

Q β RNA 复制酶中亚基的共表达对 β 亚基溶解性的影响

王 栋

(江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

摘 要 在体外 RNA 和蛋白质合成及自复制系统的研究中, Q β RNA 复制酶作为以 RNA 为模板的 RNA 聚合酶, 是比较重要的应用酶种之一。该酶由 4 个亚基组成, 其中只有 β 亚基是由病毒基因编码, 而其他 3 个亚基都是宿主蛋白。利用普通表达载体合成 Q β 复制酶时, 得到的 β 亚基几乎都是不溶性蛋白, 从而影响了 Q β 复制酶的活性和产率。为尝试提高 β 亚基的溶解性, 构建含有 β 亚基基因的表达质粒 pBAD 33-rep, 同时利用 pET21a(+) 为表达载体表达其他 3 个亚基进行共表达研究。不同亚基组合的共表达结果通过 SDS-PAGE 分析表明, 当 β 亚基与 EF-Tu-Ts 亚基共表达时, 溶解度有一定的提高, 而且可溶性部分也具有复制酶活性。通过调节共表达诱导物浓度, 相对增强可溶性 β 亚基的表达, 可溶性 Q β 复制酶酶量得到相应的提高。

关键词 Q β 复制酶, 共表达, β 亚基, 溶解性

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2004)06-0780-05

Q β 复制酶最初是来源于 Q β 噬菌体的以 RNA 为模板的 RNA 聚合酶^[1,2], 现在常用于体外 RNA 的复制及分子进化^[3,4]、无细胞蛋白质分子的合成以及自复制系统的构建研究^[5-8]。该复制酶由 4 个亚基组成, 分别为 α , β , γ 和 δ 亚基, 其中只有 β 亚基是由病毒基因编码, 大小约为 65kD, 其他 3 个亚基都是宿主蛋白, 通常与蛋白质合成有关, 分别为核糖体蛋白 S1(α), 蛋白质合成延长因子 EF-Tu(γ) 和 EF-Ts(δ), 各亚基以等摩尔比构成完整的复制酶^[1]。

随着 Q β 复制酶研究的深入, 该酶除了在体外 RNA 和蛋白质分子的合成及构建自复制系统研究领域具有重要理论研究价值, 在 RNA 的扩增和基因检测等方面也有重要应用^[9,10], 对于纯化的 Q β 复制酶的需求正不断增加。但 Q β 复制酶的产量仍较为有限, 为此, 许多研究者利用噬菌体、表达质粒等分子生物学手段对 Q β 复制酶的制备和纯化进行了大量的研究工作^[11-14], 然而提供具有活性的纯 Q β 复制酶仍难以满足需要, 所用方法也不够简便迅速, 制备过程中还存在一些问题。利用质粒对 Q β 复制酶进行高效表达时, 表达的 β 亚基几乎都是以不溶的形式存在, 基本没有复制酶活性, 从而限制了大量的可溶性 Q β 复制酶的获得。

由于宿主细胞中核糖体蛋白 S1 与延长因子

EF-Ts 的胞内含量比较低, 而亚基 EF-Ts 和 EF-Tu 对于 Q β 复制酶的合成和功能又具有重要作用^[15,16], β 亚基单独表达时可能会引起其他亚基量的相对不足, 从而影响 Q β 复制酶全酶的合成及其活性。因此利用 β 亚基与其他亚基共表达可以了解是否宿主亚基的缺乏是引起 Q β 复制酶不溶性的主要因素, 进而了解 β 亚基与其他 3 个亚基的共表达是否有助于可溶性 Q β 复制酶的形成。Fukano 等^[16]研究发现, 在真核无细胞体系中, EF-Ts 和 EF-Tu 作为融合蛋白表达对于 Q β 复制酶的活性具有重要作用。其他利用共表达来提高 Q β 复制酶溶解性和活性的研究未见报道。为此, 本文对 Q β 复制酶 β 亚基与其他亚基的共表达进行了探索, 研究提高可溶性复制酶生产的可能性, 对于利用亚基的共表达提高多亚基酶的溶解性进行了尝试。

1 材料和方法

1.1 菌种和培养基

大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)(Novagen 公司)[F-ompT hsdSB(rB- mB-) gal den(DE3)]作为宿主细胞在 LB 培养基^[17]中培养。培养基所用抗生素浓度如下: 氨苄青霉素 50 μ g/mL, 氯霉素 20 μ g/mL。IPTG 浓度为 1 mmol/L, L-阿拉伯糖浓度为 0.2%。

作者简介: 王 栋(1971-)男, 浙江绍兴人, 江南大学生物工程学院助理研究员, 在职博士研究生, 主要从事微生物和酶工程研究工作。
Tel/Fax: 86-510-5864112; E-mail: dwang@sytu.edu.cn, dwang1234@163.com

收稿日期: 2004-04-26, 修回日期: 2004-08-22

其他实验菌株,大肠杆菌 JM109/pKK-rep 和 BL21(DE3)pET-rep 由大阪大学应用生物学系酶工程实验室提供。

1.2 主要试剂

质粒纯化试剂盒(QIAGEN tip-100 Kit)和 DNA 片段回收试剂盒 QIAquick gel extraction (250) Kit 均购自 QIAGEN 公司。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和其他修饰酶、氨苄青霉素、氯霉素、IPTG 等药品购自 TaKaRa 公司。

1.3 质粒的构建和 DNA 的制备

利用 pBAD 质粒(日本国立遗传学研究所)作为携带复制酶(rep)基因(β 亚基)的载体构建质粒。Rep 基因片段由携带 Q β 全基因组 cDNA 的质粒 SKQ β 通过 PCR 扩增得到后,先插入到质粒 pBAD24 中,构建得到 pBAD-24-rep 用于 β 亚基的表达。在进行不同亚基共表达时,由于 pBAD-24-rep 与 pET 载体含有相同的复制起点-pBR32 起点,以及相同的氨苄青霉素抗性选择标记,两种载体不适合进行共表达。因此将 pBAD-24-rep 中含有 Rep 基因和 SD 序列的约 3.1kb 片段插入到 pBAD33,该质粒具有不同的复制起点-pACYC184 起点及氯霉素抗性选择标记,构建得到质粒 pBAD33-rep 用于 β 亚基的共表达。

S1、EF-Tu 和 EF-Ts 基因分别由质粒 SKQ β 通过 PCR 扩增得到,插入到质粒 pET 中构建得到质粒 pET-S1、pET-Tu 和 pET-Ts,分别携带 S1、EF-Tu 和 EF-Ts 基因,质粒 pET-Ts-Tu 则携带 EF-Tu 和 EF-Ts 两个基因,均由大阪大学应用生物学系酶工程实验室提供。将这 4 种质粒独立转化宿主 BL21(DE3),分别得到转化子 BL21(DE3)pET-S1、BL21(DE3)pET-Ts、BL21(DE3)pET-Tu 和 BL21(DE3)pET-Ts-Tu。再将质粒 pBAD33-rep 转化这些菌株,经限制性内切酶分析验证转化子中得到不同的质粒组合,进而实现不同亚基的共表达。

利用 QIAquick gel extraction (250)试剂盒回收 DNA 片段,质粒由 QIAGEN 公司 tip-100 试剂盒提取得到,质粒构建的各个步骤均经限制性内切酶分析确证。酶反应与 *Escherichia coli* 细胞转化操作如文献 [17] 所述。

1.4 培养条件和方法

各菌株及转化子均在 37℃ LB 培养基中培养。含 pET 载体的转化子,培养基中加入 50 μ g/mL 氨苄青霉素,诱导物 IPTG 浓度为 1mmol/L,含 pBAD 载体的转化子,培养基中氯霉素浓度为 20 μ g/mL,诱导物

为浓度 0.2% 的 L-阿拉伯糖。当菌体生长至细胞密度达到 OD_{600} 0.5 时,加入诱导物,继续培养 3h。取 5mL 培养液离心收集细胞,再悬浮于 500 μ L 缓冲液中[10mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 3mmol/L EDTA, 25% 甘油, 10mmol/L β -巯基乙醇]。细胞悬浮液经超声波破碎,15000r/min 4℃ 下离心 10min,分离得到可溶与不溶性组分,各组分进行 10% SDS-PAGE 分析 [17]。

1.5 RNA 复制酶活性分析

细胞破碎液中加入 5 μ L 1mol/L MgCl₂ 和 1 μ L 的 DNase I (10U/ μ L),于 15℃ 保温 10min,4℃ 15000r/min 离心 10min。可溶性与不溶性部分分别作为粗酶进行 RNA 复制酶活性分析。

MDV-poly(+)RNA 由 T7 RNA 聚合酶体外转录 pUC-MDV-LR DNA 制备得到 [18],作为模板用于 RNA 复制酶活性分析。RNA 复制酶活性分析反应体系 (50 μ L)含 5 μ L 粗酶,2 μ g/mL MDV-poly(+)RNA 模板以及 125mmol/L Tris-HCl (pH8.0),25mmol/L β -巯基乙醇,10mmol/L MgCl₂,5mmol/L 磷酸烯醇式丙酮酸,10 μ g/mL 丙酮酸激酶,10 μ g/mL 利福平,NTPs 各 0.8mmol/L,74U/mL 的 DNase I。反应体系温和混匀,35℃ 保温 30 min,加入苯酚/氯仿终止反应。取 10 μ L 水相 100℃ 加热 1min,2% 琼脂糖电泳分析 [13]。

2 结果和分析

2.1 Q β 复制酶 β 亚基与其他亚基的共表达

由于多种质粒表达载体,如 pKK、pET 等用于 rep 基因的表达时,来自于宿主细胞的其他亚基数量与 β 亚基相比可能相对不足,难以形成大量完整的复制酶,大量的 β 亚基聚集成为不溶性蛋白,基本没有活性,从而影响了活性 Q β 复制酶的获得。Q β 复制酶本身的可溶性表明不同亚基间的相互作用可能对 β 亚基的溶解性有重要影响,如果通过宿主细胞自生合成或者其他方式,提供与 β 亚基数量相当的其他亚基,则有可能使 β 亚基保持溶解状态,得到较多的活性复制酶。因此,利用 β 亚基与其他亚基的共表达可以有效地考察这一问题。

在 Q β 复制酶中, β 亚基与 α 亚基(S1)结合较为紧密,而 Ts 与 Tu 则以复合体形式存在 [1]。因此为确定何种亚基与 β 亚基共表达可增加其溶解性,选择带有 S1、Ts、Tu 及 Ts-Tu 基因的各个质粒分别转化 *E. coli*,得到的转化子再用带有 β 亚基基因的 pBAD33-rep 转化,进行亚基的共表达。各转化子经限制性内切酶分析(图 1)证实,共表达转化子分别

含有 pBAD33-rep 与 pET-S1、pET-Ts、pET-Tu 或 pET-Ts-Tu 质粒的不同组合(3、5、7、10 泳道)

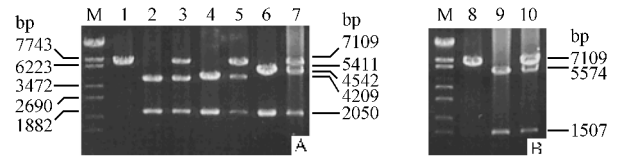


图 1 共表达转化子限制性内切酶分析

Fig. 1 Restriction enzyme analysis of transformants for co-expression

M. λ DNA/*Eco* T4I digest marker ; 1 ,2 ,4 ,6 ,8 ,9. Plasmid samples of pBAD33-rep , pET-Ts , pET-Tu , pET-TS-Tu , pBAD33-rep and pET-S1 prepared from hosts harboring single plasmid , respectively ; 3 ,5 ,7 ,10. Plasmid samples prepared from hosts harboring two types of plasmids , pBAD33-rep and pET-Ts , pBAD33-rep and pET-Tu , pBAD33-rep and pET-TS-Tu , pBAD33-rep and pET-S1 , respectively. A. Samples were digested by restriction enzyme *Bgl*I ; B. Samples were digested by *Mlu*I.

利用所得到的共表达转化子经不同诱导物诱导后 ,复制酶 β 亚基可与其他亚基共表达 ,SDS-PAGE 分析表达结果如图 2 所示。当亚基 S1、Ts、Tu 分别与 β 亚基共表达时 ,与 β 亚基单独表达结果(2 泳道约 65kD 处)相似 , β 亚基条带仍然只存在于不溶性组分中(6、10、14 泳道约 65kD 处) ,溶解性没有明显变化。而当 Ts-Tu 与 β 亚基共表达时 ,一定数量的 β 亚基可以在可溶性组分中观察到 ,尽管仍有相当数量的蛋白存在于不溶性组分中(17、18 泳道约 65kD 处)。这一结果表明 ,复制酶 β 亚基的溶解性在 Ts 和 Tu 亚基存在时有一定的提高。此外 ,Ts-Tu 的表达也使得 Tu 溶解性得到了明显的提高。Tu 单独表达时有相当部分蛋白存在于不溶性组分中(12 泳道约 45kD 处)随着 Ts-Tu 的表达 ,可发现 Tu 与 Ts 一起主要存在于上清液中(15 泳道)。

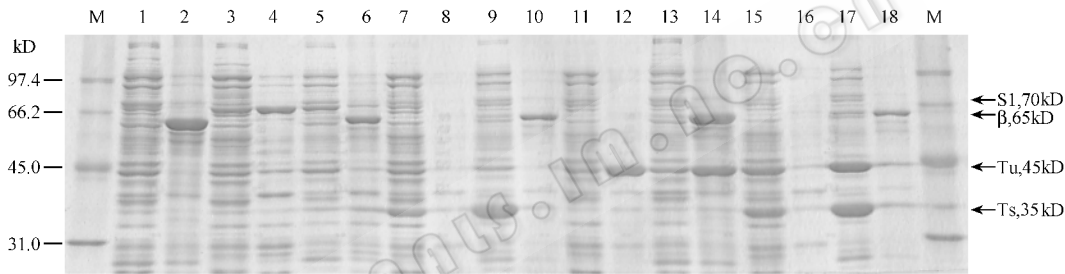


图 2 不同亚基共表达 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the co-expression of subunits after induction

M. Marker ; 1 3 5 7 9 ,11 ,13 ,15 ,17. Supernatant fractions prepared from the lysates of cells harboring pBAD33-rep , pET-S1 , both of pBAD33-rep and pET-S1 , pET-Ts , both of pBAD33-rep and pET-Ts , pET-Tu , both of pBAD33-rep and pET-Tu , pET-TS-Tu , both of pBAD33-rep and pET-TS-Tu , respectively ; 2 4 6 8 ,10 ,12 ,14 ,16 ,18. Corresponding precipitate fractions.

为检验可溶性蛋白是否具有活性 ,对不同亚基组合得到的粗酶进行复制酶活性分析(图 3) ,结果表明 ,虽然不溶性部分中存在大量的 β 亚基 ,但基本没有复制酶活性。而在可溶性部分中 ,特别是 β 亚基与 Ts-Tu 共表达时(9 泳道) ,复制酶活性特别明显 ,表明可溶性蛋白具有活性。

2.2 IPTG 浓度对于 β 亚基与 EF-Ts-Tu 共表达的影响

虽然 β 亚基通过与 Ts-Tu 共表达溶解度有所提高 ,但 β 亚基的表达水平与 EF-Ts 和 EF-Tu 相比较低(图 2) ,提高 β 亚基表达的相对水平是否能够增加可溶性蛋白的含量 ? 由于带有 EF-Tu 和 EF-Ts 基因的 pET 质粒相对于 pBAD33-rep 质粒来说是一个高效表达载体 ,其表达效率受到诱导物 IPTG 浓度

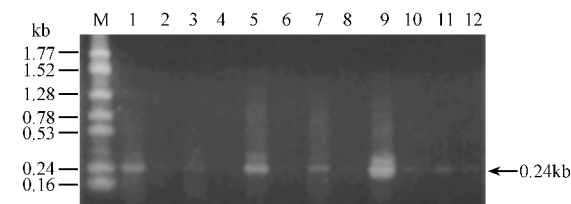


图 3 不同亚基共表达得到的 Q β 复制酶活性分析

Fig.3 Replicase activity analysis of Q β replicase of the co-expression of subunits after induction

M. RNA Ladder marker ; 1 3 5 7 9. Supernatant fractions prepared as crude enzyme from the lysates of cells harboring pBAD33-rep , both of pBAD33-rep and pET-S1 , both of pBAD33-rep and pET-Ts , both of pBAD33-rep and pET-Tu , and both of pBAD33-rep and pET-TS-Tu , respectively ; 2 ,4 ,6 ,8 ,10. Corresponding precipitate fractions ; 11 ,12. Positive and negative control using pure Q β replicase. The arrow indicates the MDV-poly(+) RNA.

的影响,而 pBAD 质粒的表达则受 L-阿拉伯糖的诱导。因此在亚基共表达时,通过降低诱导物 IPTG 的浓度,减弱 EF-Ts 和 Tu 的表达,可以更为有效地相对增强 β 亚基的表达。

诱导物 IPTG 不同浓度条件下共表达结果的 SDS-PAGE 分析表明(图 4-A),随着 IPTG 浓度从 1mmol/L 降低到 0.01mmol/L,EF-Ts 和 Tu 的表达被减弱, β 亚基的表达相应得到了增强,可溶性 β 亚基的含量也有所增加(5 泳道约 65kD 处)。相应的复制酶活性分析表明(图 4-B),得到的可溶性蛋白具有更为明显的复制酶活性。这一结果证实了 β 亚基与 EF-Ts-Tu 的共表达增强了其溶解性。

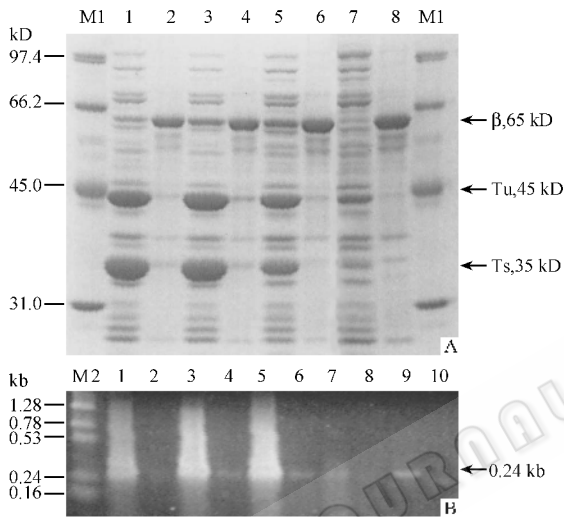


图 4 IPTG 浓度对于 β 亚基与 EF-Ts-Tu 共表达的影响

Fig.4 Effect of the concentration of inducer IPTG on the co-expression of β -subunit with EF-Ts-Tu

A: The result of SDS-PAGE analysis of different fractions; B: The result of replicase activity assay of different fractions as crude enzyme. M1. Protein marker; M2. RNA Ladder Marker; 1, 3, 5, 7. Supernatant fractions from the lysates of BL21(DE3) harboring both of pBAD33-rep and pET-TS-Tu after incubated with 0.2% L-arabinose and IPTG at final concentration of 1mmol/L, 0.1mmol/L, 0.01mmol/L and 0mmol/L, respectively; 2, 4, 6, 8. Corresponding precipitate fractions. B. 9, 10. Positive and negative control using pure Q β replicase, respectively. The arrow indicates the MDV-poly(+) RNA.

3 讨论

综上所述,由于 Q β 复制酶 β 亚基在 *E. coli* 中单独表达时得到的几乎都是不溶性蛋白,通过构建带有 β 亚基基因的质粒 pBAD33-rep 与带有其他亚基基因的 pET 系列质粒进行不同组合的共表达,尝试提高 β 亚基的溶解性。结果表明, β 亚基与其他单一亚基的共表达并不能明显增加其溶解性,无助于复制酶的制备,只有当 β 亚基与 EF-Tu、EF-Ts 共表达时,其溶解性得到了一定的增强,可溶性蛋白也具有活性。由于天然的 EF-Tu、EF-Ts 复合物可刺激变性的 Q β 复制酶复性,可作为 Q β 复制酶其他组成成分正确折叠的分子伴侣^[15],因此,EF-Tu 与 EF-Ts 的共表达,很可能易于 EF-Tu、EF-Ts 复合物大量形成,从而有助于 β 亚基表达溶解性的提高,进而得到较多的活性 Q β 复制酶。Fukano 等^[16]也得到了相似的研究结果。进一步通过调节诱导物浓度,相对增强可溶性 β 亚基的表达,可溶性复制酶酶量得到相应提高。从研究结果似乎还可以发现, β 亚基的溶解性与 Q β 复制酶活性似乎具有一定的相关性,定量测定复制酶活性和可溶性蛋白的表达水平,从而确定两者间关系的研究还有待进一步进行。

参 考 文 献

[1] Blumenthal T, Carmichael G G. RNA replication: Function and structure of Q β replicase. *Ann Rev Biochem*, 1979, **48**: 525 - 548.

[2] Priano C, Arora R, Butke J, et al. A complete plasmid-based complementation system for RNA coliphage Q β : Three proteins of bacteriophage Q β (Group III) and SP (Group IV) can be interchanged. *J Mol Biol*, 1995, **249**: 283 - 297.

[3] Brown D, Gold L. RNA replication by Q β replicase: A working model. *PNAS*, 1996, **93**: 11558 - 11562.

[4] Biebricher C K, Gardiner W G. Molecular evolution of RNA *in vitro*. *Biophysical Chem*, 1997, **66**: 179 - 192.

[5] Kramer F R, Miele E A, Mills D R. Cell-free method for synthesizing a protein. *Biotechnology Advances*, 1997, **15**: 677 - 682.

[6] Chetverin A B, Spirin A S. Replicable RNA vectors: Prospects for cell-free gene amplification, expression, and cloning. *Nucleic Acid Res*, 1995, **51**: 225 - 270.

[7] Lee D H, Granja J R, Martinez J A, et al. A self-replicating peptide. *Nature*, 1996, **382**: 525 - 528.

[8] Strunk G, Ederhof T. Machines for automated evolution experiments *in vitro* based on the serial-transfer concept. *Biophysical Chemistry*, 1997, **66**: 193 - 202.

[9] Tyagi S, Landegren U, Tazi M, et al. Extremely sensitive, background-free gene detection using binary probes and Q β replicase. *PNAS*, 1996, **93**: 5395 - 5400.

[10] Stefano J E, Genovese L, An Q, et al. Rapid and sensitive detection of *Chlamydia trachomatis* using a ligatable binary RNA probe and Q β replicase. *Molecular and Cellular Probes*, 1997, **11**(6): 407 - 426.

[11] Kamen R, Kondo M, Römer W, et al. Reconstitution of Q β replicase lacking subunit α with protein-synthesis-interference factor I. *Eur J Biochem*, 1972, **31**: 44 - 51.

[12] Moody M D, Burg J L, Difrancesco R, et al. Evolution of host cell RNA into efficient template RNA by Q beta replicase: the origin of RNA in untemplated reactions. *Biochemistry*, 1994, **33**(46): 13836 - 13847.

