

热玫瑰小双孢菌来源的丙酮酸磷酸双激酶的表达及应用

邹秉杰¹, 陈之遥¹, 周国华^{1,2}

1 中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009

2 华东医学生物技术研究所, 南京 210002

摘要:以热玫瑰小双孢菌基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增得到了编码 PPDK 的基因, 将此基因片段插入到表达载体 pET28a(+)中构建得到了重组表达质粒 pET28a(+)-PPDK, 将重组表达质粒 pET28a(+)-PPDK 转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中, 经过 IPTG 诱导, 重组菌成功表达了 N 端带有 6-His Tag 的重组 PPDK。经 SDS-PAGE 分析, 重组 PPDK 单体分子量为 101 kD。经过镍亲和层析和超滤后, 重组 PPDK 蛋白基本达到电泳纯, 并被成功应用于焦测序中。

关键词: PPDK, 热玫瑰小双孢菌, 大肠杆菌, 焦测序

Expression of PPDK from *Microbispora rosea* subsp. *aerata* in *Escherichia. coli* and Its Application in Pyrosequencing

Bingjie Zou¹, Zhiyao Chen¹, and Guohua Zhou^{1,2}

1 School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2 Huadong Research Institute for Medicine and Biotechnics, Nanjing 210002, China

Abstract: Pyruvate phosphate dikinase (PPDK; EC 2.7.9.1) is found in certain microorganisms and plants, and catalyzes the conversion of AMP, P_i and phosphoenolpyruvate (PEP) to ATP, P_i and pyruvate. Using the genomic DNA of *Microbispora rosea* subsp. *aerata* as the template, a DNA fragment encoding the gene PPDK was amplified by PCR and inserted into the expression vector pET28a(+), yielding pET28a (+)-PPDK. The *E. coli* BL21 (DE3) was transformed with the pET28a (+)-PPDK. After inducing with IPTG, the *E. coli* BL21 (DE3) [pET28a (+)-PPDK] expressed recombinant PPDK fused to an N-terminal sequence of 6-His Tag. The molecular weight of PPDK was estimated to be 101 kD by SDS-PAGE. The PPDK was purified by His · Bind Resin affinity chromatography and ultrafiltration using 10 kD cut-off membrane. The successful application of PPDK in pyrosequencing was also demonstrated.

Keywords: PPDK, *Microbispora rosea* subsp. *aerata*, *E. coli*, pyrosequencing

丙酮酸磷酸双激酶(Pyruvate phosphate dikinase, PPDK; EC 2.7.9.1)存在于某些植物、微生物和原虫当中, 能够可逆催化磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)、单磷酸腺苷(AMP)和焦磷酸盐(P_i)生成三磷酸腺苷(ATP)、

无机磷酸盐(P_i)和丙酮酸(Pyruvate)的反应。在 C₄ 植物中, PPDK 主要催化 PEP 生成的反应, 这一反应在植物光合作用 CO₂ 的固定中起着重要的作用^[1]。在一些原虫如贾第虫(*Giardia*)^[2]、克氏锥体虫

Received: August 4, 2007; Accepted: September 18, 2007

Supported by: the National Nature Science Foundation of China (No. 30470454) and Central Research Laboratory of Hitachi, Japan.

Corresponding author: Guohua Zhou. Tel: +86-25-84514223, Fax: +86-25-84514223, E-mail: ghzhou@nju.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 30470454)和日本日立中央研究所资助。

(*Trypanosoma cruzi*)^[3,4]、阿米巴虫 (*Entamoeba histolytica*)^[5]等生物体中, PPKK 充当了丙酮酸激酶的作用, 催化丙酮酸和 ATP 生成的反应, 为生命活动提供能量。在一些微生物如共生梭菌(*Clostridium symbiosum*)^[6]中也发现了 PPKK。

各种来源的 PPKK 稳定性一般较差, 热玫瑰小双孢菌(*Microbispora rosea* subsp. *aerata*, NBRC 14047)来源的 PPKK 是目前发现的较为稳定的 PPKK, 同时它也是第一个来源于放线菌的 PPKK, 因其稳定性好, 能够得到广泛应用。目前, 热玫瑰小双孢菌来源的 PPKK 偶连荧光素酶的生物发光检测方法已经应用于很多方面, 如体内 ATP、ADP 和 AMP 含量的测定^[7,8]、细胞计数^[9]、酶联免疫分析^[10,11]、焦测序^[12]等。由于热玫瑰小双孢菌来源的 PPKK 具有较高的应用价值, 因此, 能够利用基因工程方法实现其重组表达就具有重要意义。

本文以 pET28a(+)(Novagen)作为表达载体, 将热玫瑰小双孢菌来源的 PPKK 编码基因插入到载体上构建了重组质粒, 并在大肠杆菌中获得表达, 表达的重组 PPKK 带有 6-His Tag, 通过镍亲和层析和超滤除盐就能实现重组 PPKK 的纯化, 纯化过程比以往用其他载体表达的 PPKK 更加经济、简单、快速, 纯化后的 PPKK 被成功应用于焦测序。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌株

热玫瑰小双孢菌 (*Microbispora rosea* subsp. *aerata*, NBRC 14047)购自日本技术评价研究所生物资源中心(NBRC)。宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)及原核表达质粒 pET28a(+)(由南京军区疾病预防控制中心刁振宇博士惠赠。

1.2 试剂

限制性内切酶、LA Taq DNA 聚合酶、2×LA GC Buffer、T4 DNA 连接酶、λ-EcoT14 I digest DNA Marker、蛋白 Marker、PCR 产物纯化试剂盒购自 TaKaRa 公司; *d*-虫荧光素, 荧光素酶, Klenow (exo⁻) DNA polymerase 购自 Promega 公司; Apyrase 购自 Sigma 公司; 酵母提取物、胰蛋白酶购自 Oxoid 公司; IPTG、Lysozyme 购自 Amresco 公司; His·Bind Resin 和 His·Bind Columns 购自 Novagen 公司; 0.5 mL 超滤离心管(10K)购自 Millipore 公司; 其他试剂均为

国产分析纯。

1.2.1 重组表达质粒的构建及阳性克隆的筛选

利用文献报道的方法^[13]提取热玫瑰小双孢菌基因组 DNA, 根据已报道的基因序列^[14]设计引物, 上游引物 PPKK1: 5'-GCGTGAATTCATGCCGAAGTACGTT-3 (划线部分为 *EcoR* I 位点), 下游引物 PPKK2: 5'-AACCAAGCTTTTATCGGGTGTCCGA-3 (划线部分为 *Hind* III 位点)。PCR 采用 25 μL 反应体系(2×LA GC Buffer I 12.5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 4.0 μL, 引物(10 pmol/μL)各 1 μL, 5 u LA Taq DNA 聚合酶 0.5 μL, 基因组 DNA 约 200 ng), 热循环条件为 94°C 5 min, 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 3 min, 30 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min。产物经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后, 插入到原核表达质粒 pET28a(+)上相应位点之间, 转化 *E. coli* BL21(DE3), 挑选转化子抽提质粒后通过限制性内切酶酶切分析筛选阳性克隆, 阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序, 重组表达质粒命名为 pET28a(+)-PPKK。

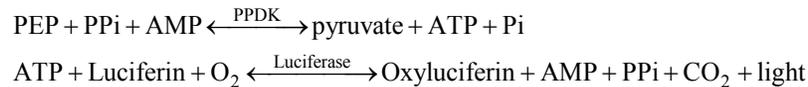
1.2.2 重组 PPKK 的诱导表达及分离纯化

将过夜活化的重组菌按 1%的接种量接种到 100 mL LB(含 30 μg/mL Kan)中, 37°C, 200 r/min 振荡培养至 $OD_{600\text{ nm}}$ 达 0.6 左右时加入 IPTG(终浓度 0.1 mmol/L), 25°C, 200 r/min 诱导表达 5 h。在这一过程中分别收集 1 mL 诱导表达 0、1、3、5 h 的培养物, SDS-PAGE(12%)分析外源蛋白表达情况, 剩余培养物离心收集菌体, 用 PBS 洗涤后, 重悬于 10 mL 细胞裂解液(1×Binding Buffer, 溶菌酶 100 μg/mL, 0.1% Triton X-100), 37°C 消化 30 min, 然后反复冻融 3 次破碎细胞。向细胞破碎液中分别加入 1 μL 100 mg/mL 的 DNase I 和 RNase, 4°C 放置 30 min 以消化其中的核酸, 然后 4°C, 12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清, SDS-PAGE(12%)分析重组蛋白是否以可溶形式表达。

将细胞破碎液上清用 His·Bind Resin 进行镍亲和层析纯化, 具体操作步骤参照 Novagen 公司操作手册进行。将洗脱得到的目的蛋白用截留分子量为 10000 的超滤膜进行超滤除盐, 所得产品进行 SDS-PAGE(12%)分析其纯度。

1.2.3 重组 PPKK 的活性测定

采用荧光素酶的生物发光反应来测定重组 PPKK 的活性, 其原理可以简单的用下面两个方程式表示:



PPDK 催化产生的 ATP 能够被荧光素酶利用并将其转化荧光信号, 通过测定产生的荧光信号就能够计算出 ATP 的量, 从而能够计算出 PPDK 的活性。首先测定 ATP 的量与荧光信号之间的线性关系曲线。测定标准曲线的测活反应液组成为: 0.1 mol/L Tris-Ac(pH 7.75), 0.5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L Mg(Ac)₂, 0.4 mg/mL PVP, 0.02 % BSA, 1 mmol/L DTT, 0.4 mmol/L *d*-虫荧光素, 1.46 μg/mL 荧光素酶。然后在 50 μL 测活底物溶液(20 mmol/L Hepes, 25 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 3 mmol/L Mg SO₄, 2 mmol/L DTT, 2 mmol/L PPI, 2 mmol/L PEP, 0.1 mmol/L AMP, pH 6.8)中加入 1 μL PPDK, 37°C 温浴 10 min, 立即放入沸水中煮沸 3 min, 取 1 μL 测定发光信号, 根据回归方程计算酶活。用紫外分光光度法测定蛋白质浓度从而计算比活。

1.2.4 重组 PPDK 在焦测序中的应用

焦测序技术^[15]是一种实时测定碱基序列的技术, 在测序过程中, 分别循环加入 4 种 dNTP, 一旦加入的 dNTP 与模板互补, 在 DNA 聚合酶的作用下会发生延伸反应, 释放出 PPI, PPI 在 PPDK 或 ATP sulfurylase 作用下生成 ATP, ATP 在 Luciferase 的催化下与 Luciferin 反应发出荧光, 发出的荧光强度与嵌入的 dNTP 个数成正比, 根据测定图谱的信号相对强度, 可知模板核酸的序列。

本文使用的焦测序反应体系组成为: 90 u/mL Klenow (exo⁻) DNA polymerase, 2 u/mL Apyrase, 0.1 mol/L Tris-Ac (pH 7.75), 0.5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L Mg(Ac)₂, 0.4 mg/mL PVP, 0.02% BSA, 1 mmol/L DTT, 0.4 mmol/L Amp, 0.08 mmol/L PEP, 0.4 mmol/L *d*-虫荧光素, 1.46 μg/mL 荧光素酶, 0.22 u/mL PPDK。本实验对液体合成单链模板(5'-T CAGACTTTGACCGTA-3')进行测序, 划线部分为待测定的序列, 测序引物为 5'-TACGGTCAAAGT-3'。

2 结果与讨论

2.1 重组表达质粒的构建及阳性克隆的筛选

利用设计的上下游引物和热玫瑰小双孢菌基因组 DNA 成功扩增得到了大小约为 2.6 kb 的片段(图 2 泳道 1)。重组转化子抽提质粒后用 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切, 酶切结果显示产生了 2 个片段(图 2 泳道 2),

它们分别与 pET28a(+)经 *Eco*R 和 *Hind* III 双酶切产生的片段(图 2 泳道 3)和 PCR 扩增产物(图 2 泳道 1)大小一致, 说明目的片段已经成功插入到表达载体中, 将阳性克隆测序, 测序结果与文献^[14]报道的 PPDK 基因序列相符。

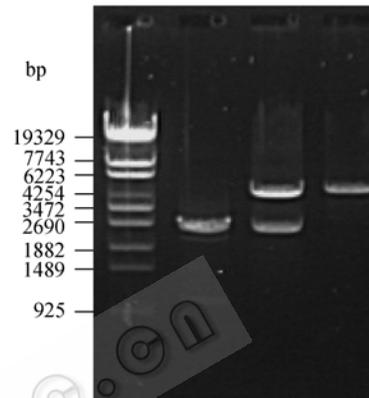


图 1 重组质粒 pET28a(+)-PPDK 双酶切鉴定

Fig. 1 Restriction enzyme digestion analysis of recombinant plasmid pET28a (+)-PPDK

M: λ-EcoT14 I digest DNA marker; 1: PCR products of PPDK gene; 2: pET28a (+)-PPDK digested with *Eco*R I and *Hind* III; 3: pET28a (+) digested with *Eco*R I and *Hind* III

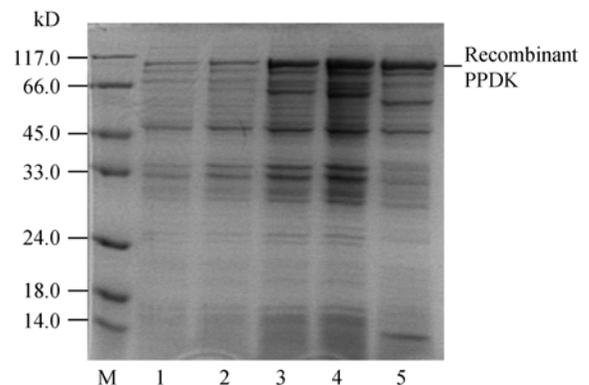


图 2 重组 PPDK 在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant PPDK expressed in *E. coli*

M: protein Marker; Lane 1: total protein of *E. coli* BL(DE3) transformed with pET28a(+)-PPDK without IPTG induction; Lane 2-4: total protein of *E. coli* BL(DE3) transformed with pET28a(+)-PPDK after being induced with IPTG of 1h, 3h, and 5h, respectively; Lane 5: supernatant of the lysate of *E. coli* BL21(DE3) transformed with pET28a(+)-PPDK

2.2 重组 PPDK 的诱导表达及分离纯化

SDS-PAGE 分析诱导表达 0、1、3、5 h 的菌体总蛋白以及表达 5 h 的上清, 发现重组菌表达了分

子量约为 101 kD 的重组 PPDK, 并且随着诱导时间的延长, 重组 PPDK 的表达量也有所增加(图 2 泳道 1~4)。重组 PPDK 大部分是以可溶形式表达的(图 2 泳道 5)。

将细胞破碎液上清用 His - Bind Resin 进行镍亲和层析纯化, 采用 10 倍柱床体积的含有 60 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液来洗脱杂蛋白, 含 300 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液来洗脱目的蛋白, 从 SDS-PAGE 结果显示纯化得到的重组 PPDK 基本达到电泳纯(图 3 泳道 1)。

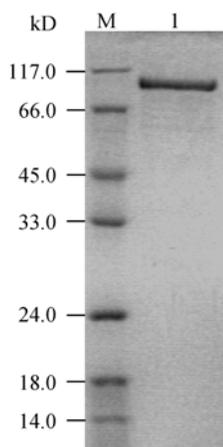


图 3 纯化后的重组 PPDK 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified recombinant PPDK
M: protein marker; Lane 1: purified recombinant PPDK

2.3 重组 PPDK 的活性测定

采用生物发光反应间接测定重组 PPDK 的活性, 首先测定 ATP 与产生的荧光信号之间的标准曲线, 以 ATP 的量为横坐标, 荧光信号值为纵坐标作图, 通过线性回归得到回归方程。通过测定重组 PPDK 催化底物所产生的 ATP 的量来计算重组 PPDK 的活性。PPDK 的活力单位定义为: 在 37°C, pH 6.8 的条件下, 每分钟产生 1 μ mol ATP 所需的酶量。本文测得重组 PPDK 的比活为 0.1 u/mg。

2.4 重组 PPDK 在焦测序中的应用

我们将纯化得到的重组 PPDK 应用在焦测序中, 测定一段人工合成的寡核苷酸序列, 模板序列为: 5' TCAGACTTTGACCGTA-3' (划线部分为待测序列), 测序使用的引物为: 5'-TACGGTCAAAGT-3', 将单链模板和测序引物退火, 然后进行焦测序。dNTP 的加入顺序为: A-T-G-C-T-G, 测定结果如图 4 所示。由于待测序列为 GACT, 所以在加入 dATP α S、dTTP 和

dGTP 时, 均没有信号产生, 只产生了各自的本底信号, 而当加入 dCTP 时, 由于能够与待测序列中的第一个碱基 G 互补, 发生了延伸反应, 检测到了延伸信号, 同样在加入 dTTP、dGTP 和 dATP α S 时也得到了相应的延伸信号, 这一结果证明了我们表达的重组 PPDK 可以用于焦测序。

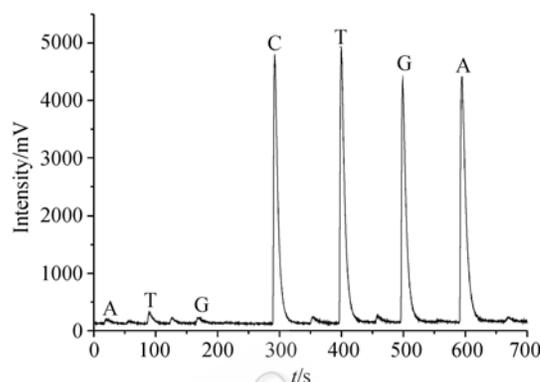


图 4 重组 PPDK 在焦测序中的应用

Fig. 4 Pyrosequencing on an artificial DNA template with recombinant PPDK

Template: artificially synthesized oligonucleotide(5' -TCAGACTTTGACCGTA-3'); Order of dNTP dispensing: A-T-G-C-T-G with the double dispensing of each dNTP species

3 结论

热玫瑰小双孢菌来源的 PPDK 是一种 ATP 产生酶, 本文将其应用在焦测序反应只是它众多应用的一个方面。将其与荧光素酶发光反应偶联, 既可以用于测定 P_i(如焦测序); 也可以用于测定 ATP 和 AMP 的含量。在细菌污染控制检测中具有重要的应用价值, 可以达到快速现场测定, 避免长时间的细菌培养过程。此外, 由于 PPDK 能够较好的耐受化学修饰试剂而在酶联免疫分析方面得到了成功应用^[10, 11]。与荧光素酶发光反应中, 由于 PPDK 能够循环利用发光反应产物 AMP, 所以可显著延长发光时间而使得检测的灵敏度能够显著提高^[8]。

本研究利用大肠杆菌表达系统成功表达出了具有活性的重组 PPDK, 利用质粒自身带有的 6-His Tag 能够很方便的通过镍亲和层析得到纯化, 与文献^[14]报道的表达方法相比大大简化了纯化步骤, 节约了成本, 并且将其成功地应用于焦测序中, 但本文所表达的重组 PPDK 的比活还不够高, 是否融合的 6-His Tag 对该酶的活性产生了影响, 还不清楚, 我们将研究高活性 PPDK 的表达方法, 探讨融合位

置对酶活的影响, 以便使得重组 PPK 能够得到更广泛的应用。

REFERENCES

- [1] Chastain Chris J, Botschner Montgomery, Harrington Grant E, *et al.* Further analysis of maize C4 pyruvate, orthophosphate dikinase phosphorylation by its bifunctional regulatory protein using selective substitutions of the regulatory Thr-456 and catalytic His-458 residues. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2000, **37**(1): 165–170.
- [2] Hiltbold A, Thomas RM and Kohler P. Purification and characterization of recombinant pyruvate phosphate dikinase from *Giardia*. *Mol Biochem Parasitol*, 1999, **104**(2): 157–169.
- [3] Maldonado RA and Fairlamb AH. Cloning of a pyruvate phosphate dikinase from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 2001, **112**: 183–191.
- [4] Acosta H, Dubourdiu M, Quinones W, *et al.* Pyruvate phosphate dikinase and pyrophosphate metabolism in the glycosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2004, **138**(4): 347–356.
- [5] Lira ES, Silva LR and Montfort RP. Expression and characterization of recombinant pyruvate phosphate dikinase from *Entamoeba histolytica*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1998, **1382**: 47–54.
- [6] McGuire M., Carroll L.J., Yankie L., *et al.* Determination of the nucleotide binding site within clostridium symbiosum pyruvate phosphate dikinase by photoaffinity labeling, site-directed mutagenesis, and structural analysis. *Biochemistry*, 1996, **35**: 8544–8552.
- [7] Ishii S, Sato Y, Terashima M, *et al.* A novel method for determination of ATP, ADP, and AMP contents of a single pancreatic islet before transplantation. *Transplantation Proceedings*, 2004, **36**: 1191–1193.
- [8] Sakakibara T, Murakami S, Eisaki N, *et al.* An enzymatic cycling method using pyruvate orthophosphate dikinase and firefly luciferase for the simultaneous determination of ATP and AMP (RNA). *Analytical Biochemistry*, 1998, **268**: 94–101.
- [9] Sakakibara T, Murakami S and Imai K. Enumeration of bacterial cell numbers by amplified firefly bioluminescence without cultivation. *Anal Biochem*, 2003, **312**(1): 48–56.
- [10] Ito K, Nishimura K, Murakami S, *et al.* Novel bioluminescent assay of pyruvate phosphate dikinase using firefly luciferase-luciferin reaction and its application to bioluminescent enzyme immunoassay. *Analytica Chimica Acta*, 2000, **421**: 113–120.
- [11] Maeda M. New label enzymes for bioluminescent enzyme immunoassay. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, **30**(6): 1725–1734.
- [12] Zhou GH, Kajiyama T, Gotou M, *et al.* Enzyme system for improving the detection limit in pyrosequencing. *Anal Chem*, 2006, **78**: 4482–4489.
- [13] Saito H and Miura K I. Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochim Biophys Acta*, 1963, **72**: 619–629.
- [14] Eisaki N, Tatsumi H, Murakami S, *et al.* Pyruvate phosphate dikinase from a thermophilic actinomyces *Microbispora rosea* subsp. *aerata*: purification, characterization and molecular cloning of the gene. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1431**(2): 363–373.
- [15] Ahmadian A, Ehn M and Hober S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clin Chim Acta*, 2006, **363**(1-2): 83–94.

© 2007 中国科学院微生物研究所期刊广告部

中国科学院微生物研究所期刊广告部成立

中科院微生物研究所期刊广告部于 2007 年 3 月正式成立, 具有北京市工商行政管理局正式批准的广告经营许可证(京海工商广字第 8107 号)。广告部代理《生物工程学报》、《微生物学报》、《微生物学通报》、《菌物学报》四个期刊的广告经营业务, 此四种期刊均为中国自然科学核心期刊, 国内外公开发行, 主要报道微生物学、菌物学和生物技术领域的最新研究成果和研究动态, 已被美国化学文摘(CA)、生物学文摘(BA)、医学索引(MEDLINE)、俄罗斯文摘杂志(AJ)、Abstracts of Mycology (美国“菌物学文摘”)、Index of Fungi (英国“菌物索引”)、Review of Plant Pathology (英国“植物病理学文摘”)、Bibliography of Systematic Mycology (英国“系统菌物学文献目录”)、Bibliographie der Pflanzenschutz literature(德国“植物保护文献目录”)、《中国学术期刊文摘》、《生物学文摘》等等国内外著名数据库和检索期刊收录, 是促进国内外学术交流的重要科技期刊。

广告刊登内容主要包括大型生化仪器(如显微镜、离心机、色谱仪、无菌操作台、大、中、小型发酵罐)、设备耗材(如 PCR 仪、细胞生物反应器、微量移液器、离心管、杂交膜、)及生化试剂(如各种酶、载体、试剂盒)等的产品宣传信息, 也可以发布生物技术人才招聘信息、会议消息、以及与生命科学有关的各类服务信息。广告部以严谨、诚信为原则, 愿与从事生物技术产品生产与销售的各类厂商和公司精诚合作, 共同发展。如果您有刊登广告的需要, 欢迎与我们联系或 email 联系获取各刊版位及报价信息! 也可以登陆各刊网站, 了解更多详情。

提示: 从 2007 年起, 各公司与此四刊签订的广告费用请通过新地址汇款(收款单位: 中国科学院微生物研究所, 开户银行: 中国工商银行北京分行海淀镇支行, 帐号: 0200004509089117425)。

中国科学院微生物研究所·期刊广告部

联系电话: 010-64807336; 010-64807521 电子信箱: gg@im.ac.cn 联系人: 武文 王闯

网址: <http://journals.im.ac.cn>