



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20150071

热休克蛋白质 DnaK 的纯化及其二聚体性质研究

刘清岱^{1,2}, 苏家跃¹, 田雪利¹, 杨莹¹, 赵飞^{1,2}, 盛长忠^{1,3}

(1. 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457; 2. 天津天隆种业科技有限公司, 天津 300457;
3. 丹娜(天津)生物科技有限公司, 天津 300457)

摘要: 通过定点突变技术构建了两个 DnaK 蛋白质突变体, 研究腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)和腺苷二磷酸(ADP)条件对热休克蛋白质 DnaK 二聚体性质的影响. 首先诱导表达 DnaK 蛋白质的两个突变体 DnaK-A303C 和 DnaK-H541C, 并采用硫酸镍亲和层析和阴离子交换层析对重组蛋白质进行纯化. 对等量的 DnaK 蛋白质进行氧化交联处理, 然后采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测 ATP、ADP 对 DnaK 二聚体的影响. 研究表明 DnaK 突变体在 ADP 的存在下以同二聚体的形式存在, 但是在 ATP 条件下能够形成异二聚体. 由此为深入认识热休克蛋白质两个亚基之间的协同作用提供了实验依据.

关键词: DnaK; ATP; 二聚体; 突变体

中图分类号: TS201

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2016)03-0011-05

Purification of DnaK Mutants and the Characteristics of DnaK Dimer

LIU Qingdai^{1,2}, SU Jiayue¹, TIAN Xueli¹, YANG Ying¹, ZHAO Fei^{1,2}, SHENG Changzhong^{1,3}

(1. College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;
2. Tianjin Tianlong Seeds Science and Technology Co., Ltd, Tianjin 300457, China;
3. Dynamiker Biotechnology (Tianjin) Co., Ltd, Tianjin 300457, China)

Abstract: Two DnaK mutants were constructed by site-directed mutagenesis to study the effect of ATP or ADP on heat shocked protein. DnaK-A303C and DnaK-H541C were expression through induction. Then the recombinant proteins were purified by using sulfate nickel affinity chromatography and anion exchange chromatography. The same amount of proteins was oxidized and the protein cross-linking was detected by SDS-PAGE. The results show that DnaK mutants formed dimer in the presence of ADP. However, the heterodimer was found under the condition of ATP. This study provides an experimental basis for understanding the synergism between the two subunits of heat shocked protein.

Key words: DnaK; ATP; dimer; mutant

热休克蛋白 70s(heat shock proteins, Hsp70s)是从细菌到哺乳动物中均广泛存在的一类保守的蛋白质家族,是维持蛋白内稳态所必需的分子伴侣^[1].在果蔬保鲜中,适当的热处理诱导产生的热休克蛋白能够提高果蔬抗冷性,降低冷害^[2],并能通过帮助调节果蔬采后的生理生化代谢^[3],保持果蔬原有品质并延长保鲜期^[4-5].同时在生物医学领域,热休克蛋白及其自身抗体可能参与了许多疾病的发病过程^[6].

DnaK 是大肠杆菌中的 Hsp70 蛋白质,能够促进蛋白合成、折叠、装配和运输并且参与变性蛋白的清除^[7]. DnaK 包括两个结构域,其中 N 末端是腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)水解酶结构域,C 末端是底物结合结构域. DnaK 与 ATP 的结合影响着 DnaK 蛋白质的结构,在没有 ATP 的情况下,纯化的 DnaK 形成无序的低聚物,当 DnaK 与 ATP 结合时 DnaK 更倾向于形成二聚体结构^[8].但是,其具体反应机理和生化意

收稿日期: 2015-06-07; 修回日期: 2015-09-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31571029);天津市应用基础与前沿技术研究计划资助项目(15JCYBJC30300,15JCQNJC46300,15JCTPJC55400)

作者简介: 刘清岱(1975—),男(满),河北保定人,副研究员, lqd@tust.edu.cn.

数字出版日期: 2015-12-10; 数字出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1355.N.20151210.1045.002.html>.

义并不清楚,因此有必要对 DnaK 进行纯化,研究 ATP 与腺苷二磷酸(ADP)对 DnaK 蛋白质二聚体的影响,进而为医学研究以及在食品科学领域中的应用提供基本理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒

受体菌为 *dnak* 基因缺失的大肠杆菌(*E. coli*)菌株 BB205(卡那霉素和氯霉素抗性),表达载体质粒为 pBB46(氨苄抗性),均由美国弗吉尼亚联邦大学医学院惠赠。

1.2 试剂和仪器

DNA 提取试剂盒, Qiagen 公司; 定点突变试剂盒, Agilent Technologies 公司; 蛋白质 marker, Biolabs 公司; 40% 丙烯酰胺、 β -巯基乙醇、苯甲基磺酸钠、十二烷基磺酸钠等试剂, Sigma 公司。

主要仪器包括 AKTA prime 蛋白质纯化系统、Ni 亲和层析柱和阴离子交换柱(HisTrap)、12500 SERIES 型摇床、1938 型超声仪、Mini-PROTEAN III 型电泳槽、RS232 型分光荧光计等。

1.3 突变体质粒的获得

根据 DnaK-ATP 的空间结构, 本实验构建了两个突变体, 即将第 303 位、541 位氨基酸突变为半胱氨酸(A303C 和 H541C)。突变后经纯化的 DNA 经测序, 序列分析正确后进行下一步实验。A303C, 正向引物为 5'-AAAGTGACTCGTTCAAACCTGGAAAGC-3', 反向引物为 5'-GCTTTCCAGTTTGAACGAGTCACTTT-3'; H541C, 正向引物为 5'-CTGGTACAGACTACCTGCTGCACAGC-3', 反向引物为 5'-GCTGTGCAGCAGGTAGTCTGTACCAG-3'。PCR 反应体系为 50 μ L 体系, PCR buffer 5 μ L, PCR solution 1.5 μ L, 脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)1 μ L, 模板 2 μ L, 5'引物 2 μ L, 3'引物 2 μ L, DNA 聚合酶 1 μ L。反应程序为 94 $^{\circ}$ C 模板预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 4 min, 68 $^{\circ}$ C 充分延伸 10 min, 用 4 $^{\circ}$ C 进行保存。

1.4 重组 DnaK 蛋白质的诱导表达

本实验所需的蛋白均是将 *dnak* 表达载体 pBB46 导入到 *dnak* 缺失菌株 BB205 中进行表达而得到的。挑取转化后的单菌落于 100 mL 含有卡那-氯霉素-氨苄的 LB 培养基中, 30 $^{\circ}$ C 过夜进行预培养, 经预培养后的菌体 1:100 接种于 1 L 培养基中进行扩

大培养, 待菌体密度 A_{600} 达到 0.6 时加入 1 mmol/L IPTG 进行诱导表达, 4 h 后诱导完成, 离心收集菌体并用 2 倍磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗菌体^[9]。

菌体充分重悬后加入 100 μ L 30 mg/mL 的裂解酶充分裂解菌体, 冰上孵育 30 min 后, 置于冰水浴中进行超声裂解。超声结束后, 将裂解后的菌体于 4 $^{\circ}$ C、20 000g 离心 1 h, 上清液经 0.22 μ m 滤膜过滤后作为蛋白质上样液。

1.5 DnaK 蛋白质的纯化

1.5.1 Ni 亲和层析纯化

采用 Ni 亲和柱进行亲和层析, 上样流量为 1 mL/min。上样结束后用裂解液 PBS 平衡洗脱柱子时, 流量为 5 mL/min, 洗脱体积为 300 mL, 之后用含 200 μ mol 的 ATP、10 mmol 醋酸镁的裂解液以同样流量清洗 100 mL^[10]。然后采用含 4%、8% 的洗脱液(2 \times PBS + 300 mmol/L NaCl + 400 mmol/L pH 为 7.5 的咪唑)对柱子进行梯度洗脱, 保持同样流量, 各洗 200 mL。最后进行梯度洗脱, 洗脱流量为 2 mL/min, 总体积为 120 mL, 洗脱液的含量从 8% 上升至 60%, 并收集样品, 每管 3 mL。洗脱结束后, 选取有紫外吸收值的样品, 取样, 利用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行检测^[11]。

收集蛋白浓度较高且杂蛋白较少的样品, 置于相对分子质量为 1.0×10^4 的透析袋中, 在 2 倍 PBS 中过夜透析, 同时加入 1 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)还原被氧化的蛋白。

1.5.2 阴离子交换柱进一步纯化

采用阳离子交换柱进一步纯化, 选择 5 mL/min 的上样流量。上样结束后用溶液 A(25 mmol/L pH 7.5 的 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(Hepes) + 50 mmol/L NaCl + 1 mmol/L DTT)冲洗柱子, 流量为 5 mL/min, 体积为 100 mL, 之后用 5% 溶液 B(25 mmol/L pH 7.5 Hepes + 1 mol/L NaCl + 1 mmol/L DTT)继续冲洗, 流量为 5 mL/min, 体积为 100 mL^[12]。然后进行蛋白梯度洗脱, 洗脱流量为 2 mL/min, 总体积为 120 mL, 洗脱液(25 mmol/L pH 7.5 Hepes + 1 mol/L NaCl + 1 mmol/L DTT)的含量从 5% 上升至 60%, 并收集样品, 每管 3 mL^[13]。洗脱后选取有紫外吸收值的样品进行 SDS-PAGE 检测其纯度, 然后收集样品, 浓缩, 并用洗脱液稀释, 蛋白最终质量浓度应高于 10 mg/mL。分装后用液氮速冻并保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中。

1.6 蛋白质交联实验

利用溶液 A(25 mmol/L pH 7.5 Hepes + 150 mmol/L KCl + 10 mmol/L Mg(OAc)₂, 10% 丙三

醇 + 5 mmol/L DTT)将蛋白稀释至 5 mg/mL,并在冰上孵育 2 h,以彻底除去产生的半胱氨酸残基^[14].然后将样品加到事先用溶液 B (25 mmol/L pH 7.5 Hepes + 150 mmol/L KCl + 10 mmol/L Mg(OAc)₂, 10% 丙三醇)平衡好的除盐柱子中,离心使蛋白通过柱子而除去 DTT^[15].用微量分光光度计测定蛋白质质量浓度,并用溶液 B 将蛋白稀释至 0.5 mg/mL,然后加入 100 μmol/L 的硫酸铜和 200 μmol/L 的邻菲罗啉开始氧化蛋白,氧化过程需在冰上进行,1 h 后加入终浓度为 5 mmol/L 的二乙烯三胺(DETA)终止反应.通过聚丙烯酰胺凝胶检测蛋白质交联结果^[16].

2 结果与讨论

2.1 定点突变 DNA 测序结果

为了研究 DnaK 蛋白质的结构,根据已经报道的 DnaK 的两个结构域功能,设计 DnaK-A303C、DnaK-H541C 两个蛋白质突变体,并构建带有突变位点的

表达载体.将经快速定点突变实验(Quickchange)之后所得到的质粒进行测序,图 1 为 DnaK-A303C 与 DnaK 野生型碱基序列比对图,上一排显示 DnaK-A303C 碱基序列,下一排显示 DnaK 碱基序列,其中第 303 位氨基酸对应由 907~909 位碱基编码,密码子 GCG 突变成为 UGU,对照氨基酸序列表,即由丙氨酸突变为半胱氨酸(DnaK-A303C).测序结果进行比对分析,所有结果全部正确,进行下一步实验.共得到 DnaK-A303C、DnaK-H541C 两个突变质粒.

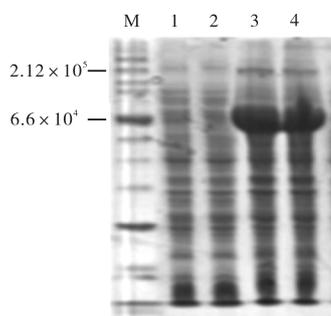
2.2 蛋白质的诱导表达

经 IPTG 诱导后的菌体,需要经 SDS-PAGE 检测表达并进行下一步纯化,结果如图 2 所示,即 DnaK-A303C 诱导表达前,蛋白质分布均匀(泳道 1、2).经 IPTG 诱导后,在大于 6.6×10^4 的位置有明显的诱导条带,此蛋白质诱导表达量占蛋白质总量的 50% 以上(泳道 3、4).通过计算迁移率可知此蛋白质相对分子质量约为 7.0×10^4 ,即为所需要的目标蛋白质 DnaK-A303C.



图 1 DnaK-A303C 与 DnaK 野生型测序碱基比对结果

Fig. 1 Sequence comparison of DnaK-A303C and the wild DnaK



M. 蛋白质 marker; 1,2. 诱导前样品; 3,4. 诱导后表达样品

图 2 DnaK-A303C 蛋白质表达电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE expression of DnaK-A303C

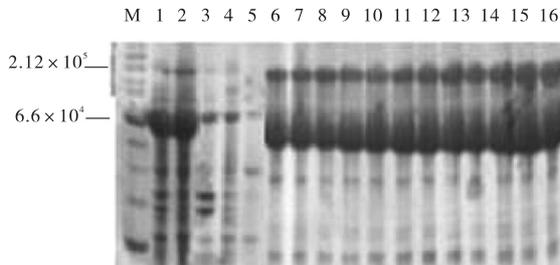
2.3 纯化结果

2.3.1 Ni 亲和层析纯化

Ni 离子柱亲和层析是一种高效的蛋白质纯化方法.本实验采用 DnaK 表达载体 pBB46,重组表达的 DnaK-A303C 蛋白质产物带有 6 个组氨酸标签,可以采用 Ni 亲和层析进行高效纯化.首先研究 DnaK-A303C 蛋白质在上清液和沉淀中的含量,比较图 3 中第 1、2、3 泳道样品,大部分目标蛋白质存在于上清液中,仅有少量目标蛋白质在沉淀中,说明重组表达的 DnaK-A303C 蛋白质溶解性极好.

重组蛋白质上柱后,分析上样流出液的组成,发现少量目标蛋白质进入流出液,说明目标蛋白质与

Ni 亲和柱结合的较好(图 3, 泳道 4). 第 5 泳道为裂解液冲洗柱子的流出液样品, 由 SDS-PAGE 显示, 有杂蛋白质脱离柱子. 洗脱液以每管 3 mL 的体积进行收集. 凝胶第 5 泳道直至 16 泳道, 所有样品均为洗脱所得到的样品.



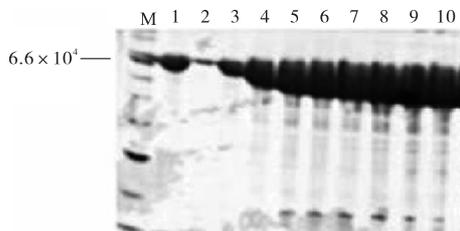
M. 蛋白质 marker; 1. 超声破碎后总蛋白质; 2. 离心后上清液中蛋白质; 3. 离心后重悬沉淀中不可溶蛋白质; 4. 上样流出液; 5—16. 裂解溶液洗出液

图 3 Ni亲和层析纯化蛋白质电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of Ni-clumn purification

2.3.2 离子交换纯化

由于 DnaK-A303C 蛋白质的等电点为 4.83, 根据阴、阳离子交换柱的不同性质, 继续使用阴离子交换柱对 2 × PBS 透析后的蛋白质进行进一步纯化. 首先分析了样品与阴离子交换柱的结合, 其中第 1 泳道是上样前的样品, 第 2 泳道为流出液, 对比第 1、2 泳道, 可以发现仅有少量蛋白质没有很好地与柱子结合, 随流出液流出(图 4). 从第 3 泳道至最后 10 泳道全部为梯度洗脱阴离子交换柱所得到的样品. 由电泳图可见, 阴离子交换柱对蛋白质的进一步纯化具有较好的效果, 特别是在 2.7×10^4 附近有一条杂蛋白质在较高的盐浓度时被洗脱下来, 与大部分目标蛋白质分离开来.



M. 蛋白质 marker; 1. 上样样品; 2. 上样流出液; 3—10. 洗脱样品

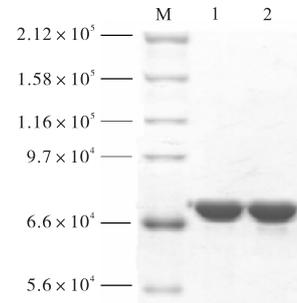
图 4 阴离子交换柱纯化蛋白质电泳图

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of Q-clumn purification

2.3.3 DnaK 突变体的纯化

将 DnaK 的两个突变体(DnaK-A303C、DnaK-H541C)依照两步层析的方法分别进行纯化, 并将所纯化的蛋白质同时稀释至 1 mg/mL, 用 7.5% 的 SDS-

PAGE 检测其纯度. 纯化结果如图 5 所示, DnaK 的两个突变体在 SDS-PAGE 条件下呈现单独的电泳带, 纯度达 85% 以上.



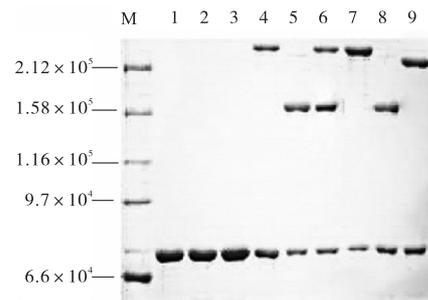
M. 蛋白质 marker; 1. DnaK-A303C; 2. DnaK-H541C

图 5 DnaK 突变蛋白质纯化结果

Fig. 5 Purified DnaK mutant proteins

2.4 蛋白质交联结果

为了研究 ATP 和 ADP 对 DnaK 二聚体的影响, 将两种蛋白质等量混合后, 采用铜-邻菲罗啉氧化 DnaK 蛋白之间的二硫键, 通过特殊二硫键的形成来研究二聚体的状态. 两个 DnaK 突变体在没有 ATP 或 ADP 存在下, 以相对分子质量约为 7.0×10^4 的蛋白质单体形式存在(图 6, 泳道 1—3). 在 ADP 条件下, DnaK-A303C 形成相对分子质量约为 2.2×10^5 同二聚体, DnaK-H541C 形成相对分子质量约为 1.6×10^5 同二聚体(图 6, 泳道 4、5). 当两种突变体混合氧化后, 同二聚体没有变化, 分别形成 2.2×10^5 和 1.6×10^5 两条电泳带(图 6, 泳道 6).



M. 蛋白质 marker; 1. DnaK-A303C; 2. DnaK-H541C; 3. DnaK-A303C + DnaK-H541C; 4. DnaK-A303C + ADP; 5. DnaK-H541C + ADP; 6. DnaK-A303C + DnaK-H541C + ADP; 7. DnaK-A303C + ATP; 8. DnaK-H541C + ATP; 9. DnaK-A303C + DnaK-H541C + ATP

图 6 DnaK 蛋白质交联结果

Fig. 6 Crosslinked DnaK protein

在 ATP 条件下, DnaK-A303C 和 DnaK-H541C 单独氧化后分别形成同二聚体. 但是两种突变体蛋白质混合后进行氧化, 同二聚体蛋白条带消失, 产生了相对分子质量约为 2.12×10^5 的电泳条带, 推测为

DnaK-A303C 和 DnaK-H541C 之间二硫键氧化后形成的异二聚体结构。

3 结 语

DnaK 是原核生物中的热休克蛋白质,具有分子伴侣功能,需要从 ATP 水解过程获取能量,以结合多肽底物并执行正常功能。本文通过构建两个 DnaK 的突变体,研究在 ATP 或 ADP 条件下,对 DnaK 二聚体性质的影响。研究表明两个 DnaK 突变体在 ADP 的存在下以同二聚体的形式存在,但是在 ATP 条件下能够形成异二聚体,ATP 能够影响 DnaK 蛋白质的结构。已有研究报道了 ATP 结合热休克蛋白后,诱导其发生变构效应实现对底物的结合^[8]。本文通过两个 DnaK 突变体在 ATP 条件下生成异二聚体,从生物化学的角度验证了该理论,对于揭示蛋白正确折叠和维持蛋白内稳态具有重要意义。DnaK 突变体蛋白质经 IPTG 高效诱导表达后,Ni 亲和层析柱纯化与阴离子交换柱纯化后可得到纯度达 85% 以上的蛋白质,符合生物化学实验的要求。

DnaK 突变体纯化是整个实验中最为基础,也最为关键的一步,因此需要在最大程度上提高蛋白的纯度,并且保持蛋白活性。具体应注意:蛋白质对理化因素的影响特别敏感,特别是 pH、温度等。因此应根据蛋白质自身的等电点,结合所用层析柱的特性,选择合适 pH 的缓冲液。同时,为了最大程度降低蛋白的变性和降解,整个纯化过程都在 4 °C 层析柜中进行。

参考文献:

- [1] Ellis J. Proteins as molecular chaperones[J]. Nature, 1987, 328(6129): 378-379.
- [2] 张晓勇,陈发河,吴光斌. 热激蛋白及其与果蔬的抗冷性关系[J]. 食品科学,2008,29(12): 726-730.
- [3] Wang C Y. Effect of moist hot air treatment on some postharvest quality attributes of strawberries[J]. Journal of Food Quality, 2000, 23(1): 51-59.
- [4] 杨志伟,胡波,尹秀华. 热处理对芒果贮藏特性影响的研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(13): 6131-6133.
- [5] McDonald R E, McCollum T G, Baldwin E A. Temperature of water heat treatments influences tomato fruit quality following low-temperature storage[J]. Postharvest Biology and Technology, 1999, 16(2): 147-155.
- [6] Lindquist S, Craig E. The heat-shock proteins[J]. Annual Review of Genetics, 1988, 22(1): 631-677.
- [7] Janson J C. Protein purification: Principles, high resolution methods, and applications[M]. Hoboken: Wiley, 2012.
- [8] Qi R F, Sarbeng E B, Liu Q, et al. Allosteric opening of the polypeptide-binding site when an Hsp70 binds ATP [J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2013, 20(7): 900-907.
- [9] Flaherty K M, Deluca F C, McKay D B. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70 K heat-shock cognate protein[J]. Nature, 1990, 346(6285): 623-628.
- [10] Diogo M M, Silva S, Cabral J M S, et al. Hydrophobic interaction chromatography of *Chromobacterium viscosum* lipase on polypropylene glycol immobilised on Sepharose[J]. Journal of Chromatography A, 1999, 849(2): 413-419.
- [11] Porath J, Carlsson J, Olsson I, et al. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation [J]. Nature, 1975, 258(5536): 598-599.
- [12] Wisniewska M, Karlberg T, Lehtio L, et al. Crystal structures of the ATPase domains of four human Hsp70 isoforms[J]. PLoS One, 2010, 5(1): 8625.
- [13] Porath J. Immobilized metal ion affinity chromatography [J]. Protein Expression and Purification, 1992, 3(4): 263-281.
- [14] Janson J C, Feeney R E, Whitaker J R. Importance of cross-linking reactions in proteins[J]. Advances in Cereal Science and Technology, 1988, 9: 21-43.
- [15] Singh H. Modification of food proteins by covalent cross-link[J]. Trends in Food Science and Technology, 1991, 2: 196-200.
- [16] Tissieres A, Mitchell H K, Tracy U M. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs[J]. Journal of Molecular Biology, 1974, 84(3): 389-398.

责任编辑: 郎婧