

硫矿硫化叶菌 P2 分子伴侣基因的克隆表达及其性质

褚鑫, 王丽, 何永志, 董志扬*

(中国科学院微生物研究所, 北京 100101)

摘要: 【目的】研究重组表达的硫矿硫化叶菌 P2 分子伴侣 β 亚基体外同源聚合体的结构和生化功能。

【方法】利用 PCR 技术从硫矿硫化叶菌 P2 的基因组 DNA 中克隆得到分子伴侣 β 亚基的基因, 将该基因克隆到表达载体 pET-21a(+)上并在大肠杆菌 BL21(DE3)中实现了表达。对纯化后的 β 亚基单体进行体外聚合, 利用透射电镜观察 β 分子伴侣的结构, 并对其促蛋白折叠性质进行了研究。【结果】硫矿硫化叶菌 P2 分子伴侣 β 亚基基因在大肠杆菌 BL21 中实现了高效表达, 纯化后的分子伴侣 β 亚基单体在 ATP 和 Mg^{2+} 存在的条件下可自组装形成分子伴侣聚合体。透射电镜观察表明: 该 β 分子伴侣具有 II 型分子伴侣典型的双层面包圈结构, 每个环由 8 个亚基构成。该 β 分子伴侣具有 ATPase 活性, 最适反应温度为 80℃; 它不仅能够促进变性的绿色荧光蛋白 (GFP) 重新折叠, 而且还能有效的提高木聚糖酶的热稳定性。【结论】本文根据 P2 基因组序列分析预测的分子伴侣基因设计引物, 克隆表达了硫矿硫化叶菌 P2 分子伴侣的 β 亚基, 纯化后对其进行体外聚合, 透射电镜观察表明该聚合体具有 II 型分子伴侣的经典结构, 功能分析表明该 β 分子伴侣能够在体外促进异源蛋白质的折叠、提高其它酶分子的热稳定性。这为进一步深入研究嗜热古菌耐热抗逆的分子机制, 奠定了良好的基础。

关键词: 硫矿硫化叶菌; 分子伴侣; 蛋白折叠

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 10-1324-06

分子伴侣广泛存在于各种生物细胞中, 在帮助蛋白质正确折叠、防止蛋白质变性等过程中具有重要的生理功能。近年来, 由于分子伴侣在细胞生命活动的各个层次上所起的重要作用, 引起了科学家的广泛关注^[1, 2, 8, 10, 22, 24]。分子伴侣素是进化上最为保守的蛋白之一, 从结构上可以分为两类: I 型 chaperonins 主要存在于细菌和真核生物的线粒体、叶绿体中, 以 GroEL 和 HSP60 为代表; II 型 chaperonins 主要存在于古细菌和真核生物的细胞质中, 以 thermosome 和 TRiC 为代表^[1]。

大部分古菌的分子伴侣是由 α 、 β 、 γ 三种亚基形成的同源或异源聚合体, 其结构非常经典, 往往由 16~18 个亚基聚合形成双层环状结构^[2]。自 1991 年

Phipps 从嗜热古菌 *Pyrodictium* 中首次发现古菌来源的 chaperonins 以来, 已有部分关于古菌分子伴侣的研究报道^[8,9,13,19]。但到目前为止, 在国内外尚未见硫矿硫化叶菌 P2 分子伴侣的相关报道。

硫矿硫化叶菌 (*Sulfolobus solfataricus*) P2 是一种极端嗜热古菌, 它的最适生长温度为 80℃, 是目前嗜热古菌研究的一个模式菌株, 该菌株全基因组测序工作已经完成^[25]。

本研究根据 P2 基因组序列分析预测的分子伴侣基因设计引物, 首次克隆表达了硫矿硫化叶菌 P2 分子伴侣的 β 亚基, 纯化后对其进行体外聚合, 透射电镜观察表明该聚合体具有 II 型分子伴侣的经典结构, 功能分析表明该分子伴侣 β 亚基体外同源聚合体 (以

基金项目: 国家“863”重点课题(2004AA214080)

*通讯作者。Tel / Fax: +86-10-64807337; E-mail: dongzy@im.ac.cn

作者简介: 褚鑫(1983-), 男, 天津人, 硕士研究生, 研究方向为酶分子生物学。

收稿日期: 2008-05-29; 修回日期: 2008-06-06

下简称: β 分子伴侣)能够在体外促进异源蛋白质的折叠、提高其它酶分子的热稳定性。这为进一步深入研究嗜热古菌耐热抗逆的分子机制,奠定了良好的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒和总 DNA: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 和 BL21(DE3)为本实验室保存。克隆载体 pGEM-T vector 购于 Promega 公司,表达载体 pET-21a(+) vector 为本实验室保存。硫矿硫化叶菌 P2 基因组 DNA 为中国科学院微生物研究所黄力研究员惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器: 限制性内切酶、*Taq* 酶均购于 TaKaRa 公司, IPTG、X-gal、dNTP 均购于 Promega 公司。其它试剂均为进口或国产分析纯。PCR 仪购于 MJ 公司,超声波细胞破碎仪购于宁波新芝科器研究所,721 型分光光度计购于上海第三分析仪器厂,恒温摇床购于 NBS 公司,恒压恒流电泳仪购于北京市六一仪器厂,AKTA FPLC 购于 GE 公司,低温台式离心机购于 Sigma 公司,恒温水浴锅购于 LKB 公司,凝胶成像系统购于 Tanon 公司,超净工作台购于哈东联公司,超低温冰箱购于 Thermo 公司。

1.2 分子伴侣 β 亚基基因克隆及序列测定

质粒的提取、感受态细胞的制备、连接产物的转化等分子生物学基本操作参照文献[3]进行。

据 GenBank 上已报道的 P2 的分子伴侣 β 亚基预测的序列设计引物:上游引物:5'-GCTAGCGTGCCT-AAAATGGCAAC-3',序列中包含 *Nhe* I 的酶切位点;下游引物:5'-AAGCTTTTAGTCTTCAGAAGATTTT-TCTTC-3',序列中包含 *Hind*III的酶切位点。

以 P2 总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,反应条件为:94 $^{\circ}$ C 30 s,50 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10 min。回收 1.6 kb 左右的片断,并将其连接到 pGEM-T vector 上,转化 *E.coli* DH5 α 感受态细胞,在含有 Amp/IPTG/X-gal 的 LB 平板上筛选阳性白斑,PCR 鉴定后进行测序。

1.3 重组表达载体的构建

用限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Hind* III 将克隆到 pGEM-T vector 上的分子伴侣 β 亚基基因切下,同样用 *Nhe* I 和 *Hind* III 消化质粒 pET-21a(+),并将两者进行连接。将连接产物转化 *E.coli* DH5 α 感受态细胞,

对重组质粒进行扩增。挑取单克隆进行培养,碱法提取质粒,酶切鉴定。用鉴定结果为阳性的重组质粒转化 *E.coli* BL21 感受态细胞。

1.4 分子伴侣 β 亚基的体外聚合

将收集的菌体重新悬浮于缓冲液 A (20 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L MgCl₂, pH7.5) 中,4 $^{\circ}$ C 超声破碎后,12557 \times g 离心 15 min。将上清液置于 75 $^{\circ}$ C 保温 30 min,12557 \times g 离心 15 min 后于上清中加入(NH₄)₂SO₄ 至 80% 饱和度。将硫酸沉淀的蛋白质溶于缓冲液 A,上 Sephacryl S-200 柱子进行纯化。对纯化过程中收集的样品,用 SDS-PAGE 和 Native-PAGE 进行分析^[26]。

纯化后的 β 亚基(12.5 mg/mL)80 μ L,加入 ATP (50 mmol/L)10 μ L、MgCl₂ (100 mmol/L)10 μ L 以及不同量的(NH₄)₂SO₄ (2 mol/L),37 $^{\circ}$ C 保温 5 h,用 5% 的 Native-PAGE 分析 β 亚基的聚合情况。

1.5 β 分子伴侣的透射电镜观察

取适当稀释的 β 分子伴侣样品放置于铜网上,用 1% 的醋酸双氧铀负染色 2 min,用透射电镜 Tecnai 20 在 50000 倍率下观察 β 分子伴侣的形态。

1.6 β 分子伴侣的 ATPase 活力测定

参照 Baykov 等的方法进行^[4]。用孔雀石绿的方法测定释放的无机磷,A₆₃₀ 比色,以 ATP 的自水解为对照。ATPase 活力定义:每 mg 分子伴侣,每分钟分解 ATP 产生 1 μ mol 无机磷,定义为一个活力单位。

1.7 β 分子伴侣帮助 GFP 重新折叠

向绿色荧光蛋白 GFP (10 μ mol/L) 中加入 HCl 至终浓度 0.125 mol/L,室温(约 25 $^{\circ}$ C)变性 1 h,用缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl,25 mmol/L MgCl₂,100 mmol/L KCl)稀释 100 倍复性,同时加入 β 分子伴侣(终浓度 0.1 μ mol/L)和 ATP(终浓度 1 mmol/L),荧光分光光度计 Fluostar Optima,480 nm 激发,520 nm 发射,实时测定荧光变化,以 0.1 μ mol/L native GFP 荧光强度为 100%。以加入等摩尔比的牛血清白蛋白(BSA)后 GFP 的复性情况,以及 GFP 自身的稀释复性情况作为对照。

1.8 β 分子伴侣对 Xylanase 热稳定性的影响

将 β 分子伴侣与 Xylanase 以摩尔比 1:1 混合,加入 ATP 至终浓度 1 mmol/L,60 $^{\circ}$ C 保温 60 min,每 10 min 取样,测定残存酶活,以 0 min 时的酶活力为 100%。以加入等摩尔比的牛血清白蛋白(BSA)后 Xylanase 在 60 $^{\circ}$ C 时的热稳定性,以及 Xylanase 在 60 $^{\circ}$ C

时自身的热稳定性为对照。

2 结果

2.1 分子伴侣 β 亚基基因的克隆

本文以硫矿硫化叶菌 *Sulfolobus solfataricus* P2 的基因组 DNA 为模板, 用 PCR 的方法扩增分子伴侣 β 亚基基因。核苷酸序列测定结果表明: 此基因编码序列全长 1671 bp, 编码 557 个氨基酸, 与 GenBank 中预测的序列一致。

2.2 分子伴侣 β 亚基的表达、纯化

分子伴侣 β 亚基在大肠杆菌 BL21 中实现了高效表达, SDS-PAGE 表明该蛋白的分子量约为 60 kDa, 与预计的大小一致(见图 1)。同时, 我们还可以看出: IPTG 诱导与不诱导差别显著(图 1, 泳道 2 和 4); 超声破碎后, 将上清液置于 75℃保温 30 min, 可以去除绝大部分的杂蛋白(图 1, 泳道 5), 大大降低了后期纯化的难度。热处理后的超声破碎上清经硫酸铵沉淀后(图 1, 泳道 6), 上 Sephacryl S-200 柱子进行纯化, 纯化后的 β 亚基在 12.5% 的 SDS-PAGE 中呈单一条带(图 1, 泳道 7)。

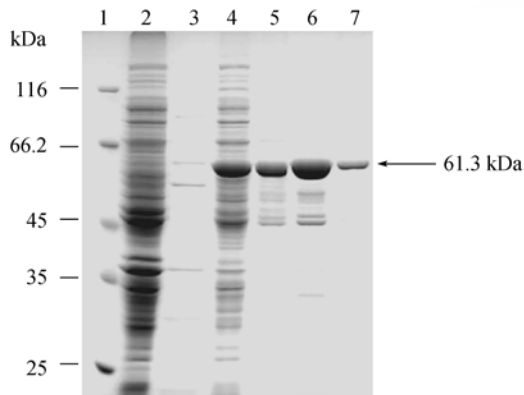


图 1 β 亚基在 BL21 中表达、纯化的 12.5% SDS-PAGE

Fig. 1 SDS-PAGE analysis on expression and purification of subunit β in BL21(DE3). 1. Protein Marker; 2. pET21a β /BL21; 3. pET21a β /BL21(heat treatment at 75°C for 30 minute); 4. pET21a β /BL21 induced by IPTG; 5. pET21a β /BL21 induced by IPTG (heat treatment at 75°C for 30 minute); 6. Ammonium sulfate precipitation; 7. Purification of subunit β .

2.3 分子伴侣 β 亚基的体外聚合

对纯化后的 β 亚基进行体外聚合实验, 用 5% 的 Native-PAGE 进行分析(图 2)。实验结果表明: 在 2.5 mol/L ATP 存在的条件下, β 亚基即可聚合, 但是聚合的不彻底(图 2-A, 泳道 2); 在 2.5 mol/L ATP、

5 mol/L Mg^{2+} 存在的条件下, 聚合的效果更好, 几乎全部的单体聚合为聚体(图 2-A, 泳道 5); 而硫酸铵对聚合反应的影响不大。在 2.5 mol/L ATP、5 mol/L Mg^{2+} 的条件下, 37℃保温 3 h 后 β 亚基已有大部分聚合, 随着保温时间的延长, 聚合反应继续进行; 保温 5 h 后, 绝大部分单体都已经聚合了(图 2-B)。

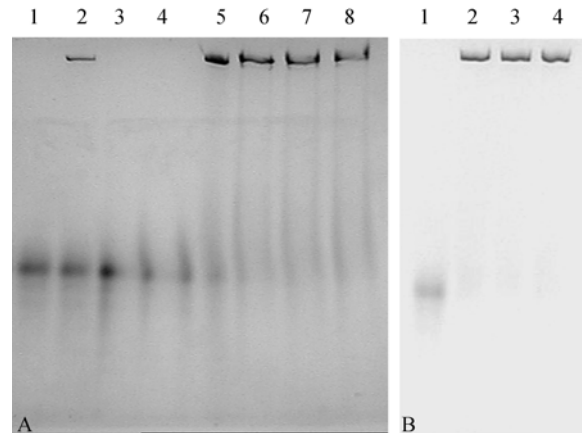


图 2 条件(A)和时间(B)对 β 亚基体外聚合的影响

Fig. 2 Effect of condition (A) and time (B) on the assembly of subunit β . (A): 1. Purified β monomer; 2. Assembly in the presence of 2.5 mmol/L ATP; 3. Assembly in the presence of 5 mmol/L Mg^{2+} ; 4. Assembly in the presence of 1 mol/L ammonium sulfate; 5. Assembly in the presence of 2.5 mmol/L ATP and 5 mmol/L Mg^{2+} ; 6. Assembly in the presence of 2.5 mmol/L ATP, 5 mmol/L Mg^{2+} and 0.5 mol/L ammonium sulfate; 7. Assembly in the presence of 2.5 mol/L ATP, 5 mmol/L Mg^{2+} and 0.7 mol/L ammonium sulfate; 8. Assembly in the presence of 2.5 mmol/L ATP, 5 mmol/L Mg^{2+} and 1 mol/L ammonium sulfate; (B): 1. Purified β monomer; 2. Assembly at 3 h; 3. Assembly at 4 h; 4. Assembly at 5 h.

2.4 β 分子伴侣的电镜观察

图 3 显示了体外聚合后 β 亚基形成聚体的电镜照片(50000 倍率下), 从照片中可以清晰的看出: 这些大分子复合物是环状的八聚体(每个环由八个亚基组成, 整个分子是十六聚体), 展现了分子伴侣典型的双层面包圈的结构特征。

2.5 β 分子伴侣的 ATPase 活性

图 4 显示了不同温度下 β 分子伴侣的 ATPase 活力情况, 可以看出: 从 55℃ ~ 85℃, β 分子伴侣都有 ATPase 活力, 最适反应温度为 80℃, 此时的 ATPase 活力为 0.048 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。

2.6 β 分子伴侣的功能

虽然在电镜下观察到了分子伴侣 β 亚基体外同源聚合体的分子伴侣典型结构, 也证实了其具有分子伴侣应具有 ATPase 活力, 但是究竟其是否具有分子

伴侣的基本功能——帮助变性蛋白重新折叠,下面将做进一步验证。

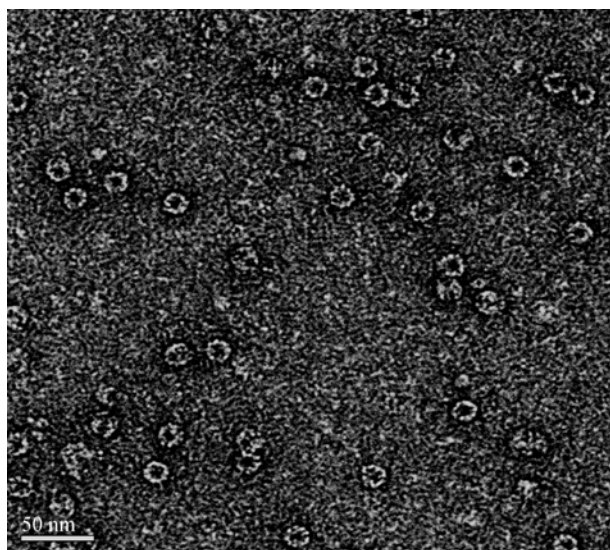


图 3 β 分子伴侣的电镜照片(50000 倍率)

Fig. 3 Electron micrograph of subunit β oligomeric complex (50000 \times).

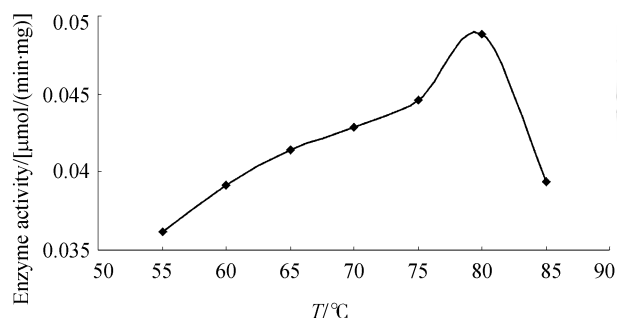


图 4 不同温度下 β 分子伴侣的 ATPase 活力

Fig. 4 ATPase activity of subunit β oligomeric complex in different temperature.

2.6.1 帮助 GFP 重新折叠:由图 5 可以看出:自身稀释释性的绿色荧光蛋白 (GFP), 其荧光强度仅仅可以达到原来的 30%; 加入牛血清白蛋白 (BSA) 的对照组, 其荧光强度可以达到原来的 40%; 而加入 β 分子伴侣后, GFP 的荧光强度可以恢复到原来的 70% 以上。这说明 β 分子伴侣确实起到了帮助变性的 GFP 重新折叠的作用, 而非是非特异性的蛋白保护作用。

2.6.2 提高木聚糖酶的热稳定性:由图 6 可以看出: 60°C 处理 60 min 后, 木聚糖酶的残存活力为初始的 55%; 加入牛血清白蛋白 (BSA) 的对照组, 其残存活力为初始的 60%。而加入 β 分子伴侣的木聚糖酶,

经 60°C 处理 60 min 后, 仍具有 80% 左右的活力, 比加入 BSA 的对照组高出 20%。因此, β 分子伴侣的加入, 确实可以有效的提高木聚糖酶的热稳定性。

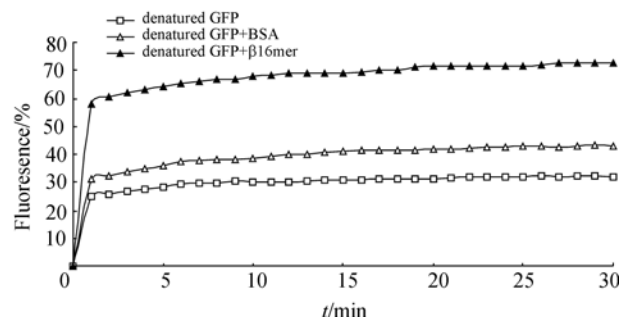


图 5 GFP 的重新折叠

Fig. 5 Renaturation of denatured GFP.

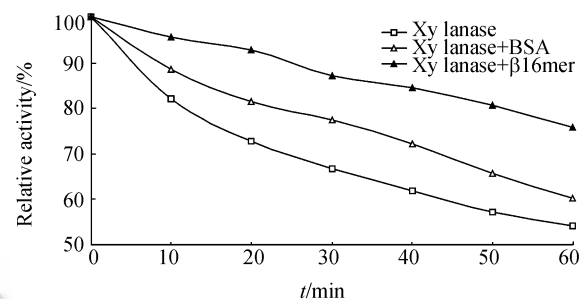


图 6 60°C 时木聚糖酶的热稳定性曲线

Fig. 6 Thermal stability of xylanase.

3 讨论

古菌一般都生活在极端条件下, 而古菌的分子伴侣恰恰能在极端环境下维持蛋白质的正确构像、帮助变性的蛋白重新折叠, 它们的存在对于古菌在各种极端环境条件下的适应性具有重要的意义。通过对古菌分子伴侣的研究, 可以进一步增加我们对极端环境生命抗逆分子机制的认识。

目前, 关于古菌分子伴侣的研究越来越引人注目, 许多古菌如: 芝田硫化叶菌 *Sulfolobus shibatae*^[12, 13], 嗜酸热原体 *Thermoplasma acidophilum*^[14], 嗜热古菌 *Sulfolobus* sp. Strain 7^[9, 15], 隐蔽热网菌 *Pyrodicticum occultum*^[16], 炽热火球菌 *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1^[17], 甲烷嗜热菌 *Methanopyrus kandleri*^[18], 硫矿硫化叶菌 *Sulfolobus solfataricus*^[19], 超高热球菌 *Thermococcus* strain KS-1^[8, 20, 21]等, 其分子伴侣结构及功能的研究都相继报道。

硫矿硫化叶菌 P2 是嗜热古菌的模式菌株, 开展其分子伴侣的研究具有重要的意义。因此本研究根据

GenBank 上推测的序列设计 PCR 引物, 成功的从 P2 总 DNA 中克隆得到分子伴侣 β 亚基的基因, 并通过大肠杆菌对其进行表达。纯化后的 β 亚基, 在一定条件下能够自行组装形成 II 型分子伴侣典型的环状结构。 β 分子伴侣的组装需要 ATP 的参与, Mg^{2+} 的存在能够进一步促进分子伴侣的组装, 而硫酸铵对于该分子伴侣的组装是非必须的。这与 Lissin NM^[22]和 Furutani M^[23]的研究结果类似。

在大肠杆菌中表达的 P2 分子伴侣 β 亚基具有良好的耐热性, 利用高温处理的方法就可以去除大肠杆菌中大部分的杂蛋白, 而该亚基能够保持正确的结构与功能。电泳分析表明 β 亚基在大肠杆菌表达产物中多以单体的形式存在, 经纯化后能够聚合形成完整的分子伴侣典型结构。

研究表明^[18,24]: ATPase 活力是分子伴侣行使功能所必须的, 古菌分子伴侣的 ATPase 活力有温度依赖性。一般来说, ATPase 活力的上限是略低于其解离为单亚基的温度, 接近于有机体的最适生长温度。本研究所得到的 β 分子伴侣同样表现出弱的 ATPase 活性, 最适温度为 80℃, 和其最适生长温度基本持平。

对变性的绿色荧光蛋白 (GFP) 重新复性的研究表明: β 分子伴侣可以有效的促进已变性的 GFP 在短时间内重新折叠, 形成正确的构象, 完美的诠释了分子伴侣的典型功能——帮助错误折叠的蛋白重新折叠成为有活性的构象。而 β 分子伴侣对木聚糖酶热稳定性的提高则可能是由于其不断地帮助热变性的木聚糖酶分子重新折叠成正确的构象, 从而提高该木聚糖酶的热稳定性的。无论是对于绿色荧光蛋白还是木聚糖酶, β 分子伴侣都可以发挥其功能, 因此该分子伴侣在促进蛋白质正确折叠、维持其结构稳定性方面是不分蛋白来源和种类的, 这也是 II 型分子伴侣所特有的性质。

本研究对于进一步探索古菌分子伴侣的结构与功能, 特别是嗜热古菌的耐热分子机制具有重要的意义。更加深入的研究, 我们将作进一步的报道。

致谢 感谢中国科学院微生物研究所黄力研究员为本职工作提供硫矿硫化叶菌 P2 的实验材料及学术指导。

参 考 文 献

[1] Frydman J. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperone. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70: 603–649.
[2] Phipps BM, Hoffmann A, Stetter KO, *et al.* A novel ATPase

complex selectively accumulated upon heat shock is a major cellular component of thermophilic archaeobacteria. *EMBO J*, 1991, 10: 1711–1722.
[3] J Sambrook. 分子克隆实验指南. 黄培堂等译. 北京: 科学出版社, 2002.
[4] Baykov AA, Evtushenko OA, Avaeva SM. A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal Biochem*, 1988, 171: 266–270.
[5] Kusmierczyk A, Martin J. Nested cooperative and salt dependence of ATPase activity of the archaeal chaperonin Mm-cpn. *FEBS Letters*, 2003, 547: 201–204.
[6] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 第一版. 北京: 科学出版社, 2002.
[7] 张龙祥, 张庭芳, 李令媛, 等. 生物化学实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1997.
[8] Yoshida T, Yohda M, Maruyama T, *et al.* Structural and functional characterization of homo-oligomeric complexes of α and β chaperonin subunits from the hyperthermophilic archaeum *Thermococcus* strain KS-1. *J Mol Biol*, 1997, 273: 635–645.
[9] Yoshida T, Yohda M, Suzuki M, *et al.* Characterization of homo-oligomeric complexes of α and β chaperonin subunits from the acidothermophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. Strain7. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 242: 640–647.
[10] Cerchia L, Rossi M, Guagliardi A. An archaeal chaperonin-based reactor for renaturation of denatured proteins. *Extremophiles*, 2000, 4: 1–7.
[11] 马晴, 张渝英. 腾冲嗜酸热两面菌 S5 分子伴侣 B 亚基的表达、纯化和活性的初步分析. *微生物学通报(Microbiology)*, 2007, 34(1): 28–31.
[12] Quate-Randall E, Trent JD, Josephs R, *et al.* Conformational cycle of the archaeosome, a TCP1-like chaperonin from *Sulfolobus shibatae*. *J Biol Chem*, 1995, 270: 28818–28823.
[13] Schoehn G, Quate-Randall E, Jiménez JL, *et al.* Three conformations of an archaeal chaperonin, TF55 from *Sulfolobus shibatae*. *J Mol Biol*, 2000, 296: 813–819.
[14] Nitsch M, Klumpp M, Lupas A, *et al.* The thermosome: alternating α and β -subunits within the chaperonin of the archaeon *Thermoplasma acidophilum*. *J Mol Biol*, 1997, 267: 142–149.
[15] Nakamura N, Taguchi H, Ishii N, *et al.* Purification and molecular cloning of the Group II chaperonin from the acidothermophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. Strain7. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 236: 727–732.
[16] Minuth T, Frey G, Lindner P, *et al.* Recombinant homo- and hetero-oligomers of an ultrastable chaperonin from the archaeon *Pyrodictium occultum* show chaperone activity in vitro. *Eur J Biochem*, 1998, 258: 837–845.

- [17] Izumi M, Fujiwara S, Takagi M, *et al.* Isolation and characterization of a second subunit of molecular chaperonin from *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1: analysis of an ATPase-deficient mutant enzyme. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 1801–1805.
- [18] Minuth T, Henn M, Rutkat K, *et al.* The recombinant thermosome from the hyperthermophilic archaeon *Methanopyrus kandleri*: in vitro analysis of its chaperone activity. *Biol Chem*, 1999, 380: 55–62.
- [19] Valle F, Dietler G, Londei P. Single-molecule imaging by atomic force microscopy of the native chaperonin complex of the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 288: 258–262.
- [20] Yoshida T, Ideno A, Hiyamuta S, *et al.* Natural chaperonin of the hyperthermophilic archaeum, *Thermococcus* strain KS-1: a hetero-oligomeric chaperonin with variable subunit composition. *Mol Microbiol*, 2001, 39: 1406–1413.
- [21] Kohda J, Yamada T, Yoshida T, *et al.* Refolding of proteins by hexadecamers and monomers of the α and β subunits of group II chaperonin from the hyperthermophilic archaeum *Thermococcus* strain KS-1. *Biochem Eng J*, 2004, 18: 73–79.
- [22] Lissin NM, Venyaminov SYu, Girshovich AS. (Mg-ATP)-dependent self-assembly of molecular chaperone GroEL. *Nature*, 1990, 348: 339–342.
- [23] Furutani M, Iida T, Yoshida T, *et al.* Group II chaperonin in a thermophilic methanogen, *Methanococcus thermolithotrophicus*. Chaperone activity and filament-forming ability. *J Biol Chem*, 1998, 273: 28399–28407.
- [24] Makino Y, Amada K, Taguchi H, *et al.* Chaperonin-mediated folding of green fluorescent protein. *J Biol Chem*, 1997, 272: 12468–12474.
- [25] She Q, Singh RK, Confalonieri F, *et al.* The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98: 7835–7840.
- [26] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227: 680–685.

Expression and characterization of chaperonin from *Sulfolobus solfataricus* P2

Xin Chu, Li Wang, Yongzhi He, Zhiyang Dong*

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: [Objective] To elucidate the structure and functional mechanism of β subunit of chaperonin from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. [Methods] Molecular cloning of the β subunit gene of chaperonin from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* P2 was performed by using PCR technique. The gene was expressed in BL21(DE3) of *Escherichia coli*. After purified and assembled *in vitro*, the structure of the β subunit homo-oligomer was observed by transmission electron microscope (TEM). The function of this homo-oligomer as a chaperonin was evaluated. [Results] The gene encoding β subunit of chaperonin was amplified by PCR from the genomic DNA of *Sulfolobus solfataricus* P2 and expressed in BL21(DE3) of *E. coli*. *In vitro*, the purified β monomer could assemble to a homo-oligomer in the presence of ATP and Mg^{2+} . As observed by transmission electron microscope(TEM), the β subunit homo-oligomer (β 16mer) showed a double-ring structure, which is typical in group II chaperonins. The optimum temperature for ATPase activity of the β 16mer was 80°C. The β 16mer was able to promote the refolding of denatured GFP and improve the thermostability of xylanase. [Conclusion] According to the prediction and analysis of the chaperonin sequence from thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* P2 genome, we cloned and expressed the β subunit of chaperonin from P2. This subunit formed a homo-oligomer *in vitro* and showed a typical structure of group II chaperonins. We found that the β 16mer was able to function correctly when promoting the refolding and improving the thermostability of some other proteins. Our research has laid a foundation for the further study on the molecular mechanism of thermoacidophilic archaeon.

Keywords: *Sulfolobus solfataricus*; chaperonin; protein folding