

• 基础实验研究论著 •

人胱硫醚 β 合酶 I278T 突变体的表达、纯化及鉴定*

牛卫宁, 许 乐, 羊梦林, 曹珊珊

(西北工业大学生命学院, 陕西西安 710072)

摘要:目的 探讨在大肠埃希菌中重组表达和纯化人胱硫醚 β 合酶 CBS(I278T) 突变体。方法 采用重叠延伸聚合酶链反应(PCR)定点突变技术构建突变质粒 pGEX4T-1-CBS(I278T), 在含有 3% 乙醇的培养基中诱导表达, 亲和层析纯化得到突变 CBS(I278T) 蛋白, 测定纯化蛋白的活性、紫外可见吸收光谱、蛋白粒径及 Zeta 电位。结果 成功构建了质粒 pGEX4T-1-CBS(I278T)。CBS(I278T) 蛋白产率、比活性及酶活性回收率分别为 2.3 mg/L、21.4 U/mg、22.6%。终浓度为 1 mmol/L 的 S-腺苷甲硫氨酸(AdoMet)对突变 CBS(I278T) 蛋白没有激活作用。紫外可见吸收光谱分析显示纯化的突变 CBS(I278T) 存在 429 nm 和 550 nm 的血红素结合蛋白特征吸收峰。蛋白平均粒径为 7.5~10.1 nm, 主要以四聚体形式存在, Zeta 电位为 -16.3 mV。结论 成功建立了在大肠埃希菌中表达、纯化及鉴定突变 CBS(I278T) 的方法。

关键词: 胱硫醚 β 合酶; 突变; 粒径; Zeta 电位

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.09.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)09-1089-03

Expression, purification and identification of I278T-mutant human cystathionine β synthase*

Niu Weining, Xu Le, Yang Menglin, Cao Shanshan

(School of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an, Shanxi 710072, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and purification I278T-mutant human cystathionine β synthase(CBS) in *E. coli*. Methods Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction(PCR) was employed to construct mutant plasmids pGEX4T-1-CBS(I278T), which was induced and expressed in a medium containing 3% ethanol, purified by affinity chromatography to obtain mutated CBS(I278T) protein. The activity, UV-visible absorption spectroscopy, protein particle size and Zeta potential of the purified protein were measured. Results Plasmid pGEX4T-1-CBS(I278T) was successfully constructed. The yield, the specific activity and activity recovery of purified mutant CBS(I278T) protein were 2.3 mg/L, 21.4 U/mg and 22.6%. S-adenosylmethionine(AdoMet) with final concentration of 1 mmol/L showed no activation toward mutant CBS(I278T) protein. According to UV-visible absorption spectroscopy analysis, purified mutant CBS(I278T) had characteristic absorption peaks at 429 nm and 550 nm for heme-binding proteins. Protein average particle size was 7.5-10.1 nm, mainly in the form of tetramers, and Zeta potential was -16.3 mV. Conclusion The methods of expression, purification and identification of I278T-mutant human cystathionine β synthase in *E. coli* were successfully established.

Key words: cystathionine beta-synthase; mutation; particle size; Zeta potential

人胱硫醚 β 合成酶(cystathionine beta-synthase, CBS)是体内同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)代谢的关键酶,催化体内 Hcy 与丝氨酸生成胱硫醚后进一步分解为半胱氨酸,而半胱氨酸是体内合成重要还原性物质谷胱甘肽的前体^[1]。同时在体内 CBS 也能催化 Hcy 和半胱氨酸合成信号分子 H_2S ^[2]。CBS 突变导致人体内 Hcy 浓度异常升高而形成高同型半胱氨酸血症,继而引发心血管疾病、神经管畸形、老年痴呆症等多种疾病,现已在患者 CBS 基因中发现 140 多处突变,超过 85% 为错义突变。临床病例中最常见的突变为 c.833T>C(I278T),约占总突变数量的四分之一^[3],迄今为止,还没有治疗 CBS 突变引起的高同型半胱氨酸血症的有效药物。因此,突变 CBS(I278T) 蛋白的表达纯化、活性测定以及性质研究对高同型半胱氨酸血症的病因及其诊断具有重要的意义,同时也为 CBS(I278T) 突变体激活剂的体外筛选提供了蛋白来源。CBS 是目前发现的惟一的磷酸吡哆醛依赖的血红素结合蛋白,其单亚基的相对分子质量为 63 000,该酶由 3 个部分组成:氨基端的血

红素结合域(1~70 aa)、催化域(71~413 aa)以及羧基端的调控域(414~551 aa)。S-腺苷甲硫氨酸(adenosylmethionine, AdoMet)结合到 CBS,可使酶活性提高 2~5 倍^[4]。由于 CBS 羧基端调控域的疏水性氨基酸含量较高,所以在大肠埃希菌(*E. coli*)中表达 CBS 易形成没有活性的包涵体,而在酿酒酵母中表达的 CBS(I278T) 蛋白,也检测不到活性^[5]。将 CBS 和谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)进行融合表达是得到可溶性 CBS 的策略之一^[6]。由于患者体内 CBS(I278T) 突变体表达量和酶活性均很低,且稳定性差,因此,提高表达量和抑制纯化过程中蛋白聚集沉淀是获得 CBS(I278T) 的关键。本研究通过定点突变得到了 CBS(833T>C) 突变基因,在 *E. coli* 中表达和纯化了 CBS(I278T),解决了 CBS(I278T) 可溶性蛋白表达量低以及在纯化过程中易聚集沉淀的问题,测定了纯化蛋白的活性和紫外可见吸收光谱,并通过动态光散射研究了纯化蛋白的粒径和 Zeta 电位,为进一步研究 CBS(I278T) 的结构功能以及激活剂的筛选奠定了基础。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(20802057);西北工业大学基础研究基金资助项目(JC201161);西北工业大学研究生创业种子基金资助项目(Z2013186)资助。 作者简介:牛卫宁,男,博士,副教授,主要从事细胞硫代谢相关疾病的研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和材料 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* Rosetta(DE3) 均为本院生物化学研究室保存, 人野生型 CBS 表达载体 pGEX4T-1-CBS 为本院生物化学研究室构建^[7]。质粒 DNA 抽提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒购自美国 OMEGA 公司; T_4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶和各种限制性内切酶、蛋白 Marker 购自日本 TaKaRa 公司。D, L-同型半胱氨酸、AdoMet、5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid, 5-ALA)、吡哆醇和磷酸吡哆醛(pyridoxal phosphate, PLP) 购于美国 Sigma 公司, GSTrapTM Fast Flow(5 mL) 预装柱和凝血酶购于美国 GE 公司, 异丙基-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)、牛血清清蛋白(bovine serum albumin, BSA)、L-丝氨酸和 2, 4-二硝基苯肼(2, 4-dinitrophenylhydrazine, DNPH) 购自上海生工生物工程技术有限公司, 其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 重叠延伸聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)法构建 CBS(I278T)突变体 设计扩增人野生型全长 CBS 基因的上、下游引物, A_1 : 5'-CTC GGA ATT CCC TTC TGA GAC CCC CCA GG-3' 和 A_2 : 5'-CAG TGC GGC CGC TTA CTT CTG GTC CCG C-3'。下划线分别为 *EcoR* I 和 *Not* I 的酶切位点。另外, 在 CBS(c. 833T>C) 突变位点位置设计引物, B_1 : 5'-CCT TCG GGA TCC ACC CCA GTG ATC CTG CAT CCA GGA-3' 和 B_2 : 5'-TCC TGG ATG CAG GAT CAC TGG GGT GGA TCC CGA AGG-3'。下划线为突变位点。以表达人野生型 CBS 的质粒 pGEX4T-1-CBS 为模板, 以引物 A_1 和 B_1 为上、下游引物进行 PCR 扩增, 获得突变位点及其上游的 CBS 片段 Fa, 再以引物 B_2 和 A_2 为上、下游引物进行 PCR 扩增得到突变位点及其下游 CBS 片段 Fb。再以 A_1 和 A_2 为上下游引物进行 PCR 扩增, 将 Fa 和 Fb 片段拼接成全含 CBS(I278T) 突变位点的产物 Fab。PCR 反应体系为 10 \times buffer 5 μ L, dNTP 8 μ L, 模板 Fa 和 Fb 各 2 μ L, 上、下游引物 A_1 和 A_2 各 0.5 μ L, *Taq* 酶 0.5 μ L, 加三蒸水至 50 μ L。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 120 s, 再次循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.3 CBS(I278T)突变体的表达 用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切质粒 pGEX-4T-1 和 CBS(I278T) 基因产物, 连接酶切后片段构建重组质粒 pGEX4T-1-CBS(I278T), 重组质粒通过测序鉴定后转化到 *E. coli* Rosetta (DE3) 感受态细胞中, 获得重组菌 *E. coli* Rosetta pGEX4T-1-CBS(I278T)。将培养过夜的重组菌按 1:100 比例接种到 6 L 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素及 3% 乙醇的 LB 培养基中, 30 $^{\circ}$ C、振荡培养(转速为 220 r/min) 至菌液在波长 600 nm 处的光密度(optical density, OD) 值为 0.6, 然后加入 5-ALA(终浓度 0.3 mmol/L)^[8]、吡哆醇(终浓度 0.1 mmol/L) 及 IPTG(终浓度 0.05 mmol/L), 于 30 $^{\circ}$ C 诱导 16 h, 再于 4 $^{\circ}$ C 6 000 r/min 离心 10 min, 获得的菌体经悬浮洗涤后, 离心收获备用。

1.4 重组蛋白 CBS(I278T)的纯化 将上述收获的菌体重悬于 250 mL 破碎缓冲液中, 在冰水浴中超声破碎细胞, 破碎液经 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 30 min, 上清液即为粗酶液。将粗酶液加入经平衡缓冲液预平衡的 GSTrapTM Fast Flow(5 mL) 柱, 以 1 mL/min 的流速洗脱至基线, 然后用凝血酶切缓冲液, 再平衡至基线。在层析柱中加入 5 mL 凝血酶(含 10 U/

mg 融合蛋白), 在 4 $^{\circ}$ C 下保存 12~16 h, 收集酶切后蛋白溶液, 经超滤脱盐后于一 80 $^{\circ}$ C 保存。

1.5 酶活性测定 酶活性测定参照文献^[7], 稍做修改。在 1 mL 反应体系中加入适量酶液和 100 μ g 绝对过量的胱硫醚- β -裂解酶(cystathionine β -lyase, CBL), 在 37 $^{\circ}$ C 下温浴 60 min, 沸水浴 5 min 使酶失活。然后在反应液中加入 1 mL 1 mmol/L 2, 4-二硝基苯肼(溶于 1 mol/L 盐酸), 37 $^{\circ}$ C 保温 20 min, 最后加入 5 mL 0.4 mol/L NaOH, 在室温下静置 30 min, 检测其 OD₅₂₀ 值, 以不加 CBL 的反应液作为对照, 以不同浓度的丙酮酸钠标准溶液和 2, 4-二硝基苯肼反应制作丙酮酸钠浓度和 OD 值的标准曲线, 通过标准曲线计算丙酮酸的生成量, 从而测定 CBS 活性。当测定酶激活剂 AdoMet 对 CBS 活性影响时, AdoMet 终浓度为 1 mmol/L。

1.6 突变 CBS(I278T)的紫外可见吸收光谱分析 取纯化的 0.5 mg/mL CBS(I278T) 蛋白在紫外可见分光光度计上进行测定, 设定以不含 CBS 蛋白的缓冲溶液为基线。

1.7 突变 CBS(I278T)的粒径和 Zeta 电位测定 取纯化的 0.5 mg/mL 突变 CBS(I278T) 蛋白溶液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 在激光粒度分析仪和 ZEN3500 Zeta 电位仪(英国马尔文仪器有限公司) 上进行粒径和 Zeta 电位测定。

2 结果

2.1 表达载体 pGEX4T-1-CBS(I278T)的构建和鉴定 以表达人野生型 CBS 的质粒 pGEX4T-1-CBS 为模板, PCR 扩增得到突变 CBS(I278T) 片段 Fa 和 Fb, 电泳显示均为大小约 800 bp 的 DNA 片段, 然后以 Fa 和 Fb 为混合模板, PCR 扩增出大小约 1 600 bp 的突变 CBS(I278T) 全长片段。PCR 产物经回收纯化后, 克隆至 pGEX4T-1 载体上, 构建的突变 CBS 质粒命名为 pGEX4T-1-CBS(I278T)。将质粒进行测序, 结果表明编码野生型 CBS 第 278 位氨基酸残基的核苷酸序列 ATT 已突变为 ACT, 成功构建了质粒 pGEX4T-1-CBS(I278T)。

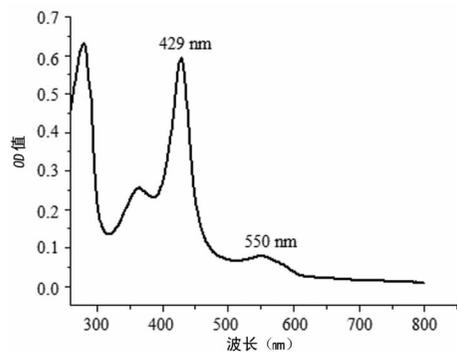


图 1 突变 CBS(I278T) 的紫外可见吸收光谱

2.2 突变 CBS(I278T)的表达、纯化和活性测定 本研究构建了表达突变 CBS(I278T) 的重组菌 *E. coli* Rosetta pGEX4T-1-CBS(I278T), 重组菌诱导至稳定期。通过一步亲和层析得到 CBS(I278T) 蛋白, 蛋白产率为 2.3 mg/L。活性测定结果表明, 纯化的突变 CBS(I278T) 比活性为 21.4 U/mg, 酶活性回收率为 22.6%。终浓度为 1 mmol/L 的 AdoMet 对突变 CBS(I278T) 蛋白没有激活作用。而野生型 CBS 的比活性为 143 U/mg, 1 mmol/L 的 AdoMet 能使其显著提高, 达到 735 U/mg^[7]。与野生型 CBS 比较, 突变 CBS(I278T) 的酶活性大幅度下降, 仅为野生型 CBS 的 15%。

2.3 突变 CBS(I278T)的紫外可见吸收光谱分析 纯化的突

变 CBS(I278T) 的紫外可见吸收光谱见图 1, 存在 429 nm 和 550 nm 的血红素结合蛋白特征吸收峰。

2.4 突变 CBS(I278T) 的粒径和 Zeta 电位 蛋白平均粒径主要集中在 7.5~10.1 nm(图 2), 占蛋白质分子总数的 86%; Zeta 电位为 -16.3 mV。

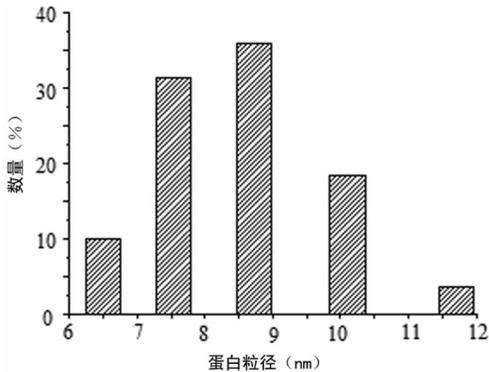


图 2 CBS(I278T) 在溶液中 (pH 8.0) 的粒径分布

3 讨论

本研究的前期实验发现在 *E. coli* 中表达突变 CBS(I278T) 蛋白容易形成错误折叠和聚集沉淀, 即使通过降低诱导温度 (16 °C) 以及诱导剂 IPTG 浓度 (0.05 mmol/L), 可溶性 CBS(I278T) 的表达量也很低 (<0.2 mg/L 培养基), 因此, 很难纯化得到毫克级的突变 CBS(I278T) 蛋白。Singh 等^[9] 在酿酒酵母中表达突变 CBS 时发现, 在培养基中加入一些化学分子伴侣 (如甘油、乙醇、二甲基亚砷、山梨醇等小分子) 能促进突变 CBS 的正确折叠, 从而增加突变 CBS 的可溶性表达和活性。本研究在 *E. coli* 表达 CBS(I278T) 的培养基中加入 3% 乙醇, 从而增加了可溶性蛋白的表达量, 通过一步亲和层析和柱上酶切得到 CBS(I278T), 最终蛋白产率达到 2.3 mg/L 培养基。

因为 CBS 为血红素结合蛋白, 血红素对蛋白质的功能和活性具有重要的作用, 因此在培养基中加入 0.3 mmol/L 的血红素合成前体 5-ALA 用于合成足量的血红素。由于 CBS 羧基端调控域的疏水性氨基酸残基含量较高, 因此在纯化过程中 CBS 蛋白很容易聚集沉淀, 导致 CBS 纯化得率较低。因此, 在本研究中使用凝血酶直接对带有 GST 标签的融合蛋白进行柱上切割, 为防止酶切后 CBS 蛋白聚集沉淀, 在凝血酶酶切缓冲液中加入 3% 的甘油。

紫外可见吸收光谱分析表明, 纯化的突变 CBS(I278T) 存在 429 nm 和 550 nm 的血红素结合蛋白特征吸收峰, 这与 CBS 野生型蛋白的光谱特征是一致的^[10]。表明 CBS(I278T) 蛋白突变后并不影响辅酶血红素的结合, 但 CBS(I278T) 的活性大幅度降低, 仅为野生型 CBS 的 15%, 影响了 CBS 在体内功能的正常发挥。

蛋白质粒径的测定可以判断突变 CBS(I278T) 蛋白的聚集程度, Zeta 电位测定可以表明在该溶液中蛋白质是否具有聚集倾向及其程度。Meier 等^[11] 对野生型 CBS 晶体结构研究表明, CBS 四聚体的粒径为 7.2~9.6 nm。因此, 突变 CBS(I278T) 蛋白主要以四聚体的形式存在。CBS(I278T) 溶液的 Zeta 电位为 -16.3 mV, 表明在该溶液体系下 CBS(I278T) 蛋

白具有聚集倾向。Zeta 电位是表征胶体分散系稳定性的重要指标, 是对颗粒之间相互排斥或吸引力强度的度量^[12]。分子或分散粒子越小, Zeta 电位绝对值越高, 体系越稳定, 即溶解或分散可以抵抗聚集。反之, Zeta 电位绝对值越低, 越倾向于凝结或凝聚, 即吸引力超过了排斥力, 分散被破坏而发生凝结或凝聚。

通过本研究, 纯化得到了突变 CBS(I278T) 蛋白, 为其激活剂的筛选提供了蛋白来源。

参考文献

- [1] Yamanishi M, Kabil O, Sen S, et al. Structural insights into pathogenic mutations in heme-dependent cystathionine-β-synthase[J]. J Inorg Biochem, 2006, 100(12):1988-1995.
- [2] Singh S, Padovani D, Leslie RA, et al. Relative contributions of cystathionine beta-synthase and gamma-cystathionase to H2S biogenesis via alternative trans-sulfuration reactions [J]. J Biol Chem, 2009, 284(33):22457-22466.
- [3] Gupta S, Wang L, Anderl J, et al. Correction of cystathionine β-synthase deficiency in mice by treatment with proteasome inhibitors[J]. Hum Mutat, 2013, 34(8):1085-1093.
- [4] Miles EW, Kraus JP. Cystathionine beta-synthase: structure, function, regulation, and location of homocystinuria-causing mutations [J]. J Biol Chem, 2004, 279(29):29871-29874.
- [5] Shan X, Dunbrack RL Jr, Christopher SA, et al. Mutations in the regulatory domain of cystathionine beta synthase can functionally suppress patient-derived mutations in cis[J]. Hum Mol Genet, 2001, 10(6):635-643.
- [6] Frank N, Kent JO, Meier M, et al. Purification and characterization of the wild type and truncated human cystathionine β-synthase enzymes expressed in *E. coli*[J]. Arch Biochem Biophys, 2008, 470(1):64-72.
- [7] 牛卫宁, 羊梦林, 曹珊珊, 等. 人胱硫醚 β-合酶及其截短型片段的表达、纯化和活性测定[J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(12):15-21.
- [8] Kery V, Elleder D, Kraus JP. Delta-aminolevulinatase increases heme saturation and yield of human cystathionine beta-synthase expressed in *Escherichia coli*[J]. Arch Biochem Biophys, 1995, 316(1):24-29.
- [9] Singh LR, Kruger WD. Functional rescue of mutant human cystathionine beta-synthase by manipulation of Hsp26 and Hsp70 levels in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. J Biol Chem, 2009, 284(7):4238-4245.
- [10] Taoka S, Ohja S, Shan X, et al. Evidence for heme-mediated redox regulation of human cystathionine beta-synthase activity[J]. J Biol Chem, 1998, 273(39):25179-25184.
- [11] Meier M, Janosik M, Kery V, et al. Structure of human cystathionine beta-synthase: a unique pyridoxal 5'-phosphate-dependent heme protein[J]. EMBO J, 2001, 20(15):3910-3916.
- [12] Uskokovic V, Castiglione Z, Cubas P, et al. Zeta-potential and particle size analysis of human amelogenins[J]. J Dent Res, 2010, 89(2):149-153.