

家蚕吡哆醛激酶的融合表达与纯化

张平平¹, 张剑韵¹, 黄龙全^{2,*}

(1. 安徽农业大学生命科学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学茶与食品科技学院, 合肥 230036)

摘要:【目的】吡哆醛激酶(pyridoxal kinase, PLK, EC 2.7.1.35)是维生素 B₆ 的关键代谢酶。本研究原核表达家蚕 *Bombyx mori* 重组 PLK, 为进一步开展家蚕 PLK 的催化作用机制和表达调控机制的研究奠定基础。【方法】构建家蚕 PLK 基因融合表达质粒, 转化大肠杆菌 *Escherichia coli* 诱导表达, 经 Ni²⁺ 亲和层析纯化后, 对融合蛋白的催化活性进行分析。【结果】纯化后的家蚕重组 PLK 经 SDS-PAGE 鉴定为单一条带, 比活力为 1 800 U/mg, 纯化倍数为 40 倍。在底物过量的条件下, 该重组酶的体外最适反应温度是 50℃; 最适 pH 为 5.5~6; Zn²⁺ 是酶促反应有效的激活剂。【结论】重组家蚕 PLK 与来源于家蚕组织的 PLK 具有相同的催化性质。

关键词: 家蚕; 吡哆醛激酶; 融合表达; 纯化; 酶活性

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2010)09-0957-05

Fusion expression and purification of pyridoxal kinase of *Bombyx mori*

ZHANG Ping-Ping¹, ZHANG Jian-Yun¹, HUANG Long-Quan^{2,*} (1. College of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. College of Tea & Food Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: 【Aim】Pyridoxal kinase (PLK, EC 2.7.1.35) is a key enzyme related to vitamin B₆ metabolism. In this study, recombinant pyridoxal kinase of *Bombyx mori* will be expressed, which will lay a foundation for further study on regulation mechanism, catalytic mechanism and structure of PLK in *B. mori*. 【Methods】After fusion expression vector harboring PLK gene of *B. mori* was constructed, the recombinant vector was transformed to *Escherichia coli* Rosetta for induction and expression, and then the characteristics of the purified recombinant protein was analyzed after the expression product was purified using affinity chromatography by Ni²⁺ column. 【Results】Only one band was observed when the purified PLK was separated on SDS-PAGE. The PLK was enriched by 40-fold and its specific activity was 1 800 U/mg. The optimum temperature and pH of this enzyme was about 50℃, and 5.5–6, respectively, and Zn²⁺ was the effective activator in enzymatic reaction. 【Conclusion】The recombinant PLK exhibited the same catalytic characteristics as the native protein obtained from tissues of *B. mori*.

Key words: *Bombyx mori*; pyridoxal kinase; fusion expression; purification; enzyme activity

磷酸吡哆醛(pyridoxal-5'-phosphate, PLP)是维生素 B₆(VB₆)的主要辅酶形式, 参与氨基酸代谢的各种反应(Kerry *et al.*, 1986)。吡哆醛激酶(pyridoxal kinase, PLK, EC 2.7.1.35)是 VB₆ 的关键代谢酶(Wrenger *et al.*, 2006), 在金属阳离子和 ATP 存在下, 催化吡哆醛、吡哆醇及吡哆胺, 分别形成磷酸吡哆醛、磷酸吡哆醇和磷酸吡哆胺(McCormick and Chen, 1999)。哺乳动物和微生物 PLK 的分离纯化、酶学性质、空间结构等多有报道(Maras *et al.*, 1999; Lum *et al.*, 2002; Safo *et al.*, 2004; Salvo *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2006), 而昆虫

PLK 的相关研究较少。家蚕是重要经济昆虫, VB₆ 对蚕体氨基酸代谢、脂肪酸代谢以及转氨酶活力有较大影响(张剑韵和黄龙全, 2003b); 家蚕体内 VB₆ 的转换代谢与哺乳动物存在差异(张剑韵和黄龙全, 2003a); 深入研究家蚕 PLK 的催化机制和表达调控机制有重要意义。

张剑韵等(2008)采用生物信息学原理和 PCR 方法, 从 5 龄幼虫脂肪体中克隆出家蚕 PLK cDNA (GenBank 登录号: DQ452397), 构建非融合表达载体 pET22-PLK 进行原核表达, 并对表达产物进行了功能鉴定。家蚕 PLK cDNA 含有一 894 bp 的完整

基金项目: 国家自然科学基金项目(30870338)

作者简介: 张平平, 女, 1983 年生, 山东德州人, 硕士研究生, 研究方向为生物物理学, E-mail: acedreams@gmail.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: lqhuang218@yahoo.com.cn

收稿日期 Received: 2010-03-15; 接受日期 Accepted: 2010-06-15

读码框,编码一条分子量为33.1 kD,含298个氨基酸残基的蛋白质。本研究进一步构建家蚕 PLK 融合表达质粒 pET22b-His-PLK,原核表达、纯化出重组蛋白,为进一步分析家蚕 PLK 催化作用机制,制备多克隆抗体、检测 PLK 的表达提供了实验材料。

1 材料与方法

1.1 菌株、载体和试剂

DH5 α 克隆菌株、pET-22b(+)载体由安徽农业大学茶叶生物技术重点实验室保存。表达菌株 *Escherichia coli* Rosetta(DE3)、Pfu 聚合酶和蛋白质 Marker 购自北京全式金生物技术有限公司;限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I、T4 连接酶购自 TaKaRa 公司;胶回收试剂盒购自 Axygen 生物技术有限公司;异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、二硫苏糖醇(DTT)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、溶菌酶、氨苄青霉素钠(Amp $\cdot$ Na $_2$)、氯霉素(CM)、三磷酸腺苷钠盐(ATP $\cdot$ Na $_2$)和牛血清白蛋白购自上海生工生物工程公司;Ni SepharoseTM 6 Fast Flow 购自 GE 公司;离心超滤管购自 Millipore 公司;吡哆醛购自 Sigma 公司。引物合成和 DNA 测序由上海生工生物工程公司完成。

1.2 家蚕重组 PLK 融合表达质粒的构建

以 pET22-PLK 为模板,设计合成引物(上游引物:5'-GGCCATATGTCTCAAGATGATACTCCA-3',斜体字表示 *Nde* I 酶切位点,下划线部分为起始密码子;下游引物:5'-GTCTCTCGAGGTTTATTTTCACAGCCTT-3',斜体字表示 *Xho* I 酶切位点)进行 PCR 扩增。PCR 产物和 pET-22b(+)分别用 *Nde* I/*Xho* I 进行双酶切;酶切产物经切胶回收、纯化后用 T4 连接酶连接获得重组质粒,转化 DH5 α 感受态细胞,涂布于平板培养基上培养。挑选单菌落提取质粒,经 *Nde* I/*Xho* I 双酶切后测序鉴定。重组质粒命名为 pET22b-His-PLK。

1.3 家蚕重组 PLK 的诱导表达及纯化

将重组质粒 pET22b-His-PLK 转化 Rosetta 后接种于 5 mL LB 液体培养基(50 μ g/mL Amp、34 μ g/mL CM)中,37 $^{\circ}$ C、225 r/min 过夜培养。次日按 1:100(体积比)扩大培养,30 $^{\circ}$ C 培养至菌液 OD₆₀₀ 值为 0.4~0.6 时,加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L,16 $^{\circ}$ C 诱导表达 12 h 后离心收集菌体。加入 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.4,含 0.5 mol/L NaCl)5 mL 重悬菌体,添加终浓度

1 mmol/L DTT、10 mmol/L PMSF、100 μ g/mL 溶菌酶后混匀。冰浴下超声破碎菌体,4 $^{\circ}$ C 下 8 000 r/min 离心 20 min 取上清,即为粗酶液。粗酶液经 Ni SepharoseTM 6 Fast Flow(GE)分离纯化,收集目的蛋白进行超滤浓缩。取 10 μ L 样品进行 SDS-PAGE 电泳(浓缩胶 5%、分离胶 12.5%)检测蛋白纯度。

1.4 家蚕重组 PLK 活力的测定

酶活力测定参照 Kerry 等(1986)的方法,略加改动。反应体系 3 mL,由 70 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 5.6)2.7 mL、3 mmol/L ATP $\cdot$ Na $_2$ 0.1 mL、3 mmol/L ZnCl $_2$ 0.05 mL、3 mmol/L 吡哆醛 0.1 mL 和酶液 0.05 mL 构成。37 $^{\circ}$ C 下反应 10 min 后,388 nm 处测定吸光值。酶活力单位(U)定义:37 $^{\circ}$ C 下,每分钟催化生成 1 nmol PLP 所需的酶量。样品中蛋白质定量采用 Bradford(1976)法。

2 结果与分析

2.1 家蚕重组 PLK 融合表达质粒的构建

质粒 PCR 扩增 pET22b-His-PLK 重组基因产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,可见 900 bp 左右的片段,与预期相符(图 1)。测序结果表明,在家蚕 PLK 基因的 C 末端连有 6 $\times$ His 标签序列,融合载体构建成功。

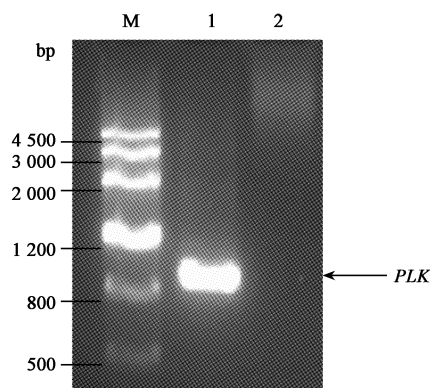


图 1 大肠杆菌转化子 PCR 检测

Fig. 1 PCR results of *Escherichia coli* transformants

M: DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker; 1: pET22b-His-PLK PCR 产物 PCR product of pET22b-His-PLK; 2: 空载体 PCR 产物 PCR product of empty vector.

2.2 家蚕重组 PLK 的融合表达与纯化

家蚕 PLK 的理论分子量为 33.1 kD,组氨酸标签为 0.84 kD,合计分子量为 33.94 kD。重组表达菌株经 IPTG 诱导后在 34 kD 附近出现目的蛋白条带,该蛋白主要存在于菌体破碎离心后的上清中,

经亲和层析纯化后为单一一条带(图2)。

表达菌液超声破碎离心后所得粗酶液的比活力为 45 U/mg, 经 Ni^{2+} 亲和层析后的比活力为 1 800 U/mg, 纯化倍数为 40 倍(表 1)。

2.3 家蚕重组 PLK 经纯化后的基本酶学性质

在底物过量的情况下, 家蚕重组 PLK 的体外最适反应温度为 50℃(图 3); 最适 pH 值为 5.5 ~ 6(图 4); Zn^{2+} 是有效的激活剂(图 5), 其他金属离子对酶的激活作用顺序为 $\text{Fe}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ 。

3 讨论

融合表达系统可以简化重组蛋白的纯化过程。常用的融合标签包括谷胱甘肽巯基转移酶(GST)标签、多聚精氨酸(Arg)标签、多聚组氨酸(His)标签及亲水性八氨基酸肽(Flag)标签等。His 标签具有相对分子量小、无免疫原性、与固定的金属离子结合力强、可在温和条件下洗脱等优点(Terpe, 2003)。本研究构建带有 His 标签的原核表达载体, 表达产

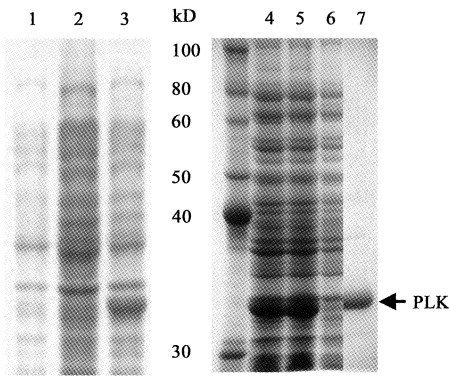


图2 家蚕重组 PLK 纯化的 SDS-PAGE 电泳分析
Fig. 2 SDS-PAGE analysis on purification of recombinant pyridoxal kinase of *Bombyx mori*

1: 空菌株 *Escherichia coli* Rosetta; 2: 含 pET22b-His-PLK 但未经 IPTG 诱导 Expression of pET22b-His-PLK without IPTG induction; 3: IPTG 诱导 pET22b-His-PLK 表达 Expression of pET22b-His-PLK after induction with IPTG; M: 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker; 4 - 6: 分别为超声破碎后的菌液、上清和沉淀 Mixture, supernatant and precipitation of bacterial liquid after ultrasonication, respectively; 7: 纯化家蚕重组 PLK Purified recombinant PLK of *B. mori*.

表 1 家蚕重组吡哆醛激酶的纯化
Table 1 Purification of recombinant pyridoxal kinase of *Bombyx mori*

处理 Treatment	体积(mL) Volume	总蛋白质(mg) Total protein	总活力(U) Total activity	活力(U/mL) Activity	比活力(U/mg) Specific activity
粗酶液 Crude extract	10	38	1 710	171	45
亲和层析 Affinity chromatography	1.3	0.26	468	360	1 800

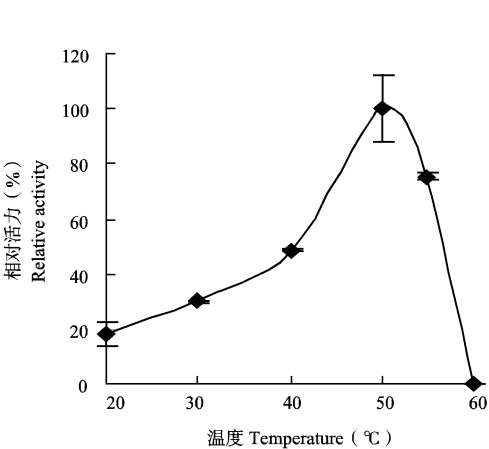


图3 温度对家蚕重组吡哆醛激酶酶活性的影响
Fig. 3 Effect of temperature on the activity of recombinant pyridoxal kinase of *Bombyx mori*

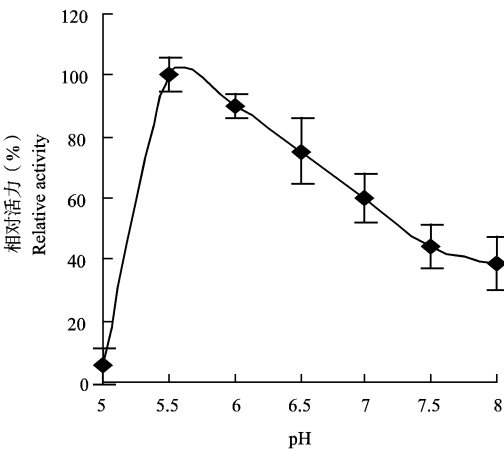


图4 pH 值对家蚕重组吡哆醛激酶酶活性的影响
Fig. 4 Effect of pH value on the activity of recombinant pyridoxal kinase of *Bombyx mori*

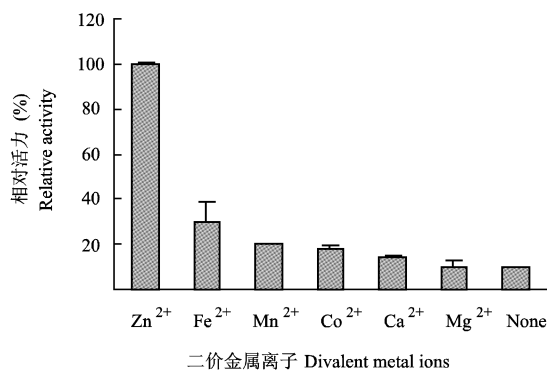


图5 不同金属离子对家蚕重组吡哆醛激酶活力的影响

Fig. 5 Effect of different divalent metal ions on the activity of recombinant pyridoxal kinase of *Bombyx mori*

物经简单亲和层析纯化后, 获得了 SDS-PAGE 鉴定为单一蛋白质成分的家蚕重组 PLK。

重组蛋白开放阅读框中如果存在大肠杆菌的稀有密码子, 外源蛋白的合成速率和表达量会显著降低 (Spanjaard and van Duin, 1988; Wakagi *et al.*, 1998)。为避免家蚕 PLK 序列中存在的 8 个大肠杆菌稀有精氨酸密码子 (AGG 和 AGA) 对融合蛋白表达的影响, 本研究选用 *E. coli* Rosetta (DE3) 作为表达菌株。*E. coli* Rosetta 含有一种能提供精氨酸稀有密码子的 tRNA 质粒, 可以增加含有稀有密码子重组蛋白在大肠杆菌中的表达。结果表明家蚕重组 PLK 在 *E. coli* Rosetta 菌株中得到了高效表达。

近年来, 猪 *Sus scrofa domestica*、人 *Homo sapiens*、拟南芥 *Arabidopsis thaliana*、小麦 *Triticum aestivum* 和疟原虫 *Plasmodium falciparum* PLK 基因/cDNA 成功地在大肠杆菌中表达, 表达出的重组蛋白具有和天然蛋白相同的酶学性质、免疫原性和酶动力学参数 (Gao *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000; Lum *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004; Wrenger *et al.*, 2006), 并且适用于蛋白结构的研究 (Cao *et al.*, 2006; Musayev *et al.*, 2007)。本研究采用大肠杆菌表达纯化的家蚕重组 PLK, 也与从家蚕组织直接提取的 PLK (Huang *et al.*, 1999) 的催化性质一致, 为进一步开展家蚕 PLK 的催化机制和表达调控机制的研究奠定了基础。

致谢 本实验载体构建工作在安徽农业大学茶叶生物化学与生物技术重点开放实验室完成, 感谢江昌俊老师、谭振硕士与本研究室已毕业石瑞君硕士的大力支持。

参考文献 (References)

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of

microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytic Biochemistry*, 72: 248–254.

Cao P, Gong Y, Tang L, Leung YC, Jiang T, 2006. Crystal structure of human pyridoxal kinase. *J. Struct. Biol.*, 154(3): 327–332.

Gao ZG, Lau CK, Lo SC, Choi SY, Churchich JE, Kwok F, 1998. Porcine pyridoxal kinase: c-DNA cloning, expression and confirmation of its primary sequence. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 30(12): 1379–1388.

Huang LQ, Zhang JY, Hayakawa T, Tsuge H, 1999. Analysis of the enzyme activities on the vitamin B6 metabolism in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 68(2): 103–109.

Kerry JA, Rohde M, Kwok F, 1986. Brain pyridoxal kinase. Purification and characterization. *Eur. J. Biochem.*, 158(3): 581–585.

Lee HS, Moon BJ, Choi SY, Kwon OS, 2000. Human pyridoxal kinase: overexpression and properties of the recombinant enzyme. *Mol. Cells*, 10(4): 452–459.

Lum HK, Kwok F, Samuel CL, 2002. Cloning and characterization of *Arabidopsis thaliana* pyridoxal kinase. *Planta*, 215(5): 870–879.

Maras B, Valiante S, Orru S, Simmaco M, Barra D, Churchich JE, 1999. Structure of pyridoxal kinase from sheep brain and role of the tryptophanyl residues. *J. Protein Chem.*, 18(3): 259–268.

McCormick DB, Chen H, 1999. Update on interconversions of vitamin B-6 with its coenzyme. *J. Nutr.*, 129(2): 325–327.

Musayev FN, Salvo ML, Ko TP, Gandhi AK, Goswami A, Schirch V, Safo MK, 2007. Crystal structure of human pyridoxal kinase: structure basis of M⁺ and M²⁺ activation. *Protein Sci.*, 16: 2184–2194.

Safo MK, Musayev FN, Hunt S, Salvo ML, Scarsdale N, Schirch V, 2004. Crystal structure of the PdxY protein from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 186(23): 8074–8082.

Salvo ML, Hunt S, Schirch V, 2004. Expression, purification, and kinetic constants for human and *Escherichia coli* pyridoxal kinase. *Protein Expr. Purif.*, 36: 300–306.

Spanjaard RA, van Duin J, 1988. Translation of the sequence ACG-AGG yields 50% ribosomal frameshift. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(21): 7967–7971.

Terpe K, 2003. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60: 523–533.

Wakagi T, Oshima T, Imamura H, Matsuzawa H, 1998. Cloning of the gene for inorganic pyrophosphatase from a thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. strain 7, and overproduction of the enzyme by coexpression of tRNA for arginine rare codon. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62(12): 2408–2414.

Wang HB, Liu DC, Liu CG, Zhang AM, 2004. The pyridoxal kinase gene TaPdxK from wheat complements vitamin B₆ synthesis-defective *Escherichia coli*. *J. Plant Physiol.*, 161: 1053–1060.

Wrenger C, Eschbach ML, Müller IB, Warnecke D, Walter RD, 2006. Analysis of the vitamin B6 biosynthesis pathway in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.*, 280(7): 5242–5248.

- Zhang JY, Huang LQ, 2003a. Distribution, movement and metabolism of vitamin B₆ compounds in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.*, 46(3): 277 – 281. [张剑韵, 黄龙全, 2003a. 家蚕体内维生素 B₆ 的存在形态和转换代谢. 昆虫学报, 46(3): 277 – 281]
- Zhang JY, Huang LQ, 2003b. Effects of vitamin B₆ deficiency on the amino acid metabolism, fatty acid metabolism and aminotransferase activity of the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.*, 46(4): 436 – 440. [张剑韵, 黄龙全, 2003b. 家蚕体内因缺乏维生素 B₆ 而引起的若干代谢变动. 昆虫学报, 46(4): 436 – 440]
- Zhang JY, Shi RJ, Huang LQ, 2008. Cloning, expression and genomic organization of the cDNA encoding pyridoxal kinase in *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.*, 51(2): 113 – 119. [张剑韵, 石瑞君, 黄龙全, 2008. 家蚕吡哆醛激酶 cDNA 的克隆、表达和基因结构分析. 昆虫学报, 51(2): 113 – 119]

(责任编辑: 赵利辉)