

网络出版日期:2017-08-18
网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20170818.0939.040.html>

东方粘虫中肠 V-ATP 酶 A 亚基突变体 TSCA 的原核表达及复性纯化

侯文思¹, 李玉洁¹, 王媛媛², 陶虎¹

(1. 西北农林科技大学 理学院, 陕西杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西杨凌 712100)

摘 要 根据得到的东方粘虫 [*Mythimna separate* (Walker)] 中肠 V-ATPase A 亚基 (VHA-A) 基因 (VAT-PA), 预测其三维结构, 构建定点突变并复性。利用 Swiss-Model 在线预测 VHA-A 三维结构, 确定突变位点, 通过重折叠 PCR (Overlap-PCR) 技术构建突变基因并将其整合到 pET-22b(+) 载体上, 得到重组质粒 pET-22b(+)-TSCA, 转入大肠杆菌 BL21 中表达, 最后通过亲和层析纯化包涵体蛋白质并进行透析复性。结果表明, 成功构建突变基因和融合表达载体, 融合蛋白质以包涵体形式表达, 并得到大量纯化的可溶性蛋白。

关键词 V-ATP 酶 A 亚基; 定点突变; 原核表达; 包涵体复性

中图分类号 Q786 **文献标志码** A **文章编号** 1004-1389(2017)08-1248-05

液泡型 ATP 酶 (V-ATPase) 是由 14 个不同亚基组成的复合体, 作为持家基因广泛分布于细胞膜系统中^[1]。V-ATPase 利用水解 ATP 释放能量将 H⁺ 转运到囊泡或胞外, 从而维持胞质 pH 的平衡, 形成跨膜电势梯度, 为细胞活动的正常进行及各种离子和代谢物的转运提供必不可少的条件^[2]。在昆虫中肠, V-ATPase 存在于上皮杯状柱细胞, 是唯一的离子运输启动器, 严格调控昆虫中肠的离子运输^[3]。V-ATPase 的缺失会导致昆虫出现病理变化甚至死亡^[4]。近年来越来越多的学者将 V-ATP 酶作为药物靶标来研究^[5]。已有学者利用 Western 杂交和质谱等方法鉴定出多种昆虫中肠的 V-ATP 酶 A 亚基可以和苏云金芽孢杆菌 [*Bacillus thuringiensis* (Bt)] 毒素结合。徐丽娜^[6]通过双向凝胶电泳、配体杂交等方法发现亚洲玉米螟 [*Ostrinia furnacalis* (Guenée)] 幼虫刷状缘膜囊 (Brush border membrane vesicles, BBMV) 的 V-ATP 酶 A 亚基是 Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Ah、Cry1Ie 蛋白的结合位点。V-ATPase A 亚基是高度保守的催化亚基^[7], 研究表明 A 亚基上 walker A motif

(GXXXGKT) 特定残基具有重要作用; 将极端嗜热杆菌 V-ATPase A 亚基第 232 位丝氨酸突变为丙氨酸, 第 235 位苏氨酸突变为丝氨酸能够降低 ADP 反馈抑制, 提高全酶催化活性^[8]。目前, V-ATPase A 亚基的重组表达已有文献报道, 如靳婷婷等^[9]构建原核表达载体在大肠杆菌中表达玉米螟幼虫中肠 A 亚基。已有的文献^[10-11]均显示, 原核表达的 V-ATPase A 亚基在大肠杆菌中均以包涵体形式存在, 而利用真核系统表达蛋白质代价昂贵。本研究通过分析东方粘虫 [*Mythimna separate* (Walker)] 中肠 V-ATP 酶 A 亚基核酸结合区域, 筛选可能提高酶活力的氨基酸位点, 进行基因定点突变, 通过原核表达、包涵体复性等方法获得大量可溶性蛋白质, 为进一步研究东方粘虫 A 亚基的结构与功能奠定基础, 也为相关抑制剂的开发和筛选新农药奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 表达载体 pET-22b(+) 和大肠杆菌 Turbo、BL21(DE3) 为西北农林科技大

收稿日期: 2016-05-29 修回日期: 2016-06-15
基金项目: 西北农林科技大学引进人才专项资金(Z111021101); 国家自然科学基金(21403168)。
第一作者: 侯文思, 女, 硕士研究生, 从事蛋白质表达和纯化研究。E-mail: 956850986@qq.com
通信作者: 陶虎, 男, 教授, 硕士生导师, 从事蛋白质三维结构研究。E-mail: taohu@nwsuaf.edu.cn

学理学院蛋白质结构研究实验室保存;克隆载体 pMD 19-T-Simple 购自 TaKaRa 公司;质粒 pET-22b(+)-VATPA 由西北农林科技大学农药所提供。

1.1.2 主要生化试剂 *Taq* DNA Polymerase、*T₄* DNA Ligase、限制性内切酶 *Nde* I、*Hind* III、DNA Marker、核酸酶均购于 TaKaRa 公司;Pfu DNA Polymerase、蛋白质 Markers 购于 Thermo 公司;胶回收试剂盒、广谱蛋白 Markers 购于康为世纪公司;Bradford 试剂盒购于天根生化科技有限公司;Ni-NTA agarose 柱购于 GE 公司;其他相关试剂均为国产分析纯,购自杨凌三力化玻站。

1.2 方法

1.2.1 原核表达载体的构建与鉴定 以嗜热杆菌(*Thermus thermophiles*, PDB:3GQ) A 亚基氨基酸序列及其突变体 TSSA 为模板,利用 NCBI Blast 软件,与东方粘虫中肠 V-ATPase 酶 A 亚基序列比较,确定东方粘虫中肠 V-ATPase A 亚基突变位点。根据选定的突变点 C254 突变为 A254, T257 突变为 S257,设计引物(小写部分为突变位点氨基酸对应密码子)(表 1)。

表 1 重折叠 PCR 引物序列
Table 1 Primers for Overlap-PCR

引物名称 Primer	引物序列(5'→3') Sequence
F	CGCATATGAGCAAAAAAGATCAGCTGA-AGAAGATCG
RM	GAGATGACgctCTTGCCgcgACCGAAGG
FM	CCTTCGGTgcgGGCAAGagcGTCATCTC
R	GCAAGCTTGTCTCCAGGTTACGGAAGG

利用 overlap PCR 方法构建定点突变基因^[12],以 pET-22b(+)-VATPA 质粒为模板,引物 F、RM、FM、R 进行 PCR 扩增,分别扩增出上下游片段 A、B;以等量的 A、B 基因为模板,引物 F、R 进行 PCR 扩增并回收。将回收的 PCR 产物加 A 尾后与 pMD19-T-Simple 连接,转化至 *E. coli* Turbo,提取质粒,将重组质粒与 pET-22b(+)-载体均进行 *Nde* I、*Hind* III 双酶切并连接,得到表达载体 pET-22b(+)-TSCA,转入 *E. coli* Turbo,挑取单克隆进行 PCR 验证后测序。

1.2.2 目的蛋白的诱导表达 将测序结果正确的表达载体转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,并将其涂布于含氨苄青霉(Amp)的 LB 平板,过夜培养。挑取阳性单克隆于 5 mL 含 100 mg/L Amp 的新鲜 LB 培养液中 37 ℃ 过夜培养。次日以 1% 接种量接种至 50 mL 含 100 mg/L

Amp 的 LB 培养基中,37 ℃ 培养至 OD₆₀₀ ≈ 0.6 时,将培养物以每管 5 mL 分装于 4 个无菌 15 mL EP 管中,分别加入异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 0.1、0.2、0.5 和 1 mmol/L,于 37 ℃ 诱导表达 4 h。6 000 r/min、4 ℃ 离心 5 min 收集菌体,用 PBS 缓冲液重悬,超声破碎,于 12 000 r/min、4 ℃ 离心 30 min,分别取 37 ℃ 诱导上清和沉淀进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.3 蛋白质复性与纯化 参照文献[13],在 37 ℃ 条件下以 0.2 mmol/L 的 IPTG 终浓度大量诱导(1 L 液体 LB 培养基) pET-22b(+)-TSCA 在大肠杆菌 BL21 中表达 5 h,离心取菌体,用 Lysis buffer(20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl pH 7.0)重悬,加溶菌酶至 150 μg/mL,冰浴 30 min,超声破碎,加入 0.5 倍体积含 15 g/L Triton X-100 的洗涤液(100 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 7.0)搅拌混匀,12 000 r/min、4 ℃ 离心 30 min,弃上清。将沉淀用 35 mL 含 5 g/L Triton X-100 的洗涤液重悬,再用匀浆器研磨 15 min,12 000 r/min、4 ℃ 离心 30 min,弃上清。用不含 Triton X-100 的洗涤液重复上述步骤 2 次。洗涤后将包涵体溶解于 35 mL 溶解液(100 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L DTT, 8 mol/L 尿素, pH 8.0)中,室温搅拌 2~3 h,12 000 r/min、4 ℃ 离心 30 min,取上清,用 0.22 μm 滤膜过滤后溶液即为包涵体蛋白液。pET-22b(+)-表达的融合蛋白 C 端含有一个 His-tag,可使用 Ni-NTA 亲和层析纯化变性后包涵体蛋白。用结合缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L DTT, 8 mol/L 尿素, pH 8.0)平衡 Ni-NTA 层析柱,调节蛋白质样品 pH 至 8.0,以 1.5 mL/min 流速上样,用洗涤缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L DTT, 8 mol/L 尿素, pH=6.3)洗去杂蛋白,用洗脱缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L DTT, 8 mol/L 尿素, pH 4.5)洗脱目的蛋白。收集的洗脱液用 Bradford 试剂盒测蛋白质质量浓度后于-80 ℃ 冻存。取适当体积 Ni-NTA 纯化后蛋白质样品用新鲜溶解液稀释至终体积 100 mL,终质量浓度 0.1~0.2 mg/mL。稀释后的蛋白质样品于复性缓冲液 I (1 mol/L L-精氨酸, 1 mmol/L DTT, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 4 ℃ 透析 24 h, 12 000 r/min、4 ℃ 离心 30 min,上清继续用复性缓冲液 II (20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L

NaCl,1 mmol/L DTT,1 mmol/L 苯甲脒,pH 7.3)透析 12 h,换新鲜溶液Ⅱ继续透析,12 000 r/min,4 ℃离心 30 min,上清为复性成功的蛋白质。

2 结果与分析

2.1 同源建模和突变位点的选择

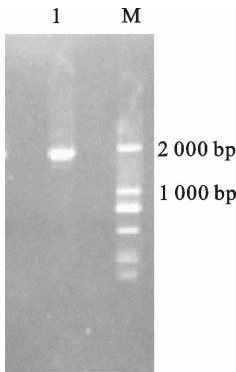
选用与蛋白一级序列相似度最高(一致性 65.24%)且已获得 3D 蛋白结构的酵母 V-ATP 酶 A 亚基(PBD:3J9T)为模板,利用 Swiss-Model(<http://swissmodel.expasy.org/interactive>)软件进行同源建模,获得东方粘虫中肠 V-ATPase A 亚基三维结构模型(图 1)。



图 1 东方粘虫中肠 V-ATPase A 亚基三维结构模拟图
Fig.1 Simulative tertiary structure of *Mythisma separata* subunit A

2.2 原核表达载体的构建与鉴定

提取重组质粒 pET-22b(+)-TSCA 转入 *E. coli* Turbo 后,挑取阳性克隆并提取质粒,进行 PCR 验证,电泳条带与预期大小一致(图 2),且质粒测序结果正确,重组质粒 pET-22b(+)-TSCA 构建成功。

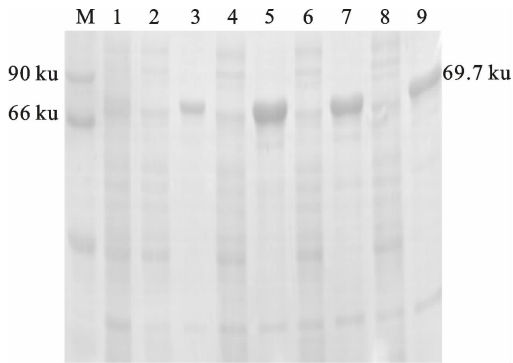


M, DM 2000 DNA marker;1. pET-22b(+)-TSCA 的 PCR 结果 Result of pET-22b(+)-TSCA gene by PCR

图 2 PCR 验证 pET-22b(+)-TSCA 表达载体
Fig.2 Identification of pET-22b(+)-TSCA expression vector by PCR

2.3 融合蛋白的表达

将测序验证正确的 pET-22b(+)-TSCA 表达载体转入 BL21(DE3)表达菌株中,在 37 ℃不同 IPTG 终浓度诱导该蛋白质表达。融合蛋白分子质量理论值约为 69.7 ku,目的蛋白与广谱蛋白标准比对条带位置正确(图 3)。且不同诱导剂浓度下,菌体超声破碎后的上清液中均没有明显的目的条带,沉淀中有明显的目的蛋白条带。这表明绝大多数的蛋白以包涵体形式存在,且 IPTG 终浓度为 0.2 mmol/L 时沉淀中目的蛋白含量最大。



M. 蛋白质标准分子质量 Protein molecular weight marker; 1. 未经 IPTG 诱导的细胞总蛋白质 Total cell proteins without induced by IPTG;2-9:不同浓度 IPTG 诱导后的上清液和沉淀,IPTG 浓度分别为 0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.5 mmol/L 和 1 mmol/L Supernatant and pellet induced by IPTG,and the inducer concentrations were 0.1 mmol/L, 0.2 mmol/L, 0.5 mmol/L and 1 mmol/L

图 3 37 ℃下不同浓度 IPTG 表达蛋白的鉴定
Fig.3 Identification of TSCA expression at 37 ℃ under different IPTG concentration

2.4 包涵体的纯化与复性

细胞裂解后的包涵体蛋白质用 Triton X-100 处理,再利用 Ni-NTA 层析柱纯化,上样后用洗杂蛋白液洗去部分杂蛋白(图 4-A、4-B)。透析液Ⅱ透析后的蛋白质为复性好的可溶性蛋白质,经 10% SDS-PAGE 检测为一条带,且条带位置与理论分子质量一致(图 4-C)。包涵体用 8 mmol/L 尿素溶解后,用 bradford 试剂盒测粗蛋白质样品,其质量浓度为 4.13 mg/mL,体积约为 35 mL。复性好的蛋白质经 Bradford 蛋白质点定量试剂盒测得质量浓度约为 48 μg/mL,体积约为 110 mL,一次复性效率约 53%。培养 1 L 菌体最终可获得纯蛋白质约 67 mg。

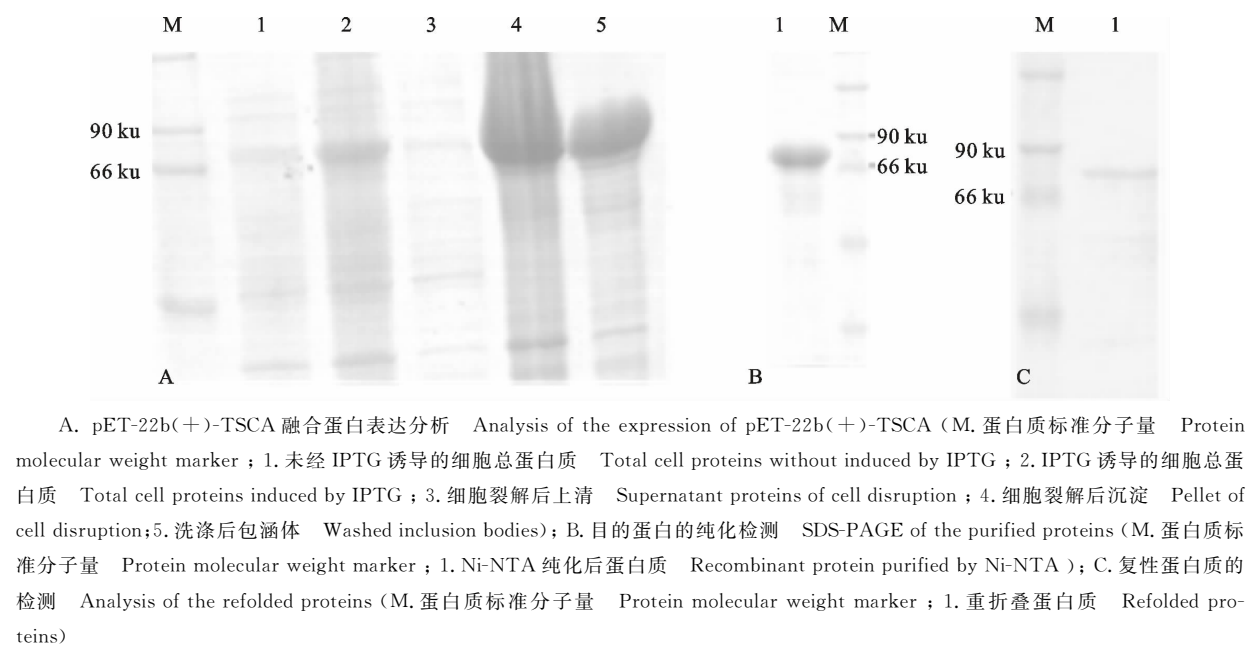


图 4 TSCA 诱导表达与纯化检测

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the expression and the purification of recombinant proteins

3 结论与讨论

V-ATPase 广泛存在于真核细胞的内膜系统上,由胞内的 V1 结构域和镶嵌在膜上的 V0 结构域组成^[14]。V 1 由 A~H 8 个亚基组成,具有 ATP 水解作用;V0 由 a、d、e、c 和 c' 亚基组成,负责质子运输。酵母包含 1 个额外的亚基 c'^[15],更高级的真核生物则有额外的蛋白质 Ac45^[16]。V-ATPase A 亚基是催化亚基^[17],由 4 个结构域组成:N 端的 β 桶状结构域,包含凸起的非同源结构域;中心的 α/β 结构域和 C 端结构域^[18]。C 端结构域包含 Walker A motif、Walker B motif。Walker A motif 与核酸结合有关,而 Walker B motif 与天冬氨酸介导的 Mg^{2+} 反应有关^[19-20]。

本试验通过预测 V-ATPase A 亚基蛋白质三维结构,同源比对确定突变位点,利用 over-lap PCR 等分子生物学技术构建突变工程菌。在前期,对诱导温度、时间和 IPTG 浓度进行摸索,期望能得到更多的可溶性蛋白质,但结果目的蛋白质绝大多数以包涵体形式存在。可能是因为原核表达系统缺乏引导多肽正确折叠的分子伴侣或者调解机制,使得蛋白质无法正确折叠,失去原有特性和功能,最终以包涵体形式存在。本试验最终决定通过复性获得可溶性目的蛋白,考虑到纯化方法和复性步骤,选用 pET-22b(+)构建表达载体,采取一步透析法,在透析液 pH 8.0,添加终浓

度为 1 mol/L 的 L-精氨酸,获得高收率的可溶性蛋白质。本试验 1 L 菌体最终可得到 67 mg 左右较纯的可溶性蛋白质,复性效率为 53%,为后续研究 V-ATP 酶活性,A 亚基的功能和结构,利用突变体 TSCA 筛选 ATP 酶抑制剂提供条件。

参考文献 Reference:

- [1] BEYENBACH K W, WIECZOREK H. The V-type H^{+} ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2006, 209(4): 577-589.
- [2] BRETON S, BROWN D. Regulation of luminal acidification by the V-ATPase[J]. *Physiology*, 2013, 28(5): 318-329.
- [3] WIECZOREK H, GRUBER G, HARVEY W R, et al. Structure and regulation of insect plasma membrane H^{+} -V-ATPase[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2000, 203(1): 127-135.
- [4] WIECZOREK H, BEYENBACH K W, HUSS M, et al. Vacuolar-type proton pumps in insect epithelia[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2009, 212(11): 1611-1619.
- [5] KARTNER N, MANOLSON M F. V-ATPase subunit interactions: the long road to therapeutic targeting[J]. *Current Protein & Peptide Science*, 2012, 13(2): 164-179.
- [6] 徐丽娜. Cry1Ab 抗性亚洲玉米螟对不同 Bt 毒素的交互抗性及其产生的分子机理[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010: 34-58
- [7] XU L N. Cross-resistance and molecular mechanism of Cry1Ab-selected *Ostrinia furnacalis* to other Bt toxins [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010: 34-58(in Chinese with English abstract).
- [8] MA B Y, YUN X, LI Z A. Structural bases of physiological functions and roles of the vacuolar H^{+} -ATPase[J]. *Cellular Signalling*, 2011, 23(8): 1244-1256.
- [9] IMAMURA H, FUNAMOTO S, YOSHIDA M, et al. Reconstitution in vitro of V1 complex of *Thermus thermophilus* V-ATPase revealed that ATP binding to the A subunit is crucial for V1 formation [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(50): 38582-38591.
- [9] 靳婷婷, 李 宁, 王振营, 等. 亚洲玉米螟中肠 Cry1Ac 毒素结合蛋白 V-ATP 酶 A 亚基的研究[J]. 中国生物防治学

- 报, 2015, 31(2): 208-215.
- JIN T T, LI N, W ZH Y, *et al.* Cloning and characterization of the CryIaC-binding V-ATPase subunit A in the Asian corn borer [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2015, 31(2): 208-215 (in Chinese with English abstract).
- [10] 毛毅辉, 李会勇, 王天宇, 等. 玉米液泡 ATP 酶亚基 A 基因的克隆及表达分析[J]. 作物学报, 2008, 34(1): 31-36.
- MAO Y H, LI H Y, WANG T Y, *et al.* Cloning and expression analysis of a vacuolar ATPase subunit A gene in maize[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2008, 34(1): 31-36 (in Chinese with English abstract).
- [11] HUNKE C, CHEN W J, SCHAFER H J, *et al.* Cloning, purification, and nucleotide-binding traits of the catalytic subunit A of the V1V0 ATPase from *Aedes albopictus* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2007, 53(2): 378-383.
- [12] HECKMAN K L, PEASE L R. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(4): 924-32.
- [13] 沈 琴, 邓汉卿, 侯文思, 等. 人降钙素受体胞外域的复性及新的体外活性测定方法[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2014, 30(9): 942-947.
- SHEN Q, DENG H Q, HOU W S, *et al.* Method of in vitro bioactivity assay for refolded human ectodomain of calcitonin receptor [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 30(9): 942-947 (in Chinese with English abstract).
- [14] FORGAC M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, 8(11): 917-929.
- [15] ZHAO J H, BENLEKBIR S, RUBINSTEIN J L, *et al.* Electron cryomicroscopy observation of rotational states in a eukaryotic V-ATPase [J]. *Nature*, 2015, 521(7551): 241.
- [16] COTTER K, STRANSKY L, MCGUIRE C, *et al.* Recent insights into the structure, regulation, and function of the V-ATPases [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2015, 40(10): 611-622.
- [17] CROSS R L, MULLER V. The evolution of A-, F-, and V-type ATP synthases and ATPases: reversals in function and changes in the H^+ /ATP coupling ratio [J]. *Febs Letters*, 2004, 576(1/2): 1-4.
- [18] MAHER M J, AKIMOTO S, IWATA M, *et al.* Crystal structure of A3B3 complex of V-ATPase from *Thermus thermophilus* [J]. *Embo Journal*, 2009, 28(23): 3771-3779.
- [19] MARSHANSKY V, RUBINSTEIN J L, GRUBER G. Eukaryotic V-ATPase: Novel structural findings and functional insights [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 2014, 1837(6): 857-879.
- [20] MAEGAWA Y, MORITA H, IYAGUCHI D, *et al.* Structure of the catalytic nucleotide-binding subunit A of A-type ATP synthase from *Pyrococcus horikoshii* reveals a novel domain related to the peripheral stalk [J]. *Acta Crystallographica*, 2010, 62(5): 483-488.

Prokaryotic Expression, Refolding and Purification of V-ATPase Subunit A Mutant TSCA in the Midgut of *Mythimna separate*

HOU Wensi¹, LI Yujie¹, WANG Yuanyuan² and TAO Hu¹

(1. College of Science, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China;

2. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract Based on V-ATPase A subunit gene(VATPA) in the midgut of *Mythimna separate*, three-dimensional structure was predicted, site-directed mutant was built and recombinant protein was obtained after renaturing. The protein structure of VHA-A was analyzed, three-dimensional structure was predicted by Swiss-Model online, and the mutation site was designed. The mutant gene was constructed with overlap PCR, and inserted into pET-22b(+) vector. The recombinant plasmid pET-22b(+)-TSCA was transformed into *E. coli* BL21(DE3) for expression. After purified by Ni-NTA column, the inclusion body was renatured. The results showed the recombinant plasmid was successfully built, the fusion proteins were expressed as inclusion bodies, and the soluble proteins were successfully obtained in large scale. The study will facilitate the investigation of structure and function of V-ATPase subunit A and creation of environmental friendly pesticides.

Key words V-ATPase subunit A; Designated mutation; Protein prokaryotic expression; Refolding of inclusion body

Received 2016-05-29 **Returned** 2016-06-15

Foundation item Special Talent Recruitment Fund of Northwest A&F University(No. Z111021101); the National Natural Science Foundation of China(No. 21403168)

First author HOU Wensi, female, master student. Research area: protein expression and purification. E-mail: 956850986@qq.com

Corresponding author TAO Hu, male, professor, master supervisor. Research area: protein-protein interaction and structural resolution. E-mail: taohu@nwsuaf.edu.cn

(责任编辑: 郭柏寿 Responsible editor: GUO Baishou)