

家蚕吡哆醛激酶 cDNA 的克隆、表达和基因结构分析

张剑韵¹, 石瑞君¹, 黄龙全^{2,*}

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

摘要: 吡哆醛激酶(pyridoxal kinase, PLK, EC2.7.1.35)是维生素 B₆ 关键代谢酶,其 cDNA 的克隆在昆虫类还未见报道。利用生物信息学原理和使用 PCR 方法,克隆出编码家蚕 *Bombyx mori* 吡哆醛激酶的 cDNA (GenBank 登录号 DQ452397),体外原核表达成功,并对表达粗提产物进行了酶活检测。克隆到的 cDNA 含有一 894 bp 的完整可读框,编码一条分子量为 33.1 kD,含 298 个氨基酸残基的蛋白质。序列比对显示此蛋白质与人类吡哆醛激酶具有 52.84% 的同一性,包含吡哆醛激酶家族共有的特征保守序列,但比哺乳动物和植物克隆到的吡哆醛激酶均少 10 多个氨基酸残基,几个有关键功能且在哺乳动物和植物中均保守的氨基酸残基在此蛋白中被替换。依据家蚕基因组数据库信息和 PLK 的 cDNA,家蚕 PLK 基因包含 5 个外显子和 4 个内含子,跨越 10 kb DNA 序列,所有外显子/内含子交接点都遵从 gt/ag 剪接规则,基因的 5' 端启动子调控区发现有 TATA-box 和 CAAT-box 保守基序。

关键词: 家蚕;吡哆醛激酶;cDNA 克隆;表达;基因结构分析

中图分类号:S881.2 文献标识码:A 文章编号:0454-6296(2008)02-0113-07

Cloning, expression and genomic organization of the cDNA encoding pyridoxal kinase in *Bombyx mori*

ZHANG Jian-Yun¹, SHI Rui-Jun¹, HUANG Long-Quan^{2,*} (1. College of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. College of Tea & Food Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: Pyridoxal kinase (PLK, EC2.7.1.35) is a key enzyme catalyzes the vitamin B₆ metabolism. In this paper, a cDNA encoding PLK was cloned from *Bombyx mori* using the PCR method. The cDNA (GenBank accession number: DQ452397) has an 894 bp open reading frame and encodes a protein of 298 amino acid residues with a molecular mass of 33.1 kD. The cDNA cloned was expressed successfully in *Escherichia coli* using the T7 promoter/T7 RNA polymerase expression system, and the crude extracts containing the expressed product were found to have strong PLK enzymatic activity. The amino acid sequence shares 52.84% identity with that of human PLK, and it also contains signature conserved motifs of the PLK family. However, the protein is 10 or more amino acid shorter than the PLKs from mammals and plants, and several amino acid residues conserved in the PLKs from mammals and plants are changed in the protein. According to genomic database of *B. mori* and the cDNAs of PLK, the gene organization of PLK was determined. The *B. mori* PLK gene is composed of five exons and four introns, and spans approximately 10 kb. All exon/intron junctions of PLK gene of *B. mori* contain the gt/ag consensus splicing site. The TATA-like box and CAAT-like box is found in regulatory regions of PLK gene. This is the first identification of a gene encoding PLK in insects.

Key words: *Bombyx mori*; pyridoxal kinase; cDNA clone; expression; genomic organization

维生素 B₆(VB₆)是一类吡啶化化合物的总称,游离型有吡哆醇(pyridoxine, PN)、吡哆胺(pyridoxamine, PM)和吡哆醛(pyridoxal, PL),相应磷酸酯型为磷酸吡哆醇(pyridoxine-5'-phosphate, PNP)。

基金项目:安徽省教育厅自然科学基金项目(2003KJ126);安徽省人事厅人才开发基金资助项目(2002Z034);实验内容在教育部茶叶生物化学与生物技术重点开放实验室完成

作者简介:张剑韵,女,1959年11月生,江苏无锡人,博士,副教授,主要从事昆虫生物化学和分子生物学研究, Tel.: 13856021134; E-mail: jianyun218@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 0551-5157862; E-mail: lqhuang218@yahoo.com.cn

收稿日期 Received: 2007-08-15; 接受日期 Accepted: 2007-09-24

磷酸吡哆胺 (pyridoxine-5'-phosphate, PMP) 和磷酸吡哆醛 (pyridoxal-5'-phosphate, PLP)。PLP 是 VB₆ 的主要辅酶形式, 在氨基酸的合成、分解和转换代谢中发挥重要作用。

吡哆醛激酶 (pyridoxal kinase, PLK, EC 2.7.1.35) 在 Zn²⁺ 和 ATP 存在下, 催化 PN、PM 及 PL 生成相应的磷酸酯型。PLK 和磷酸吡哆醇氧化酶决定 PLP 的合成, 两者和磷酸酶一起调节细胞内 PLP 浓度变化, 维持 PLP 浓度的动态平衡。目前已从部分哺乳动物、微生物和植物中分离鉴定了 PLK 基因 (Hanna *et al.*, 1997; Scott and Phillips, 1997; Gao *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998; Maras *et al.*, 1999; Guo and Newell, 2000; Wang *et al.*, 2004), 其酶学性质、空间结构和催化机制也有不少研究 (Safo *et al.*, 2004, 2006; Li *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 2006), 但昆虫类生物 PLK 基因的相关研究还未见报道。家蚕 *Bombyx mori* 也属 VB₆ 异养型生物, 家蚕体内 VB₆ 的转换代谢与哺乳动物有较大差异 (张剑韵和黄龙全, 2003)。我们利用生物信息学原理和使用 PCR 方法, 克隆出家蚕 PLK cDNA, 并对基因结构进行了分析。实验结果有助于弄清 PLK 在生物中的进化演变规律, 为深入研究昆虫类生物 PLK 的空间结构、从分子生物学的角度探讨家蚕体内 VB₆ 特殊转换代谢的形成机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试虫及主要试剂

蚕品种为皓月 × 青松, 自然条件下桑叶育, 5 龄 4 日幼虫冷冻于 -80℃ 冰箱中保存备用。大肠杆菌菌株 DH5a 和 BL21trxB (DE3) 以及表达载体 pET-32a (+) 和 pET-22b (+) 为安徽农业大学茶叶生物技术实验室保存。Trizol、MMLV 反转录试剂盒、Pfu DNA 聚合酶、Taq DNA 聚合酶、dNTP、Gel Extraction Kit (SK1131)、RNA 酶、EB、SYBR Green I、DEPC、X-gal、IPTG、DNA Marker、蛋白质 Marker、TEMED、Tris base、Gly 等购自上海生物工程公司 (Sangon)。克隆载体 pMD18-T、限制性内切酶 (*Nde* I、*Xho* I) T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司, PLP、PL 购自 Sigma 公司。实验所用引物的合成及 DNA 的测序工作由上海生物工程公司完成。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析: 以人的 PLK 氨基酸序列 (312 个氨基酸) 搜索 (Translated-BLAST program) 家蚕

EST 库和基因组序列数据库 (<http://silkworm.genomics.org.cn/>) 在骨架 Scaffold000593 上的 51 ~ 60 kb 区域, 搜索到了相似性较高的 5 条邻近的 DNA 序列, 其中第 1 条与第 5 条分别与人 PLK 的氨基酸序列 C 端和 N 端同源。没有从家蚕 EST 库搜索到人的 PLK 同源序列。利用 GENSCAN 软件辅助预测, 对 Scaffold000593 上的 51 ~ 60 kb 区进行外显子拼接, 适当外延第 1 和第 5 条序列, 获得了一条假定的家蚕 PLK cDNA 序列, 共 915 bp。使用引物设计软件 Primer premier 5.0、Oligo6 作辅助, 在假定的起始密码子和终止密码子附近设计 1 对引物用于 PCR 扩增验证。正义引物为 5'-AATGTCTCAAGATGATACTC-3'; 反义引物为 5'-AATCTAGTTTATTTTCACAG-3', 引物跨越完整的编码区。

编码框序列翻译、蛋白质序列性质分析使用 Dnastar 软件进行。双序列比对、多序列比对和聚类分析使用 Dnaman 软件进行。基因结构分析采用 SeqVISTA 软件辅助进行。基因调控区序列预测使用的网络资源: <http://compel.bionet.nsc.ru/FunSite/CompelPatternSearch.html>; <http://compel.bionet.nsc.ru/FunSite/fsp.html>; <http://www.cbs.dtu.dk/services/promoter/>。

1.2.2 总 RNA 的提取: 从 -80℃ 取出家蚕幼虫, 于低温下分离出家蚕腹部的脂肪体, 称量 100 mg 放入预先在 -80℃ 冰箱中预冷了 2 h 的研钵中, 加入 2 mL Trizol 试剂冰上研磨 5 min, 待 Trizol 溶化成液态后, 继续研磨 2 min 后静置 1 min。然后按试剂说明提取总 RNA。

1.2.3 RNA 反转录为 cDNA: 参照 Sangon MMLV 反转录试剂盒的说明书进行。

1.2.4 RT-PCR 扩增目的片段: 50 μL 反应体系中含有 10 × Buffer 5 μL、MgCl₂ 1.5 mmol/L、dNTP 200 μmol/L、上下游引物各 0.4 μmol/L、cDNA 模板 2 μL, 用 ddH₂O 补至总体积为 50 μL。扩增条件: 95℃ 4 min, 78℃ 暂停, 加入 2 U pfu (高保真) DNA 聚合酶, 在 94℃ 45 s、56℃ 45 s、72℃ 120 s、每个循环降 0.5℃ 的条件下进行 10 个循环, 退火温度至 51℃ 后再进行 94℃ 45 s、52℃ 45 s、72℃ 120 s 条件下的 25 个循环。

1.2.5 PCR 产物克隆与测序: PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳割胶回收, 操作参照 Sangon UNIQ-5 柱式 DNA 凝胶回收试剂盒说明书进行。回收片段加 A 尾以利 T-A 克隆。使用 Takara 的 pMD18-T 载体及 Ligate Mix 将加 A 后的 PLK 片段连接入 pMD18-T 载

体(带有抗 Amp 基因),构建重组质粒 pMD18-T-PLK。转化 *E. coli* DH5a 感受态细胞并筛选培养。挑取单个白色菌落,用菌落 PCR 法鉴定阳性克隆,挑取阳性菌落穿刺于装有固体培养基(Amp⁺)的 1.5 mL 离心管中,送 Sangon 用 MBI 3730 测序仪进行双向测序。

1.2.6 PLK 的原核表达:依据 PLK 编码框序列设计用于构建 PLK 的 pET22b(+)非融合蛋白表达载体的引物(表 1)表中下划线部分为酶切位点,酶切位点的 5'方向为保护碱基,加边框部分为起始密码子,黑体部分为终止密码子,U 表示上游引物,L 表示下游引物。

表 1 原核表达使用的引物

Table 1 The primers used for expression in *E. coli*

引物名称 Primer name	引物碱基序列 Primer base	限制酶 Restriction enzyme
P _{PLK} -U 5'-GGC <u>CAT</u> ATG TCTCAAGATGATACTCCA-3'		<i>Nde</i> I
P _{PLK} -L 5'-GTCT <u>CTCGAGTCTAGTTTATTTTCACAG</u> -3'		<i>Xho</i> I

以 1.2.5 节方法构建好的包含有 PLK 基因可读框的克隆载体 pMD18-T-PLK 为模板,用以上所示引物进行 PCR 反应,扩增出目标 DNA 片段。PCR 产物经纯化后,通过双酶切插入表达载体 pET22b(+),转化感受态 DH5a 细胞,倒置培养。挑取单菌落先用菌落 PCR 方法鉴定,继续培养经 PCR 鉴定为阳性的菌落,提取质粒进行酶切鉴定,得到重组表达质粒 pET22-PLK(PLK 非融合蛋白表达载体)。进一步转化表达菌 BL21trxB(DE3)感受态细胞并倒置培养,采用菌落 PCR 法鉴定阳性菌。

1.2.7 表达菌株的诱导表达及表达产物 SDS-PAGE 分析:将含有重组质粒 pET22-PLK 的 BL21 单菌落接种于装有 7 mL 液体 LB 培养基(含 Amp 50 μg/mL、Kan 15 μg/mL)的 50 mL 三角瓶中,37℃、200 r/min 振荡培养 10 h 后,取 500 μL 转接于装有 50 mL 液体 LB 培养基的 500 mL 三角瓶中,30℃、200 r/min 振荡培养至溶液的光密度(OD₆₀₀)为 1.0,添加 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L,30℃ 继续培养,并分别于 0 h、1 h、3 h、6 h 取出 5 mL 菌液用于蛋白质 SDS-PAGE 分析。

表达菌液样品于 4℃、12 000 r/min,离心 1 min,弃上清。加入 1 mL 的 1×PBS 重悬菌体,加溶菌酶至终浓度 100 μg/mL,混匀后 30℃ 水浴 15 min,4℃ 水浴下超声波处理(400 W,每次处理 5 s,间隔 3 s,共处理 80 次)。超声处理完成后加入 1 mL 的 2×SDS 加样缓冲液,70℃ 加热 3 min。蛋白质 SDS-

PAGE 的分离胶浓度 12%,积层胶浓度 5%,上样量 20 μL,电泳后的凝胶用考马斯亮蓝 R250 染色,脱色后采用 Bio-rad 成像系统拍照分析。

1.2.8 酶活性检测:含重组质粒 pET22-PLK 表达菌的粗酶液命名为 Pro-PLK,同时提取含空质粒载体的 BL21 菌株表达产物粗酶液作为参比对照,命名为 Pro-P22。

PL 和 PLP 与羟氨反应生成物的荧光强度增加幅度基本一致,但两者与羟氨形成复合物的反应速度有较大差别,PLP 与羟氨达到完全反应只需 2.5 min,而 PL 与羟氨需 1 h 以上才能完全反应。据此利用添加羟氨后在几分钟内混合物荧光强度的变化来反映 PLP 的浓度变化。

酶促反应体系 3 mL,含 70 mmol/L 混合磷酸钾缓冲液(pH 6.4)、0.2 mmol/L PL、0.2 mmol/L ATP·Na₂、0.1 mmol/L ZnCl₂,反应液在加入相当于 0.5 mg 总蛋白的粗酶液 Pro-PLK 后立即置 37℃ 水浴 20 min 后反应混合物转入比色皿中,加入羟氨溶液至终浓度为 1 mmol/L,迅速摇匀置入荧光分光光度计比色池,进行荧光检测(激发波长 380 nm,荧光波长 450 nm,5 min 时间扫描模式,灵敏度 2 缝隙 10)。

2 结果与讨论

2.1 RT-PCR 扩增结果

依据预测的 PLK cDNA 设计的 1 对引物经 RT-PCR 扩增,得到了 1 条约 900 bp 左右的条带(图 1),条带大小与预期吻合。

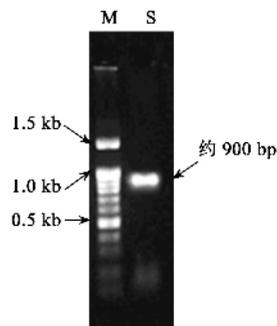


图 1 RT-PCR 产物的电泳分析

Fig. 1 Electrophoresis analysis of the product of RT-PCR
M: DNA 标准 DNA marker; S: RT-PCR 产物 Product of RT-PCR.

2.2 家蚕 PLK 测序结果

PLK 扩增产物测序结果如图 2 所示,碱基长度为 901 bp,第 2~898 碱基区为可读框,编码一个具有 298 个氨基酸残基的蛋白质,此蛋白质分子量为

33.09 kD, 等电点为 6.15。PLK 测序序列与预测序列比对显示(图省略), 预测序列有一段外显子拼接错误, 多出 14 个碱基, 两序列间有 3 个碱基不同, 但

差异的碱基不改变编码的氨基酸, 提示这种碱基差异可能是由不同品种间单核苷酸多态性引起。

	10	20	30	40	50	60	70	80	90																					
1	<u>AATGTC</u> <u>CAAGATGAT</u> <u>ACTCC</u> AAAGAGTTCTTCCATACAGAGTCATGGTACATGGTTATGTTGGTAATAAAAGTGCAGTTTTCCATT																													
1	M	S	Q	D	D	T	P	R	V	L	S	I	Q	S	H	V	V	H	G	Y	V	G	N	K	S	A	V	F	P	L
	100	110	120	130	140	150	160	170	180																					
91	GCAAGTCTAGGTTTTGAAGTAGATTCCATAAATACTGTACAGTTTTTCAACACACACAGCATACAAGCATATCAAGGGCTATGTATTGAA																													
31	Q	V	L	G	F	E	V	D	S	I	N	T	V	Q	F	S	T	H	T	A	Y	K	H	I	K	G	Y	V	L	N
	190	200	210	220	230	240	250	260	270																					
181	TAATGACCAAATGAAGAAATTAGTTGAAGCCCTGGTACTGAATGAGTTGACTATTATACACATTTCTAAGTGGTTACTCAAGATCGCC																													
61	N	D	Q	M	K	E	L	V	E	G	L	V	L	N	E	V	D	Y	Y	T	H	F	L	T	G	Y	S	R	S	P
	280	290	300	310	320	330	340	350	360																					
271	AGATCTCTCAGAAAATAGCTAAAATAATAAAACAACCTGAGAGAGAAAACCCAAACTTAATATATGTCGTGACCCGGTGTGGGTGA																													
91	D	S	L	R	E	I	A	K	I	I	K	Q	L	R	E	K	N	P	N	L	I	Y	V	C	D	P	V	M	G	D
	370	380	390	400	410	420	430	440	450																					
361	TAATGGAAAATGTCAGTACCGAAGAGATTCTGCGGTATACCGCGAGTCTGGTACCGCTAGCAGACATTTTGACCCCAAACAATT																													
121	N	G	K	M	Y	V	P	E	E	I	L	P	V	Y	R	D	V	L	V	P	L	A	D	I	L	T	P	N	Q	F
	460	470	480	490	500	510	520	530	540																					
451	CGAAGCAGAATTGATCACCAGCATTCCAATGAAGGATCTCGATGGTCTCTGAGAGTCATACAGAGGCTCCACGATATGGGAGTAAAGAC																													
151	E	A	E	L	I	T	G	I	P	M	K	D	L	D	G	A	L	R	V	I	Q	R	L	H	D	M	G	V	K	T
	550	560	570	580	590	600	610	620	630																					
541	GGTGGTGTCTAGTACCGATCTGGGAGCAGGAGAATATGATCGGCTGGCTAGTACTGGAGGATCATGTTACAAGATCCCAATACC																													
181	V	V	L	S	S	T	D	L	G	D	E	E	N	M	I	G	L	A	S	T	G	G	S	C	Y	K	I	P	I	P
	640	650	660	670	680	690	700	710	720																					
631	CAAAGTGGAGCAACGTTACGGGTACCGGAGACTTGTTCGGCGGTTATTCTCGCGTGGTCACACTTGACTGGCAACGACGTCAAAC																													
211	K	V	E	A	T	F	T	G	T	G	D	L	F	A	A	L	F	L	A	W	S	H	L	T	G	N	D	V	K	L
	730	740	750	760	770	780	790	800	810																					
721	GGCCCTCGAAAAGACGATAGCGACTCTGCAGAGTATTGTGGGATACATACCAAACGGCCAGAGCATCTCATCTGACCCGAAAATCC																													
241	A	L	E	K	T	I	A	T	L	Q	S	I	V	V	D	T	Y	Q	T	A	R	A	S	H	L	T	G	K	I	P
	820	830	840	850	860	870	880	890	900																					
811	ACCACGGTCTCACTGAACCTCCGTCTCGTCAAAAACAAACCGTCATTGAAGATCCAAAATAAATTAAGGGCTGTGAAAATAAACTAGAT																													
271	P	R	F	T	E	L	R	L	V	Q	N	K	T	V	I	E	D	P	K	I	K	L	K	A	V	K	I	N	*	
901	T																													

图 2 吡哆醛激酶 cDNA 序列及其可读框氨基酸序列

Fig. 2 The nucleotide sequence of PLK cDNA and the deduced amino acid sequence of ORF

PCR 扩增验证使用的引物为下划线部分, 星号标记终止密码子位。The PCR primers used in cloning cDNA are labeled and underling.

The translation termination codon is designated with an asterisk.

2.3 PLK 序列比对和聚类分析

将经功能鉴定过的来源于多物种的 PLK 氨基酸序列进行比对和聚类分析。各序列在 GenBank 中的登录号为: 人(human, NP_003672); 羊(sheep, P82197); 猪(pig, O46560); 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, AAL57364); 小麦(wheat, AAR00318); 家蚕(*Bombyx mori*, ABE28378); 锥虫(*Trypanosoma brucei*, AAC61803); 盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*, AAG01573); 大肠杆菌(*E. coli*, pdxY, BAA15397); 大肠杆菌(*E. coli*, pdxK, BAA16292)。

双序列比对揭示, 家蚕与人 PLK 序列的同一性为 52.84%。多序列比对显示(图省略), 与哺乳动物和高等植物相比, 家蚕 PLK 氨基酸序列要短 10 多个残基, 高等植物 PLK 体现在 N 端的延长, 哺乳动物 PLK 主要体现在 180~235 非保守区残基数的增多。PLK 活性位点处有重要功能的残基在家蚕中同样保守, 如与 PL 形成氢键相互作用并决定底物特异

性的三个残基 Ser14、Tyr86 和 Asp221; 与 ATP γ 磷酸相互作用的 Asp115 和 Glu151。羊 PLK 与 PL 疏水相互作用的两个残基为 Val19 和 Val231, 其中 Val231 在家蚕中改变为 Thr217。家蚕 PLK 与低等生物和植物一样, 活性中心区的 LOOP1(L1 区)结构比哺乳动物少 4 个残基, 其中 Asp120、Met124 和 Tyr125 与哺乳动物 PLK 相应残基一致。PLK 活性中心 LOOP2 区中普遍保守的 Asn, 在家蚕 PLK 中替换为 Thr47。大肠杆菌 pdxK 中 LOOP2 上两个与 PL 相互作用的重要残基 Pro58-His59, 在家蚕中替换为 Thr49-Ala50, 而哺乳动物 PLK 中相应两个残基为 Thr-Gly。图 3 为 PLK 聚类分析结果。

2.4 家蚕 PLK 的原核表达

采用 T7 启动子/T7 RNA 聚合酶表达系统 pET22k(+)-BL21trxB(DE3)对 PLK 基因 cDNA 编码区进行了在大肠杆菌中的蛋白表达。载体 pET22k(+)上含有 T7 启动子及一段位于 T7 启动子序列后

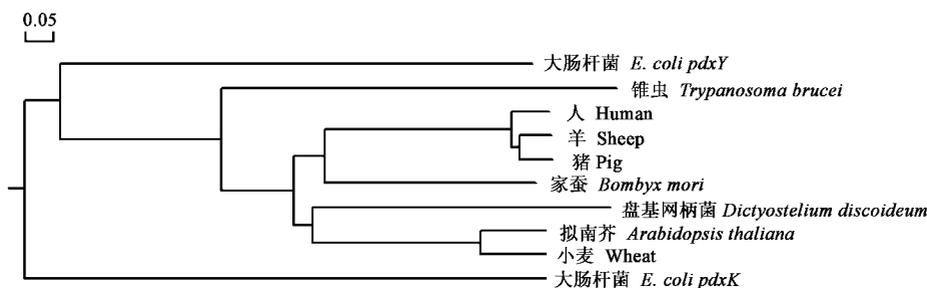


图 3 吡哆醛激酶的聚类分析

Fig. 3 The phylogenetic tree of PLKs

的 N 末端 *pelB* 信号序列。在 IPTG 诱导下,插入 T7 启动子后的基因能够在宿主菌 BL21(DE3)中被高效率地转录。pET22b(+)上的 *Nde* I 酶切位点序列(CAT/ATG)包含 N 末端 *pelB* 信号序列的起始密码子,使用 *Nde* I 和 *Xho* I 对 pET22b(+)进行双酶切时, N 末端 *pelB* 信号序列被完全切除。另外,插入 pET22b(+)中的 PLK 编码区序列已包含终止密码子。所以,由构建的表达质粒 pET22-PLK 表达得到的蛋白是非融合蛋白,其氨基酸序列完全由 PLK ORF 框编码而来。

为了使可溶性蛋白产量达最大,经诱导表达条件的优化筛选,PLK 的最佳诱导条件确定为: IPTG 诱导起始时期为培养液 $OD_{600} = 1.0$, IPTG 诱导浓度为 0.2 mmol/L, 诱导培养温度为 30℃, 最长诱导时间 6 h。

图 4 为最佳诱导条件下的 PLK 表达培养物总溶胞产物的 SDS-PAGE 分析。含有 pET22-PLK 质粒的大肠杆菌 BL21(DE3)菌株表达出了预期分子量大小的蛋白(泳道 2、3、4),而在含有 pET22b(+)空载体的大肠杆菌 BL21(DE3)菌株则没有同样大小分子量的蛋白产生(泳道 5)。

2.5 家蚕 PLK 催化活性的鉴定

图 5 为 PLK 酶活测定结果,粗酶液 Pro-PLK 呈现出较强的吡哆醛激酶活性,其酶促反应液的荧光强度是同样量的粗酶液 Pro-P22 酶促反应液的荧光强度 20 倍。根据 PLP 荧光强度标准曲线(省略)计算出 0.5 mg Pro-PLK 在 37℃ 下与底物 PL 温育 20 min 后,产物 PLP 的生成量约为 300 nmol。由这些数据可得出,在以 PL 为底物时,Pro-PLK 的酶活力约为 $30 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。实验结果证实了克隆到的 cDNA 编码家蚕吡哆醛激酶。

2.6 家蚕 PLK 基因结构分析

在中国所公布的家蚕基因组框架图中, Scaffold000593 上的 49 000 ~ 60 006 bp 之间为 PLK 基

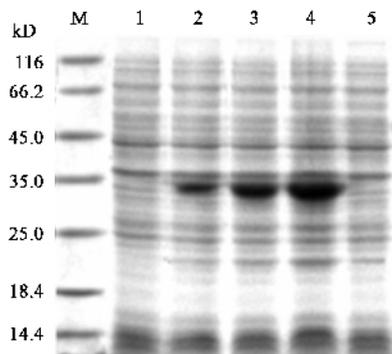


图 4 吡哆醛激酶表达培养物总溶胞产物的 SDS-PAGE(12%)分析

Fig. 4 SDS-PAGE(12%) analysis of cell lysates from expression culture of PLK and PNPO

M: 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker; 1-4: 分别为含有质粒 pET22-PLK 的 BL21(DE3)表达菌 IPTG 诱导 0 h、1 h、3 h、6 h 后的溶胞产物

The crude extracts of *E. coli* BL21(DE3), harboring pET22b-BPLK, induced 0 h, 1 h, 3 h, 6 h by IPTG in order; 5: 含有质粒 pET22b(+)的 BL21(DE3)表达菌 IPTG 诱导 3 h 后的溶胞产物 The crude extracts of *E. coli* BL21(DE3), harboring pET22b(+), induced 3 h by IPTG.

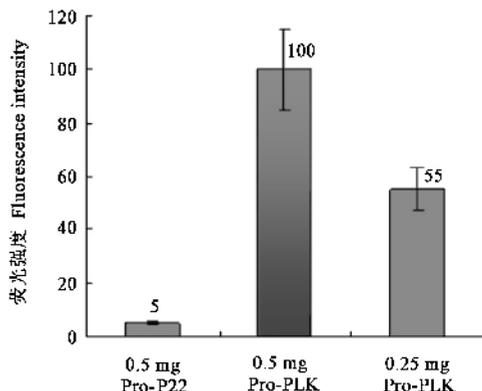


图 5 Pro-PLK 酶促反应混合物的荧光强度

Fig. 5 Fluorescence intensity of reaction mixture containing Pro-PLK

因所在部位, Scaffold000593 总长 60 006 bp, PLK 基因的正义链是其反向互补序列, PLK 起始密码子位于

Scaffold000593 的末端第 59 921 碱基处,因此 PLK 基因 5' 侧翼区大部分序列无法从 Scaffold000593 上获得。我们从日本公布的家蚕 DNA 数据库中搜索到一个 RAMEN 重叠群 BAAB01016615,此条序列长 1 085 bp,与 Scaffold000593 重叠了 634 个碱基。拼接 BAAB01016615 与 Scaffold000593 这两条序列,即延伸了 PLK 基因 5' 侧翼区的 451 个碱基。

家蚕 PLK 基因结构如图 6 所示(序列省略)。PLK 基因跨越约 10 kb DNA 区域,包含 5 个外显子及 4 个内含子。E1 ~ E5 标识的方框区域为外显子部分,黑色方框为 ORF 序列,灰色方框为 5' 和 3' 非

翻译区序列,方框之间的粗线段为内含子部分。空心方框内的碱基序列为可能的核心启动子。相对于转录起始点(- CCAT A T -)位置的 - 26 和 - 92 区具有典型的 TATA 框和 CAAT 框启动子结构。所有内含子边界包含规则的 5' _{gt} 剪接供体序列和 3' _{ag} 剪接受体序列(表 2)。

在上述 PLK 基因序列 3' 侧翼区,发现了多个加 A 信号序列,成熟 mRNA 实际的末端位点还需要通过实验确定。另外,我们给出的家蚕 PLK 基因转录起始点和两个保守启动子区,是经预测软件辅助和经验得出的结果,其准确性尚需由实验来证实。

PLK-GENE



图 6 家蚕吡哆醛激酶基因结构

Fig. 6 Genomic organization of the PLK gene in *Bombyx mori*

表 2 家蚕吡哆醛激酶基因外显子和内含子的拼接点

Table 2 The intron/exon junctions of the PLK gene in *Bombyx mori*

外显子 (bp) Exon	5' 剪接供体端 5' splice donor	内含子 (bp) Intron	3' 剪接受体端 3' splicing receptor	外显子 Exon
E1 (189)	TTCAA/gtaagt	1 (659)	tttcag/GTTCTA	E2
E2 (244)	TATATG/gtatgt	2 (4 840)	ctccag/TCTGTG	E3
E3 (267)	CTGGAG/gtattt	3 (1 001)	ttttag/GATCGT	E4
E4 (180)	CTAGAG/gtagg	4 (858)	ttgtag/CGTCTC	E5
E5 (113 +)				

大写字母表示外显子剪接位点序列,小写字母表示内含子剪接区序列。The exon splice site sequences is shown in uppercase, while the intron splice site sequences is depicted in lowercase.

参 考 文 献 (References)

- Cao P, Gong Y, Tang L, 2006. Crystal structure of human pyridoxal kinase. *Journal of Structural Biology*, 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: 1 379 - 1 388.
- Guo K, Newell PC, 2000. Pyridoxal kinase knockout of *Dictyostelium* complemented by the human homologue. *FEMS Microbiol. Lett.*, 189: 195 - 200.
- Hanna MC, Turner AJ, Kirkness EF, 1997. Human pyridoxal kinase cDNA cloning, expression, and modulation by ligands of the benzodiazepine receptor. *J. Biol. Chem.*, 272: 10 756 - 10 760.
- Li MH, Kwok F, Chang WR, Liu SQ, Lo SC, Zhang JP, Jiang T, Liang DC, 2004. Conformational changes in the reaction of pyridoxal kinase. *J. Biol. Chem.*, 279(17): 17 459 - 17 465.
- 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: 259 - 268.
- Safo MK, Musayev FN, Hunt S, di Salvo ML, Scarsdale N, Schirch V, 2004. Crystal structure of the pdxY protein from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 186(23): 8 074 - 8 082.
- Safo MK, Musayev FN, di Salvo ML, Scarsdale N, Schirch V, 2006. Crystal structure of pyridoxal kinase from the *Escherichia coli* pdxK gene: Implications for the classification of pyridoxal kinases. *Journal of Bacteriology*, 188(12): 4 542 - 4 552.
- Scott TC, Phillips MA, 1997. Characterization of *Trypanosoma brucei* pyridoxal kinase: purification, gene isolation and expression in *Escherichia coli*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 88: 1 - 11.
- Tang L, Li MH, Cao P, 2005. Crystal structure of pyridoxal kinase in complex with roscovitine and derivatives. *Journal of Biological Chemistry*, 280(35): 31 220 - 31 229.
- Wang HB, Liu DC, Liu CG, Zhang AM, 2004. The pyridoxal kinase gene from wheat complements vitamin B₆ synthesis-defective *Escherichia coli*. *Journal of Plant Physiology*, 161: 1 053 - 1 060.
- Yang Y, Tsui HC, Man TK, Winkler ME, 1998. Identification and function

of the *pdxY* gene, which encodes a novel pyridoxal kinase involved in the salvage pathway of pyridoxal 5'-phosphate biosynthesis in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 180:1 814 – 1 821.

Zhang JY, Huang LQ, 2003. Distribution, movement and metabolism of vitamin B₆ compounds in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta*

Entomologica Sinica, 46(3):277 – 281. [张剑韵, 黄龙全, 2003. 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]

(责任编辑: 黄玲巧)