

人同型融合和蛋白质分选复合体亚基的原核表达、蛋白纯化及功能验证

陈玉, 郭仁朋, 黄赛飞, 宋丹, 刘蓉

南京农业大学 食品科技学院, 江苏 南京 210095

陈玉, 郭仁朋, 黄赛飞, 等. 人同型融合和蛋白质分选复合体亚基的原核表达、蛋白纯化及功能验证. 生物工程学报, 2020, 36(1): 133-142.

Chen Y, Guo RP, Huang SF, et al. Prokaryotic expression, protein purification and functional verification of human homotypic fusion and vacuole protein sorting complex subunit. Chin J Biotech, 2020, 36(1): 133-142.

摘要: 同型融合和蛋白质分选复合体 (HOPS) 由 VPS11、VPS16、VPS18、VPS33、VPS39 和 VPS41 这 6 种蛋白组成, 能够通过膜融合机制来调节生物体内的膜泡运输。已有研究表明其可以作为融合因子来促进自噬体与溶酶体膜融合过程。为在体外确定 HOPS 复合体与自噬性 SNARE 蛋白 STX17 是否具有直接相互作用, 首先利用 PCR 技术从已有质粒中扩增得到 6 种基因的编码序列, 将其连接至 pGEX 4T-1-GST 或 pET-His-NusA 原核表达载体上, 经菌落 PCR 初步鉴定和 DNA 测序无误后成功构建 6 种原核表达重组质粒并转化至大肠杆菌 BL21(DE3); 利用谷胱甘肽琼脂糖树脂与镍柱对重组蛋白进行纯化, 烟草蚀纹病毒 (TEV) 蛋白酶酶切掉 GST 或 His-NusA 标签, 得到分子量约为 105 kDa 的 HA-VPS11 蛋白、97 kDa 的 Flag-VPS16 蛋白、108 kDa 的 HA-VPS18 蛋白、70 kDa 的 Flag-VPS33 蛋白、97 kDa 的 HA-VPS39 蛋白和 98 kDa 的 Flag-VPS41 蛋白; 通过体外 GST pull-down 技术对 6 种蛋白的功能进行验证, 证实自噬性 SNARE 蛋白 STX17 和 6 种重组蛋白在体外均具有直接相互作用, 为深入探究 HOPS 复合体参与自噬体与溶酶体膜融合过程中的功能及作用机制奠定实验基础。

关键词: 人同型融合和蛋白质分选复合体 (HOPS), 原核表达, 蛋白纯化, 自噬

Received: April 10, 2019; **Accepted:** May 29, 2019

Supported by: Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (No. BK20160729), Central Colleges Basic Business (No. KYZ201651), Outstanding Youth Foundation of Jiangsu Province, China (No. BK20170025).

Corresponding authors: Rong Liu. Tel: +86-25-8439373; E-mail: liuronglr010@163.com

江苏省自然科学基金 (No. BK20160729), 中央高校基本业务费 (No. KYZ201651), 江苏省杰出青年基金 (No. BK20170025) 资助。

网络出版时间: 2019-07-12

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20190710.1209.001.html>

Prokaryotic expression, protein purification and functional verification of human homotypic fusion and vacuole protein sorting complex subunit

Yu Chen, Rengeng Guo, Saifei Huang, Dan Song, and Rong Liu

College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

Abstract: Homotypic fusion and vacuole protein sorting(HOPS) is a protein complex consisting of VPS11, VPS16, VPS18, VPS33, VPS39, VPS41 and regulates membrane transport *in vivo* through membrane fusion mechanisms. The evidence suggests that HOPS complex as a fusion factor, facilitates autophagosome-lysosome fusion. To determine whether the HOPS complex directly interacts with the autophagic SNARE protein STX17 *in vitro*, the coding sequence of the six genes were amplified from the existing plasmids by PCR, and then ligated to the prokaryotic expression vector pGEX 4T-1-GST or pET-His-NusA. After identification through colony PCR and DNA sequencing, 6 recombinant plasmids were constructed and transferred into *Escherichia coli* BL21 (DE3). The recombinant proteins were purified by glutathione sepharose 4B and nickel column. We used the tobacco etch virus protease to cut off the GST-tag or His-NusA-tag, to obtain HA-VPS11 protein of about 105 kDa, Flag-VPS16 protein of about 97 kDa, HA-VPS18 protein of about 108 kDa, Flag-VPS33 protein of about 70 kDa, HA-VPS39 protein of about 97 kDa, and Flag-VPS41 protein of about 98 kDa. The function of the purified proteins was verified by *in vitro* glutathione S-transferases pull-down assay, confirming that autophagic SNARE protein STX17 interacted directly with HOPS components. Our findings provide experimental basis to further study the function and mechanism of HOPS complex in the process of autophagosome-lysosome fusion.

Keywords: human HOPS complex, prokaryotic expression, protein purification, autophagy

HOPS 是一个在哺乳动物和酵母之间高度保守的多蛋白复合体, 由 6 个相对分子质量为 79–123 kDa 的蛋白组成。长约 30 nm, 形状类似“海马”, Vps41 位于顶部邻近 Vps16 和 Vps33 亚基, 而 Vps39 位于底部与 Vps18 和 Vps11 亚基连接在一起^[1]。HOPS 又被称为 Vps (Vacuolar protein sorting) 复合物, 先发现的 Vps11、Vps16、Vps18 和 Vps33 构成 Vps-C complex, 普遍存在于酵母、果蝇、植物、哺乳动物中。Vps-C complex 能够通过自噬过程、胆固醇和脂质代谢途径处理和再循环细胞质组分^[2-3]。另外两个亚基 Vps39 及 Vps41 则属于 Vps-B complex, 与 Vps-C complex 形成了相对分子质量约 633 kDa 的 HOPS 复合体。最初 HOPS 只被鉴定为酵母内涵体上的一种聚集复合物, 如今其已被确定能够影响内涵体和溶酶体的成熟和传递过程, 可以通过膜融合机制来调节生物体内的膜泡运输, 对于酵母和哺乳动物中自噬体与液泡/溶酶体的膜融合过程至关重要^[4-6]。

细胞自噬广泛存在于真核生物中, 是一种自我消化、进化保守的过程, 依赖于溶酶体降解途径^[7]。自噬的过程需要经历以下几个阶段: 自噬的诱导; 自噬前体的形成; 自噬前体的延伸及闭合; 自噬体的成熟; 自噬体与溶酶体的融合及内容物的降解^[8]。其中自噬体与溶酶体的融合是自噬的关键过程, 需要多种蛋白的参与。已知 SNAREs 属于膜锚定蛋白, 主要作用是介导囊泡与靶膜的融合^[9]。在融合过程中, 定位于两个待融合膜上不同形式的 SNARE 蛋白会形成复合体, 这一复合体之间的螺旋结构相互缠绕, 从而使膜拉近并融合。研究表明 STX17 (定位于自噬体上) 通过与 SNAP29 形成二元复合物, 再与 VAMP8 (定位于溶酶体上) 相互作用形成 STX17-SNAP29-VAMP8 三元复合物从而介导自噬体与溶酶体的融合^[10]。形成 SNARE 复合物对膜融合过程至关重要, 但它们的自发组装效率很低, 由 SNARE 蛋白介导的膜融合过程均需要一些聚集

因子的调节。体内试验结果表明, HOPS 复合体通过与自噬性 SNARE 蛋白 STX17 相互作用来促进 SNARE 复合物的组装, 加速由 SNARE 蛋白介导的膜融合过程^[11-12]。但是, HOPS 复合体亚基与自噬 SNARE 蛋白 STX17 是直接发生相互作用还是由其他蛋白进行介导的, 这一问题目前尚未可知。

鉴于 HOPS 复合体在细胞自噬膜融合过程中的重要作用, 本研究拟纯化得到 VPS11、VPS16、VPS18、VPS33、VPS39 和 VPS41 这 6 种组成人 HOPS 复合体的重组蛋白, 利用 GST pull-down 技术, 在体外鉴定 HOPS 复合体与 STX17 蛋白是否存在直接相互作用, 为寻找 HOPS 复合体的互作蛋白和进一步探究其在自噬体与溶酶体融合过程中的功能及作用机制奠定材料基础。

1 材料与方法

1.1 材料

pGEX 4T-1-GST 原核表达质粒由本实验室保存; pET-28a(+)-改造的 pET-His-NusA 原核表达质粒由南京农业大学理学院万群实验室惠赠; pcDNA3.1-HA-VPS11 等 6 种重组质粒由浙江大学孙启明实验室惠赠; 大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 、BL21 (DE3) 感受态细胞购自上海唯地生物技术公司; PCR 试剂盒、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; Trelief SoSoo Cloning Kit 购自南京擎科生物技术有限公司; 限制性核酸内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I、*Hind* III 和 *Not* I 购自 NEB 公司; 胶回收试剂盒、DNA marker 购自 Genstar 公司; 质粒小提试剂盒购自 OMEGA 公司; TAE、氨苄青霉素 (Ampicillin)、卡那青霉素 (Kanamycin)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 和考马斯快速染色液均购自北京索莱宝科技有限公司; 引物合成及 DNA 序列测序均由南京金斯瑞生物科技有限公司完成; Glutathione Sepharose 4B 购自美国 GE 公司; Ni Focurose 6FF 购自武汉汇研生物科技股份有限公司; 鼠单克隆抗 Flag 抗体购自 Sigma 公

司; 鼠单克隆抗 HA 抗体、鼠单克隆抗 VPS11、VPS18、VPS39、VPS41 抗体均购自 Santa Cruz 公司; 兔单克隆抗 VPS33 抗体购自 Genetex 公司; 兔单克隆抗 VPS16 抗体购自 Proteintech 公司; 兔单克隆抗 STX17 抗体购自 Sigma 公司; HRP 标记的山羊抗鼠 IgG、山羊抗兔 IgG 购自 SBA 公司; 化学发光试剂购自 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成

所用引物见表 1。

1.2.2 组成人 HOPS 复合体 6 种基因编码区的扩增

以 pcDNA3.1-HA-VPS11、pcDNA3.1-HA-VPS16、pcDNA3.1-HA-VPS18、pcDNA3.1-HA-VPS33、pcDNA3.1-HA-VPS39、pcDNA3.1-HA-VPS41 (已有质粒) 为模板, 利用 PrimerSTAR 酶扩增目的片段, 条件如下: 98 °C 变性 10 s, 58 °C 退火 5 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测正确后, 胶回收目的片段。

1.2.3 6 种重组质粒的构建及鉴定

37 °C 酶切过夜条件下, *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切 pET-His-NusA 质粒, *Eco*R I 和 *Not* I、*Bam*H I 和 *Not* I 分别双酶切 pGEX 4T-1-GST 质粒, 回收线性化载体。1) 无缝连接方式: Trelief SoSoo Cloning Kit 连接线性化载体与目的片段, 转化 *E. coli* DH5 α , 37 °C 培养过夜。2) T4 连接方式: 双酶切 PCR 产物并用 T4 DNA 连接酶将带有粘性末端的目的片段与载体连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 37 °C 培养过夜。次日挑取单克隆, 进行菌落 PCR, 琼脂糖凝胶电泳初步检测, 选择条带位置正确的菌液进行测序鉴定。测序无误后, 进行质粒小提。

1.2.4 重组蛋白的分离纯化

将测序正确的 6 种重组质粒转化至 *E. coli* BL21 (DE3), 挑取单克隆并扩大培养。1) 镍柱亲和层析: 37 °C 培养至 OD_{600} 0.9-1.2, 加入 IPTG (终浓度为 0.2 mmol/L), 22 °C 诱导 16 h, 4 °C 离心

表 1 试验所用引物

Table 1 Primers used in the study

Name of primer	Primer sequence (5'-3')	Restriction site
pET-HA-VPS11-F	CTGGTGAGAACCTGTACTTCCAATCC <u>GGATCCT</u> ACCCCTACGACGTG CCCGACTA	BamH I
pET-HA-VPS11-R	TCCTCTTCAGAGATGAGTTTCTGCTCA <u>AAGCTT</u> TTAAGTGCCCTCCTG GAGTGC	Hind III
pGEX 4T-1-Flag-VPS16-F	CCG <u>GAATTC</u> ATGGACTGCTACACGGCGAAC	EcoR I
pGEX 4T-1-Flag-VPS16-R	ATTTG <u>CGGCCGC</u> CTACTTCTTCTGGGCTTGTGCCCT	Not I
pET-HA-VPS18-F	CTGGTGAGAACCTGTACTTCCAATCC <u>GGATCCT</u> ACCCCTACGACGTGC CCCGACTA	BamH I
pET-HA-VPS18-R	TCCTCTTCAGAGATGAGTTTCTGCTCA <u>AAGCTT</u> CTACAGCCAACTGAGCT GCTCCTC	Hind III
pGEX 4T-1-Flag-VPS33-F	ACAAGGGATCCCCG <u>GAATTC</u> ATGGCGGCTCATCTGTCC	EcoR I
pGEX 4T-1-Flag-VPS33-R	CAGTCAGTCACGATGCGGCCGCCTAGAAAGGTTTTTCCATCAG	Not I
pET-HA-VPS39-F	CTGGTGAGAACCTGTACTTCCAATCC <u>GGATCCT</u> ACCCCTACGACGTG CCCGACTA	BamH I
pET-HA-VPS39-R	TCCTCTTCAGAGATGAGTTTCTGCTCA <u>AAGCTT</u> CTAAGTGTGAGCTGGG TTTACCTC	Hind III
pGEX 4T-1-Flag-VPS41-F	CGC <u>GGATCC</u> ATGGCGGAAGCAGAGGAGCAGGAAAC	BamH I
pGEX 4T-1-Flag-VPS41-R	ATTTG <u>CGGCCGC</u> CTATTTTTTCATCTCCAAAATTGCAC	Not I

Note: underlined sequences are restriction enzyme sites.

弃上清收集菌体,用 *E. coli* 裂解缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, 1.4 mmol/L β -巯基乙醇, 0.05% Tween 20, 0.2 mmol/L PMSF 蛋白酶抑制剂) 重悬, 静置 30 min 后超声破碎, 12 000 r/min、4 °C 离心取上清。2 倍柱体积的平衡液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 500 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, 5% 甘油) 清洗镍柱, 随后加入菌体上清, 4 °C 旋转 2 h, 弃流出液, 加入 2 倍柱体积的清洗液 (20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, 5% 甘油) 清洗, 加入洗脱液 (20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 500 mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑, 5% 甘油) 洗脱, 得到蛋白液①加入 TEV 酶切掉标签, 二次过柱时标签蛋白与镍柱结合, 收集蛋白液②即得最终纯化好的重组蛋白, 采用 SDS-PAGE 和 Western blotting 方法检测。2) 谷胱甘肽琼脂糖树脂亲和层析: 37 °C 培养至 OD_{600}

0.4–0.6, 加入 IPTG (终浓度为 0.2 mmol/L), 28 °C 诱导 5 h, 4 °C 离心弃上清收集菌体, 用 *E. coli* 裂解缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.1% β -巯基乙醇, 1% Triton X-100, 0.2 mmol/L PMSF 蛋白酶抑制剂) 重悬, 静置 30 min 后超声破碎, 12 000 r/min、4 °C 离心取上清, 并加入适量 Glutathione Sepharose 4B (玻璃珠), 4 °C 旋转过夜。次日先清洗玻璃珠, 再加入适量 *E. coli* 裂解缓冲液和 TEV 酶, 旋转 2 h, 离心收集上清即得最终纯化好的重组蛋白, 采用 SDS-PAGE 和 Western blotting 方法检测。

1.2.5 *In vitro* GST pull-down 验证 HOPS 组分蛋白与 STX17 的相互作用

将 pGEX 4T-1-TEV-Flag-STX17 重组质粒转化至 *E. coli* BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导离心得到菌体, 用 *E. coli* 裂解缓冲液重悬, 静置 30 min 后超声破碎, 12 000 r/min、4 °C 离心取上清, 加入

相应 Glutathione Sepharose 4B (对照组 1 为纯玻璃珠, 不加 Flag-STX17 蛋白上清), 4 °C 旋转过夜。次日清洗玻璃珠, 在实验组与对照组 1 中加入已纯化好的 HOPS 蛋白, 对照组 2 中加入等量缓冲液, 旋转结合 1 h, 离心弃上清并清洗玻璃珠, 再加入适量 *E. coli* 裂解缓冲液和 TEV 酶, 4 °C 继续旋转 2 h, 最后收集上清并制备样品, 采用 Western blotting 方法检测 HOPS 组分蛋白与 STX17 之间的相互作用。

2 结果与分析

2.1 目的片段的克隆及鉴定

以 6 种已有质粒为模板, 利用设计的 6 对引物扩增得到目的片段, 其中 *VPS11* 全长 2 826 bp, *VPS18* 全长 2 922 bp, *VPS39* 全长 2 628 bp, *VPS16* 全长 2 520 bp, *VPS33* 全长 1 791 bp, *VPS41* 全长 2 565 bp, 经琼脂糖电泳鉴定获得与预期片段一致的 6 种 PCR 产物 (图 1 和图 2)。

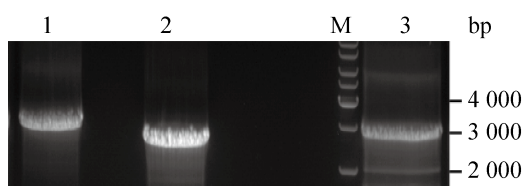


图 1 *VPS18*、*VPS39* 和 *VPS11* 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 The amplification result of *VPS18*, *VPS39* and *VPS11* gene by PCR. M: DNA marker; 1: PCR product of *VPS18* gene; 2: PCR product of *VPS39* gene; 3: PCR product of *VPS11* gene.

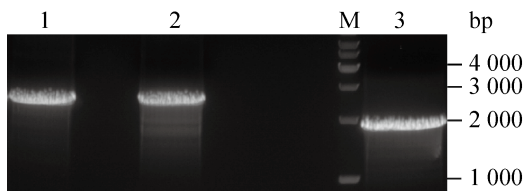


图 2 *VPS16*、*VPS41* 和 *VPS33* 基因的 PCR 扩增

Fig. 2 The amplification result of *VPS33*, *VPS41* and *VPS16* gene by PCR. M: DNA marker; 1: PCR product of *VPS16* gene; 2: PCR product of *VPS41* gene; 3: PCR product of *VPS33* gene.

2.2 重组质粒的构建及鉴定

用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切 pET-His-NusA 质粒 (图 3), 用 *Eco*R I 和 *Not* I 或 *Bam*H I 和 *Not* I 分别双酶切 pGEX 4T-1-GST 质粒 (图 4), 37 °C 酶切过夜后得到 3 种线性化载体。将载体与目的片段分别连接并转化。次日, 挑取单克隆, 进行菌落 PCR, 用琼脂糖凝胶电泳初步鉴定 (图 5 和图 6)。菌落 PCR 验证正确的菌液送测, 正反向测序结果与基因序列一致, 说明 6 种组成 HOPS 复合体的原核表达重组质粒构建成功。

2.3 重组蛋白的纯化

经 SDS-PAGE 和 Western blotting 方法检测得出以下结果: 利用镍柱亲和层析方式成功纯化得到分子量在 105 kDa 左右的 HA-VPS11 重组蛋白、

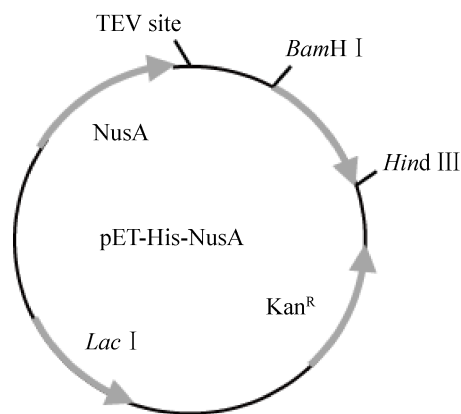


图 3 pET-His-NusA 载体图谱

Fig. 3 The vector map of pET-His-NusA.

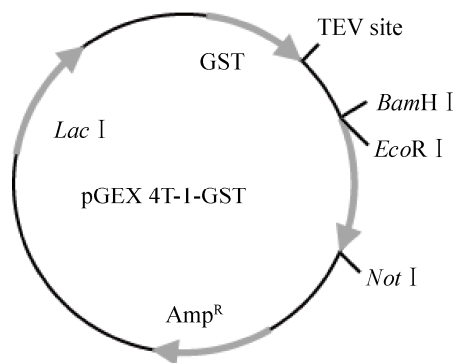


图 4 pGEX 4T-1-GST 载体图谱

Fig. 4 The vector map of pGEX 4T-1-GST.

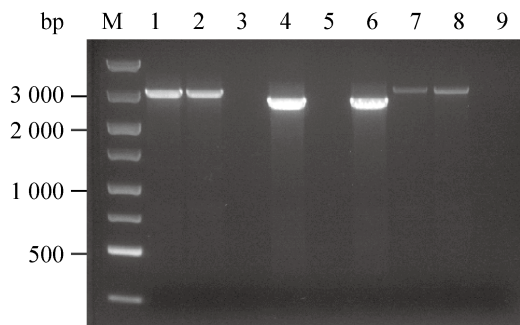


图 5 pET-His-NusA-TEV-HA-VPS11、VPS39、VPS18 重组质粒的菌落 PCR 鉴定结果

Fig. 5 The recombinant plasmids pET-His-NusA-TEV-HA-VPS11, VPS39 and VPS18 colony PCR results. M: DNA marker; 1–3: detection with colony PCR for the recombinant plasmid pET-His-NusA-TEV-HA-VPS11; 4–6: detection with colony PCR for the recombinant plasmid pET-His-NusA-TEV-HA-VPS39; 7–9: detection with colony PCR for the recombinant plasmid pET-His-NusA-TEV-HA-VPS18.

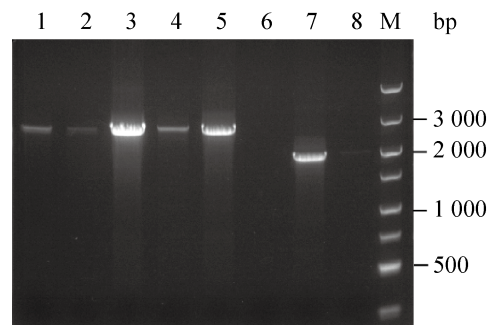


图 6 pGEX 4T-1-GST-TEV-Flag-VPS16、VPS41、VPS33 重组质粒的菌落 PCR 鉴定结果

Fig. 6 The recombinant plasmids pGEX 4T-1-GST-TEV-Flag-VPS16, VPS41 and VPS33 colony PCR results. M: DNA marker; 1–2: detection with colony PCR for the recombinant plasmid pGEX 4T-1-GST-TEV-Flag-VPS16; 3–5: detection with colony PCR for the recombinant plasmid pGEX 4T-1-GST-TEV-Flag-VPS41; 6–8: detection with colony PCR for the recombinant plasmid pGEX4T-1-GST-TEV-Flag-VPS33.

108 kDa 左右的 HA-VPS18 重组蛋白及 97 kDa 左右的 HA-VPS39 重组蛋白 (图 7); 利用谷胱甘肽亲和层析方式成功纯化得到分子量在 97 kDa 左右的 Flag-VPS16 重组蛋白、70 kDa 左右的 Flag-VPS33 重组蛋白及 98 kDa 左右的 Flag-VPS41 重组蛋白 (图 8)。

2.4 HOPS 蛋白与 Flag-STX17 蛋白的体外相互作用

以 Flag-STX17 为诱饵蛋白, 首先将其与 Glutathione Sepharose 4B 结合, 然后分别加入纯化好

的 6 种重组蛋白, 待 HOPS 组分蛋白与 Flag-STX17 蛋白充分结合后, 用 TEV 蛋白酶进行洗脱。若两种蛋白没有直接相互作用, 添加的蛋白被清洗掉, 则上清中无此添加蛋白, 用特异性抗体将检测不出相应条带。结果如图 9 所示, 与对照组相比, 实验组在分子量为 105、97、108、70、97、98 kDa 左右分别检测出 HA-VPS11、Flag-VPS16、HA-VPS18、Flag-VPS33、HA-VPS39、Flag-VPS41 蛋白的特异性条带, 并且同一位置对照组 1 和 2 均无非特异性条带, 以上结果一方面说明制备的

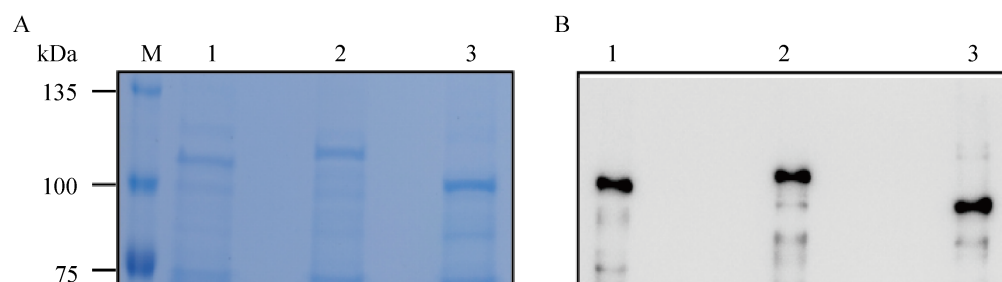


图 7 HA-VPS11、HA-VPS18、HA-VPS39 重组蛋白的 SDS-PAGE (A) 与 Western blotting (B) 法分析

Fig. 7 SDS-PAGE and Western blotting analysis of HA-VPS11, HA-VPS18 and HA-VPS39 recombinant proteins. (A) The analysis of SDS-PAGE. (B) The analysis of Western blotting. M: protein marker; 1: HA-VPS11 recombinant protein; 2: HA-VPS18 recombinant protein; 3: HA-VPS39 recombinant protein.

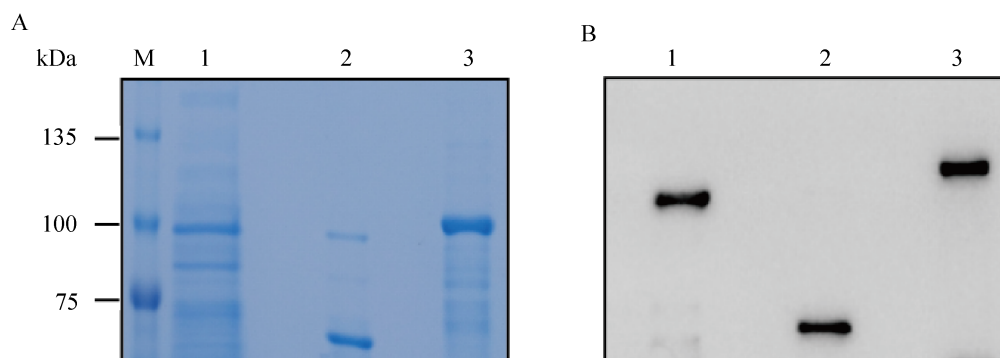


图 8 Flag-VPS16、Flag-VPS33、Flag-VPS41 重组蛋白的 SDS-PAGE (A) 与 Western blotting (B) 法分析

Fig. 8 SDS-PAGE and Western blotting analysis of Flag-VPS16, Flag-VPS33 and Flag-VPS41 recombinant proteins. (A) The analysis of SDS-PAGE. (B) The analysis of Western blotting. M: protein marker; 1: flag-VPS16 recombinant protein; 2: flag-VPS33 recombinant protein; 3: flag-VPS41 recombinant protein.

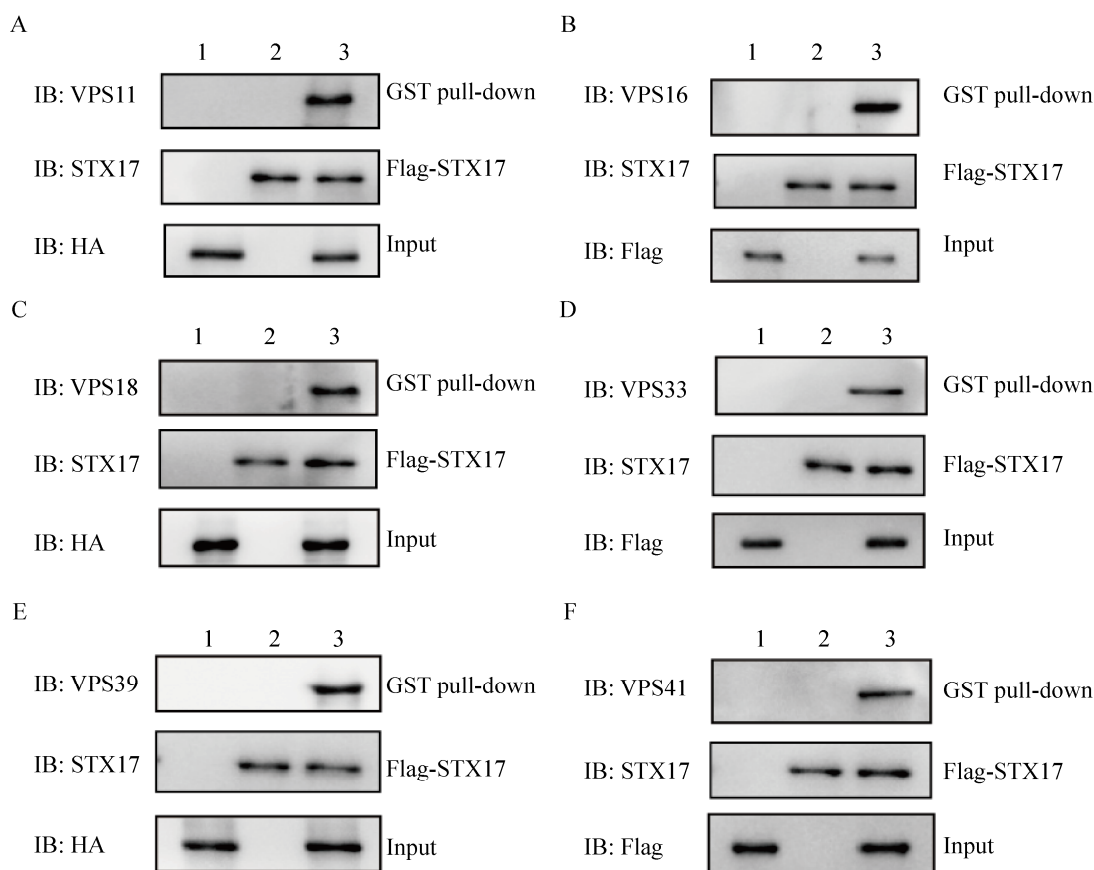


图 9 组成 HOPS 复合体的 6 种重组蛋白与 Flag-STX17 相互作用的体外 GST pull down 结果

Fig. 9 *In vitro* GST pull down results of the interaction between STX17 and six recombinant proteins consisting of human HOPS complex. (A) *In vitro* result of the interaction between HA-VPS11 and Flag-STX17. (B) *In vitro* result of the interaction between Flag-VPS16 and Flag-STX17. (C) *In vitro* result of the interaction between HA-VPS18 and Flag-STX17. (D) *In vitro* result of the interaction between Flag-VPS33 and Flag-STX17. (E) *In vitro* result of the interaction between HA-VPS39 and Flag-STX17. (F) *In vitro* result of the interaction between Flag-VPS41 and Flag-STX17. 1: without Flag-STX17 protein; 2: without recombinant protein; 3: test group with recombinant protein.

重组蛋白均具有生物学功能,另一方面说明组成 HOPS 复合体的 6 种重组蛋白与 STX17 蛋白在体外均发生直接相互作用,不存在第三者在中间作为“桥梁”形成间接相互作用。

3 讨论

当细胞处于饥饿状态下自噬体会吞噬长寿命蛋白,将其递送至溶酶体进行降解,从而回收降解所产生的营养物质用来供能,使细胞在应激条件下循环产生能量来继续存活^[13]。自噬还可以降解细胞内错误折叠的蛋白质和受损害的细胞器,消除细胞内的病原体以此维持胞内稳态^[14]。研究者们已经在细胞和分子生物学水平上证实了自噬可以改善因内质网应激、微生物感染和蛋白质聚集积累引起的疾病^[15]。目前对于细胞自噬与疾病的研究已包括衰老、病原体感染、神经退行性疾病、癌症等^[16-17]。对自噬研究的深入将会对这些疾病的治疗提供新的方法,而对与自噬相关蛋白结构的解析可能会对未来疾病的治疗提供潜在药物靶标^[18]。

如今,自噬体的形成机制已得到广泛研究,而自噬体与溶酶体融合的分子机制尚不明朗。已知自噬体与溶酶体的融合经历了联结、锚定、膜融合 3 个步骤,SNAREs 在这一过程中发挥了重要作用。2012 年 Itakura 等^[19]首先确定了自噬体与溶酶体膜融合需要自噬性 SNARE 蛋白 STX17 的参与,STX17-SNAP29-VAMP8 三元复合物的形成能介导这一膜融合过程^[20]。但自噬体与溶酶体之间一些聚集因子的作用尚不清楚,因此还有许多蛋白的功能需要进行验证。2014 年 Jiang 等^[11]利用免疫共沉淀 (Co-IP) 和质谱分析 (MS) 两种方法确定了与 STX17 相互作用的两种蛋白 VPS33 及 VPS16,当利用 siRNA 干扰 VPS33、VPS16 或 VPS39 基因的表达会阻断自噬流过程,造成 STX17 和 LC3 蛋白的积累。在 293T 细胞中分别转染带 Flag 标签的 STX17 和 GFP 标签的 HOPS

复合体亚基,结果表明所有的 HOPS 组分蛋白在体内都与 STX17 有相互作用,但是两者在体外的相互作用还未得到验证。因为 Co-IP 结果只能证明两种蛋白在细胞内存在相互作用,这种作用可能是直接相互作用,也可能是第三者在中间作为“桥梁”,形成复合物后的间接相互作用;而 GST pull-down 是一种常用的探究蛋白质体外相互作用的技术,该方法能在体外鉴定两种蛋白质是否发生直接的相互作用从而消除其他蛋白质的影响。因此本试验纯化出 6 种构成人 HOPS 复合体的重组蛋白,采用 GST pull-down 技术证实 HOPS 复合体与 STX17 蛋白在体外具有直接相互作用,为在体外揭示 HOPS 复合体在自噬体与溶酶体膜融合过程中的作用机制提供切实可行的实验途径,并为进一步研究 HOPS 的生物学功能奠定实验基础。

在前期试验中发现 pGEX 4T-1-GST-TEV-Flag-VPS11、VPS18 和 VPS39 这 3 种重组质粒的蛋白表达量很低,即使优化培养条件(诱导时间、温度和诱导剂浓度),效果也并不明显,因此选择 pET-His-NusA 载体重新构建质粒。此载体上含有 T7 强启动子,为了减慢蛋白质的合成速度、降低形成包涵体的概率,利用 IPTG 诱导表达时采用 22 °C 诱导过夜的条件,最终在 His-NusA 促融标签的作用下实现 VPS11、VPS18 和 VPS39 的可溶性表达,成功纯化出重组蛋白。本试验构建的重组质粒带有 GST 和 His 两种标签,GST-tag 约为 26 kDa,其能够增加重组蛋白的可溶性,提高其稳定性并且保留抗原性和生物活性^[21-22]。同样 GST-tag 也有相应的缺点,分子量较大可能影响蛋白质的功能^[23]。His-tag 通常是由 6-10 个组氨酸残基组成,约 0.84 kDa。His-tag 作为蛋白纯化的标签不会影响蛋白质的可溶性及生物学功能,免疫原性较低,用这种方式纯化的蛋白可以直接注入动物体内制备抗体,并且能够与其他亲和标签一起组成双亲和标签利于蛋白表达^[24]。NusA 是

一个分子量约 55 kDa 的蛋白标签, 由于其自身的可溶性很高, 因此作为融合标签与目的蛋白结合后可以提高目标蛋白的稳定性及可溶性^[25]。并且有研究表明, NusA 还有利于促进重组蛋白的正确折叠, 提高蛋白的表达量^[26]。由于 GST、NusA 这两种融合标签的分子量较大, 而本试验纯化的 6 种重组蛋白相对分子质量大多超过 90 kDa, 所以利用 TEV 蛋白酶去除重组蛋白的 GST 或 NusA 融合标签, 从而消除亲和标签对蛋白结构及生物学功能的影响。

综上所述, 本研究利用 pGEX 4T-1-GST 和 pET-His-NusA 载体成功构建出组成人 HOPS 复合体的 6 种重组质粒, 转化至 *E. coli* BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导在原核系统中正确表达, 并且采用谷胱甘肽琼脂糖树脂与镍柱两种亲和纯化方法获得 VPS11、VPS16、VPS18、VPS33、VPS39 和 VPS41 这 6 种重组蛋白, GST pull-down 试验证实 HOPS 复合体与定位在自噬体上的 STX17 蛋白在体外具有直接的相互作用。前面已介绍到自噬体与溶酶体融合过程中, 自噬体上的 STX17 及 SNAP29 会首先形成二元复合体, 继而与溶酶体上的 VAMP8 形成三元复合体促进膜融合。因此我们猜想 HOPS 复合体是否与 SNARE 蛋白 STX17-SNAP29 二元复合体或 STX17-SNAP29-VAMP8 三元复合体也存在直接相互作用, 从而促进这一膜融合过程。后续将继续采用 GST pull-down 技术来探究 HOPS 复合体与 SNARE 蛋白不同复合体的体外相互作用关系, 阐明 HOPS 复合体作为融合因子在膜融合过程中的作用机制。

REFERENCES

- [1] Bröcker C, Kuhlee A, Gatsogiannis C, et al. Molecular architecture of the multisubunit homotypic fusion and vacuole protein sorting (HOPS) tethering complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(6): 1991–1996.
- [2] Yang T. RILP interacts with HOPs complex via VPS41 subunit to regulate endocytic trafficking[D]. Xiamen:

Xiamen University, 2012 (in Chinese).

杨婷. RILP 通过与 HOPs 复合体 VPS41 亚基相互作用调控胞吞途径[D]. 厦门: 厦门大学, 2012.

- [3] Stroupe C, Collins KM, Fratti RA, et al. Purification of active HOPS complex reveals its affinities for phosphoinositides and the SNARE Vam7p. *EMBO J*, 2006, 25(8): 1579–1589.
- [4] Hu WQ, Lin ZX, Chen LL, et al. Function of HOPS complex proteins in autophagy process. *Chin J Cell Biol*, 2011, 33(8): 855–860 (in Chinese).
胡晚秋, 林志祥, 陈丽莲, 等. HOPS 复合体蛋白在细胞自噬过程中的功能研究. *中国细胞生物学学报*, 2011, 33(8): 855–860.
- [5] Balderhaar HJK, Ungermann C. CORVET and HOPS tethering complexes-coordinators of endosome and lysosome fusion. *J Cell Sci*, 2013, 126: 1307–1316.
- [6] Nickerson DP, Brett CL, Merz AJ. Vps-C complexes: gatekeepers of endolysosomal traffic. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21(4): 543–551.
- [7] Yang ZF, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(9): 814–822.
- [8] Huang J, Brumell JH. Bacteria-autophagy interplay: a battle for survival. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12(2): 101–114.
- [9] Hong WJ. SNAREs and traffic. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1744(2): 120–144.
- [10] Itakura E, Mizushima N. Syntaxin 17: the autophagosomal SNARE. *Autophagy*, 2013, 9(6): 917–919.
- [11] Jiang PD, Nishimura T, Sakamaki Y, et al. The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Mol Biol Cell*, 2014, 25(8): 1327–1337.
- [12] Cheng XW, Ma XL, Ding XM, et al. Pacer mediates the function of class III PI3K and HOPS complexes in autophagosome maturation by engaging Stx17. *Mol Cell*, 2017, 65(6): 1029–1043.e5.
- [13] Zhi XY, Feng WZ, Rong YG, et al. Anatomy of autophagy: from the beginning to the end. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(5): 815–831.
- [14] Cadwell K. Crosstalk between autophagy and

- inflammatory signalling pathways: balancing defence and homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16(11): 661–675.
- [15] Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(12): 961–967.
- [16] Xu CM, Wang ZJ, Wang M, et al. The study on autophagy induced by pseudorabies virus in PK-15 cells (PRV). *J Nanjing Agric Univ*, 2018, 41(4): 701–707 (in Chinese).
许长萌, 王志建, 王咪, 等. 猪伪狂犬病毒引起 PK-15 细胞自噬的研究. *南京农业大学学报*, 2018, 41(4): 701–707.
- [17] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 2008, 451(7182): 1069–1075.
- [18] Huang R, Xu XJ, Liang YC, et al. The expression, purification and characterization of human His-ATG4B protein. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2015, 31(2): 173–176 (in Chinese).
黄蓉, 徐小洁, 梁迎春, 等. 人 ATG4B 的表达及蛋白纯化和鉴定. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31(2): 173–176.
- [19] Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*, 2012, 151(6): 1256–1269.
- [20] Liu R, Zhi XY, Zhong Q. ATG14 controls SNARE-mediated autophagosome fusion with a lysosome. *Autophagy*, 2015, 11(5): 847–849.
- [21] McTigue MA, Williams DR, Tainer JA. Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from *Schistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. *J Mol Biol*, 1995, 246(1): 21–27.
- [22] Schäfer F, Seip N, Maertens B, et al. Purification of GST-tagged proteins. *Methods Enzymol*, 2015, 559: 127–139.
- [23] Wissmueller S, Font J, Liew CW, et al. Protein-protein interactions: analysis of a false positive GST pulldown result. *Proteins*, 2011, 79(8): 2365–2371.
- [24] Zakalskiy AE, Zakalska OM, Rzhetskiy YA, et al. Overexpression of (His)₆-tagged human arginase I in *Saccharomyces cerevisiae* and enzyme purification using metal affinity chromatography. *Protein Express Purif*, 2012, 81(1): 63–68.
- [25] Marco VD, Stier G, Blandin S, et al. The solubility and stability of recombinant proteins are increased by their fusion to NusA. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 322(3): 766–771.
- [26] Nallamsetty S, Waugh DS. Solubility-enhancing proteins MBP and NusA play a passive role in the folding of their fusion partners. *Protein Express Purif*, 2006, 45(1): 175–182.

(本文责编 陈宏宇)