

## 毛竹 *KDO8PS* 的原核表达纯化及晶体生长

张凤雪, 徐英武, 张智俊, 肖冬长, 王超莉, 屈亚平

(浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300)

**摘要:** 3-deoxy-D-manno-octulosonate (KDO) 8-phosphate synthase (KDO8PS) [EC 4.1.2.16] 是 KDO 生物合成途径中的关键酶。采用逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 方法, 以毛竹 *Phyllostachys edulis* 新鲜实生苗为材料, 分离得到竹子 *KDO8PS* 基因。通过对不同物种来源的 *KDO8PS* 进行氨基酸序列比对分析和半定量 RT-PCR 技术对该基因进行组织特异性表达分析。将 *PeKDO8PS* 基因构建入原核表达载体 pET-28a, 并在大肠埃希菌 *Escherichia coli* 原核表达系统中获得了 *KDO8PS* 的可溶性高表达。经 nickel 亲和层析和分子筛纯化 2 种方法对表达蛋白进行纯化。结果分析表明: 该基因编码区全长 876 bp, 可编码 291 个氨基酸。*PeKDO8PS* 与拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 等植物来源的 *KDSA2* 的基因有很高序列一致性, 而与微生物来源的 *KDO8PS* 序列一致性较低。分析毛竹各组织中 *KDO8PS* 基因的表达结果表明, 该基因在根、茎和叶片中均有表达, 但在根中相对表达量较高, 此表达模式亦同拟南芥 *AtKDSA2* 类似。另外, 发现 *KDO8PS* 在溶液 (30 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8.0, 200 mmol·L<sup>-1</sup> 氯化钠) 中以二聚体的形式存在, 并且初步筛选出该酶晶体生长条件。此结果为 *PeKDO8PS* 蛋白的最终结构分析奠定了基础。图 6 参 12

**关键词:** 林木育种学; 毛竹; 脱氧辛糖酸-8-磷酸合酶; 组织特异性表达; 原核表达; 蛋白纯化; 结晶

中图分类号: S722.3

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2014)04-0515-06

## Expression, purification, and crystallization of *KDO8PS* from *Phyllostachys edulis*

ZHANG Fengxue, XU Yingwu, ZHANG Zhijun, XIAO Dongchang, WANG Chaoli, QU Yaping

(The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

**Abstract:** 3-deoxy-D-manno-octulosonate (KDO) 8-phosphate synthase (KDO8PS) [EC 4.1.2.16] is the rate-limiting enzyme in the KDO biosynthetic pathway. In this study, the *KDO8PS* gene (3-deoxy-d-manno-octulosonate-8-phosphate synthase) was cloned from fresh *Phyllostachys edulis* seedlings using Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Amino acid sequence alignment analysis of the KDO-8P synthase from different organisms and tissue specific expression analysis by semi-quantitative RT-PCR were conducted. After, *PeKDO8PS* was recombined into the expressed pET-28a vector and over expressed in *Escherichia coli*. Then the fusion protein was purified through using a two-steps purification strategy including nickel affinity and size exclusion chromatography (SEC). Results showed that the open reading frame was 876 bp encoding a protein consisting of 291 amino acid residues. The *PeKDO*-8P synthase had high similarity with KDO-8P synthase from plants such as *AtkdsA2* from *Arabidopsis thaliana*, while low identities from microorganism. The tissue specific expression analysis showed much higher gene expression in roots than in stems and leaves which was similar to *AtkdsA2* from *Arabidopsis thaliana*. Finally, the chromatography analysis showed that the *PeKDO8PS* protein mainly existed as dimer in 30 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8.0, 200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, from which the

收稿日期: 2013-10-21; 修回日期: 2014-01-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31270715); 浙江农林大学科研发展基金资助项目(2010FR072)

作者简介: 张凤雪, 从事生物技术与种质创新研究。E-mail: xiaoxue\_kuaille@163.com。通信作者: 张智俊, 副教授, 博士, 从事生物技术与种质创新研究。E-mail: 397942805@qq.com

growth of preliminary screening protein crystallization condition was obtained. These works provide the first step for its structure determination. [Ch, 6 fig. 12 ref.]

**Key words:** forest tree breeding; *Phyllostachys edulis*; 3-deoxy-D-manno-octulosonate (KDO)8-phosphate synthase (*KDO8PS*); tissue-specific expression; prokaryotic expression; protein crystallization; crystal

果胶是植物中的一种酸性多糖物质, 主要存在于植物的细胞壁和细胞内层, 为内部细胞的支撑物质。果胶类多糖包括三大类: 同型半乳糖醛酸聚糖(HG), 鼠李糖半乳糖醛酸聚糖 I (RG-I) 和鼠李糖半乳糖醛酸聚糖 II (RG-II)<sup>[1-2]</sup>。其中 RG-II 至少有 12 种不同成分的糖基残基组成, 而 2-酮-3-脱氧辛糖酸(KDO)是 RG-II 成分中很少见的八碳糖<sup>[3]</sup>, 其在进化过程中也很保守, 对花粉管的生长和伸长具有一定的作用<sup>[4-5]</sup>。KDO 的合成部位为细胞溶胶质, 合成过程中涉及到 5 种酶<sup>[6]</sup>。脱氧辛糖酸-8-磷酸合酶(3-Deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthase, *KDO8PS*, EC)是参与 KDO 合成代谢的关键酶之一, 催化浓缩磷酸烯醇式丙酮酸与  $\alpha$ -阿拉伯糖 5 磷酸产生 2-酮-3-脱氧辛糖 8 磷酸(3-Deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate), 并释放无机磷酸(Pi)。产物 2-酮-3-脱氧辛糖-8 磷酸是 2-酮-3-脱氧辛糖酸的前体。最初研究发现, 在所有的革兰氏阴性菌中(G<sup>-</sup>), 2-酮-3-脱氧辛糖酸是脂多糖组分中必需的八碳糖, 它连接类脂 A 与 O-特异侧链共同嵌入细胞壁的外膜上, 其中类脂 A 是内毒素的物质基础, O-抗原的多样性决定了 G<sup>-</sup> 表面抗原决定簇的多样性, 脂多糖(LPS)具有控制着某些物质进出细胞的部分选择性屏障功能<sup>[7]</sup>。此后又发现, 2-酮-3-脱氧辛糖酸也是高等植物细胞壁以及一些绿色藻类植物细胞壁多糖的成分<sup>[3,8]</sup>。大肠埃希菌 *Escherichia coli* 中, *KDO8PS* 晶体结构已经被解析, 它是一个不对称同源四聚体, 其中每个单体都含有( $\beta/\alpha$ )8 桶状折叠<sup>[9]</sup>, 在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中分离到 2 个编码 *KDO8PS* 的旁系同源基因 *AtkdsA1* 和 *AtkdsA2*<sup>[10]</sup>, 相对于茎干、幼嫩的叶、成熟的叶, 成熟花中 *AtkdsA2* 基因的表达量明显增高, 对花粉管的生长和伸长具有一定的作用, 并发现 *KDO8PS* 在水溶液中主要是以二聚体形式存在<sup>[11]</sup>。但是由于在植物中 *KDO8PS* 晶体结构尚未解析, 酶功能及催化作用机制、不同生物来源 *KDO8PS* 酶的催化特性等科学问题仍需深入研究。中国是竹子大国, 竹产业的发展蕴藏着巨大的经济效益, 其中食用竹笋拥有丰富的营养价值, 被认为是最佳的绿色食品、经济价值高<sup>[12]</sup>。在众多竹类中, 毛竹 *Phyllostachys edulis* 是中国竹类植物中分布范围最广、栽培面积最大、蓄积量最多、经济价值最高的一个材用和笋用竹种, 在中国林业生产中占有非常重要的地位。本研究拟克隆毛竹脱氧辛糖酸-8-磷酸合酶基因, 分析其在毛竹不同组织表达特异性, 进行进化系统分析和在原核细胞中过量表达, 经过亲和层析和分子筛层析纯化得到高纯度蛋白, 用于培养晶体。实验结果显示: 该蛋白在溶液中是以二聚体形式存在, 并筛选出微晶, 为解析其晶体结构和揭示其酶催化机制奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

克隆基因所用材料取自浙江农林大学亚热带森林培育国家重点实验室培育基地培养室内半年生毛竹 *Phyllostachys edulis* 实生苗; 分别取新鲜、无病虫害的根、茎和叶, 液氮速冻-80℃保存备用。

### 1.2 实验方法

1.2.1 试剂 核糖核酸(RNA)提取试剂/ Trizol 购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司; AMV 酶反转录试剂盒, *Bam*HI, *Eco*RI, T<sub>4</sub>DNA ligase 酶和 pMD18-T simple vector 购自宝生物工程有限公司; DNA 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自上海生工生物工程有限公司; 大肠埃希菌菌株 DH5 $\alpha$ , Rosetta™(DE3), BL21(DE3)和 pET-28a 质粒(浙江农林大学亚热带森林培育国家重点实验室培育基地改造后的质粒)载体为浙江农林大学亚热带森林培育国家重点实验室培育基地所保存。

1.2.2 毛竹幼苗 RNA 的提取和 cDNA 的合成 取新鲜、无病虫害的根、茎和叶, 液氮中迅速研磨成粉末, 采用 RNA 提取试剂盒提取 RNA, 用 DNaseI 酶消除 RNA 中的 DNA。分别以毛竹根、茎、叶以及总 RNA 为模板, 利用反转录试剂盒合成 cDNA 的第 1 条链。

1.2.3 *PeKDO8PS* 基因克隆 通过美国生物技术信息中心(NCBI)数据库获得双子叶植物拟南芥, 水稻 *Oryza sativa* 的 *KDO8PS* 基因序列, 根据该基因的开放阅读框(ORF)区以及氨基酸序列比对获得聚合酶

链式反应(PCR)引物: 上游 *Bam*HI 酶切位点引物 A 5'-CGGGATCCATGGATGCTTCGTCC-3'和下游 *Eco*RI 酶切位点引物 B 5'-GGAATTCTCATTCCTGGAATGGAGTGAGGT-3'(酶切位点用下划线显示), 由上海生物工程技术有限公司合成。以毛竹实生苗总 RNA 反转录成 cDNA 为模板, 利用 A 和 B 特异性引物进行扩增。PCR 产物电泳分析后经 DNA 胶回收试剂盒回收, 利用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 限制性内酶切双酶切 PCR 产物, 获得的目的 DNA 片段插入经同样酶切后的 pET-28a(+)表达载体, 得到 1 个 N-末端含有 6 个 His 亲和标签的重组子。将重组质粒经热击转化到大肠埃希菌菌株 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 经菌液 PCR 鉴定阳性克隆, 同时提取阳性克隆质粒进行双酶切和单酶切验证, 经生物工程技术有限公司测序。

1.2.4 *PeKDO8PS* 基因的组织特异性表达检测 采用 RT-PCR 法确定 *PeKDO8PS* 基因在不同器官中的表达量。以毛竹 *Actin* 基因作为内参, PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 5 min 1 个循环; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 58  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 45 s, 28 个循环; 72  $^{\circ}$ C 8 min, 可获得 150 bp 左右的 DNA 片段。目的基因(上游引物 5'-ATGGATGCTTCGTCCGTGG-3'和下游引物 5'-CTAGACCAGGACCACGGAAGG-3')经 RT-PCR 可获得 300 bp 左右的目的产物, PCR 反应条件选择循环次数在线性范围内, 且电泳效果好的次数作为最佳循环次数。

1.2.5 *PeKDO8PS* 的原核表达 重组表达质粒分别转化表达菌株 Rosetta<sup>TM</sup>(DE3) 和 BL21(DE3), 从抗卡那霉素平板上挑取单克隆, 接入 2 mL LB 液体培养基 (K<sup>+</sup>)37  $^{\circ}$ C 培养, 当菌体 OD600 达到 0.7 时, 其中一部分加入 0.4 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> IPTG 诱导, 在 37  $^{\circ}$ C 摇床上诱导 3 h, 收集菌体。另一部分加入 0.4 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> IPTG 诱导, 在 20  $^{\circ}$ C 摇床上诱导 14 h, 收集菌体。超声(开/关 5 s /6 s, 总时间 1 min, 功率 20%)破碎, SDS-PAGE 检测蛋白表达及可溶性情况。

1.2.6 *PeKDO8PS* 的大量表达纯化 将收集的菌体重悬在 25 mL 裂解缓冲液(30 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8.0, 200 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 氯化钠)中, 加入 500 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup> 甘油至终质量分数 50 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup>, 超声破碎(开/关 8 s /8 s, 总时间 15 min, 功率 40%), 4  $^{\circ}$ C, 17 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 30 min, 将上清转移至镍柱(预先用超声 buffer 平衡), 在冰上结合 0.5~1.0 h 后, 用 Buffer A(30 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8.0, 200 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 氯化钠, 50 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 咪唑)洗杂蛋白, 用 Bradford 试剂粗略检测至无颜色变化, Buffer B(30 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8.0, 200 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 氯化钠, 200 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 咪唑)洗脱目的蛋白。将洗脱的目的蛋白在 10 kDa 浓缩柱中浓缩至 500  $\mu$ L 左右。分子筛层析柱 Superose 12 10/300 GL 用 Buffer C(30 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8.0, 200 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 氯化钠)平衡, 将浓缩的蛋白上样, 根据出峰的顺序, 在目标蛋白峰处每 500  $\mu$ L 收集 1 管, SDS-PAGE 检测每管的纯度, 将纯度高的蛋白组份浓缩到 10 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>(紫外 280 nm 分光光度检测), -80  $^{\circ}$ C 保存。

1.2.7 蛋白晶体生长条件筛选 采用悬滴法初筛晶体的生长条件。初次筛选的条件是用 Emerald Biosystems 公司的 Wizard<sup>TM</sup> I, Wizard<sup>TM</sup> II, Wizard<sup>TM</sup> III 和 Wizard<sup>TM</sup> IV 试剂盒, 共有 192 个筛选条件。采用 24 孔蛋白结晶培养板, 池液 350  $\mu$ L, 蛋白液和池液以 1:1 比例混合, 点样, 密封盖玻片, 置于 20  $^{\circ}$ C 进行晶体培养。晶体生长情况可以在显微镜下观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因保守区片段的克隆、分析及原核表达载体的构建

经克隆后重组测序, 获得开放阅读框为 876 bp 的目的片段, 应用 Blast 在线软件与已报道的基因进行同源比较, 发现插入片段与脱氧辛糖酸-8-磷酸合酶基因家族 NeuB 超家族的保守区有较高的相似性, 其中与水稻的一致性达 95%, 与拟南芥脱氧辛糖酸-8-磷酸合酶基因一致性达 84%, 初步确定为毛竹脱氧辛糖酸-8-磷酸合酶基因的序列, 此基因编码 291 个氨基酸(图 1), 第 260~270 位为脱氧辛糖酸-8-磷酸合酶保守区, 等电点为 7.7, 分子量为 31 656.45 Da。

### 2.2 *PeKDO8PS* 氨基酸序列比较与系统进化树分析

通过 Blast 软件在线分析, 结果显示: *PeKDO8PS* 编码的氨基酸序列与单子叶植物的 *KDSA* 具有较高的一致性, 尤其与同是禾本科 Poaceae 的水稻\玉米 *Zea mays* 和二穗短柄草 *Brachypodium distachyon* 的一致性较高, 其中与水稻的一致性达 95%, 与小立碗藓属 *Physcomitrella* 的一致性为 76%。由此可见: *KDO8PS* 在进化系统中是比较保守的。采用 MEGA5 软件构建了基于 *KDSA* 编码氨基酸序列的系统进化树(图 2)。分析表明: 系统树明显分为三大支, 其中竹子与水稻、玉米位置较近, 位于同一个分支上; 与拟南芥位于同一大分支上, 与大肠埃希菌和风产杆菌分支最远。

```

1 M D A S S U A L L N Q L K A A Q P F F L L A G P N U I E S E
1 atggatgcttcgctccgtggcgctgttgaaccagctcaaggctgctcaaccattcttctgctagctgggcccaatgtgattgaatctgag
31 E H V L K M A K H I K G I T T K L G L P L U F K C S F D K A
91 gagcatgtcctgaagatggcacaacacatcaaaagcacaacagcttggctgcccacttgtgttcaagtcagctttgataaaagca
61 N R T S S K S F R G P G L E E G L K I L E K U K A T Y D L P
181 aatcgtacatcatcaaaatccttccgtggctcctggtctagaagaaggcctgaagatccttgaagggtgaaagctacatatgaccttcca
91 U U T D U H E S Y Q C E A U G R U U D I I Q I P A F L C R Q
271 gtggcactgatgtgcacgaaagctaccagtgtagctgttggaaagagttgttgacattatacaaatccagctttcttcttggccgcag
121 T D L L U A A A K T G K I I N I K K G Q F C A P S U M U N S
361 actgatcttctagtgccagctgtaagactggaaaaattatcaatatcaagaaggacaattctgtgctccttctgttatggtaactcc
151 U E K I R L A G N Q N U M U C E R G T M F G Y N D L I U D P
451 gtggagaaaattagacttctggaaatcaaaatgttatggctgtgagcgtggcaccatgttggctacaatgatctgattgtcgaccca
181 R N L E W L R E A N C P U U A D I T H A L Q Q P A G T K L D
541 aggaaccttgagtggttagggaagctaattgccagttgtagctgatataacgcctgcttacaacaaccagctggaacaaagcttgat
211 G G G U A S G G L R E L I P C I A R T S U A U G U D G I F M
631 ggtggagggtgttgaagtggggcttacgagaactaataccatgcattgcaagaacttctgttctgttggcgttgatggcattttcatg
241 E U H D P L N A P C D G P T Q W P L R N L E E L L E E L I
721 gaggtacatgatgatccctgaatgcaccatgcatggcccaactcaatggcgttgcgaatttggaggagctattggaggaattgatt
271 A I A R U T K G K K Q F K I D L T P F Q E *
811 gcaattgctcgagtcaccaagggaaagaagcagttcaagatcgacctcactccattccaggaataa 876
    
```

图1 毛竹 *PeKDO8PS* 基因 ORF 区及预测的氨基酸序列  
 Figure 1 ORF of *PeKDO8PS* gene and the corresponding amino acid sequence

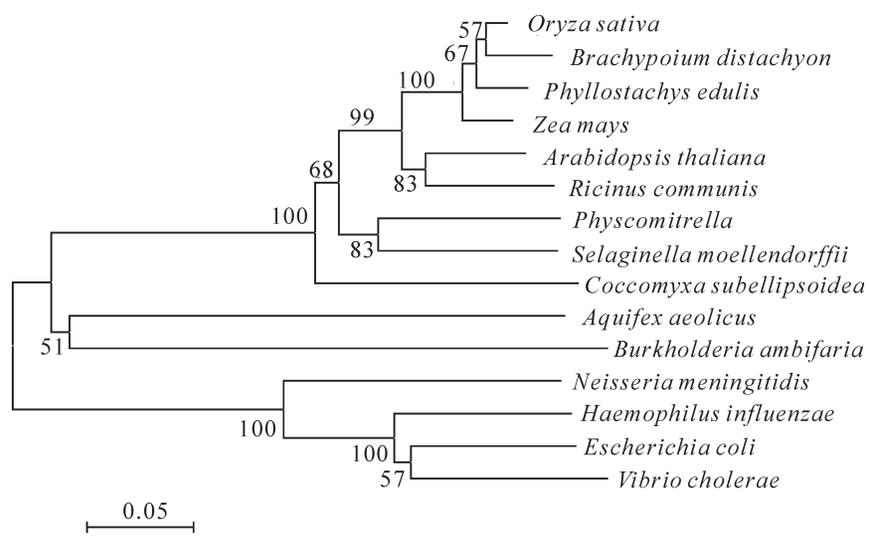


图2 基于不同植物 KDO8PS 氨基酸序列构建的系统树  
 Figure 2 Phylogenetic tree of KDO8PS from different plants

2.3 *PeKDO8PS* 基因组织表达特异性分析

分别提取毛竹根、茎和幼叶的 RNA，经分光光度法检测， $D(260)/D(280)$  为 1.8~2.0， $D(260)/D(280)$  大于 2.3，表明 RNA 质量高，可用于进一步分析。反转录 cDNA 时，用毛竹 *actin* 基因作为内参，调整 cDNA 用量和循环数，使目的基因扩增时内参基因的表达丰度一致。半定量 PCR 结果表明：*PeKDO8PS* 基因在根、茎和幼叶中均有表达，其中在根中的表达丰度最高，茎次之，在幼叶中的表达丰度最低(图3)。

2.4 *PeKDO8PS* 重组蛋白的纯化及表达检测

重组载体转化表达菌株 Rosetta™(DE3)和 BL21(DE3)感受态细胞，诱导表达后，取 10 mL 诱导菌体和未诱导菌体，超声破碎后，4 °C，17 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 min，分别取上清、沉淀，加入上标缓冲液，95 °C 变性后，SDS-PAGE 变性胶电泳分析，在电泳图谱发现 1 条明显的表达条带，接近理论分子量 33 kDa，并且对比分析发现表达菌株 Rosetta™(DE3)在 20 °C 培养温度下表达量相对高些，有助于减少重组蛋白包涵体的形成，故在后续试验中确定表达菌株 Rosetta™(DE3)在 20 °C 为重组蛋白诱导表达的最佳条件(图 4 左图)。

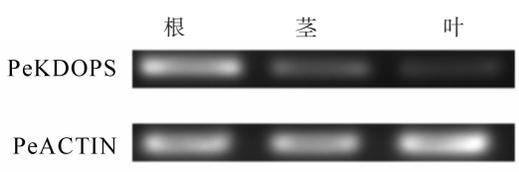
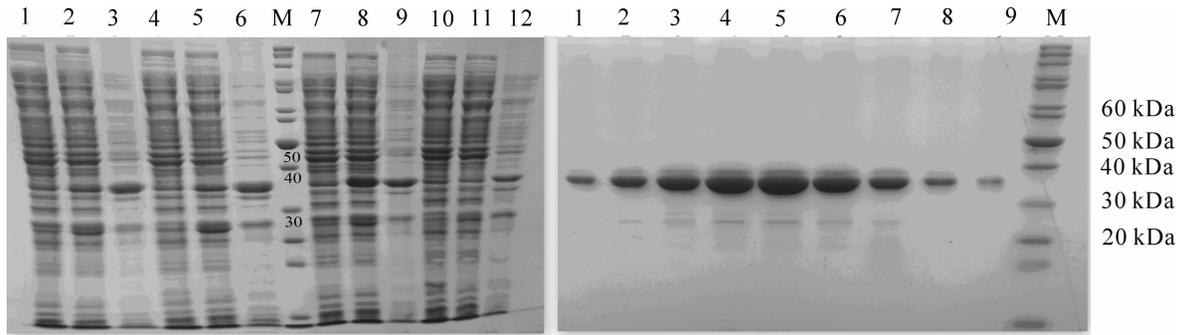


图3 毛竹 *KDO8PS* 基因在根、茎、叶中的表达  
 Figure 3 Tissue specific expression analysis of *PeKDO8PS* in root, stem, and leaf



M为蛋白标记物; 泳道1,4,7,10为未诱导上清; 泳道2,3,5,6为37 °C诱导, 其中泳道2,3在BL21(DE3)菌株中表达; 泳道5,6在Rosetta™(DE3)菌株中表达; 泳道8,9,11,12为20 °C表达, 其中泳道8,9在Rosetta™(DE3)菌株中表达; 泳道11,12在BL21(DE3)菌株中表达; 泳道2,5,8,11破碎离心后上清; 泳道3,6,9,12,破碎离心后沉淀(左图)。泳道1~9表示收集的第几管(右图)。

图 4 PeKDO8PS 分别在表达菌株 Rosetta™(DE3) 和 BL21(DE3) 中的表达(左图)和 PeKDO8PS 分子筛层析后, 分管收集蛋白 SDS-PAGE 电泳图(右图)

Figure 4 Prokaryotic expression of PeKDOPS in Rosetta™(DE3) and BL21(DE3) cells(left)and SDS-PAGE analysis of PeKDO8PS(right)

## 2.5 PeKDO8PS 蛋白的分子筛层析

因水溶液中 BSA 分子之间快速可逆自聚可形成少量的 BSA 二聚体, 所以 BSA 是一个很好的标记物。经 Superose 12 10/300 GL 层析后, 对比 BSA 洗脱体积和分子量关系可知, 目的蛋白峰位置所对应的分子量大小在 BSA 单体(66.43 kDa)位置, 初步确定其为二聚体(63.3 kDa, 图 5), 并且重组蛋白只出现明显的单峰, 说明蛋白的均一性很好, 收集目的蛋白, 500  $\mu$ L 为 1 管, 用于电泳检测和晶体生长。

## 2.6 PeKDO8PS 蛋白 SDS-PAGE 检测

分子筛层析后分管收集的蛋白变性后用 120  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  聚丙烯酰胺凝胶变性电泳检测, 结果显示蛋白分子量为 33 kDa(图 4 右图), 纯度为 95%以上, 可用于蛋白晶体生长。

## 2.7 PeKDO8PS 蛋白晶体筛选结果

收集的蛋白浓缩至 30  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 可用于蛋白晶体生长。2 d 后蛋白 2 种条件中长出了长条状晶体(图 6), 2 种条件分别是 100  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  PEG 3000, 0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cacodylate(pH 6.5), 0.2  $\cdot\text{L}^{-1}$  氯化镁; 2.5  $\cdot\text{L}^{-1}$  氯化钠, Na/K phosphate(pH 6.2)。但形状并不相同。经考马斯亮蓝试剂染色, 晶体为淡蓝色, 说明是蛋白晶体。优化工作正在进行中。

## 3 讨论

毛竹 *KDO8PS* 编码的蛋白序列与拟南芥 *KDO8PS* 的一致性达 84%, 与大肠埃希菌 *KDO8PS* 一致性达 49%, 同属于 NeuB 超家族。系统进化分析显示, 毛竹与水稻和玉米位置较近, 位于同一个分支上; 与拟南芥位于同一大分支上, 与大肠埃希菌和产杆杆菌 *Aquifex aeolicus* 分支最远。*KDO8PS* 基因在植物组织中的表达具有组织特异性。本研究中, *PeKDO8PS* 基因在根、茎和幼叶中均有表达, 在根中的表达丰度较高, 但在幼叶中的表达丰度最低, 这与拟南芥中 *KDSA2* 表达模式相同<sup>[10]</sup>, 进一步推测竹子 *KDO8PS* 基因与拟南芥中 *KDSA2* 基因可能具有相似功能。本研究目前得到的 *KDO8PS* 晶体较小, 结晶条件有待进一步优化。N 端 His 标签的引入也可能增加蛋白分子柔性, 不利于晶体生长<sup>[12]</sup>。后续实验将继续优化结晶条件, 并通过酶法切除 His 标签, 以提高晶体质量。

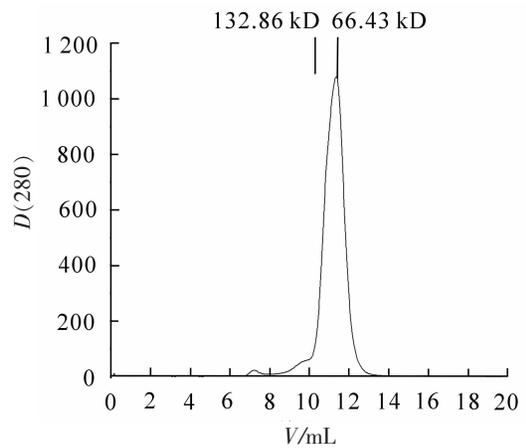
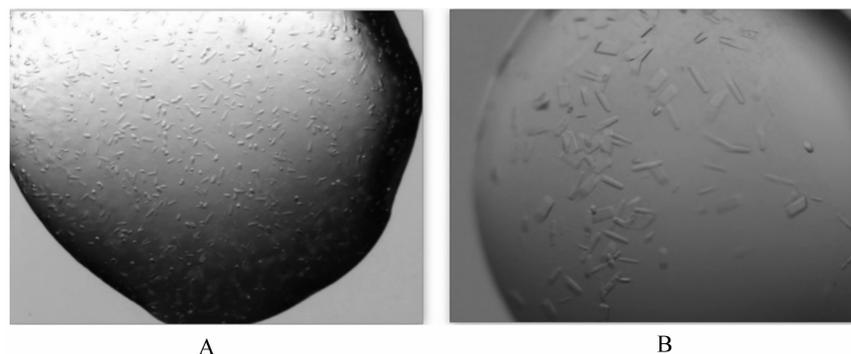


图 5 PeKDO8PS 分子筛层析图

Figure 5 Purification of PeKDO8PS by size exclusion chromatography



A.  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  PEG-3000 (pH 6.5),  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  cacodylate,  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氯化镁;  
B.  $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氯化钠 (pH 6.2) Na/K phosphate.

图6 PeKDO8PS蛋白晶体

Figure 6 Protein crystallization of PeKDO8PS

自2000年大肠埃希菌的KDO8PS结构公布后,又陆续有其他微生物的KDO8PS结构得到报道。但是植物来源KDO8PS结构至今仍未被解析,仅在拟南芥相关研究中表明KDO8PS在溶液中呈现二聚体的形式<sup>[11]</sup>。在本研究中出现一个有趣的现象:我们实验室首次获得拟南芥脱氧辛糖酸-8-磷酸合酶(KDO8PS)晶体,并解析其衍射精度 $2.1 \times 10^{-10} \text{ m}$ 的三维空间结构,其三维结构为不对称同源四聚体(文章待发表),这与大肠埃希菌的KDO8PS的不对称同源四聚体结构相似,虽与C-末端存在一定差异。但从分子筛以及戊二醛交联结果可知,拟南芥KDO8PS在溶液中以二聚体形式存在,这种情况可能是两两环抱的二体聚合,在X射线照射下呈现四聚体。而对于纯化过程中的毛竹KDO8PS,从分子筛的图形中估计也是以二聚体形式存在。因此,为了进一步了解单子叶和双子叶植物KDO8PS结构上的差异,还需获得毛竹KDO8PS较高精度的三维结构,并与拟南芥KDO8PS的三维结构进行比较。

#### 参考文献:

- [1] SCHOLS H A, BAKX E J, SCHIPPER D, *et al.* A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin [J]. *Carbohydrate Res*, 1995, **279**: 265 – 279.
- [2] WILLATS W G T, McCARTNEY L, MACKIE W, *et al.* Pectin: cell biology and prospects for functional analysis [J]. *Plant Mol Biol*, 2001, **47**: 9 – 27.
- [3] YORK W S, DARVILL A G, MCNEIL M, *et al.* 3-deoxy-d- manno-2-octulosonic acid (KDO) is a component of rhamnogalacturonan( II ) a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants [J]. *Carbohydrate Res*, 1985, **138** (1): 109 – 126.
- [4] SÉVENO M, SÉVENO-CARPENTIER E, VOXEUR A, *et al.* Characterization of a putative 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (Kdo) transferase gene from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Glycobiology*, 2010, **20**(5): 617 – 628.
- [5] LI Yi. *Studies of 3-Deoxy-D-manno-Octulosonate 8-Phosphate Phosphatase: Mechanistic Insights and a Gene Fusion Example* [M]. Ann Arbor: ProQuest, 2009.
- [6] DELMAS F, SÉVENO M, NORTHEY J G B, *et al.* The synthesis of the rhamnogalacturonan( II ) component 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (KDO) is required for pollen tube growth and elongation [J]. *J Exp Bot*, 2008, **59** (10): 2639 – 2647.
- [7] RAETZ C R H. Biochemistry of endotoxins [J]. *Ann Rev Biochem*, 1990, **59**(1): 129 – 170.
- [8] BECKER B, LOMMERSE J P M, MELKONIAN M, *et al.* The structure of an acidic trisaccharide component from a cell wall polysaccharide preparation of the green alga *Tetraselmis striata* Butcher [J]. *Carbohydrate Res*, 1995, **267** (2): 313 – 321.
- [9] RADAEV S, DASTIDAR P, PATEL M, *et al.* Structure and mechanism of 3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthase [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275**(13): 9476 – 9484.
- [10] LASKIN A I, BENNETT J W, GADD G M. *Advances in Applied Microbiology* [M]. San Diego: Elsevier Academic Press, 2003.
- [11] WU Jing, PATEL M, SUNDARAM A, *et al.* Functional and biochemical characterization of a recombinant *Arabidopsis thaliana* 3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthase [J]. *Biochem J*, 2004, **381**: 185 – 193.
- [12] BERGFORS T. Seeds to crystals [J]. *J Struct Biol*, 2003, **142**(1): 66 – 76.