

蓝细菌分离 DnaE 内含肽的自我剪接研究

魏新元^a, 丑敏霞^b, 闻盼盼^a, 刘东斌^a

(西北农林科技大学 a. 食品科学与工程学院, b. 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**证实蓝细菌 *Anabaena* sp. PCC 7120 复制酶中分离的 DnaE 内含肽的自我剪接活性。**【方法】**分别将 *Anabaena* PCC 7120 中分离的 2 个 *dnaE* 基因的部分序列克隆到表达载体上, 获得重组表达质粒, 经超量表达和纯化后, 免疫家兔获得相应的抗体; 同时, 两段分离的 *dnaE* 序列被克隆到同一表达载体, 构建双重组表达质粒, 两段序列具有各自的 ORF, 但由同一启动子调控。双重组表达质粒经诱导之后, 利用以上获得的抗体对含有内含肽的 DnaE 蛋白在大肠杆菌表达体系中的自我剪接反应进行检测。**【结果】**在双重组表达质粒的表达产物中, 抗体不仅可以分别与对应的蛋白质反应, 而且还可以同时识别 1 条新条带, 该条带的表观分子量与成熟 DnaE 的理论值大致相符。**【结论】**蓝细菌分离的 DnaE 内含肽在大肠杆菌表达体系中可以进行自我剪接; 本研究获得的抗体具有较好的特异性, 无明显背景干扰, 而且效价高, 抗体可以稀释 1 000 倍以上使用, 也可以用于相关方面的研究。

[关键词] DnaE 内含肽; 重组表达质粒; 自我剪接; 蓝细菌

[中图分类号] Q503

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)02-0160-05

Study on self-splicing of split intein of the DNA polymerase DnaE in cyanobacteria

WEI Xin-yuan^a, CHOU Min-xia^b, WEN Pan-pan^a, LIU Dong-bin^a

(a. College of Food Science and Engineering, b. College of Life Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The double recombinant expression plasmid was cloned to determine the self-splicing activity of split inteins located in split DnaE of cyanobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120. **【Method】** The corresponding antiserum against the two split DnaE precursor proteins were collected by injecting rabbits with purified proteins after over-expression from reconstructing recombinant expressing plasmid in *Escherichia coli*. In heterogeous *E. coli*, the antibodies were available to test the self-splicing of split DnaEs. **【Result】** Results showed that both precursor proteins and mature proteins were detected in *E. coli* and antibodies could only react with their corresponding proteins. **【Conclusion】** The results suggested that trans-splicing existed between the split DnaEs which contain the split inteins. The antibodies were specific without obvious background disturbance and had high effect with applied concentration low to 1/1 000, so it could be used in related research.

Key words: DnaE intein; recombinant expressing plasmid; self splicing; cyanobacterium

内含肽(Intein)是宿主蛋白质中的一段插入序列, 其对应的编码序列嵌合于宿主蛋白基因中, 随着宿主蛋白基因同时进行转录和翻译, 当蛋白质前体生成后, 内含肽通过蛋白质的自我剪接作用从宿主

蛋白质中被准确地去除, 而内含肽两侧被称为外显肽(Extein)的宿主蛋白通过肽键连接起来, 形成成熟的功能性蛋白质^[1-2]。

内含肽最早于 1990 被发现和报道, 在 1993 年,

* [收稿日期] 2008-03-31

[基金项目] 西北农林科技大学人才基金项目

[作者简介] 魏新元(1971—), 男, 湖北天门人, 讲师, 博士, 主要从事微生物学和分子生物学研究。E-mail: wheixinyuan@126.com

新英格兰生物学实验室的科学家们最先构建了其体外剪接体系^[3],该体系的构建极大地推动了内含肽自我剪接机制的研究和应用。

内含肽一般根据其是否含有自我剪接结构域和核酸内切酶结构域,分为大内含肽和小内含肽^[4]。根据存在形式,内含肽又可分为整体内含肽和分离内含肽,整体内含肽通过顺式剪接作用切除^[4-5];分离内含肽则通过反式剪接作用切除并形成功能蛋白质,天然的分离内含肽最早从 *Synechocystis* sp. PCC 6803 中发现^[6],并且得到广泛研究,这进一步推动了内含肽在生物技术领域的应用^[5,7-8]。

Anabaena sp. PCC 7120 是一种丝状蓝细菌,当环境中缺乏化合态氮源时,有 5%~10% 的细胞能分化形成异形胞^[9]。异形胞是一种末端分化的细胞,其主要功能是进行生物固氮,为营养细胞提供氮源;同时营养细胞也将生成的碳水化合物提供给异形胞,两者互相依存^[9-10],它是当前研究原核生物细胞分化的模式生物之一。基因组学分析发现,*Anabaena* PCC 7120 含有 4 个内含肽成分,分别位于 DnaE (All3578 和 Alr1054)、DnaB (All0578) 和 NrdJ (All4035) 中,其中 DnaE 内含肽以分离状态存在,并分别位于相对的 2 条 DNA 链上,这是首次从具有异形胞分化的原核生物中发现分离内含肽的存在(<http://www.kazusa.or.jp>)。本研究将具有异形胞分化的 *Anabaena* PCC 7120 分离的 2 个 *dnaE* 基因部分片段,分别构建了重组表达载体,诱导表达蛋白,并免疫家兔,获得了它们的抗体,进而在大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达体系中对 DnaE 内含肽的反式剪接作用进行了检测,以期了解 *Anabaena* PCC 7120 的 DnaE 内含肽的自我剪接反应能力。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 *Anabaena* sp. PCC 7120,野生型丝状蓝细菌,可分化异形胞;*Escherichia coli* TG1,常规克隆宿主,无甲基化作用;*Escherichia coli* BL21(DE3),表达宿主,均为华中农业大学农业微生物学国家重点实验室惠赠。通常蓝细菌在 28~30 ℃、120 r/min 连续光照(40 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$)条件下培养^[11];大肠杆菌于 37 ℃、在 LB 培养基中培养,如果使用氨苄青霉素(ampicillin, Amp),其终质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.1.2 质粒 pBluescript SK-,常规克隆载体,含 LacZ 启动子,氨苄青霉素抗性(ampicillin resist-

ance, Amp^r);pET15b,表达载体, Amp^r,均为华中农业大学农业微生物学国家重点实验室惠赠。p15ENI'和 p15ECI',均为重组表达质粒,本试验中构建;p15ENI'-CI',双重组表达质粒,本试验中构建。

1.1.3 生化试剂 PCR 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成;限制性核酸内切酶购自 NEB 或大连 TaKaRa 公司;高保真的 DNA 聚合酶 *Probest* 购自大连 TaKaRa 公司;T₄ DNA 连接酶购自 Promage 和 TaKaRa 公司;DNA 回收试剂盒购自 QIAGEN 及 Omega 公司;HisTrap 蛋白质亲和层析柱购自 Amersham 公司;氯化钠、氯化钙、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺和甘氨酸等化学试剂,均为进口产品或国产分析纯产品。

1.2 试验方法

1.2.1 表达质粒的构建 为了获得足量免疫家兔的蛋白质,构建了重组表达质粒 p15ENI'和 p15ECI',同时还构建了双重组表达质粒 p15ENI'-CI',用于大肠杆菌中蛋白质的剪接试验。构建过程中使用常规克隆载体 pBluescript SK-、表达载体 pET15b 和常规克隆宿主 *E. coli* TG1,具体操作参考文献[12]进行。

1.2.2 不同 DnaE 多肽的表达 用 pET15b 为载体构建的重组表达质粒 p15ENI'、p15ECI'和双重组表达质粒 p15ENI'-CI',分别转化表达宿主 *E. coli* BL21 后,在 37 ℃、180 r/min 条件下,以 1 mmol/L IPTG (isopropyl β -D-thiogalactoside) 诱导 DnaENI'和 DnaECI'的超量表达。

1.2.3 蛋白质的纯化 *E. coli* 中大量表达的蛋白质 DnaENI'和 DnaECI'带有 His-Tag,可以使用 HisTrap 蛋白质亲和层析柱进行纯化。

1.2.4 抗血清的制备 用纯化的 DnaENI'和 DnaECI'蛋白背部皮下多点注射家兔,每兔每次的剂量为 300~400 μg ,进行 1 次基础免疫和 2 次或更多次加强免疫。当抗血清效价超过 1/1 000 时,对家兔采取心脏放血,获取大量的抗血清,参考文献[12]进行收集和保存。

1.2.5 免疫杂交 蛋白质提取物经过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后,转移到硝酸纤维素膜(NC 膜)上,然后依次与对应的一抗(1.2.4 试验中获得)、二抗(羊抗兔抗血清)反应,最后用 ECL (Enhanced Chemiluminescence) 试剂盒检测杂交结果,具体操作参考文献[12]进行。

2 结果与分析

2.1 DnaE 的生物信息学分析

通过对 *Anabaena* PCC 7120 基因组进行分析发现,DnaE 由 2 个 ORF 所编码,并且分别位于其染色体 2 条相对的核苷酸链上,被约 3.1 Mbp(整个基因组全长约 6.4 Mbp)的序列隔开,序列比对显示,

每个 ORF 对应的多肽分别与 *E. coli* 的 DnaE 蛋白两端序列高度同源。这 2 个分离多肽中含有分离的蛋白内含肽,分别位于各多肽的两端,*Anabaena* PCC 7120 的 DnaE 蛋白的两部分 DnaEN 和 DnaEC 被翻译之后,经过内含肽的剪接作用,形成成熟的 DnaE,如图 1 所示。

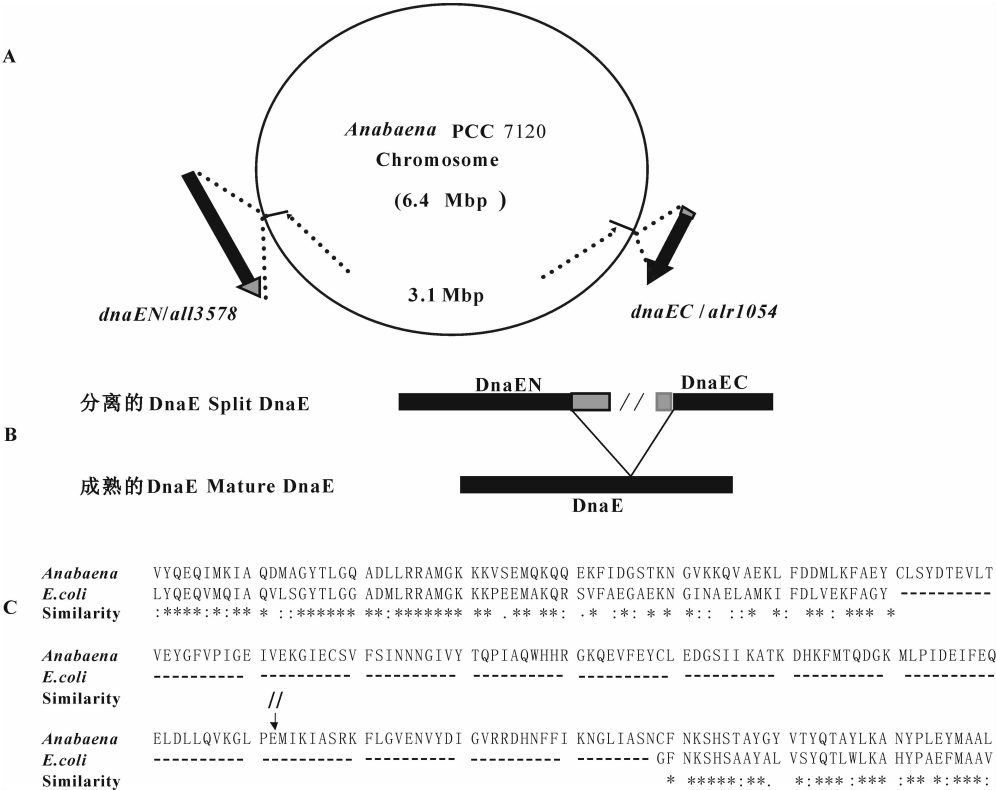


图 1 *Anabaena* PCC 7120 中 *dnaE*/DnaE 的结构

A. 分离的 *dnaE* 在 *Anabaena* PCC 7120 基因组上的位置;B. *Anabaena* PCC 7120 的 DnaE 形成;C. *Anabaena* PCC 7120 和大肠杆菌的 DnaE 部分序列的比对;A 和 B 部分中,灰色表示内含肽,黑色表示外显肽;B 和 C 部分中,“//”表示蛋白质分离点;C 部分中的“*”表示氨基酸完全一样,“.”表示氨基酸性质相似,“:”表示氨基酸性质非常相似

Fig. 1 Structure of *dnaE* or DnaE in *Anabaena* PCC 7120

A. Distribution of split *dnaE* of *Anabaena* PCC 7120;B. The formation of DnaE of *Anabaena* PCC 7120;C. The sequence alignment of partial DnaE of *Anabaena* PCC 7120 and *E. coli*. ;In panel A and B, grey bar and black bar indicate intein and extein respectively;“//” represent split spot of DnaEN and DnaEC in panel B and C;For panel C, the “*”,“.” and “:”, respectively, indicate amino acids identity, similarity, and high similarity between the sequences of *Anabaena* PCC 7120 and *E. coli*.

2.2 表达质粒的构建

重组表达质粒 p15ENI’与 p15ECI’及双重组表达质粒 p15ENI’-CI’的构建如图 2 所示。

2.2.1 重组表达质粒 p15ENI’和 p15ECI’的构建

将 *Anabaena* PCC 7120 中含有内含肽的 DnaE 氨基端多肽 All3578 的末尾部分编码序列(命名为 *dnaENI*’,长 1 110 bp,引物中引入限制性内切酶位点,其中上游引物及酶切位点为 5’-CTT CTG CAG CAT ATG GCG ATG CGA ATC GAA 和 *Pst* I、

Nde I;下游引物及其酶切位点为 5’-CTT GGA TCC GAG CTC TTA CTC TGG TAA ACC CTTC 和 *Bam*H I、*Sac* I),与含有内含肽的 DnaE 羧基端 Alr1054 的整个编码序列(命名为 *dnaECI*’,长 1 353 bp,引物中引入限制性内切酶位点,其中上游引物与酶切位点为 5’-CTT CTG CAG CAT ATG ATT AAA ATA GCA AGC 和 *Pst* I、*Nde* I;下游则为 5’-CTT GGA TCC TCA CGA ACC ACC AAT CAG 和 *Bam*H I),以其总 DNA 为模板,使

用高保真的 DNA 聚合酶 *Probest*,通过 PCR 获得扩增产物。PCR 产物经过限制性内切酶 *Nde* I 和 *Bam*H I 进行双酶切后,连接到经相同内切酶处理的表达载体 pET15b 中(Invitrogen),获得重组表达

质粒,分别命名为 p15ENI'和 p15ECI'(图 2)。插入序列被测序证实,在插入序列之前都分别含有 HisTag、核糖体结合位点和 T7 启动子序列,插入序列还含有自己的终止子。

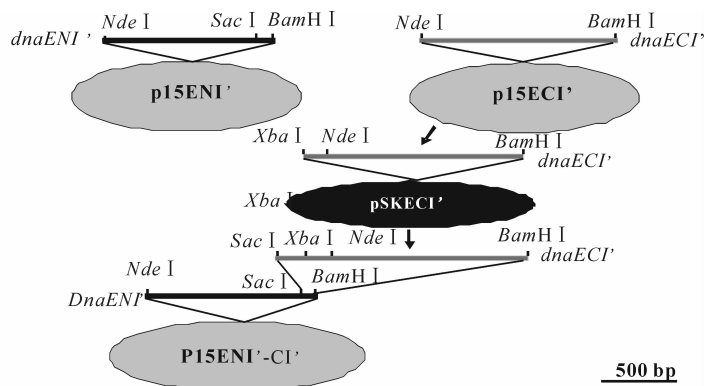


图 2 表达质粒 p15ENI'、p15ECI'和 p15ENI'-CI'的分子构建

Fig. 2 Molecular construction of expression plasmids:p15ENI',p15ECI' and p15ENI'-CI'

2.2.2 双重重组表达质粒 p15ENI'-CI'的构建 为了将 *dnaENI'*和 *dnaECI'*人为地构建在同一个操纵子内,先用 *Xba* I 和 *Bam*H I 将含有 *dnaECI'*的片段从 p15ECI'上剪切下来,插入到以相同内切酶处理的 pBluescript SK-中,获得重组质粒,命名为 pSKECI',然后将重组质粒用 pSKECI'以 *Sac* I 和 *Bam*H I 进行酶切,将含有 *dnaECI'*的核苷酸序列连接到 p15ENI'中的 *Sac* I 和 *Bam*H I 位点之间,得到含有 2 个基因片段的双重重组表达质粒,命名为 p15ENI'-CI'(图 2)。在该表达质粒中,*dnaENI'*和 *dnaECI'*含有各自的终止子、HisTag 和核糖体结合位点,但是 2 个基因由同一个 T7 启动子调控。

2.3 重组表达质粒的诱导表达

为了获得高水平表达的 DnaENI'和 DnaECI',重组表达质粒 p15ENI'和 p15ECI'被分别转化到 *E. coli* BL21 中(在该菌株中,IPTG 可以诱导 T7 RNA 聚合酶的表达),以终浓度为 1 mmol/L IPTG 进行诱导^[13],以含有空载体 pET15b 质粒的诱导产物为对照。细胞裂解物经过 SDS-PAGE,然后进行考马斯亮蓝染色分析,结果见图 3。由图 3 可见,2 个融合蛋白被诱导后可以在 *E. coli* 中超量表达,DnaENI'和 DnaECI'的表观分子量分别对应于它们的期望值 42 000 和 50 000 u。使用 HisTrap 蛋白质亲和和层析柱对其进行纯化,然后免疫家兔以获取抗体。

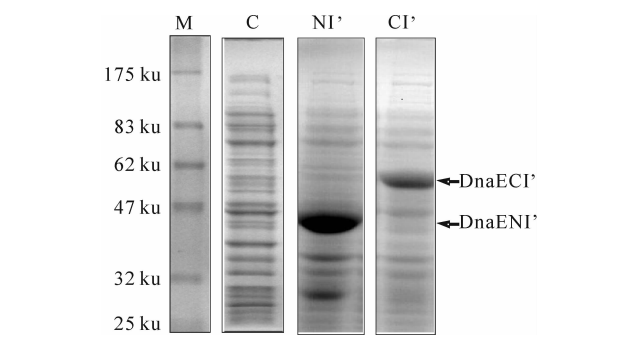


图 3 重组表达质粒诱导表达后的 SDS-PAGE 分析 C、NI'和 CI'。pET15b、p15ENI'和 p15ECI'转化 *E. coli* BL21,IPTG 诱导的细胞裂解物;M: 蛋白质标记

Fig. 3 SDS-PAGE of lysate of over-expressed recombinant plasmids in *E. coli*

SDS-PAGE followed by Coomassie brilliant blue staining. The three plasmids,pET15b (C,for control without insert),p15ENI'(NI') and p15ECI'(CI'),were transformed into *E. coli* BL21 and induced by adding IPTG;M: Protein molecular weight Marker

2.4 DnaE 内含肽在大肠杆菌中的反式剪接

双重重组表达质粒 p15ENI'-CI'被用来检测分离的 DnaE 内含肽在 *E. coli* 中的反式剪接作用。以 IPTG 对 p15ENI'-CI'和 pET15b 的 *E. coli* BL21 转化子进行诱导,细胞裂解液经过 SDS-PAGE 分离,考马斯亮蓝染色显示,双重重组表达质粒转化子生成超量表达产物(图 4-A)。然后将表达产物裂解液和纯化的 DnaENI'、DnaECI'多肽电泳分离后转移到 NC 膜上,分别以 DnaENI'和 DnaECI'抗体进行检测,结果显示,抽提物中存在有共同的条带 N'-

C',表观分子量与期望值相当,为 76 000 u;同时,也检测到了与对照分子大小一致的条带 NI'和 CI',如图 4-B 和 4-C;但未检测到去掉内含肽部分的外显肽 DnaEN'和 DnaEC'。

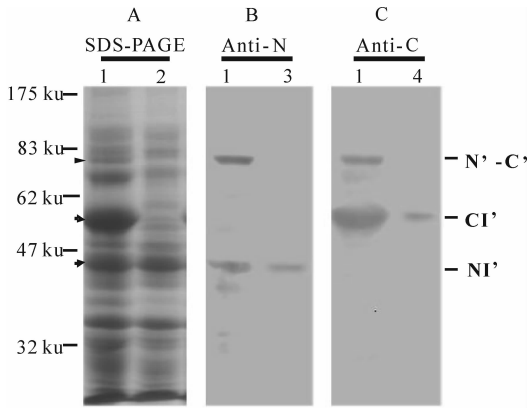


图 4 DnaE 在大肠杆菌中的反式剪接

A. p15ENI'-CI'(泳道 1)和 pET15b(泳道 2)的 *E. coli* BL21 转化子经 IPTG 诱导,蛋白质抽提物在 SDS-PAGE 后,用考马斯亮蓝染色;
B 和 C. p15ENI'-CI'的 *E. coli* BL21 转化子细胞抽提物、纯化的 DnaENI'(泳道 3)和 DnaECI'(泳道 4)转移到硝酸纤维素滤膜上,然后与 DnaENI'(B 部分)和 DnaECI'(C 部分)抗体进行反应;M. 蛋白质标记

Fig. 4 Trans-splicing of DnaE in *E. coli*

A. Protein expression,transformed with plasmid p15ENI'-CI' (lane 1) and pET15b (lane 2) into *E. coli* BL21,was incubated by IPTG, after separation by SDS-PAGE,proteins were revealed by Coomassie brilliant blue staining;B,C. Cell extracts of *E. coli* BL21 transformed with plasmid p15ENI'-CI' and purified DnaENI' (lane 3) and DnaECI' (lane 4) were transferred onto NC membrane and incubated with antibodies against either DnaENI' (anti-N, panel B) or DnaECI' (anti-C,panel C);M. Protein Marker

3 结论与讨论

蓝细菌 *Anabaena* PCC 7120 的 2 段 *dnaE* 构建的双重组表达质粒,在 *E. coli* 体系的试验中能形成成熟的蛋白质 N'-C',说明内含肽在细胞中能进行自我剪接。在大肠杆菌表达体系中,还能检测到 DnaENI'和 DnaECI',说明剪接反应不完全,这可能是因为表达体系的生理条件不同于其宿主蓝细菌造成的。由于双重组表达质粒 p15ENI'-CI'中的插入片段 *dnaENI'*和 *dnaECI'*各自拥有自己的终止子,所以它们的表达产物最初以分离状态存在,所带内含肽也同样以分离状态存在,因此,其在大肠杆菌体系中的自我剪接反应属于反式剪接。

Anabaena PCC 7120 的异形胞是一种末端分化的细胞,其细胞周期,包括细胞分裂周期和 DNA 复制周期,一直被认为也是停止的^[10,14]。DnaE 对于

细胞进行正常的生长繁殖是至关重要的^[15]。本研究中 DnaENI'和 DnaECI'抗体的免疫杂交结果显示,2 种抗体均具有很好的特异性,可以稀释 1 000 倍使用,而且背景少,可以利用它们来研究 *Anabaena* PCC 7120 异形胞发育和 DNA 复制之间的关系,也可以用于该内含肽其他方面的研究。

[参考文献]

[1] Cooper A A,Stevens T H. Protein splicing;self-splicing of genetically mobile elements at the protein level [J]. Trends Biochem Sci,1995,20:351-356.
[2] Perler F B,Davis E O,Dean G E, et al. Protein splicing elements:inteins and exteins-a definition of terms and recommended nomenclature [J]. Nucleic Acids Res,1994,22:1125-1127.
[3] Xu M,Southworth M W,Mersha F B, et al. *In vitro* protein splicing of purified precursor and the identification of a branched intermediate [J]. Cell,1993,75:1371-1377.
[4] Liu X Q. Protein splicing inteins:Genetic mobility,origin and evolution [J]. Ann Rev Genet,2000,34:61-76.
[5] Paulus H. Protein splicing and related forms of protein auto-processing [J]. Ann Rev Biochem,2000,69:447-496.
[6] Wu H,Hu Z,Liu X Q. Protein trans-splicing by a split intein encoded in a split DnaE gene of *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. Proc Natl Acad Sci,USA,1998,95:9226-9231.
[7] Gogarten J P,Senejani A G,Zhaxybayeva O, et al. Inteins: Structure, function, and evolution[J]. Annu Rev Microbiol, 2002,56:263-287.
[8] Noren C J,Wang J,Perler F B. Dissecting the chemistry of protein splicing and its applications [J]. Angew Chem Int Ed, 2000,39:450-466.
[9] Wolk C P,Ernst A,Elhai J. Heterocyst metabolism and development [M]//Bryant. Mol Biol Cyanobacteria. Dordrecht, Nether Lands;Kluwer Academic Publishers,1994:769-823.
[10] Golden J W,Yoon H S. Heterocyst development in *Anabaena* [J]. Curr Opin Microbiol,2003,6:557-563.
[11] Zhang C C. A gene encoding a protein related to eukaryotic-type protein kinases from the filamentous heterocystous cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120 [J]. Proc Natl Acad Sci, USA,1993,90:11840-11844.
[12] Sambrook J,Fritsch E F,Maniatis T. Molecular clone:A laboratory manual [M]. 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1992.
[13] Studier F W,Rosenberg A H,Dunn J J, et al. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes [J]. Meth Enzymol,1990,185:60-89.
[14] Adams D G. Heterocyst formation in cyanobacteria [J]. Curr Opin Microbiol,2000,3:618-624.
[15] Messer W,Weigel C. Initiation of chromosome replication[C]// Neidhardt F C,Ingraham J L,Low K B, et al. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. 2nd ed. Washington D C:American Society for Microbiology,1996:1579-1601.