

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (2) :149 - 155; 4 February 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140196

盐藻 *PDS* 基因的同源克隆及在大肠杆菌中的表达

周峰, 黄非, 白林含*

四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川 成都 610064

摘要: 【目的】八氢番茄红素脱氢酶 *PDS* 为真核膜结合蛋白, 我们通过更换不同的表达策略, 探索在大肠杆菌中表达真核膜结合蛋白的方式。【方法】利用 RACE 的方法克隆盐藻 *PDS* 的全长 cDNA 序列。利用原核表达载体 pET-28a 构建 pET-28a-*PDS* 表达载体; 使用 PLtac 启动子替换 T7 启动子构建 pET-PLtac-*PDS* 表达载体; 合成 *Mistic* 序列融合入 pET-28a 中构建了 pET-*Mistic-PDS* 融合表达载体。分别转化入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行原核表达。【结果】获得了盐藻 *PDS* 基因的全长 cDNA 序列 2237 bp, 开放阅读框为 1749 bp, 共编码 582 个氨基酸 (NCBI 登录号为 GQ923693.1)。利用 pET-28a-*PDS* 和 pET-PLtac-*PDS* 表达的 *PDS* 蛋白表达量低, 并以包涵体形式存在; 利用 pET-*Mistic-PDS* 载体表达的 *PDS* 蛋白表达量明显提高, 且大部分以可溶蛋白形式存在, 具有脱氢酶活性。【结论】实验结果表明 *Mistic* 作为促溶标签能促进膜蛋白的正确折叠, 提高蛋白的可溶性。蛋白酶活测定结果证明了 *Mistic* 的融合可以保持蛋白的天然活性。

关键词: 盐藻 *PDS* 基因; 同源克隆; 原核表达; PLtac 启动子; *Mistic* 序列

中图分类号: Q933 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 02-0149-07

膜结合蛋白在整个生物体蛋白组成中占 30% 以上, 在生物生理功能上具有重要作用, 比如控制激素表达、信号传递和离子通道等^[1]。自大肠杆菌作为蛋白表达平台以来, 大多数蛋白都在大肠杆菌表达体系中得到表达, 且多达 28000 种可溶蛋白的结构得到了解析, 但是仅仅只有少量的膜蛋白结构得以解明。这一情况极大限制了膜蛋白相关功能结构的研究, 也阻碍了多种重要膜蛋白在工业医疗上的应用。限制膜蛋白可溶表达的原因可以归纳为 2 类^[2]: (1) 大肠杆菌中缺乏真核蛋白的翻译后加工和修饰, 以及信号传递机制, 导致产物无法正确折叠以及自我缔合形成包涵体; (2) 膜蛋白在大肠杆菌中高效表达, 抢占了大量资源, 影响了大肠杆菌中必

需蛋白的合成, 因而对宿主造成了毒性。为了应对这一问题, 研究者们往往通过更换弱启动子、使用低拷贝数表达质粒以及控制低温发酵温度, 来获得可溶蛋白, 然而蛋白的获得量很低。通过加入添加剂可以使包涵体蛋白变性, 然而复性的包涵体蛋白活性明显低于天然蛋白, 也存在蛋白回收困难等缺点, 对进一步的实验研究造成影响^[3-4]。

目前, 膜蛋白的表达采取一些新的策略, 比如融合分子伴侣。分子伴侣与目的蛋白的共表达可以促进目的蛋白的自我正确折叠以及传递运输。*Mistic* 是一类来源于 *Bacillus subtilis* 的膜结合蛋白, 含有 110 个氨基酸残基, 具有定位于细胞膜上的功能^[5]。*Mistic* 有 4 个 α 螺旋的二级结构, 蛋白内部呈现疏

基金项目: 国家自然科学基金 (30970043)

* 通信作者。E-mail: bailinhan@scu.edu.cn

作者简介: 周峰 (1988 -), 男, 四川成都人, 硕士研究生, 主要研究领域为分子生物学。

收稿日期: 2014-04-14; 修回日期: 2014-05-18

水特性,同时 Mystic 的表面与内部相反具有高度的酸性,这种内外结构中对水的亲疏特性使 Mystic 能够灵活地适应膜分子层以及协助膜蛋白的转运,是一个理想的分子伴侣^[6]。

八氢番茄红素脱氢酶 (Phytoene desaturase, PDS) 是一类位于类胡萝卜素合成代谢途径中的关键酶,其位于类胡萝卜素合成途径的上游,将八氢番茄红素脱氢为 ζ -胡萝卜素,是整个代谢途径中的限速步骤,影响整个类胡萝卜素的代谢。其中代谢产物番茄红素在人类健康和医疗事业上有着广泛的应用。PDS 蛋白也参与光合作用,合成后定位于类囊体膜上,有研究表明 CRTI 类型的八氢番茄红素脱氢酶就是一种典型的膜结合蛋白,提供亲脂性的底物八氢番茄红素后表现出了很高的活性^[7]。本文通过同源克隆和 RACE 技术获得了盐藻 PDS 基因的全长,并以 PDS 基因为例,分别构建了原核表达载体 pET-28a-PDS、中低强度启动子表达载体 pET-PLtac-PDS 以及添加融合标签 Mystic 的表达载体 pET-Mistic-PDS,以探索在大肠杆菌中大量表达真核膜结合蛋白的方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与表达载体: 盐藻,购于中国科学研究院武汉水生生物研究所藻种库;克隆菌株 JM109 菌株和表达菌株 BL21 (DE3) 为实验室保存;原核表达载体 pET-28a 质粒为实验室保存;PLtac 启动子^[8]和 Mystic 序列^[16]参照文献由 invitrogen 公司合成。

1.1.2 主要试剂和仪器: 限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind* III, PrimerSTAR HS 聚合酶, LA Taq, T4 DNA 连接酶, RNA PCR Kit (AMV) VER. 3.0, TRI Reagent, DNA marker 和蛋白质 Marker 均购自 TaKaRa (大连) 宝生物公司; SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit, 购于 Clontech; 质粒提取试剂盒与凝胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司; Applied Biosystems 2720 型 PCR 仪, 美国 ABI 公司; 超声波匀浆仪 VCX750, 美国 Sonics & Materials 公司; 紫外可见分光光度计 8100A, 北京普析通用仪器有限责任公司。

1.2 盐藻总 RNA 的提取及反转录获取 cDNA 模板

将原藻种按 5% 的接种量转入 1 L 的盐藻培养液^[8]中(含 1.5 mol/L NaCl), 按光照 16 h, 黑暗 8 h,

25℃ 培养至对数期, 离心收集菌体。按照 Trizol 试剂盒说明书提取盐藻的 RNA。甲醛变性凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 并测定 RNA 的浓度和纯度。以提取的盐藻总 RNA 为模版, 按照 RNA 反转录试剂盒说明书进行扩增, 获取 cDNA 模版。

1.3 PDS 基因 EST 的克隆

根据莱茵衣藻、拟南芥、雨生红球藻和拜尔代维勒杜氏藻八氢番茄红色脱氢酶的氨基酸序列, 利用 Vector NTI 9.0 软件进行同源性比对分析, 找出氨基酸相对保守区域并设计简并引物 Sense primer: 5'-GCNTGGAARGAYGARGAYGG-3'; Antisense primer: 5'-GTNCCNGTNATHAAYATHCA-3'。

利用简并引物, 以反转录获得的 cDNA 为模版进行 PCR 扩增。20 μ L PCR 反应体系: ddH₂O 12.5 μ L, MgCl₂ 2.5 μ L, 10 \times LA PCR Buffer II 2.5 μ L, dNTP Mixture 4 μ L, Sense primer 1 μ L, Antisense primer 1 μ L, 反转录 cDNA 1.25 μ L, LA Taq, 0.25 μ L。PCR 反应条件: 94℃, 2 min; 94℃, 30 s, 57.1℃, 30 s, 72℃, 1 min, 35 个循环; 72℃, 10 min。克隆载体的构建按 pMD19-T 试剂盒说明书进行, 质粒的转化按常规热激法进行。挑取阳性克隆, 提取质粒进行酶切验证, 鉴定出来的阳性子送交测序。

1.4 PDS 基因全长 cDNA 的克隆

按照 RACE 克隆基因方法中引物的设计要求, 根据上述实验中克隆获得的 PDS 基因 EST 序列设计 3'RACE 和 5'RACE 引物。3'RACE 引物 (Sense2 位于 Sense1 下游)。Sense 1: 5'-GGACCACTTCACTTCCAGGGGTGGA-3'; Sense 2: 5'-CACTTTGAGCTCCTGAACGGAGAGA-3'。设计 5'RACE 引物 (Antisense 2 位于 Antisense 1 下游), Antisense 1: 5'-CTGCTTCGTCATCCACTGAGTCACT-3'; Antisense 2: 5'-AGCAGGCCAATGGCAAAGTGGATCT-3'。通用引物为 UPM 及 NUP, UPM (混合物): 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3', 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCACTGCTATCAACGCAGAGT-3', NUP: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'。

按照 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 的实验说明进行反转录 PCR 实验, 分别获得 3'和 5'的 cDNA。以 cDNA 为模版, 采用巢式 PCR 进行 3'和 5'的序列扩增。

1.5 表达载体构建

设计合成了 PLtac 启动子, 用 PLtac 启动子序列替换 pET-28a 载体中的 T7 启动子, 构建为 pET-

PLtac 表达质粒。在合成的 *Mistic* 序列前后两端设计酶切位点 *Nco* I 和 *Bam*H I, 与 pET-28a 载体进行 *Nco* I 和 *Bam*H I 双酶切, 经过连接转化, 构建为 pET-*Mistic* 表达质粒。由于 *Mistic* 和 His 标签都带

有强电荷, 会对彼此的功能相互产生影响, 所以在构建 pET-*Mistic* 表达质粒时去掉了 pET 表达序列中第一个 His 标签。构建的表达载体如图 1 所示 (克隆 / 表达区域)。

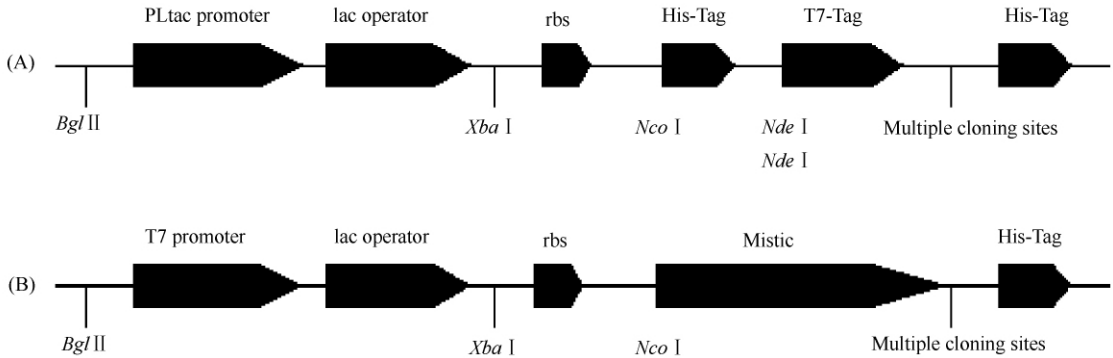


图 1. pET-PLtac 和 pET-*Mistic* 载体构建图谱

Figure 1. Vector construction of pET-PLtac and pET-*Mistic*. A: pET-PLtac; B: pET-*Mistic*.

分别在 *PDS* 基因前端与后端引入 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点。设计引物为 *Bam*H I -*PDS*-A: CGCGGATCCATGCAGTTATGCAGGGCAGGGCACA CACT 和 *Hind* III -*PDS*-AT: CCCAAGCTTTTAGAA CCAAGGGAAGGTGACTGCC。使用 PrimerStarDNA 聚合酶对 *PDS* 基因进行 PCR 扩增。扩增产物回收后通过加 A 尾处理, 进行 pMD19-T 连接, 转化入 JM109 菌株中。分别提取 pET-28a、pET-PLtac 和 pET-*Mistic* 表达载体质粒和 pMD19-T-*PDS* 质粒, 37°C 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切 4h。回收酶切产物, 将各个酶切载体片段和 *PDS* 酶切片段纯化产物以摩尔比 1:4 混合, 加入 T4 DNA 连接酶, 16°C 连接过夜 (16 h 以上)。连接产物转化入 JM109 菌株中, 涂布于含 Kan (30 mg/mL) 的 LB 固体培养基中, 挑取单菌落, 提取质粒, 使用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切验证, 并送出 Invitrogen 公司完成测序。

1.6 蛋白表达

鉴定正确后的 pET-28a-*PDS*、pET-PLtac-*PDS* 和 pET-*Mistic*-*PDS* 原核表达载体通过热激法转化入表达菌株大肠杆菌 BL (DE3) 中, 涂布于含有 Kan (30 μ g/mL) 的 LB 固体培养基中, 挑取单菌落接种于 4 mL 含 Kan (30 μ g/mL) 的 LB 液体培养基中, 37°C 摇菌过夜。按照 1:100 的比例接种于 LB 液体培养基中, 摇菌至 $OD = 0.6$, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 16°C 摇菌培养过夜 (12 h 以上)。取 1 mL 菌液离心收集菌体, 加入 500 μ L 的 PBS 溶液重悬, 冰上进行超声波破碎 (振荡 3 s, 间隔 2 s)

2 min, 4°C 6000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 沉淀用 5 mol/L 的尿素溶解。加入 4 \times SDS 上样缓冲液, 煮沸 5 min, 进行 SDS-PAGE 电泳分析 (分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 3%)。

1.7 类胡萝卜素提取

取 20 g 胡萝卜, 敲碎, 在研钵中加入液氮, 迅速将胡萝卜捣碎。加入 10 mL 的丙酮浸提, 使用纱布挤压液或过夜避光浸提, 直至细胞组织无色。取出浸提液, 离心收集上清, 即制成 *PDS* 酶反应底物。

1.8 *PDS* 酶活测定

在试管中加入 1 mL 的酶蛋白提取液, 加入 10 μ L 的类胡萝卜素提取液。避光 28°C, 120 r/min 振荡培养 3 h^[9]。设置对照组, 在培养反应后再加入底物, 其余操作相同, 去零作为对照。分别对类胡萝卜素进行分光光度计的吸光值测定。

2 结果

2.1 *PDS* 基因的克隆

利用甲醛变性凝胶电泳检测盐藻总 RNA 提取情况, 获得了盐藻的 28S rRNA 和 18S rRNA 两条带, 亮度明显。利用 Quant pro RNA/DNA calculator 仪器测得的 A_{260}/A_{280} 比值为 1.999, 表明提取的 RNA 纯度很高。同时, 测得其浓度为 500 ng/ μ L。以提取的 RNA 进行反转录获得从 DNA, 设计简并引物, 以反转录获得的 cDNA 为模版进行 PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳中 PCR 扩增出了一条大约 780

bp 的片段,如图 2 所示,和预期的 EST 片段大小基本一致。BLAST 序列比对表明该 EST 序列与数据库里的八氢番茄红素脱氢酶基因高度相似,该片段和莱茵衣藻、拟南芥、雨生红球藻和拜尔代维勒杜氏藻八氢番茄红色脱氢酶基因具有很高的相似性。

根据 EST 序列,设计 3'RACE 和 5'RACE 引物。

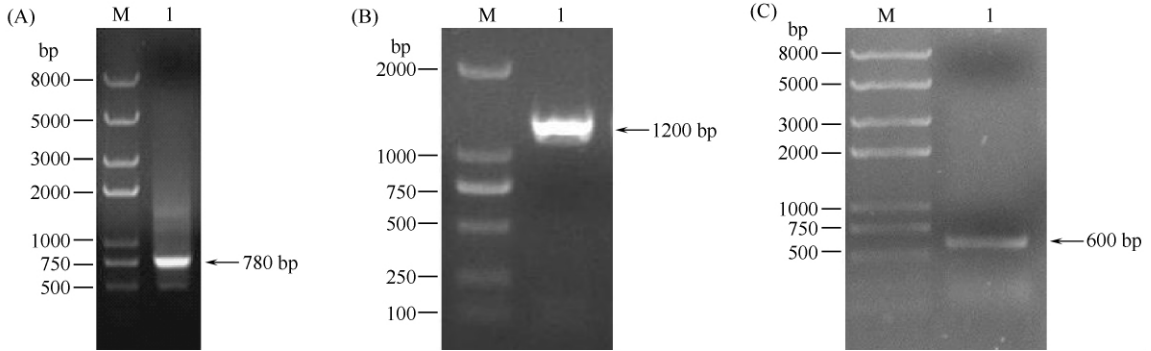


图 2. PDS 基因的克隆

Figure 2. Clone of *PDS* gene. A: clone of EST. M: DNA Marker; lane 1: PCR production of EST. B: 3' RACE. M: DNA Marker; lane 1: PCR production of 3' RACE. C: 5' RACE. M: DNA Marker; lane 1: PCR production of 5' RACE.

对克隆获得的 EST 片段,3'末端和 5'端片段进行拼接,获得了盐藻八氢番茄红素脱氢酶的全长 cDNA 序列。该基因全长 cDNA 为 2237 bp,开放阅读框为 1749 bp,共编码 582 个氨基酸。NCBI 登录号为 GQ923693.1。

利用 <http://people.mbi.ucla.edu/sumchan/caltor.html> 网址对 *PDS* 基因的阅读框进行稀有密码子分析,结果如表 1 所示。*PDS* 基因中稀有密码子共有 45 个,串联稀有密码子共 4 个。

表 1. *PDS* 基因稀有密码子分析

Table 1. Rare codon analysis of *PDS* gene

amino acid	rare codon	frequency of occurrence
Arginine	CGA	3
	CGG	2
	AGG	8
	AGA	2
Glycine	GGA	6
	GGG	2
Soleucine	AUA	0
Leucine	CUA	2
Proline	CCC	17
Threonine	ACG	3

Repeated and/or consecutive rare codons. AGG CGA = 1, AGG ACG = 1, CCC CGG = 1, AGG CCC = 1.

根据 Bioinformatics (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/>) 对 *PDS* 蛋白进行二级结构分析,共含有 14 个 α 螺旋和 16 个 β 折叠。使用 Tmpred (http://ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 分析穿膜

PDS 基因 3' 的克隆:通过巢式 PCR 扩增出的产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶上电泳得到一条大约 1200 bp 的条带,与预期片段大小相吻合。*PDS* 基因 5' 的克隆:通过巢式 PCR 扩增出的产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶上电泳得到一条大约 600bp 的条带,与预期片段大小相吻合。结果如图 2 所示。

结构,发现有 3 处 α 螺旋的超二级结构可能组成了穿膜区域,氨基酸序列分别为 73 - 92, 189 - 210 和 540 - 556。

2.2 表达载体构造

PDS 基因通过设计的特异引物进行 PCR 扩增,连接入 pMD19-T 中。并通过 *Bam*H I 和 *Hind* III 分别对 pET-28a、pET-PLtac、pET-Mistic 载体和 pMD19-T-*PDS* 进行双酶切,回收 *PDS* 和载体片段,构建 pET-28a-*PDS*、pET-PLtac-*PDS*、pET-Mistic-*PDS* 原核表达载体。提取质粒后,再次通过 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切验证,结果如图 3 所示。

酶切片段为 2 条带,酶切片段大小与 *PDS* 基因 (1749 bp) 一致。pET-28a-*PDS*、pET-PLtac-*PDS* 和 pET-Mistic-*PDS* 表达载体通过测序后, DNA 序列无误,表达载体构建成功。

2.3 蛋白表达检测

将构建好的 pET-28a-*PDS*、pET-PLtac-*PDS* 和 pET-Mistic-*PDS* 表达载体一同转化入 BL21 (DE3) 中,在 IPTG 浓度为 0.5 mmol/L, 16°C 条件下摇菌过夜,配制 SDS-PAGE 浓度为 10%,超声波破碎进行蛋白检测。结果如图 4 所示。

从图 4 -A、B 可见,利用表达载体 pET-28a-*PDS* 能表达出大约 64 kDa 左右的 *PDS* 蛋白,大部分以包涵体形式存在。更换中等强度启动子,以 pET-PLtac-*PDS* 表达的蛋白,整体表达量有所减少,可溶

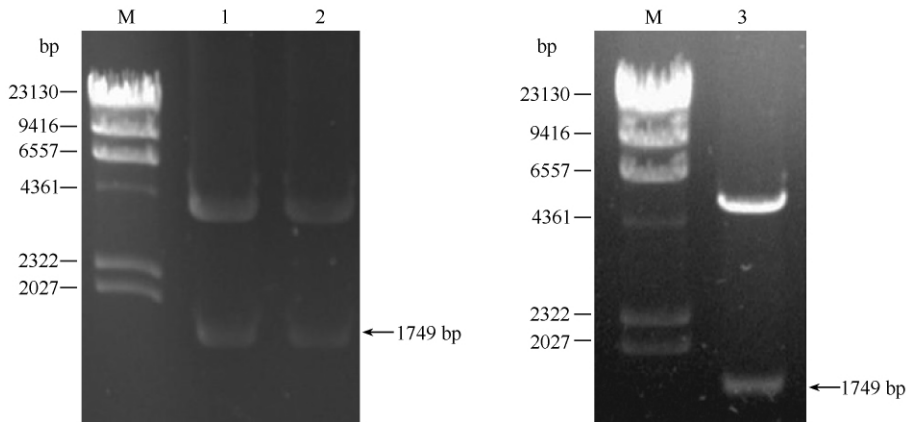


图 3. 表达载体凝胶电泳分析

Figure 3. The gelelectrophoresis analysis of expression vector. M: DNA marker; lane 1: restriction digestion of pET-28a-PDS; lane 2: restriction digestion of pET-PLtac-PDS; lane 3: restriction digestion of pET-Mistic-PDS.

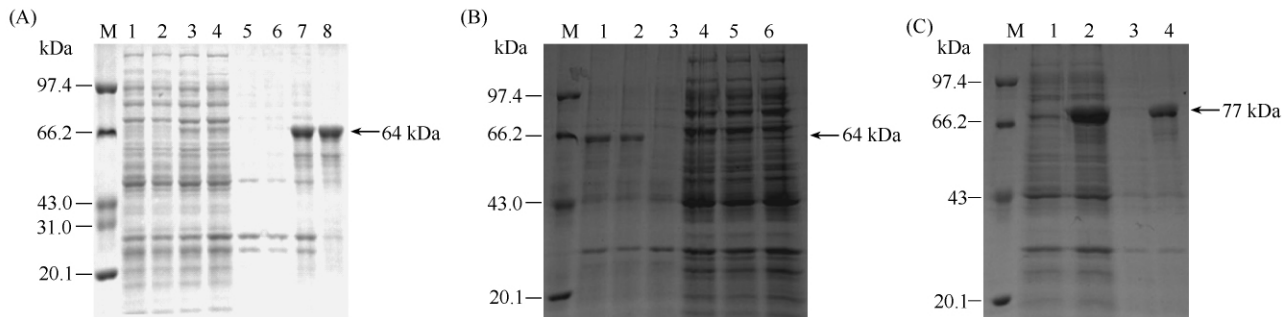
图 4. *PDS* 基因原核表达图谱

Figure 4. Map of prokaryotic expression of *PDS* gene. A: Expression of pET-28a-PDS. Lane 1-2: supernatant of pET-28a; lane 3-4: supernatant of pET-28a-PDS; lane 5-6: precipitation of pET-28a; lane 7-8: precipitation of pET-28a-PDS. B: Expression of pET-PLtac-PDS. Lane 1-2: precipitation of pET-PLtac-PDS; lane 3: precipitation of pET-PLtac; lane 4-5: supernatant of pET-PLtac-PDS; lane 6: supernatant of pET-PLtac. C: Expression of pET-Mistic-PDS. Lane 1: supernatant of pET-Mistic; lane 2: supernatant of Mistic-PDS; lane 3: precipitation of pET-Mistic; lane 4: precipitation of pET-Mistic-PDS.

部分也未有明显的增加。Mistic-PDS 表达载体中融合了 13 kDa 大小的 Mistic 蛋白,其融合蛋白产物大小在 77 kDa 左右,见图 4-C。在上清中 Mistic-PDS 融合蛋白量有了明显的提高,同时在沉淀中仍有少量蛋白积累,表明 Mistic 在一定程度上可以诱导 PDS 膜蛋白的正确折叠和定位,形成可溶蛋白,改善膜蛋白在大肠杆菌中的正确表达。

2.4 PDS 酶活性测定

通过丙酮提取胡萝卜中的类胡萝卜素作为 PDS 蛋白的反应底物,然后使用 450 nm 进行吸收值测定。八氢番茄红素脱氢酶介导的是类胡萝卜素代谢中第一个显色反应,PDS 酶蛋白可将八氢番茄红素脱氢,形成的产物会增加 4 个共轭双键,吸收峰产生红移,这样在 450 nm 处的吸收值会上升,进而测定 PDS 酶活力。将蛋白提取液与类胡萝卜素提取液混合,28℃ 避光摇荡 3 h 后,进行吸收值测定。结果如

表 2。

培养反应后,加入类胡萝卜素提取液底物作为对照,3 种表达策略的蛋白酶(可溶部分)活力测定都表现出活性。类胡萝卜素的吸光值上升,表明有 PDS 酶活反应产物的生成。通过吸光值比较,Mistic-PDS 的酶活性比 pET-28a 和 pET-PLtac 表达体系显著升高。这一结果表明通过融合 Mistic 不仅能促进 PDS 膜蛋白的可溶表达,同时能保持蛋白的天然活性,保证后续功能研究的顺利进行。

表 2. *PDS* 酶活测定结果Table 2. Enzyme activity assay of *PDS*

Expression vector	OD_{450}
pET-28a-PDS	0.01337
pET-PLtac-PDS	0.01051
pET-Mistic-PDS	0.06952

3 讨论

影响蛋白表达的因素多种多样,在实际工作中往往会通过更换载体启动子、优化发酵条件、分子融合表达方面来改善膜蛋白的可溶表达。低强度的表达效率及低温都可以降低蛋白合成速率,促进蛋白的自我正确折叠,减少蛋白自我聚集的趋势。更换具有耐毒性的宿主菌,比如 C43、C41 也可以达到提高外源膜蛋白可溶表达的目的^[10]。基因自身的结构问题如稀有密码子,宿主缺乏相关转运功能的 tRNA,会导致蛋白无法正常合成,本文中的 PDS 基因通过稀有密码子分析,其数量占总序列不到 10%,故选择了通用的 BL21 (DE3) 作为宿主,并成功获得表达。

Mistic 作为一种膜整合蛋白分子伴侣,具有自动定位于细胞膜上的功能,与膜蛋白的融合表达可以将膜蛋白转运到响应的细胞膜上,弥补了大肠杆菌中缺乏的转运机制。通过运用 Mistic 及相关的同源直系物,已经成功获得了 G 蛋白偶联受体 (GPCR)、钾离子通道、ATP/ADP 转运蛋白等多种膜蛋白的可溶表达^[11-13]。最近有研究表明以乳酸链球菌为宿主,通过融合 Mistic 成功表达了同源原核膜蛋白 pkjLi,一种新分离的亚油酸酯异构酶(来源于 *Lactobacillus acidophilus*)^[14]。PDS 中含有大量 α 螺旋结构,是穿膜结构的显著特征,作为一种膜蛋白,通过 pET-28a 原核表达载体直接表达,由于大肠杆菌缺乏转运机制而无法定位于细胞膜上,导致大量产物缔合为聚集体,无法正确折叠。对 pET-28a 更换 PLtac 启动子,降低表达强度也无法获得明显的可溶蛋白。本实验通过融合 Mistic 后,成功地获得了在上清中可溶的 PDS 融合蛋白,并且保持酶的天然活性。

Mistic 的功能源于自身的特殊结构,Mistic 具有 4 个 α 螺旋的二级结构,其中 3 个 α 螺旋较短,另一个 α 螺旋较长,4 个 α 螺旋围绕一个中轴聚集为一圈紧密环绕的空间结构,中轴内部多为疏水氨基酸,4 个 α 螺旋紧密围绕形成的内部疏水区域为定位于细胞膜提供了疏水氨基酸残基,这样能够穿入细胞膜的磷脂双分子层疏水区域^[15]。有研究发现,将中轴内部第 75 位的 Met 改变为 Ala 后,融合蛋白无法再定位于细胞膜上,表明这一区域很可能与 Mistic 能够定位于细胞膜上的功能相关^[16]。同时 α 螺旋表面与内部性质相反呈现酸性,具有高度的亲水性,而且 α 螺旋末端呈现解链状态,这些都为 Mistic 转运膜蛋白和穿梭细胞膜提供了灵活的功能。一些 Mistic 的类似物,具有和 Mistic 同样的 4 个 α 螺旋结构,这些物质往往还比 Mistic 的氨基酸残基少一些,

比如具有 84 个氨基酸残基的 Mistic 同系物(来源于 *Bacillus mojavensis* 等)同样具有细胞膜定位的功能,而且表现出更强的内部疏水性和表面酸性,能够极大地促进膜蛋白的可溶表达^[17-18]。

本研究表明,将膜蛋白与 Mistic 融合表达,不仅可以在大肠杆菌中获得可溶的重组蛋白,提高蛋白产量,而且能够保持膜蛋白天然的酶活性,保障实验的后续进行。将 Mistic 作为分子伴侣于膜蛋白进行融合表达,能够免去常规表达方法中的包涵体复性过程,提高了效率保证了蛋白活性。相信随着对 Mistic 研究的逐步深入,这一方法可为膜蛋白的结构和功能研究提供新的思路。

参考文献

- [1] Speers AE, Wu CC. Proteomics of integral membrane proteins-theory and application. *Chemical Reviews*, 2007, 107 (8) : 3687-3714.
- [2] Dvir H, Lundberg ME, Maji SK, Riek R, Choe S. Mistic: Cellular localization, solution behavior, polymerization, and fibril formation. *Protein Science*, 2009, 18 (7) : 1564-1570.
- [3] Expert-Bezançon N, Rabilloud T, Vuillard L, Goldberg ME. Physical-chemical features of non-detergent sulfobetaines active as protein-folding helpers. *Biophysical Chemistry*, 2003, 100 (1-3) : 469-479.
- [4] Krause M, Rudolph R, Schwarz E. The non-ionic detergent Brij 58P mimics chaperone effects. *FEBS Letters*, 2002, 532 (1-2) : 253-255.
- [5] Kefala G, Kwiatkowski W, Esquivies L, Maslennikov I, Choe S. Application of Mistic to improving the expression and membrane integration of histidine kinase receptors from *Escherichia coli*. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 2007, 8 : 167-172.
- [6] Debnath DK, Basaiawmoit RV, Nielsen KL, Otzen DE. The role of membrane properties in Mistic folding and dimerisation. *Protein engineering, Design & Selection*, 2011, 24 (1-2) : 89-97.
- [7] Schaub P, Yu Q, Gemmecker S, Poussin-Courmontagne P, Mailliot J, McEwen AG, Ghisla S, Al-Babili S, Cavarelli J, Beyer P. On the structure and function of the phytoene desaturase CRTI from *Pantoea ananatis*, a membrane-peripheral and FAD-dependent oxidase/isomerase. *PLoS One*, 2012, 7 (6) : e39550.
- [8] de Boer HA, Comstock LJ, Vasser M. The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1983, 80 (1) : 21-25.
- [9] Liu J, Zhong YJ, Sun Z, Huang JC, Sandmann G, Chen F. One amino acid substitution in phytoene desaturase

makes *Chlorella zongiensis* resistant to norfuzon and enhances the biosynthesis of astaxanthin. *Planta*, 2010, 232: 61-67.

- [10] Miroux B, Walker JE. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of Molecular Biology*, 1996, 260: 289-298.
- [11] Chowdhury A, Feng R, Tong Q, Zhang Y, Xie XQ. Mystic and TarCF as fusion protein partners for functional expression of the cannabinoid receptor 2 in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 2012, 83 (2): 128-134.
- [12] Blain KY, Kwiatkowski W, Choe S. The functionally active Mystic-fused histidine kinase receptor, EnvZ. *Biochemistry*, 2010, 49 (42): 9089-9095.
- [13] Deniaud A, Bernaudat F, Frelet-Barrand A, Juillan-Binard C, Vernet T, Rolland N, Pebay-Peyroula E. Expression of a chloroplast ATP/ADP transporter in *E. coli* membranes: behind the Mystic strategy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, 1808 (8): 2059-2066.
- [14] Xu Y, Kong J, Kong W. Improved membrane protein expression in *Lactococcus lactis* by fusion to Mystic. *Microbiology*, 2013, 159 (Pt 6): 1002-1009.
- [15] Jacso T, Bardiaux B, Broecker J, Fiedler S, Baerwinkel T, Mainz A, Fink U, Vargas C, Oschkinat H, Keller S, Reif B. The mechanism of denaturation and the unfolded state of the α -helical membrane-associated protein Mystic. *Journal of American Chemical Society*, 2013, 135 (50): 18884-18891.
- [16] Roosild TP, Greenwald J, Vega M, Castronovo S, Riek R, Choe S. NMR structure of Mystic, a membrane-integrating protein for membrane protein expression. *Science*, 2005, 307: 1317-1321.
- [17] Roosild TP, Vega M, Castronovo S, Choe S. Characterization of the family of Mystic homologues. *BMC Structural Biology*, 2006, 6: 10.
- [18] Dvir H, Choe S. Bacterial expression of a eukaryotic membrane protein in fusion to various Mystic orthologs. *Protein Expression and Purification*, 2009, 68 (1): 28-33.

Homologous cloning and expression of *PDS* gene from *Dunaliella salina* in *Escherichia coli*

Feng Zhou, Fei Huang, Linhan Bai*

Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, Sichuan Province, China

Abstract: [Objective] Phytoene desaturase *PDS* is a eukaryotic nuclear membrane binding protein, we used different expression methods to search for the soluble expression strategy of membrane binding protein in *Escherichia coli*.

[Methods] We cloned the full-length cDNA sequence of *PDS* from *Dunaliella salina* through RACE. First, we utilized prokaryotic expression vector pET-28a to construct pET-28a-*PDS* vector. Then, we substituted PLtac promoter for T7 promoter in pET-28a to construct pET-PLtac-*PDS* vector. Last, we constructed pET-Mistic-*PDS* fusion vector by integrating Mystic sequence into pET-28a. All were transformed into BL21 (DE3) for protein expression. [Results] The 2237-bp full-length cDNA sequence of *PDS* was cloned, including a 1749-bp open reading frame, encoding 582 amino acids (NCBI accession: GQ923693.1). The expression of *PDS* protein was low via pET-28a-*PDS* and pET-PLtac-*PDS* vector, and proteins were mostly expressed in inclusion body. The expression of *PDS* protein was significantly increased via pET-Mistic-*PDS* vector, in addition most were expressed as soluble protein which possessed dehydrogenase activity.

[Conclusion] Mystic as the solubilization label was able to promote proper folding of membrane proteins and improve solubility. Protease activity assay proved that Mystic could maintain the enzyme activity.

Keywords: *Dunaliella salina* *PDS* gene, homologous cloning, prokaryotic expression, PLtac promoter, Mystic sequence

(本文责编: 张晓丽)