria induced at 14 °C; C. SDS-PAGE analysis of the purified recombinant CbbX; 1. Control; 2. Total protein; 3. The purified recombinant CbbX.

图 5 重组蛋白 SDS-PAGE 图谱

Fig. 5 SDS-PAGE of recombinant nucCbbX proteins

2.5 蛋白质结晶

使用 Crystal Screen 试剂盒和 Crystal Screen 2 试剂盒的 96 组试剂对结晶条件进行筛选,结果发现在 0.01 mol/L 氯化钙、0.1 mol/L 醋酸钠 pH 值 4.6、30% MPD 或 30% PEG400 条件下,能够初步得到海带 nucCbbX 蛋白的晶体(图 6),而在其他条件下则出现无反应、相分离或蛋白沉淀的现象,说明以复性法得到的蛋白溶液可以用于蛋白质的结晶。该晶体虽然形成了晶核,但晶体的排列并不整齐,在通过打碎晶体稀释成晶核,降低成晶条件接入晶核的试验后,目前尚无法获得高质量的晶体,后续试验将通过调节沉淀剂浓度、pH 值、温度等进行结晶条件优化,以期获得高质量的海带 nucCbbX 蛋白质晶体,然后通过 X-射线衍射技术确定其蛋白质分子三维结构。



图 6 初筛到的海带 nucCbbX 蛋白晶体

Fig. 6 Crystal of *S. japonica* nucleus-encoded CbbX

3 讨论

红藻和杂色藻类中, *cbbX* 基因与同位于质体基因组的 *rbcL* 和 *rbcS* 基因形成 *rbcL-rbcS-cbbX* 基因簇^[17]。在单细胞红藻 *Cyanidioschyzon merolae* 中,除质体基因组 *cbbX* 外,还有一个 *cbbX* 基因位于核基因组中,它编码的 CbbX 蛋白含有质体信号肽,说明其编码的 CbbX 蛋白最终也定位于叶绿体中,但是这 2 个基因编码的 CbbX 相似度不高,为 50.9%^[17]。与 *C. merolae* 相同,隐藻 *Guillardia theta* 中,也具有 2 个 *cbbX* 基因,分别位于质体基因组和核基因组中,编码的蛋白具有 56% 同源性^[18]。海带同样具有 2 个 *cbbX* 基因,但是二者编码的蛋白差别较大,相差 124 个氨基酸,编码蛋白分子量分别是 44.7, 34.3 kDa,成熟蛋白序列相似度仅为 37%^[19]。与 nucCbbX 相比, *RsCbbX* 的所有功能相关位点在 ptCbbX 中均保守,另外,二者相似度也较 nucCbbX 高,这可能与杂色藻类的形成有关。藻类的演化经历了真核细胞的一次吞噬(红藻和绿藻)和二次吞噬(杂色藻类)^[20]。约 15 亿年前一个真核细胞吞噬一个蓝细菌,逐渐演化出红藻和绿藻,蓝细菌的一部分基因直接或复制后通过基因的水平转移与宿主细胞的细胞核融合^[20],形成红藻或绿藻的细胞核,而蓝细菌本身转化为红藻或绿藻的质体;在约 12 亿年前红藻被原生动物吞噬^[21-23],红藻的细胞核及质体基因组部分基因同样直接或复制后再次通过基因的

水平转移与宿主细胞的细胞核融合,形成杂色藻类的细胞核^[24-25],而红藻的质体转变为杂色藻类的质体,因此,二次吞噬和基因的水平转移扩充了杂色藻类细胞核基因组^[26-28],同时造成包括 *cbbX* 基因在内的一些基因的变异,因此,海带 *nucCbbX* 蛋白与类球红细菌的 *RsCbbX* 蛋白氨基酸序列相似度较低,而质体未经融合,只是保留了蓝细菌的叶绿体基因组,因此,与同属原核生物的 *RsCbbX* 氨基酸序列相似度相对较高。另外,值得注意的是海带 *nucCbbX* 结合硫酸根离子的 2 个氨基酸发生变异,那么,造成这些变异的因素以及这些关键位点的变异是否对其功能造成影响, *ptcbbX* 基因是否表达和参与 Rubisco 的激活,相信这些谜题将随着对海带 *CbbX* 蛋白的蛋白结晶、基因沉默、蛋白亚细胞定位及基因组信息的分析得到科学的解答。

为最终获得海带 *nucCbbX* 的晶体结构,本研究通过原核表达、变性后纯化及复性,获得了可用于蛋白结晶的可溶性蛋白,并对结晶条件进行了初步的探索。海带 *nucCbbX* 重组蛋白含有 452 个氨基酸,重组蛋白主要以包涵体形式存在,主要是因为重组蛋白在受体细胞内合成后,由于外源基因表达速度过快往往导致长度大于 100 个氨基酸残基的蛋白的肽链折叠过程中发生错误聚合而形成不可溶的包涵体。包涵体是一种非天然状态的不可溶蛋白^[29],表达稳定,不会被细胞内的融解蛋白酶所融解,容易分离纯化,且由于是非活性蛋白,包涵体的存在不会影响宿主细胞的生理活动,因此可以大量生产,可用于多克隆抗体的制备,以研究基因的生化功能和表达蛋白的亚细胞定位。但是,一旦形成包涵体蛋白,很难将其还原成有活性的天然蛋白,不能进行晶体结构的研究。为获得大量可溶性重组蛋白和降低包涵体在重组蛋白中的含量,通常采用以下方法,加入尿素等强变性剂将其融解,通过透析复性法获得有活性的可溶性重组蛋白,但是要确保融解蛋白复性的每一步都正确折叠;在克隆外源基因的同时将分子伴侣或折叠酶基因克隆到载体上,使它们在宿主细胞内共表达,这样可以降低包涵体的形成概率;另外控制诱导表达的条件,如降低培养温度、减少 IPTG 的用量等也对减少包涵体的形成有一定的效果,但至今对于蛋白包涵体的形成,还没有一种通用有效的方法来避免或改善^[29]。本研究尝试分别在 14, 37 °C 对重组菌株进行诱导,但均无法得到可溶性蛋白,通过变性纯化和透析复性法获得大量可溶性 *nucCbbX* 重组蛋白,并经验证可用于 *nucCbbX* 蛋白结晶,虽然目前未获得高质量晶体,但为进一步优化

结晶条件,最终获得高质量 *nucCbbX* 蛋白晶体积累了试验经验。

参考文献:

- [1] Fishery and Aquaculture Statistics. Aquaculture Production [M]//2009 FAO Yearbook. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2011: 221.
- [2] Ross A B, Jones J M, Kubacki M L, *et al.* Classification of macroalgae as fuel and its thermochemical behaviour [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(14): 6494 - 6504.
- [3] Gao K S, Mckinley K R. Use of macroalgae for Marine biomass production and CO₂ remediation: a review [J]. *Journal of Applied Phycology*, 1994, 6(1): 45 - 60.
- [4] Tabita F R, Satagopan S, Hanson T E, *et al.* Distinct form I, II, III and IV Rubisco proteins from the three kingdoms of life provide clues about Rubisco evolution and structure/function relationships [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(7): 1515 - 1524.
- [5] Badger M R, Bek E J. Multiple rubisco forms in proteobacteria: their functional significance in relation to CO₂ acquisition by the CBB cycle [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(7): 1525 - 1541.
- [6] Portis A R Jr. Rubisco activase-Rubisco's catalytic chaperone [J]. *Photosynthesis Research*, 2003, 75: 11 - 27.
- [7] Mueller-Cajar O, Stotz M, Wendler P, *et al.* Structure and function of the AAA + protein CbbX, a red-type Rubisco activase [J]. *Nature*, 2011, 479(7372): 194 - 199.
- [8] 石微微, 王丽丽, 陈晶, 等. 海带 *cbbX* 基因序列特征及在雌、雄配子体之间的差异表达 [J]. *水产学报*, 2010, 34(1): 80 - 88.
- [9] 周志刚, 吴超元. 海带无性繁殖系的形成及孢子体诱导 [J]. *生物工程学报*, 1998, 14(1): 111 - 113.
- [10] Higgins D G, Sharp P M. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignments on a microcomputer [J]. *Gene*, 1988, 73(1): 237 - 244.
- [11] Chenna R, Sugawara H, Koike T, *et al.* Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs [J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(13): 3497 - 3500.
- [12] Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, 41: 95 - 98.
- [13] Nicholas K, Nicholas H B. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments, 1997, Available; <http://www.nrbsc.org/downloads/>.
- [14] Dyrskov Bendtsen J, Nielsen H, Von Heijne G, *et al.* Improved prediction of signal peptides; SignalP 3.0 [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 340(4): 783 - 795.

- [15] Kelley L A, Maccallum R M, Sternberg M J. Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 299(2): 499 – 520.
- [16] Schrodinger L LC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1. 3, 2010, Available: <http://www.pymol.org>.
- [17] Fujita K, Ehira S, Tanaka K, *et al.* Molecular phylogeny and evolution of the plastid and nuclear encoded *cbbX* genes in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon mero-lae* [J]. *Genes & Genetic Systems*, 2008, 83(2): 127 – 133.
- [18] Dubbs J M, Bird T H, Bauer C E, *et al.* Interaction of CbbR and RegA* transcription regulators with the *Rhodobacter sphaeroides* *cbbI* Promoter-operator region [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(25): 19224 – 19230.
- [19] 谢玮怡. 海带配子体核编码 *CbbX* 基因的功能分析 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
- [20] Matsuda Y, Kroth P G. Carbon fixation in diatoms Hohmann-Marriott M F (ed.) [M]//The structural basis of biological energy generation. Dordrecht: Springer, 2014: 335 – 362.
- [21] Delwiche C F, Palmer J D. The origin of plastids and their spread via secondary symbiosis [M]. Springer Vienna, 1997: 53 – 86.
- [22] Cavalier-Smith T. Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis; Euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree [J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 1999, 46(4): 347 – 366.
- [23] Yoon H S, Hackett J D, Pinto G, *et al.* The single, ancient origin of chromist plastids [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(24): 15507 – 15512.
- [24] Kilian O, Kroth P G. Presequence acquisition during secondary endocytobiosis and the possible role of introns [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2004, 58(6): 712 – 721.
- [25] Moustafa A, Reyes-Prieto A, Bhattacharya D. Chlamydiae has contributed at least 55 genes to Plantae with predominantly plastid functions [J]. *PLoS One*, 2008, 3(5): e2205.
- [26] Allen A E, Dupont C L, Oborník M, *et al.* Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms [J]. *Nature*, 2011, 473(7346): 203 – 207.
- [27] Moustafa A, Beszteri B, Maier U G, *et al.* Genomic footprints of a cryptic plastid endosymbiosis in diatoms [J]. *Science*, 2009, 324(5935): 1724 – 1726.
- [28] Qiu H, Yoon H S, Bhattacharya D. Algal endosymbionts as vectors of horizontal gene transfer in photosynthetic eukaryotes [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4: 366.
- [29] 彭银祥, 李 勃, 陈红星, 等. 基因工程 [M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2007: 172 – 186.