

非特异性脂质转移蛋白突变体的构建及在两种硫氧还蛋白表达载体中的表达比较

葛晓春* 陈继超 王文漪 曹凯鸣 孙崇荣

(复旦大学生命科学院生物化学系 上海 200433)

摘 要 对水稻非特异性脂质转移蛋白(Nonspecific lipid transfer protein, nsLTP) LTP110 中结构重要的 5 个氨基酸位点进行了定点突变, 测序结果证实了突变体构建成功。在尝试了多种大肠杆菌表达系统进行表达之后, 发现硫氧还蛋白融合表达载体适合于 LTP110 野生型及突变体的表达。将编码野生型 LTP110 及突变体 Y17A, P72L, R46A, D45A, C50A 蛋白的 cDNA 顺序克隆进两种硫氧还蛋白表达载体并对其表达情况进行了比较: pTrxFus 载体可以在宿主菌 GI724 中以较低水平表达野生型 LTP110 及突变体 Y17A, P72L, R46A 融合蛋白, 但不能表达 D45A 和 C50A 融合蛋白; pET32a(+) 载体可以在宿主菌 BL21(DE3) trxB⁻ 中以可溶蛋白的形式表达野生型及所有突变型融合蛋白, 且表达量比在 pTrxFus 载体/GI724 突变菌中表达量高。对 pET32a(+) 载体中表达的 LTP110 融合蛋白进行了纯化, 并利用带有荧光标记的脂肪酸分子对其测活, 结果表明表达的野生型 LTP110 分子具有结合脂质的活性。

关键词 nsLTP, 定点突变, 硫氧还蛋白融合表达载体, 荧光标记脂质

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)02-0167-05

非特异性脂质转移蛋白(Nonspecific lipid transfer protein, nsLTP)是植物体内一类碱性、分子量较小、富含 Cys 的蛋白质, 它含有 91~93 个氨基酸, 其中有 8 个 Cys 在所有的 nsLTP 中位置保守^[1,2]。玉米、大麦、小麦中 nsLTP 的晶体结构数据显示, nsLTP 分子内有一个疏水孔穴, 可以结合多种脂肪酸、磷脂和糖脂分子, 为其在生物膜间转运脂质的活性提供了结构基础^[3,4,5]。nsLTP 在植物体内的作用可能与角质合成、抵御病原菌侵袭和胚胎发育等过程相关, 但其结构和功能的关系尚不清楚^[1,6]。其中, 抑制病原细菌和真菌生长的功能是否与其转运脂质的功能相关就是十分令人关注的问题。为了了解蛋白质内哪些位点影响其抗菌功能, 本文通过比较不同来源的 nsLTP 分子的氨基酸顺序并结合已知的 X-射线晶体衍射结果, 针对水稻中 LTP110 的一些保守位点设计了突变体, 并将其 cDNA 顺序克隆到大肠杆菌表达载体中进行了表达。由于 nsLTP 结构上的特殊性, 使得它在一般的大肠杆菌系统中较难表达, 我们在尝试了多种大肠杆菌表达系统后, 发现硫氧还蛋白融合表达载体适合其野生型及突变型的表达, 但在表达效果上, 两种硫氧还蛋白表达系统有优劣之分。

本文的研究结果为进一步揭示 nsLTP 结构和功能的关系提供了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 大肠杆菌 DH5 α , 含有 LTP110 cDNA 顺序的质粒 pSK⁺ 为本室构建和保存; pTrxFus 载体和宿主菌 GI724 来自 Invitrogen 公司; pET32a(+)及宿主菌 BL21(DE3) trxB⁻ 来自 Novagen 公司。

1.1.2 限制酶和主要试剂: Nco I、EcoRI、BamHI、NdeI 和 T4 连接酶、Taq 酶等购于 Biolabs 公司和 Boehringer 公司; pGEMT vector 购于 Promega 公司; 色氨酸购于华美公司; 酪蛋白酸水解物购于 Sigma 公司; 荧光探针 P-96(1-pyrenedodecanoic acid) 购于 Molecular Probe 公司。

1.1.3 点突变试剂盒及引物: 点突变试剂盒购于 TaKaRa 公司; 引物由上海皓嘉生物工程公司合成:

Y17A(Y17 \rightarrow A): Y17Aprimer1
(CCTGTCCGCTGTGCATGGG);
原 TAC Y17Aprimer2
(CACGCCGATCGACG)

收稿日期 2001-08-01, 修回日期 2001-12-21。

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 30000037)。

* 通讯作者。 Tel 86-21-65643672; Fax 86-21-65650149; E-mail gexiaocun1@yahoo.com.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

D45A (D45→A): (GCC GCT CGCCGACCCG); 原 GAC	D45Aprimer1
(GGAGGAGGAGGCCTTTCC)	D45Aprimer2
R46A (R46→A): (GCCGAG GCT CGCACCCGCTG); 原 CGC	R46Aprimer1
(GGAGGAGGAAGCCTTTCC)	R46Aprimer2
C50A (C50→A): (CCGCC GCT AGCTGCCTCAAG); 原 TGC	C50Aprimer1
(TGGCGCGGTGGCGG)	C50Aprimer2
P72L (P72→A): (ATC CTT AGCAAATGTGGCGTC); 原 CCC	P72Lprimer1
(GGAGGCGCGTTGCCC)	P72Lprimer2
克隆至 pTrx-Fus 的表达引物: (GGT ATCCCGGG GCCGGTTAGCTGGCGGAC); Sma I	NLTP110thiol
CLTP110thio(GCTCTAGAC TATTAGTTGATCTTGAGC)	
Xba I	
克隆至 pET32a(+) 的表达引物: (GATGGATCCA CCATGG CTGCGGTTAGCTGGCGG); Nco I	NLTP110
CLTP110	
(TC GAATTC CCTATTAGTTGATCTTGAGCAG) EcoRI	

1.2 方法

1.2.1 氨基酸顺序分析:利用 GCG 软件进行氨基酸保守性分析。

1.2.2 定点突变 按试剂盒说明书进行。

1.2.3 利用 pTrxFus 载体的蛋白质表达:利用插入了野生型或突变基因的 pTrxFus 质粒转化宿主菌 G1724 30℃生长约 24h 后,将平板上的转化克隆(约 500~1000 个单菌落)刮下接种 300mL RM 培养基,30℃生长至 OD₆₀₀ 为 0.6 左右时,加入色氨酸至终浓度为 100μg/mL 37℃诱导 5h 后收集菌体。

1.2.4 利用 pET32a(+) 载体的蛋白质表达:将克隆了待表达基因的 pET32a 质粒转化 BL21(DE3) trxB⁻ 37℃生长约 12h 后将平板上的菌落刮下接种 300mL LB 培养基,OD₆₀₀ 达到 0.6~1.0 之间加入 IPTG 至 1mmol/L 30℃诱导 5h 后收获菌体。

1.2.5 渗透休克:按 20OD₆₀₀/mL 的浓度将菌体溶于高渗液(20mmol/L Tris·HCl pH8.0,2.5mmol/L EDTA,20%(W/V)蔗糖)4℃放置 15min 后,10 000r/min 离心 10min,吸去上清,加入与高渗液等体积的 4℃预冷的低渗液(20mmol/L Tris·HCl pH8.0,2.5mmol/L EDTA)混匀,冰上放置 20min,12 000r/min 离心 15min,上清即为渗透休克释放的蛋白,吸取少量电

泳鉴定。

1.2.6 His-tag 亲和柱进行蛋白质纯化:在渗透休克后释放出的蛋白质溶液中加入 1/4 体积 5×binding buffer(100mmol/L Tris·HCl,50mmol/L 咪唑,2.5mol/L NaCl,50μmol/L PMSF,pH7.6),上 Ni²⁺-chelating sepharose fast flow 柱,用 wash buffer(20mmol/L Tris·HCl,60mmol/L 咪唑,0.5mol/L NaCl,10%甘油,pH7.6)洗涤,最后用 Elution buffer(20mmol/L Tris·HCl,300mmol/L 咪唑,0.5mol/L NaCl,pH7.6)洗脱,将流出峰对 10mmol/L NH₄Ac 透板过夜后,冻干。

1.2.7 脂质结合活性测定:将融合蛋白溶于 10mmol/L MOPS pH7.2 缓冲液中,浓度为 5μmol/L。在蛋白质溶液中加入 1mmol/L 的探针母液至不同的终浓度,通过荧光分光光度计(Hitachi 公司)测量 P-96 探针的荧光变化。P-96 激发波长为 343nm,发射波长为 378nm。

2 结 果

2.1 水稻 LTP110 与不同植物来源的 nsLTP 成熟肽氨基酸顺序比较以及突变体的构建

图 1 显示了 LTP110 与不同来源的植物 nsLTP 的氨基酸顺序比较。由图中可见,除了 8 个 Cys 位点高度保守外,还有一些位点也非常保守。根据同源建模原理,以玉米苗 nsLTP 三维结构为模板建模的 LTP110 三维结构与玉米及其它植物中已解出的 nsLTP 高级结构较为相似。在这些已知的三维结构中,Tyr17 可与 Asn64 形成氢键,稳定蛋白质分子

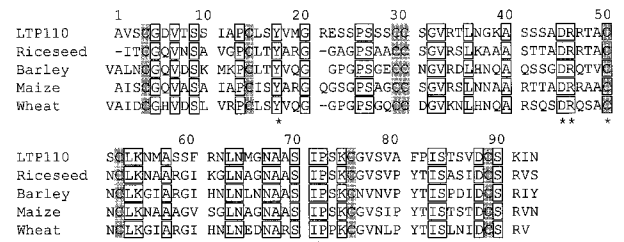


图 1 LTP110 和其它结构已知的 nsLTPs 的氨基酸顺序比较
Fig.1 Comparison of the amino acid sequence of LTP110 with other known structure determined nsLTPs
8 conserved cystein residues are shown in grey boxes;
100% conserved residues are boxed the mutation residues are boxed and marked by asterisk (*).

的球形结构,Tyr17 还与 Pro25,Ile71 的侧链形成一个小的疏水孔穴,避免它们暴露于亲水溶剂中,D45 可与 R46,R47 一起形成盐桥,除此之外,D45 的羧基还可与 N-端的氨基,R46 的胍基还要可与 C-端的羧基相互作用稳定整个分子,P72 引起螺旋的回折,因此

参与形成大的疏水孔穴,而 C50 则与 C89 形成分子内一个重要的二硫键。选择这些结构上具有重要性的位点进行突变,进一步研究突变体的功能变化将有助于我们阐明其结构和功能的关系。

测序结果表明,所有构建的突变体均在预定的位置引入了突变。

2.2 表达载体的构建

以野生型和已引入突变位点的克隆为模板,分别利用 pTrxFus 载体和 pET32a(+)载体的表达引物进行 PCR,将所得片段连入表达载体中,构建 6 个蛋白的 pTrx-LTP 表达质粒(包括一种野生型和 5 个突变体)和 pET32a-LTP 表达质粒,再次测序确证了所有的克隆正确。2 种载体的表达质粒示意图见图 2。pTrxFus 空载体表达出的担体蛋白大小约为 18kD, pET32a 空载体表达出的担体蛋白大小约为 21kD,其大小差别主要在于在硫氧还蛋白编码区后引入的顺序长短不一样。

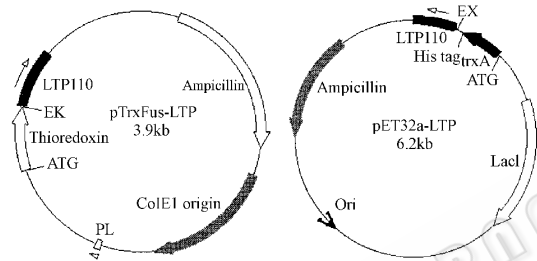


图 2 表达质粒 pTrxFus-LTP 和 pET32a-LTP 示意图

Fig.2 Schematic representation of the expression plasmids pTrxFus-LTP and PET32a-LTP

2.3 LTP110 野生型及突变体在 pTrxFus 表达载体中的表达

从图 3 可以看出,在 pTrx-Fus 表达系统中,LTP110 野生型及 3 种突变体得到了表达。融合蛋白长约 26kD,但表达量不高,凝胶扫描结果是 LTP110 表达量约为总菌体蛋白的 7.5%,Y17A 约为 6.8%,P72L 约为 7.8%,R46A 约为 3.4%,而另外两个突变体 D45A 和 C50A 在预定的位置未见明显表达条带。利用硫氧还蛋白可以通过渗透休克从细胞质中释放的特性,休克后取上清电泳(见图 4),目的蛋白在总蛋白中占有量有一定提高,如 LTP110 占 18.3%,Y17 占 20.2%,P72L 占 17.3%,而 R46A 占 24.3%,D45A 和 C50A 在 26kD 处未见明显条带,只在担体蛋白所处位置约 18kD 处见到一明显条带,可能是由于融合可能是由于融合蛋白不稳定引起。突变体蛋白可以通过渗透休克释放的特性,表明它们存在于上清中,但释放量与总菌中表达量不成比

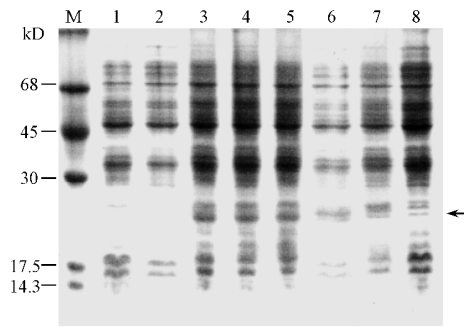


图 3 野生型和突变体融合蛋白在 pTrxFus/G1724 表达系统中表达情况的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the total cell lysates of G1724 harbouring pTrx-Fus vector expressing the wild type or mutant fusion proteins

M. Protein marker, the size shown on the left; 1. Empty vector; 2. Before induction; 3. LTP110; 4. Y17A; 5. P72L; 6. R46A; 7. D45A; 8. C50A

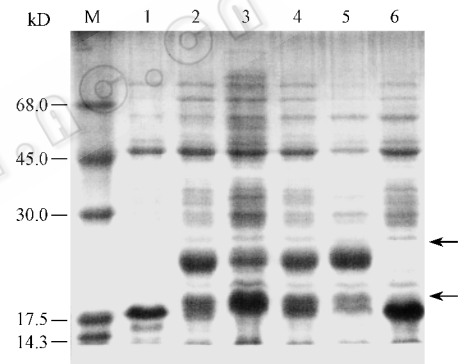


图 4 宿主菌 G1724 渗透休克释放蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of the supernatants after osmotic shock of the host strain G1724

M. Protein marker, size shown on the left; 1. Empty vector; 2. LTP110; 3. Y17A; 4. P72L; 5. R46A; 6. D45A (C50A not shown)

例,可能有一部分存在于沉淀中,且不同突变体中存在于沉淀的比例不一样。

2.4 野生型及突变型 LTP110 在 pET32a(+)表达载体中的表达

由于有 2 种突变体 D45A 和 C50A 在 pTrxFus 中未能得到有效表达,考虑到硫氧还蛋白表达载体适合于表达含二硫键比较丰富的蛋白质,我们仍采用硫氧还蛋白融合表达载体,但改用 Novagen 公司的 pET32a(+)载体,以该公司 BL21(DE3) trxB⁻ 作为宿主菌。从图 5 看出,LTP110 野生型和所有的突变体,包括在 pTrxFus 中不能正常表达的 D45A 和 C50A 在其中都得到了正常表达,除了 C50A 由于结构变化比较大,表达量只有 15% 外,其它表达量均占到菌体总蛋白的 25% - 30% 之间,实现了高表达。经

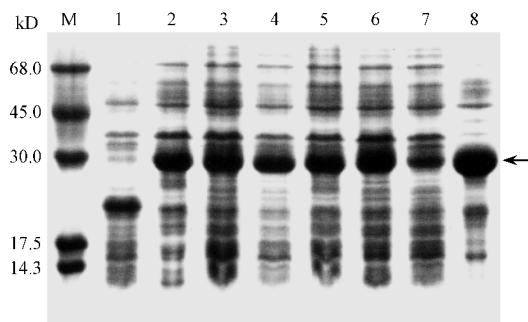


图 5 野生型和突变体融合蛋白在 pET32a/BL21 (DE3) trxB^- 表达系统中表达情况的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of the total cell lysates of BL21 (DE3) trxB^- harbouring pET32a(+) vector expressing the wild type or mutant proteins

M. Protein marker, the size shown on the left; 1. Empty vector; 2. LTP110; 3. P72L; 4. R46A; 5. D45A; 6. Y17A; 7. C50A; 8. Supernatant after osmotic shock of the host strain carrying LTP110

过渗透休克,融合蛋白占到总蛋白的约 50%,表明它们存在于上清,而且可以通过渗透休克对其进行部分纯化。

2.5 LTP110 野生型蛋白的纯化及脂质结合活性测定

经过渗透释放和 His-tag 亲和柱吸附,对 pET32a(+) 载体系统中表达的 LTP110 融合蛋白进行了纯化,得到了纯度在 90% 以上的 LTP110 融合蛋白(图 6)。我们利用荧光探针 P-96 对野生型 LTP110 融合蛋白进行脂质结合活性测定。

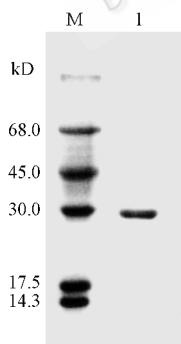


图 6 纯化的 LTP110 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.6 SDS-PAGE analysis of purified LTP 110 fusion protein

M. Protein marker, the size shown on the left;

1. Purified LTP110 fusion protein

P-96 是一个头部带有荧光基团的 12-碳脂肪酸分子,其在水溶液中所发荧光极低,进入 LTP 分子内部后,由于环境的疏水性,荧光大大增强。探针超过一定浓度后,由于第二个脂肪酸分子的进入,其荧光又有所淬灭。所得 LTP 分子结合荧光的特征曲线(图略)表明,所纯化的野生型 LTP 融合蛋白确实

具有结合脂肪酸分子的特性。依据上述方法还可以对其它突变体进行纯化和活性测定,其结构与功能的关系将在今后进一步讨论。

3 讨 论

研究突变体的功能对于了解脂质转移蛋白结构与功能的关系是一个有效的手段。本论文选取了 nsLTP 中几个非常关键的位点进行了突变,并将它们克隆到表达载体中进行了高表达,为进一步研究 nsLTP 结构和功能的关系提供了非常好的前提。

在构建突变体之前,我们曾尝试用不同的载体来表达野生型的 LTP110。但此蛋白在多个表达载体中都未见表达,例如 pET14b, pET30a, pBAD-HisA, pGEX-4T-1 等。这可能是由于:① LTP 分子内含有较多的二硫键,这些二硫键的正常形成对于维持其功能非常重要,而一般的大肠杆菌表达系统氧化还原电势较高,不适合于二硫键的形成,故而不能产生正常折叠的外源蛋白;② LTP 分子内具有疏水孔穴,如果折叠不正确,很容易导致其疏水结构外翻,从而很快被大肠杆菌的蛋白降解系统识别;③ LTP 分子较小,易被降解。这些原因使得 LTP110 在一般的大肠杆菌中难以正常表达。硫氧还蛋白表达载体在表达这一类蛋白上有其独特的优势,主要由于:① 硫氧还蛋白本身参与细胞内一些蛋白质的二硫键形成,它可以帮助蛋白质正常折叠,从而产生有活性的可溶蛋白;② 硫氧还蛋白可以利用其本身的信号顺序将产生的融合蛋白靶向细胞膜间隙。细胞膜间隙氧化还原电势较低,适合于二硫键的形成,且可以避免细胞膜内蛋白酶的降解,这也是产生的融合蛋白为什么可以通过渗透释放的原因^[7]。在两种硫氧还蛋白表达载体中,野生及部分突变型 nsLTP 都可以得到表达。其中, pET32a(+) 表达载体由于运用了经过改造的 BL21 (DE3) trxB^- 宿主菌,该菌内的硫氧还蛋白还原酶被突变,更有利于二硫键的形成,使得一些在 pTrxFus/GI724 表达系统中难以表达的突变型也能得到正常表达,其表达量也更高。

在表达纯化上, pET32a(+) 载体由于在硫氧还蛋白担体和目的蛋白之间插入了 His-tag 位点,利用这种 tag 进行亲和柱纯化更为方便,纯化出来的蛋白还可以利用肠激酶等切去硫氧还蛋白担体;而 pTrxFus 载体尽管可以利用硫氧还蛋白的亲和柱纯化,但由于该介质利用较高浓度的巯基乙醇进行洗脱,使得它对于 nsLTP 的纯化并不适合,因为该蛋白分子内含有 4 个二硫键,易被高浓度还原剂破坏。

活性测定表明 pET32a(+)系统表达的野生型 LTP110 融合蛋白具有结合脂质的活性,经过肠激酶切割释放出的 LTP110 分子同样也具有结合脂质活性(未显示),表明担体蛋白不影响活性的测定。依据本文提供的纯化和测活方法还可以对其它的突变型蛋白进行纯化和活性测定,为进一步揭示 nsLTP 结构和功能的关系提供了基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Kader J C. Lipid-transfer proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996 **47**: 627 ~ 654
- [2] GE X (葛晓春), LIU X H (刘晓斐), ZHAN S X (詹树萱) et al. Comparative studies of the expression patterns of two kinds of lipid transfer protein genes in rice etiolated seedlings. *Progress in Natural Science(自然科学进展)*, 1999 **9**(5): 413 ~ 418
- [3] Gomar J, Petit M C, Sodano P, Sy D, Marion D, Kader J C. Solution

structure and lipid binding of a nonspecific lipid transfer protein extracted from maize seeds. *Protein Sci*, 1996 **5**: 565 ~ 577.

- [4] Gincel E, Simorre J P, Caille A, Marion D, Ptak M, Novelle F. Three-dimensional structure in solution of a wheat lipid-transfer protein from multidimensional 1H NMR data. A new folding for lipid carriers. *Eur J Biochem*, 1994 **226**: 413 ~ 422
- [5] Lerege M H, Kragelund B B, Bech L M, Poulsen F M. Barley lipid-transfer protein complexed with palmitoyl CoA: the structure reveals a hydrophobic binding site that can expand to fit both large and small lipid-like ligands. *Structure*, 1997 **5**: 291 ~ 306
- [6] ZHAN S X (詹树萱), GE X (葛晓春), LI X (李耕) et al. Sequence analysis of rice lipid transfer protein cDNA and the structural characteristics of corresponding peptide. *Acta Botanica Sinica(植物学报)*, 1997 **23**(8): 701 ~ 706
- [7] Novy R, Berg J, Keith Y, Mierendorf R. PET TRX fusion system for increased solubility of proteins expressed in *E. coli*. *Novage, Inc. Newsletter*, 1994 Jun 4

Construction of the Mutants of Rice Nonspecific Lipid Transfer Protein and Expression Comparison in Two Kinds of Thioredoxin Fusion Expression Vectors

GE Xiao-Chun* CHEN Ji-Chao WANG Wen-Yi CAO Kai-Ming SUN Chong-Rong

(Department of Biochemistry, College of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract Five structural important residues of rice nonspecific lipid transfer protein LTP110 were mutated by site-directed mutagenesis. Sequence results showed that they were all mutated successfully. After trying various *E. coli* expression systems, thioredoxin fusion expression system was found to be a proper system to express wild type and mutant LTP110. cDNA sequences encoding wild type LTP110 and the mutants Y17A, P72L, R46A, D43A, C50A were cloned into two kinds of thioredoxin fusion expression vectors. The expression results were compared. In pTrxFus/GI724 expression system, wild type LTP110 and the mutants Y17A, P72L, R46A could be expressed at low level while D43A and C50A could not be expressed normally; in pET32a(+)/BL21(DE3) trxB⁻ expression system, wild type LTP110 and all mutant proteins could be expressed very well and the levels were higher than that in pTrxFus/GI724 system. LTP110 fusion protein expressed in pET32a(+) vector was purified and its activity was checked by fluorescence labeled fatty acid. Results indicated that the recombinant LTP110 fusion protein has lipid binding activity. This work provides good basis for the further study.

Key words nsLTP, site-directed mutagenesis, thioredoxin fusion expression system, fluorescence labeled fatty acid

Received: 08-01-2001

This work was supported by a grant from National Natural Science Foundation of China.

* Corresponding author. Tel: 86-21-65643672; Fax: 86-21-65650149; E-mail: cxiao@im.ac.cn; cxiao@im.ac.cn; <http://journals.im.ac.cn>