

· 其 他 ·

重组旋毛虫 plancitoxin-1-like 活性位点突变体蛋白的核酸酶活性

廖成水¹, 王晓利², 田文静¹, 张梦珂¹, 张春杰¹, 李银聚¹, 吴庭才¹, 程相朝^{1,3}

1 河南科技大学 动物科技学院 洛阳市活载体生物材料与动物疫病防控重点实验室, 河南 洛阳 471023

2 河南科技大学 医学院, 河南 洛阳 471023

3 洛阳职业技术学院, 河南 洛阳 471099

廖成水, 王晓利, 田文静, 等. 重组旋毛虫 plancitoxin-1-like 活性位点突变体蛋白的核酸酶活性. 生物工程学报, 2017, 33(8): 1315-1324.

Liao CS, Wang XL, Tian WJ, et al. Nuclease activity of the recombinant plancitoxin-1-like proteins with mutations in the active site from *Trichinella spiralis*. Chin J Biotech, 2017, 33(8): 1315-1324.

摘要: 旋毛虫 plancitoxin-1-like (Ts-Pt) 是旋毛虫 125 种 DNase II 家族蛋白中唯一具有典型 DNase II 活性区域 HKD 基序的核酸酶, 且普遍认为, 组氨酸位点是 DNase II 的活性氨基酸位点。为研究 Ts-Pt 活性位点突变体蛋白的核酸酶活性, 利用重叠 PCR 方法获得 Ts-Pt 活性位点突变体片段, 以 pET-28a(+) 为载体构建重组表达质粒并在大肠杆菌中诱导表达。重组 Ts-Pt 突变体蛋白经亲和层析纯化后进行 SDS-PAGE 分析。利用琼脂糖凝胶电泳法和核酸酶酶谱分析重组 Ts-Pt 突变体蛋白的核酸酶活性。成功构建含 Ts-Pt 突变体重组质粒的基因工程菌, SDS-PAGE 和亲和层析纯化结果显示, 重组 Ts-Pt 突变体蛋白呈包涵体表达。重组蛋白经复性后并没有表现出核酸酶活性, 但核酸酶酶谱分析结果显示, 包涵体表达的重组 Ts-Pt 突变体蛋白表现出降解 DNA 的能力。同时, N 端和 C 端活性位点 H 及 HCK 和 DHSK 突变并不影响 Ts-Pt 的核酸酶活性, 研究结果为进一步研究庞大的 DNase II 家族蛋白在旋毛虫发育和感染方面的作用提供一定的参考。

关键词: 旋毛虫, plancitoxin-1-like, 活性位点, 突变体, 核酸酶

Received: January 10, 2017; **Accepted:** May 8, 2017

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31572489), Henan Science and Technology Key Project (No. 152102110078), Key Project of Henan Province for Scientific Research Higher Education of China Colleges and Universities (No. 17A230009), PhD Start-up Fund of Henan University of Science and Technology (No. 13480071).

Corresponding authors: Chengshui Liao. E-mail: liaochengshui33@163.com

Xiangchao Cheng. E-mail: chengxch@126.com

国家自然科学基金 (No. 31572489), 河南省科技攻关项目 (No. 152102110078), 河南省高等学校重点科研项目计划 (No. 17A230009), 河南科技大学博士启动基金项目 (No. 13480071) 资助。

Nuclease activity of the recombinant plancitoxin-1-like proteins with mutations in the active site from *Trichinella spiralis*

Chengshui Liao¹, Xiaoli Wang², Wenjing Tian¹, Mengke Zhang¹, Chunjie Zhang¹, Yinju Li¹, Tingcai Wu¹, and Xiangchao Cheng^{1,3}

¹ Luoyang Key Laboratory of Live Carrier Biomaterial and Animal Disease Prevention and Control, College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China

² Medical College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China

³ Luoyang Vocational and Technical College, Luoyang 471099, Henan, China

Abstract: Although there are 125 predicted DNase II-like family genes in the *Trichinella spiralis* genome, plancitoxin-1-like (Ts-Pt) contains the HKD motif, a typical conserved region of DNase II, in N- and C-terminal. It is generally believed that histidine is the active site in DNase II. To study the nuclease activity of recombinant Ts-Pt with mutations in the active site from *T. spiralis*, different fragments of the mutated Ts-Pt genes were cloned using overlap PCR technique and inserted into the expressing vector pET-28a(+), and transformed into *Escherichia coli* Rosseta (DE3). The fusion proteins were purified by Ni-NTA affinity chromatography and SDS-PAGE. Nuclease activity of the recombinant proteins was detected by agarose gel electrophoresis and nuclease-zymography. The recombinant plasmids harboring the mutated Ts-Pt genes were constructed and expressed as inclusive body in a prokaryotic expression system. After renaturation *in vitro*, the recombinant proteins had no nuclease activity according to agarose gel electrophoresis. However, the expressed proteins as inclusive body displayed the ability to degrade DNA after renaturation in gel. And the nuclease activity was not affected after subjected to mutation of active site in N- and C-termini of Ts-Pt. These results provide the basis to study the relationship between DNase II-like protein family and infection of *T. spiralis*.

Keywords: *Trichinella spiralis*, plancitoxin-1-like, active site, mutation, nuclease

脱氧核糖核酸酶 (DNase) 是一类能够催化水解 DNA 骨架上磷酸二酯键的酶类的统称, 参与机体细胞凋亡和免疫保护等多种生命活动。根据底物特异性、化学机制和生物学功能的不同, 主要将 DNase 分为 DNase I 和 DNase II 两大类。根据现有研究资料显示, 绝大多数物种存在一种 DNase I 或多种 DNase II 同源物。2011 年公布的旋毛虫基因组序列分析显示, 旋毛虫可能存在一个多达 125 种 DNase II 蛋白家族。

旋毛虫拥有如此庞大的 DNase II 蛋白, 这在其他物种中是极为罕见的。DNase II 家族成员氨基酸序列的 N 端和 C 端都具有典型的高度保守的活性区域, 即 HKD 基序 (H-x-K-x(4)-D)^[1]。但笔者前期利用在线生物信息学软件 Conserved Domain Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 对旋毛虫 125 种 DNase II 家族蛋白进行保守区域分析, 结果显示, 只有 plancitoxin-1 蛋白 (1 095 bp, GenBank Accession

No. XM_003370715.1) 在 C 端具有 1 个典型 DNase II 活性位点 HKD 基序。对该基因进行克隆和测序发现, 扩增获得的基因序列比 GenBank 预测的短 210 bp, 并且相对应的氨基酸序列中在 N 端和 C 端都具有 HKD 基序, 重新命名为 *plancitoxin-1-like* (Ts-Pt)^[2]。

虽然有报道称旋毛虫肌幼虫时期排泄分泌物中存在核酸酶活性, 但旋毛虫 125 种 DNase II 蛋白中到底哪个蛋白发挥核酸酶活性仍然不清楚, 笔者前期利用核酸酶酶谱证明了经大肠杆菌表达的重组 Ts-Pt 蛋白表现出一定的核酸酶活性^[2]。氨基酸 N 端和 C 端的两个 HKD 基序是 DNase II 的活性位点区域, 并且组氨酸可能是 DNase II 发挥核酸酶活性的关键位点, 但目前仍没有足够的研究证据表明组氨酸就是 HKD 基序的关键位点。因此, 本研究通过重叠 PCR 方法对 Ts-Pt 的活性位点 HKD 基序进行突变构建 Ts-Pt 突变体表达载体, 经大肠杆菌表达、纯化后利用核酸酶酶谱分析各种重组突变体蛋白的核酸酶活性, 试图探讨 HKD 基序在 DNase II 发挥核酸酶活性的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株

重组质粒 pET28a-Ts-Pt 和 Rosetta (DE3)/(pET28a-Ts-Pt) 由笔者构建^[2], 大肠杆菌 Rosetta (DE3) 菌株均由洛阳市活载体生物材料与动物疫病防控重点实验室提供。

1.1.2 主要试剂

胰蛋白胍和酵母浸出物均购自英国 Oxoid 公司; *Taq* DNA 聚合酶、DNA marker、T4 DNA 连接酶、*Bam*H I 和 *Hind* III 均购自宝生物工程

(大连) 有限公司; 质粒小量提取试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒均购自美国 Axygen 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒、氨苄青霉素、卡那霉素、IPTG 和咪唑均购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司; 预染蛋白 marker 购自美国 Genview 公司; 鲑鱼精 DNA 和 Triton X-100 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

参照旋毛虫 *plancitoxin-1-like* 基因 (Ts-Pt) 的碱基序列 (GenBank Accession No. KF984291) 设计构建 DNase II 活性位点 HKD 基序突变体重组表达载体的引物 (表 1)。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。所构建的各种突变体分别命名为 H→A、H→L、HCK→LAQ、DHSK→VLLQ 和 HCK/DHSK→LAQ/VLLQ。

1.2.2 Ts-Pt 突变体表达载体的构建

以引物 Ts-Pt 上游和突变引物上游、突变引物下游和引物 Ts-Pt 下游作为引物, 利用 *Taq* DNA 聚合酶从质粒 pET28a-Ts-Pt 模板上进行 PCR 扩增 Ts-Pt 突变体的上游和下游片段, 然后以引物 Ts-Pt 上游和下游通过重叠 PCR 的方法得到 Ts-Pt 突变片段。将 Ts-Pt 突变片段亚克隆到 pMD18-T 载体中并转化入大肠杆菌 DH5 α 。经 PCR、酶切鉴定和测序正确后将 Ts-Pt 突变片段连接至 pET-28a(+) 构建 Ts-Pt 突变体重组表达质粒。

1.2.3 Ts-Pt 突变体的原核表达与蛋白纯化

将 Ts-Pt 突变体重组表达质粒转化入大肠杆菌 Rosetta (DE3) 株, 经 PCR、酶切鉴定和测序正确后将重组菌接种于含卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C、160 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达, 培养 5 h 后收集菌体, 经超声破碎仪

破碎后收集沉淀。用包涵体结合缓冲液溶解包涵体，经 0.22 μm 一次性滤器过滤后利用美国 GE Healthcare 公司的 AKTA Purifier 100 系统纯化 His 标签的表达蛋白。用透析袋梯度透析除去咪唑，采用 Bradford 法检测重组蛋白的浓度。

1.2.4 SDS-PAGE

收集各种 Ts-Pt 突变体表达纯化的重组蛋白和野生型 Ts-Pt 重组蛋白用于 SDS-PAGE 分析。取适量蛋白加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液，煮沸 10 min、冰浴 5 min，8 000 r/min 离心 5 min 后取上清。将重组蛋白在 12%分离胶和 5%浓缩胶的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳。电泳结束后将凝胶分别于考马斯亮蓝染色液和考马斯亮蓝脱色液中进行染色和脱色。

1.2.5 重组蛋白的复性

根据相关参考文献报道的包涵体复性方法进行重组蛋白的复性^[3]，即选择 0.2 mmol/L DTT、0.3 mmol/L GSSG 和 3 mmol/L GSH 作为复性液母液，将含有包涵体的复性液 (8 mol/L

尿素) 装入截留分子量为 8 kDa 的透析袋中，在 4 °C 条件下，依次用含 6、5、4、3.5、3、2.5、2、1.5、1、0.5 和 0 mol/L 尿素的复性液进行透析 (袋内袋外溶液体积比为 1 : 50)，每 4 h 换液 1 次，同时充分搅拌。

1.2.6 琼脂糖凝胶电泳法测定复性重组 Ts-Pt 突变体蛋白的核酸酶活性

配制 50 mmol/L 10×Acetate 缓冲液 (pH 5.0)，按下列参数配制 20 μL 反应体系：10×缓冲液 2 μL，鲑鱼精 DNA 0.2 μg，重组 Ts-Pt 突变体蛋白或野生型 Ts-Pt 重组蛋白 10 μg，补充 ddH₂O 至总体积 20 μL。混匀后置于水浴锅 37 °C 反应 1 h 后将酶切产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像系统下观察 DNA 降解程度并拍照。

1.2.7 重组 Ts-Pt 突变体蛋白的核酸酶酶谱分析

核酸酶的酶谱分析与 SDS-PAGE 相似，差别在于酶谱在胶内添加底物 DNA，且样品不进行加热处理及上样缓冲液中不含 β-巯基乙醇。取 50 μg 重组 Ts-Pt 突变体蛋白或野生型 Ts-Pt

表 1 本研究中所用的 PCR 扩增引物序列

Table 1 The primer sequences for PCR amplification in this study

| Gene | Primer | Primer sequence (5'-3') | Underline |
|-----------------|------------|-------------------------------------|------------------------|
| Wild-type Ts-Pt | Upstream | TTTTGGATCCATGGACGCACGTCGGCCGGTAT | <i>Bam</i> H I * |
| | Downstream | CCCAAGCTTTCAATATGGTGGGAATAGGACAAAGT | <i>Hind</i> III ** |
| H58A | Upstream | CCACGACACCTTTACAAGCGCCGGCATTCC | H→A [#] |
| | Downstream | GGAATGCCGGCGCTTGTAAGGTGTCGTGG | |
| H236A | Upstream | AGCCCATTTGGAAGCATCTGATGCAAAGTA | |
| | Downstream | TACTTTGCATCAGATGCTTCCAAATGGGCT | |
| H58L | Upstream | CCACGACACCTTTACAAGCGCCGGCATTCC | H→L [#] |
| | Downstream | GGAATGCCGGCCTTTGTAAGGTGTCGTGG | |
| H236L | Upstream | AGCCCATTTGGAAGATCTGATGCAAAGTA | |
| | Downstream | TACTTTGCATCAGATCTTCCAAATGGGCT | |
| HCK | Upstream | CCACGACACCTTGAGCAAGGCCGGCATTCC | HCK→LAQ [#] |
| | Downstream | GGAATGCCGGCCTTGCTCAAGGTGTCGTGG | |
| DHSK | Upstream | AGCCCATTTGGAGAAGAAGTCTGATGCAAAGTA | DHSK→VLLQ [#] |
| | Downstream | TACTTTGCATCAGTTCTTCTCCAATGGGCT | |

*: the underlined sequence is *Bam*H I site. **: the underlined sequence is *Hind* III site. #: the underlined sequence is amino acid of site-specific mutations.

重组蛋白,加入不含 β -巯基乙醇的上样缓冲液,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅孵育15 min后上样,按10 mA/浓缩胶和20 mA/分离胶于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中进行横流电泳。电泳结束后取出分离胶置于平皿中,用预冷 ddH₂O 洗涤后于预冷复性液轻摇孵育30 min,换液4次,预冷 ddH₂O 洗涤后转移至37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的反应液中,反应2 d后于含有EB染料中轻摇染色10 min,凝胶成像系统下观察胶内底物DNA降解情况并拍照。

2 结果与分析

2.1 Ts-Pt 突变体重组表达载体的鉴定

利用重叠 PCR 方法将旋毛虫 Ts-Pt 氨基酸序列第58和236位的H突变为A或L,第58/59和60位的HCK突变为LAQ,第235、236、237和238位的DHSK突变为VLLQ,各突变体PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测,在750–1 000 bp 之间出现特异性条带,大小均与野生型 Ts-Pt 相等(图1A)。目的片段亚克隆至pMD18T构建重组质粒,经酶切鉴定目的条带与预期结果相符(图1B)。测序正确后回收酶切目的片段与pET-28a(+)相连构建 Ts-Pt 突变体重组表达质粒。测序结果显示,各种 Ts-Pt 突变体重组表达质粒的目的基因片段已成功突变。

2.2 重组 Ts-Pt 突变体蛋白的鉴定

SDS-PAGE 结果显示,各种 Ts-Pt 突变体重组表达质粒的大肠杆菌 Rosetta(DE3) 经 IPTG 诱导后在分子质量34–43 kDa 之间均得到一条重组蛋白,大小与野生型重组 Ts-Pt 蛋白一致(图2A)。

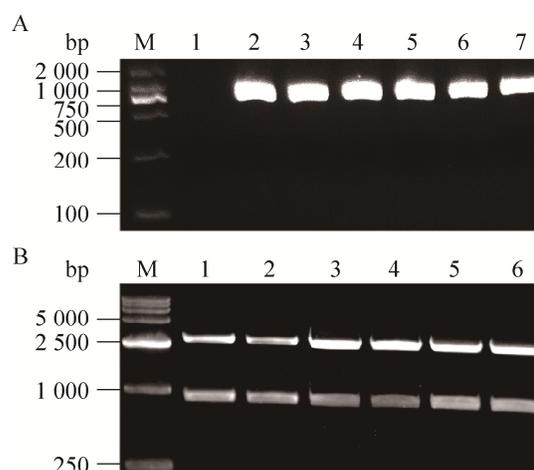


图1 Ts-Pt 突变体的 PCR 扩增和酶切鉴定

Fig. 1 PCR amplification and enzyme digestion of Ts-Pt with active site mutant. (A) PCR amplification of Ts-Pt gene with active site mutant. M: DL2 000 DNA ladder; 1: ddH₂O; 2: wild-type Ts-Pt; 3: H→A; 4: H→L; 5: HCK→LAQ; 6: DHSK→VLLQ; 7: HCK/DHSK→LAQ/VLLQ. (B) Enzyme digestion of pMD18T-Ts-Pt with active site mutant. M: DL15 000 DNA ladder; 1: wild-type Ts-Pt; 2: H→A; 3: H→L; 4: HCK→LAQ; 5: DHSK→VLLQ; 6: HCK/DHSK→LAQ/VLLQ.

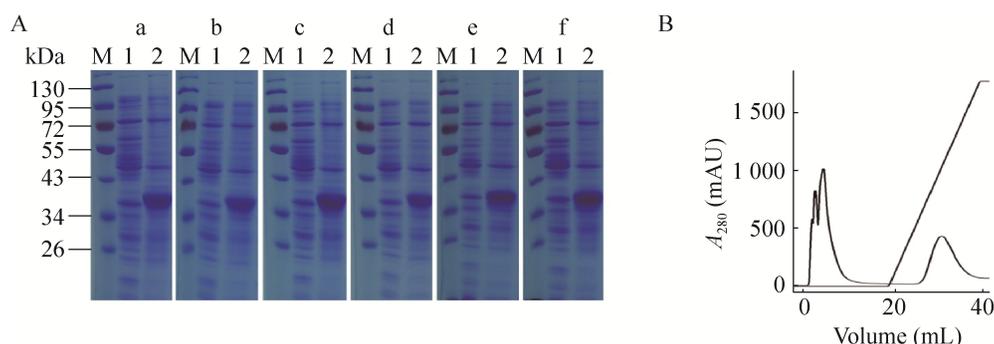


图2 重组 Ts-Pt 突变体蛋白的纯化及 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 Purification and SDS-PAGE analysis of the recombinant proteins. (A) SDS-PAGE analysis of the recombinant proteins. a: wild-type Ts-Pt; b: H→A; c: H→L; 5: HCK→LAQ; d: DHSK→VLLQ; e: HCK/DHSK→LAQ/VLLQ. M: prestained protein marker; 1: *E. coli* lysate without IPTG; 2: *E. coli* lysate with IPTG. (B) Purification of the recombinant proteins.

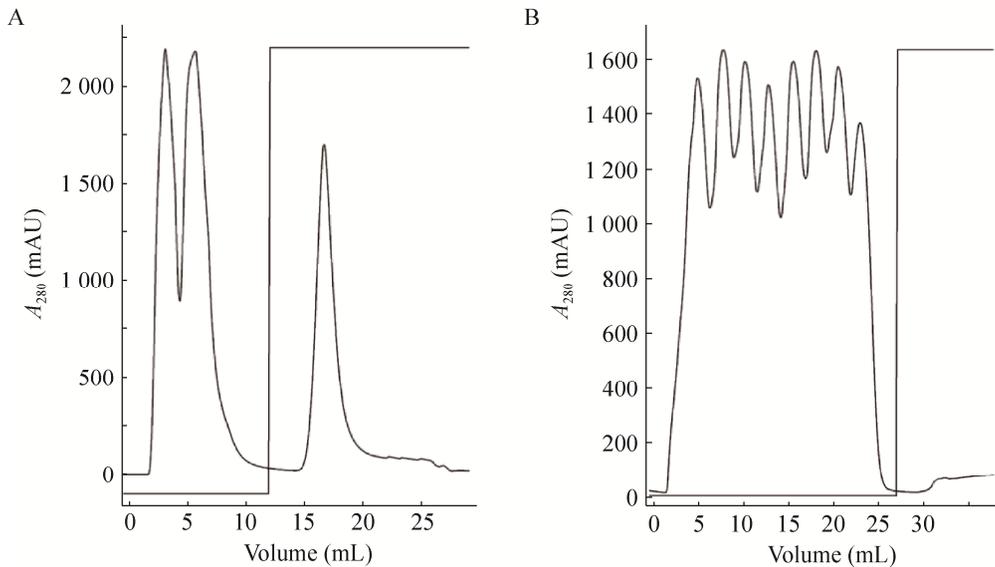


图3 重组 Ts-Pt 蛋白的亲和层析纯化

Fig. 3 Purification of the recombinant proteins by affinity chromatography. (A) Purification of inclusion body. (B) Purification of soluble protein.

为了研究重组蛋白的核酸酶活性,利用 His-Trap 经 AKTA Purifier 100 纯化系统纯化表达的重组蛋白(图 2B)。但亲和层析纯化结果显示,原核表达的重组 Ts-Pt 蛋白呈包涵体表达(图 3)。

2.3 琼脂糖凝胶电泳法分析复性重组 Ts-Pt 突变体蛋白的核酸酶活性

收集复性的重组 Ts-Pt 突变体蛋白,采用琼脂糖凝胶电泳法分析复性重组 Ts-Pt 突变体蛋白的核酸酶活性,结果如图 3 所示,与 DNase II 标准品相比,各种复性的重组 Ts-Pt 突变体蛋白并未表现出降解鲑鱼精 DNA 的能力(图 4)。

2.4 核酸酶酶谱分析重组 Ts-Pt 突变体蛋白的核酸酶活性

核酸酶酶谱分析结果显示,在紫外灯照射下聚丙烯酰胺凝胶之间有一条黑色条带,大小与 SDS-PAGE 一致(图 5)。DNase II 标准品活性

较强,降解区域呈片状,而 BSA 蛋白阴性对照则未见降解 DNA 的现象。这说明表达的各种 Ts-Pt 突变体蛋白经 SDS-PAGE 的胶内复性后能够降解鲑鱼精 DNA。

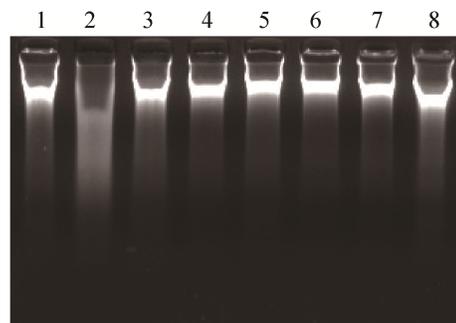


图4 琼脂糖凝胶电泳法分析重组 Ts-Pt 突变体蛋白的核酸酶活性

Fig. 4 Detection of the nuclease activity of the recombinant proteins by agarose gel electrophoresis. 1: ddH₂O; 2: DNase II; 3: wild-type Ts-Pt; 4: H→A; 5: H→L; 6: HCK→LAQ; 7: DHSK→VLLQ; 8: HCK/DHSK→LAQ/VLLQ.

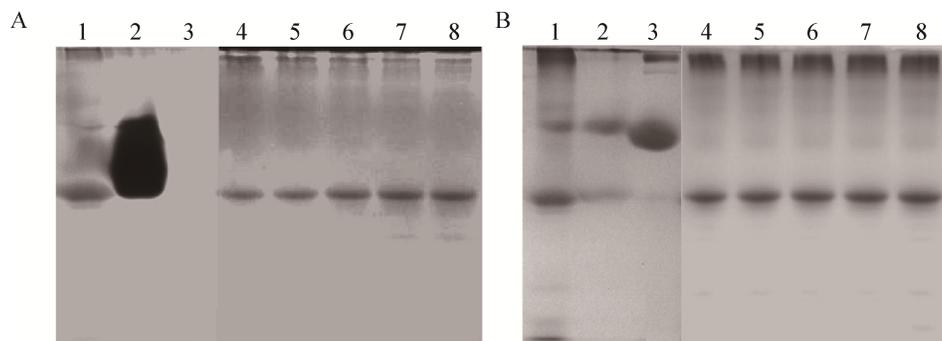


图5 核酸酶酶谱分析重组 Ts-Pt 突变体蛋白的核酸酶活性

Fig. 5 Detection of the nuclease activity of the recombinant proteins by nuclease-zymography. (A) Nuclease-zymography analysis of the recombinant proteins, after staining with ethidium bromide and exposure to UV light. (B) The same gel was stained with Coomassie Brilliant blue after zymography. 1: wild-type Ts-Pt; 2: DNase II; 3: BSA. 4: H→A; 5: H→L; 6: HCK→LAQ; 7: DHSK→VLLQ; 8: HCK/DHSK→LAQ/VLLQ.

3 讨论

DNase II 于 20 世纪 40 年代首先发现于哺乳动物中,随后陆续报道了其生物学特性。但直至 1998 年首次克隆到人类 DNase II^[4],对其研究才深入到分子水平。之后的研究发现, DNase II 广泛存在于低等的原核生物和高等的哺乳动物中^[5],包括牛、马、猪、小鼠、大鼠、鸡、斑马鱼、非洲蟾蜍、果蝇、海星、河豚、类鼻疽杆菌、盘基网柄菌、鸡痘病毒、金丝雀痘病毒、冈比亚按蚊、广杆属线虫和秀丽隐杆线虫等 20 多种生物。从目前已报道的序列上分析,大部分哺乳动物具有 DNase II α 和 DNase II β 两种同源物,而秀丽隐杆线虫是已知存在最多 DNase II 同源物的物种^[6],多达 10 余种,而其他绝大多数物种只有一种或少数几种同源物。

旋毛虫是一种寄生于骨骼肌细胞的重要人兽共患胞内寄生虫,约 55 个国家 1.1 亿人感染,死亡率在 0.2% 左右,主要分布于中国、阿根廷和一些东欧国家等^[7]。旋毛虫生活史包括新生幼虫、肌幼虫和成虫。Mitreva 等通过构建旋毛虫

成虫、新生幼虫和肌幼虫 3 个不同发育时期的抑制性差减杂交 cDNA 文库,筛选到 28 个特异性 DNase II 家族基因,其中成虫期家族 12 个、新生幼虫期家族 15 个、肌幼虫期家族 1 个。虽然 3 个时期 DNase II 间的基因相似性非常低,仅介于 32%–36%,但家族内成员的基因相似性则高达 94%–99%。但是根据 2011 年公布的旋毛虫基因组数据显示,旋毛虫拥有其他寄生性线虫和非寄生性线虫所无法比拟的 DNase II 基因家族,达到惊人的 125 个 DNase II 蛋白家族,并且一半以上的基因被认为编码排泄/分泌产物^[8]。虽然旋毛虫具有如此庞大的 DNase II 蛋白家族,但旋毛虫为何表现出完全不一样的 DNase II 数量, DNase II 在旋毛虫发育和感染中的作用以及 125 个 DNase II 蛋白家族是否真具有核酸酶活性,目前关于这些相关研究报道较少。

水解酶活性的检测研究的方法包括琼脂糖凝胶电泳、分光光度计和胶内酶谱,琼脂糖凝胶电泳法是最为直接的,但琼脂糖凝胶电泳和分光光度计法一样存在非特异性问题。目前特异性检

测酶活性的研究方法主要包括胶内酶谱、原位酶谱和体内酶谱 3 种酶谱方法^[9-10]。胶内酶谱已在各种生物体蛋白质、多肽、低聚糖、多糖、脂质以及核酸酶的检测、分析和鉴定中得到广泛应用^[11]。胶内酶谱中的核酸酶酶谱是指在 SDS-PAGE 过程中在分离胶中加入 DNA 作为底物,核酸酶降解的区域 EB 染色在紫外灯下呈黑色条带,可直接观察活性核酸酶的分子量大小^[12]。相对于琼脂扩散法的定性和分光光度计的定量,胶内酶谱具有定性和定量的优势^[13],胶内酶谱可通过分子量大小直接特异观察核酸酶活性^[10]。胶内酶谱已成为研究核酸酶活性的一种常用方法^[14],通过胶内核酸酶酶谱的方法已证实了许多动物、植物、细菌、真菌和寄生虫组织及其分泌排泄物的天然核酸酶。

对于真核生物表达或原核生物可溶性表达的核酸酶蛋白可直接分析核酸酶活性。但一些蛋白结构复杂,外源基因在大肠杆菌中呈高水平表达时,由于新生肽链的聚集速率远远大于蛋白正确折叠的速率,就会形成无活性的蛋白聚集体即包涵体^[15]。分子和蛋白技术的不断发展使得包涵体经合适的复性过程获得生物活性蛋白成为可能。在本研究中,在重组 Ts-Pt 以及各种突变体蛋白的表达过程中,通过改变各种表达参数(培养基、表达载体、宿主菌、IPTG 浓度、诱导温度和诱导时间等)仍然无法获得可溶性蛋白。同时通过梯度稀释、透析和柱上复性等复性方法进行包涵体复性,利用琼脂糖凝胶电泳法对复性后得到的少量蛋白进行核酸酶活性分析,并未观察到降解 DNA 的能力(部分数据未提供)。利用核酸酶酶谱分析呈包涵体表达的重组 Ts-Pt 及突变体蛋白,结果证明了表达蛋白具有核酸酶活性。

但是需要指出的是,完全阐明包涵体表达的蛋白经胶内酶谱表现出活性的确切理论对于目前现有的技术仍是个挑战。从包涵体的体外溶解变性和复性原理可能可以解释这种胶内变性复性的机制^[16-17],即在不含 β -巯基乙醇的上样缓冲液中,高密度聚集的包涵体于 SDS 作用下溶解形成中间体,同时在整个 SDS-PAGE 过程中也处于一个变性环境足以有效防止聚集,胶内的 SDS 可以很容易地利用含有 Triton X-100 或奶粉的复性液除去^[14,18],从而促使中间体重新折叠成蛋白的天然构象,起到蛋白复性的作用^[19-20]。

据报道,旋毛虫排泄/分泌产物中存在活性核酸内切酶^[21-22]。有学者认为,旋毛虫 p43、SS1 和 AAK85403 三个蛋白的氨基酸与人类 DNase II 表现出一定的相似性,但 3 个蛋白的氨基酸序列在 N 端和 C 端均不存在 DNase II 经典的活性区域 HKD 基序^[23],并且未对 p43、SS1 和 AAK85403 三个蛋白进行核酸酶活性分析。氨基酸序列 N 端和 C 端的两个 HKD 基序(H-x-K-x(4)-D)是 DNase II 经典的活性位点区域, DNase II 属于单体核酸酶,其催化作用的活性中心由两个 HKD 基序形式假二聚体构成^[24]。前期研究发现, Ts-Pt 在 N 端和 C 端保守区域具有 2 个 HKD 基序,且原核表达的重组 Ts-Pt 蛋白在核酸酶酶谱中表现出一定的核酸酶活性^[2]。因此,本研究通过重叠 PCR 方法对 Ts-Pt 的活性位点 N 端和 C 端的 H、HCK 和 DHSK 进行突变,利用核酸酶酶谱分析各种重组突变体蛋白的核酸酶活性。令人惊奇的是,各种重组突变体蛋白均表现出降解 DNA 的能力。因此,可以提出一个科学命题: DNase II 是否是依赖于 HKD 基序发挥活性?虽然本研究未能解释这种现象的原因,但值得深入探究。虽

然吴秀萍等对旋毛虫新生幼虫期脱氧核糖核酸酶T31D4的核酸酶活性及活性位点进行了鉴定^[25], 但该研究并未证实组氨酸位点是 DNase II 的真正活性氨基酸位点。

REFERENCES

- [1] Schäfer P, Cymerman IA, Bujnicki JM, et al. Human lysosomal DNase II α contains two requisite PLD-signature (HxK) motifs: evidence for a pseudodimeric structure of the active enzyme species. *Protein Sci*, 2007, 16(1): 82–91.
- [2] Liao CS, Liu MY, Bai X, et al. Characterisation of a plancitoxin-1-like DNase II gene in *Trichinella spiralis*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2014, 8(8): e3097.
- [3] Zhang SH, Jia WZ, Luo XN, et al. Renaturation, purification and antigenicity identification of recombinant protein of *Cysticercus cellulosae* expressed in *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2008, 24(8): 1490–1495 (in Chinese).
张少华, 贾万忠, 骆学农, 等. 猪囊尾蚴 CE18 重组蛋白的复性纯化及抗原性鉴定. *生物工程学报*, 2008, 24(8): 1490–1495.
- [4] Yasuda T, Takeshita H, Iida R, et al. Molecular cloning of the cDNA encoding human deoxyribonuclease II. *J Biol Chem*, 1998, 273(5): 2610–2616.
- [5] Evans CJ, Aguilera RJ. DNase II: genes, enzymes and function. *Gene*, 2003, 322: 1–15.
- [6] Lai HJ, Lo SJ, Kage-Nakadai E, et al. The roles and acting mechanism of *Caenorhabditis elegans* DNase II genes in apoptotic DNA degradation and development. *PLoS ONE*, 2009, 4(10): e7348.
- [7] Gottstein B, Pozio E, Nöckler K. Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis. *Clin Microbiol Rev*, 2009, 22(1): 127–145.
- [8] Mitreva M, Jasmer DP, Zarlenga DS, et al. The draft genome of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Nat Genet*, 2011, 43(3): 228–235.
- [9] Vandooren J, Geurts N, Martens E, et al. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nat Methods*, 2013, 10(3): 211–220.
- [10] Napirei M, Ricken A, Eulitz D, et al. Expression pattern of the deoxyribonuclease 1 gene: lessons from the Dnase1 knockout mouse. *Biochem J*, 2004, 380(3): 929–937.
- [11] Fischer H, Scherz J, Szabo S, et al. DNase 2 is the main DNA-degrading enzyme of the stratum corneum. *PLoS ONE*, 2011, 6(3): e17581.
- [12] Rosenthal AL, Lacks SA. Nuclease detection in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*, 1977, 80(1): 76–90.
- [13] Budič M, Kidrič M, Meglič V, et al. A quantitative technique for determining proteases and their substrate specificities and pH optima in crude enzyme extracts. *Anal Biochem*, 2009, 388(1): 56–62.
- [14] Wilkesman J, Kurz L. Protease analysis by zymography: a review on techniques and patents. *Recent Pat Biotechnol*, 2009, 3(3): 175–184.
- [15] Fang M, Huang HL. Advances in *in vitro* refolding of inclusion body proteins. *Chin J Biotech*, 2001, 17(6): 608–612 (in Chinese).
方敏, 黄华樑. 包涵体蛋白体外复性的研究进展. *生物工程学报*, 2001, 17(6): 608–612.
- [16] De Bernardez Clark E. Refolding of recombinant proteins. *Curr Opin Biotechnol*, 1998, 9(2): 157–163.
- [17] Eiberle MK, Jungbauer A. Technical refolding of proteins: do we have freedom to operate? *Biotechnol J*, 2010, 5(6): 547–559.
- [18] Ludwig S, Mannherz HG, Schmitt S, et al. Murine serum deoxyribonuclease 1 (Dnase1) activity partly originates from the liver. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41(5): 1079–1093.
- [19] Boone DL, Tsang BK. Non-isotopic technique for the identification of endonucleases involved in apoptosis. *Biotechniques*, 1997, 22(4): 648–649.
- [20] Thimon V, Belghazi M, Labas V, et al. One- and two-dimensional SDS-PAGE zymography with quenched fluorogenic substrates provides

- identification of biological fluid proteases by direct mass spectrometry. *Anal Biochem*, 2008, 375(2): 382–384.
- [21] Mak CH, Ko RC. Characterization of endonuclease activity from excretory/secretory products of a parasitic nematode, *Trichinella spiralis*. *Eur J Biochem*, 1999, 260(2): 477–481.
- [22] Liu RD, Qi X, Sun GG, et al. Proteomic analysis of *Trichinella spiralis* adult worm excretory-secretory proteins recognized by early infection sera. *Vet Parasitol*, 2016, 231: 43–46.
- [23] MacLea KS, Krieser RJ, Eastman A. A family history of deoxyribonuclease II: surprises from *Trichinella spiralis* and *Burkholderia pseudomallei*. *Gene*, 2003, 305(1): 1–12.
- [24] Cheng YC, Hsueh CC, Lu SC, et al. Identification of three crucial histidine residues (His¹¹⁵, His¹³² and His²⁹⁷) in porcine deoxyribonuclease II. *Biochem J*, 2006, 398(2): 177–185.
- [25] Wu XP, Yu L, Wang XL, et al. Identification of enzymatic activity and activity sites of DNase II protein from *Trichinella spiralis*. *J Jilin Agric Univ*, 2010, 32(2): 209–213 (in Chinese).
吴秀萍, 于录, 王学林, 等. 旋毛虫脱氧核糖核酸酶-II酶活及酶活性位点的鉴定. *吉林农业大学学报*, 2010, 32(2): 209–213.

(本文责编 陈宏宇)

~~~~~

## CNKI推出《中国高被引图书年报》

日前,中国知网(CNKI)中国科学文献计量评价研究中心推出了一套《中国高被引图书年报》,该报告基于中国大陆建国以来出版的422万余本图书被近3年国内期刊、博硕、会议论文的引用频次,分学科、分时段遴选高被引优秀学术图书予以发布。据研制方介绍,他们统计并分析了2013–2015年中国学术期刊813万余篇、中国博硕士学位论文101万余篇、中国重要会议论文39万余篇,累计引文达1451万条。根据统计数据,422万本图书至少被引1次的图书达72万本。研制方根据中国图书馆分类法,将72万本图书划分为105个学科,分1949–2009年和2010–2014年两个时间段,分别遴选被引最高的TOP10%图书,共计选出70911本优秀图书收入《中国高被引图书年报》。统计数据显示,这7万本高被引优秀图书虽然只占全部图书的1.68%,却获得67.4%的总被引频次,可见这些图书质量上乘,在同类图书中发挥了更加重要的作用。该报告还首次发布各学科“学科h指数”排名前20的出版单位的评价指标,对客观评价出版社的社会效益——特别是学术出版物的社会效益具有重要的参考价值。

该报告从图书被引用的角度出发,评价图书的学术影响力,弥补了以销量和借阅等指标无法准确评价学术图书的缺憾,科学、客观地评价了图书、图书作者以及出版单位对各学科发展的贡献。

《中国高被引图书年报》把建国以来出版图书全部纳入评价范围属国内首创,是全面、客观评价图书学术影响力的工具,填补了目前图书学术水平定量评价的空白,在帮助图书馆建设特色馆藏和提高服务水平、帮助出版管理部门了解我国学术出版物现状、帮助科研机构科研管理、帮助读者购买和阅读图书等方面,均具有较强的参考价值,也为出版社评估出版业绩、决策再版图书、策划学科选题提供有用的信息。

《中国高被引图书年报》由《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司出版。该产品的形式为光盘电子出版物,分为理学、工学、农学、医学、人文科学和社会科学6个分卷,随盘赠送图书,欢迎您咨询、订购。

咨询电话:010-82710850 82895056 转 8599, Email: aspt@cnki.net