

D1 蛋白酶的克隆表达、纯化、生物活性测定及多克隆抗体的制备

李慧^{1*}, 张巍^{1*}, 申明霞¹, 李伟国², 刘艳丽¹, 刘素芳², 祁超¹

1 华中师范大学生命科学学院 遗传调控与整合生物学湖北省重点实验室, 武汉 430079

2 华中师范大学化学学院 农药与化学生物学教育部重点实验室, 武汉 430079

摘要: 为了开发以 D1 蛋白酶作为靶标的新型除草剂, 需要对先导化合物的生物活性进行检测和筛选。从菠菜中提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 采用 PCR 扩增了 CtpA 的基因, 连接至表达载体 pET-28a 中, 构建了重组表达质粒, 并在大肠杆菌 BL21(DE3) 中进行高效表达, 通过降低 IPTG 和诱导温度获得了可溶性表达的重组蛋白酶。采用 Ni-NTA 亲和层析和凝胶过滤柱层析对重组蛋白进行了纯化, SDS-PAGE 和 Western blotting 结果证实目的蛋白为含有 His-tag 的融合蛋白。以合成的 D1 前体蛋白羧基端 24 肽作为模拟底物, 采用高效液相色谱法测定了其水解活性, 结果表明活性可达 1.10 nmol/(mg·min), 为文献报道数据的 15 倍。纯化后的 CtpA 蛋白免疫日本的长耳大白兔制备多克隆抗体, ELISA 法测定其血清抗体的效价高达 1: 100 000。该结果为抑制剂先导化合物的筛选和酶蛋白与化合物的作用机理研究提供了必要的基础。

关键词: D1 蛋白酶, 表达, 纯化, 生物活性, 多克隆抗体

Cloning, expression, purification of spinach carboxyl-terminal processing protease of D1 protein with hydrolysis activity and preparation of polyclonal antibody

Hui Li^{1*}, Wei Zhang^{1*}, Mingxia Sheng¹, Weiguo Li², Yanli Liu¹, Sufang Liu², and Chao Qi¹

1 Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation & Integrative Biology, College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079, China

2 Key Laboratory of Pesticide & Chemical Biology, Ministry of Education, College of Chemistry, Central China Normal University, Wuhan 430079, China

Abstract: Carboxyl-terminal processing protease of D1 protein (CtpA) catalyzes carboxyl terminal processing of the D1 protein of photosystem II, which is essential for the assembly of a manganese cluster and consequent light-mediated water oxidation. It is a target for the discovery of wide-spectrum herbicide. We amplified the CtpA gene from spinach cDNA with standard PCR method

Received: November 8, 2009; **Accepted:** February 2, 2010

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 20702017, 30670429), Key Project of Chinese Ministry of Education (No. 107082), Natural Science Foundation of Hubei Province of China (No. 2007ABA141).

*These authors contributed equally to this study.

Corresponding author: Weiguo Li. E-mail: weiguoli@mail.ccnu.edu.cn

Chao Qi. Tel: +86-27-67862703; E-mail: qichao@mail.ccnu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 20702017, 30670429), 教育部科学技术研究重点项目 (No. 107082), 湖北省自然科学基金 (No. 2007ABA141) 资助。

and constructed it into pET-28a vector to generate a recombinant expression plasmid. Recombinant CtpA fusion protein with His-tag was expressed as soluble protein in *Escherichia coli* BL21(DE3) after induction with 0.1 mmol/L IPTG at 8°C for 72 h. We purified the CtpA protein with the Ni-NTA affinity chromatography and Superdex 75 gel filtration chromatography respectively, and verified the protein by SDS-PAGE and Western blotting with anti-his antibody. Hydrolysis activity of CtpA was assayed by HPLC method with a synthetic 24-mer oligopeptide corresponding to carboxyl terminal of precursor D1 protein, and gave a total activity of 1.10 nmol/(mg·min). We used the purified CtpA protein as antigen to immune rabbit for the production of polyclonal antibody, and prepared antibody with high specificity and sensitivity. The results obtained in this paper provided the feasibility of high-throughput screening of lead compounds for the protease as inhibitors and mechanism analysis of CtpA enzyme.

Keywords: carboxyl-terminal processing protease (CtpA), expression, purification, activity, polyclonal antibody

农药对于保证农业实现稳产增收具有重要意义,自20世纪40年代发展选择性植物激素类除草剂以来,经典的盆栽技术与喷洒筛选方法已经获得了270个品种、17种作用模式的除草剂。但是近年来,随着植物对农药抗性的增加,以及社会和环境对农药品种安全性的要求,许多农药品种已经被列入禁用名单,实际上在市场上使用的农药品种在相对地减少。因此,开发高效、低毒、环境友好的新型农药显得尤为迫切^[1]。

D1蛋白是植物光合系统II中的一个组成亚基,起着连接电子供体和放氧复合体的作用,它是由质体*psbA*基因编码的大小约40 kDa的膜蛋白,在植物类囊体中以前体蛋白(pD1)的形式表达,需要在D1蛋白酶(Carboxyl-terminal processing protease, CtpA)的作用下剪切掉其羧基端延伸的肽段之后成为成熟的D1蛋白(mD1)。D1蛋白酶是由叶绿体核*ctpA*基因编码的含有389个氨基酸残基的单亚基蛋白,大小约为45 kDa,主要酶切D1前体蛋白中C端延伸的肽段,使之转变为mD1^[2-3],进一步用于光合系统II中锰簇合物的组装,具有维持光合系统II损伤-修复循环过程的重要作用^[4],该酶切过程是植物进行光合作用必不可少的步骤。集胞蓝细菌*Synechocystis* sp和斜生栅藻*Scenedesmus obliquus*在*ctpA*基因敲除后均呈现出非光合自养的表型^[5-7],证实D1蛋白酶也是植物光合作用链中的重要组成部分,因此D1蛋白酶被认为是一个新型优异的广谱除草剂作用靶标^[8]。由于D1蛋白酶在植物中的含量只有D1蛋白的1%左右,与当前广泛使用的以抑制D1蛋白为靶标的除草剂(如西玛津、阿拉特津、敌草隆等)相比,开发以D1蛋白酶作为靶标的除草剂

将会使得农药的施用量大幅度减少,对环境和人类的毒副作用也将会大为降低,可望成为新一代的农药品种。

本研究根据开发新型农药品种的实际需要,利用基因工程方法将*CtpA*基因定向克隆至原核表达载体pET-28a中,并将重组质粒转化至大肠杆菌BL21(DE3),实现了D1蛋白酶的可溶性融合表达,采用Ni-NTA亲和层析柱对重组蛋白酶进行了纯化并测定了其生物活性,同时用纯化的蛋白制备多克隆抗体,为D1蛋白酶抑制剂先导化合物的筛选和蛋白酶与化合物的作用机理研究提供了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒pET-28a和大肠杆菌DH5 α 、BL21(DE3)均为本实验室保存。pMD 18-T Vector、DNA限制性内切酶*Nhe*I和*Xho*I、*Ex Taq* DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、M-MLV TRase cDNA Synthesis Kit、Agarose Gel DNA Purification Kit、MiniBEST Plasmid Purification Kit、DNA Marker和低分子量蛋白Marker均购自大连TaKaRa生物工程有限公司。酵母提取物(Yeast extract)和胰化蛋白胨(Tryptone)购自Oxoid公司。氨苄青霉素(Amp)、卡那青霉素(Kana)、5-溴-4-氯-3-吡啶半乳糖苷(X-gal)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、二硫苏糖醇(DTT)、三氟乙酸(TFA)、弗氏完全及不完全佐剂均购自Sigma公司。4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)购自Amresco公司。乙腈(色谱纯)购自Tedia公司。Ni-NTA亲和柱、HiLoad 16/60 Superdex 75、 \ddot{A} KTA purifier 100蛋白纯化系统为GE

Healthcare 公司产品。Anti-His antibody 购自天根生化科技有限公司。BCA Protein Assay Kit 为美国 Pierce 公司产品。PCR 引物及重组质粒测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。Hypersil BDS C8 (5 μm , 0.46 cm \times 15 cm) 反相柱购自大连依利特分析仪器有限公司。9 肽 (AIEAPSTNG) 和 24 肽 (VMHERNAHNFPLDLA↓AIE APSTNG, 其中↓为酶切位点)均由上海吉尔生化有限公司采用固相合成法合成,并经过高效液相色谱和质谱测定确认。其余试剂均为国产分析纯。试验动物日本长耳兔 2 只,体重 1.5~2.0 kg,购于湖北省疾病预防控制中心下属的实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 菠菜总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

参照植物 RNA 的提取方法,采用 TRIzol 法从菠菜中提取总 RNA,得到白色的 RNA 沉淀,用 DEPC 水溶解。取 5 μL 提取的总 RNA 经甲醛变性琼脂糖凝胶进行电泳检测。按照 TaKaRa 公司提供的 cDNA 合成试剂盒说明,先合成 cDNA 第一链,再合成 cDNA 第二链,最后对合成的 cDNA 进行精制,取 5 μL 合成的 cDNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 PCR 引物设计、合成与 PCR 扩增

根据 GenBank 中获得的 *CtpA* 基因序列 (Accession No. D50585),设计了一对引物,序列如下: *CtpA*-1: 5'-GAGAGCTAGCCTTTCTGAGGAGAATCGA-3',其中下划线部分为限制性内切酶 *Nhe* I 的识别序列; *CtpA*-2: 5'-GTGTCTCGAGTCTTGAGAAAGAGTTGTAC-3',其中下划线部分为限制性内切酶 *Xho* I 的识别序列。以合成的 cDNA 为模板, *CtpA*-1、*CtpA*-2 为引物,扩增 *CtpA* 目的基因。扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。取样进行琼脂糖凝胶电泳分析,采用胶回收试剂盒回收目的基因。

1.2.3 克隆载体 pMD18-T-*CtpA* 的构建及序列测定

按照 pMD18-T Vector 试剂盒说明书要求,取 2 μL 回收后的 *CtpA* 基因与 1 μL pMD18-T 载体连接,并转化至大肠杆菌 DH5 α 中,通过蓝白斑筛选,挑选白色菌落扩大培养后,采用限制性内切酶 *Nhe* I

和 *Xho* I 酶切重组质粒 pMD18-T-*CtpA*, 同时进行 PCR 扩增鉴定,1% 琼脂糖凝胶电泳分析。将鉴定结果正确的阳性菌和质粒送往上海生工生物工程技术有限公司进行测序。

1.2.4 表达载体 pET-28a-*CtpA* 的构建及鉴定

用限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Xho* I 将 *CtpA* 基因从重组质粒 pMD18-T-*CtpA* 上切下,再用同样的限制性内切酶酶切质粒 pET-28a,将 *CtpA* 片段和 pET-28a 酶切产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳纯化回收后,分别取 4 μL *CtpA* 基因与 2 μL 载体 pET-28a,用约 1 μL T4 DNA 连接酶 (350 U/ μL) 于 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜,连接后的产物转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞,接种于含 50 mg/mL 卡那霉素的 LB 平板上培养,次日挑取单克隆菌扩大培养后,采用碱裂解法提取质粒 DNA,用限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Xho* I 酶切重组质粒 pET-28a-*CtpA*,同时以该质粒为模板,合成的 *CtpA*-1 和 *CtpA*-2 为引物进行 PCR 扩增,酶切和 PCR 扩增后的产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

1.2.5 *CtpA* 的诱导表达及纯化

从卡那平板上挑取经酶切和 PCR 鉴定正确的单菌落,接种于 10 mL 含有 50 mg/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 继续振荡培养至 A_{600} 为 0.8 左右,吸取 2 mL 培养物作为未诱导的样品,在剩余的培养物中加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L,继续培养 4 h,离心收集菌体,超声波破碎后采用 SDS-PAGE 电泳检测蛋白表达情况。

为了大量表达和纯化蛋白酶,挑取单菌落接种于 30 mL 含有卡那霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 振荡培养过夜,次日按照 1:100 的比例接种于 400 mL 新配的 LB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 继续振荡培养至 A_{600} 为 0.8 左右,加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L,然后在 8 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 继续振荡培养 72 h。诱导后的菌液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8000 r/min 离心 20 min,收集菌体。按照每克湿菌体加入 10 mL 柱平衡缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 500 mmol/L NaCl) 的量充分悬浮菌体,在冰浴条件下超声破碎菌体 (300 W, 工作 5 s, 间歇 3 s, 共 99 次),然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 40 min,分离上清液和沉淀。将上清液加至预先用平衡缓冲液充分平衡好的

Ni-NTA 亲和层析柱 (1 mL), 并用平衡缓冲液淋洗 10 个柱体积, 然后换用含不同浓度咪唑的平衡缓冲液洗脱 CtpA 蛋白, 收集各组分, 并将各组分进行 12% SDS-PAGE 电泳分析。采用超滤法(Millipore, 截留分子量 3000) 对纯化后的蛋白进行浓缩, 浓缩后的样品采用 Superdex 75 凝胶过滤层析柱 (HiLoad 16/60, GE) 进一步纯化, 采用缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl) 洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 通过 280 nm 处的光吸收进行检测, 收集各组分, 12% SDS-PAGE 电泳分析。蛋白浓度采用 BCA 法测定。

1.2.6 表达产物的 Western 印迹分析

蛋白 Western 印迹分析参照 GE Healthcare Life Sciences 全湿电转印系统 TE22 操作手册进行。将浓缩的蛋白经 12% SDS-PAGE 分离后, 400 mA 电流强度水浴 10°C 将 CtpA 融合蛋白从凝胶上转移至硝酸纤维素膜后, 以含 5% 脱脂奶粉的 PBS 缓冲液 4°C 封闭过夜, 1×PBS、0.1% 吐温 20 洗涤 3 次, 然后与 anti-His 抗体 37°C 反应 1 h, 用 1×PBS、0.1% 吐温 20 洗涤 2 次, 每次 1 h, 再与 1:20 000 稀释的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠抗体在 37°C 温育 1 h, 1×PBS、0.1% 吐温 20 洗涤 2 次, 每次 1 h。最后以沉淀型单组分 TMB 底物溶液显色。

1.2.7 D1 蛋白酶的活性测定

纯化后的 D1 蛋白酶活性测定以合成的 D1 蛋白前体羧基端 24 肽作为模拟底物, 采用 1100 高效液相色谱检测系统 (Aglient) 和 Hypersil BDS C8 (5 μm, 0.46 cm×15 cm) 反相柱对水解产物进行分离和检测^[9]。取 21 μL D1 蛋白酶 (0.657 mg/mL) 和 3 μL 底物 P-24 (5 mmol/L) 加入至 1.5 mL EP 管中, 并用缓冲液 (50 mmol/L HEPES, pH 7.7, 100 mmol/L NaCl, 100 ml/L 甘油, 0.5 g/L 曲拉通 X-100) 补足至 73 μL, 25°C 恒温反应 6 h 后加入 27 μL TFA (0.1 mol/L) 中止反应。10 000 r/min 离心 10 min, 取 20 μL 上清液进行高效液相色谱测定。色谱分离条件: 以水(含 0.1% TFA)为洗脱水相, 乙腈 (含 0.065% TFA) 为洗脱有机相, 0~1.00 min 用 10% 有机相平衡反相柱, 1.01~16.00 min 采用有机相进行体线性梯度(10%~40%)洗脱, 检测波长为 220 nm。

1.2.8 重组 CtpA 血清多克隆抗体的制备和鉴定

免疫前, 从耳缘静脉少量取血, 用作阴性对照。取 1.3 mg 重组 CtpA 蛋白与 2 mL 弗氏完全佐剂混合成油包水的乳剂, 免疫日本长耳大白兔。14 d 后取 1 mg 重组蛋白与 2 mL 弗氏不完全佐剂混合成油包水的乳剂加强免疫, 每两周 1 次。第 3 次加强免疫后, 从耳缘静脉少量取血, ELISA 检测血清效价。效价合格后, 颈动脉放血, 4°C 放置过夜, 收集血清, 分装冻存。

2 结果

2.1 菠菜总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

采用 TRIzol 法提取得到菠菜的总 RNA 后, 经甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 1A 所示。在电泳图中显示出明显的 28S rRNA 和 18S rRNA 条带, 无拖尾, 且 28S rRNA 与 18S rRNA 亮度比接近 2:1 的比例, 说明总 RNA 的完整性良好, 可用于 cDNA 的合成。以总 RNA 为模板, 经逆转录酶催化合成 cDNA, 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 所得结果如图 1B 所示。电泳图中显示 cDNA 亮度良好, 约为 Marker 的 3 倍, 可用于目的基因的 PCR 扩增。

2.2 PCR 扩增 CtpA 目的基因

以合成的 cDNA 为模板, 设计的短链 DNA 为引物, 经过 PCR 扩增后的产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析, 结果如图 2 所示, PCR 扩增后的产物大小约为 1200 bp, 与 CtpA 基因的理论编码序列大小相符合。

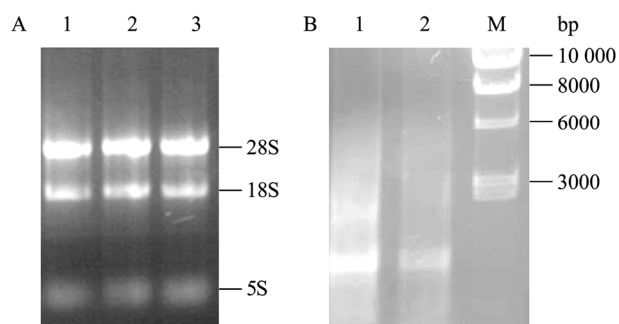


图 1 菠菜总 RNA 的变性琼脂糖凝胶电泳 (A) 和 cDNA 的琼脂糖凝胶电泳 (B)

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of spinach total RNA (A) and spinach cDNA (B). (A) 1-3: RNA. (B) 1, 2: cDNA; 3: 10 000 bp ladder DNA marker.

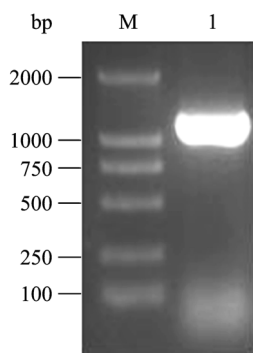


图2 *CtpA* 目的基因的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of *CtpA* gene encoding region. 1: PCR product; 2: 100 bp ladder DNA marker.

2.3 重组质粒 pET-28a-CtpA 的构建和鉴定

为了便于构建重组质粒,将回收后的 PCR 产物先与 pMD18-T 载体连接,并转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,通过蓝白斑筛选得到含有目的基因的阳性菌。采用限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Xho* I 酶切克隆载体 pMD18-T-CtpA,得到目的基因片段,然后与同样经过 *Nhe* I 和 *Xho* I 酶切后的表达载体 pET-28a 连接,转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 中,挑取单菌落提取质粒,采用 *Nhe* I 和 *Xho* I 进行双酶切进行鉴定,同时以此质粒为模板,采用 PCR 扩增进行鉴定,所得结果如图 3 所示。由 1% 琼脂糖凝胶电泳图中可以看出,以重组后的质粒为模板可以扩增出约 1200 bp 的产物,酶切后的质粒在相同位置也出现大小一致的片段,说明目的基因片段与表达载体连接正确,表达载体 pET-28a-CtpA 的构建是成功的。DNA 序列测定结果证实:扩增序列与菠菜的 D1 蛋白酶 DNA 序列一致。

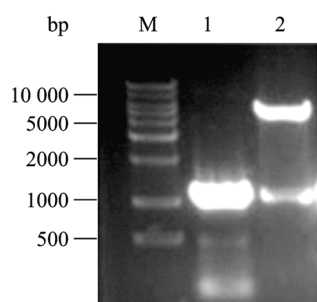


图3 表达载体 pET-28a-CtpA 的 PCR 和双酶切鉴定

Fig. 3 Identification of pET-28a-CtpA by PCR and enzyme digestion. M: 100 bp ladder DNA marker; 1: PCR product of pET-28a-CtpA; 2: pET-28a-CtpA digested with *Nhe* I and *Xho* I.

2.4 重组 CtpA 蛋白的表达与纯化

重组质粒 pET-28a-CtpA 转化至大肠杆菌 BL21(DE3),在 37 $^{\circ}$ C 条件下经 0.4 mmol/L IPTG 诱导 4 h 后,与对照菌相比,在 45 kDa 位置出现了一条明显的显色带,结果如 4A 所示。由图中可以看出,诱导表达的重组质粒主要以包涵体的形式表达,以可溶性形式表达的重组蛋白较少。而未诱导的质粒在相同位置也有表达,但目的蛋白的表达量,特别是包涵体的表达量要明显少于诱导表达质粒。诱导表达获得了高表达量的目的蛋白,但为了获得可溶性表达的目的蛋白,比较了 IPTG 浓度以及诱导温度对 CtpA 蛋白高效可溶性表达的影响,发现降低诱导剂 IPTG 的用量以及降低诱导温度后,包涵体形式的目的蛋白明显减少,而亲和层析结果表明可溶性形式的目的蛋白逐渐增多,尤其是降低诱导温度后,对改善蛋白酶的可溶性表达效果更为明显(图 4B),经过优化后确定的 IPTG 用量为 0.1 mmol/L,最佳的诱导温度为 8 $^{\circ}$ C。

为了纯化可溶性表达的重组蛋白,将阳性单菌落接种于含有卡那霉素的 LB 培养基中,8 $^{\circ}$ C、250 r/min 条件下诱导培养 72 h。获得的菌体超声破碎,上清液通过 Ni-NTA 亲和层析柱纯化,并用含不同浓度咪唑的缓冲液洗脱目的蛋白,所得结果如图 5 所示。从电泳图中可以看出经过 8 $^{\circ}$ C 诱导表达 72 h 后的菌液,上清中的目的蛋白明显增多,表达后的蛋白与亲和柱的结合较牢固,在咪唑浓度为 150 mmol/L 后才得以被洗脱,合并洗脱后的目的蛋白,再经过 Superdex 75 凝胶过滤柱层析进一步纯化,用 BandScan5.0 软件分析,计算得到的重组蛋白酶纯度达到 94.9% (泳道 7)。BCA 法测定结果表明重组蛋白的表达量约为 5~6 mg/L。采用 anti-His 抗体进行 Western blotting 印迹分析证实纯化后的蛋白为带有 His-tag 的融合蛋白 (泳道 10)。

2.5 重组 CtpA 的生物活性测定

以合成的 D1 前体蛋白羧基端延伸的 24 肽作为模拟底物,测定了蛋白酶的生物活性。由于蛋白酶能够将 24 肽水解生成 9 肽和 15 肽,因此采用 C8 反相柱对产物进行分离和分析,图 6 是水解产物在 HPLC 系统上的色谱分离图。由图中可以看到,24

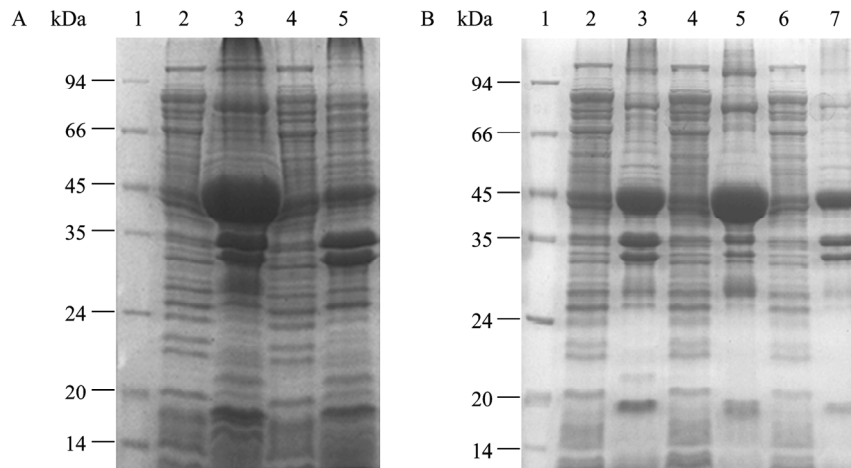


图4 重组质粒的表达 (37°C) (A) 和不同温度对蛋白表达的影响 (B)

Fig. 4 Expression of recombinant CtpA at 37°C (A) and effect of induction temperature on the expression of CtpA (B). (A) 1: protein marker; 2: induced supernatant; 3: induced precipitate; 4: controlled supernatant; 5: controlled precipitate. (B) 1: protein marker; 2: induced supernatant at 16°C; 3: induced precipitate at 16°C; 4: induced supernatant at 37°C; 5: induced precipitate at 37°C; 6: induced supernatant at 8°C; 7: induced precipitate at 8°C.

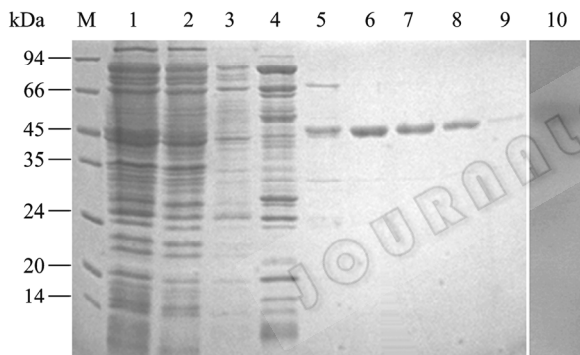


图5 采用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化重组 CtpA 蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 5 12% SDS-PAGE analysis of the recombinant CtpA purified by Ni-NTA affinity chromatography column. M: protein marker; 1: induced supernatant; 2: flow-through sample; 3: elution with binding buffer; 4: elution with 50 mmol/L imidazole; 5: elution with 100 mmol/L imidazole; 6: elution with 150 mmol/L imidazole; 7: elution with 200 mmol/L imidazole; 8: elution with 500 mmol/L imidazole; 9: elution with 1 mol/L imidazole; 10: Western blotting image.

肽的吸收峰在水解反应后明显降低, 同时在 5.6 min 处出现了一个明显的吸收峰, 经过标准样品对照确认为 9 肽, 此外在 11.5 min 位置也出现了一个小的吸收峰, 可能为生成的 15 肽。根据化合物的吸收峰面积和对应的 24 肽浓度可测得重组 D1 蛋白酶的活性为 1.10 nmol/(mg·min)。

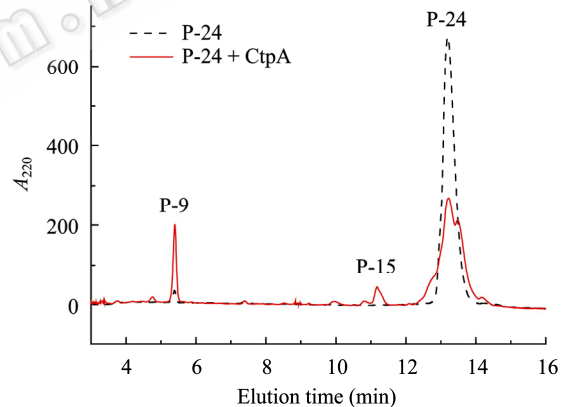


图6 HPLC 对重组蛋白酶水解产物的分离和检测

Fig. 6 HPLC separation and determination of CtpA hydrolysis products.

2.6 重组 CtpA 多克隆抗体效价的检测

ELISA 法检测重组 CtpA 蛋白血清效价多克隆抗体, 空白对照为 PBS, 阴性对照为未免疫的长耳兔血清, 样品为免疫后的长耳兔血清。由于未免疫的长耳兔血清没有产生颜色反应, 而免疫的长耳兔血清有颜色反应, 说明免疫后的长耳兔产生了针对本实验抗原的抗体。ELISA 结果表明从 1:10 到 1:100 000 的各个稀释度的抗体与重组的 CtpA 蛋白有反应, 抗体效价达 1:100 000 (表 1)。

表 1 ELISA 测定重组 CtpA 蛋白血清抗体效价
Table 1 Potency of serum antibody against recombinant CtpA analyzed by ELISA

Antibody concentration				Negative control	Null
1:100	1:1000	1:10 000	1:100 000		
1.109	0.949	0.487	0.214	0.080	0.008

3 讨论

由于 D1 蛋白酶在植物体中剪切 D1 前体蛋白 (pD1) 中 C 端延伸的多肽 (8~16 个氨基酸残基), 使之成为成熟的 D1 蛋白, 进一步用于光合系统 II 中锰簇合物的组装, 具有维持光合系统 II 的损伤-修复循环过程的重要作用, 因此近年来引起了人们的广泛关注, 被认为是一个新型优异的广谱除草剂作用靶标, 国内外部分学者已经开始进行针对该蛋白酶的分子设计和合成工作^[10-12]。为了对合成的抑制剂先导化合物进行活性评价和筛选, 需要进行必要的酶活性分析。虽然文献先后报道了从斜生栅藻以及菠菜叶绿体中提取 D1 蛋白酶的方法, 包括类囊体的提取、超声破碎、羟基磷灰石吸附层析、阴离子交换层析、分子筛层析等方法^[7-8, 13], 但是由于 D1 蛋白酶在天然蛋白中的含量较低 (如菠菜中的 D1 蛋白酶仅占可溶蛋白的 0.06%), 从生物组织中提取天然蛋白酶不仅操作繁琐、纯化周期长, 而且所能提取到的酶蛋白总量也有限, 远不能满足化合物的高通量筛选要求, 而采用基因工程方法获得可溶性表达的重组蛋白则可以解决这些难题。Inagaki 等^[14]和 Fabbri 等^[8]先后采用 pET 15b(+) 和 Pet-30a 载体克隆表达了菠菜的 CtpA 蛋白, Liao 等则表达了斜生栅藻的 CtpA 蛋白^[15], 但均只获得了包涵体形式的蛋白, 需要进行变复性处理方能获得具有部分活性的酶蛋白。本实验根据开发以 D1 蛋白酶为靶标的新型农药的实际需要, 从菠菜中提取总 RNA 和合成 cDNA, 并用 PCR 扩增 CtpA 的全长序列基因, 将其分别与 pMD18-T 载体和 pET-28a 载体进行连接, 构建了 CtpA 蛋白的重组融合表达质粒, 并在大肠杆菌中进行了高效表达。虽然融合蛋白也主要以包涵体形式表达, 但是通过降低诱导剂的使用量和

降低表达温度等条件获得了可溶性的重组蛋白酶, 并采用亲和层析和凝胶过滤层析对重组蛋白进行了纯化, Western 印迹结果证实纯化后的蛋白为带有 His-tag 的重组蛋白。

D1 蛋白由质体 *psbA* 基因编码, 在植物类囊体中以前体蛋白 (pD1) 的形式表达。对 43 种 *psbA* 基因的序列比对分析表明, D1 蛋白虽然在 C 端的延伸序列长度不一, 但是它未剪切的序列却高度保守^[16]。D1 蛋白酶主要酶切 Ala-Ala 或 Ala-Ser 之间的肽键, 例如菠菜 D1 蛋白酶的剪切作用位点是 pD1 中 Ala-344 和 Ala-345 之间的肽键^[13]。Taguchi 等合成了不同长度含有 pD1 剪切位点附近保守区氨基酸序列的多肽化合物, 系统比较了剪切位点附近各保守氨基酸残基对酶分子与底物识别影响的一般规律^[9, 17], 发现作为模拟底物, 合成小肽的长度至少需要 11 个残基以上才能检测到蛋白酶的水解活性, 当多肽长度在 19 个残基以上时对蛋白酶的酶学常数 (K_m 和 V_{max}) 没有明显影响。以 Gly、Val、Pro 残基取代 Ala 残基后, 蛋白酶的活性分别下降至 50%、30%、0%, 而以 Cys、Phe 和 Ser 残基取代 Ala 后, 对蛋白酶的水解活性没有明显影响, 表明蛋白酶对水解底物具有一定的选择性。本实验根据文献报道, 采用合成的 pD1 羧基端 24 肽作为模拟底物, 测定了重组 D1 蛋白酶的生物活性, 发现蛋白酶可以将 24 肽水解生成 9 肽和 15 肽, 其活性可达 1.10 nmol/(mg·min), 是文献报道数据的 15 倍^[8]。Fabbri 等采用盐酸胍对表达后的包涵体蛋白进行变性处理, 再通过柱层析方法对蛋白酶进行复性, 所得蛋白酶的活性仅为 0.07 nmol/(mg·min)^[8]。由于得到的为可溶性形式表达的蛋白酶, 无需变复性处理, 因此其活性要高于 Fabbri 等的结果。本实验还成功制备了 CtpA 蛋白高效价的特异性多克隆抗体, 对进一步研究 CtpA 蛋白的表达模式和植物 CtpA 突变体的研究都有重要意义。

本实验通过优化表达, 获得了具有较高生物活性的重组蛋白酶并成功地制备了高效价的多克隆抗体, 为下一步的抑制剂先导化合物筛选以及化合物与酶蛋白的作用机理研究提供了必要的基础, 目前相关的工作正在进行中。

REFERENCES

- [1] Lein W, Bornke F, Reindl A, *et al.* Target-based discovery of novel herbicides. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, **7**: 219–225.
- [2] Bowyer JR, Packer JCL, McCormack BA, *et al.* Carboxyl-terminal processing of the D1 protein and photoactivation of water-splitting in photosystem II: partial purification and characterization of the processing enzyme from *Scenedesmus obliquus* and *Pisum sativum*. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 5424–5433.
- [3] Fujita S, Inagaki N, Yamamoto Y, *et al.* Identification of the carboxyl-terminal processing protease for the D1 precursor protein of the photosystem II reaction center of spinach. *Plant Cell Physiol*, 1995, **36**: 1169–1177.
- [4] Mattoo AK, Marder JB, Edelman M. Dynamics of the photosystem II reaction center. *Cell*, 1989, **56**: 241–246.
- [5] Anbudurai PR, Mor TS, Shestakov SV, *et al.* The *ctpA* gene encodes the C-terminal processing protease for the D1 protein of the photosystem II reaction center complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 8082–8086.
- [6] Taylor MA, Packer JCL, Bowyer JR. Processing of the D1 polypeptide of the photosystem II reaction center and photoactivation of a low fluorescence mutant (LF-1) of *Scenedesmus obliquus*. *FEBS Lett*, 1988, **237**: 229–233.
- [7] Trost JT, Chisholm DA, Jordan DB, *et al.* The D1 C-terminal processing protease of photosystem II from *Scenedesmus obliquus*. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 20348–20356.
- [8] Fabbri BJ, Duff SM, Remsen EE, *et al.* The carboxyterminal processing protease of D1 protein: expression, purification and enzymology of the recombinant and native spinach proteins. *Pest Manag Sci*, 2005, **61**: 682–690.
- [9] Taguchi F, Yamamoto Y, Inagaki N, *et al.* Recognition signal for the C-terminal processing protease of D1 precursor protein in the photosystem II reaction center: an analysis using synthetic oligopeptides. *FEBS Lett*, 1993, **326**: 227–231.
- [10] Kimiyuki S, Yumiko Y. The carboxyl-terminal processing of precursor D1 protein of the photosystem II reaction center. *Photosynth Res*, 2007, **94**: 2–3.
- [11] Stephen MGD, Chen YS, Brad JF. The carboxyterminal processing protease of D1 protein: herbicidal activity of novel inhibitors of the recombinant and native spinach enzymes. *Pest Biochem Physiol*, 2007, **88**: 1–13.
- [12] Chen YS, Brad JF, Claire AC. Suppression of CtpA in mouseearcress produces a phytotoxic effect: validation of CtpA as a target for herbicide development. *Weed Sci*, 2007, **55**: 283–287.
- [13] Nixon PJ, Trost JT, Diner BA. Role of the carboxy terminus of polypeptide D1 in the assembly of a functional water-oxidizing manganese cluster in photosystem II of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: assembly requires a free carboxyl group at C-terminal position 344. *Biochemistry*, 1992, **31**: 10859–10871.
- [14] Inagaki N, Maitra R, Satoh K, *et al.* Amino acid residues that are critical for *in vivo* catalytic activity of CtpA, the carboxyl-terminal processing protease for the D1 protein of photosystem II. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 30099–30105.
- [15] Liao DI, Qian J, Chisholm DA, *et al.* Crystal structures of the photosystem II D1 C-terminal processing protease. *Nat Struct Biol*, 2000, **7**(9): 749–753.
- [16] Satoh K, Deisenhofer J, Norris JR. In the Photosynthetic Reaction Center. New York: Academic Press, 1993: 289–318.
- [17] Taguchi F, Yamamoto Y, Satoh K. Recognition of the structure around the site of cleavage by the carboxyl-terminal processing protease for D1 precursor protein of the photosystem II reaction center. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 10711–10716.