

牛痘病毒拓扑异构酶 I 的原核表达与纯化

文征宇, 侯文韬, 杨龙雨, 陈 鹏

(西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】【目的】建立牛痘病毒拓扑异构酶 I (Vaccinia topoisomerase I) 的原核表达体系及纯化方法, 以获得高活性、高纯度的牛痘病毒拓扑异构酶 I。【方法】优化并人工合成牛痘病毒拓扑异构酶 I 的全基因序列, 构建牛痘病毒拓扑异构酶 I 的原核表达载体(pET28a/TOPO)并转化 *E. coli* BL21 Star(DE3) 菌株, 优化其诱导表达条件, 表达蛋白经 Talon his-tag purification resin 螯合层析柱纯化, 用 SDS-PAGE 鉴定纯化效果, 借助酶切质粒 pLLP-OmpA 检测纯化蛋白的活性。【结果】转化 pET28a/TOPO 的 *E. coli* BL21 Star(DE3) 特异地表达了牛痘病毒拓扑异构酶 I 蛋白, 最佳诱导条件为 30 °C 下以 0.5 mmol/L IPTG 诱导 12 h。该蛋白经钴离子螯合层析柱纯化后, SDS-PAGE 电泳结果显示其为分子质量 36 ku 的蛋白。酶切和冻融试验结果表明, 该酶具有高活性和高稳定性。【结论】成功构建了牛痘病毒拓扑异构酶 I 的原核表达和纯化体系, 为后续拓扑异构酶 I 的应用研究奠定了基础。

【关键词】 牛痘病毒拓扑异构酶 I; 原核表达; 蛋白纯化

【中图分类号】 Q558⁺.9

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)03-0049-05

Prokaryotic expression and purification of topoisomerase I of vaccinia virus

WEN Zheng-yu, HOU Wen-tao, YANG Long-yu, CHEN Peng

(College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The study was done to obtain high-purity and high-activity topoisomerase I from vaccinia virus by establishing the prokaryotic expressing and purification system. 【Method】 The sequence encoding Topoisomerase I optimized by the usage of the favourite codons in *E. coli* was synthesized and inserted to expression plasmid pET28a(+). The expression topoisomerase I was induced in *E. coli* BL21 Star(DE3) by IPTG. The protein was purified by Talon his-tag purification resin and characterised by SDS-PAGE to examine the purified protein. The activity of topoisomerase I was assayed by digestion of plasmid pLLP-OmpA as the substrate. 【Result】 The optimum conditions of expression were 30 °C, 0.5 mmol/L IPTG, 12 h. High yield and high purity of topoisomerase I was achieved by Co²⁺ affinity chromatography, the purified protein was assayed by SDS-PAGE and the result was one single band (with molecular weight of 36 ku). Activity analysis and freeze-thaw resistance analysis showed that the recombinant topoisomerase had high activity and high stability. 【Conclusion】 The prokaryotic expressing system and purification method were constructed and optimized successfully. These methods can be used in the further study of topoisomerase I.

Key words: vaccinia virus topoisomerase I; prokaryotic expression; protein purification

DNA 拓扑异构酶(DNA topoisomerase, Topo) 是一种重要的酶, 它通过催化 DNA 链的断裂和

* [收稿日期] 2010-08-12

[基金项目] 2008 年国家大学生创新性实验计划项目

[作者简介] 文征宇(1987-), 男, 辽宁沈阳人, 主要从事分子生物学研究。E-mail: alleniverson0708@sina.com

[通信作者] 陈 鹏(1972-), 男, 陕西富平人, 副教授, 博士, 主要从事蛋白质与酶研究。E-mail: pengchen@nwsuaf.edu.cn

连接而控制 DNA 的拓扑状态。该酶常参与 DNA 复制、转录、重组、基因调节及细胞有丝分裂等重要生命活动。DNA 拓扑异构酶分为拓扑异构酶 I (Topo I) 和拓扑异构酶 II (Topo II) 2 种。Topo I 的酪氨酸残基与 DNA 的 3' 末端以磷酸二酯键结合, 形成 Topo I-DNA 可裂解复合物^[1], 该复合物可以介导 DNA 单链断裂, 使超螺旋松弛, 然后再将已断裂的 DNA 连接起来; 而 Topo II 可同时断开 DNA 的两条链, 但反应过程需消耗 ATP^[2]。

有研究表明, 拓扑异构酶在肿瘤细胞中的表达量很高, 而且具有高活性, 所以研究拓扑异构酶及其抑制剂对于肿瘤治疗有着重要意义^[3-6]。拓扑异构酶还具有 DNA 的高连接活性, 对改造 DNA 连接技术有着重要意义^[7], 但目前国内的相关研究较少。在多种拓扑异构酶中, 牛痘病毒拓扑异构酶 I (Vaccinia topoisomerase I, V Topo I) 是目前已知的最简单、分子质量最小、唯一一种存在于病毒内的 I 型拓扑异构酶^[8], 其由 314 个氨基酸残基构成, 基因大小仅有 945 bp。基于以上特点, 本试验构建了牛痘病毒拓扑异构酶 I 的原核表达载体, 并对其诱导条件进行优化, 检测其酶活性, 探讨了冻融对酶活性的影响, 以期能制备大量高纯度的 Topo I, 为后续深入研究拓扑异构酶奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌菌株 TOP10、*E. coli* BL21 Star(DE3) 和质粒 pET28a(+), pLLP-OmpA, 为西北农林科技大学生命科学院酶学实验室保存; 限制性内切酶 *Xho* I 和 *Nco* I, 购自 TaKaRa 公司; Talon his-tag purification resin, 购自 Clontech 公司; 质粒抽提试剂盒, 为 Qiagen 公司产品; 胶回收试剂盒, 为上海捷瑞生物技术公司产品; 其余试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 牛痘病毒拓扑异构酶 I 编码序列的优化

从 NCBI 网站上查得牛痘病毒拓扑异构酶 I 的基因序列 (ID: 3707560), 根据大肠杆菌的密码子利用频率, 对牛痘病毒拓扑异构酶 I 的密码子进行优化, 在优化序列的两端引入 *Xho* I 和 *Nco* I 的酶切位点, 送南京金斯瑞生物科技有限公司进行全基因合成。

1.2.2 pET28a/TOPO 重组质粒的构建与鉴定

将牛痘病毒拓扑异构酶 I 全序列连接于克隆载体 pUC57 上, 转化 TOP10 菌株, 挑单克隆摇菌提取质

粒, 经 *Xho* I 和 *Nco* I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳切胶回收目的片段, 再克隆入经 *Xho* I 和 *Nco* I 双酶切的表达载体 pET28a(+), 构建表达载体 pET28a/TOPO。

1.2.3 牛痘病毒拓扑异构酶 I 的诱导表达与优化

用表达质粒 pET28a/TOPO 转化 *E. coli* BL21 Star(DE3) 感受态细胞, 阳性克隆接种于含卡那霉素 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养至 OD_{600} 为 0.3 时, 用终浓度为 0.5 和 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10 和 12 h 取样, 收集细胞进行电泳, 探索最佳表达时间。

1.2.4 牛痘病毒拓扑异构酶 I 的纯化

将过夜培养的菌液, 按体积比 1 : 100 接种, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD_{600} 为 0.3 时, 按优化的条件进行诱导, 离心收集菌体, 超声破碎细胞, 离心去除细胞碎片后, 取上清液用 Talon his-tag purification resin 进行分离纯化。用 150 mmol/L 咪唑洗脱, 洗脱样品经透析后进行 SDS-PAGE 电泳。蛋白纯化溶液均进行灭菌处理。

1.2.5 牛痘病毒拓扑异构酶 I 的活性检测

活性检测参考 Stewart^[9] 的方法进行。37 $^{\circ}\text{C}$ 下用牛痘病毒拓扑异构酶 I 酶切 pLLP-OmpA 质粒 (序列中有 1 个拓扑异构酶 I 识别位点) 30 min, 琼脂糖凝胶电泳检测质粒构象的变化。

1.2.6 冻融对重组拓扑异构酶 I 稳定性的影响

将经纯化的拓扑异构酶 I 分别冻融 1~7 次 (每次在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下冷冻 40 min, 20 $^{\circ}\text{C}$ 融化) 后, 检查其活性。

2 结果与分析

2.1 牛痘病毒拓扑异构酶 I 原核表达载体的构建

pET28a/TOPO 重组质粒经 *Xho* I 和 *Nco* I 双酶切鉴定, 出现了 2 条大小约为 1 kb (Topo I 片段) 和 5 kb (pET28a(+)) 载体的特异性条带 (图 1), 其中 1 kb 片段经测序与拓扑异构酶 I 基因序列相符, 表明载体构建成功。

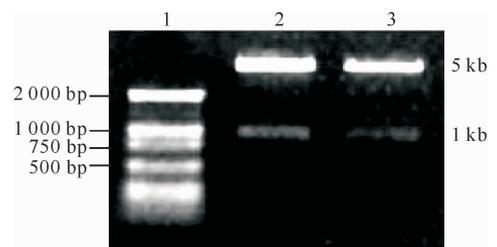


图 1 重组质粒 pET28a/TOPO 的双酶切鉴定
1. Marker DL2000; 2, 3. *Xho* I + *Nco* I 双酶切的重组质粒

Fig. 1 Double digestion identification of recombinant plasmid pET28a/TOPO

1. Marker DL2000; 2, 3. pET28a/TOPO digested by *Xho* I + *Nco* I

2.2 牛痘病毒拓扑异构酶 I 诱导表达条件的优化

将诱导表达的细胞加入 SDS-PAGE 上样缓冲液,沸水浴破碎细胞,经 SDS-PAGE 电泳检测,发现 IPTG 可诱导分子质量为 36 ku 蛋白的表达,其与拓

扑异构酶 I 的分子质量一致。IPTG 浓度为 0.5 和 1 mmol/L 都可以达到较理想的诱导量,且以 0.5 mmol/L IPTG 诱导表达量略高。诱导后 12 h 可以获得最高浓度蛋白(图 2)。

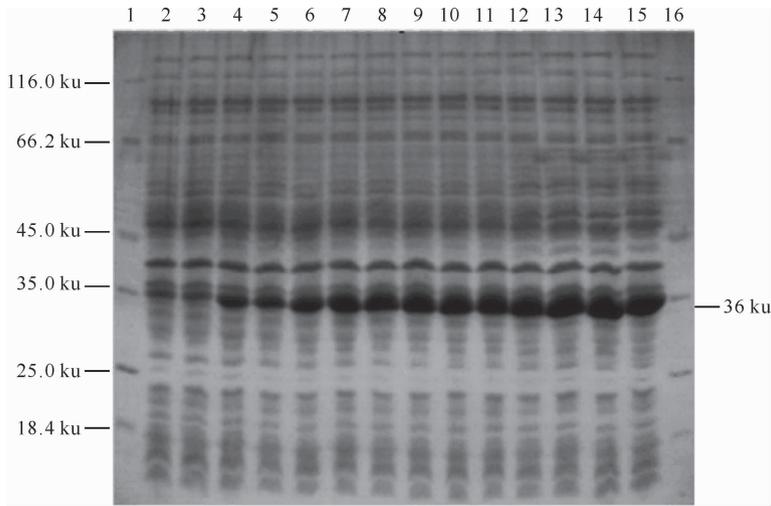


图 2 牛痘病毒拓扑异构酶 I 诱导表达及优化的 SDS-PAGE

1,16. 蛋白 Marker;2,3. IPTG 诱导前的 BL21Star/pET28a/TOPO;4~15. IPTG 分别诱导 2~12 h 的 BL21Star/pET28a/TOPO;
2,4,6,8,10,12,14. IPTG 浓度为 0.5 mmol/L;3,5,7,9,11,13,15. IPTG 浓度为 1 mmol/L

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of protein expression under different inducing durations and different concentrations of IPTG
1,16. Protein Marker;2,3. BL21Star/pET28a/TOPO before IPTG induction;4-15. BL21Star/pET28a/TOPO induced by
IPTG for 2-12 h;2,4,6,8,10,12,14. IPTG concentration was 0.5 mmol/L;3,5,7,9,11,13,15. IPTG concentration was 1 mmol/L

2.3 牛痘病毒拓扑异构酶 I 的纯化

经 Talon his-tag purification resin 金属离子螯合层析纯化,牛痘病毒拓扑异构酶 I 在 SDS-PAGE 凝胶上显示单一条带,分子质量为 36 ku(图 3)。

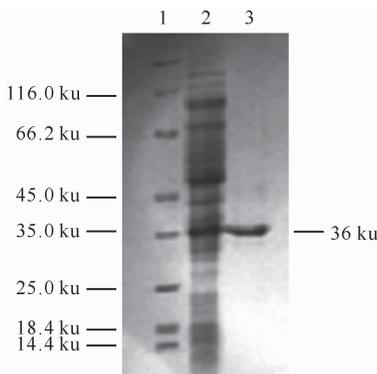


图 3 牛痘病毒拓扑异构酶 I 纯化的 SDS-PAGE

1. 蛋白 Marker;2. 纯化前总蛋白;

3. 经钴柱纯化的牛痘病毒拓扑异构酶 I

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified V TOPO I

1. Protein Marker;2. Total protein;3. Purified V TOPO I

2.4 牛痘病毒拓扑异构酶 I 活性的检测

酶切反应后发现,pLLP-OmpA 质粒的超螺旋结构被解旋,超螺旋条带消失,表明纯化后的牛痘病毒拓扑异构酶 I 具有切割活性(图 4)。

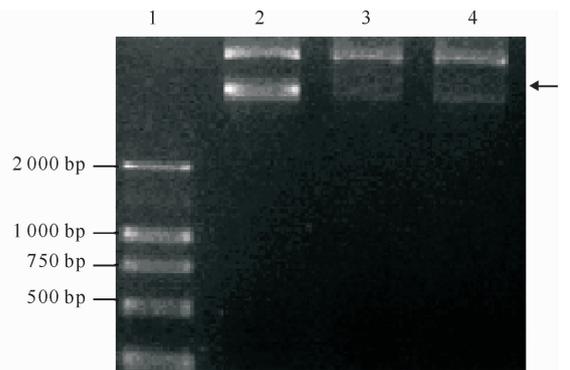


图 4 牛痘病毒拓扑异构酶 I 活性的 SDS-PAGE

1. Marker DL2000;2. 未被解旋的 pLLP-OmpA 质粒;

3,4. 被解旋的 pLLP-OmpA 质粒,超螺旋结构消失(箭头指示)

Fig. 4 Agarose electrophoresis patterns for enzymatic activity analysis of topoisomerase I

1. Marker DL2000;2. pLLP-OmpA without treatment;

3,4. Treated pLLP-OmpA,supercoiled plasmid

decreased(arrow indicated)

2.5 冻融对重组拓扑异构酶 I 稳定性的影响

图 5 显示,反复冻融对重组拓扑异构酶 I 活性无明显影响,其仍能使质粒 pLLP-OmpA 的超螺旋结构解旋,证明该酶具有良好的稳定性。

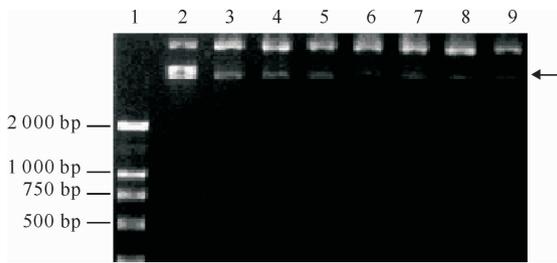


图 5 冻融对重组拓扑异构酶 I 稳定性影响的 SDS-PAGE

1. Marker DL2000; 2. 未被拓扑异构酶解旋的 pLLP-OmpA 质粒; 3~9. 被反复冻融 1~7 次的经拓扑异构酶解旋的 pLLP-OmpA 质粒,超螺旋结构消失(箭头指示)

Fig. 5 Agarose electrophoresis pattern for freeze-thaw resistance analysis of V TOPO I

1. Marker DL2000; 2. pLLP-OmpA without V TOPO I treatment; 3-9. pLLP-OmpA treated with V TOPO I after 1 to 7 times freeze-thawing cycles, supercoiled plasmid disappeared (arrow indicated)

3 讨论

DNA 拓扑异构酶是可以参与 DNA 复制、转录、重组、修复等细胞核内过程的基本酶之一。其中能切断 DNA 一条链而改变闭环状双链 DNA 拓扑结构的为 I 型拓扑异构酶。I 型拓扑异构酶能催化超螺旋 DNA 的切断与结合反应,使超螺旋的连环数发生松弛变化。拓扑异构酶可以调节核酸的结构动态,与肿瘤发生、发展以及治疗和预防等方面都有较密切的联系。研究表明,在肿瘤细胞中,拓扑异构酶的含量及活性远高于正常体细胞,因此抑制肿瘤细胞中拓扑异构酶的活性就可以抑制并杀死肿瘤细胞^[5]。目前,DNA 拓扑异构酶抑制剂主要有喜树碱类、吲哚并咪唑类、茚并异喹啉酮类^[10]以及喹诺酮类^[11]等,近几年的实践表明,以 DNA 拓扑异构酶作为靶酶设计的抗肿瘤药物对多种实体瘤活性很高,选择性较好,对于癌症化疗具有重要价值,已成为近年来的热点课题。而最近发现的拓扑异构酶抑制剂有 NK341^[12]、Santamarin^[13]和 Homocamptothecin、Gimatecan^[14]等。

牛痘病毒拓扑异构酶 I 是迄今发现的分子质量最小的 I 型酶,其可特异性地识别双链的 C(T)-CCTT 位点,并实现切割和重新连接。在催化过程

中,拓扑异构酶 I 的第 274 位酪氨酸残基的羟基与切割位点碱基的磷酸基团形成共价酯键,形成酶与 DNA 的复合物;切割形成的 5'羟基可与该复合物结合,催化 3',5'磷酸二酯键的再形成(催化过程需要的能量来自于酶与 DNA 分子间形成的酯键),从而实现 DNA 分子拓扑结构的改变。在体外环境条件下,当反应体系中存在外源含 5'羟基的 DNA 时,其同样可以利用复合物中储存的酯键能量催化 3',5'磷酸二酯键的形成,牛痘病毒拓扑异构酶 I 的这一特性可以用于 DNA 体外重组中外源 DNA 的连接反应,且反应体系中无需添加辅因子(如 ATP 等)。由于牛痘病毒拓扑异构酶 I 存在切割和连接活性动态平衡,因此本研究酶活性检测中的超螺旋状态质粒虽随着处理时间的延长而减少,但仍有残存。

本研究在优化牛痘病毒拓扑异构酶 I 基因的基础上,人工合成了该酶的编码区序列,克服了该基因 PCR 扩增模板不易获得的难题,优化的密码子也为其在大肠杆菌中高效表达提供了基础;用构建的表达载体 pET28a/TOPO 转化经 RNase E 突变的 *E. coli* BL21 Star(DE3),有利于提高转录形成 mRNA 的稳定性及该酶的表达水平。

牛痘病毒拓扑异构酶 I 的 C 端融合了有利于纯化的组氨酸标签,常规纯化一般选用镍螯合介质,但由于镍螯合介质的亲和力较强^[15],会与一些不含 His-Tag 的蛋白非特异性地结合,最终导致纯化产物中有杂蛋白残留^[16];同时金属镍离子也容易脱落漏出而混入蛋白溶液。本研究前期试验利用镍柱纯化时出现了类似的现象,因此采用 Clontech 公司的钴柱(Talon his-tag purification resin)进行蛋白纯化,获得了高纯度的牛痘病毒拓扑异构酶 I。

本研究结果表明,重组表达的牛痘病毒拓扑异构酶 I 可以高效地改变超螺旋质粒的拓扑结构。牛痘病毒拓扑异构酶 I 的高效表达为调控该酶的切割和连接活性及深入研究其催化特性、并将其用于连接反应奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Kent S, Sabine H, Frank G. Human topoisomerase I forms double cleavage complexes on natural DNA [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 349: 178-185.
- [2] James W. Molecular biology of the gene [M]. San Francisco, America: Benjamin Cummings, 2004: 121-125.
- [3] 莫晓媚,李静,耿美玉. DNA 拓扑异构酶与抗肿瘤 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23(1): 20-22.

- Mo X M, Li J, Geng M Y. DNA topoisomerase and antitumor [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2007, 23(1): 20-22. (in Chinese)
- [4] 张美荣, 薛华, 竺晓凡, 等. 急性淋巴细胞白血病患者 DNA 拓扑异构酶的表达及临床意义 [J]. 白血病·淋巴瘤, 2006, 15(2): 96-98.
Zhang M R, Xue H, Zhu X F, et al. The clinical significance of DNA topoisomerase expression in acute lymphoblastic leukemia [J]. Journal of Leukemia & Lymphoma, 2006, 15(2): 96-98. (in Chinese)
- [5] 张乃哲, 江平. DNA 拓扑异构酶: 肿瘤化疗的重要靶点 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2002, 10(2): 121-124.
Zhang N Z, Jiang P. DNA topoisomerase: the important target of chemotherapy of tumour [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2002, 10(2): 121-124. (in Chinese)
- [6] 凌莉莉. 拓扑异构酶 II 抑制剂抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. 哈尔滨医药, 2007, 27(6): 50-51.
Ling L L. Advances in the researches on antitumor effect of topoisomerase inhibitors and its mechanism [J]. Harbin Medical Journal, 2007, 27(6): 50-51. (in Chinese)
- [7] 孙明. 基因工程 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 139-140.
Sun M. Genetic engineering [M]. Beijing: Higher Education Press, 2006: 139-140. (in Chinese)
- [8] Stewart Shuman. Vaccinia virus DNA topoisomerase: a model eukaryotic type IB enzyme [J]. Biochemica et Biophysica Acta, 1998, 1400: 321-337.
- [9] Stewart Shuman. Characterization of vaccinia virus DNA topoisomerase I expressed in *Escherichia coli* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1988, 263(31): 16401-16407.
- [10] 刘潇, 王汝冰. 拓扑异构酶 I 抑制剂研究进展 [J]. 药学进展, 2009, 33(7): 311-320.
Liu X, Wang R B. Advances in the researches on topoisomerase I inhibitors [J]. Progress in Pharmaceutical Sciences, 2009, 33(7): 311-320. (in Chinese)
- [11] 冯连顺, 刘明亮, 郭慧元. 细菌拓扑异构酶抑制剂研究进展 [J]. 国外医药(抗生素分册), 2009, 30(1): 13-18.
Feng L S, Liu M L, Guo H Y. Advances in the researches on topoisomerase inhibitors of bacteria [J]. World Notes on Antibiotics, 2009, 30(1): 13-18. (in Chinese)
- [12] Takeshi O, Eriko T, Osamu M, et al. NK314, a novel topoisomerase II inhibitor, induces rapid DNA double-strand breaks and exhibits superior antitumor effects against tumors resistant to other topoisomerase II inhibitors [J]. Cancer Letters, 2008(259): 99-110.
- [13] 张雁丽, 杨益东, 李祖强, 等. Santamarin 的抗肿瘤活性及对 DNA 拓扑异构酶的影响 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23(10): 1370-1374.
Zhang Y L, Yang Y D, Li Z Q, et al. Antitumor activity of santamarin and its effect on topoisomerase [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2007, 23(10): 1370-1374. (in Chinese)
- [14] Beverly Teicher. Next generation topoisomerase I inhibitors: Rationale and biomarker strategies [J]. Biochemical Pharmacology, 2008(75): 1262-1271.
- [15] 王晓军, 范代娣. 4 种金属离子亲和层析纯化重组类人胶原蛋白的效果比较 [J]. 应用化工, 2009, 38(6): 857-860.
Wang X J, Fan D D. Comparison of purified recombinant human-like collagen by affinity chromatography with four metal ions [J]. Applied Chemical Industry, 2009, 38(6): 857-860. (in Chinese)
- [16] 李淑娟, 孙永亮. 金属螯合亲和层析介质用于六聚组氨酸融合蛋白的纯化研究 [J]. 生物工程学报, 2007, 23(5): 941-946.
Li S J, Sun Y L. Preparation of metal chelate affinity chromatographic medium and its application in the purification of 6× Histidine-tagged protein [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2007, 23(5): 941-946. (in Chinese)

(上接第 48 页)

- [5] Taponen S, Pyorala S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis- not so different from *Staphylococcus aureus*? [J]. Vet Microbiol 2009, 134(1/2): 29-36.
- [6] Klodzińska E, Szumski M, Hryniewicz K, et al. Differentiation of *Staphylococcus aureus* strains by CE, zeta potential and coagulase gene polymorphism [J]. Electrophoresis, 2009, 30(17): 3086-3091.
- [7] Meier P S, Entenza J M, Vaudaux P, et al. Study of *Staphylococcus aureus* pathogenic genes by transfer and expression in the less virulent organism *Streptococcus gordonii* [J]. Infection and Immunity, 2001, 69(2): 657-664.
- [8] Bjerketorp J, Jacobsson K, Frykberg L. The von Willebrand factor-binding protein (vWbp) of *Staphylococcus aureus* is a coagulase [J]. FEMS Microbiol Lett, 2004, 234: 309-314.
- [9] Watanabe S, Ito T, Takeuchi F, et al. Structural comparison of ten serotypes of staphylocoagulases in *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(11): 3698-3707.