

定点突变改善红色荧光指示蛋白玉米尿卟啉原Ⅲ 甲基化酶的水溶性研究

Improved the Solubility of Maize Uroporphyrinogen Ⅲ Methyltransferase as the Red Fluorescent Indicator by Site-directed Mutagenesis

潘海韵 程 郢 朱苏文 范 军*

PAN Hai-Yun , CHENG Ying , ZHU Su-Wen and FAN Jun *

安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036

School of Life Sciences , Anhui Agricultural University , Hefei , 230036 , China

摘 要 尿卟啉原Ⅲ甲基化酶是一种新型的红色荧光指示蛋白,但是,在大肠杆菌重组表达的 SUMT 水溶性相对较低,限制了它的应用范围,而且对于结合在蛋白的色素组分尚不清楚。利用定点突变产生玉米尿卟啉原Ⅲ甲基化酶 L88R/L89G 双突变体和 L166A 突变体,两种突变体分别在大肠杆菌中重组表达, Ni-NTA 一步纯化。紫外可见光谱扫描和质谱分析确定从纯化的 L88R/L89G 双突变体蛋白分离的色素组分。L88R/L89G 双突变体在大肠杆菌细胞内有酶活,而 L166A 突变体胞内酶活丧失。结合蛋白的主要组分为三甲基化咕啉。纯化的双突变体蛋白水溶性增加,为提高它作为荧光指示蛋白检测外源融合蛋白的水溶性打下基础。

关键词 尿卟啉原Ⅲ甲基化酶,玉米,定点突变,三甲基咕啉

中图分类号 Q946.5 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)02-0206-05

Abstract *S*-adenosylmethionine-dependent uroporphyrinogen Ⅲ methyltransferase (SUMT) is a novel red fluorescence indicator. However, the production of SUMT in *Escherichia coli* is restricted by its relatively low solubility, and little is known about the red fluorescent materials that are associate with SUMT. Two individual SUMT mutations, L166A and L88R/L89G double mutant were produced by site-directed mutagenesis. Both mutants were overexpressed in *E. coli* and purified by Ni-NTA chromatography. The reddish mixtures isolated from the purified L88R/L89G double mutant were analyzed by UV-visible spectra scanning and mass analysis (MS). The L88R/L89G double mutant has enzymatic activity *in vivo*, whereas L166A mutant loses the activity. Trimethylpyrrocorphin is identified as the main constituent in the isolated pigments. The purified L88R/L89G mutant increases protein solubility, which is applied potentially as the fluorescent indicator denoting the solubility of protein fusion partner.

Key words uroporphyrinogen Ⅲ methyltransferase, maize, mutation, trimethylpyrrocorphin

Received: September 15, 2006; Accepted: November 21, 2006.

This work was supported by a grant from Anhui Provincial Commission of Science and Technology (No. 06013155C).

* Corresponding author. Tel: + 86-551-2823795; E-mail: fanjun@ahau.edu.cn

安徽省科学技术厅资助(No.06013155C)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

依赖于 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionin , SAM)的尿卟啉原Ⅲ甲基化酶(S-adenosylmethionine dependent uroporphyrinogen Ⅲ methyltransferase , SUMT)是西罗血红素和维生素 B₁₂ 分支合成的调控酶,它催化尿卟啉原Ⅲ二甲基化生成前咕啉-2。从数个细菌中纯化了 SUMT ,并分别详细研究了酶学性质^[1]。两种细菌 SUMT 晶体结构的解析有助于深入了解酶的功能^[2,3]。植物 SUMT 研究报道较少。我们初步研究了玉米(*Zea mays* L.)的 SUMT ,它是同亚基二聚体, N 端的导肽影响重组蛋白在大肠杆菌的折叠, C 端 52 个氨基酸残基不是催化所必需的。红色色素和酶非共价结合, 除去色素后, 酶的二级结构会发生轻微改变^[4]。

表达 SUMT 会在重组细胞内积累红色荧光物质, 它们分别是 SUMT 催化产物的氧化形式西罗双氢叶绿三酸和过甲基化副产物三甲基咕啉, 该物质在长紫外光下产生强烈红色荧光^[5,6]。这种性质使编码 SUMT 基因能够作为报告基因, 用于重组质粒的筛选^[7], 它在大肠杆菌、酵母和哺乳动物细胞用于转录报告基因^[8], 还用于细胞传感器^[9]。由于 SUMT 是限速酶, 它的过量表达可提高维生素 B₁₂ 的产量^[10]。作为一种新型的红色荧光指示蛋白, SUMT 的研究远不及绿色荧光蛋白(green fluorescent protein , GFP)。目前发现不同生物 SUMT 的水溶性偏低, 纯化的重组蛋白需要溶解在一定浓度的盐溶液中^[2-4]和重组酶结合的荧光色素组分目前尚不清楚。改善大肠杆菌表达的重组蛋白水溶性有多种方法, 其中之一是将蛋白中疏水氨基酸残基定点突变成带正电荷的氨基酸残基, 这已有成功的例子^[11-13]。本研究中, 我们利用定点突变技术改善了玉米 SUMT 的水溶性并分析了结合重组酶的荧光物质成分, 这为拓宽这种红色荧光指示蛋白的应用范围奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒:大肠杆菌 DH 5 α 和 S13009 菌株由本实验室保存。p31S1 载体是将编码去除导肽的玉米 SUMT 基因插入表达载体 pQE 31 中^[4]。

1.1.2 生化试剂:酵母浸出物和胰蛋白胨为英国 oxioid 公司产品, Ni-NTA 购自德国 Qiagen 公司, Sephadex G-10 购自 Pharmacia 公司, 标准分子量蛋白和异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)购自上海 Promega 公司, 定点突变试剂盒购自大连宝生物工程

公司, 其它试剂为国产分析纯。

1.1.3 仪器:紫外可见分光光度计 U-2001 和高速冷冻离心机 SCR20BC 购自日本 Hitachi 公司, 凝胶成像系统购自日本 Kodark 公司。蛋白质电泳装置购自美国 Bio-Rad 公司。超滤装置购自美国 Millipore 公司。动态光散射仪 DynaPro-MS800 是美国 Proterion 公司产品, 质谱仪是美国 Thermo 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 含组氨酸标签的玉米 SUMT 的定点突变:具体操作参见 MutanBEST kit 手册。对于双突变体 L88R/ L89G, 反义引物 *tgc tga atc tcc tcc tgg gtg cgg ctg tgg*, 正义引物 *g aag ggg ctg agc ttg gcg gag gcc ggt gc* 对于 L166A 突变体, 反义引物 *tag agt tgg aga aac tag atc ggc tga*, 正义引物 *ata gct att ggg aaa gtg gta tcc ttg*, 下划线为突变核苷酸序列。分别以 p31S1 为模板, PCR 扩增, 纯化产物的 5' 端磷酸化后连接, 转化大肠杆菌 DH 5 α , 分别获得编码 SUMT L88R/L89G 双突变体的质粒和 L166A 突变体的质粒, 突变序列由上海生工公司测序。

1.2.2 SUMT 突变体的表达与纯化:两种突变体的表达与纯化方法相同。将含有编码突变体的质粒转化大肠杆菌 S13009, 挑取单克隆菌株接种于 Luria-Bertan(LB)液体培养基中, 37℃、220r/min 培养 12h, 再以 1:100 稀释到 800mL LB 液体培养基中扩大培养, 至 OD₆₀₀ 约 0.5, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 继续培养 5 h 将菌液 7000 \times g 离心 10min, 收集菌体。冰浴超声破碎(3-10-99, 300 W \times 2), 17000 \times g 离心 20min, 弃沉淀。上清过 Ni-NTA 层析柱(2 \times 3cm), 用缓冲液 A(10mmol/L 咪唑, 300mmol/L, 10mmol/L PBS, pH8.0)洗脱 20 个柱体积后, 用缓冲液 B(50mmol/L 咪唑, 其它成分同缓冲液 A)洗脱 20 个柱体积, 再以缓冲液 C(200mmol/L 咪唑, 其它成分同缓冲液 A)洗脱 10 个柱体积, 收集洗脱液, 超滤浓缩, 对于 SUMT L88R/L89G 双突变体, 样品溶于缓冲液 D(10mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液, 内含 50mmol/L 的 NaCl, pH 7.5), -70℃ 保存备用。L166A 突变体溶解在含有 100mmol/L 的 NaCl 的缓冲液 D 中。

1.2.3 电泳分析及蛋白质浓度测定:SDS-PAGE 采用不连续胶, 即 15% 的分离胶和 5% 的浓缩胶, 考马斯亮蓝 R250 染色。蛋白质浓度采用考马斯亮蓝 G250 染色, 以牛血清白蛋白作对照。

1.2.4 色素的分离和测定:取蛋白溶液 1mL(约 8mg 蛋白), 加入 0.5mL 的氯仿, 剧烈振荡。17000 \times g 冷冻离心 20min, 吸取水相, 再离心 1 次, 弃沉淀, 上清

液过 Sephadex G-10(1.0 × 15cm) 用除气的 ddH₂O 洗脱。收集含有红色荧光物质的洗脱液,冷冻干燥。再用少量体积的除气的 ddH₂O 溶解,离心,迅速分别在 300 ~ 650nm 光谱扫描和质谱仪上分析。

1.2.5 全酶分子量测定 获得脱色素的双突变体蛋白是在纯化中在缓冲液 B 之前用缓冲液 E(10 mmol/L 的 Tris-HCl ,内含 1.8mol/L NaCl ,pH 8.0)洗脱 10 个柱体积,除去结合在蛋白的色素,然后再依次按上述的纯化步骤进行。浓度分别为 2mg/mL 和 5mg/mL 纯化的蛋白在 25℃ 下动态光散射仪分析,每次记录 30 个数据,根据厂家提供的软件,以假定尿卟啉原甲基化酶是球蛋白来计算分子量。

表 1 野生型和突变体 SUMT 在大肠杆菌的表达
Table 1 The expression of maize wild-type SUMT and its mutants

Enzyme	Colonies fluorescence	Protein expression (mg/L culture)	Pigments production (A ₃₅₄ /g cell)
Wild-type	+	5.2 ^a	11.216 ± 1.606 ^a
L88R/L89G double mutant	+	5.4	7.682 ± 1.193
L166A mutant	-	5.2	NT ^b

a : see reference[4]; b : Not tested.

2.2 突变体的表达和纯化

如表 1 ,突变体的表达水平和野生型 SUMT 相近。双突变体在去除色素后分子量基本没有变化,经 Ni-NTA 亲和层析一步纯化后,电泳显示大约为 34kD 一条带,表明色素分子和酶非共价键结合(图 1)。双突变体的水溶性略有改变,在 50mmol/L 的 NaCl 能溶解,而野生型 SUMT 低于 100mmol/L 的 NaCl 就会沉淀,原因可能是 L88/L89 位于蛋白质的表面。L166A 突变体能够纯化,SDS 电泳显示一条带(图 1)表明此突变并不影响酶的表达。一般来说,N 端氨基酸残基对蛋白的折叠起重要作用,而 L166 位于 SUMT 的 C 末端,所以影响不大。

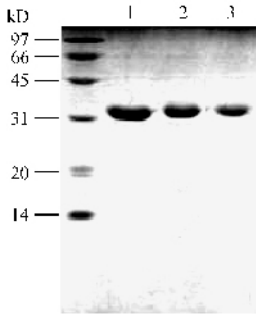


图 1 纯化玉米 SUMT 突变体的 SDS-PAGE

Fig. 1 SDS-PAGE of purified maize mutants

1 : pigment-bound L88R/L89G double mutant ; 2 : pigment-free L88R/L89G double mutant ; 3 : L166A mutant .

1.2.6 色素产量测定 :取上述破碎的菌液,测定每克细胞的 354nm 的光吸收值。

2 结果

2.1 突变体的体内酶活

如表 1 和野生型 SUMT 的菌落一样,表达双突变体 SUMT 的大肠杆菌菌落显示红色荧光,显示酶在细胞内有酶活,而表达 L166A 突变体的大肠杆菌不显示细菌的荧光,说明突变导致酶活基本丧失。SUMT 双突变体胞内色素产量比野生型的略低,表明它低于重组野生型 SUMT 的胞内酶活。

2.3 突变体的分子量确定

动态光散射测定显示除去色素的双突变体分子量约为 72kD(图 2,左)野生型 SUMT 的全酶分子量约为 79kD^[4]。和色素结合的野生型 SUMT 相比,双突变体分子量略有降低,原因可能有两个,一是色素分子除去后分子量自然降低,二是色素除去后蛋白的空间结构略有变化,这在以前的研究中已经证明^[4]。L166A 突变体分子量约为 79kD,和野生型 SUMT 一致(图 2,右),L166 不在 SUMT 二聚体结合表面,L166A 不影响酶的二聚化。

2.4 和突变体结合的荧光产物分析

纯化的 SUMT 双突变体紫外可见光谱扫描显示在 354 nm 中有一个主要的吸收峰,它是三甲基咕啉的特异吸收峰,另一次要吸收峰是 378 nm,它是西罗双氢叶绿三酸的吸收峰(图 3),突变体的扫描光谱不同于重组 *Selenomonas ruminantium* SUMT 的结果^[14],但是和重组拟南芥 SUMT 的性质一致^[15],显示双突变体并没有改变玉米 SUMT 的过甲基化催化性质。

质谱分析显示有一个分子量为 913.3D 的化合物含量相对较高(图 4)。SUMT 催化的底物尿卟啉原Ⅲ带有两个水分子,它们结合在羧基上。甲基化作用并不影响两个羧基的结构。据此推测,913.3D 的化合物可能是结合两个水分子的三甲基咕啉,它

和该化合物的理论分子量 913.6D 非常接近。

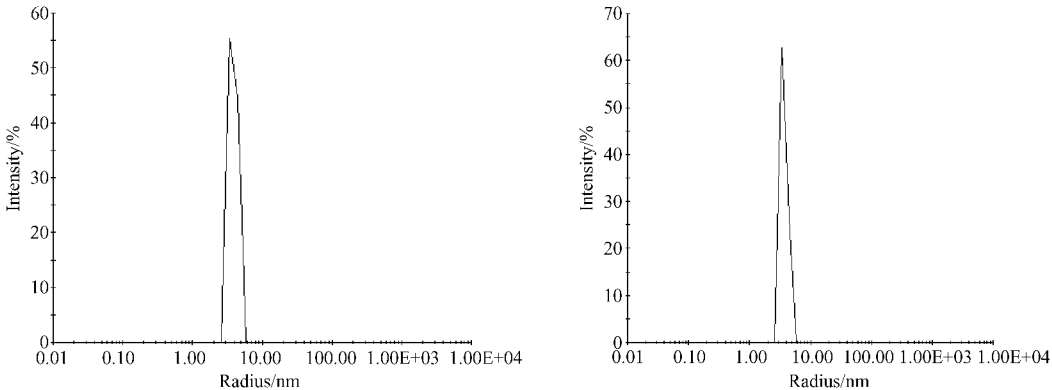


图2 玉米 SUMT 突变体的动态光散射分析.
左：不含色素的 L88R/L89G 双突变体. 右：L166A 突变体
Fig. 2 The dynamic light scattering assay of maize SUMT mutants
Left：the pigment-free SUMT L88R/L89G double mutant；Right：the SUMT 166A mutant.

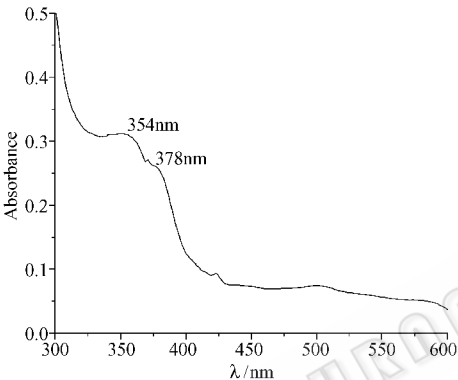


图3 含色素的玉米 L88R/L89G 双突变体的紫外可见光谱扫描.

Fig. 3 UV-visible spectra of pigment-bound SUMT L88R/L89G double mutant

The absorption peaks 354 nm and 378 nm represent trimethylpyrrocophin and sirohydrochlorin respectively.

upm_031030095654#86 RT: 0.72 AV: 1 NL: 5.75E5
T: +cFull ms [800.00-1000.00]

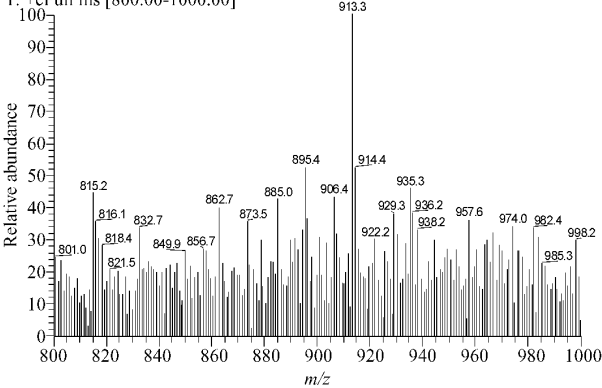


图4 从玉米 L88R/L89G 双突变体分离的色素质谱分析
Fig. 4 MS analysis of pigments isolated from the purified SUMT L88R/ L89G double mutant

3 讨论

SUMT 的空间结构显示所有的 β 折叠都是由疏水氨基酸组成^[2,3],其中 β 10 折叠含有 4 个连续的强疏水性氨基酸残基。在所有的 α 螺旋中,只有 α 4 螺旋的疏水性较强。根据 30 个物种 SUMT 的氨基酸序列比对,选择突变保守性相对较低的 L88/L89 和 L166,它们分别是 α 4 螺旋和 β 10 折叠,这 3 个氨基酸残基离酶活部位相对较远。突变后的氨基酸在其它物种中对应存在,以避免酶活大幅降低。*Thermus thermophilus* 的 SUMT 结构显示 SAM 和酶结合会诱导酶的 SAM 结合模块 (Motif) 构象改变^[3],结构模拟显示 L166 离 SAM 结合模块较远,但是 L166A 的突变可能改变 β 10 折叠的构象,影响 SAM 结合模块的构象变化,导致 SAM 结合受阻,酶活力丧失。

和 SUMT 结合的色素,已报道有微量的卟啉类化合物及催化产物降解的中间物^[5],正常的催化产物前咕啉-2 和过甲基化产物三甲基咕啉和四甲基咕啉^[6],以及西罗血红素等。体外酶活检测中,即使高效液相层析也难以分离催化的产物和降解的中间物^[5]。质谱分析表明和 SUMT 结合的色素组分复杂,但光谱学显示主要吸收峰没有改变,推测原因可能是和酶结合的色素相对稳定,或者和催化产物相比,降解的中间物组分的吸收光谱没有明显变化。这种光谱学的稳定性有助于对结合态色素的定量确定。

重组 *Pseudomonas denitrificans* SUMT 的催化产物以西罗双氢叶绿三酸为主^[2],这有利于西罗血红素和维生素 B₁₂ 的后续反应,而大肠杆菌、

Propionibacterium freudenreichii 和植物 SUMT 在大肠杆菌表达产生三甲基咕啉积累,这种性质适用于指示蛋白^[4-6]。*P. denitrificans* SUMT 的突变体体外酶活测定显示有单甲基化中间物前咕啉-1 积累,它的光谱学性质不同于其它催化产物的结果^[2]。不同物种的 SUMT 及其突变体催化产物的不同光谱学性质,可使 SUMT 作为荧光指示蛋白具有多样性。

在哺乳动物细胞中, SUMT 的红色荧光强度明显高于红移的 GFP^[8]。但是,和普通的 GFP 相比, SUMT 还有许多需要改进。GFP 作为指示剂用于检测外源蛋白在大肠杆菌的表达和折叠,以及检测外源蛋白的定向进化效果^[16],如改善 TEV 蛋白的水溶性^[17]。通过定向进化技术,获得了 GFP 的超级折叠体^[18]。SUMT 能否像 GFP 一样作为大肠杆菌的新型荧光报告蛋白,取决于它的折叠和水溶性。本研究初步证明突变 α_4 螺旋的两个疏水氨基酸残基能适度改善 SUMT 的水溶性,表明 SUMT 可能具有 GFP 一样的多种用途。利用体外定向进化技术改善玉米 SUMT 的折叠水平和水溶性,正在进行。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Warren MJ, Raux E, Schubert HL, Semerena EJC. The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B₁₂). *Nat Prod Rep*, 2002, **19** (4): 390 – 412.
- [2] Ve'vodova J, Graham RM, Raux E, et al. Structure/function studies on a S-Adenosyl-L-methionine-dependent uroporphyrinogen III C methyltransferase (SUMT), a key regulatory enzyme of tetrapyrrole biosynthesis. *J Mol Biol*, 2004, **344** (2): 419 – 433.
- [3] Rehse PH, Kitao T, Tahiov TH. Structure of a closed-form uroporphyrinogen-III C-methyltransferase from *Thermus thermophilus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2005, **61** (7): 913 – 919.
- [4] Fan J, Wang DQ, Liang Z, et al. Maize uroporphyrinogen III methyltransferase: overexpression of the functional gene fragments in *Escherichia coli* and one-step purification. *Proteins Expr Purif*, 2006, **46** (1): 40 – 46.
- [5] Warren MJ, Stolowich NJ, Santander PJ, et al. Enzymatic synthesis of dihydrosirohydrochlorin (precorrin-2) and of a novel pyrrocorphin by uroporphyrinogen III methylase. *FEBS Lett*, 1990, **261** (1): 76 – 80.
- [6] Sattler I, Roessner CA, Stolowich NJ, et al. Cloning, sequencing, and expression of the uroporphyrinogen III methyltransferase cobA gene of *Propionibacterium freudenreichii* (shermanii). *J Bacteriol*, 1995, **177** (6): 1564 – 1569.
- [7] Roessner CA, Scott AI. Fluorescent-based method for selection of recombinant plasmids. *Biotechniques*, 1995, **19** (5): 760 – 764.
- [8] Wildt S, Deuschle U. CobA, a red fluorescent transcriptional reporter for *Escherichia coli*, yeast, and mammalian cells. *Nat Biotech*, 1999, **17** (12): 1175 – 1178.
- [9] Feliciano J, Liu Y, Daunert S. Novel reporter gene in a fluorescent – based whole cell sensing system. *Biotechnol Bioeng*, 2006, **93** (5): 989 – 997.
- [10] Martens JH, Barg H, Warren MJ, Jahn D. Microbial production of vitamin B₁₂. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **58** (3): 275 – 285.
- [11] Jenkins TM, Hickman AB, Dyda F, et al. Catalytic domain of human immunodeficiency virus type 1 integrase: identification of a soluble mutant by systematic replacement of hydrophobic residues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (13): 6057 – 6061.
- [12] Das D, Georgiadis MM. A directed approach to improving the solubility of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *Protein Sci*, 2001, **10** (10): 1936 – 1941.
- [13] Burden AE, Wu CK, Dailey TA, et al. Human ferrochelatase: crystallization, characterization of the [2Fe-2S] cluster and determination that the enzyme is a homodimer. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1435**: 191 – 197.
- [14] Anderson PJ, Entsch B, McKay DB. A gene, *cobA* + *hemD*, from *Selenomonas ruminantium* encodes a bifunctional enzyme involved in the synthesis of vitamin B₁₂. *Gene*, 2001, **281** (1 – 2): 63 – 70.
- [15] Leustek T, Smith M, Murillo M, et al. Siroheme biosynthesis in higher plants. Analysis of an S-adenosyl-L-methionine-dependent uroporphyrinogen III methyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 1997, **272** (5): 2744 – 2752.
- [16] Waldo GS, Standish BM, Berendzen J, Terwilliger TC. Rapid protein folding assay using green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 1999, **17** (7): 691 – 695.
- [17] Van den Berg S, Lofdahl PA, Hard T, Berglund H. Improved solubility of TEV protease by directed evolution. *J Biotechnol*, 2006, **121** (3): 291 – 298.
- [18] Pedelacq JD, Cabantous S, Tran T, et al. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 2006, **24** (1): 79 – 88.