

## 酿酒酵母二腺苷四磷酸磷酸解酶 片段的表达、 纯化及晶体培养研究

李文哲<sup>1</sup>, 张钧玮<sup>1</sup>, 徐宁宇<sup>1</sup>, 周丛照<sup>2</sup>, 陈宇星<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092)

(<sup>2</sup> 中国科技大学生命学院, 合肥 230026)

**摘要:** 【目的】为了培养用于 X-衍射的酿酒酵母二腺苷四磷酸磷酸解酶 的蛋白晶体, 为研究该酶的三维结构和功能打下基础; 【方法】构建了表达酿酒酵母二腺苷四磷酸磷酸解酶 片段(Apa1dn16)的表达质粒, 用核苷酸序列分析证明了克隆片段的正确性。将重组载体转化大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导后, 用 SDS-PAGE 检测了蛋白的表达情况。将粗蛋白用 Ni-NTA 亲和层析分离, 收集组分进一步用 Superdex 75 分子筛纯化。纯化后的蛋白用 SDS-PAGE 和质谱检验其纯度和正确性, 然后用悬滴气相扩散法进行了蛋白结晶条件的初筛。【结果】成功地用大肠杆菌可溶性地高效表达了 Apa1dn16 蛋白。得到了分子量约为 36 kD 的单一蛋白条带, 纯度在 95% 以上。质谱结果证明该蛋白纯度高, 分子量正确。将纯化后的蛋白用悬滴气相扩散法进行晶体初筛, 得到了针状簇晶。此晶体经 SDS-PAGE 检测, 证明为 Apa1dn16 蛋白晶体。【结论】利用大肠杆菌高效表达体系可以正确表达 Apa1dn16 蛋白, 蛋白经过纯化后, 用悬滴气相扩散法可以生长出针状晶体, 适合于进一步的三维结构研究。

**关键词:** 二腺苷四磷酸磷酸解酶 ; 酿酒酵母 ; 表达 ; 纯化 ; 结晶

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 11-1537-06

二腺苷四磷酸 (doadenosine 5',5'-bisphosphate, Ap<sub>4</sub>A) 是一种特殊核苷酸, 它存在于从原核到真核生物的所有细胞中。在细胞中 Ap<sub>4</sub>A 的浓度约为 0.05 ~ 100 μmol/L<sup>[1]</sup>, 它作为一个细胞内和细胞外的调控分子可能具有重要的生理作用。如: 在发生热休克或者氧化应激时, 细胞内的 Ap<sub>4</sub>A 浓度会骤然增加, 因而, Ap<sub>4</sub>A 被当作细胞应激反应的报警器<sup>[2]</sup>。Ap<sub>4</sub>A 可能与 DNA 复制的起始、应激信号转导、DNA 修复、细胞分裂时间控制等生理功能相关, 还可能是细胞凋亡和分化的信号因子<sup>[3]</sup>。研究发现, 这一类核苷酸在体内的合成途径主要是作为蛋白质合成的副产物而产生。随着蛋白质的合成, 不可避免的会产生

Ap<sub>4</sub>A<sup>[4,5]</sup>。这种核苷酸的积累会对体内的一些关键酶如腺苷酸激酶和蛋白激酶等有抑制作用<sup>[6,7]</sup>, 因此, 生物体内 Ap<sub>4</sub>A 的降解途径对保持细胞内这类核苷酸的平衡也是非常重要的。

从原核生物到人类都存在着特异性的酶催化 Ap<sub>4</sub>A 的降解。高等真核生物以及人类中降解 Ap<sub>4</sub>A 的酶为分子量较低 (17-21 kDa) 的 Ap<sub>4</sub>A 非对称水解酶 (EC 3.6.1.17), 它们水解 Ap<sub>4</sub>A, 产生 AMP 和 ATP。人类和猪的 Ap<sub>4</sub>A 水解酶已经被克隆和测序, 它们的序列中含有 MutT 核苷焦磷酸水解酶结构域。在低等生物中, 催化降解 Ap<sub>4</sub>A 的酶随物种不同而各不相同, 如: 非细胞的多头绒泡菌 (*Physarum polycephalum*)

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30670461)

\*通讯作者: Tel: +86-551-3602492; E-mail: cyxing@ustc.edu.cn

作者简介: 李文哲(1973-), 女, 河北博野人, 在职博士研究生, 从事蛋白质结构与功能的研究。E-mail: lwz@mail.tongji.edu.cn

收稿日期: 2008-05-30; 修回日期: 2008-07-16

和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 等原核生物中存在对称的  $Ap_4A$  水解酶 (EC 3.6.1.41), 可以水解  $Ap_4A$  产生两分子的 ADP<sup>[8]</sup>。裂殖酵母 (*Saccharomyces pombe*) 中发挥降解  $Ap_4A$  功能的酶是以 49 kDa 二聚体形式存在的非对称  $Ap_4A$  水解酶, 它的序列和酶学性质与高等真核细胞都有明显的差别, 但却与酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中特异性的  $Ap_3A$  水解酶相似。人类中与此酶同源的蛋白为 Fhit, 该蛋白在肾、消化道和肺癌中是普遍缺陷的, 这说明  $Ap_3A$  或  $Ap_4A$  水平的升高对细胞来说也许是至关重要的。

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 降解  $Ap_4A$  的方式比较特殊, 它的基因组共编码两个同源的二腺苷四磷酸磷酸解酶 (Apa1 和 Apa2), 它们之间的同源率为 60%, 均存在于细胞质和细胞核中<sup>[9]</sup>。酿酒酵母 Apa1 和 Apa2 能可逆地催化  $Ap_4A$  磷酸解为 ATP 和 ADP, 还可以催化从 AMPS 和 ATP 合成  $Ap_4A$ , 以及 NDP 和磷酸之间的磷酸基的相互交换反应。此外, 它还具有 ADP 硫酸化酶的特性, 能催化 AMPS 和  $P_i$  转换为 ADP 和 S。缺失 Apa1 和 Apa2 的酿酒酵母细胞仍然能够存活, 但都存在细胞内的  $Ap_4A$  浓度升高现象。迄今为止, 还没有 Apa1 和 Apa2 的同源蛋白的结构被解析。因此, 我们以 Apa1 的蛋白晶体培养入手, 希望最终能够解析 Apa1 和 Apa2 的结构。这将有助于我们了解二腺苷四磷酸磷酸化酶的催化机理, 并且通过三维结构来解释这一大类磷酸化酶在细胞中的生物学功能。

在前期工作中, 我们表达了共 321 个氨基酸的 Apa1 全长序列, 但经过筛选, 未得到蛋白晶体。在本实验中, 我们用酵母数据库 (<http://www.yeastgenome.org>) 中的相关工具分析了 Apa1 蛋白的氨基酸序列, 发现该蛋白的 N 端约 16 个氨基酸处在功能区域之外, 因此我们表达了 His-Tag 与 Apa1 蛋白第 17-321 位氨基酸的融合蛋白, 即去除了全长蛋白的 16 个 N 端氨基酸, 记为 Apa1dn16。经过纯化后筛选出了粗晶, 为 Apa1 的结构与功能研究提供了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和载体**: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 菌株购自 Novagen 公司, p28 质粒为 pET28 衍生质粒, 由本实验室提供。大肠杆菌 Top10 菌株由本实验室保存。

**1.1.2 主要试剂和仪器**: 质粒小量抽提试剂盒和胶回收试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限公司; IPTG、硫酸卡那霉素和其他生化试剂购自上海生工生物工程技术服务有限公司; Hotstart Taq DNA 聚合酶购自天根生化科技有限公司; 限制性内切酶购自纽英伦生物技术有限公司; DNA 连接酶和 Marker 购自宝生物工程有限公司和纽英伦生物技术有限公司;  $Ap_4A$  购自 Sigma-Aldrich 贸易有限公司; 蛋白晶体筛选试剂盒购自 Hampton Research 公司。实验中所用的仪器有: 宁波新芝生物科技股份有限公司 JY92-2D 型超声波细胞粉碎机; Hitachi CR22-G 型高速冷冻离心机; GE AKTA prime plus 纯化系统, 配有 Hiload 16/60 Superdex 75 column; Bio-Rad Universal Hood II 型凝胶成像系统, 配有 Quantity One 凝胶定量分析软件; Applied Biosystems Q Trap LC/MS system 质谱仪; Berthold FB12 luminometer 发光检测仪。DNA 测序委托上海英骏生物技术有限公司完成。

### 1.2 Apa1dn16 表达质粒的构建

根据酿酒酵母 *apa1* 基因序列, 设计出了扩增 *apa1dn16* 片段的一对引物, 并在各自的 5' 端加上酶切位点。以酿酒酵母测序标准菌株 S288C 基因组为模板, 采用高保真 HotStart Taq 酶, PCR 扩增目的基因; PCR 条件为: 94 10 min; 94 30 s, 57 30 s, 72 1 min, 32 个循环。PCR 产物经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后割胶回收, 双酶切并纯化后, 与线性化 p28 质粒在 T4 连接酶的作用下 16 连接过夜。连接产物转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞, 通过卡那抗性 LB 平板结合菌落 PCR 筛选鉴定出阳性重组子。经 DNA 测序证明插入序列的正确性。

### 1.3 Apa1dn16 蛋白的表达

将重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 37 培养 12~16 h 后挑单克隆接种于含卡那霉素的 500 mL LB 培养基中, 37 , 200 r/min 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 约为 0.6 时, 加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L。18 , 200 r/min 诱导 20 h 后, 于 4 , 8470 × g 离心 10 min 收菌。菌体用 20 mL 100 mmol/L, pH 7.8 的磷酸钾缓冲液重悬后, SDS-PAGE 检测表达情况。冰浴超声法破碎菌体后, 24100 × g 离心 30 min, 上清和沉淀分别上样 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色法检测表达蛋白的溶解性。

### 1.4 Apa1dn16 蛋白的纯化

500 mL 诱导后的菌液离心后, 菌体沉淀用 20 mL

100 mmol/L pH 7.8 的磷酸钾缓冲液重悬,振荡均匀后,冰浴超声破碎菌体。超声液于 4 °C, 24100 × g 离心 30 min, 上清为粗蛋白液。以 1.0 ml/min 的速度将粗蛋白液上样 Ni-NTA 亲和层析柱,用 100 mmol/L pH 7.8 的磷酸钾,咪唑缓冲液梯度洗脱,分段收集洗脱组分,用 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色法检验目的蛋白的纯度。

收集纯度较高的 Apa1dn16 蛋白组分,上样 Hiload 16/60 superdex 75 分子筛层析柱,以 1.0 ml/min 的流速洗脱,洗脱液为 20 mmol/L Tris·HCl pH 8.5, 100 mmol/L NaCl, 5% 甘油。分段收集洗脱组分,SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色后检验目的蛋白的纯度,进一步用质谱证明目的蛋白的分子量和纯度。

### 1.5 Apa1dn16 蛋白的活性测定

采用萤火虫荧光素酶法<sup>[10]</sup>测定了纯化蛋白的活性。测活体系为 50 μL 40 mmol/L HEPES/KOH, pH 8.0, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 5 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mmol/L 2-巯基乙醇, 50 μmol/L Ap<sub>4</sub>A。活性测定在 25 °C 进行,通过向测活体系中加入 Apa1dn16 蛋白开始酶反应,通过监测 2 min 内的发光量,得出酶反应中 ATP 的生成量,进而得出酶活性。

### 1.6 Apa1dn16 蛋白的晶体初筛和鉴定

将纯化好的蛋白浓缩至 10 mg/mL,以 2 倍摩尔比加入其底物 Ap<sub>4</sub>A,用 Hampton Research Crystal Screen Kit、Kit 和悬滴气相扩散法进行蛋白结晶条件的初筛,并对晶体进行了初步的优化。将晶体挑出用下槽液洗涤 5 次以上,上样 SDS-PAGE 检测其是否为蛋白晶体。

## 2 结果

### 2.1 apa1dn16 基因的扩增

编码 Apa1dn16 蛋白的 *apa1dn16* DNA 片段理论分子量应为 918 bp,本实验中的 PCR 产物经琼脂糖电泳检测,与 marker 比较,显示其大小正确。

### 2.2 apa1dn16 基因的克隆和重组质粒的筛选鉴定

PCR 产物经过酶切、连接后转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞。通过卡那霉素抗性的 LB 平板和菌液 PCR 筛选出阳性重组子 1 个。用 T7 启动子通用引物对重组质粒测序,证明重组质粒序列正确,已在 p28 质粒中定向插入了 *apa1dn16* 基因,p28-Apa1dn16 质粒构建成功。

### 2.3 Apa1dn16 蛋白的表达

重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态,

诱导表达后收菌。菌体用缓冲液重悬,SDS-PAGE 检测表达情况。结果说明 Apa1dn16 蛋白在重组的大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达量很高。经过超声破碎菌体和离心后,分别检测上清和沉淀中目的蛋白的表达情况,发现该蛋白部分可溶(图 1),收集上清为粗蛋白液。

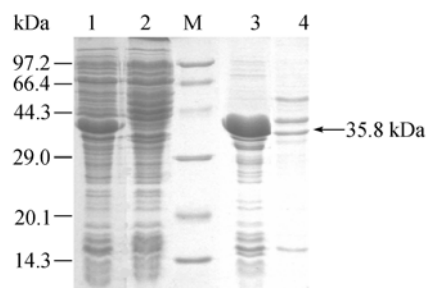


图 1 SDS-PAGE 检测 Apa1dn16 蛋白的表达和溶解情况  
Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the expression and solubility of Apa1dn16 protein. 1. Supernatant of bacterial extracts of BL21(DE3) harboring p28-Apa1dn16 after IPTG induction; 2. Supernatant of bacterial extracts of BL21(DE3) harboring p28-Apa1dn16 before IPTG induction; 3. Pellet of bacterial extracts of BL21(DE3) harboring p28-Apa1dn16 after IPTG induction; 4. Pellet of bacterial extracts of BL21(DE3) harboring p28-Apa1dn16 before IPTG induction; M. Low molecular weight protein marker.

### 2.4 Apa1dn16 蛋白的纯化

**2.4.1 Apa1dn16 蛋白的纯化过程:** Apa1dn16 粗蛋白液经过 Ni-NTA 亲和层析、咪唑梯度洗脱后,分别收集洗脱组分,采用 SDS-PAGE 结合考马斯亮蓝染色检测蛋白纯度,结果显示(图 2-A),该蛋白在实验缓冲体系中,可以用 80 mmol/L 以上的咪唑洗脱。但为了保证蛋白的纯度,我们只收集了相对较纯的 160 ~ 500 mmol/L 的咪唑洗脱蛋白液(图 2-A 中的 4-6 道),用超滤管浓缩后,上样 Hiload Superdex 75 分子筛分离,UV<sub>280 nm</sub> 监测流出物的蛋白含量,图 2-B 为纯化的层析图。

**2.4.2 Apa1dn16 蛋白的纯度鉴定:** 由图 2-B 可见, Apa1dn16 蛋白在用 Superdex 75 分子筛分离时,产生了两个没有完全分离的峰,第一个峰在 40 mL 左右出峰,在 48 mL 处达到最高,该峰可能为 Apa1dn16 蛋白的多聚体所产生。第二个峰在 56 mL 左右达到最高,在 65 mL 左右结束。分段收集这两个峰对应的蛋白组分,用 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色检测蛋白的纯度,结果如图 3-A 所示。电泳条带经过 Bio-rad Quantity One 凝胶定量分析软件处理后,证明图 2-B 中的第二个峰所对应的洗脱组分中(图 3-A 中的第 3 道),Apa1dn16 蛋白的纯度已经达到 95% 以上。

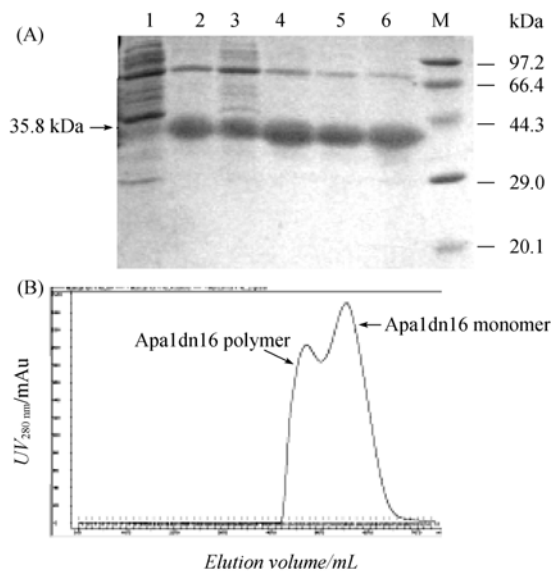


图 2 (A)Apa1dn16 粗蛋白 Ni-NTA 亲和层析洗脱组分 SDS-PAGE 图; (B)Apa1dn16 蛋白 UV<sub>280 nm</sub> 处的 Superdex 75 洗脱曲线

Fig. 2 (A) SDS-PAGE of Ni-NTA column elution of Apa1dn16 protein crude extract. 1. fraction of 40 mmol/L imidazole; 2. fraction of 80 mmol/L imidazole; 3. fraction of 120 mmol/L imidazole; 4. fraction of 160 mmol/L imidazole; 5. fraction of 200 mmol/L imidazole; 6. fraction of 500 mmol/L imidazole; M. Low molecular weight protein marker. (B) Gel filtration of Apa1dn16 protein on Superdex 75 column at UV<sub>280 nm</sub>.

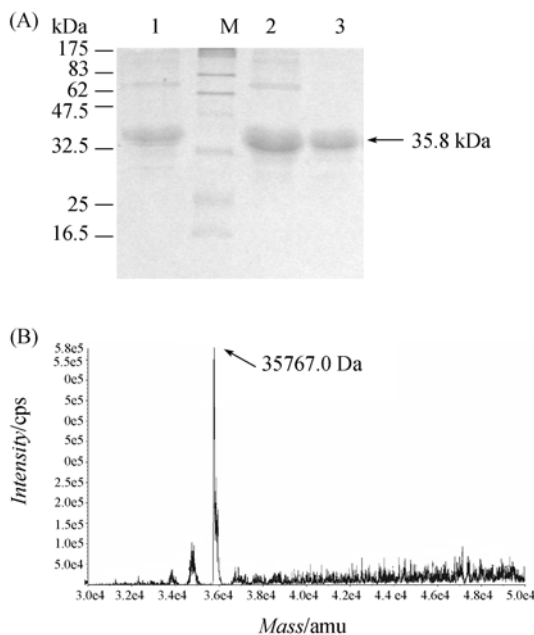


图 3 (A)Apa1dn16 蛋白的 Superdex 75 纯化组分电泳图; (B)纯化后的 Apa1dn16 蛋白质谱图

Fig. 3 (A) SDS-PAGE of Apa1dn16 Superdex 75 fractions. 1 and 2 correspond to the pooled fractions from front and back of the first superdex 75 column eluted peak of Fig.2-B; 3. correspond to the pooled fractions from the second eluted peak of superdex 75; M. the Prestained Protein Marker #P7708S from NEB company. (B) Mass Spectrum result of purified Apa1dn16 protein.

纯化后的蛋白经过脱盐后,用质谱检验其分子量和纯度。质谱仪为 ABI 公司 Q-Trap (API 2000) 型质谱仪,采用电喷雾离子阱法分析 Apa1dn16 蛋白的分子量;喷雾电压为 5500 V,经过 Analyst 1.4 数据处理软件得到的质谱图如图 3-B 所示。图中主峰出现在分子量 35767.0 Da 处,而 Apa1dn16 融合蛋白理论分子量为 35769.6 Da,二者的差别在质谱误差允许范围之内。由以上的结果证明,经过纯化后,所得到的 Apa1dn16 蛋白纯度高,分子量正确,适合用于蛋白晶体的培养。

## 2.5 Apa1dn16 蛋白活性的测定

将纯化后的蛋白在 40 mmol/L HEPES/KOH pH 8.0 缓冲体系中测定其活性。结果表明,该蛋白具有磷酸解 Ap<sub>4</sub>A 产生 ATP 的活性。如果将酶活力单位定义为在最适反应条件下,温度 25℃,每分钟内催化 1 μmol 底物转化为产物所需的酶量为一个酶活力单位(IU),则本试验所得到的纯 Apa1dn16 蛋白的 Ap<sub>4</sub>A 磷酸解活性为 0.039 IU/μL。测定蛋白浓度后得到该 Apa1dn16 蛋白的比活力为 4.48 IU/mg 蛋白。

## 2.6 Apa1dn16 蛋白晶体筛选和初步鉴定

Apa1dn16 蛋白浓缩至 10 mg/mL 后,加入 2 倍摩尔比的 Ap<sub>4</sub>A,采用悬滴法进行在 Hampton Research Crystal 和 的结晶条件初筛。经过 16 培养 15 d 后,在 0.1 mol/L Tris·HCl pH 8.5, 0.2 mol/L NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50% MPD 中生长出了 X 形的粗晶体。为了避免铵盐晶体析出,在优化晶体过程中将 NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 去除后,培养出了针状晶体(图 4-A)。将此晶体挑出用下槽液

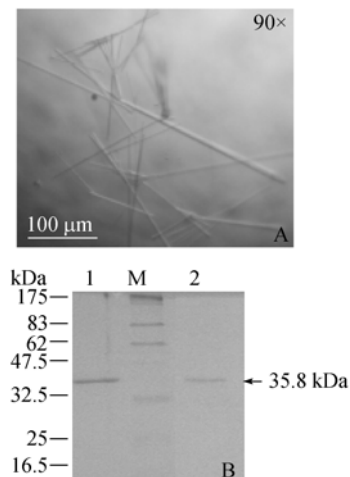


图 4 (A)悬滴法得到的酿酒酵母 Apa1dn16 针状晶体照片 (90×); (B)针状晶体的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 (A) Needle crystals of *Saccharomyces cerevisiae* Apa1dn16 obtained by hanging-drop vapour-diffusion method (90×). (B) SDS-PAGE of Apa1dn16 crystals. Lane 1. purified Apa1dn16 protein; 2. needle crystals of Apa1dn16; M. Marker.

洗涤 5 次以上,上样 SDS-PAGE,结果(图 4-B)证明该针状晶体为蛋白晶体。由于该蛋白晶体还未达到衍射要求,后续的晶体优化工作还在进行之中。

### 3 讨论

Ap<sub>4</sub>A 在二腺苷四磷酸磷酸化酶的催化下可以磷酸解为 ADP 和 ATP,以应对细胞在受到各种胁迫时的能量需求。酿酒酵母 Apa1 和 Apa2 在催化中形成酶-AMP 的中间态,磷酸解 Ap<sub>4</sub>A 而产生 ATP<sup>[11]</sup>。每个处于对数生长期的酿酒酵母细胞中含有的 Apa1 蛋白的分子数为 19600 个左右,这说明酿酒酵母细胞中 Apa1 具有相当重要的生理功能。

在本次试验中,我们用大肠杆菌原核表达体系高效表达了 Apa1dn16 蛋白。为了避免大肠杆菌本身的 Ap<sub>4</sub>A 水解酶活性的影响,在测定酶活性时我们使用的是纯化后的 Apa1dn16 蛋白。大肠杆菌的 Ap<sub>4</sub>A 水解酶分子量为 31 kDa,在经过亲和层析和分子筛分离后,用 SDS-PAGE 和质谱都未检测到该酶的污染。另外,大肠杆菌中本身虽含有 Ap<sub>4</sub>A 水解酶,但该酶是对称水解酶,它水解 Ap<sub>4</sub>A 得到的产物是两分子 ADP;且该水解反应需要 Co<sup>2+</sup>激活。本文中使用的荧光素酶-荧光素测活体系只有在 ATP 作用下才能产生荧光,ADP 分子中因为不含高能键,是不能产生荧光的。实验中的酶活测定体系在配制时也无 Co<sup>2+</sup>污染。因此,大肠杆菌本身含有的 Ap<sub>4</sub>A 水解酶对酶活性的测定不会造成影响。所以我们认为,本文选取的表达和酶活测定体系是合适的。

在 Apa1dn16 分子筛纯化时,层析图中出现两个重叠的峰。第一个峰在外水体积流出,说明其中的蛋白质分子量超过了 Superdex 75 柱的分离范围,在 70 kDa 以上。这可能是由于高效表达的蛋白存在二聚体或多聚体。该峰的蛋白在 SDS-PAGE 图中显示出有较多的杂蛋白,不适合用于后续实验。由文献可知,Apa1 蛋白在细胞内是以单体的形式存在的,在本实验中出现多聚体可能是因为高效表达时,蛋白折叠不正确或者是由于 His-tag 的引入和 N 端的切除所造成的。而层析图中出现的第二个峰经过 SDS-PAGE 和质谱检测,证明分子量正确、纯度高,适合用于后续实验。由此可知,在高效表达时,仅从 SDS-PAGE 图判断蛋白的表达情况是不全面的,必须结合其他手段测定目的蛋白的分子量才能收集到正确折叠的蛋白样品。

纯化后的 Apa1dn16 蛋白经过测定,发现其活性

较低,这可能是由于原核表达体系在表达真核细胞蛋白时,表达量大造成蛋白无法正确折叠;也可能是因为去掉的 N 端 16 个氨基酸中包含有对底物结合或催化有影响的重要氨基酸残基所造成的。具体原因将在后续试验中进行探讨。

在前期工作中,我们在原核生物中超量表达了 Apa1 的全长蛋白,但经过初筛,没有培养出蛋白的结晶。在经过序列分析后,我们去除了 Apa1 蛋白的 N 端非结构域序列 16 个氨基酸,经过克隆、表达纯化后得到了可溶性的 Apa1dn16 蛋白。通过尝试底物与蛋白共结晶,最终得到了蛋白的针状晶体。这为我们进行后续的晶体优化,推断 Ap<sub>4</sub>A 的磷酸解机理打下了基础,同时也为体内核苷酸代谢的研究提供了素材,这些工作至今尚无人报道。实验中得到的晶体因为直径太小,还无法用于衍射数据的收集,因此,今后本研究的工作重点将集中在晶体生长条件的优化上。

致谢 感谢同济大学蛋白质研究所为本项目提供实验条件!

### 参 考 文 献

- [1] Zamecnik P. Diadenosine 5', 5'''-P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-tetrphosphate (Ap<sub>4</sub>A): Its role in cellular metabolism. *Ana Biochem*, 1983, 134(1): 1-10.
- [2] Plateau P, Fromant M, Schmitter JM, *et al.* Isolation, characterization, and inactivation of the APA1 gene encoding yeast diadenosine 5',5'''-P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup> tetrphosphate phosphorylase. *J Biol Chem*, 1989, 171(12): 6437-6445.
- [3] Vartanian A, Alexandrov I, Prudowski I, *et al.* Ap<sub>4</sub>A induces apoptosis in human cultured cells. *FEBS Lett*, 1999, 456(1): 175-180.
- [4] Brevet A, Plateau P, Cirakoglu B, *et al.* Zinc-dependent synthesis of 5',5'-Diadenosine tetrphosphate by sheep liver lysyl- and phenylalanyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem*, 1982, 257(24): 14613-14615.
- [5] McLennan AG. Ap<sub>4</sub>A and Other Dinucleoside Polyphosphates. 1st. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc, 1992.
- [6] Purich DL, Fromm HJ. Inhibition of rabbit skeletal muscle adenylate kinase by the transition state analogue P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup>-di(adenosine-5') tetrphosphate. *Biochim Biophys Acta*, 1972, 276(2): 563-567.
- [7] Lienhard GE, Secemski II. P<sup>1</sup>,P<sup>5</sup>-Di(adenosine-5') pentaphosphate, a potent multisubstrate inhibitor of adenylate kinase. *J Biol Chem*, 1973, 248(3): 1121-1123.
- [8] Barton GJ, Cohen PT, Barford D. Conservation analysis and structure prediction of the protein serine/threonine phosphatases.

- Sequence similarity with diadenosine tetraphosphatase from *Escherichia coli* suggests homology to the protein phosphatases. *Eur J Biochem*, 1994, 220(1): 225–237.
- [9] Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, *et al.* Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, 2003, 425(16): 686–691.
- [10] McLennan AG, Mayers E, Hankin S, *et al.* The green alga *Scenedesmus obliquus* contains both diadenosine 5',5'''-P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup>-tetraphosphate (asymmetrical) pyrophosphohydrolase and phosphorylase activities. *Biochem J*, 1994, 300(1): 183–189.
- [11] Booth JW, Guidotti G. An alleged yeast polyphosphate kinase is actually diadenosine-5', 5'''-P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-tetraphosphate alpha, beta-phosphorylase. *J Biol Chem*, 1995, 270(33): 19377–19382.

## Expression, purification and crystallization of a truncated *Saccharomyces cerevisiae* diadenosine 5',5'''-P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-tetraphosphate phosphorylase

Wenzhe Li<sup>1</sup>, Junwei Zhang<sup>1</sup>, Ningyu Xu<sup>1</sup>, Congzhao Zhou<sup>2</sup>, Yuxing Chen<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Life Science and Technology Tongji University, Shanghai 200092, China)

<sup>2</sup>School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

**Abstract:** [Objective] To obtain the crystal of 5',5'''-P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-tetraphosphate phosphorylase I (Apa1) of *Saccharomyces cerevisiae* for X-ray crystal structure and function analysis. [Methods] We amplified the coding region of an N-terminally truncated version of *Saccharomyces cerevisiae* diadenosine 5',5'''-P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-tetraphosphate phosphorylase I (Apa1dn16), and cloned it into the pET28 derived expression vector. After having screened the recombinant plasmids by PCR and confirmed them by DNA sequencing, we transformed a positive recombinant plasmid into the *Escherichia coli* BL21(DE3) cells for efficient expression. Then the expression and solubility of the recombinant Apa1dn16 protein were analyzed by SDS-PAGE after proper concentration of IPTG induction. Following that, we collected the soluble Apa1dn16 protein and purified it to homogeneity by sequential Ni-NTA affinity chromatography and Superdex 75 gel filtration, and then detected the purity and molecular weight of the desired protein by SDS-PAGE and mass spectrometry. In addition, we screened the crystallization conditions of Apa1dn16 with Hampton Research kits using the hanging drop vapor diffusion method. [Results] We efficiently expressed an N-terminally truncated *Saccharomyces cerevisiae* diadenosine 5',5'''-P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup>-tetraphosphate phosphorylase I in *Escherichia coli* BL21(DE3). The recombinant protein was partially soluble and was purified to homogeneity with a single band of ~36 kDa after SDS-PAGE. Mass spectrometry analysis further confirmed the purity and intactness of the recombinant protein. Moreover, we obtained the needle crystals of Apa1dn16 by hanging drop vapor diffusion method. [Conclusion] *Escherichia coli* BL21(DE3) is an efficient expression system for producing enough quantity of Apa1dn16 protein. The purified recombinant Apa1dn16 protein is suitable for crystallization and further structural investigation.

**Keywords:** diadenosine 5',5'''-P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-tetraphosphate phosphorylase ; *Saccharomyces cerevisiae*; overexpression; purification; crystallization

Supported by the Chinese National Natural Science Foundation (30670461)

\*Corresponding author. Tel: +86-551-3602492; E-mail: cyxing@ustc.edu.cn

Received: 30 May 2008/ Revised: 16 July 2008