

限制性内切酶Bsa I的分离纯化与结晶及其硒代衍生物的制备

朱海, 郑梦泽, 贾玮玮, 周倩, 谈帅, 刘子昂, 张传志, 王伟玲, 李婷婷

Isolation, Purification and Crystallization of Restriction Enzyme Bsa I and Its Preparation of Seleno-derived Derivatives

ZHU Hai, ZHENG Mengze, JIA Weiwei, ZHOU Qian, TAN Shuai, LIU Ziang, ZHANG Chuanzhi, WANG Weiling, and LI Tingting

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022110215>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

玉米须中高含量植物甾醇的提纯工艺

Process of extraction and purification of high content phytosterol from corn silk

食品工业科技. 2017(03): 192-195 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.03.028>

速冻终温对刺嫩芽水分结晶及质构的影响

Effect of different final frozen temperatures on *Aralia elata*(Miq.) seem's crystallization and texture

食品工业科技. 2017(03): 49-51 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.03.001>

基因共表达对人源LysoPLD异源可溶性表达、纯化及酶学性质的影响

Effect of Gene Co-expression on Heterologous Soluble Expression, Purification and Enzymatic Properties of Human LysoPLD

食品工业科技. 2021, 42(7): 102-109 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020060091>

人源磷脂酶PLA₂异源可溶表达纯化及酶学分析

Prokaryotic Expression, Purification and Enzymatic Characterization of Recombinant Human Phospholipase A₂

食品工业科技. 2021, 42(2): 70-75,82 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020040039>

限制性酶解乳清蛋白功能性质研究

Study on limited enzymatic hydrolysis of whey protein and functional properties

食品工业科技. 2017(04): 127-131 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.04.016>

抗克百威单链抗体的可溶性表达、纯化与鉴定

Soluble expression, purification, and identification of scFv against carbofuran

食品工业科技. 2017(20): 77-82 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.20.015>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

朱海, 郑梦泽, 贾玮玮, 等. 限制性内切酶 Bsa I 的分离纯化与结晶及其硒代衍生物的制备 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(22): 110-116. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110215

ZHU Hai, ZHENG Mengze, JIA Weiwei, et al. Isolation, Purification and Crystallization of Restriction Enzyme Bsa I and Its Preparation of Seleno-derived Derivatives[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(22): 110-116. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110215

· 生物工程 ·

限制性内切酶 Bsa I 的分离纯化与结晶及其 硒代衍生物的制备

朱海^{1,2}, 郑梦泽^{1,2}, 贾玮玮^{1,2}, 周倩^{1,2}, 谈帅^{1,2}, 刘子昂^{1,2}, 张传志³, 王伟玲^{1,2}, 李婷婷^{1,2,*}

(1. 江苏海洋大学, 江苏省海洋药物活性分子筛选重点实验室, 江苏连云港 222005;

2. 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心, 江苏连云港 222005;

3. 正大天晴药业集团股份有限公司, 江苏连云港 222005)

摘要:目的: 筛选并优化限制性内切酶 Bsa I 的三维结构样品制备的方法。方法: 本课题采用大肠杆菌表达系统表达 Bsa I 蛋白及其硒代衍生物。首先构建重组表达载体 pBAD-Bsa I, 转化到大肠杆菌 (*E. coli*) ER2566 中进行表达, 并采用亲和层析和阴离子交换层析进行纯化。然后利用质谱、圆二色谱的方法测试硒代蛋白衍生情况, 并对其酶活测定。最后采用坐滴法进行初步的晶体生长研究。结果: 通过两步纯化方法获得了纯度大于 90% 的重组 Bsa I 和 Se-Bsa I 硒代蛋白; 经质谱检测发现重组 Se-Bsa I 蛋白中的 11 个甲硫氨酸全部硒代, 圆二色谱检测和酶活测试确定了硒代对 Bsa I 蛋白的结构和活性无明显影响。结晶实验显示重组 Bsa I 蛋白不仅可以在 0.2 mol/L 硫酸镁四水合物、pH6.5 的 0.1 mol/L 二甲胍酸钠三水合物、20% 聚乙二醇 8000 的条件下生长出颗粒状结晶, 而且可以在 pH4.6 的 0.1 mol/L 三水醋酸钠、2 mol/L 硫酸铵的条件下生长出球状结构晶体。结论: 本研究成功实现了 Bsa I 蛋白及其硒代蛋白的重组表达, 并对蛋白晶体条件进行初筛, 旨在解析 Bsa I 蛋白三维结构提供一定的参考。

关键词: 限制性内切酶, 表达纯化, 硒代, 结晶

中图分类号: Q819

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)22-0110-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110215



本文网刊:

Isolation, Purification and Crystallization of Restriction Enzyme Bsa I and Its Preparation of Seleno-derived Derivatives

ZHU Hai^{1,2}, ZHENG Mengze^{1,2}, JIA Weiwei^{1,2}, ZHOU Qian^{1,2}, TAN Shuai^{1,2}, LIU Ziang^{1,2},
ZHANG Chuazhi³, WANG Weiling^{1,2}, LI Tingting^{1,2,*}

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Pharmaceutical Compound Screening,
Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;

2. Co-Innovation Center of Jiangsu Marine Bio-Industry Technology, Lianyungang 222005, China;

3. Chia Tai Tianqing Pharmaceutical Group Co., Ltd., Lianyungang 222005, China)

Abstract: Objective: To screen and optimize the method for preparing three-dimensional structural samples of restriction endonuclease Bsa I. Methods: In this study, the *Escherichia coli* expression system was employed to express the Bsa I protein and its selenomethionine derivative. Firstly, a recombinant expression vector pBAD-Bsa I was constructed and transformed into *Escherichia coli* (*E. coli*) ER2566 for expression. Purification was carried out using affinity chromatography and anion exchange chromatography. Subsequently, selenomethionine derivation situation was assessed using mass spectrometry and circular dichroism spectroscopy, followed by enzyme activity determination. Lastly,

收稿日期: 2022-11-21

基金项目: 江苏省高等学校自然科学研究项目 (22KJB180012)。

作者简介: 朱海 (1998-), 男, 硕士, 研究方向: 蛋白纯化, E-mail: 1678361514@qq.com。

* 通信作者: 李婷婷 (1987-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 蛋白质晶体结构解析, E-mail: litt@jou.edu.cn。

preliminary crystal growth studies were conducted using the sitting-drop method. Results: Through a two-step purification approach, recombinant Bsa I and Se-Bsa I selenomethionine derivative with a purity exceeding 90% were obtained. Mass spectrometry analysis revealed that all 11 methionine residues in the recombinant Se-Bsa I protein were selenomethionine-incorporated. Circular dichroism spectroscopy and enzyme activity testing confirmed that the selenomethionine incorporation had no significant impact on the structure and activity of Bsa I protein. Crystallization experiments demonstrated that the recombinant Bsa I protein could not only form granular crystals under conditions of 0.2 mol/L magnesium acetate tetrahydrate at pH6.5, 0.1 mol/L sodium cacodylate trihydrate with 20% polyethylene glycol 8000, but also form spherical structures under conditions of 0.1 mol/L sodium acetate trihydrate at pH4.6 and 2 mol/L ammonium sulfate. Conclusion: This study successfully achieved the recombinant expression of Bsa I and Se-Bsa I selenomethionine derivative, conducted preliminary screening of protein crystal conditions, aiming to provide valuable insights for deciphering the three-dimensional structure of Bsa I protein.

Key words: restriction enzymes; expression purification; selenoids; crystallized

限制性内切酶是分子生物学中最常用的工具酶之一^[1],其中,Ⅱ型限制性内切酶在识别序列的内部或附近确定位点对 DNA 进行特异性切割,由于其稳定的裂解模式及简便的催化方式而被广泛应用于基因重组等分子生物学领域,具有重要的商业价值^[2]。根据Ⅱ型限制性内切酶在识别序列上的不同,可以将其分为不同的亚类:例如,以 EcoR I、Hind III 为代表的ⅡP型内切酶,可以识别回文序列,并在识别序列内部进行对称切割;以 Bsa I、Fok I 为代表的ⅡS型,可以识别不对称序列,并在识别序列一端的固定位置进行切割^[3-4]。

Bsa I 是一种来源于嗜热芽孢杆菌的ⅡS型限制酶,可以特异性识别不对称 DNA 序列 5'-GGTCTC-3',并在识别序列 3'端第 1 个碱基 N1 后,以及识别的互补序列 3'-CCAGAG-5'的 5'端第 5 个碱基 N5 后切割,从而留下 4 个碱基的 5'突出端^[5-6]。常用于 Golden Gate 组装(Golden Gate Assembly)以及 mRNA 疫苗用质粒的线性化或其它体外转录质粒的线性化^[7-10]。Bsa I 作为基因敲除的工具,在揭示植物基因功能和作物改良方面具有举足轻重的作用^[11-13]。天然来源的限制酶使用往往具有局限性,比如活性低,星号活性明显,使用条件苛刻等^[14-15]。这些局限性极大地影响了内切酶在商业化中的应用,所以研究者对于天然限制酶的研究和改造一直都没有停止。为了克服天然酶存在的问题,针对 Bsa I 进行结构研究具有重要意义。

X 射线晶体衍射是解析生物大分子三维结构的主要手段之一。其主要过程包括数据收集、相位解析、初始电子密度优化以及原子模型的构建^[16-18]。对于生物大分子,一般情况下难以直接从衍射数据求得相位。结构解析中解决相位问题的一般方法有分子置换法,同晶置换法和反常散射法^[19-20]。分子置换法需要同源性较高的同源结构来解析相位,而Ⅱ型限制酶同源性较低,无法利用分子置换法解析 Bsa I 的相位问题。同晶置换法需要首先获得大量蛋白晶体进行重金属浸泡,因此本实验尝试在重组蛋白表达时制备硒代蛋白衍生物,利用反常散射法推算晶体相位^[21-22]。

本研究以 pBAD 质粒为载体,利用大肠杆菌 ER2566 (*E.coli.*) 为宿主菌,制备ⅡS型限制性内切酶 Bsa I 及其硒代蛋白衍生物,利用坐滴法进行初步的晶体生长研究,为后续阐明 Bsa I 的三维结构及作用机理提供实验基础,进而为其定向改造和功能优化提供信息。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

感受态菌株 B834(DE3)、ER2566 武汉森灵生物科技有限公司;λDNA 莫纳(武汉)生物科技有限公司;酵母提取物、蛋白胨 Thermo Fisher Scientific 公司;Ni 亲和层析填料、UniGel-80Q 阴离子层析填料 江苏纳微生物科技有限公司;其余化学试剂均为分析纯 国药集团化学试剂有限公司;基础培养基配方 LB 培养基(g/L):酵母提取物 5.0,胰蛋白胨 10.0,氯化钠 10.0;M9 培养基(g/L):十二水合磷酸氢二钠 17.09,磷酸二氢钾 3.0,葡萄糖 4.0,硫酸镁 0.24,氯化钠 0.5,氯化钙 0.011,氯化铵 1.0。

凝胶成像系统 上海勤翔科学仪器有限公司;超高压连续流细胞破碎仪 广州聚能生物科技有限公司;AKTATm Pure 蛋白纯化仪 GE 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 重组菌株的获取 将编码Ⅱ型限制酶 Bsa I 序列(Q6SPF4)及甲基化酶 Bsa I-M 基因序列(Q6SPF6)经人工合成构建在 pBAD 载体上(安徽通用生物公司)。将重组质粒通过热激法转入到 ER2566 感受态细胞内(冰浴 30 min,42 °C 热激 1 min,冰浴 5 min,加入 500 μL 无抗 LB,37 °C,200 r/min 培养 1 h),将培养液在固体平板划线,37 °C 培养箱培养过夜,获得重组菌株^[23]。

1.2.2 重组 Bsa I 蛋白的表达与纯化 将重组菌株 ER2566-Bsa I 在含有氨苄霉素的 LB 平板上划线稀释,37 °C 培养箱培养过夜。挑取数个单克隆在含有氨苄霉素的 LB 液体培养基中活化,37 °C 200 r/min 摇床培养至 OD₆₀₀ 值为 0.6~1.0。进行小量诱导实验(实验组 1),取活化液 10 mL,加入 20% L-ara,37 °C 诱导 5 h 后,收集菌体,加水溶解,100 °C 煮沸 15 min,

取上清, SDS-PAGE 点胶验证蛋白表达情况, 通过实验组 1 确定蛋白表达后进行大量诱导实验(实验组 2)。按 1:50 比例在 500 mL LB 培养基中扩大培养, 其 OD_{600} 值为 0.6~0.8 时加入 20% L-ara, 在 37 °C 下进行诱导 5 h 后, 收集发酵菌体。发酵菌体重悬至裂解液(25 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 150 mmol/L NaCl), 用细胞破碎仪 1000 bar 破碎至菌液澄清透亮, 4 °C 下 13000 r/min 离心 1 h, 收集上清; 然后将上清液与镍填料结合过夜; 利用 15 mmol/L 低浓度咪唑洗杂蛋白, 再利用 250 mmol/L 高浓度咪唑洗脱目的蛋白; 目的蛋白洗脱液用 UniGel-80Q 阴离子层析柱进行下一步纯化, 低盐溶液(25 mmol/L Tris-HCl, pH8.0)进行柱平衡, 盐浓度梯度洗脱目的蛋白。蛋白浓度的确定: 通过测量样品在 280 nm 处的吸光度。

1.2.3 Se-Bsa I 蛋白的表达与纯化 活化方法见 1.2.2, 首先进行小量诱导实验(实验组 1), 取活化液 200 μ L 加入 10 mL 过度培养基中(LB 培养基: M9 培养基体积比为 1:4), 37 °C 200 r/min 摇床培养至 OD_{600} 值为 0.6~1.0, 2500 \times g 离心 5 min 后, 收集菌体, 置换到 M9 培养基中培养 1 h, 加入 20% L-ara, 37 °C 诱导 5 h, 分 2 次加入硒代甲硫氨酸, 诱导开始时及诱导 2 h 后各添加一次硒代甲硫氨酸, 每次加入量为 0.25 mg, 诱导完成后, 收集菌体, 加水溶解, 100 °C 煮沸 15 min, 取上清, SDS-PAGE 点胶验证蛋白表达情况。

通过实验组 1 确定蛋白表达后进行大量诱导实验(实验组 2)。按照 1:50 比例将活化液接种于 500 mL 过渡培养基扩大培养(实验组 2), 待其 OD_{600} 值为 0.6~0.8 时, 将菌体置换到完全 M9 培养基中培养 1 h。加入 20% L-ara, 37 °C 诱导 5 h, 分 2 次加入硒代甲硫氨酸, 诱导开始时及诱导 2 h 后各添加一次硒代甲硫氨酸, 每次加入量为 0.0125 g, 使其终浓度为 0.05 g/L。诱导完成后, 收集菌体, 硒代蛋白纯化过程与重组蛋白一致, 见方法 1.2.2。

1.2.4 重组 Bsa I 蛋白和 Se-Bsa I 蛋白的质谱检测 为验证 Se-Bsa I 蛋白中硫原子被硒原子的取代情况, 采用 AB Sciex 5800 MALDI-TOF/TOF 质谱仪对 Bsa I 重组蛋白和其硒代蛋白进行分析鉴定, 质谱检测在华中科技大学完成。

1.2.5 重组 Bsa I 蛋白和 Se-Bsa I 蛋白圆二色谱检测 为初步检验重组 Bsa I 蛋白与 Se-Bsa I 蛋白二级结构的区别, 将重组蛋白和硒代蛋白稀释至 0.5 mg/mL, 并使用圆二色谱仪对其进行扫描, 样品池光程为 0.5 mm, 近紫外区波长范围为 190~240 nm, 分析其二级结构有无差异。

1.2.6 重组 Bsa I 蛋白和 Se-Bsa I 蛋白酶活检测 重组 Bsa I 蛋白(1 mg/mL)或 Se-Bsa I 蛋白(1 mg/mL)各 1 μ L, 底物为 1 μ g 的 λ DNA, 配制成 20 μ L 的反

应体系, 在 37 °C 的条件下反应 30 min, 反应结束后高温失活。使用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 鉴定 Bsa I 蛋白或 Se-Bsa I 蛋白对 λ DNA 切割条带。

1.2.7 重组 Bsa I 蛋白结晶条件初筛 将蛋白浓缩到 10 mg/mL, 通过气相扩散坐滴法对 9 种结晶试剂盒(Crystal Screen Cryo-HR2-112、PEGx 1 -HR2-082、Index-HR2-144、Crystal Screen Lite-HR2-128、Crystal Screen Cryo -HR2-122、SaltRx 1 -HR2-107、Crystal Screen-HR2-110、Natrix-HR2-116、PEGx 2 -HR2-084)条件进行蛋白晶体生长条件的初步探索。使用 NT8 机械手臂将蛋白溶液和生长池液按照 1:1 的比例混合, 点样至晶体板的样品槽内, 并使用透明塑封纸封装。放入全自动晶体生长观察成像分析仪, 设置温度为 20 °C, 间隔 12 h 拍照, 观察晶体在不同条件下的生长情况。蛋白在 2 种情况下生长出晶体, 条件 a: 0.2 mol/L 醋酸镁四水合物, 0.1 mol/L 二甲胍酸钠三水合物 pH6.5, 20% 聚乙二醇 8000; 条件 b: 0.1 mol/L 三水醋酸钠 pH4.6, 2.0 mol/L 硫酸铵。

2 结果与分析

2.1 重组表达载体的构建

利用原核生物表达体系表达内切酶, 首先要考虑的问题是避免重组内切酶对宿主 DNA 的切割伤害。为解决这个难题, 本研究在载体 pBAD 上同时构建了 Bsa I 基因和 Bsa I 的甲基化酶基因。如图 1 所示, 在 Bsa I 基因和 Bsa I-M 基因的上下游分别构建了启动子和终止子, 使两个蛋白分别表达。另外, 在 Bsa I 基因的上游加入 6 \times His 标签序列, 使目的蛋白 Bsa I 可以带有融合标签 6 \times His。将构建成功的重组质粒通过热激法转化到 ER2566 感受态细胞中, 获得 Bsa I 重组蛋白的表达菌株。

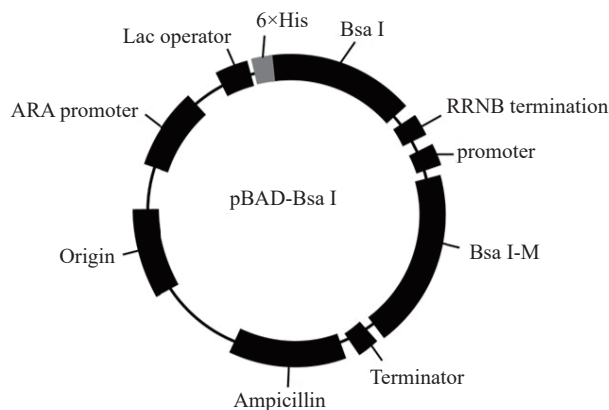


图 1 pBAD-Bsa I 质粒图谱
Fig.1 Schematic of pBAD-Bsa I construct

2.2 Bsa I 重组蛋白的表达和纯化

首先将构建成功的 Bsa I 重组表达菌株 ER2566 进行诱导实验, 以确定目的蛋白表达情况。限制性内切酶 Bsa I 重组蛋白的分子质量约为 65 kDa。将表达菌株在 37 °C 下诱导 5 h, 小量实验验证(实验组 1)泳道 2 比泳道 1 多了一条诱导后条带。与预期

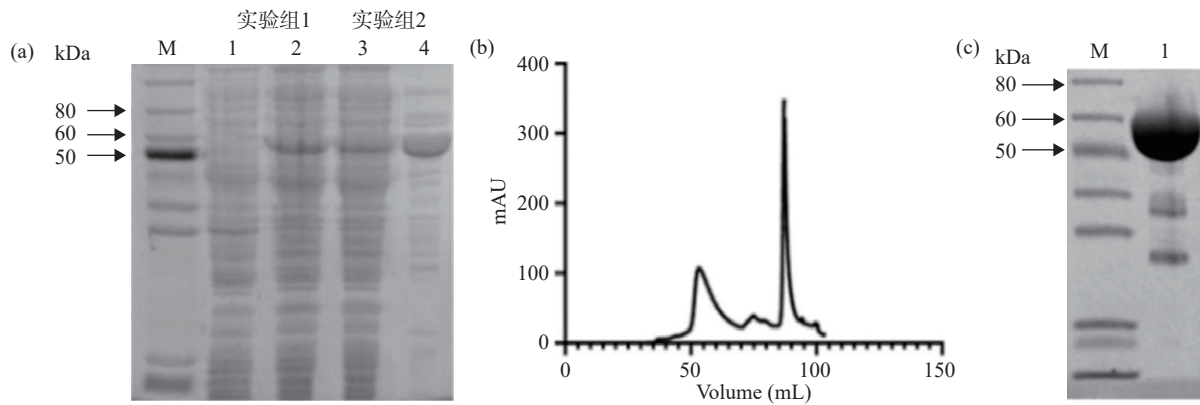


图 2 重组蛋白 Bsa I 的表达与纯化

Fig.2 Expression and purification of Bsa I

65 kDa 大小相仿, 证明重组 Bsa I 蛋白在 ER2566 菌株中有诱导表达。然后进行大规模发酵实验(实验组 2), 将诱导后的发酵液进行超高压破碎, 如图 2a 泳道 3, 在目的蛋白与镍基至结合后, 利用高浓度咪唑洗脱, 如图 2a 泳道 4 所示, 经过 Ni 亲和层析后重组 Bsa I 蛋白的纯度明显提升。但重组 Bsa I 蛋白的纯度还未达到蛋白晶体生长所需的纯度, 因此对重组 Bsa I 蛋白利用阴离子交换层析进一步纯化, 如图 2c 所示, 蛋白纯度可以达到 90% 以上。最终, 每升发酵液得到了 6.6 mg 的目的蛋白。

2.3 Se-Bsa I 硒代蛋白的表达与纯化

实验室最常用的方法是使用甲硫氨酸缺陷型菌株制备硒代蛋白, 利用 M9 培养基发酵获得硒代蛋白, 其中大肠杆菌常用甲硫氨酸缺陷型菌株是 B834^[24]。因此, 本研究将构建成功的重组质粒转化导入 B834 (DE3) 菌株中, 并进行目的蛋白的小量表达试验。经过 SDS-PAGE 检测发现没有硒代蛋白的目的条带。推测其结果可能是甲硫氨酸缺陷型菌株 B834 (DE3) 不适合同时诱导表达 Bsa I 基因和 Bsa I-M 基因, B834 菌株中的甲基化修饰系统阻碍了表达 Bsa I 的甲基化酶, 而无法获得目的蛋白 Bsa I。程艺等^[25]在表达重组 Se-Nco I 时, 利用甲硫氨酸缺陷型菌株 B834 时蛋白未表达, 之后利用表达重组 Nco I 的 BL21 (DE3)pLysS 菌株和 M9 培养基成功表达出硒代蛋白。

因此, 本实验采用原 ER2566 表达菌株, 利用 M9 培养基来替换甲硫氨酸为硒代甲硫氨酸, 进行 Se-Bsa I 蛋白的诱导表达, 诱导后的重组 Bsa I 蛋白在硒代培养基中有诱导条带产生, 表明此方法是可行的。但是诱导后的菌体量少, 无法获得足够的硒代蛋白。推测是由于硒代甲硫氨酸的细胞毒性^[26]以及 M9 培养基不是大肠杆菌的最适培养基, 会严重影响菌体的生长, 从而降低 Se-Bsa I 重组蛋白的表达量。因此, 本实验通过分批次加入硒代甲硫氨酸, 减少硒代甲硫氨酸的浓度, 从而降低硒代甲硫氨酸的细胞毒性。通过小量实验(实验组 1)表明分批次加入可以提高诱导后菌体量, 从而提高硒代蛋白的产量。大规模发酵(实验组 2)经过 Ni 亲和层析和阴离子交换层析的纯化, 如图 3a 泳道 4 和图 3c 所示。最终, 每升发酵产物得到 4 mg 目的蛋白。

邵钰晨等^[27]在制备硒代蛋白时也发现了此类问题, 指出 M9 培养基对于 LB 培养基来说, 营养成分相对贫瘠, 因此邵钰晨等在培养过程中添加异亮氨酸等多种氨基酸, 抑制大肠杆菌本底代谢, 从而提高外源硒代甲硫氨酸利用率, 提高硒代蛋白表达量。通过这些改进最终获得了浓度为 10 mg/mL、纯度在 95% 以上的 Se-Mlu I 蛋白。后续实验将针对硒代蛋白诱导条件进行优化, 以达到满足晶体生长的蛋白浓度。

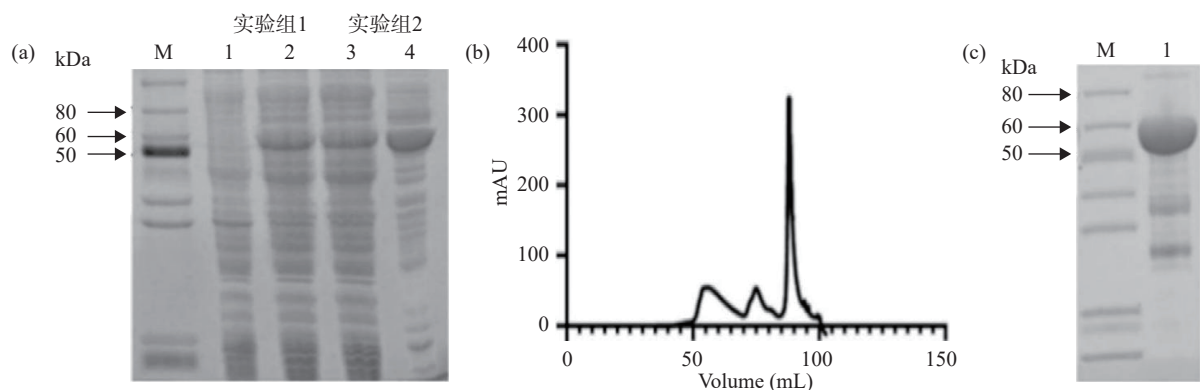


图 3 重组蛋白 Se-Bsa I 的表达与纯化

Fig.3 Expression and purification of Se-Bsa I

SDS-PAGE 检测结果显示 Se-Bsa I 硒代蛋白的大小和 Bsa I 蛋白大小类似,但电泳图中很难判断 Se-Bsa I 蛋白是否被硒代,因此后续进行质谱检测 Se-Bsa I 蛋白的分子量与 Bsa I 蛋白的区别,从而判断 Se-Bsa I 蛋白中甲硫氨酸的硒代概率。

2.4 重组蛋白 Bsa I 和 Se-Bsa I 的质谱检测

由于采用原 ER2566 表达菌株,利用 M9 培养基掺入硒代甲硫氨酸来替换目的蛋白中的甲硫氨酸,存在替换不完全的风险。为了检测 Se-Bsa I 蛋白中硒原子的取代率,将纯化得到的 Bsa I 和 Se-Bsa I 取样进行质谱检测如图 4 所示。经过质谱检测发现,重组 Bsa I 蛋白的分子质量为 65278.87 Da,这与 Bsa I 理论相对分子质量 65 kDa 相符。而重组 Se-Bsa I 蛋白相对分子质量为 65758.26 Da,与 Bsa I 重组蛋白之间相差 479.39 Da。已知硫元素相对分子质量为 32.065 Da,硒元素的相对分子质量为 78.96 Da,因此平均每分子 Se-Bsa I 中被硒原子取代的硫原子数量为 $479.39 / (78.96 - 32.065) = 10.22$ 。通过分析重组 Bsa I 蛋白质的氨基酸序列发现其有 11 个甲硫氨酸,存在 11 个硫原子。因此,推测出本批次的 Se-Bsa I 蛋白质中甲硫氨酸被硒代甲硫氨酸取代的概率约 92.91%,样品适合进行后续 X-射线衍射实验^[28]。

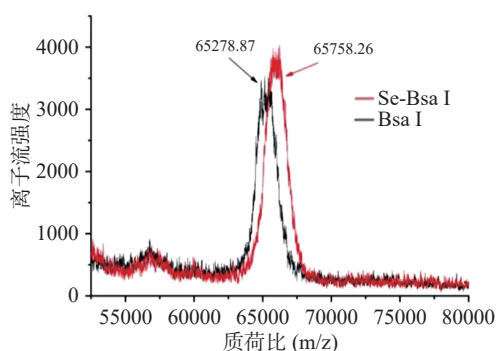


图 4 Bsa I 和 Se-Bsa I 质谱图
Fig.4 Serum mass spectrometry of Bsa I and Se-Bsa I

2.5 重组蛋白 Bsa I 和 Se-Bsa I 的圆二色谱图检测

为了解析限制性内切酶 Bsa I 的三维结构,Se-Bsa I 重组蛋白样品与 Bsa I 重组蛋白样品的结构必须高度相似。测定蛋白质二级结构最常用的方法是圆二色谱法,其广泛应用于蛋白质的构象研究中^[29]。为了进一步明确硒代蛋白对重组蛋白的结构有无影响,本研究将重组蛋白样品 Bsa I 和 Se-Bsa I 进行圆二色谱检测,解析其二级结构(图 5)。CD 图谱均显示在 192 nm 处有一个正峰,208、222 nm 处有两个负峰,这表明 Bsa I 和 Se-Bsa I 都是以 α -螺旋的形式存在,说明蛋白折叠正确,构象稳定。结果表明,Bsa I 和 Se-Bsa I 在二级结构上无差异,硒代不影响其结构。为后续功能以及结构研究奠定了很好的基础。

2.6 蛋白及其硒代蛋白的酶活检测

本研究分别对 Bsa I 重组蛋白与 Se-Bsa I 重组

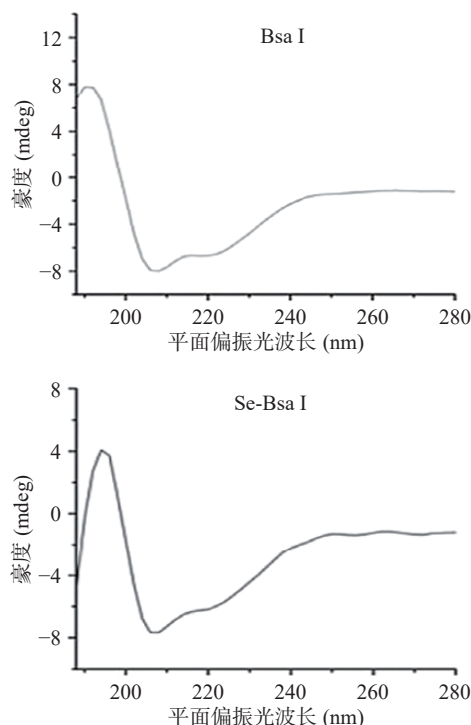


图 5 Bsa I 和 Se-Bsa I 圆二色谱图
Fig.5 Circular dichroism of Bsa I and Se-Bsa I

蛋白进行酶活力检测,进一步检测硒代是否影响野生型蛋白的生物学功能。取 1 μ g Bsa I 和 1 μ g Se-Bsa I 蛋白,对 1 μ g λ DNA 进行 30 min 快速酶切实验,结果见图 6。经琼脂糖凝胶电泳检测发现,Bsa I 和 Se-Bsa I 都有明显的特征酶切条带,与 Thermo Fisher 公司网址中公布的 Bsa I 特征酶切条带相似。酶切结果表明了 Se-Bsa I 蛋白与野生型蛋白具有相似的生物学活性,即硒代蛋白活性并未受到硒代影响。

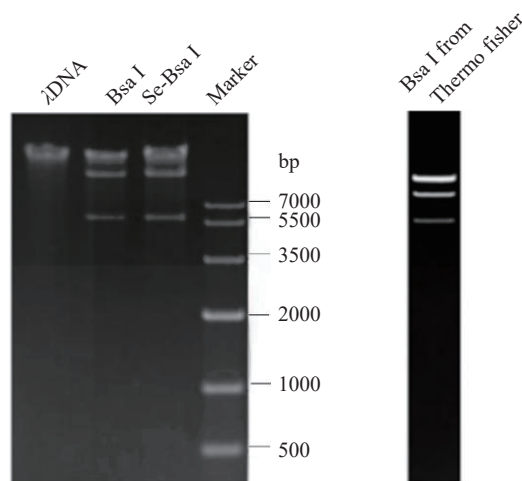


图 6 Bsa I 和 Se-Bsa I 的酶活验证
Fig.6 Enzymes activity of Bsa I and Se-Bsa I

2.7 Bsa I 蛋白结晶生长条件筛选

本实验将重组后的 Bsa I 蛋白利用坐滴法进行蛋白质晶体的初筛。初筛使用购自 Hampton Research 公司的商品化蛋白质晶体筛选试剂盒,蛋白质液滴与点晶体等体积混合后,于 20 $^{\circ}$ C 的全自动晶体生长观

察成像分析仪中进行晶体培养,每隔 12 h 自动拍照采集数据^[30-31]。在使用商品化蛋白结晶试剂盒进行蛋白结晶,最初得到的蛋白结晶条件往往不是最优条件,大概率会出现晶体过小,分辨率较差,衍射能力较低等情况^[32-33]。筛选结果显示有 2 个条件生长晶体,晶体如图 7 所示。

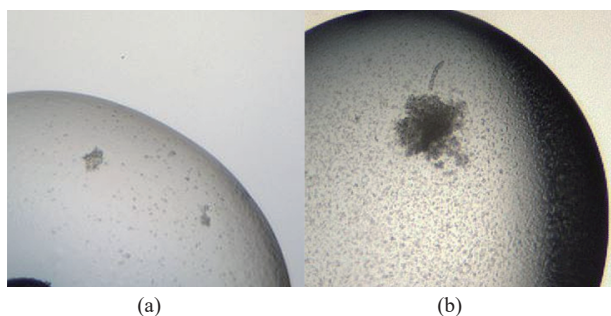


图 7 Bsa I 的结晶条件筛选

Fig.7 Screening of crystallization conditions of Bsa I

蛋白晶体可以在 a 条件下(0.2 mol/L 醋酸镁四水合物, 0.1 mol/L 二甲胍酸钠三水合物 pH6.5, 20% 聚乙二醇 8000)生长出较小的颗粒状结晶,并且可以在 b 条件(0.1 mol/L 三水醋酸钠 pH4.6, 2 mol/L 硫酸铵)下生长出不规则的球形晶体,但初步结晶条件所筛选到的蛋白结晶较为脆弱且边缘不规则,无法捞出进行衍射实验。针对这种情况,程焯等^[34]在制备 LxmX 蛋白时,通过利用最初筛选得到的晶体生长条件,设计正交试验,成功得到了边缘整齐,可用于衍射数据收集的 LxmX 蛋白及硒代 LxmX 蛋白晶体。因此后续实验将对初步得到的蛋白结晶条件进行优化,以获得高分辨率的晶体。此外,通过观察所有晶体的生长情况,发现大部分蛋白都发生了沉淀,推测 Bsa I 的稳定性可能是影响其蛋白晶体生长的一个关键因素^[35-37]。

3 结论

限制性内切酶是分子生物学最常用的工具之一,而内切酶的结构决定其功能。但大部分内切酶结构没有被解析,这限制了内切酶的发展。通过制备硒代衍生物进行衍射解析结构,其操作更为简单,适用性更高。但在制备硒代蛋白过程中,B834 甲硫氨酸缺陷型菌株往往易受到外源基因的影响,无法获得重组蛋白,具有局限性,同时硒代甲硫氨酸的毒性问题以及发酵条件鲜有报道,这也限制了制备硒代蛋白的成功率。本实验利用限制性内切酶 Bsa I 和甲基化酶 Bsa I-M 的大肠杆菌共表达系统,获得大量表达的 Bsa I 蛋白,通过 M9 培养基添加硒代甲硫氨酸的方式,获得了大小、性质和重组蛋白一致的硒代蛋白,并在两种结晶条件下培养出蛋白晶体,为后续 Bsa I 蛋白的晶体衍射,解析其三维结构奠定了基础。

参考文献

[1] 郭晓强. 酶的研究与生命科学(三): 分子生物学酶的发现和

应用[J]. 自然杂志, 2015, 37(5): 369-380. [GUO Xiaoqiang. Enzymes and life sciences (III): Discovery and utilization of molecular biology enzymes[J]. Chinese Journal of Nature, 2015, 37(5): 369-390.]

[2] SHEN B W, DOYLE L, BRADLEY P, et al. Structure, subunit organization and behavior of the asymmetric type IIT restriction endonuclease BbvCI[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(1): 450-467.

[3] PINGOUD A, FUXREITER M, PINGOUD V, et al. Type II restriction endonucleases: Structure and mechanism[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, 62(6): 685-707.

[4] DI F F, MICHELI G, CAMILLONI G. Restriction enzymes and their use in molecular biology: An overview[J]. *Journal of Biosciences*, 2019, 44(2): 1-8.

[5] LIPPOW S M, AHA P M, PARKER M H, et al. Creation of a type IIS restriction endonuclease with a long recognition sequence[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(9): 3061-3073.

[6] PINGOUD A, WILSON G G, WENDE W. Type II restriction endonucleases—a historical perspective and more[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(12): 7489-7527.

[7] ZHU Z, XU S. Method for cloning and expression of Bsa I restriction endonuclease and Bsa I methylase in *E. coli*: US, 09933313 [P]. 2003-02-04.

[8] BHADRA S, NGUYEN V, TORRES J A, et al. Producing molecular biology reagents without purification[J]. *PLoS one*, 2021, 16(6): e0252507.

[9] 言普. 基于 Golden Gate 技术的载体构建新方法[D]. 北京: 中国科学院大学, 2012. [YAN Pu. A new approach to carrier construction based on Golden Gate technology[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2012.]

[10] LIEMAY M L, RENAUD A, ROUSSEAU G, et al. Targeted genome editing of virulent phages using crispr-Cas9[J]. *Bio-Protocol*, 2018, 7(1): e2674.

[11] TIAN S W, JIANG L J, GAO Q, et al. Efficient CRISPR/Cas9-based gene knockout in watermelon[J]. *Plant Cell Reports*, 2017, 36(3): 399-406.

[12] LEE J, CHUNG J H, KIM H M, et al. Designed nucleases for targeted genome editing[J]. *Plant Biotechnol*, 2016, 14(2): 448-462.

[13] CARDI T, NEAL S C J. Progress of targeted genome modification approaches in higher plants[J]. *Plant Cell Reports*, 2016, 35(7): 1401-1416.

[14] YANG G, MITON CM, TOKURIKI N. A mechanistic view of enzyme evolution[J]. *Protein Science*, 2020, 29(8): 1724-1747.

[15] SCHIERLING B, NOËL A J, WENDE W, et al. Controlling the enzymatic activity of a restriction enzyme by light[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(4): 1361-1366.

[16] BLUNDELL T L. The first resolution revolution in protein structure analysis: X-ray diffraction of polypeptide conformations and globular protein folds in 1950s and 1960s[J]. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2021, 167: 32-40.

[17] 闫创业. 蛋白质晶体学中的相位解析优化以及三维模型构建的研究[D]. 北京: 清华大学, 2014. [YAN C Y. Research on phase resolution optimisation in protein crystallography and three-dimensional model construction[D]. Beijing: Tsinghua University, 2014.]

[18] 范海福, 梁栋材. 结构基因组学中的衍射相位问题[J]. *生命科学*, 2003(2): 65-69. [FAN Haifu, LIANG Dongcai. Diffraction phase problems in structural genomics[J]. *Life Science*, 2003(2):

65-69.]

[19] BLUNDELL T L, CHAPLIN A K. The resolution revolution in X-ray diffraction, Cryo-EM and other Technologies[J]. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2021, 160: 2-4.

[20] PABST G, KUCERKA N, NIEH M P, et al. Applications of neutron and X-ray scattering to the study of biologically relevant model membranes[J]. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2010, 163(6): 460-479.

[21] CHEN Y H, ZHANG M. Preparation and crystal growth of *Arabidopsis thaliana* VSP1 selenium protein derivatives[J]. *Journal of Biology*, 2011, 28(6): 23-25.

[22] SHOEMAKER S C, ANDO N. X-rays in the cryo-electron microscopy era: Structural biology's dynamic future[J]. *Biochemistry*, 2018, 57(3): 277-285.

[23] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 2版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999. [LU S D. Modern experimental techniques of molecular biology [M]. 2 (Ed.). Beijing: China Union Medical University Press, 1999.]

[24] DAVIES A M, TATA R, AGHA R, et al. Crystal structure of a putative phosphinothricin acetyltransferase (PA 4866) from *Pseudomonas aeruginosa* PAC 1[J]. *Proteins: Structure, Function & Bioinformatics*, 2005, 61(3): 677-679.

[25] 程艺, 马超, 陈晓雨, 等. 限制性内切酶 Nco I 的高效重组表达、硒代与结晶条件初步筛选[J]. *食品与生物技术学报*, 2021, 40(7): 81-88. [CHENG Yi, MA Chao, CHEN Xiaoyu, et al. Efficient recombinant expression, selenogeneration and preliminary screening of selenobacteria and crystallization conditions of restriction enzyme Nco I[J]. *Journal of Food and Biotechnology*, 2021, 40(7): 81-88.]

[26] SMITH J H, THOMPSON A, et al. Reactivity of selenomethionine--dents in the magic bullet?[J]. *Structure*, 1998, 6(7): 815.

[27] 邵钰晨, 马燕燕, 谷庆花, 等. 限制性内切酶 Mlu I 蛋白及其硒代衍生物的制备[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(5): 1528-1537.

[SHAO Yuchen, MA Yanyan, GU Qinghua, et al. Preparation of restriction enzyme Mlu I protein and its selenoderivative[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(5): 1528-1537.]

[28] RYAN D J, SPRAGGINS J M, CAPRIOLI R M. Protein identification strategies in MALDI imaging mass spectrometry: A brief review[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2019, 48: 64-72.

[29] 王铮, 郭新秋, 朱邦尚, 等. 利用圆二色光谱检测计算血清白蛋白二级结构[J]. *实验室研究与探索*, 2013, 32(10): 294-296.

[WANG Zheng, GUO Xinqiu, ZHU Bangshang, et al. Calculation of serum albumin secondary structure by circular dichroic spectroscopy[J]. *Laboratory Research and Exploration*, 2013, 32(10):

294-296.]

[30] 蒋君梅, 杜巧丽, 陈美晴, 等. 马铃薯 Y 病毒衣壳蛋白的表达、纯化与结晶条件筛选[J]. *植物保护学报*, 2022, 49(2): 508-514. [JIANG Junmei, DU Qiaoli, CHEN Meiqing, et al. Expression, purification and crystallization criteria screening of potato Y virus capsid protein[J]. *Journal of Plant Protection*, 2022, 49(2): 508-514.]

[31] 曹汝菲, 李泽轩, 许欢, 等. 脆弱拟杆菌 PifI 解旋酶的表达纯化与晶体生长[J]. *生物技术通报*, 2021, 37(9): 180-190. [CAO Rufe, LI Zexuan, XU Huan, et al. Expression purification and crystal growth of bacteroides fragilis PifI helicase[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2021, 37(9): 180-190.]

[32] 郭元亨, 吕哲, 丁子元, 等. 乙醇体系中 D-阿洛酮糖的结晶工艺优化[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(24): 185-189, 198. [GUO Yuanheng, LÜ Zhe, DING Ziyuan, et al. Crystallization process optimization of D-psicose in ethanol system[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(24): 185-189, 198.]

[33] 马晓慧. 非洲猪瘟病毒四种蛋白的表达纯化及结晶条件初步探索[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2021. [MA X H. Preliminary study on expression, purification and crystallization conditions of four proteins of african swine fever virus[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2021.]

[34] 程焯, 王业民, 郑舰艇, 等. 雷可肽生物合成中 LxmX 的表达纯化与结晶[J]. *基因组学与应用生物学*, 2021, 40(Z3): 3027-3034. [CHENG Zhuo, WANG Yemin, ZHENG Jianting, et al. Expression purification and crystallization of LxmX in racloptide biosynthesis[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2021, 40(Z3): 3027-3034.]

[35] HOFMANN M, WINZER M, WEBER C, et al. Limitations of polyethylene glycol-induced precipitation as predictive tool for protein solubility during formulation development[J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2018, 70(5): 648-654.

[36] 戚宝杰, 刘清海, 谢静莉, 等. 变形杆菌属脂肪酶 LipK107 的分离纯化、结晶及初步晶体学分析[J]. *食品工业科技*, 2012(19): 201-204. [QI Baojie, LIU Qinghai, XIE Jingli, et al. Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of a lipase from *Proteus* sp. K107[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012(19): 201-204.]

[37] 颜俊杰, 李玉洁, 郑迎迎, 等. 黑曲霉内切葡聚糖酶 AnCel5A 的表达纯化与晶体优化[J]. *食品与生物技术学报*, 2019, 38(2): 81-86. [YAN Junjie, LI Yujie, ZHENG Yingying, et al. Expression purification and crystal optimization of endoglucanase AnCel5A from *Aspergillus niger*[J]. *Journal of Food and Biotechnology*, 2019, 38(2): 81-86.]